

Interaktionen der adaptiven und angeborenen Immunität während der Pathogenese der chronischen Abstoßung experimenteller Lungentransplantate

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

im Fachbereich 08
Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Alena Evers
aus Amelunxen

Gießen 2014

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn
Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Stephanstraße 24, 35390 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Veronika Grau
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie
Sektion Experimentelle Chirurgie
Feulgenstraße 10-12, 35392 Gießen

Die vorliegende Arbeit wurde von der Landesoffensive zur Förderung wissenschaftlicher und ökonomischer Exzellenz (LOEWE) des Landes Hessen gefördert. Sie wurde in der Klinik für Allgemeine, Viszeral- und Thoraxchirurgie der Uniklinik Gießen (Prof. Dr. med. Winfried Padberg) in der Sektion Experimentelle Chirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau angefertigt. Die Betreuung der Arbeit im naturwissenschaftlichen Fachbereich wurde von Prof. Dr. rer. nat. Adriaan Dorresteijn übernommen. Das Thema und das Labor wurden von Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau gestellt, unter deren Betreuung die Arbeit entstand. Die Sektion Experimentelle Chirurgie ist Teil des ECCPS (Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System), des LOEWE-Zentrum UGMLC (Universities of Giessen and Marburg Lung Center) und des DZL (Deutsches Zentrum für Lungenforschung).

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten.“

Alena Evers

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1-20
1.1	Die Lunge der Säugetiere	1
1.2	Lungentransplantation	3
1.3	BOS	5
1.4	Histopathologische Definition der Abstoßung allogener Lungentransplantate	7
1.5	Experimentelle Modelle der chronischen Abstoßung von Lungentransplantaten	8
1.6	Ein neues experimentelles Modell zur Untersuchung von BOS	11
1.7	Toll-like Rezeptoren (TLR)	12
1.8	Nestin / regeneratives Potential	15
1.9	Immunreaktion gegen Alloantigene	16
1.10	Zielsetzung der Arbeit	19
2.	Material & Methoden	21-50
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	21
2.2	Reagenzien	23
2.3	Verwendete Software	26
2.4	Lösungen und Puffer	26
2.5	Methoden	31
2.5.1	Tiere	31
2.5.2	Lungentransplantation	32
2.5.3	Experimentelles Modell für die chronische Abstoßung von Lungentransplantaten	32
2.5.4	Homogenisieren von Lungengewebe	33
2.5.5	Organentnahme und Organfixierung	34
2.5.6	Einbettung von Organen in Paraffin	34
2.5.7	Vorbereitung von Objektträgern und histologischen Schnitten	35
2.5.7.1	Beschichtung von Objektträgern mit Gelatine	35
2.5.7.2	Beschichtung von Objektträgern mit 3-Aminopropyltriethoxysilan	35
2.5.7.3	Paraffinschnitte	35

2.5.7.4 Gefrierschnitte	36
2.5.8 Histologische Standardfärbungen	36
2.5.9 Immunhistochemische Färbungen	36
2.5.9.1 Vorbehandlung von Paraffinschnitten	36
2.5.9.2 Immunhistochemische Einzelfärbung	37
2.5.9.3 Immunhistochemische Doppelfärbung mit Antikörpern gegen das <i>proliferating cell nuclear antigen</i> (PCNA) und den α/β T-Zellrezeptor (R73)	38
2.5.9.4 Immunhistochemische Färbung mit dem Dako Verstärkungssystem (<i>CSAll Biotin-free Tyramide Signal Amplification System</i>)	39
2.5.9.5 HRP-Markierung von monoklonalen Mausantikörpern mit dem Invitrogen <i>Zenon Mouse IgG₁ Labeling Kit</i> (HRP-Markierungssystem)	39
2.5.10 Proteinbiochemie	41
2.5.10.1 Proteingehaltsbestimmung und Probenherstellung	41
2.5.10.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)	41
2.5.10.3 Transfer	43
2.5.10.4 Detektion von Antigenen	43
2.5.11 Extraktion von RNA aus Gewebe	43
2.5.12 Synthese von cDNA und Bestimmung der mRNA-Expression	44
2.5.12.1 Herstellung von cDNA	44
2.5.12.2 <i>Quantitative Reverse Transkriptase-PCR</i> (qRT-PCR)	45
2.5.12.3 Agarosegelelektrophorese	47
2.5.12.4 Sequenzierung	47
2.5.13 Aufarbeitung von Blut und <i>Mixed Lymphocyte Reaction</i> (MLR)	47
2.5.13.1 Aufarbeitung von Blutproben	47
2.5.13.2 <i>Mixed Lymphocyte Reaction</i> (MLR)	48
2.5.14 Statistik und Datenauswertung	50

3. Ergebnisse	51-74
3.1 Histologische Veränderungen des Lungengewebes am d 28	51
3.2 Verteilung von Glattmuskelaktin (α SMA) in Transplantaten am d 28	52
3.3 Verteilung von ED1- und ED2-positiven Zellen in Transplantaten am d 28	53
3.4 Expression von Genen des TLR-Systems am d 28	55
3.5 Erfolgreiche Immunhistochemie und WB mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 und TLR4	62
TLR2	62
TLR4	65
3.6 Verteilung von Nestin in Transplantaten am d 28	68
3.7 T-Zellproliferation in Milzen von Transplantatempfängern	70
3.8 T-Zellproliferation in Lungen allogener Transplantatempfänger	71
3.9 <i>Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)</i>	74
4. Diskussion	75-96
4.1 Histopathologie	75
4.2 Expression von Genen des TLR-Systems	79
4.3 Expression von Nestin	87
4.4 Proliferation von T-Zellen	89
4.5 Schlussfolgerung	96
5. Zusammenfassung	97
6. Summary	99
7. Literatur	101-116
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	117-120
7.1 Abbildungsverzeichnis	117
7.2 Tabellenverzeichnis	119
9. Anhang	121-137
10. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	138-139
11. Danksagung	140

Abkürzungen

AAT = α 1-Antitrypsin-Mangel
 α SMA = alpha-Glattmuskelaktin
Abb. = Abbildung
allo = allogene
AP = alkalische Phosphatase
APAAP = alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
APC = Antigen-präsentierende Zellen
AU = *arbitrary units*
BAL = Bronchoalveoläre Lavage
BN = Brown Norway
BO = *Bronchiolitis obliterans*
BOS = *Bronchiolitis obliterans Syndrom*
BrdU = 5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA = Rinderserumalbumin
Ca = Calcium
CD = *cluster of differentiation*
cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF = cystische Fibrose
CMV = Cytomegalovirus
CO₂ = Kohlendioxid
COPD = chronische obstruktive pulmonale Dysfunktion
CpG = Dinukleotid, das Cytosin-Phosphat-Guanin enthält
Ct = *cycle threshold*
CXCL = *chemokine (C-X-C motif) ligand*
DA = Dark Agouti
DAB = 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAMPs = *danger associated molecular patterns*
DKT = Dampfkochtopf
DNA = Desoxyribonukleinsäure
dsRNA = doppelsträngige RNA
EDTA = Ethylendiamintetraacetat
ELISA = *enzyme-linked immunosorbent assay*
F344 = Fischer-344
FEF = mittlere expiratorische Flussrate, Atemflusskurve
FEV₁ = ausgeatmetes Atemvolumen in 1 s
fpVCT = *flat panel volume computed tomography*
H&E = Hämalun & Eosin
HLA = *human leukocyte antigen*
HMGB1 = *high mobility group box 1*
H₂O₂ = Wasserstoffperoxid
HRP = Meerrettichperoxidase
HSP = *heat shock protein*
IE = internationale Einheiten
IFN = Interferon
Ig = Immunglobulin
IHC = Immunhistochemie
I- κ B = *inhibitor of kappa B*
IL = Interleukin
IL-1R1 = Typ I IL-1-Rezeptor

IPF = idiopathische Lungenfibrose
I/R-Schäden = Ischämie-/Reperfusionsschäden
IRAK = *interleukin-1 receptor-associated kinase-1*
ISHLT = *International Society of Heart and Lung Transplantation*
iso = isogen
iTreg = in der Peripherie induzierte Treg
KO = TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäuse
L = links, linke Lunge
LEW = Lewis
LEW L = linke Lunge unbehandelter LEW-Ratten
LEW R = rechte Lunge unbehandelter LEW-Ratten
LPS = Lipopolysaccharid
MCP-1 = *monocyte chemotactic protein-1*
MD2 = Ly96 (*lymphocyte antigen 96*; Synonym: MD2)
Mg = Magnesium
MHC = *major histocompatibility complex*
MLR = *mixed lymphocyte reaction*
mRNA = *messenger RNA*
MyD88 = *myeloid differentiation primary response 88*
n = Anzahl
Nestin = **neuroepithelial stem cell protein**
NF-κB = *nuclear factor kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*
NK = natürliche Killerzellen
NLR = *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NOD-like)*
NMS = Normalmausserum
NO = Stickstoffmonoxid
NOD = *nucleotide-binding oligomerization domain receptors*
Nr. = Nummer
NRS = Normalrattenserum
nTreg = natürliche, aus dem Thymus stammende Treg
OD = optische Dichte
p.a. = *pro analysi*
PAMPs = *pathogen associated molecular patterns*
PAP = Peroxidase anti-Peroxidase
PBGD = Hydroxymethylbilan-Synthase (Synonym: *Porphobilinogendeaminase*)
PBS = phosphatgepufferte Salzlösung
PBS/BSA = phosphatgepufferte Salzlösung (1x PAA) mit Zusatz von 1% BSA
PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*
PCR = Polymerase Kettenreaktion
PFA = Paraformaldehyd
PH = pulmonale Hypertonie
PHA-L = Phytohemagglutinin-L
PRR = *pattern recognition receptor*
qRT-PCR = quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
R = rechts, rechte Lunge
RNA = Ribonukleinsäure
RT = Raumtemperatur
SDS = Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE = SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
ssRNA = einzelsträngige RNA
Tab. = Tabelle

TAE = Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS = Tris-gepufferte Salzlösung
T_H = T-Helferzellen
THP-1 = humane Zelllinie einer akuten monozytären Leukämie
TIR = *toll-interleukin-1 receptor*
TIRAP = *toll-interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein*
TLR = Toll-like Rezeptor
TNF = Tumornekrosefaktor
TRAM = *translocation associated membrane protein 1*
Treg = regulatorische T-Zellen
TRIF = Rnf183 (*ring finger protein 138, E3 ubiquitin protein ligase*; Synonym: TRIF)
ü.N. = über Nacht
VB = Vorbehandlung
WB = *western blot*
WKY = Wistar Kyoto
WT = Wildtyp

Einheiten

°C = Grad Celsius
bp = Basenpaare
cm = Zentimeter
d = Tag
g = Gramm
h = Stunden
kDa = Kilodalton
l = Liter
M = molar
mM = Millimolar
mg = Milligramm
min = Minuten
ml = Milliliter
mm = Millimeter
N = normal
ng = Nanogramm
s = Sekunden
µg = Mikrogramm
µl = Mikroliter
µm = Mikrometer

1. Einleitung

1.1 Die Lunge der Säugetiere

Beim Menschen beginnen die oberen Atemwege mit der Nase und dem daran anschließenden Nasopharynx. Danach gelangt die eingeatmete Luft in die unteren Atemwege, die mit dem Larynx und der von Knorpelringen gestützten Trachea beginnen [27]. Zunächst zweigt sie sich in die zwei ebenfalls von Knorpel gestützten Hauptbronchen (*Bronchi principales*) auf, die jeweils in einen Lungenflügel führen [145]. Der rechte *Bronchus principalis* ist weitlumiger und kürzer als der linke. Trachea und Bronchen besitzen dreischichtige Wände, die aus der *Tunica mucosa*, der *Tunica fibromusculocartilaginea* und der *Tunica adventitia* bestehen [145]. Die *Tunica mucosa* teilt sich auf in die *Lamina epithelialis* mit respiratorischem Epithel und die drüsenhaltige *Lamina propria*, die aus einer kollagenfaserigen Bindegewebsschicht mit elastischen Fasern besteht [145]. Die *Tunica fibromusculocartilaginea* setzt sich aus Knorpelplatten sowie aus elastischen, kollagenen Strukturen und glatten Muskelzellen zwischen den Knorpelplatten zusammen [145]. Durch die *Tunica adventitia*, die aus lockerem Bindegewebe besteht, kann die Trachea beim Schlucken oder Husten verschoben werden [145]. Das Zusammenwirken dieser Schichten sichert, dass die Atemwege offen bleiben, angefeuchtet sind und gereinigt werden, die Atemluft angewärmt wird und insgesamt sowohl Festigkeit, als auch Dehnbarkeit und Flexibilität gewährleistet sind [145].

Aus den Hauptbronchen führen die *Bronchi lobares* jeweils in die pulmonalen Lappen (*Lobi pulmonis*), die in der menschlichen Lunge aus drei Lappen im rechten Lungenflügel und zwei Lappen im linken Lungenflügel bestehen, die von den *Fissurae interlobares* getrennt werden [145]. In diesen Lungenlappen verzweigen sich die *Bronchi lobares* der Anzahl der Lungensegmente entsprechend weiter in die *Bronchi segmentales* [145]. Die Wandstruktur ähnelt bis hierhin der der Hauptbronchen, jedoch nimmt der Knorpelanteil immer weiter ab und wird durch eine ringförmige Schicht glatter Muskulatur ersetzt [145]. Durch eine dichotome Teilung aus den vorhergehenden Bronchen entstehen die Bronchioli, die weder Knorpel noch Drüsen in ihren Wänden enthalten [145]. Mit jeder Verzweigung werden sie immer kleiner und auch das respiratorische Epithel wird niedriger [145]. In den *Bronchioli terminales* findet man ein einschichtiges respiratorisches Epithel mit eingestreuten sezernierenden Clara-Zellen [129]. Darauf folgen die respiratorischen Abschnitte mit

den *Bronchioli respiratorii*, den *Ductus alveolares* und den Alveolen, in denen der Atemgaswechsel stattfindet [145]. In den *Bronchioli respiratorii* nimmt die Anzahl der Zilien nach distal ab, der restliche Aufbau der Wände entspricht dem der *Bronchioli terminales* [145]. Ab hier kommen zunächst einzelne Alveolen vor, deren Anzahl zunimmt. Aus den *Bronchioli respiratorii* gehen mehrere Alveolargänge ab, die *Ductus alveolares* [145]. Sie beginnen dort, wo mehrere Alveolen so nebeneinander liegen, dass nur noch Eingänge in Alveolen oder zu den *Sacculi alveolares* (Vorhöfe zu Alveolengruppen) bleiben, die schließlich in den Alveolen blind enden [188].

Die Alveoli werden durch *Septa interalveolaria* voneinander getrennt. Die innere Oberfläche der Lunge wird durch die Alveolen auf etwa 140 m² vergrößert [145]. In den *Septa interalveolaria*, die von zahlreichen Kapillaren durchzogen werden, finden sich neben einem elastischen Netzwerk aus kollagenen und retikulären Bindegewebsfasern zudem Fibroblasten und für die Abwehr verantwortliche Leukozyten wie Makrophagen und Mastzellen [145].

Das Epithel der Alveolen enthält Alveolarepithelzellen vom Typ I und II. Die Typ I-Zellen sind flach und bilden eine kontinuierliche Zellschicht mit Einsenkungen, die der Mikropinozytose dienen [145]. Typ II-Zellen sind annähernd kubisch und treten einzeln oder in kleineren Gruppen auf. Sie teilen sich stetig und ersetzen Typ I-Zellen [145]. Die Typ II-Zellen sezernieren das „Surfactant“, einen Protein-Phospholipid-Flüssigkeitsfilm, der die Alveolaroberfläche überzieht [31, 55]. Dieser Flüssigkeitsfilm wird von Typ I-Zellen und Makrophagen resorbiert und muss deshalb ständig von Typ II-Zellen und Clara-Zellen ersetzt werden [145].

An den Stellen, wo die Basalmembranen von Alveolarepithel und Kapillarendothelzelle verschmelzen, befindet sich die Blut-Luft-Schranke. Hier ist die Diffusionsstrecke für den Gasaustausch am geringsten (0,5 µm) [145]. Neben den verschmolzenen Basalmembranen von Alveolarepithel und Kapillarendothelzelle, sind das Zytoplasma der Endothelzellen und der Typ I-Zellen, sowie das „Surfactant“ Bestandteile der Blut-Luft-Schranke [145]. Wenn Schwebeteilchen bis in die Alveolen gelangen, wandern Alveolarmakrophagen aus den Lungenkapillaren ein, um diese Fremdpartikel zu phagozytieren [145]. Danach wandern sie in die mit respiratorischem Epithel ausgestatteten Atemwege und können dort mit der Schleimschicht abtransportiert werden [102]. Alternativ wird eingeatmeter Staub in das Bindegewebe der Alveolarwände und von da vor allem ins interlobuläre Bindegewebe transportiert, wo er von Makrophagen phagozytiert und abgelagert wird

(graue Verfärbung der Lunge) [145]. Über Lymphgefäße können Feinstoffe ebenfalls abtransportiert werden und sich in den regionären Lymphknoten ablagern, was mit der Zeit auch hier zu einer schwarzen Verfärbung führt [145].

Andere Säugetierlungen funktionieren nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben. Ein anatomischer Unterschied zwischen menschlicher Lunge und der der Ratte (*Rattus norvegicus*) liegt in der Aufteilung der Lungenflügel. Der linke Lungenflügel besteht aus nur einem Lappen, während der rechte sich in fünf Lappen teilt [157].

Die oben beschriebenen Abwehrmechanismen bieten der Lunge einen effektiven Schutz gegen Fremdkörper, Bakterien und Viren aus der Atemluft. Durch verschiedene Krankheiten kann jedoch die Feinstruktur der Lunge und letztendlich das gesamte Organ zerstört werden, so dass eine Lungentransplantation oft die einzige lebensverlängernde Maßnahme ist.

1.2 Lungentransplantation

1963 wurde von James Hardy das erste Mal eine Lunge (Herz-Lungen-Transplantation) von einem Menschen auf einen anderen übertragen [65]. Jedoch blieb das Verfahren bis in die 1980er Jahre experimentell und die meisten Patienten verstarben nach wenigen Wochen. Die bis dahin eingesetzten Immunsuppressiva (Azathioprin, Prednisolon) führten zu unzureichenden Ergebnissen [62]. Erst mit der Einführung des Immunsuppressivums Ciclosporin 1981, das die Abstoßung des fremden Organs verhinderte, änderte sich dieser Zustand in den folgenden Jahren rasant. 1983 konnte von Cooper in Toronto der erste Lungenflügel transplantiert werden, der auch im Langzeitverlauf stabil war [32, 35]. Weltweit werden laut der *International Society of Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) pro Jahr momentan etwa 2.000 Lungen transplantiert [30]. Die größten Limitierungen liegen in der geringen Anzahl von geeigneten Spenderorganen und in der relativ schlechten Prognose nach einer Lungentransplantation. Deshalb kommen nur Patienten mit sehr schwerwiegenden Krankheitsbildern im Endstadium für eine Transplantation in Frage. Dazu gehören einerseits akute (z.B. nach einer Influenza) oder chronische Krankheitsverläufe wie obstruktive pulmonale Dysfunktion (COPD), Lungenemphysem, cystische Fibrose (CF), idiopathische Lungenfibrose (IPF), α 1-Antitrypsin-Mangel (AAT), pulmonale Hypertonie (PH), Sarkoidose und *Bronchiolitis obliterans* (BO) [30]. Nach der Transplantation sind die regelmäßige Einnahme von

Immunsuppressiva und lebenslange Kontrolluntersuchungen ausschlaggebend für das Langzeitüberleben der Patienten.

Trotz einiger Forschungserfolge in Bezug auf Therapieansätze nach einer Lungentransplantation ist das Überleben der Patienten im Langzeitverlauf weiterhin stark limitiert. Fünf Jahre nach einer Lungentransplantation sind ca. 50% der transplantierten Organe nicht mehr funktionsfähig (ISHLT). Zehn Jahre nach der Transplantation liegt dieser Wert schon bei 70% (siehe Abb. 1) [30].

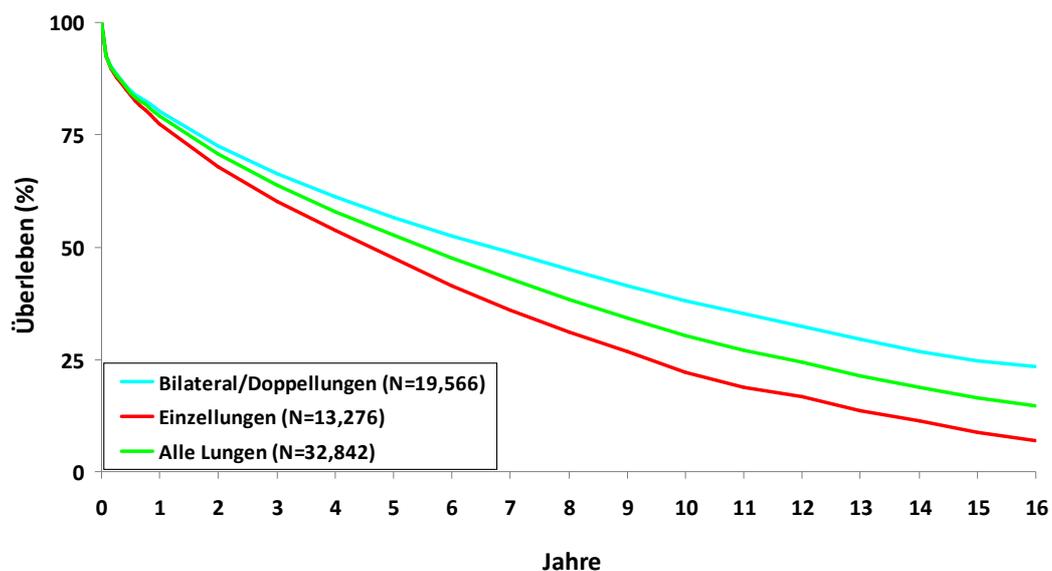


Abb. 1: Überleben nach Lungentransplantation (1994–2010). Für Doppellungen-(blau) und Einzellungentransplantation (rot) bzw. für alle Lungentransplantationen (grün), verändert nach ISHLT 2012 [30].

Bei einem Transplantatversagen wäre eine erneute Transplantation nötig, um das Überleben der Patienten zu sichern. Aufgrund des Organmangels und des Zustandes der Patienten wird dieser Schritt jedoch nur in den wenigsten Fällen gegangen. Zu Kontraindikationen für die erneute Transplantation nach einer Lungentransplantation zählen z.B. Nierenschäden (durch die jahrelange Einnahme von Immunsuppressiva), kardiovaskuläre, metabolische (*Diabetes mellitus*, Adipositas), hämatologische oder onkologische Probleme [39].

Auf der Liste des ISHLT der für den Tod von Lungentransplantatempfängern verantwortlichen Ursachen, treten vor allem im ersten Jahr nach der Transplantation akute Abstoßung, Transplantatversagen und technische Probleme in den Vordergrund (siehe Tab. 1). Im Langzeitverlauf, gehört vor allem das *Bronchiolitis obliterans Syndrom* (BOS) zu den für den Tod und das Versagen des Organs verantwortlichen Ursachen. BOS wird in wenigen Fällen bereits ein Jahr nach der

Transplantation diagnostiziert, nimmt aber in den folgenden Jahren massiv an Bedeutung zu (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Gründe für den Tod nach einer Lungentransplantation im Verlauf von zehn Jahren (Verändert nach einer Studie der ISHLT in den Jahren 1992-2008) [30].

Todesursache		0 Tage – 1 Jahr	1 – 3 Jahre	3 – 5 Jahre	5-10 Jahre
		(n = 4.731) Anzahl	(n = 2.776) Anzahl	(n = 1.593) Anzahl	(n = 1.797) Anzahl
Bronchiolitis obliterans		149	702	460	444
Akute Abstoßung		126	45	11	14
Bösartiger Tumor		171	234	161	220
Infektionen	CMV	92	27	5	3
	nicht CMV	1.424	640	303	322
Transplantatversagen		1.014	524	301	340
Kardiovaskulär		313	102	74	89
Technisch		196	18	6	12
Andere		1.246	484	272	353

Grau hinterlegt: alle Daten für *Bronchiolitis obliterans* (BO), Zahlen in fett: Höchste Anzahl von Todesfällen einer Todesursache im Zeitverlauf. CMV = Cytomegalovirus, BO = *Bronchiolitis obliterans*, ISHLT = *International Society of Heart and Lung Transplantation*.

1.3 BOS

BO steht für das histopathologisch diagnostizierbare Bild bei BOS. Hier kommt es zu fibrotischen Obliterationen der kleinen Atemwege in dem transplantierten Organ, die bis zu einem partiellen oder kompletten Verschluss des Lumens führen können [10, 30, 156]. Zusätzlich sind in den Transplantaten perivaskuläre und interstitielle Infiltrate mononukleärer Zellen, sowie Vaskulopathien zu beobachten [10, 46, 156]. Die Biopsien, die bei Patienten nach einer Lungentransplantation regelmäßig durchgeführt werden, sind meist zu klein, um eine Diagnose zu ermöglichen. Das Vorhandensein von BO kann oft erst nach dem Tod oder nach einer Re-Transplantation pathologisch geklärt werden.

Aus klinischer Sicht wird BOS nach der Transplantation über die Lungenfunktionen (FEV₁ und FEF) des Transplantatempfängers definiert (siehe Tab. 2). Zum einen wird

es durch eine Überprüfung des FEV₁-Wertes bestimmt, der das ausgeatmete Atemvolumen in einer s, im Vergleich zum Ausgangswert (Mittelwert der zwei besten FEV₁-Werte nach Transplantation, im Abstand von mindestens drei Wochen gemessen) angibt. Sinkt dieser Wert unter 80%, sind die Kriterien für die Diagnose BOS erfüllt. Zum anderen wird seit 2001 als weiteres Kriterium für die Diagnose von BOS in sehr frühen Stadien der FEF₂₅₋₇₅ hinzugezogen [46]. Dieser Wert steht für die mittlere expiratorische Flussrate (Atemflusskurve, *mid-expiratory flow rate*), der bei BOS 75% unterschreitet (Tab. 2) [46].

Tab. 2: Klassifizierung des *Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS)* (Verändert nach Estenne et al. (2002) [46]).

Stadium	FEV ₁ (ausgeatmetes Atemvolumen in 1 s), FEF (mittlere expiratorische Flussrate, Atemflusskurve)
BOS 0	FEV ₁ > 90% des Ausgangswertes <u>und</u> FEF > 75% des Ausgangswertes
BOS 0p	FEV ₁ 81 bis 90% des Ausgangswertes <u>und/oder</u> FEF ≤ 75%
BOS 1	FEV ₁ 66 bis 80% des Ausgangswertes
BOS 2	FEV ₁ 51 bis 65% des Ausgangswertes
BOS 3	FEV ₁ ≤ 50% des Ausgangswertes

Um ein besseres Überleben der Patienten zu ermöglichen, ist es unerlässlich, mehr über die Pathogenese von BOS zu erfahren und damit neue Behandlungs- und Präventionsmaßnahmen ergreifen zu können. In unserem experimentellen Modell soll die Pathogenese von BOS genauer betrachtet werden.

Über die Pathogenese von BOS ist erst sehr wenig bekannt. Man geht davon aus, dass BOS chronische Abstoßung ist, die durch verschiedene Risikofaktoren getriggert oder verstärkt wird: Dazu gehören alloantigenabhängige Risikofaktoren, HLA-*mismatch* und akute Abstoßungsepisoden, sowie alloantigenunabhängige Faktoren wie Ischämie-/Reperfusionsschäden (I/R-Schäden), Säureaspiration durch gastrooesophagealen Reflux, Rauchen, Luftverschmutzung oder respiratorische Infektionen durch Viren, Bakterien und Pilze [10, 50, 149].

1.4 Histopathologische Definition der Abstoßung allogener Lungentransplantate

Um die histologische Diagnose von BOS und die Beschreibung einer Abstoßung pulmonaler allogener Transplantate zu vereinheitlichen, wurde zuerst 1990 von einer Gruppe innerhalb des ISHLT eine Klassifizierung herausgegeben, die 1996 [199] und 2007 überarbeitet wurde [156]. Das Ausmaß der Abstoßung wird über drei Kategorien definiert: Akute Abstoßung (A0-4), Entzündung der Atemwege (B0-X), chronische Atemwegsabstoßung BO (C0-1) und die chronische vaskuläre Abstoßung (D) [46, 156]. In der Tab. 3 sind die einzelnen Punkte aufgelistet.

Bei der akuten Abstoßung (A) sind fünf Grade möglich, von 0 (keine Abstoßung) über 1 (minimal), 2 (mild), 3 (moderat) bis zu 4 (stark). Diese Definitionen beziehen sich nur auf das Vorhandensein von mononukleären Infiltraten im perivaskulären und interstitiellen Raum der untersuchten Lunge [46, 156]. In der stärksten Form der akuten Abstoßung treten neben den erwähnten Infiltraten zudem Endothelialitis (subendotheliale Infiltration) und nekrotische Bereiche auf [156].

Die Definition der Atemwegsentszündung (B) bezieht sich ausschließlich auf die kleinen Atemwege, die Bronchiolen. Sie kann nur dann angewendet werden, wenn keine Infektion besteht. Der Grad B0 wird als keine Entzündung beschrieben, B1R zeigt eine schwache Entzündung, bei der vermehrt mononukleäre Zellen und/oder eosinophile Granulozyten in der Submucosa von Bronchiolen zu finden sind. In diesem Entzündungsgrad sind noch keine Epithelschäden und keine intraepithelialen Infiltrate von Lymphozyten zu beobachten. Dies ist jedoch im Grad B2R zu finden, mit partiellen Epithelnekrosen und einer deutlicheren Infiltration der Submucosa, die hier zusätzlich neutrophile Granulozyten enthalten kann. Beim Grad BX sind die Veränderungen des Gewebes so stark (Artefakte, Probleme bei der Probennahme, Infektionen usw.), dass eine Klassifizierung nicht mehr möglich ist.

Chronische Abstoßung wird über Anwesenheit (C1) oder Abwesenheit (C0) von BO definiert. Als BO werden Bereiche der Submucosa beschrieben, die so stark durch hyaline fibrotische Schichten verdichtet sind, dass es zu einem partiellen oder kompletten Verschluss des Atemweglumens kommt [46, 156]. Das Auftreten einer chronischen vaskulären Abstoßung (D) bezieht sich auf fibrotische Verdickungen der Intima von Arterien und Venen im Transplantat.

Tab. 3: Klassifizierung der pulmonalen allogenen Transplantatabstoßung (verändert nach der Formulierung des ISHLT (2007) [30]).

A: Akute Abstoßung	Grad 0 – keine
	Grad 1 – minimal
	Grad 2 – mild
	Grad 3 – moderat
	Grad 4 – stark
B: Atemwegsentzündung	Grad 0 – keine
	Grad 1R – niedriger Grad
	Grad 2R – hoher Grad
	Grad X – nicht einzustufen
C: Chronische Atemwegsabstoßung – Obliterative Bronchiolitis	0 – abwesend
	1 – nachweisbar
D: Chronische vaskuläre Abstoßung – beschleunigte vaskuläre Transplantatsklerose	

1.5 Experimentelle Modelle der chronischen Abstoßung von Lungentransplantaten

Bis heute haben sich verschiedene Arbeitsgruppen bemüht, ein geeignetes tierexperimentelles Modell zur Untersuchung von BOS zu etablieren [78, 142]. Das Ziel ist, einen besseren Einblick in die Pathogenese von BOS zu erhalten und so mögliche Therapieansätze zur Prävention und Heilung von BOS im Menschen zu finden.

Die technisch einfachsten Modelle, sind die der heterotopen, orthotopen oder semiorthotopen Tracheatransplantation [43, 49, 67, 142]. Die Aussagekraft von Tracheatransplantaten als Modelle des BOS ist jedoch limitiert: Tracheen kleiner Nager ähneln bestenfalls kleinen Bronchen der menschlichen Lunge, jedoch nicht den Bronchiolen, die bei BOS obliterieren. Die heterotope Transplantation einer Trachea kann sowohl subcutan [67] oder in das Omentum eines Empfängers durchgeführt werden, außerdem gibt es die Variante der intrapulmonalen Tracheatransplantation [43]. Selbstverständlich ermöglichen diese Modelle keine Aussagen über Veränderungen im Lungenparenchym und den Blutgefäßen. Da die Tracheen zunächst nicht vaskularisiert sind, sondern erst nach der Transplantation an kleine Blutgefäße des Empfängers angeschlossen werden, kann auch das mit BOS einhergehende *Gefäßremodeling* in diesen Modellen nicht untersucht werden [78, 142]. Abgesehen von der kritisch zu betrachtenden Aussagekraft dieser experimentellen Modelle in Bezug auf BOS, sind sie gut reproduzierbar und bieten

Möglichkeiten zur Untersuchung von allospezifischen Reaktionen, der Schädigung oder Regeneration des Epithels, der Angiogenese und des Geweberemodelings [78, 142].

Nach einer allogenen intrapulmonalen Tracheatransplantation wie im experimentellen Modell von Sato et al. [2008] beschrieben, können BO-artige Läsionen beobachtet werden [140]. Diese entstehen durch eine Infiltration von Lymphozyten und Apoptose des regenerierenden Atemwegsepithels, gefolgt von Migration und Proliferation von Fibroblasten/Myofibroblasten, die große Mengen extrazellulärer Matrix produzieren und so zu einer kompletten Obliteration des Atemwegslumens führen [140, 142]. In isogenen Transplantaten ist nach einem durch I/R-Schäden erzeugten vorläufigen Verlust des Epithels eine anschließende Regeneration bei Erhaltung des Lumens zu sehen [140, 142].

Eine weitere Variante ist die orthotope oder semiorthotope Tracheatransplantation nach der das Transplantat von Luft durchströmt ist [73, 74, 110]. In diesen experimentellen Modellen werden die Epithelzellen des allogenen Spenders zerstört und das Epithel wird durch in die Trachea wandernde Epithelzellen des Empfängers ersetzt. Im Verlauf entsteht eine leichte subepitheliale Fibrose während das Atemwegslumen offen bleibt [142]. Die beschriebenen Modelle wurden zunächst in der Ratte etabliert und werden mittlerweile auch in der Maus verwendet. Der Einsatz transgener und gendefizienter Mäuse ist in allen Modellen zur Tracheatransplantation problemlos anwendbar. Damit bietet sich die Möglichkeit grundsätzliche molekulare Mechanismen zu analysieren, die für die Pathogenese von BO relevant sein können [85, 110, 128].

Andere experimentelle Modelle verwenden die orthotope einseitige Lungentransplantation, die technisch einer menschlichen Transplantation ähnelt. Eines der vielversprechendsten experimentellen Modelle ist hier das von Matsumura et al. [1995] beschriebene, in dem linke orthotope Lungentransplantationen von Fischer 344 (F344) auf Wistar Kyoto (WKY) ohne anschließende Behandlung mit Immunsuppressiva durchgeführt werden [104]. Diese beiden Stämme unterscheiden sich im Locus RT₁C des *major histocompatibility complex* (MHC) *class I*. Zu diesem experimentellen Modell gibt es jedoch sehr unterschiedliche Ergebnisse aus verschiedenen Arbeitsgruppen [69, 78, 142, 184].

Unsere Arbeitsgruppe zeigt, dass nach einer Lungentransplantation in der oben genannten Stammkombination in etwa 50% der Transplantatempfänger zwei

Wochen nach der Transplantation eine akute Abstoßung des Transplantats auftritt. Diese Lungen sind jedoch bis zum d 98 belüftet und zeigen kein BO. In der zweiten Gruppe von Transplantatempfängern tritt ebenfalls eine akute Abstoßung auf, hier werden die Lungen innerhalb von zwei Wochen nach der Transplantation atelektatisch und werden bis zum Endpunkt der Untersuchung nicht mehr belüftet. In dieser Gruppe können am d 98 BO-artige Läsionen gefunden werden [69]. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Transplantationen in der beschriebenen Stammkombination nicht als experimentelles Modell zur Untersuchung von BOS geeignet sind.

Ein weiteres experimentelles Modell in der Ratte beschreibt BO-ähnliche Läsionen nach linker, orthotoper Lungentransplantation von Brown Norway- (BN) auf Lewis (LEW) bzw. von F1-Hybriden BN/LEW auf LEW. BN- und LEW-Ratten unterscheiden sich komplett in ihrem MHC und stellen so eine voll allogene Transplantation, vergleichbar mit einer humanen Transplantation zweier nicht verwandter Personen dar [77]. Um die Zerstörung der Lungen durch akute Abstoßung zu verhindern, wird ein sehr komplexes Behandlungsschema mit verschiedenen Immunsuppressiva durchgeführt. Außerdem wird vor der eigentlichen Lungentransplantation eine Hauttransplantation durchgeführt, um die Empfänger zu sensibilisieren [77].

Mittlerweile gibt es mehrere Mausmodelle der akuten und chronischen Abstoßung von Lungentransplantaten [38, 48, 76, 119]. Die hohe Anzahl verschiedener transgener und gendefizienter Mäuse, bietet hier die Möglichkeit, die Funktion einzelner Gene und ihre Bedeutung in der Pathogenese von BOS zu untersuchen. Die Limitierung dieser experimentellen Modelle liegt jedoch in der technischen Schwierigkeit der Transplantation in einem so kleinen Organismus. Außerdem ist das Material (Gewebe, Blut usw.) aus Mäusen stark limitiert, so dass eine hohe Anzahl an Transplantationen notwendig wäre, um umfassende Untersuchungen durchzuführen. In dem experimentellen Modell von De Vleeschouwer et al. [2012] werden Mäuse mit großem Unterschied in den MHC-Klassen zur Transplantation verwendet [38]. Hier entwickelt nur ein Drittel der Transplantatempfänger unter multipler Immunsuppression BO-Läsionen. Die für BOS beschriebene Veränderung der Lungenfunktion, sowie zelluläre Veränderungen der Bronchoalveolären Lavage (BAL) können in diesem Modell nicht untersucht werden [38]. In einem weiteren experimentellen Modell der Lungentransplantation in der Maus kann nur in 44% der allogenen Transplantatempfänger BO nachgewiesen werden [48].

Mit der Einführung von Inzucht-Mini-Schweinen ergibt sich die Möglichkeit, in einem größeren Organismus einheitliche Untersuchungsergebnisse zu erlangen, wie es bei Inzuchtstämmen von Nagern schon lange möglich ist [2]. Nach der Lungentransplantation finden sich hier BO-ähnliche Läsionen [2, 151]. Deshalb wäre dieses experimentelle Modell ideal für präklinische Studien, zur Etablierung neuer Therapieansätze und dem experimentellen Einsatz von neuen Medikamenten. Aufgrund des für die Haltung und Versorgung benötigten Platzes und Aufwandes, stellen Modelle in kleinen Nagern zur Grundlagenforschung jedoch weiterhin eine bessere Lösung dar.

1.6 Ein neues experimentelles Modell zur Untersuchung von BOS

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen dienen der Charakterisierung eines neuen experimentellen Modells für BOS, das in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde [6]. In diesem Modell werden linke Rattenlungen in der F344- auf LEW-Stammkombination orthotop transplantiert [111]. Diese beiden Stämme haben einen geringen Unterschied in ihrem MHC-I. Die Tiere erhalten für zehn Tage eine Immunsuppression mit Ciclosporin. Als Kontrollen werden isogene Lungentransplantationen in LEW-Ratten durchgeführt, die einen Einblick in den perioperativen Schaden der Transplantation erlauben. Am d 28 nach der Transplantation wird die Transplantatmorphologie per *flat panel volume computed tomography* (fpVCT) überprüft. Es werden nur solche Tiere für die anschließende Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) verwendet, deren Hauptbronchus offen ist und die transplantierte Lunge demnach belüftet wird [6]. Den Transplantatempfängern wird über die Trachea LPS, was einen bakteriellen Infekt imitieren soll, oder zur Kontrolle phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) in die Lungen instilliert. Die Transplantatempfänger werden zu verschiedenen Zeitpunkten (d 28, d 29, d 33, d 40, d 90) nach der Transplantation getötet, um einen Überblick des Verlaufs der chronischen Transplantatabstoßung zu bekommen [6].

Nach der LPS-Instillation wird in allogenen Transplantatempfängern am d 29 ein starkes leukozytäres Infiltrat nachgewiesen, das perivaskulär und peribronchiolär aus mononukleären Leukozyten besteht. Im Alveolarraum ist ein starkes Infiltrat von Leukozyten zu sehen, unter denen viele neutrophile Granulozyten sind. Manche Arterien und Venen zeigen außerdem eine subendotheliale Infiltration mit

mononukleären Zellen. In allogenen Transplantaten am d 33 sind die perivaskulären Ringe infiltrierender Zellen dicker, aber die Dichte an Zellen nimmt etwas ab. Dieser Rückgang von infiltrierenden Zellen ist auch im intraalveolären Raum zu beobachten. Am d 33 weisen allogene Transplantate erste Zeichen eines Gefäßremodelings auf, fibrotische Veränderungen des Transplantats treten zuerst am d 40 auf. Bis zum Endpunkt der Untersuchung am d 90 entwickeln allogene, LPS-behandelte Transplantatempfänger histologisch nachweisbar BO [6]. Dabei zeigen alle LPS-behandelten allogenen Transplantatempfänger die beschriebenen Zeichen für BOS, mit fibrotischer Vernarbung des Gewebes rings um Bronchiolen und Gefäße, Intimahyperplasie und Infiltrationen mononukleärer Zellen [6]. In PBS-behandelten allogenen Transplantatempfängern sind in einem von fünf Tieren alle diese beschriebenen pathologischen Zeichen eines BOS nachweisbar [6].

In isogenen Transplantatempfängern und rechten Lungen allogener Transplantatempfänger sind nach der Instillation von LPS ebenfalls leukozytäre Infiltrate vorhanden, jedoch weniger stark [6]. Außerdem nehmen diese Infiltrate zu späteren Untersuchungszeitpunkten (d 33 und d 40) ab, so dass isogene Transplantatempfänger und rechte Lungen allogener Transplantatempfänger am d 90 ein histologisch ähnliches Bild wie isogene Transplantatempfänger am d 28 liefern [6].

In der vorliegenden Arbeit wird hauptsächlich die Situation in isogenen und allogenen Transplantaten vor der LPS-Instillation am d 28 untersucht.

1.7 Toll-like Rezeptoren (TLR)

TLR wurden zuerst bei *Drosophila* als Gene zur Festlegung der dorso-ventral Achse aber auch als Rezeptoren zur Erkennung von Pilzen und Bakterien und der damit verbundenen Aktivierung von Signalkaskaden zur Abwehr dieser Pathogene beschrieben [96]. Nach der Entdeckung der TLR in *Drosophila* konnten auch in höheren Organismen eine Reihe von TLR nachgewiesen werden. Aufgrund der Ähnlichkeit in der zytosolischen Region zwischen dem Typ I Interleukin (IL)-1-Rezeptor (IL-1R1) und dem *Drosophila*-Protein Toll werden die TLR der IL-1R/TLR-Superfamilie zugeordnet. Der homologe Bereich im Zytosol wird als Toll/IL-1R (TIR) Domäne beschrieben [24]. Aufgrund der Ähnlichkeit der extrazellulären Domäne mit dem IL-1R1 oder mit dem Toll-Rezeptor, teilt sich diese Superfamilie in zwei Untergruppen auf. TLR sind *pattern recognition receptors* (PRR) [106, 176], die der

Erkennung von *danger associated molecular patterns* (DAMPs) [16, 173, 200] und *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) dienen [16, 106, 107].

Zu den DAMPs gehören z.B. *High mobility group box 1* (HMGB1), *heat shock proteins* (HSP), Harnsäure oder Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Fibrinogen, Fibronectin, Heparansulfat) [16, 173, 200]. Diese Faktoren stammen aus dem Organismus selbst und werden in Folge von Entzündungen oder Verletzungen freigesetzt. Sie sind einerseits ein „Frühwarnsystem“ für das angeborene und das erworbene Immunsystem [92, 200], andererseits scheinen sie auch eine Rolle in Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen wie Typ I Diabetes, Atherosklerose oder chronischer Arthritis zu spielen [173]. Endogene Liganden aktivieren außerdem Rezeptor-exprimierende Zellen des angeborenen Immunsystems, z.B. Dendritische Zellen und tragen so direkt oder indirekt zur Reparatur des verletzten Gewebes bei [16, 92, 200]. In Tab. 4 sind TLR mit ihren entsprechenden endogenen Liganden aufgeführt.

Tab. 4: TLR mit ihren entsprechenden endogenen Liganden (verändert nach Yu et al., 2010 [200])

TLR	endogene Liganden
TLR2	Biglycan, Endoplasmin, HMGB1, HSP60, HSP70, humanes Herzmuskelmyosin, Hyaluronsäure und Harnsäurekristalle
TLR3	mRNA
TLR4	Biglycan, CD138, α -Kristallin A-Kette, β -Defensin 2, Endoplasmin, Fibrinogen, Fibronectin, Heparansulfat, HMGB1, HSP22, HSP60, HSP70, HSP72, Hyaluronsäure, Harnsäurekristalle, OxPAPC, Resistin, S100 Proteine, Surfactant Protein A und Tenascin-C
TLR7	RNA
TLR8	humanes Herzmuskelmyosin
TLR9	DNA und HMGB1

TLR = Toll-like Rezeptor, HMGB = *high mobility group box*, HSP = *heat shock protein*, RNA = Ribonukleinsäure, mRNA = *messenger RNA*, CD = *cluster of differentiation*, DNA = Desoxyribonukleinsäure

TLR sind Transmembranrezeptoren, die intrazellulär oder auf der Zelloberfläche zu finden sind. Nach der Aktivierung der Rezeptoren und Dimerisierung zu Homo- oder Heterodimeren (TLR1/TLR2, TLR6/TLR2) verläuft die Signalkaskade ähnlich wie bereits bei *Drosophila* beschrieben [84, 176]. Fast alle TLR leiten das Signal über das Adaptermolekül *myeloid differentiation primary response* (MyD88) weiter. Nur TLR3 benutzt den Signalweg über den Adapter *ring finger protein 138* (TRIF) [196, 197]. TLR4 kann den MyD88-abhängigen oder -unabhängigen Weg wählen [196,

197]. Die Aktivierung verläuft weiter über die *pelle*-ähnliche Kinase *interleukin-1 receptor-associated kinase-1* (IRAK) und endet mit der Dissoziation des *nuclear factor kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells/inhibitor of kappa B* (NF- κ B/I- κ B)-Komplexes, der ein Homolog zum *Drosophila dorsall/cactus* Komplex bildet [131]. Durch eine Freisetzung von NF- κ B und eine Translokation in den Nukleus, wird die Expression bestimmter Zielgene reguliert. Zu diesen Genen gehören verschiedene Chemokine und Zytokine, die Entzündungen auslösen, z.B. IL-6, IL-12 und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) [84, 176]. TLR werden auf verschiedensten Zelltypen exprimiert, dazu gehören Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), B-Zellen, T-Zellen, Endothel- und Epithelzellen [75].

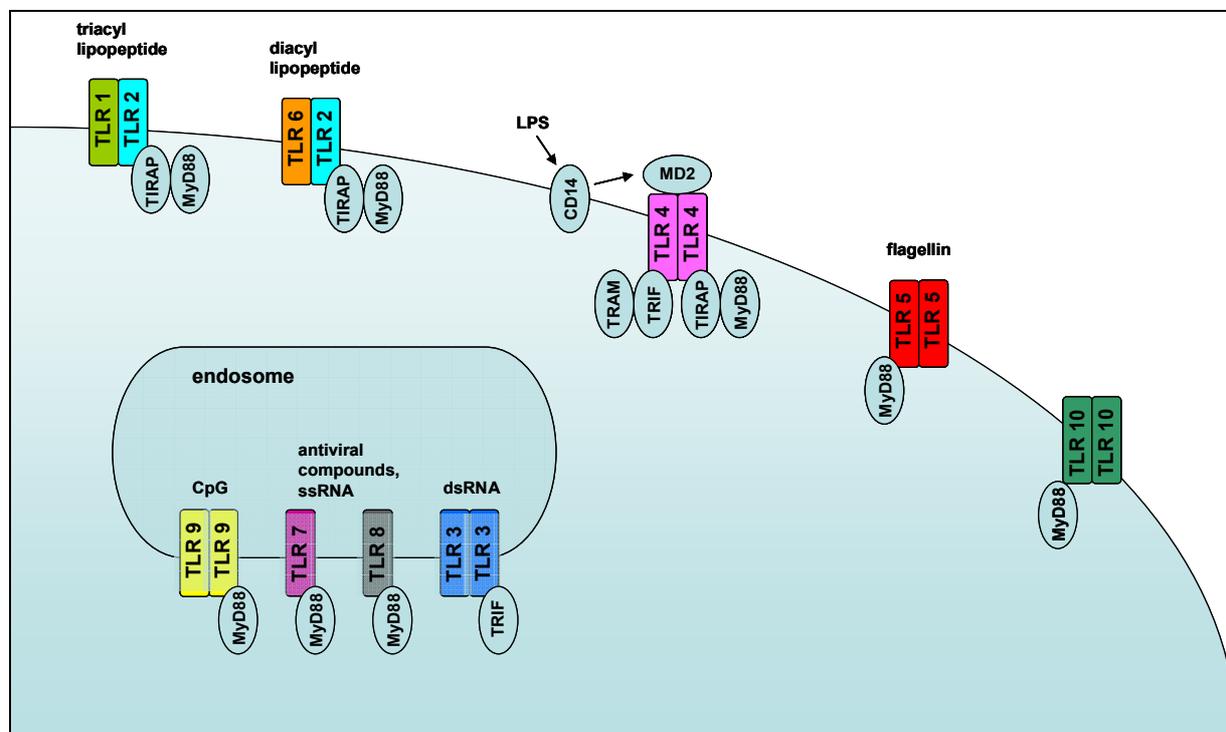


Abb. 2: Schema der in dieser Arbeit untersuchten Teile des Toll-like Rezeptor (TLR)-Systems mit den dazugehörigen Liganden. TLR2 bildet Heterodimere mit TLR1 und TLR6, alle anderen TLR bilden Homodimere. Der Signalweg aller TLR verläuft über das Adaptermolekül MyD88, die Ausnahme bilden TLR3 und TLR4, hier ist das Adaptermolekül TRIF für die Signaltransduktion verantwortlich, TLR4 kann jedoch alternativ auch MyD88 benutzen. Zur Bindung von Lipopolysaccharid (LPS) an TLR4 sind die LPS-Bindemoleküle CD14 und MD2 notwendig. TLR1/2 bindet Triacyllipopeptide, TLR2/6 bindet Diacyllipopeptide, TLR3 bindet doppelsträngige RNA (dsRNA), TLR4 bindet LPS, TLR5 bindet Flagellin, TLR7 und TLR8 binden antivirale Komponenten und einzelsträngige RNA (ssRNA), TLR9 bindet (CpG), über TLR10 ist noch nichts bekannt. TLR = Toll-like Rezeptor, TRIF = *ring finger protein 138*, MyD88 = *myeloid differentiation primary response*, LPS = Lipopolysaccharid, dsRNA = doppelsträngige RNA, ssRNA = einzelsträngige RNA, CpG = Dinukleotid, das Cytosin-Phosphat-Guanin enthält.

Die in Abschnitt 1.3 genannten Risikofaktoren für die Entstehung von BOS legen nahe, dass Signaltransduktion über TLR an der Pathogenese von BOS beteiligt ist

[4, 5, 83, 92, 98, 100, 101, 122]. Speziell TLR2 und TLR4 als Rezeptoren zur Erkennung von gram-positiven und gram-negativen Bakterien sind für diese Untersuchung von Interesse, da Infektionen durch Bakterien wahrscheinlich zur Pathogenese von BOS beitragen [190]. Aus Studien ist bekannt, dass heterozygote Träger der Mutationen Asp299Gly oder Thr399Ile im TLR4-Lokus nach einer Lungentransplantation, zum einen eine geringere Wahrscheinlichkeit für frühe, akute Abstoßungsepisoden haben (im ersten Jahr nach der Transplantation) [58, 121]. Zum anderen zeigen Patienten mit diesen Mutationen im Langzeitverlauf über drei Jahre eine geringere Häufigkeit von akuten Abstoßungsepisoden und einen Trend zu einer geringeren Häufigkeit von BOS [58, 83, 121]. Auch für TLR2 und TLR9 ist bekannt, dass Polymorphismen in diesen Genen die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von BOS beeinflussen. Patienten, die homozygote Träger bestimmter Polymorphismen sind, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit BOS zu entwickeln, während heterozygote Träger weniger häufig erkranken [83]. Außerdem zeigt eine Studie, dass die mRNA-Expression von TLR2 und TLR4 in einem Modell der akuten Abstoßung von intestinalen Transplantaten signifikant erhöht ist [88].

1.8 Nestin / regeneratives Potential

Nestin steht für *neuroepithelial stem cell protein* und gehört zur Familie der Intermediärfilamente. Es ist aufgrund seiner einzigartigen Struktur einziges Mitglied der Klasse VI Intermediärfilamente und gilt als Marker von bestimmten Progenitor- und Stammzellen [97, 109]. Es wurde 1985 über den Antikörper 401 entdeckt und die stärkste Expression findet sich in Stammzellen des Zentralnervensystems innerhalb des Neuralrohrs [53, 70]. Im Embryo wird Nestin, in sich teilenden Zellen exprimiert, wobei mit der Differenzierung dieser Zellen die Expression endet und von anderen Intermediärfilamenten übernommen wird [28, 191]. Im adulten Organismus wird Nestin in den neuronalen Vorläuferzellen nachgewiesen, sowie außerhalb des Nervensystems in Endothelzellen des Pankreas [87], des *Corpus luteum* und der Plazenta [112], sowie in Haarfollikelzellen [3, 99], Skelettmuskelzellen [18], vaskulären glatten Muskelzellen und Perizyten [36], Progenitorzellen des Herzens [26], der Haut [172] und der Retina [105]. Im adulten Organismus treten Nestin-exprimierende Zellen vor allem in Bereichen auf, in denen Regeneration stattfindet. Diese Zellen sind möglicherweise Stamm- oder Progenitorzellen, die in der Lage sind, zu proliferieren und sich zu differenzieren [123].

Nestin wird z.B. von vielen Autoren als Marker zur Identifizierung proliferierender und migrierender Zellen, sowie von Endothelzellen in der Tumorforschung eingesetzt [1, 112, 165]. Durch die Entdeckung von Nestin ist die Unterscheidung von differenzierten und undifferenzierten Zellen möglich geworden [112].

In der Lunge wird Nestin in Blutgefäßen exprimiert, hauptsächlich in Arterien, aber auch in Venen und Kapillaren [13]. In der Dissertation von Claudia Berndt werden diese Nestin-positiven Zellen in Blutgefäßen als vaskuläre Glattmuskelzellen und Perizyten identifiziert.

Nach einer Verletzung sind vermutlich verschiedenste multipotente Stamm- und Progenitorzellen in der Lunge für die Reparatur, die Regeneration und das *remodeling* des verletzten Gewebes verantwortlich [9]. Diese Zellen können entweder als zirkulierende oder in der Gefäßwand sitzende endotheliale oder Glattmuskel Progenitorzellen auftreten. Die Vorläuferzellen der glatten Muskelzellen sitzen in der Gefäßwand, und können hier aus der *Tunica intima* durch endotheliale-mesenchymale Transdifferenzierung bestimmter, reifer Endothelzellen entstehen [54]. Es gibt jedoch noch weitere Mechanismen, die am *remodeling* beteiligt sind, dazu gehört z.B. auch die epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung [23]. Das beschriebene *remodeling*, das in allogenen Lungentransplantaten bei der chronischen Abstoßung zu beobachten ist, lässt auf eine Beteiligung solcher Nestin-positiver Progenitor- oder Stammzellen schließen. Das Gleiche gilt für die Situation in isogenen Transplantaten, die im Langzeitverlauf eine scheinbar komplette Regeneration des perioperativen Schadens zeigen. Aufgrund dieser Tatsachen ist es von großem Interesse, zu untersuchen, wie die Verteilung von Nestin in isogenen und allogenen Transplantaten am d 28 aussieht, bevor LPS instilliert wird.

1.9 Immunreaktion gegen Alloantigene

Durch eine Infektion oder Verletzung des Gewebes wird eine Reihe von Abwehrmechanismen des Immunsystems in Gang gesetzt. Dabei beginnt das angeborene Immunsystem durch die Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen entsprechende Pathogene zu phagozytieren und durch die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen neutrophile Granulozyten und Monozyten aus dem Blut zu rekrutieren [60, 118]. Wenn diese Mechanismen zur vollständigen Abwehr der Pathogene nicht ausreichen, setzt das adaptive Immunsystem ein, das mit flexibleren Abwehrmechanismen reagieren kann. Daran sind verschiedene Antigen-

präsentierende Zellen (APC) beteiligt, vor allem Dendritische Zellen, die als unreife Zellen ein entsprechendes Pathogen aufnehmen, aktiviert werden und es den naiven T-Lymphozyten in den regionalen Lymphknoten präsentieren [8, 155, 166]. Als Mechanismus zur Verhinderung einer Autoimmunreaktion werden unreife T-Lymphozyten, die auf körpereigene Antigene reagieren, im Thymus durch klonale Deletion entfernt [51, 81, 154]. Zur Aktivierung von T-Lymphozyten ist neben dem Antigen (Peptid gebunden an MHC) immer eine Kostimulation (z.B. CD40 oder CD80) notwendig [57, 72, 127]. Ohne die entsprechende Kostimulation des Rezeptors CD28 kommt es zu einer T-Zellanergie oder zur Zerstörung reifer T-Zellen [57, 127, 148]. In diesem Zustand kann keine Produktion von IL-2 stattfinden, womit auch keine klonale Expansion der T-Zellen möglich ist [167].

Erkennt ein T-Lymphozyt jedoch sein Antigen, wird er zur Differenzierung und Vermehrung bzw. zur Bildung von Effektorzellen angeregt. Dabei differenzieren $CD4^+$ T-Zellen abhängig von Zytokinen und Kostimulatoren entweder zu T-Helferzellen (T_H)1- oder zu T_H 2-Zellen [103, 113, 116]. T_H 1-Zellen aktivieren neben $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen auch Makrophagen, zusätzlich werden T_H 1-abhängige zytotoxische Antikörper induziert und die Produktion von Immunglobulin (Ig) E gehemmt [113, 202]. T_H 2-Zellen führen durch die Aktivierung von B-Zellen zu antikörpervermittelten humoralen Immunreaktionen [21, 113, 202]. Eine $CD8^+$ T-Zelle kann unter anderem zytotoxische T-Effektorzellen bilden, die bei entsprechenden Zielzellen Apoptose auslösen [12, 79]. Wenn kein Antigen mehr vorhanden ist, sterben die meisten Effektorzellen durch Apoptose, nur wenige überleben und bleiben als Gedächtniszellen erhalten [15]. Zusätzlich gibt es regulatorische T-Zellen (Treg), die zur Limitierung der Immunantwort gegenüber Fremdanitigenen dienen und an der Erhaltung einer Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen beteiligt sind [138, 139, 162, 171]. Treg sind $CD4^+CD25^+$ und zeichnen sich zudem durch die Expression von Foxp3 aus [71, 160, 164]. Sie können als natürliche vorkommende Treg (nTreg) aus dem Thymus stammen oder in der Peripherie induziert werden (iTreg) [33, 126].

Nach einer Organtransplantation können verschiedene Abwehrmechanismen des Empfängers zur Abstoßung des Transplantats führen. An der Transplantatabstoßung sind alloantigenabhängige Faktoren wie das MHC-System sowie alloantigen-unabhängige Faktoren wie I/R-Schäden beteiligt, die zu einer Freisetzung von DAMPs führen [10, 11, 45, 115].

Die Erkennung der Alloantigene erfolgt über einen direkten oder einen indirekten Weg [7, 95, 132]:

Bei der direkten Alloantigenerkennung erkennen Empfänger-T-Zellen MHC-Moleküle des Spenders. Dabei handelt es sich um MHC-II-Moleküle auf "*passenger leukocytes*" aus dem Transplantat, die klassischerweise in sekundären lymphatischen Organen des Empfängers CD4⁺ T-Zellen aktivieren [11, 93]. Bereits voraktivierte CD8⁺ T-Zellen können zusätzlich mit MHC-I-Molekülen interagieren und Apoptose auslösen [25]. Die Expression von MHC-I-Molekülen ist dabei auf nahezu jeder Zelle des Transplantats zu finden.

Wie oben bereits für die Immunreaktion infolge einer Infektion beschrieben, ist auch im Zusammenhang mit der Transplantatabstoßung eine Kostimulation der T-Zellen notwendig, um sie vollständig zu aktivieren [20, 175]. In Tierexperimenten wird durch die Blockierung der Kostimulation eine Verlängerung des Transplantatüberlebens erzielt [64, 86, 94, 144]. Die vollständige Aktivierung der T-Zellen führt zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen, die die Transplantatabstoßung induzieren [34, 124]. Die Transplantatabstoßung kann durch verschiedene Effektormechanismen vermittelt werden, wie sie auch bei einer Pathogenabwehr erfolgen. Auch hier handelt es sich um T_H1-vermittelte Effektormechanismen: Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, Freisetzung von zytotoxischen IgG, Aktivierung von Makrophagen [113, 202]. CD8⁺ T-Zellen können durch die Freisetzung von Perforin oder *granzyme* zur Apoptose von Zellen des Transplantats führen [63, 174]. Makrophagen können durch die Freisetzung großer Mengen von Stickstoffmonoxid (NO), reaktiver Sauerstoffspezies oder Tumornekrosefaktor (TNF)- α ebenfalls das Transplantat schädigen [45, 118, 194].

Durch die 1953 veröffentlichten Ergebnisse von Billingham, Brent und des späteren Nobelpreisträgers Sir Peter Medawar, konnte erstmalig belegt werden, dass es möglich ist, eine Toleranz in Transplantatempfängern aktiv zu induzieren [17]. In Experimenten mit Mäusen wurden Föten über Injektionen mit allogenen Zellen behandelt und waren später in der Lage allogene Hauttransplantate zu tolerieren.

Um Abstoßungsprozesse zu verhindern, werden bei Patienten verschiedene Immunsuppressiva eingesetzt. Diese schwächen die Abwehrmechanismen des Empfängers, meist durch eine Hemmung der T-Zellen, und wirken damit einer Abstoßung entgegen [159]. Mit der Verwendung des Immunsuppressivums Ciclosporin wird im Menschen eine Verbesserung des Transplantatüberlebens erzielt

[22, 80]. Im Tiermodell werden Transplantate durch die Verabreichung von Ciclosporin nach einer Transplantation toleriert [120, 133]. Die dauerhafte Toleranz des Transplantats kann beim Menschen dadurch nicht induziert werden.

Eine nach der Transplantation etablierte Toleranz kann jederzeit auch wieder gebrochen werden. Dafür ist jedoch eine erneute Aktivierung des angeborenen Immunsystems über freigesetzte DAMPs oder PAMPs notwendig, was zu einer Aktivierung von T-Zellen führt. Es gibt Belege, dass zuvor tolerierte Transplantate nach einer bakteriellen Infektion abgestoßen werden [187, 198]. In der Veröffentlichung von Wang et al. [2010] ist die Abstoßung T-Zell-abhängig, aber unabhängig von Alloantikörpern. Außerdem sind sowohl IL-6 als auch Interferon (IFN) β am Abstoßungsprozess beteiligt [184].

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der oben geschilderten Probleme in den bereits veröffentlichten tierexperimentellen Modellen des BOS, ist es von großem Interesse ein relevantes experimentelles Modell für BOS zu etablieren. Damit könnten sich neue Möglichkeiten bieten, Therapieansätze zu finden, die das Langzeitüberleben von Patienten verlängern. In dem oben beschriebenen neuen Modell zur chronischen Abstoßung experimenteller Lungentransplantate in der Ratte (F344 \rightarrow LEW) soll eine größere Vergleichbarkeit mit der humanen Situation geschaffen werden. Zum einen wird eine orthotope linksseitige Lungentransplantation durchgeführt, auf die eine zehntägige Behandlung mit dem Immunsuppressivum Ciclosporin folgt. Außerdem wird nach vier Wochen ein bakterieller Stimulus in Form von einer Instillation von LPS in die Trachea gegeben. Mit diesem Vortäuschen einer bakteriellen Infektion wird das Immunsystem erneut aktiviert und im Langzeitverlauf entwickeln allogene Transplantate BOS, während isogene Transplantate nur leichte histologische Veränderungen zeigen.

Für die vorliegende Arbeit ist die Situation von isogenen und allogenen Transplantaten am d 28 vor der LPS-Instillation von Hauptinteresse. Es sollten die Unterschiede genauer untersucht werden, die in allogenen Transplantaten nach LPS-Instillation zur Entwicklung von BOS führen, während dies in isogenen Transplantaten nicht der Fall ist. In dieser Arbeit werden folgende Hypothesen überprüft:

1) Allogene Lungentransplantate reagieren empfindlicher auf die LPS-Behandlung, da sie

- a) ein stärkeres leukozytäres Infiltrat aufweisen als isogene Transplantate,
- b) Komponenten des TLR-Systems im Vergleich zu isogenen Transplantaten überexprimieren und/oder
- c) ein anderes regeneratives Potential besitzen als isogene Transplantate.

2) Allogene Lungentransplantate entwickeln nach der Transplantation eine Toleranz, die durch die LPS-Applikation gebrochen wird.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurden histologische Studien durchgeführt, um die Histopathologie der Transplantate, sowie die Zellzusammensetzung der Infiltrate genauer zu untersuchen. Die mRNA-Expression verschiedener Moleküle des TLR-Systems wurde mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) bestimmt. Für die Analyse von Unterschieden des regenerativen Potentials der Transplantate, wurde die Protein- und mRNA-Expression von Nestin analysiert. Mit der Durchführung einer *mixed lymphocyte reaction* (MLR) sollte überprüft werden, ob allogene Transplantatempfänger im Verlauf nach der Transplantation eine Toleranz entwickeln, die durch die Instillation von LPS gebrochen wird.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

96-well Platten, Flachboden	Greiner <i>bio-one</i> , Frickenhausen, Deutschland
10 ml Röhrchen	Greiner <i>bio-one</i> , Frickenhausen, Deutschland
50 ml Röhrchen	Greiner <i>bio-one</i> , Frickenhausen, Deutschland
Abzug	Köttermann Labortechnik, Uetzel/Hänigsen, Deutschland
Analysenwaage, AE 100	Mettler/Toledo, Gießen, Deutschland
Brutschrank/Wärmeschrank	Heraeus Instruments/Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Cryogefäße, 363401	NUNC, Roskilde, Dänemark
Dampfkochtopf	Silit, Riedlingen, Deutschland
Deckgläser, 24 x 50 mm, Automat Star	Engelbrecht Medizin und Labortechnik, Edermünde, Deutschland
Digitales Geldokumentationssystem	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Digitalkamera, CC12	Soft imaging system, Münster, Deutschland
Einbettautomat, Tissue-Tek TEC	Sakura Finetek, Torrance, CA, USA
Einbettungskassetten, Tissue-Tek	Sakura Finetek, Torrance, CA, USA
Eksikator	KNF Lab Laboport/Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethilon 9-0, Nahtmaterial Ethicon	Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland
Gelkammer	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Gewebemühle, MM301	Retsch, Haan, Deutschland
Heizblock, S81B25034	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Inkubator, HERA Cell 240i, CO ₂ <i>Incubator</i>	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Katheter, 16 G Abbocath	SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Magnetrührer, Variomag Elektronikrührer Mag-H + Heizplatte RH basic 2 (RHB2) IKA + Heizplatte Mini M IKA	Biosystem 1, Nunningen, Schweiz Gerhardt, Königswinter, Deutschland Janke und Kunkel, Staufen, Deutschland
Membran (Immobilon-P, poresize 0,45 µm), IPVH00010	Millipore, Billerica, MA, USA
<i>Microplate reader</i> , FLUOstar OPTIMA	BMG Labtechnologies, Zürich, Schweiz
Mikrotom, HM560 cool-cut HM355S	Microm, Walldorf, Deutschland

Mikroskop,	BX511F Labovert	Olympus, Tokyo, Japan Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle, intellowave		LG Electronics, Seoul, Südkorea
Mini-Brutschrank		VWR Incu-Line, Darmstadt, Deutschland
NanoDrop 1000		Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Netzgeräte,	Consort E835 300V-500mA Consort EV231	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Objektträger, RL R. 76 x 26 mm/3 x 1 inch Mattrand		Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Paraffinstrecktisch, HI 1220		Leica, Wetzlar, Deutschland
pH-Meter, Ultra Basic UB-10		Denver Instruments, Göttingen, Deutschland
Pipette,	Reference 100-1000 Reference 10-100 Reference 0,5-10 Research 0,5-10 Pipetman 10-100	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Gilson, Middleton, WI, USA
Pipetus		Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
<i>Quantitative RT-PCR Cycler, StepOne Plus</i> (Messung der mRNA-Expression)		Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL (5 x 7,50), 28906835		GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK
Sicherheitsschrank		Köttermann, Uetzel/Hänigsen, Deutschland
Sicherheitswerkbank		Nuaire, Plymouth, MN, USA
<i>Thermal Cycler G-Storm</i> (cDNA-Synthese), GS482		AlphaMetrix Biotech, Rödermark, Deutschland
Beatmungsgerät, Harvard Rodent		South Natick, MA, USA
Vortex Mixer, SA8		Stuart, Staffordshire, UK
Waage, WL100826		Kern und Sohn, Balingen, Deutschland
Wasserbad		Köttermann Labortechnik, Uetzel/Hänigsen, Deutschland
Wippe, ST5		Kobe, Marburg, Deutschland
Zentrifuge,	Mikro 200 R Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.2 Reagenzien

2-Mercaptoethanol 99% p.a., 4227.3	Roth, Darmstadt, Deutschland
3-Aminopropyltriethoxysilan, 101152840	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) Tabletten, D5905	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aceton 99,7%, Ph. Eur., reinst, CP40.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamidlösung, Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), 3029.2	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, 15510-019	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Agar-Agar Pulver, 3G-003	Waldeck, Münster, Deutschland
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat (Alaun) p.a., 1.01047	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat \geq 98% p.a., 9592.3	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Anilinblau, 415049	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anilin 99,5%, 242284	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Antisedan (Atipamezol Hydrochlorid), PZN7575554	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest., 1 l 123718002 100 ml 3450317/6874361	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Azokarmin G, A109-1	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA (Rinderserumalbumin Fraction V, pH 7,0 lyophilisiert), 11930	Serva, Heidelberg, Deutschland
<i>Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)</i> , 11647229001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Chloralhydrat EMPROVE, 1.02425	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat p.a., 1.01036	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ciclosporin Sandimmune (50 mg/ml)	Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat EMSURE, 1.00244	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Blue (Brilliant Blue G) 1368	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid, N, N-, 1.03034	Merck, Darmstadt, Deutschland
Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat p.a. EMSURE, 1.06580	Merck, Darmstadt, Deutschland
Domitor (Medetamidin Hydrochlorid), PZN7575896	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
Entwicklerkonzentrat, X-Ray, 00009	Adefo-Chemie, Dietzenbach, Deutschland
Eosin G (gelblich) für die Mikroskopie, 1.15935	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 96% p.a., 33206	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut \geq 99,8%, 32205,	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA Dinatrium), 112800	Serva, Heidelberg, Deutschland
<i>Fast Blue BB</i> (Zinkchlorid), F3378 00316EH	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FCS (<i>fetal calf serum</i>) Gold, A15-151	PAA, Cölbe, Deutschland
Fixiererkonzentrat, X-Ray, 00062	Adefo-Chemie, Dietzenbach, Deutschland

Gelatine weiß, gemahlen	Ruf, Quakenbrück, Deutschland
<i>Gelred</i>	Biotium, Hayward, CA, USA
Glycergel, <i>mounting medium</i> , C0563	Dako, Hamburg, Deutschland
Glycerin 99%, G2025	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin Pufferan 99% p.a., 3908.2	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin-Monohydrat für die Mikroskopie, 1.15938	Merck, Darmstadt, Deutschland
Heparin (25 000 IE/5 ml)	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Isofluran, HDG9623	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol) ≥ 99,8% p.a, 33539-R	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid p.a., 1.04936	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat p.a., 1.04873	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketavet (100 mg/ml), PZN3151811	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
Levamisol, L-975	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutaminlösung (2 mM), M11-004	PAA, Cölbe, Deutschland
Lipopolysaccharide (LPS) <i>Escherichia coli</i> , 026:B6, L2654	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Gene ruler, 100 bp plus DNA ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Loading dye solution (6 x)</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Lumi-Light Western Blotting Substrat</i> , 12015200001	Roche Diagnostics, Mannheim
Methanol, 32213	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Micro BCA Protein Assay Kit</i> , 23235	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Milchpulver, <i>blotting grade</i> , T145.3	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mitomycin C, 10107409001	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
<i>M-MLV RT RNase H(-) Point Mutant</i> , M368B 23031114	Promega, Madison, WI, USA
<i>M-MLV RT buffer (5 x)</i> , M531A 23713924	Promega, Madison, WI, USA
Molekulargewicht-Marker, <i>dual color</i> , 161-0374	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Naphtol-AS-MX-Phosphat, N4875	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumazid reinst, 1.06688	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid p.a., 31434-R	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat EMPROVE, 1.06345	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxidlösung (Natronlauge) TitriPUR 1 N, 1.09137	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhypochloritlösung 12%, 9062.3	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumiodat p.a., 1.06525	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Normal Mouse Serum (NMS)</i> , M5905	Sigma, Saint Louis, MI, USA
<i>Normal Rat Serum (NRS)</i>	Harlan, Borcheln, Deutschland
Orange G, 03756	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Orcein, 07380	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraffin (Gewebeeinbettmittel), VO-5- 1001	Vogel, Gießen, Deutschland
Paraformaldehyd 95%, 1001050091	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS (1 x), Dulbeccos mit Ca + Mg, steril,	PAA, Cölbe, Deutschland

H15-002	
<i>PCR Nucleotide Mix (dNTP)</i> , C114G 27917909	Promega, Madison, WI, USA
<i>PCR Purification Kit, MinElute</i> , 28004	Qiagen, Hilden, Deutschland
Penicillin-/Streptomycinlösung (100 x), P11-010	PAA, Cölbe, Deutschland
Percoll, 17089101	GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK
Pertex-Eindeckmedium, 41-401200	Medite, Burgdorf, Deutschland
Phosphorwolframsäure ≥ 95%, P4006	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phytohemagglutinin-L (PHA-L), 11249738001	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
<i>Platinum SYBR Green qPCR SuperMix- UDG</i> , 11733-038	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
<i>primer (für quantitative Reverse Transkriptase-PCR)</i>	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
<i>primer (random hexamer)</i> , C118A 26891012	Promega, Madison, WI, USA
Proteaseinhibitortabletten, <i>Complete Mini</i> , 11836153001	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Protease Typ XIV: Bacterial, <i>Streptomyces griseus</i> , 066K1538	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RNase-freies Wasser, 1017979	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>RNeasy Mini Kit</i> , 74104	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti-Block 10 x Konzentrat, A151.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol für die Histologie, 6640.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-Medium ohne L-Glutamin, E15- 039	PAA, Cölbe, Deutschland
rRNasin, RNase-Inhibitor, N251A 27838805	Promega, Madison, WI, USA
Saccharose (D(+)) 99,5% p.a., 4621.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 25% ROTIPURAN p.a. ISO, 6331.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure TitriPUR 1 N, 1.09057	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure-Lösung, X873.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS ultra pure 99%, Elektrophorese, 2326.2	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate</i> , 34075	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
TEMED 99% p.a. Elektrophorese, 2367.3	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris Base Pufferan 99,8% p.a., 48552	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan-Blaulösung, 0,4%, T8154	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20, 8.22184	Merck, Darmstadt, Deutschland
Verstärkungssystem, <i>CSA II Biotin-free Tyramide Signal Amplification System</i> , 1497	Dako, Carpinteria, CA, USA
Wasserstoffperoxid 30% EMSURE ISO p.a., 1.07209	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol AnalaR p.a., 28975.325	VWR, Darmstadt, Deutschland
<i>Zenon Mouse IgG₁ Labeling Kit</i> , Z25054	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.3 Verwendete Software

<i>AlphaEase FC Software 3.3.0</i>	Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA
<i>analySIS</i>	Olympus, Tokyo, Japan
IBM-SPSS Statistikprogramm	München, Deutschland
Excel	Microsoft Office

Bei den oben aufgeführten Produkten handelt es sich teilweise um registrierte und geschützte Markennamen der jeweiligen Hersteller.

2.4 Lösungen und Puffer

Alkalische-Phosphatase-Substratlösung

1 mg Fast Blue BB wird in 1 ml Naphtol AS-MX-Phosphat-Puffer mit 1 mM Levamisol gelöst und abzentrifugiert.

Ammoniumperoxodisulfatlösung (20%)

2 g Ammoniumperoxodisulfat werden in 8 ml sterilem Wasser gelöst.

Anilinalkohol

200 ml 90%iges Ethanol wird mit Aqua dest. angesetzt und 0,2 ml Anilin dazugegeben.

Anilinblau-Orange G-Lösung

Folgende Stoffe werden in 200 ml Aqua dest. aufgekocht:

1 g Anilinblau

4 g Orange G

Nach dem Abkühlen wird die Lösung filtriert und es werden 16 ml Essigsäure hinzugegeben.

Azokarmin-Lösung

0,2 g Azokarmin G werden in 200 ml Aqua dest. aufgekocht. Nach dem Abkühlen wird die Lösung filtriert und 2 ml Essigsäure zugegeben.

BSA-Stammlösung (Proteinstandard)

50 mg BSA werden in 1 ml Probenpuffer I (2 x) gelöst, für 5 min auf 95°C erhitzt und für 5 min mit 18.626 g zentrifugiert. Anschließend werden Aliquots abgefüllt und bei -20°C gelagert.

Citratpuffer (10 mM)

8,4 g Citronensäure-Monohydrat werden in 3,9 l Aqua dest. gelöst. Es werden 100 ml Natriumhydroxidlösung 1 N hinzugegeben und damit der pH-Wert auf 6,0 eingestellt.

Coomassie Blue-Entfärber

Die folgenden Reagenzien werden gemischt:

- 350 ml Methanol
- 24,5 ml Essigsäure
- 325,5 ml Aqua dest.

Coomassie Blue-Färbelösung

Folgende Substanzen werden gemischt:

- 200 ml Coomassie Blue-Entfärber (siehe oben)
- 50 mg Coomassie Blue (Brilliant Blue G)

Eosin

1 g Eosin G wird in 100 ml Aqua dest. gelöst und filtriert. Direkt vor Gebrauch wird die Lösung noch einmal filtriert und ein Tropfen Essigsäure/100 ml zugesetzt.

Essigsaurer Alkohol

200 ml 96%igem Ethanol werden 2 ml Essigsäure hinzugefügt.

Hämalaun-Färbelösung (Mayers)

1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumiodat und 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat (Alaun) werden in 1 l Aqua dest. gelöst und für 24 h stehengelassen. Anschließend werden 50 g Chloralhydrat und 1 g Citronensäure-Monohydrat dazugegeben. Die Lösung wird für 5 min gekocht und danach filtriert. Zur Verwendung für immunhistologische Färbungen wird diese Lösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Laufpuffer

Die folgenden Reagenzien werden in 900 ml Aqua dest. gelöst:

- 6,08 g Tris Base (50 mM)
- 28,84 g Glycin (0,38 M)
- 10 ml 10% SDS-Lösung

Die Lösung wird mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

Naphtol-AS-MX-Phosphat mit 1 mM Levamisol

2 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat werden in 200 µl Dimethylformamid gelöst. 9,8 ml 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2 werden dazugegeben und 4,8 mg Levamisol darin gelöst.

Natriumchloridlösung 0,9%

4,38 g Natriumchlorid werden in 50 ml Aqua dest. gelöst.

Orcein-Färbelösung

1 g Orcein wird in 100 ml 70% Ethanol gelöst. Danach wird der Lösung 1 ml 25% Salzsäure zugesetzt und frisch angesetzt für die Färbung benutzt.

PFA-Lösung (Paraformaldehydlösung) 4%

4 g PFA werden in 50 ml Aqua dest. erhitzt. 75 µl Natriumhydroxidlösung 1 N werden zugesetzt und die Lösung wird weiter gerührt, bis sie klar ist. Anschließend wird die abgekühlte Lösung mit 50 ml Sørensen-Puffer (2 x) aufgefüllt.

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) 10 x (Stammlösung)

Folgende Substanzen werden in 900 ml Aqua dest. gelöst:

- 80 g Natriumchlorid (1,37 M)
- 2 g Kaliumchlorid (27 mM)
- 14,24 g Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat (80 mM)
- 2 g Kaliumhydrogenphosphat (15 mM)

Der pH-Wert wird mit Salzsäure 1 N auf 7,2 eingestellt und die Lösung wird mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

PBS 1 x

Die Stammlösung (10 x PBS) wird 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Der pH-Wert wird mit Salzsäure 1 N auf 7,2 eingestellt.

PBS/BSA/Azid

In 20 ml 1 x PBS wird Folgendes gelöst:

- 0,2 g BSA
- 0,02 g Natriumazid (15 mM)

Der pH-Wert (7,2) wird mit Indikatorstreifen überprüft.

Peroxidasesubstratlösung

Eine Tablette 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) wird in 20 ml TBS gelöst. 1 ml Aliquots dieser Stammlösung werden abgefüllt und bei -20°C gelagert. Kurz vor der Benutzung werden der Substratlösung zur Aktivierung 10 μl 1,2% H_2O_2 zugesetzt. Die Substratlösung hat damit eine H_2O_2 -Endkonzentration von 0,012%.

Phosphorwolframsäure 5%

10 g Phosphorwolframsäure werden in 200 ml Aqua dest. gelöst.

Probenpuffer I (2 x)

Die folgenden Komponenten werden gemischt:

- 1,25 ml Tris/HCl-Puffer (1 M)
- 4,6 ml 10% SDS-Lösung
- 14,5 ml Aqua dest.
- 1 Proteaseinhibitortablette

Probenpuffer II (2 x)

Folgende Komponenten werden gemischt:

- 1,25 ml Tris/HCl-Puffer (1 M)
- 4,6 ml 10% SDS-Lösung
- 1,6 ml 2-Mercaptoethanol
- 4 ml Glycerin
- 4,275 ml Aqua dest.
- 1 Proteaseinhibitortablette

Proteaselösung

Die Lösung wird direkt vor der Benutzung frisch angesetzt. Dazu wird 1 mg Protease Typ XIV in 2 ml TBS-Puffer (1 x) gelöst.

Sammelgelpuffer

6,06 g Tris Base (0,5 M) werden in 70 ml Aqua dest. gelöst und der pH-Wert wird mit 6 ml Salzsäure 1 N auf 6,8 eingestellt. 4 ml 10% SDS-Lösung werden zugesetzt und mit Aqua dest. auf das Endvolumen von 100 ml aufgefüllt.

SDS-Stammlösung (10%)

10 g SDS (0,35 M) werden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Sørensen-Phosphatpuffer (2 x)

Folgende Substanzen werden in 500 ml Aqua dest. gelöst:

- 3,08 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (0,04 M)
- 14,3 g Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat (0,16 M)

TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) 50 x (Stammlösung)

Die folgenden Reagenzien werden in 900 ml Aqua dest. gelöst:

- 242 g Tris Base (2 M)
- 57,1 ml 96%ige Essigsäure (1 M)
- 18,6 g EDTA (0,06 M)

Die Lösung wird mit Aqua dest. auf das Endvolumen von 1 l aufgefüllt und hat einen pH-Wert von 8,0.

TAE 1 x

Die Stammlösung wird 1:50 mit Aqua dest. verdünnt.

TBS (Tris-gepufferte Salzlösung) 10 x (Stammlösung)

Folgende Komponenten werden in 900 ml Aqua dest. gelöst:

- 60,5 g Tris Base (0,5 M)
- 90 g Natriumchlorid (1,5 M)
- 50 ml 25%ige Salzsäure

Die Lösung wird mit Aqua dest. auf das Endvolumen von 1 l aufgefüllt.

TBS 1 x

Die Stammlösung wird 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Anschließend wird der pH-Wert mit Salzsäure 1 N auf 7,6 eingestellt.

Transferpuffer

Folgende Substanzen werden gemischt:

- 1,6 l Aqua dest.
- 6 g Tris-Base (20 mM)
- 28,67 g Glycin (200 mM)
- 10 ml 10% SDS-Lösung
- 400 ml Methanol

Trenngelpuffer

18,16 g Tris Base (1,5 M) werden in 70 ml Aqua dest. gelöst und der pH-Wert wird mit Salzsäure 1 N auf 8,8 eingestellt. 4 ml 10% SDS-Lösung werden zugesetzt und der Puffer wird mit Aqua dest. auf das Endvolumen von 100 ml aufgefüllt.

Tris/HCl-Puffer (0,1 M)

12,1 g Tris Base werden in 800 ml Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wird mit Salzsäure 1 N auf 8,2 eingestellt. Die Lösung wird mit Aqua dest. auf das Endvolumen von 1 l aufgefüllt.

2.5 Methoden

2.5.1 Tiere

Alle Tierexperimente wurden von Prof. Dr. V. Grau und K. Petri durchgeführt. Männliche LEW- sowie F344- und DA- Ratten aus spezifiziert pathogenfreier Haltung werden von Elevage Janvier (Le Genest St. Isle, Frankreich) oder Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und unter konventionellen Bedingungen gehalten. Für die Lungentransplantationen werden LEW-Ratten als Empfänger mit einem Gewicht von 200-220 g verwendet, F344-Ratten dienen als allogene Lungenspender. Die Tierhaltung und die Tierexperimente erfolgen nach der gegenwärtigen Version des Deutschen Tierschutzgesetzes und der NIH "Prinzipien der Labortierhaltung".

Das zur Kontrolle verwendete Gewebe aus TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen sowie von C57/BL6 Wildtypmäusen, stammt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Schnare aus dem Institut für Immunologie der Universität Marburg, unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Bauer.

2.5.2 Lungentransplantationen

Die Tiere werden durch kurze Inhalation mit Isofluran und durch anschließende Injektionsnarkose (Domitor: 0,1 mg/kg Körpergewicht, Ketavet: 90 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Nach orotrachealer Intubation werden die Lungen mechanisch über ein Beatmungsgerät mit Raumluft beatmet (2,5 ml Volumen; 100 Atemzüge pro min; positiver end-expiratorischer Druck von 5 cm H₂O). Die orthotope linksseitige Lungentransplantation wird mit einer *cuff*-Technik für die vaskulären Anastomosen durchgeführt und die bronchiale Anastomose erfolgt in Einzelknotentechnik [111]. Die *cuffs* werden aus Kathetern (16 G Abbocath) geschnitzt. Für die bronchiale Anastomose wird Ethilon 9-0 Nahtmaterial benutzt. Nach der Transplantation wird die Anästhesie mit 0,5 mg/kg Antisedan antagonisiert und die Ratten erhalten eine prophylaktische Dosis von 150 mg Ampicillin intraperitoneal, sowie die erste Injektion des Immunsuppressivums Ciclosporin von 5 mg/kg subkutan.

2.5.3 Experimentelles Modell für die chronische Abstoßung von Lungentransplantaten

Allogene Lungentransplantationen werden in der Stammkombination F344 auf LEW durchgeführt. Isogene Transplantate (LEW auf LEW) und unbehandelte Organe von LEW-Ratten dienen als Kontrollen. Eine suboptimale Immunsuppression mit Ciclosporin (5 mg/kg Körpergewicht) wird für 10 d nach der Transplantation durchgeführt, um eine frühe, akute und destruktive Abstoßung zu verhindern (Abb. 3). In diesem Modell werden allogene Transplantatempfänger am d 28 nach der Transplantation mit LPS (0,5 mg/kg in 0,6 ml PBS (1 x, steril)), als bakteriellem Stimulus, über die Trachea instilliert, um damit die chronische Abstoßung zu induzieren. Eine Kontrollgruppe erhält statt LPS eine intratracheale Instillation von PBS (1 x, steril).

In dieser Arbeit liegt der Hauptfokus in der Charakterisierung isogener und allogener Transplantatempfänger vier Wochen nach der Transplantation (d 28) und vor der

Instillation von LPS oder PBS (Abb. 3). Zur weiteren Untersuchung des Modells werden die Transplantatempfänger zu verschiedenen Zeitpunkten (d 29, d 33, d 40, d 90) nach der Instillation von LPS oder PBS getötet und charakterisiert.

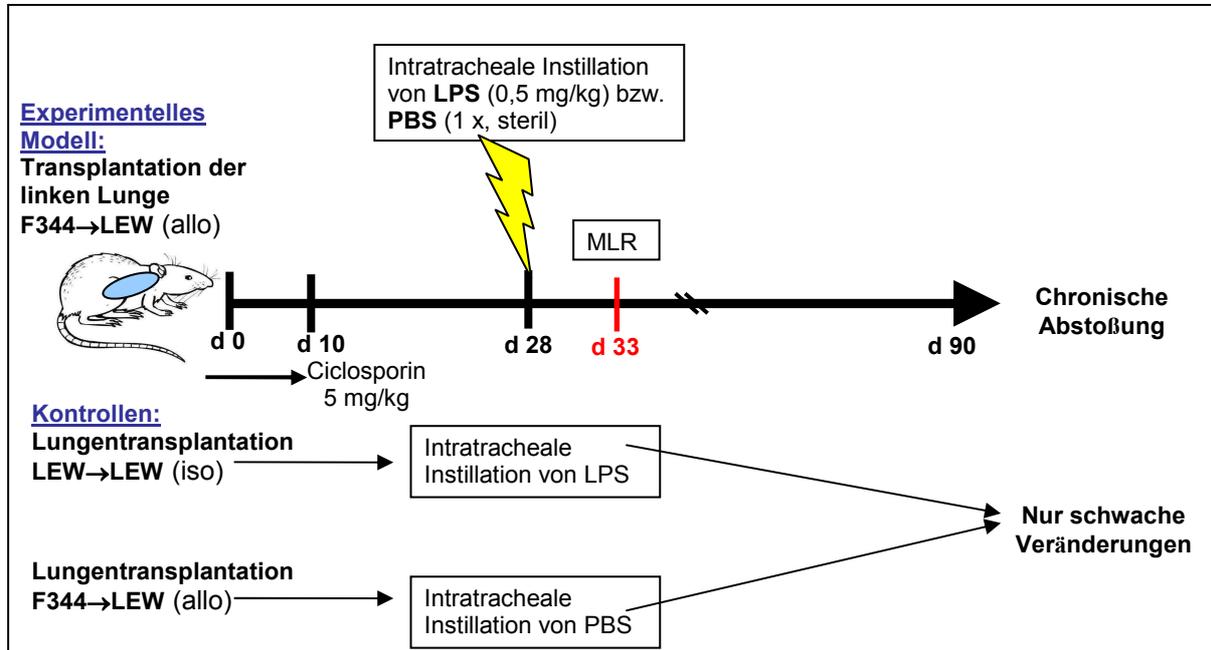


Abb. 3: Experimentelles Modell zur chronischen Abstoßung von allogenen (allo) Lungentransplantaten in der Ratte mit zehntägiger Immunsuppression und intratrachealer Instillation von LPS.

Im experimentellen Modell werden linke allo Lungen von F344 in LEW-Empfänger transplantiert. Zur isogenen (iso) Transplantation werden LEW-Ratten benutzt. Die Tiere erhalten für 10 d eine suboptimale Immunsuppression mit Cyclosporin (5 mg/kg) und werden am d 28 intratracheal mit LPS (0,5 mg/kg) instilliert. Für die *mixed lymphocyte reaction* (MLR) werden allo transplantierte Tiere am d 28 intratracheal mit LPS oder phosphatgepufferter Salzlösung (PBS 1 x, steril) instilliert und am d 33 getötet. Am d 90 nach der Transplantation sind in allo transplantierten Lungen mit Instillation von LPS Zeichen chronischer Abstoßung zu finden, in iso transplantierten Tieren sowie allo Transplantatempfängern nach Instillation von PBS finden sich nur schwache histologische Veränderungen. LEW = Lewis, F344 = Fischer-344, LPS = Lipopolysaccharid, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, MLR = *mixed lymphocyte reaction*, iso = isogen, allo = allogene.

2.5.4 Homogenisieren von Lungengewebe

Für die Gewinnung von nativem Lungengewebe werden die Lungen entnommen, voneinander getrennt und in ca. 3 mm transversale Scheiben geschnitten. Rechte und linke Lunge werden separat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Cryogefäße überführt. Zusätzlich wird die Milz entnommen, in mehrere Stücke geteilt, schockgefroren und in Cryogefäße überführt. Bis zur Verwendung wird alles bei -80°C gelagert. Die gefrorenen, nativen Lungenstücke werden in einem gekühlten Mörser pulverisiert und dadurch homogenisiert. Bis zur RNA- oder Proteinextraktion lagern die Proben bei -80°C .

2.5.5 Organentnahme und Organfixierung

Am d 28 nach der Transplantation werden die Lungen für histologische Untersuchungen über die Trachea mit einer 4%igen PFA-Lösung instilliert und im Block zusammen mit dem Herzen entnommen. Sie werden in ein mit PFA-Lösung gefülltes Gefäß überführt und über Nacht (ü.N.) im Kühlschrank gelagert. Am nächsten d werden die linke und die rechte Lunge einzeln frei präpariert und in 2%iger Agar-Agar-Lösung eingebettet. Nach zweistündigem Abkühlen, werden sie mit einem Teppichmesser in ca. 3 mm transversale Scheiben geschnitten. Die Scheiben werden von der apikalen Seite beginnend durchnummeriert. Teile mit ungeraden Nummern werden für die Einbettung in Paraffin in Einbettungskassetten überführt und in 1 x Sørensen-Puffer gelegt. Die Scheiben mit geraden Nummern werden zur Herstellung von Gefrierschnitten in 18%ige Saccharose in Sørensen-Puffer (1 x) überführt. Alle Lungenstücke müssen anschließend für 2-3 h im Eksikator entgast werden. Danach werden sie ü.N. im Kühlschrank gelagert. Für die Einbettung in Paraffin werden die Einbettungskassetten am d 3 zuerst in 50% Isopropanol für 30 min überführt und dann bis zur Einbettung in 70% Isopropanol gelagert. Die Gewebestücke zur Herstellung von Gefrierschnitten werden aus der Saccharoselösung genommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Überführen in geeignete Cryogefäße werden sie bei -80°C gelagert.

2.5.6 Einbettung von Organen in Paraffin

Nach der Organfixierung werden die Gewebestücke in den entsprechenden Einbettungskassetten jeweils für 1 h bei Raumtemperatur (RT) durch folgende Flüssigkeiten geführt:

96% Isopropanol

100% Isopropanol

100% Isopropanol

25% Rotihistol + 75% Isopropanol

50% Rotihistol + 50% Isopropanol

75% Rotihistol + 25% Isopropanol

100% Rotihistol

Die Gewebestücke werden anschließend samt Einbettungskassetten in flüssiges Paraffin bei 60°C gelegt. Nach 2 h werden sie in ein zweites Paraffinbad überführt

und über Nacht inkubiert. Am nächsten d kann das Gewebe mit einem Einbettautomat in Paraffinblöckchen eingebettet werden und aushärten.

2.5.7 Vorbereitung von Objektträgern und histologischen Schnitten

2.5.7.1 Beschichtung von Objektträgern mit Gelatine

Ein Päckchen Gelatine (10 g) wird in 1 l Aqua dest. unter Rühren und zusätzlichem Erwärmen gelöst. Wenn die Gelatine komplett gelöst ist, werden 0,5 g Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat (Chromalaun) zugegeben und die Temperatur der Heizplatte erhöht. Bei 60°C wird die Lösung noch weitere 5 min gerührt und dann zweimal gefiltert. Zur Beschichtung der Objektträger wird die Lösung in eine Küvette gegeben und ein mit Objektträgern bestückter Metallständer dreimal eingetaucht. Nach kurzem Abtropfen werden die beschichteten Objektträger zum Trocknen ü.N. bei 60°C in den Brutschrank/Wärmeschrank gestellt.

2.5.7.2 Beschichtung von Objektträgern mit 3-Aminopropyltriethoxysilan

Die Beschichtung erfolgt nach dem unten stehenden Protokoll:

- Inkubation in 5% Salzsäure in Aqua dest. ü.N.
- Waschen in Aqua dest. für 5 min
- Isopropanol für 5 min
- Trocknen bei RT für 1 h
- in 2% 3-Aminopropyltriethoxysilan in Aceton für 5 min
- in 2% 3-Aminopropyltriethoxysilan in Aqua dest. für 5 min
- in 2% 3-Aminopropyltriethoxysilan in Aqua dest. für 5 min
- Waschen in Aqua dest. für 5 min
- Trocknen bei 60°C ü.N.

2.5.7.3 Paraffinschnitte

Vom eingebetteten Gewebe werden 3-5 µm dünne Schnitte gemacht, von denen immer zwei auf einen silanisierten Objektträger überführt werden. Die Schnitte werden für 30 min zum Trocknen auf einen Paraffinstrecktisch bei 38°C gelegt und dann zur besseren Haftung ü.N. bei 60°C im Brutschrank/Wärmeschrank getrocknet.

2.5.7.4 Gefrierschnitte

Von dem nativen oder fixierten, gefrorenen Gewebe werden im Mikrotom (bei -10 bis -12°C) 5-10 µm dünne Schnitte angefertigt, auf Gelatine- oder Silan-beschichtete Objektträger überführt und für 10 min in eiskaltem 100%igem Isopropanol inkubiert. Die Schnitte werden anschließend bei RT für 1 h getrocknet, bei -20°C eingefroren und für einige d gelagert oder direkt für Färbungen benutzt.

2.5.8 Histologische Standardfärbungen

Die histologischen Färbungen mit Hämalaun & Eosin (H&E), Orcein und Azan werden nach Standardprotokollen durchgeführt [114].

2.5.9 Immunhistochemische Färbungen

2.5.9.1 Vorbehandlung von Paraffinschnitten

Die Objektträger werden zunächst vom Paraffin befreit und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe geführt:

- 100% Xylol je 3 x 10 min
- 100% Isopropanol 3 min
- 100% Isopropanol 3 min
- 90% Isopropanol 3 min
- 80% Isopropanol 3 min
- 70% Isopropanol 3 min
- 50% Isopropanol 3 min

Je nachdem wie die Schnitte im Verlauf der Färbung vorbehandelt werden, werden sie im Anschluss an die Alkoholreihe in PBS oder TBS überführt. Die Wahl der Vorbehandlung richtet sich nach entsprechenden Vorversuchen mit den jeweiligen Antikörpern:

- 1) Keine Vorbehandlung,
- 2) Dampfkochtopfvorbehandlung: 30 min kochen in Citratpuffer pH 6,0, bei 120°C und 1,1 bar,
- 3) Protease Typ XIV Vorbehandlung (1 mg in 2 ml TBS (1 x)): 15 min bei RT.

2.5.9.2 Immunhistochemische Einzelfärbung

Entparaffinierte und gegebenenfalls vorbehandelte Paraffinschnitte oder Gefrierschnitte werden in PBS (1 x) dreimal für 2 min gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität werden die Schnitte für 30 min in einer Küvette mit 3% H₂O₂ in PBS inkubiert (Gefrierschnitte ca. 4°C, Paraffinschnitte ca. 20°C). Darauf folgt ein erneuter Waschschrift dreimal für 2 min in PBS (1 x). Durch anschließende Blockierung mit PBS/BSA/Azid (pH 7,3) für 30 min werden unspezifische Proteinbindungsstellen abgesättigt. Nach Abschütteln der Blockierungslösung wird der jeweilige Primärantikörper (siehe Tab. 5) in entsprechender Verdünnung in PBS/BSA/Azid auf die Schnitte pipettiert und ü.N. bei 4°C inkubiert. Bei Gefrierschnitten erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h bei RT. Der Primärantikörper wird mit PBS (1 x) abgespült, die entsprechende Sekundärantikörperverdünnung bzw. das entsprechende Nachweissystem (siehe Tab. 6) wird aufpipettiert und die Schnitte für 30-60 min inkubiert. Die Lösung wird mit TBS abgespült und für 10 min mit Peroxidasesubstratlösung inkubiert. Zur Entsorgung wird die Substratlösung mit PBS (1 x) von den Schnitten in Natriumhypochloritlösung gespült und die Objektträger zum Waschen in eine Küvette mit PBS (1 x) überführt. Anschließend werden die Schnitte mit 1:10 verdünnter Hämalaun-Färbelösung für 1,5 min gegengefärbt, kurz in Aqua dest. ausgewaschen und für 5 min mit Leitungswasser gebläut. Die Entwässerung der Schnitte erfolgt in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 3 min:

- 50% Isopropanol
- 70% Isopropanol
- 80% Isopropanol
- 90% Isopropanol
- 100% Isopropanol
- 100% Isopropanol
- 100% Xylol
- 100% Xylol

Die Objektträger werden mit Pertex eingedeckt.

2.5.9.3 Immunhistochemische Doppelfärbung mit Antikörpern gegen das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) und den α/β T-Zellrezeptor (R73)

Für die Doppelfärbungen werden Gefrierschnitte von nativen Milzen angefertigt. Aus dem Gefrierschrank werden die Objektträger direkt in eiskalte 4%ige PFA-Lösung für 8 min überführt. Danach werden sie in eiskaltes 96%iges Ethanol für 2 min gestellt. Die nächsten Schritte verlaufen wie unter 2.4.9.2 beschrieben, jeweils bei RT. Die erste Primärantikörperlösung gegen PCNA (siehe Tab. 5) wird nach 60 min Inkubation und anschließender Inkubation mit Sekundärantikörperverdünnung (*anti-mouse IgG/HRP*, siehe Tab. 6) mit Peroxidasesubstrat in braun nachgewiesen. Die Verdünnung des zweiten Primärantikörpers gegen den α/β T-Zellrezeptor (R73, siehe Tab.1) wird für 60 min auf die Schnitte gegeben und zunächst mit *anti-mouse IgG* und mit APAAP (siehe Tab. 6) inkubiert. Der Antikörper wird in blau mit Alkalischer-Phosphatase-Substratlösung nachgewiesen. Nach 20 min Inkubation im Dunkeln wird die Lösung mit PBS (1 x) abgespült und die Objektträger werden mit Glycergel eingedeckt. Unter dem Mikroskop werden mit dem 20 x Objektiv alle doppelpositiven Zellen im Bereich der T-Zellzonen (20 Felder pro Tier, ein Feld: 200 μm x 200 μm) verblindet ausgezählt. Danach wird der prozentuale Anteil doppelpositiver Zellen in Bezug auf die Gesamtanzahl T-Zellen pro Feld berechnet.

Die oben beschriebene Doppelfärbung wird mit den gleichen Antikörpern auf Paraffinschnitten von Lungengewebe durchgeführt. Das Protokoll wird hier wie im Folgenden beschrieben verändert. Die Objektträger werden entparaffiniert und 10 min mit Protease XIV vorbehandelt. Nach einem Waschschrift in PBS (1 x) dreimal für 2 min folgt zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität eine Inkubation der Schnitte in einer Küvette mit 3% H_2O_2 in PBS inkubiert. Darauf folgt ein erneuter Waschschrift dreimal für 2 min in PBS (1 x). Durch anschließende Blockierung mit PBS/BSA/Azid (pH 7,3) mit Zusatz von 10% Normalrattenserum für 30 min werden unspezifische Proteinbindungsstellen abgesättigt. Die Schnitte werden mit der ersten Primärantikörperlösung gegen den α/β T-Zellrezeptor (R73, 1:25.000 verdünnt in 2 x PBS mit Zusatz von 10% Normalrattenserum) ü.N. bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt eine Inkubation mit *anti-mouse IgG/HRP* mit Zusatz von 10 % Normalrattenserum. Zur Verstärkung des Signals werden die Schnitte für 15 min mit dem *CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System* (siehe unten, 1:2 verdünnt) inkubiert. Nach einer Inkubation für 15 min mit *anti-Fluorescein-HRP* (aus

dem Dako Verstärkungssystem) mit Zusatz von 10% Normalrattenserum wird der Antikörper mit DAB nachgewiesen. Zum Nachweis des zweiten Antikörpers gegen PCNA werden die Paraffinschnitte anschließend für 15 min im Dampfkochtopf vorbehandelt. Nach einem Blockierungsschritt mit PBS/BSA/Azid werden die Schnitte ü.N. bei 4 °C mit dem Antikörper gegen PCNA (siehe Tab. 5) inkubiert. Es folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper *anti-mouse IgG/AP*, dann wird der Antikörper in blau mit Alkalischer-Phosphatase-Substratlösung nachgewiesen. Unter dem Mikroskop werden mit dem 40 x Objektiv alle doppeltpositiven Zellen im Bereich des Hauptbronchus, im Alveolarraum und rings um kleine Gefäße (Durchmesser $\leq 100 \mu\text{m}$) verblindet ausgezählt (jeweils 10 Felder pro Tier und pro Bereich, ein Feld $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$). Danach wird der prozentuale Anteil doppeltpositiver Zellen in Bezug auf die Gesamtanzahl gefärbter T-Zellen pro Feld berechnet.

Die beschriebene Färbung des Lungengewebes wurde freundlicherweise von Gabriele Fuchs-Moll durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die Doktorandin.

2.5.9.4 Immunhistochemische Färbung mit dem Dako Verstärkungssystem (*CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System*)

Für die Färbung mit dem Verstärkungssystem werden die histologischen Schnitte genau so behandelt, wie unter 2.4.9.2 beschrieben. Nach der Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (siehe Tab. 5) werden die ab *Step 4* im Protokoll des Herstellers beschriebenen Schritte mit den mitgelieferten Substanzen durchgeführt. Dem unter *Step 4* verwendeten *anti-mouse IgG/HRP* werden bei Färbungen auf Rattengewebe 10% Normalrattenserum zugesetzt. Zum Nachweis wird Peroxidasesubstratlösung (s.o.) benutzt.

2.5.9.5 HRP-Markierung von monoklonalen Mausantikörpern mit dem Invitrogen *Zenon Mouse IgG₁ Labeling Kit* (HRP-Markierungssystem)

Um unmarkierte monoklonale Mausantikörper in immunhistochemischen Färbungen zu verwenden, werden diese mit dem HRP-Markierungssystem nach dem Protokoll

des Herstellers markiert und können dann mit Peroxidasesubstratlösung nachgewiesen werden.

Tab. 5: Verwendete Primärantikörper in immunhistochemischen Färbungen (IHC) und *western blots* (WB).

Antigen/Antikörper/Wirt	Hersteller/ Bestellnr./Ort, Land	Verwendung	VB (IHC)	Verdünnung
α/β T-Zellrezeptor/R73/M	Serotec/MCA453EL/ Raleigh, USA	IHC	Protease	Milz (nativ): 1:500 Lunge (Paraffin): 1:25.000
CD68-artiges Antigen/ED1/M	Serotec/MCA341R/ Raleigh, USA	IHC	Protease	1:500
CD163/ED2/M	Serotec/MCA342R/ Raleigh, USA	IHC	Protease	1:200
Glattmuskelaktin (α SMA)/1A4/M	Sigma-Aldrich/A5228/ St. Louis, USA	IHC	DKT	1:3000
Lamin A/C/H-110/K	Santa Cruz/sc-20681/ Dallas, USA	WB		1:5.000
Nestin/rat-401/M	Millipore/MAB353/ Billerica, USA	IHC, WB	DKT	1:100, 1:1.000
<i>proliferating cell nuclear antigen</i> (PCNA)/PC10/M	Dako/M0879/ Glostrup, Dänemark	IHC	- DKT	1:1.000
Toll-like Rezeptor 2/T2.5/M	ebioscience/14-9024/ San Diego, USA	IHC, WB	Protease	1:100-1:250, 1:1.000-1:10.000
Toll-like Rezeptor 4/UT41/M	ebioscience/14-9041/ San Diego, USA	IHC, WB	Protease	1:100-1:250, 1:1.000-1:10.000
Toll-like Rezeptor 2/EPNCIR133/K	Epitomics/3268-1/ Burlingame, USA	IHC, WB	Protease	1:100-1:250, 1:1.000-1:10.000
Toll-like Rezeptor 4 FITC/76B357.1/M	Imgenex/IMG-5031C/ San Diego, USA	IHC	DKT	1:200

M = Maus, **K** = Kaninchen, VB = Vorbehandlung, DKT= Dampfkochtopf

Tab. 6: Verwendete Nachweisreagenzien in immunhistochemischen Färbungen (IHC) und western blots (WB).

Nachweisreagenzien/Wirt	Hersteller/Bestellnr./Ort, Land	Verdünnung (IHC, WB)	Substrat
PAP/M	Rockland/P0850/Gilbertsville, USA	1:1.000	DAB
APAAP/M	Dako/D0651/Glostrup, Dänemark	1:25	Fast Blue
anti-mouse EnVision + System HRP Labelled Polymer	Dako/K4001/Glostrup, Dänemark	-	DAB
anti-rabbit EnVision + System HRP Labelled Polymer	Dako/K4003/Glostrup, Dänemark	-	DAB
anti-mouse IgG/HRP/K	Dako/P0161/Glostrup, Dänemark	1:70, 1:5.000	DAB
anti-mouse IgG/K	Dako/Z0259/Glostrup, Dänemark	1:25	-
anti-mouse IgG/AP/K	Dako/D0314/Glostrup, Dänemark	1:30	Fast Blue
anti-rabbit IgG/HRP/Z	Dako/P0448/Glostrup, Dänemark	1:70, 1:5.000	DAB

M = Maus, **K** = Kaninchen, **Z** = Ziege, IgG = Immunglobuline, HRP = Meerrettichperoxidase, AP = Alkalische Phosphatase, PAP = Peroxidase Anti-Peroxidase, APAAP = Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase, DAB = Peroxidasesubstratlösung, Fast Blue = Alkalische-Phosphatase-Substratlösung.

2.5.10 Proteinbiochemie

2.5.10.1 Proteingehaltsbestimmung und Probenherstellung

Zur Proteingehaltsbestimmung werden das gemörserte Lungengewebe und das Lysat von THP-1 Zellen (DSMZ Nr.: ACC16, zur Verfügung gestellt von Sigrid Wilker) in Probenpuffer I gelöst. Das enthaltene SDS zerstört die nicht-kovalenten Bindungen der Proteine. Danach werden die Proben für 5 min in den Heizblock bei 95°C gestellt und anschließend für 5 min bei 18.626 g zentrifugiert. Von dieser Lösung werden 10 µl benutzt, um den Proteingehalt mit dem *Micro BCA Protein Assay Kit* zu bestimmen. Zur Kalibrierung wird eine Proteinstandardkurve mit verdünnter BSA-Stammlösung hergestellt. Nach der Messung des Proteingehalts werden die Proben mit einer entsprechenden Menge Probenpuffer II verdünnt und so die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt (20-40 µg/µl). Die Proben werden anschließend bei -20°C gelagert.

2.5.10.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Zur Auftrennung der Proteine werden 8% Acrylamid-Trenngele (Toll-like Rezeptoren, 90-100 kDa) oder 6% Acrylamid-Trenngele (Nestin, 120-260 kDa) benutzt, die wie folgt angesetzt werden:

8% Acrylamid-Trenngel	6% Acrylamid-Trenngel
2,13 ml Aqua dest.	2,43 ml Aqua dest.
1,076 ml Trenngelpuffer	1,076 ml Trenngelpuffer
1,166 ml Acrylamidlösung	0,87 ml Acrylamidlösung
7,7 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung	7,7 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung
3 µl TEMED	3 µl TEMED

Das Trenngel wird in einer entsprechenden Apparatur zwischen zwei Glasplatten pipettiert und mit Aqua dest. überschichtet. Das Auspolymerisieren des Gels erfolgt ü.N. in einer feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank. Am nächsten d wird das Wasser abgegossen und mit einem Filterpapier abgesaugt. Anschließend wird das Sammelgel über das Trenngel pipettiert.

Sammelgel:

- 1,35 ml Aqua dest.
- 790 µl Sammelgelpuffer
- 652 µl Acrylamidlösung
- 5,6 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung
- 2,25 µl TEMED

Direkt nach dem Gießen des Sammelgels wird ein Kämmchen zur Ausbildung der Geltaschen zwischen die zwei Glasplatten geschoben. Nach 30-60 min ist das Sammelgel polymerisiert und das Kämmchen wird entfernt. Die Taschen werden mit Laufpuffer gespült und die Gelapparatur wird in eine Elektrophoresekammer überführt. Diese wird so weit mit Laufpuffer gefüllt, bis das Gel komplett mit dem Puffer überschichtet ist. Direkt vor dem Auftragen der Proben werden diese für 10 min bei 70°C erhitzt. Danach erfolgt eine Zentrifugation der Proben für 5 min bei 18.626 g. Das Gel wird mit je 9,5 µl der Proben beladen und zur Bestimmung des Molekulargewichts werden 9,5 µl eines Molekulargewicht-Markers aufgetragen. Die Elektrophorese wird in einer Elektrophoresekammer bis zur entsprechenden Auftrennung der Proben durchgeführt. Dazu werden die Proteine zunächst für 10 min im Sammelgel bei 80 V konzentriert und anschließend für 70 min bei 120 V im Trenngel aufgetrennt.

2.5.10.3 Transfer

Nach der Auftrennung der Proteine im Gel, werden diese auf eine Polyvinyliden-Difluorid-PVDF Membran übertragen. Das Gel wird vor dem Transfer für 15 min in Transferpuffer equilibriert. Die Membran wird auf die Größe des Gels zugeschnitten, dann für 2 min in Methanol und für 5 min in Transferpuffer gelegt. Gel und Membran werden mit Filterpapier, Vlies und einer gelöcherten Plastikplatte auf beiden Seiten bedeckt und dann in eine Kammer mit Transferpuffer eingespannt. Der Transfer wird für 90 min bei 90 mA durchgeführt. Danach wird die Membran entnommen und bei RT getrocknet. Zur Überprüfung der Effektivität des Transfers wird das Gel mit Coomassie Blue G gefärbt.

2.5.10.4 Detektion von Antigenen

Die getrocknete Membran wird für 2 min in Methanol benetzt und dann für 10 min in PBS gewaschen. Durch Inkubation mit entsprechender Blockierungslösung (5% Milchpulver in PBS, 2,5% BSA in PBS oder Roti-Block 1:10 in PBS) für eine h bei RT, werden unspezifische Proteinbindungsstellen abgesättigt. Die Membran wird danach mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in Blockierungslösung ü.N. bei 4°C inkubiert.

Am nächsten d wird die Membran viermal für 7 min in PBS (1 x)/0,1% Tween 20 gewaschen, um ungebundene Primärantikörper auszuwaschen. Darauf folgt für 90 min die Inkubation mit dem entsprechend verdünnten HRP-markierten Sekundärantikörper (in 2,5% Milchpulver in PBS/Tween 20). Um den Sekundärantikörper abzuspülen, wird die Membran dreimal mit PBS/Tween 20 für 10 min gewaschen, gefolgt von weiteren 10 min Waschen mit PBS (1 x). Für die Chemolumineszenzreaktion wird die Membran mit *Lumi-Light Western Blotting Substrat* oder *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Dura), 5 min inkubiert und das Signal wird mit einem Röntgenfilm in der Dunkelkammer detektiert.

2.5.11 Extraktion von RNA aus Gewebe

Die Isolierung von RNA aus Lungengewebe, zur Analyse der mRNA Expression verschiedener Gene, erfolgt mit dem *RNeasy Mini Kit* im Wesentlichen nach dem Protokoll des Herstellers.

Das gemörserte Lungengewebe (30-45 mg) wird in 600 µl RLT-Puffer in der Gewebemühle (2 x 5 min) gelöst. Zur besseren Aufarbeitung wird der RLT-Puffer

geteilt und nach Zentrifugation erfolgt eine zweite Bearbeitung in der Gewebemühle. Die RNA wird am Ende in 40 µl RNase-freiem Wasser von der Säulenmembran gelöst und die RNA-Konzentration im NanoDrop bestimmt. Die RNA wird dann direkt zur Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) benutzt oder bei - 80°C gelagert werden.

2.5.12 Synthese von cDNA und Bestimmung der mRNA-Expression

2.5.12.1 Herstellung von cDNA

Zur Analyse von mRNA in einer Polymerasekettenreaktion (PCR), ist es nötig, diese in cDNA umzuschreiben. Dafür wird das Enzym *reverse transcriptase* verwendet. 0,5-1 µg RNA werden mit einer Mischung von *primern (random hexamer)* mit der Konzentration von 1 µg/1 µg RNA zusammen pipettiert. Die Mischung (Komponenten 1 und 2, siehe unten) wird mit Aqua dest. auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und für 5 min bei 70°C und 5 min bei 4°C im *Thermal Cycler* inkubiert. Die vorinkubierte RNA (Komponenten 1-3, siehe unten) wird anschließend mit einem *mastermix* (Komponenten 4-8, siehe unten) gemischt, der das Enzym enthält. Das Endvolumen von 25 µl je Probe wird noch mal im *Thermal Cycler* für 10 min bei 25°C, für 1 h bei 40°C und zum Schluss für 15 min bei 70°C inkubiert. Die fertige cDNA wird direkt benutzt oder bei -20°C gelagert.

	Komponenten	Konzentration	Menge	Endkonzentration
1	RNA		x µl	[1 µg/µl]
2	<i>primer (random hexamer)</i>	[0,5 µg/µl]	2 µl	[0,04 µg/µl]
3	Aqua dest.		auf 10 µl auffüllen	
4	<i>PCR Nucleotide Mix (dNTP)</i>	[je 10 mM]	1,5 µl	[je 0,6 mM]
5	<i>M-MLV RT buffer</i>	[5 x]	5 µl	[1 x]
6	<i>M-MLV Reverse Transcriptase</i>	[200 U/µl]	0,5 µl	[4 U/µl]
7	rRNasin	[40 U/µl]	0,5 µl	[0,8 U/µl]
8	Aqua dest.		auf 25 µl auffüllen	

2.5.12.2 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Zur Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Gene wird eine qRT-PCR in einem *Quantitative RT-PCR Cycler* durchgeführt und die Ergebnisse mit der mitgelieferten Software analysiert. Zur Herstellung eines *mastermix* wird Folgendes pipettiert:

Komponenten	Konzentration	Menge	Endkonzentration
<i>primer_F</i>	[10 pmol/μl]	0,5 μl	[0,2 pmol/μl]
<i>primer_R</i>	[10 pmol/μl]	0,5 μl	[0,2 pmol/μl]
MgCl ₂	[50 mM]	1 μl	[2 mM]
<i>Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG</i>		13 μl	
Aqua dest.		auf 23 μl auffüllen + 2 μl cDNA	

primer_F (*primer forward*), *primer_R* (*primer reverse*)

Die im *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix* enthaltene *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA-Polymerase wird bei 50°C für 2 min aktiviert und bei 95°C für 5 min wird die DNA denaturiert. Darauf folgen 45 Amplifizierungszyklen der Proben: 95°C für 5 s, 60°C für 5 s, 72°C für 30 s. Nach Abschluss der Amplifizierung wird eine Schmelzkurve mit folgenden Parametern erstellt: 15 s bei 95°C, 1 min bei 60°C und danach langsames Erhitzen (0,5°C/s) auf 95°C. Die Proben werden dann auf 4°C gekühlt.

Die in Tab. 7 aufgeführten *primer* werden mit der Internet-Freeware "*primer3*" (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) konstruiert, es handelt sich um Intron überspannende, sequenzspezifische Oligonukleotid-*primer*. Die Herstellung der *primer* erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon mit einer Konzentration von 100 pmol/μl. Für die qRT-PCR werden *forward* und *reverse primer* 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt (Endkonzentration: 10 pmol/μl) und pro Ansatz jeweils 0,5 μl von jedem *primer* pipettiert. In jedem experimentellen Ansatz werden ein Zielgen und ein Referenzgen (*Hydroxymethylbilan-Synthase* (Synonym: *Porphobilinogendeaminase* (PBGD)) zur internen Kontrolle gemessen. Die Differenz in den *cycle threshold* (Ct)-Werten, dieser beiden Gene wird in Excel mit der ΔCt -Methode berechnet und der $2^{-\Delta Ct}$ Wert graphisch dargestellt. Der Ct-Wert beschreibt das exponentielle Wachstum einer Kurve bzw. den Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt [91].

Tab. 7: Sequenzen der verwendeten *primer* in der qRT-PCR

<i>primer</i>	Sequenz (5'-3')	Genbank-ID	Produktlänge (bp)
PBGD F	GGCGCAGCTACAGAGAAAGT	NM_013168	115
PBGD R	AGCCAGGATAATGGCACTGA		
TLR1 F	CCTAGAGAAAGATGACATTCCGGG	NM_001172120	253
TLR1 R	ATTGGTAGGGATGGAGTACTGTG		
TLR2 F	AGATGGCCACAGGACTCAAG	NM_198769	100
TLR2 R	TCACAGCCATCAAGATCCAG		
TLR3 F	AAGCAACCCTTTCAAAAACCA	NM_198791	111
TLR3 R	AGCTCTTGGAGGTTCTCCAGTT		
TLR4 F	CATGGCATTGTTCTTTCT	NM_019178	116
TLR4 R	TGTCATGAGGGATTTTGCTG		
TLR5 F	CCACTGGGCTACCTCACCAG	NM_001145828	111
TLR5 R	CTTCTTGTGGCGGACTTGG		
TLR6 F	CTGGCGTCCGAGATATCTTG	NM_207604	149
TLR6 R	CTTCCGACTATTAAGGCCAGG		
TLR7 F	GCTCTGTTCTCCTCCACCAA	NM_001097582	141
TLR7 R	CCATCGAAACCCAAGGACTC		
TLR8 F	TTGCCAAAATCTGCTCTCTGC	NM_001101009	133
TLR8 R	AATCCACGACTGAGGGGACA		
TLR9 F	GCTGCCAGTTTGTGAGAGG	NM_198131	150
TLR9 R	GTAGGAAGGCAGGCAGGGTA		
TLR10 F	ACTGACCTCCCTGGGTGTGA	NM_001146035	105
TLR10 R	CTCCTGGCAGCTCTGGAAAA		
Myd88 F	GCCTTGTTAGACCGTGAGGA	NM_198130	145
Myd88 R	TTGTCTGTGGGACACTGCTC		
TRIF F	GGTAGCTGCAGATGCTGTTCA	NM_053588	109
TRIF R	TTGGAATGACAGAAGAGACACCA		
MD-2 F	GAGGCTGTCAACACAGCAATA	NM_001024279	94
MD-2 R	TATCCCCAGCAATGGCTTCT		
CD14 F	CAGAATCTACCGACCATGAAGC	NM_021744	143
CD14 R	GGATCTGAGAAGTTGCAGTAGC		
TRAM1 F	AGTTGGCGTATTGGCTCCAT	NM_001007701	113
TRAM1 R	CCCAGCAATGTGGAAGAGGT		
TIRAP F	GCCTCCTCCACTCAGTCCAA	XM_001055833	140
TIRAP R	CCATCCTGTGTGGCTGTCTG		
Nestin F	GATCGCTCAGATCCTGGAAG	NM_012987.1	118
Nestin R	AGGTGTCTGCAACCGAGAGT		

qRT-PCR = quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, F (*forward*), R (*reverse*), ID (Identification), bp (Basenpaare)

2.5.12.3 Agarosegelelektrophorese

Um die PCR-Produkte nach ihrer Größe aufzutrennen und sichtbar zu machen, werden Agarosegele verwendet, die mit *Gelred* gefärbt werden.

Für ein 1,5%iges Gel werden 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (1 x) durch dreimaliges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Der klaren Lösung werden nach kurzem Abkühlen 8-10 µl *Gelred* zur Färbung der Nukleinsäuren zugesetzt und danach wird die flüssige Agaroselösung in eine Gelkammer gegossen. Durch Platzieren eines Kämmchens im Gel bilden sich Probenaschen. Nach 30 min ist das Gel fest, wird in eine Laufkammer mit TAE-Puffer (1 x) überführt und dort mit Proben beladen. Das PCR-Produkt wird 10:1 mit *loading dye solution* gemischt und es werden jeweils 10 µl in die Probenaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße werden zusätzlich 6 µl eines *gene ruler* Größenstandards pipettiert. Bei 100-120 V werden die Nukleinsäuren in 20-30 min der Größe nach aufgetrennt. Die Produktgröße des Fragmentes wird dann mit einem digitalen Geldokumentationssystem überprüft und mit der *AlphaEase FC Software 3.3.0* ausgewertet. Für die Experimente wurden nur *primer* verwendet, die in der Gelelektrophorese eine einzelne Bande der erwarteten Größe liefern.

2.5.12.4 Sequenzierung

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wird eine Sequenzierung bei der Firma GATC (Konstanz, Germany) oder SeqLab (Göttingen, Germany) durchgeführt. Dazu werden die PCR-Produkte mit einem *PCR Purification Kit* über eine Säule gereinigt und nach Messen der DNA-Konzentration im NanoDrop auf 20-40 ng/µl in RNase-freiem Wasser für die Sequenzierung eingestellt.

2.5.13 **Aufarbeitung von Blut und Kultivierung von Zellen in einer *Mixed Lymphocyte Reaction* (MLR)**

2.5.13.1 Aufarbeitung von Blutproben

Das verwendete Blut wird Transplantatempfängern (Responder) und unbehandelten Ratten (Stimulator), nach vorheriger Heparininjektion (1.000 IE), über die *Vena cava* entnommen. Es wird in 10 ml Röhrchen überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. 2-3 ml Blut werden mit sterilem PBS (1 x) mit Zusatz von 1% BSA (PBS/BSA) aufgefüllt. Zur Aufreinigung mononukleärer Leukozyten aus dem Blut,

werden jeweils 25 ml des verdünnten Blutes über einen Percoll-Dichtegradienten geschichtet und dann für 30 min bei 1.563 g zentrifugiert. Der isopyknische Gradient setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 8,2 ml Percoll
- 4,4 ml Aqua dest.
- 1,4 ml Natriumchloridlösung (0,9%)
- 30 µl Salzsäure 1 N

Während der Zentrifugation bilden sich im Gradienten verschiedene Schichten aus. Für diese Experimente ist der in der Interphase zu findende weiße Ring mit mononukleären Leukozyten von Interesse, der in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt wird. Durch erneutes Auffüllen mit PBS/BSA auf 50 ml und Abzentrifugieren bei 1.563 g für 10 min werden die Zellen zunächst gewaschen und gleichzeitig bildet sich am Boden des Röhrchens ein *pellet* aus Erythrozyten und Granulozyten. Der Überstand wird komplett dekantiert, dann werden die Zellen in 1 oder 2 ml sterilen RPMI-Mediums (Zusätze siehe unten) aufgenommen und anschließend die Zellzahl bestimmt. Dafür werden 90 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypan-Blaulösung gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Daraufhin wird die gewünschte Zellzahl durch Zugabe entsprechender Menge sterilen RPMI-Mediums eingestellt. Dem sterilen RPMI-Medium werden zusätzlich folgende Stoffe zugesetzt:

- 10% FCS Gold
- 2 mM L-Glutaminlösung
- Penicillin-/Streptomycinlösung (100 x)

2.5.13.2 *Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)*

Zur Durchführung der MLR wird die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden wie in Tab. 8 beschrieben pipettiert. Neben einem Kontrollansatz (RPMI-Medium) und zwei Positivkontrollen (Stimulation von Responderzellen mit Phytohemagglutinin-L (PHA-L) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen) werden für das eigentliche Experiment Responder- und Stimulatorzellen in einem Ansatz zusammen gegeben. Alle Ansätze werden mindestens in Vierfachbestimmungen in 96-well-Platten pipettiert (siehe Tab. 8). Die Stimulatorzellen werden vorher mit Mitomycin C (25 µg/ml) behandelt und für 30 min im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit frischem RPMI-Medium und Zentrifugation bei 1.563 g für 10 min, werden die Zellen nach erneuter Bestimmung

und Einstellung der Zellzahl für den Versuch benutzt. Zusätzlich wird in einem weiteren Experiment (Experiment + PHA-L, siehe Tab. 8) überprüft, ob eventuelle Mitomycin C-Kontaminationen der Stimulatorzellen, die PHA-L-induzierte Proliferation der Responderzellen beeinflussen. Zur weiteren Kontrolle werden die Extinktionen von Responder- und Stimulatorzellen jeweils einzeln gemessen, um die spontane Proliferation der Zellen zu bestimmen.

Tab. 8: Pipettierschema der *mixed lymphocyte reaction* (MLR)

Negativkontrolle	RPMI Medium (200 µl)
Stimulatorzellen	100 µl Stimulatorzellen + 100 µl Medium
Responderzellen	100 µl Responderzellen + 100 µl Medium
Experiment	100 µl Responderzellen + 100 µl Stimulatorzellen
Positivkontrolle 1	100 µl Responderzellen + 90 µl Medium + 10 µl PHA-L (5 µg/ml)
Positivkontrolle 2	100 µl Responderzellen + 95 µl Medium + 5 µl PHA-L (2,5 µg/ml)
Experiment + PHA-L	95 µl Responderzellen + 95 µl Stimulatorzellen + 10 µl PHA-L (5 µg/ml)

Grau hinterlegte Felder: 4-6 Mal pro Versuchstier (n = 4-5) pipettiert; weiß hinterlegte Felder: 4 Mal pro Platte pipettiert (Referenz für alle Ansätze)

Die Platten werden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Begasung inkubiert. Am d 3 werden 100 µl des Mediums entfernt und durch frisches ersetzt. Die Zellen werden am d 4 mit BrdU-Markierungslösung versetzt und ein Einbau in die DNA der Zellen für 24 h zugelassen. Der d 5 ist der Endpunkt des Versuchs, an dem der BrdU-Einbau gestoppt wird. Eingebautes BrdU wird im *Cell Proliferation ELISA* nach dem Protokoll des Herstellers gemessen. Der relative, spezifische BrdU-Einbau wird mit den berechneten Mittelwerten der gemessenen optischen Dichte (OD) und der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Relativer, spezifischer BrdU-Einbau} = \frac{OD_{\text{Exp}} - OD_{\text{Stim}} - OD_{\text{Resp}}}{OD_{\text{Pos1}} - OD_{\text{Resp}}}$$

Exp = Experiment, Stim = Stimulator, Resp = Responder, Pos1 = Positivkontrolle 1

2.5.14 Statistik und Datenauswertung

Statistische Auswertungen werden mit dem IBM-SPSS Statistikprogramm erstellt. Zuerst wird der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, um auszuschließen, dass es sich um eine zufällige Verteilung der Daten handelt. Ist der p-Wert hier kleiner oder gleich 0,05, kann für den Vergleich zweier Gruppen anschließend der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test angewendet werden. Bei einem p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wird der Unterschied zwischen den Gruppen als signifikant beschrieben.

Die Auswertungen der qRT-PCR stellen zum einen die Unterschiede der mRNA-Expressionen verschiedener Gene von Lungen unbehandelte LEW-Ratten im Vergleich zu untransplantierten rechten Lungen isogener Transplantatempfänger und linken isogen transplantierten Lungen dar, andererseits werden die mRNA-Expressionen zwischen rechten und linken Lungen isogener Transplantatempfänger mit untransplantierten rechten Lungen allogener Transplantatempfänger und linken allogenen transplantierten Lungen verglichen. Die aufgetragenen Werte sind die $2^{-\Delta Ct}$ Berechnungen, die wie oben beschrieben (siehe 2.4.11.2) durchgeführt werden. Vor der Berechnung dieser Werte, werden die *threshold*-Werte am Gerät manuell auf einen einheitlichen Wert angepasst worden, so dass auf allen untersuchten Platten der gleiche *threshold*-Wert für das Referenzgen (PBGD) und für das jeweilige Zielgen festgelegt ist. Diese manuelle Festlegung des Wertes ist notwendig, da die automatische Festlegung durch das Gerät selbst zu einer Verschiebung der Daten führen kann.

Teilweise werden die Daten als *arbitrary units* (AU) angegeben. In der analysierten Kontrollgruppe (LEW) werden die berechneten Werte dabei auf 1 *unit* normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgt wie oben beschrieben als Vergleich zwischen zwei unabhängigen Gruppen und wird als signifikant beschrieben, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ ist. Bei signifikanten Unterschieden ist der exakte Wert als „p“ angegeben. Die untersuchten rechten Lungen dienen als interne Kontrollen. Die Anzahl der verwendeten Tiere ist als „n“ angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Histologische Veränderungen des Lungengewebes am d 28

In der histologischen Standardfärbung mit H&E (Abb. 4, A 1-A 3) zeigt sich in linken allogenen transplantierten Lungen im peribronchiolären und perivaskulären Raum eine starke Infiltration mit mononukleären Zellen (Pfeile in Abb. 4, A 3). Am d 28 nach Transplantation lassen sich transplantierte und gesunde Lungen histologisch nur durch die Stärke der Infiltration mononukleärer Zellen voneinander unterscheiden, die in allogenen Lungentransplantaten am stärksten ist. In rechten und linken Lungen isogener Transplantatempfänger sind nur wenige infiltrierende Zellen zu sehen. In isogenen Lungentransplantaten finden sich sporadisch kleine peribronchioläre Infiltrate (Pfeil in Abb. 4, A 2), während in rechten Lungen isogener Transplantatempfänger nur einzelne infiltrierende Zellen zu sehen sind (Pfeil in Abb. 4, A 1). Zur Darstellung elastischer Membranen wird eine Orceinfärbung durchgeführt, um die Struktur der Blutgefäße zu analysieren. Am d 28 ist in keiner der untersuchten Lungen ein Gefäßumbau zu erkennen (Abb. 4, B 1-B 3). Die Azanfärbung stellt Bereiche mit viel Extrazellulärschubstanz (z.B. Kollagen) blau gefärbt dar. Sowohl in den nativen Lungen als auch in Transplantaten am d 28 sind keine fibrotisch veränderten Bereiche sichtbar (Abb. 4, C 1-C 3).

Nach der Klassifizierung der ISHLT gelten die in allogenen Transplantaten auftretenden histologischen Veränderungen des Lungengewebes als Zeichen einer milden bis moderaten akuten Abstoßung, entsprechend Grad A2/B1R-A3/B1R [46, 156]. In isogenen Transplantaten findet keine akute Abstoßung statt, würde man jedoch die gleiche Klassifizierung wie in allogenen Transplantaten verwenden, hätte man in isogenen Transplantaten einen Grad A1/B0 (minimale histologische Veränderungen) und in rechten Lungen isogener Transplantate einen Grad A0/B0 (keine histologischen Veränderungen) [156].

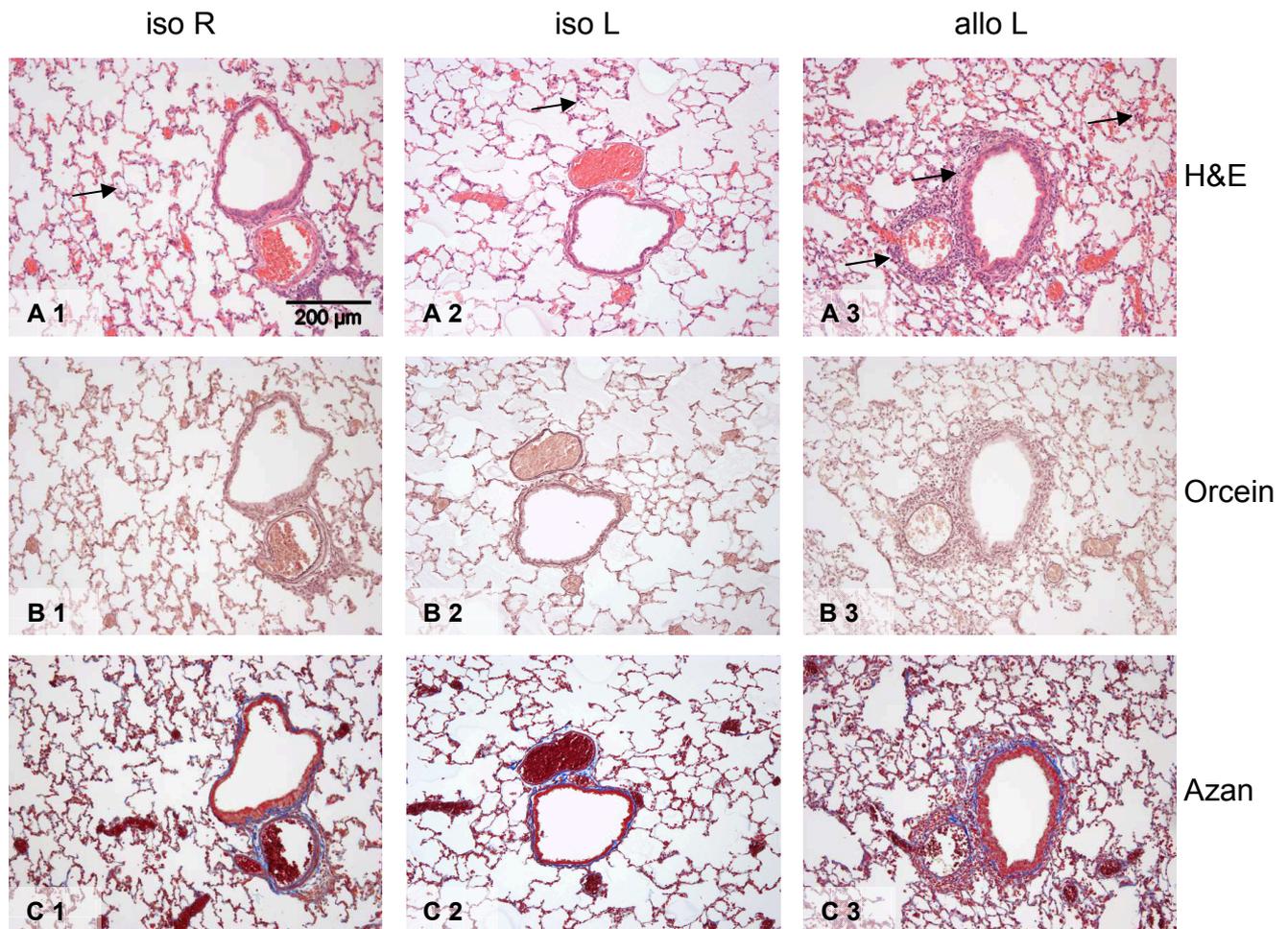


Abb. 4: Histologische Färbungen mit Hämalau & Eosin (H&E; A), Orcein (B) und Azan (C) auf Paraffinschnitten von Lungengewebe isogener Transplantatempfänger (iso R, iso L) sowie allogener Lungentransplantate (allo L) am d 28 nach linksseitiger Lungentransplantation. In allo L fallen Infiltrate von mononukleären Zellen auf (Pfeile in A 3), während in iso R und iso L (Pfeile in A 1, 2) kaum histologische Veränderungen zu sehen sind. In keiner der untersuchten Lungen gibt es Gefäßumbau (B 1-3) oder fibrotische Veränderungen (C 1-3). iso R = untransplantierte rechte Lunge isogener Transplantatempfänger, iso L = linke isogen transplantierte Lunge, allo L = linke allogene transplantierte Lunge, jeweils n = 4.

3.2 Verteilung von Glattmuskelaktin (α SMA) in Transplantaten am d 28

Zur Untersuchung von Veränderungen der glatten Muskulatur um Gefäße und Atemwege sowie zum Nachweis von Myofibroblasten in transplantierten und nativen Lungen werden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen α SMA durchgeführt. Zur Kontrolle werden Schnitte mitgeführt, bei denen auf die Inkubation mit Primärantikörper verzichtet wird, hier gibt es keine Färbung. In allen transplantierten Lungen am d 28 ist eine deutliche Färbung der glatten Muskulatur sowohl im Bereich der Atemwege und Blutgefäße, als auch in einzelnen Zellen in den *Ductus alveolares* bzw. den *Sacculi alveolares* zu finden. Es zeigen sich jedoch keine Unterschiede in der Verteilung von α SMA zwischen transplantierten Lungen

am d 28 (Abb. 5 B und C) und nativen rechten Lungen von Empfängern isogener Transplantate (Abb. 5 A).

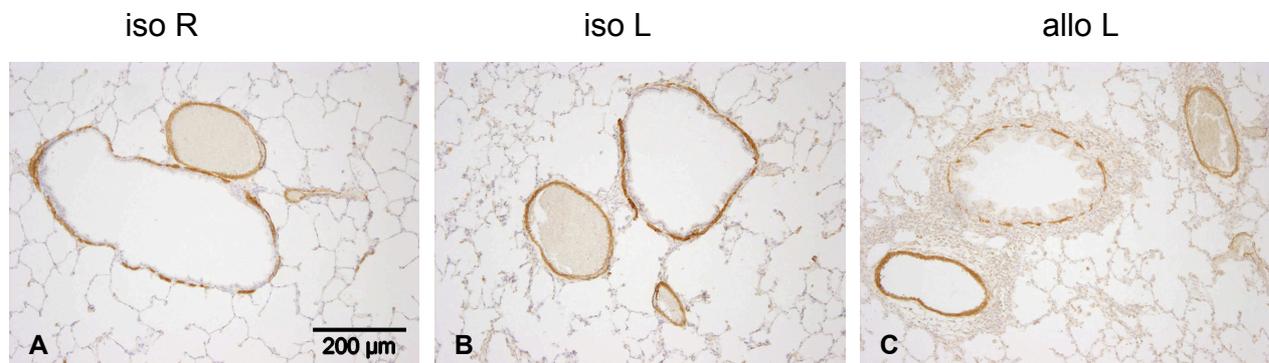


Abb. 5: Immunhistochemische Färbung in braun mit monoklonalen Antikörpern gegen Glattmuskelaktin (α SMA) auf Paraffinschnitten von Lungengewebe isogener Transplantatempfänger (iso R, (A); iso L (B)) und allogener Lungentransplantate (allo L (C)) am d 28 nach linksseitiger Lungentransplantation. Das untersuchte Gewebe von iso R, iso L, sowie von allo L zeigt eine ähnliche Intensität und Verteilung der α SMA-positiven Bereiche rings um Blutgefäße und Bronchiolen. Es gibt keine Unterschiede zwischen iso und allo Transplantaten bzw. untransplantierten iso R. iso R = untransplantierte rechte Lunge isogener Transplantatempfänger, iso L = linke isogen transplantierte Lunge, allo L = linke allogene transplantierte Lunge, jeweils n = 4; leichte Gegenfärbung mit Hämalaun.

3.3 Verteilung von ED1- und ED2-positiven Zellen in Transplantaten am d 28

Zur Identifizierung von Makrophagen in nativen Lungen und Transplantaten am d 28 werden Färbungen mit Antikörpern gegen ein CD68-artiges Antigen (ED1) und gegen CD163 (ED2) durchgeführt [40]. Zur Kontrolle werden Schnitte ohne Inkubation mit Primärantikörper mitgeführt, hier zeigt sich keine Färbung. In allogenen Lungentransplantaten (Abb. 6 C) sind größere perivaskuläre und peribronchioläre Infiltrate ED1-positiver Zellen zu finden. Im Alveolarraum lassen sich einzelne gefärbte Zellen erkennen, die aufgrund ihrer Größe als Alveolarmakrophagen identifiziert werden können (siehe Pfeilkopf in Abb. 6 C). In der isogenen sind im Vergleich zur allogenen Situation deutlich weniger gefärbte Zellen vorhanden, wobei hier in isogenen Lungentransplantaten mehr ED1-positive Zellen zu sehen sind als in untransplantierten rechten Lungen isogener Transplantatempfänger. Mit Antikörpern gegen CD163 (ED2) werden in der gesunden Lunge interstitielle Makrophagen nachgewiesen und er ist ein bekannter Marker für M2-Makrophagen [19, 146]. In isogenen Transplantaten zeigt sich scheinbar eine leicht erhöhte Anzahl gefärbter Zellen im interstitiellen Raum und rings um Bronchiolen (Pfeil in Abb. 6 E) als in allogenen Transplantaten (Abb. 6 F). In

rechten Lungen isogener Transplantatempfänger (Abb. 6 D) sind nur wenige ED2-positive Zellen zu finden. Im peribronchiolären Infiltrat sind vereinzelt auch ED2-positive Zellen zu sehen (Abb. 6 F). Insgesamt werden in allen untersuchten Geweben nur wenige ED2-positive Zellen nachgewiesen.

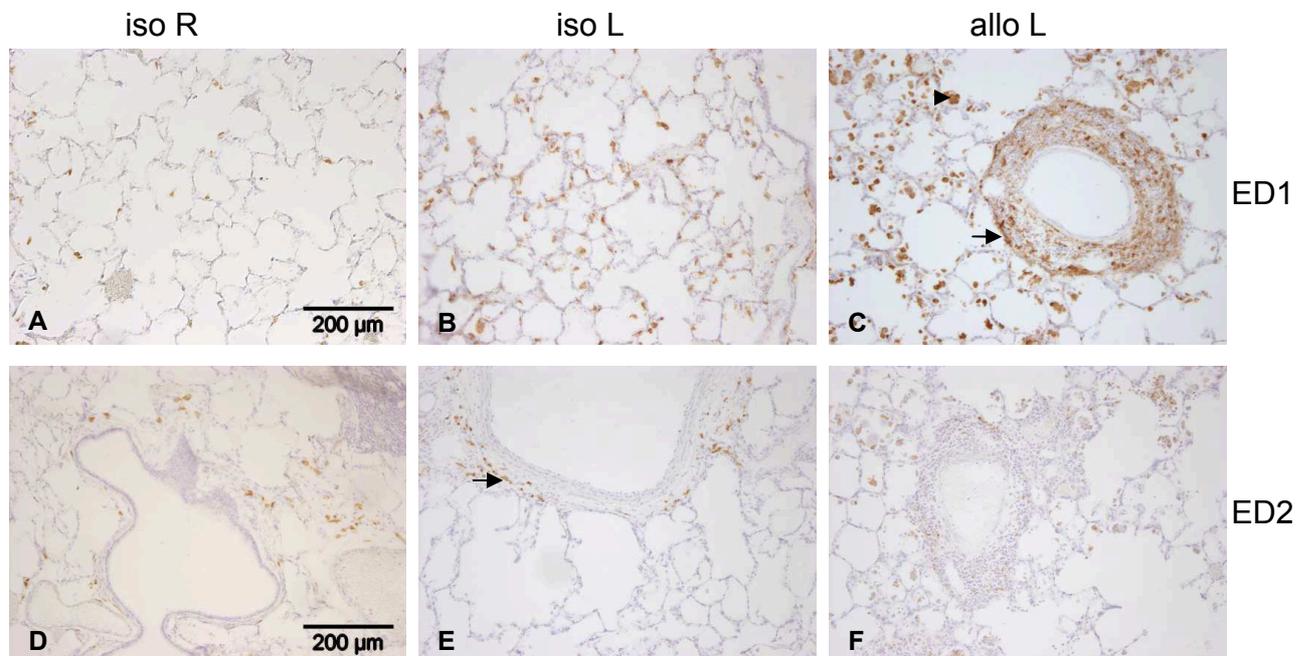


Abb. 6: Immunhistochemische Färbung in braun mit monoklonalen Antikörpern gegen ein CD68-artiges Antigen (ED1; A-C) und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD163 (ED2; D-F) auf Gefrierschnitten von Lungen isogener Transplantatempfänger (iso R, iso L) und allogenen Lungentransplantaten (allo L) am d 28 nach linksseitiger Lungentransplantation. In allo L (C) befindet sich ein Ring aus ED1-positiven Zellen rings um einen Bronchiolus, im Alveolarraum sind weitere ED1-positive Zellen (Pfeile in C), vermutlich Alveolarmakrophagen (Pfeilkopf in C). In iso R (A) und iso L (B) sind deutlich weniger ED1-positive Zellen vorhanden. Dafür findet sich in Färbungen mit ED2 in der iso (D, E) im Gegensatz zur allo Situation (F) eine leicht erhöhte Anzahl von ED2-positiven Zellen im interstitiellen Raum und rings um Bronchiolen (Pfeil in E). iso R = untransplantierte rechte Lunge isogener Transplantatempfänger, iso L = linke isogen transplantierte Lunge und allo L = linke allogene transplantierte Lunge, jeweils n = 4; leichte Gegenfärbung mit Hämalaun.

3.4 Expression von Genen des TLR-Systems am d 28 nach der Transplantation

Die Analyse der Expressionen verschiedener Gene des TLR-Systems wird in Lungen unbehauelter LEW-Ratten, sowie in Lungen isogener und allogener Transplantatempfänger am d 28 durchgeführt. Auf jeder Platte werden Negativkontrollen ohne cDNA pipettiert, hier gibt es keine Amplifizierung und im Agarosegel findet sich kein Produkt. Die Produktgröße von allen anderen Proben wird ebenfalls im Agarosegel überprüft (siehe Abb. 7) und stimmt mit der in Tab. 7 beschriebenen überein. Mit der Sequenzierung der Produkte kann zusätzlich die Spezifität des Nachweises bestätigt werden.

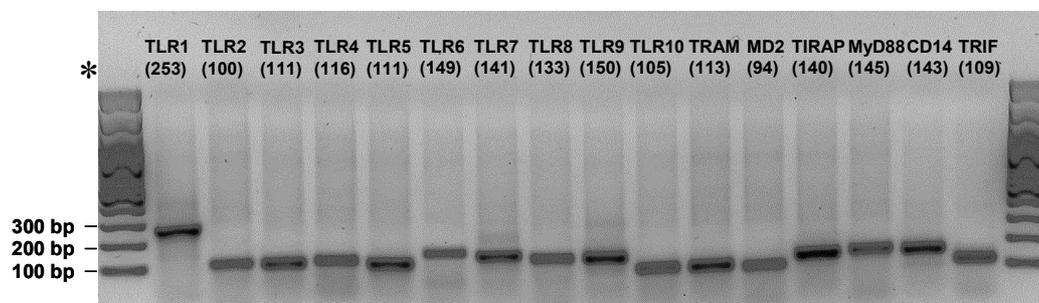


Abb. 7: Die PCR-Produkte aller verwendeten *primer*-Paare (Tab. 7) aus einer qRT-PCR mit cDNA von linken Lungen unbehauelter LEW-Ratten. Die Produkte wurden jeweils aus Lungenhomogenat einer unbehauelten LEW-Ratte bestimmt. Alle *primer*-Paare liefern einzelne, spezifische Banden mit der angegebenen Basenpaarlänge (in Klammern). * = Größe des Amplifikons (bp), bp = Basenpaare, cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure, LEW = Lewis TLR = Toll-like Rezeptor, qRT-PCR = quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion.

Zunächst wird die mRNA-Expression der einzelnen Gene zwischen LEW-Ratten und isogenen Transplantatempfängern (Abb. 8, A1-O1, linke Seite) verglichen, anschließend zwischen isogenen und allogenen Transplantatempfängern (Abb. 8, A2-O2, rechte Seite). TLR6 kann nur in einzelnen Proben detektiert werden, deshalb sind für dieses Gen keine Daten dargestellt.

Im Vergleich der Lungen unbehauelter LEW-Ratten und isogener Transplantatempfänger zeigen sich nur geringfügige Unterschiede in der mRNA-Expression der verschiedenen Gene (Abb. 8, A1-O1, linke Seite). Der statistische Vergleich der linken Lungen zeigt nur für TLR3, TLR4 und TLR7 eine signifikante Hochregulierung der mRNA-Expression nach isogener Transplantation. Für CD14 ist die mRNA-Expression in unbehauelten linken Lungen von LEW-Ratten signifikant höher als in isogen transplantierten Lungen (Abb. 8, J 1). Insgesamt ist die mRNA-Expression der untersuchten Gene relativ schwach ($2^{-\Delta Ct}$ unter 10), nur TLR4 ($2^{-\Delta Ct}$,

5-25), TLR7 ($2^{-\Delta Ct}$, 5-25) und TRAM ($2^{-\Delta Ct}$, 50-90) zeigen eine relativ starke Expression.

In Abb. 8 A2-O2 (rechte Seite) sind die berechneten $2^{-\Delta Ct}$ derselben Gene im Vergleich für isogene und allogene Transplantatempfänger aufgeführt. Der statistische Vergleich der $2^{-\Delta Ct}$ -Werte zeigt eine signifikante Hochregulierung der mRNA-Expression in allogenen transplantierten Lungen für die folgenden Gene: TLR1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, MD2 und CD14 (Abb. 8, A-C 2, E 2, F 2, H-K 2). Bei diesen Genen liegen die rechte und linke Lunge isogener Transplantatempfänger und rechte Lungen allogener Transplantatempfänger in einem ähnlichen Bereich. Bei den meisten liegt dieser Wert unter 10. Für TLR7 und TLR9 ist er zwischen 10-20 und verdoppelt sich in linken allogenen transplantierten Lungen (Abb. 8, F 2 und H 2). TLR4 und TRAM (Abb. 8, D 2 und N 2) zeigen eine ähnlich starke mRNA-Expression. Hier liegen rechte und linke Lungen isogener und allogener Transplantatempfänger jedoch alle auf einem ähnlichen Expressionsniveau (TLR4 $2^{-\Delta Ct}$, 10-15; TRAM $2^{-\Delta Ct}$, 40-60) und zeigen keine großen Unterschiede. Dies gilt auch für TLR8, MyD88, TIRAP und TRIF (Abb. 8, G 2, L 2, M 2, O 2), hier liegt in allen untersuchten Proben eine relativ schwache mRNA-Expression ($2^{-\Delta Ct}$ unter 10) vor.

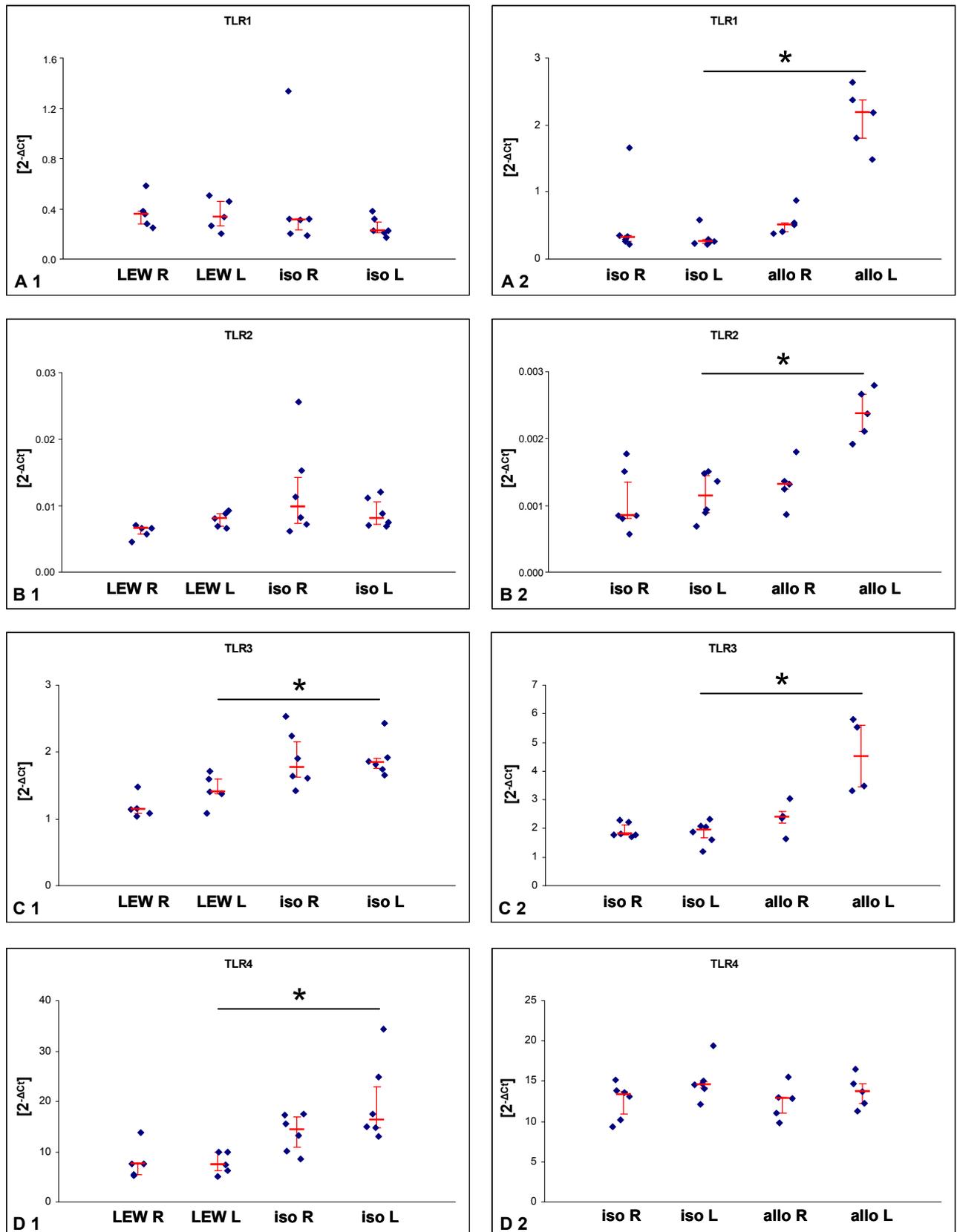
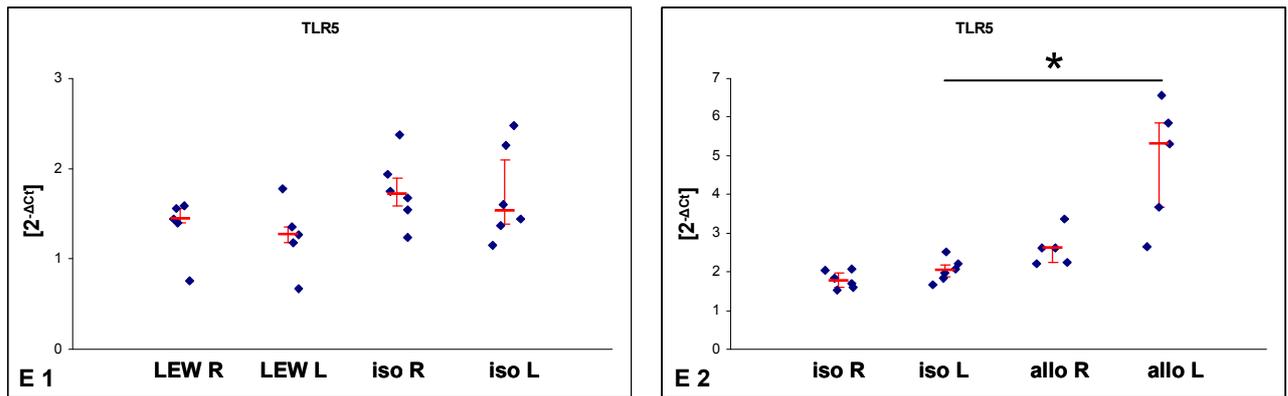


Abb. 8.1: Darstellung der mRNA-Expression verschiedener Gene des TLR-Systems in Lungen un behandelter LEW-Ratten (LEW R, LEW L) und in rechten und linken Lungen isogener (iso R, iso L) und allogener (allo R, allo L) Transplantatempfänger am d 28. Beschreibung siehe 8.4



TLR6 meist unter der Nachweisgrenze

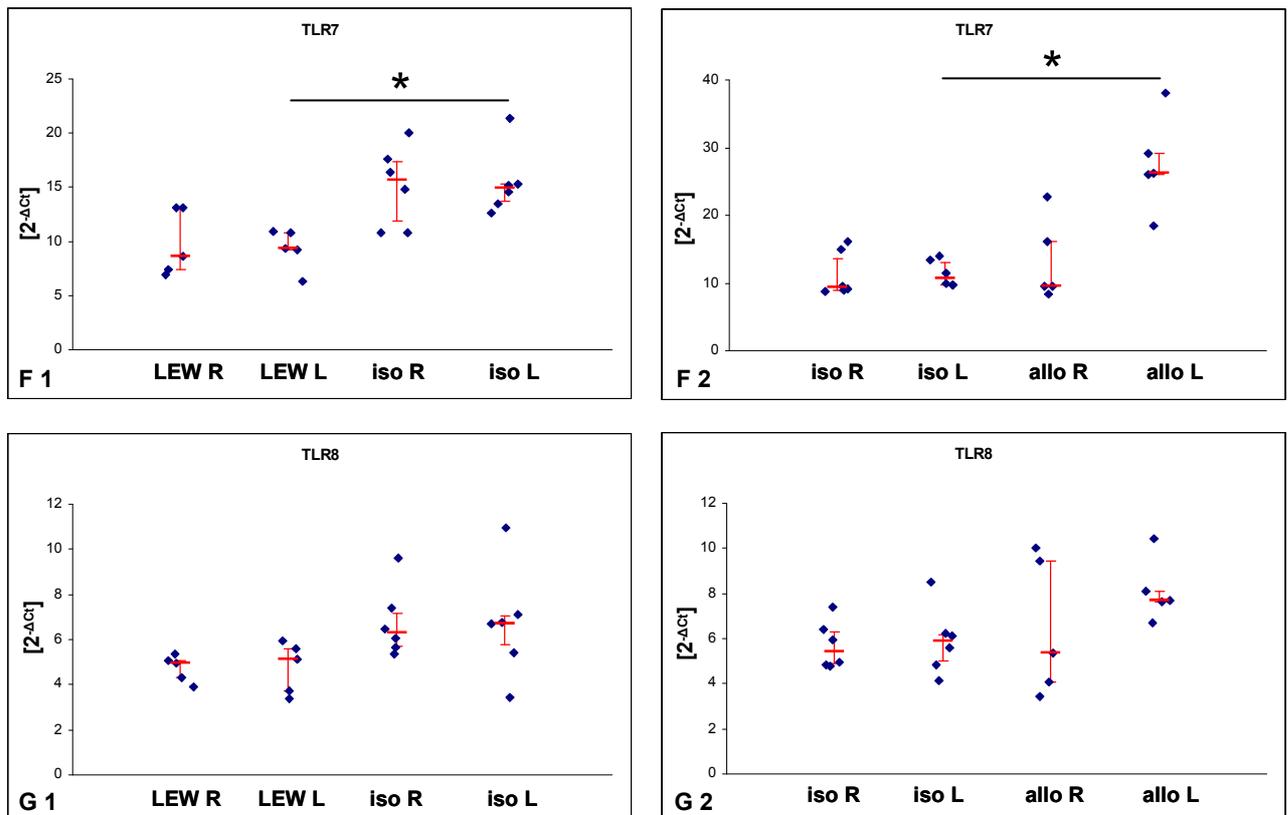


Abb. 8.2: Darstellung der mRNA-Expression verschiedener Gene des TLR-Systems in Lungen un behandelter LEW-Ratten (LEW R, LEW L) und in rechten und linken Lungen isogener (iso R, iso L) und allogener (allo R, allo L) Transplantatempfänger am d 28. Beschreibung siehe 8.4

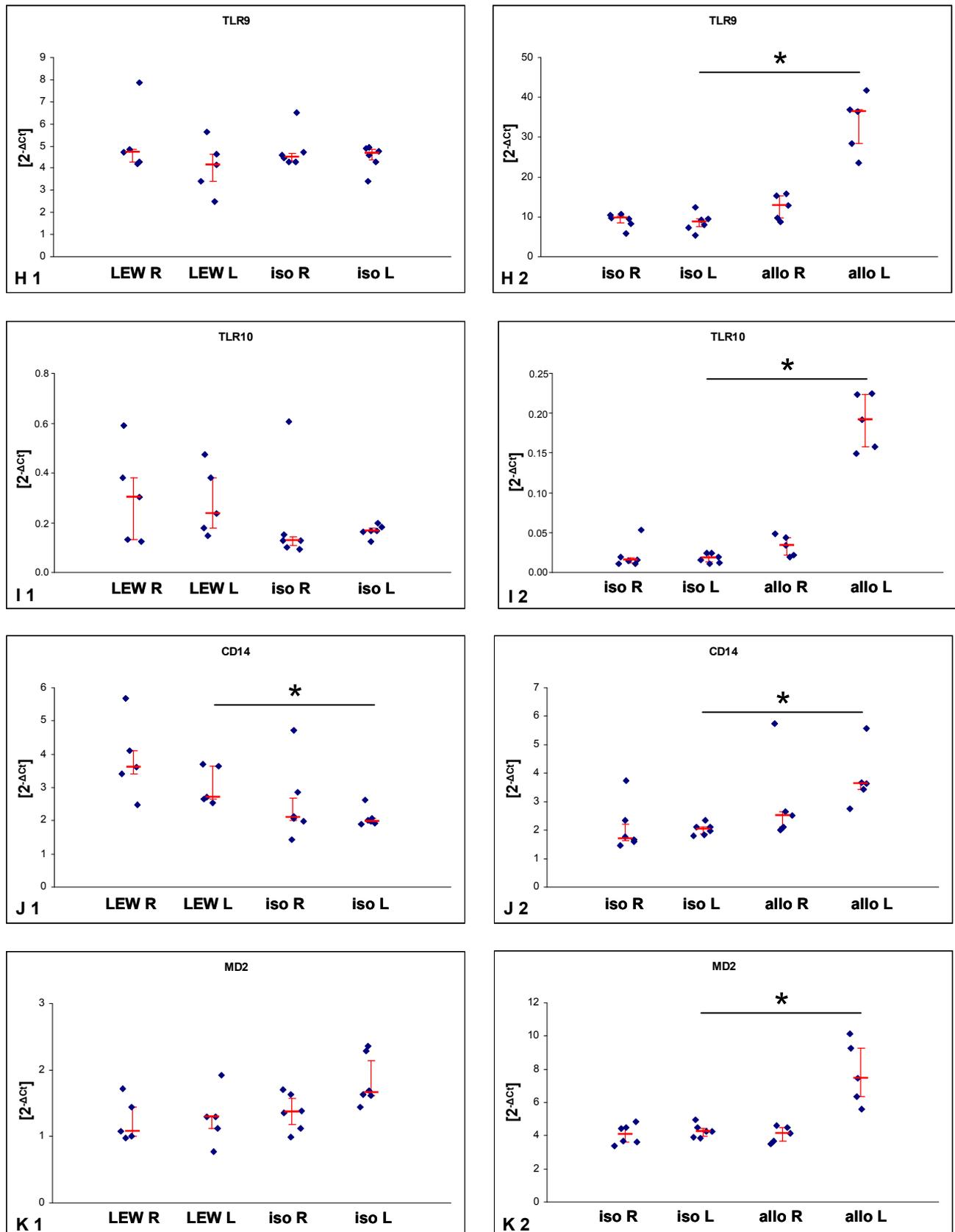


Abb. 8.3: Darstellung der mRNA-Expression verschiedener Gene des TLR-Systems in Lungen un behandelter LEW-Ratten (LEW R, LEW L) und in rechten und linken Lungen isogener (iso R, iso L) und allogener (allo R, allo L) Transplantatempfänger am d 28. Beschreibung siehe 8.4

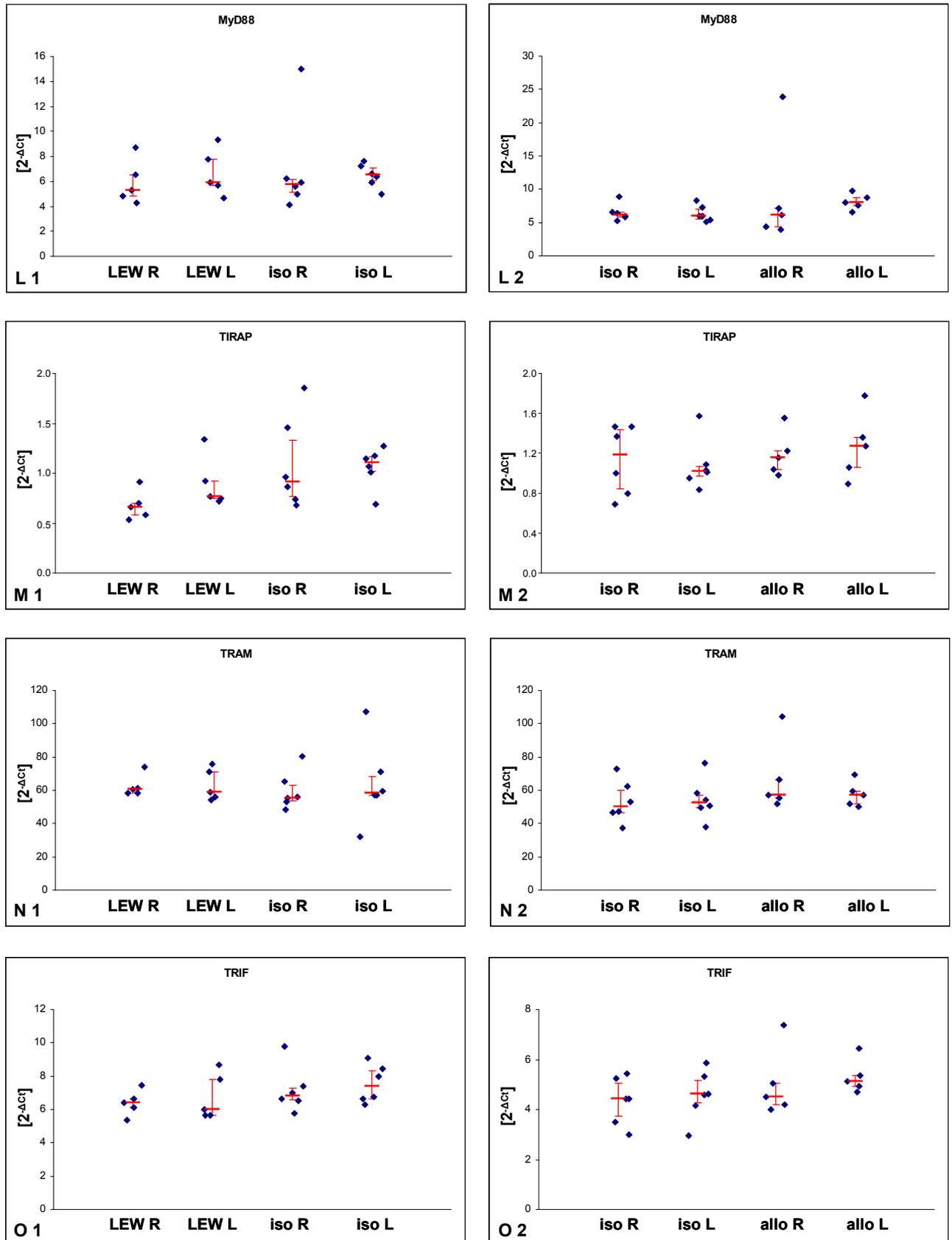


Abb. 8.4: Darstellung der mRNA-Expression verschiedener Gene des TLR-Systems in Lungen unbehandelter LEW-Ratten (LEW R, LEW L) und in rechten und linken Lungen isogener (iso R, iso L) und allogener (allo R, allo L) Transplantatempfänger am d 28. Die berechneten $2^{-\Delta C_t}$ Werte sind dargestellt. Der statistische Vergleich erfolgt jeweils zwischen den linken Lungen mit dem Mann-Whitney-U Test. Auf der linken Seite der Abbildung ist der Vergleich von LEW und iso dargestellt, auf der rechten Seite der von iso und allo. Der Vergleich von LEW L und iso L zeigt nur vereinzelt

statistisch signifikante Unterschiede. TLR3, TLR4, TLR7 und CD14 zeigen signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression. Die anderen untersuchten Gene weisen keine Unterschiede der mRNA-Expression zwischen LEW und iso auf. Im Vergleich von iso L und allo L können für TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR7, TLR9, TLR10, MD2 und CD14 signifikante Unterschiede der mRNA-Expression gefunden werden. Dargestellt sind die Einzelpunkte in blau, der Median als breiter roter Querstrich, sowie die Perzentile 25 und 75 als schmale rote Querstriche. * = signifikant ($p \leq 0,05$), TLR = Toll-like Rezeptor, LEW = Lewis, LEW R = rechte Lunge un behandelter LEW-Ratten, LEW L = linke Lunge un behandelter LEW-Ratten, iso R = untransplantierte rechte Lunge isogener Transplantatempfänger, iso L = linke isogen transplantierte Lunge, jeweils $n = 6$; allo R = untransplantierte rechte Lunge allogener Transplantatempfänger, allo L = linke allogenen transplantierte Lunge, $n = 4-5$.

Ein Vergleich aller gemessenen Ct-Werte von PBGD (jeweils alle Mittelwerte der Duplikate) zeigt in allen untersuchten Gruppen und auf allen analysierten Platten keine Unterschiede (Abb. 9, Ct-Werte zwischen 22-27). Der Median aller untersuchten Gruppen liegt bei einem Wert von 24.

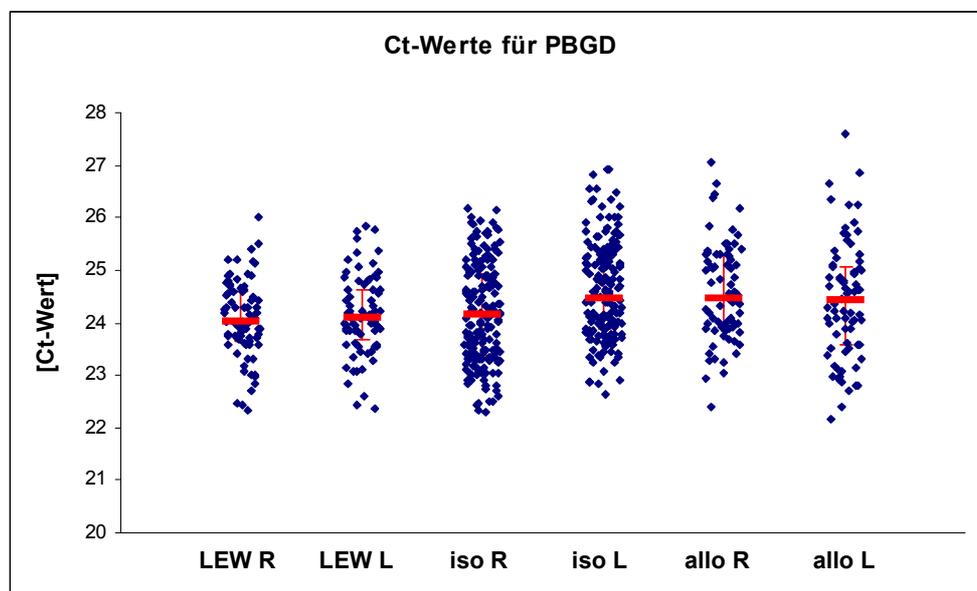


Abb. 9: Darstellung aller *cycle threshold* (Ct)-Werte des *housekeeping*-Gens (PBGD) in der qRT-PCR in rechten und linken Lungen un behandelter LEW-Ratten (LEW R, LEW L), isogener (iso R, iso L) und allogener (allo R, allo L) Transplantatempfänger. Die Werte zeigen keine großen Schwankungen zwischen den Gruppen und liegen alle im Bereich von 22-27. Da die Gruppe der iso Transplantatempfänger auf zwei Platten analysiert wird, liegt hier die doppelte Anzahl an Werten vor. Der Median liegt in allen Gruppen bei einem Wert von 24. Dargestellt sind die Einzelpunkte in blau, der Median als breiter roter Querstrich, sowie die Perzentile 25 und 75 als schmale rote Querstriche. qRT-PCR = quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion, PBGD = Hydroxymethylbilan-Synthase (Synonym: Porphobilinogendeaminase), Ct = *cycle threshold*, LEW = Lewis, LEW R = rechte Lunge un behandelter LEW-Ratten, LEW L = linke Lunge un behandelter LEW-Ratten, iso R = untransplantierte rechte Lunge isogener Transplantatempfänger, iso L = linke isogen transplantierte Lunge, allo R = untransplantierte rechte Lunge allogener Transplantatempfänger, allo L = linke allogenen transplantierte Lunge.

3.5 Erfolgreiche Immunhistochemie und WB mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 und TLR4

TLR2

Zur weiteren Überprüfung der Expression von TLR, werden Färbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 (ebioscience) aus der Maus auf Lungengewebe von Ratten (DA → LEW, d 4 nach linksseitiger Lungentransplantation, Modell zur akuten Transplantatabstoßung), WT-Mäusen (C57/BL6) sowie TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Das Datenblatt des Herstellers beschreibt diesen Antikörper als kreuzreaktiv mit Mensch und Maus und für die Immunhistochemie geeignet.

Zur Kontrolle der Färbung werden Schnitte mitgeführt, die nicht mit Primärantikörper inkubiert werden, hier zeigt sich keine Färbung. Im Lungengewebe der Ratten kann eine punktförmige Färbung in Alveolarmakrophagen für TLR2 gefunden werden (Pfeile in Abb. 10 A). Es handelt sich hier, sowie in den folgenden Abschnitten um Vorversuche zur Überprüfung der Spezifität des jeweiligen Antikörpers. Hierfür ist das Lungengewebe aus dem Modell DA → LEW zur akuten Transplantatabstoßung besonders geeignet (d 4 nach der Transplantation), da wegen der akuten Abstoßungsreaktion in diesem Modell eine verstärkte TLR-Expression erwartet wird. Um eine Färbung auf Mausgewebe durchführen zu können, werden die Antikörper mit einem HRP-Markierungssystem markiert und direkt für immunhistochemische Färbungen eingesetzt. Hier ist nach Inkubation mit Antikörpern gegen TLR2 nur eine schwache Färbung zu sehen (Abb. 10 B), deshalb wird eine weitere Färbung mit HRP-markierten Antikörpern unter zusätzlicher Verwendung des Verstärkungssystems durchgeführt (Abb. 10 C und D). Die Färbung des Lungengewebes ist danach stärker (Abb. 10 C), jedoch zeigt auch das zur Kontrolle verwendete Lungengewebe von TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen eine Färbung (Abb. 10 D).

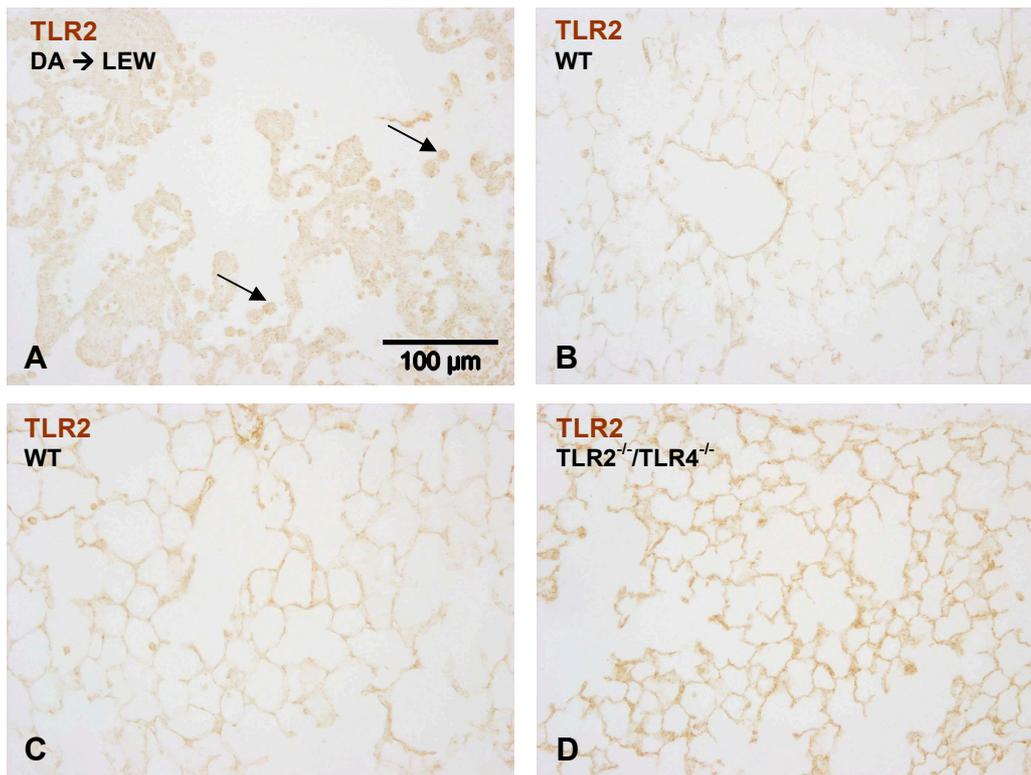


Abb. 10: Immunhistochemische Färbungen in braun mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 auf Paraffinschnitten von Lungentransplantaten von Ratten (DA → LEW), Wildtyp- (WT) und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen. In Lungentransplantaten (DA → LEW, d 4 nach Transplantation, Modell der akuten Transplantatabstoßung) ist nach Inkubation mit TLR2 und zusätzlicher Verwendung des Verstärkungssystems eine punktförmige Färbung vor allem in Alveolarmakrophagen vorhanden (Pfeile in A). Nach HRP-Markierung des Antikörpers ist eine schwache Färbung auf Lungengewebe von WT-Mäusen sichtbar (B). Nach HRP-Markierung und zusätzlicher Verwendung des Verstärkungssystems ist die Färbung auf Lungengewebe von WT-Mäusen stärker (C), jedoch ist diese auch in Lungengewebe von TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen vorhanden (D). DA = Dark Agouti, LEW = Lewis, WT = Wildtyp, TLR = Toll-like-Rezeptor, HRP = Meerrettichperoxidase.

Ein weiterer monoklonaler Antikörper gegen TLR2 (Epitomics) aus dem Kaninchen wird in immunhistochemischen Färbungen und WB eingesetzt. Im Datenblatt des Herstellers ist dieser Antikörper als kreuzreaktiv mit Mensch, Maus und Ratte beschrieben. Laut Hersteller funktioniert der Antikörper im WB, aber nicht in der Immunhistochemie. Zur Kontrolle der Färbung werden Schnitte mitgeführt, die nicht mit Primärantikörper inkubiert werden. Hier ist keine Färbung sichtbar. Auf dem Lungengewebe findet sich erneut eine punktförmige Färbung vor allem innerhalb der Alveolarmakrophagen (Pfeile, Abb. 11 A und B). Auch hier wird Lungengewebe von WT- und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen verwendet, um die Spezifität des Antikörpers zu bestätigen. Im Lungengewebe von TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen ist jedoch eine sehr ähnliche Färbung zu sehen wie in WT-Mäusen.

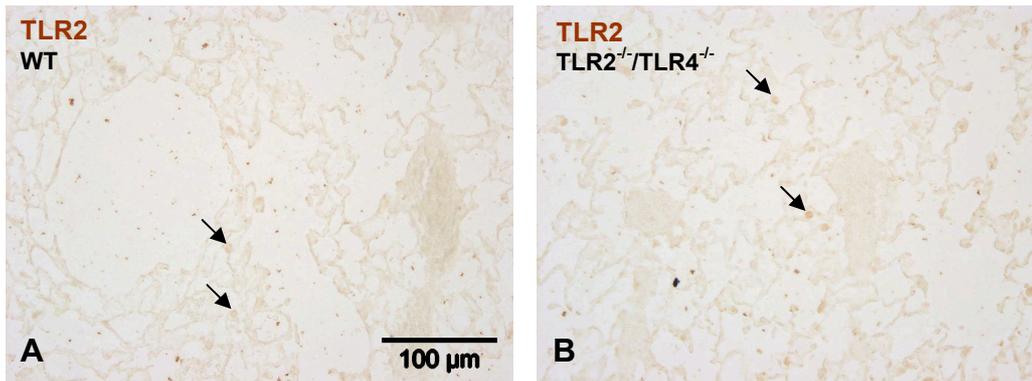


Abb. 11: Immunhistochemische Färbung (A, B) in braun mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 auf Paraffinschnitten von Lungengewebe von Wildtyp- (WT) und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen (TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}). In den immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen TLR2 auf Lungengewebe von WT- und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen, kann kein Unterschied in der Intensität der Färbung festgestellt werden (Pfeile in A und B). TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp.

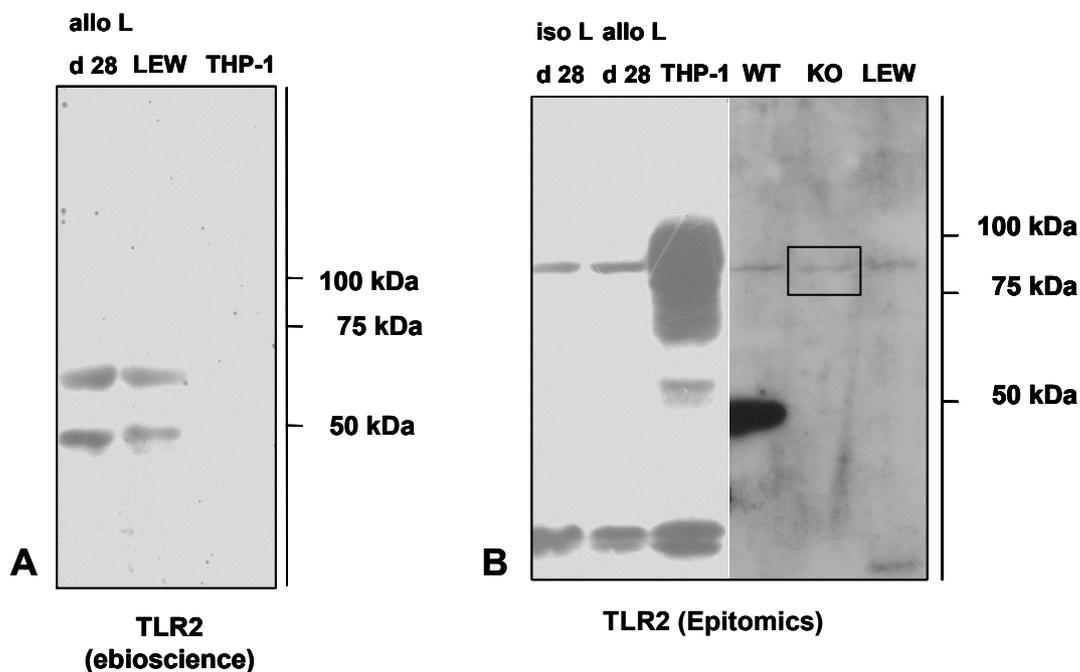


Abb. 12: Proteindetektion im *western blot* (WB) mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 in Lungenhomogenaten von isogenen und allogenen Lungentransplantaten (iso L, allo L) am d 28 nach der Transplantation und in THP-1-Zellen (Positivkontrolle), sowie in Nierengewebe von Wildtyp- (WT) und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen (KO) sowie Lungenhomogenat von unbehandelten LEW-Ratten. Im WB können nach Inkubation mit Antikörpern gegen TLR2 (ebioscience) für allo L d 28 und LEW-Lungen nur zwei unspezifische Banden zwischen 50–75 kDa detektiert werden. In der Positivkontrolle (THP-1) kann keine Bande detektiert werden (A). Für den zweiten Antikörper gegen TLR2 (Epitomics) zeigt sich in transplantierten Lungen (iso L und allo L d 28) eine einzelne Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht (B links). Auch in der Positivkontrolle (THP-1) werden starke Banden nachgewiesen. Bei der Verwendung von WT- und KO-Gewebe aus der Maus, wird diese Bande in gleicher Intensität in beiden Geweben detektiert und ist auch in Lungengewebe von LEW-Ratten vorhanden (B rechts) TLR = Toll-like-Rezeptor, iso L = linke isogen transplantierte Lunge, allo L = linke allogene transplantierte Lunge, THP-1 = humane Zelllinie einer akuten monozytären Leukämie, LEW = Lewis, WT = Wildtyp, KO = TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Maus, kDa = Kilodalton.

Die in den Färbungen verwendeten Antikörper werden auch für die Detektion im WB benutzt. Hier werden nach Inkubation mit Antikörpern gegen TLR2 (ebioscience)

zwei stark positive Banden zwischen 50 – 75 kDa detektiert. Auf der Höhe von etwa 90 – 100 kDa, wo man die TLR erwarten würde, findet sich keine entsprechende Bande (Abb. 12 A), obwohl diverse Variationen des Protokolls versucht wurden. In der Positivkontrolle (THP-1-Zellen) wird keine Bande detektiert (Abb. 12 A).

Für den zweiten Antikörper gegen TLR2 (Epitomics) kann bei der Detektion im WB nach einer Optimierung der Versuchsbedingungen (Blockierung, Nachweis) eine einzelne Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht in linken Lungen isogener und allogener Transplantatempfänger am d 28 nach der Transplantation nachgewiesen werden (Abb. 12 B links). Bei der anschließenden Verwendung von Nierengewebe aus WT und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen (KO) und Lungenhomogenat aus LEW-Ratten, findet sich die gleiche Bande wie zuvor in allen drei Geweben (Abb. 12 B rechts). Alle verwendeten Membranen werden nach dem Nachweis des jeweiligen Antikörpers zur Kontrolle mit Coomassie Blue-Färbelösung gefärbt. Dabei zeigt sich eine adäquate Proteinbeladung der WB.

TLR4

Es werden immunhistochemische Färbungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen TLR4 (ebioscience) aus der Maus durchgeführt. Nach Angaben des Herstellers reagiert dieser Antikörper nur mit TLR4 der Maus und soll nur für die Analyse in der Durchflusszytometrie geeignet sein. Zur Kontrolle der folgenden immunhistochemischen Färbungen werden jeweils Schnitte mitgeführt, die nicht mit Primärantikörper inkubiert werden. Hier zeigt sich keine Färbung.

Unter Verwendung eines hochsensitiven Verstärkungssystems ist auf Schnitten von Lungentransplantaten (DA → LEW, d 4 nach Transplantation, Modell zur akuten Transplantatabstoßung) eine punktförmige Färbung, vor allem in Alveolarmakrophagen zu sehen (Pfeile in Abb. 13 A). Der gleiche Antikörper wird anschließend zur Färbung von Lungengewebe einer WT-Maus verwendet. Dazu wird eine HRP-Markierung des Antikörpers durchgeführt und zusätzlich wird das Verstärkungssystem verwendet. Es kann nur eine sehr schwache Färbung des Gewebes beobachtet werden (Abb. 13 B) und deswegen keine Färbung von TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Lungen durchgeführt.

Ein weiterer monoklonaler Antikörper gegen TLR4 mit FITC-Markierung aus der Maus (Imgenex) wird für immunhistochemische Färbungen verwendet. Das Datenblatt des Herstellers beschreibt diesen monoklonalen Antikörper als

kreuzreaktiv mit Mensch, Maus und Ratte. Aufgrund der FITC-Markierung wird dieser Antikörper nur für den Einsatz in der Durchflusszytometrie beschrieben. Der gleiche Antikörper kann auch unmarkiert erworben werden und soll im WB und in der Immunhistochemie funktionieren (Imgenex, Bestellnr. IMG-5031A). Durch die FITC-Markierung des Antikörpers ist es möglich, das Verstärkungssystem (anti-FITC-Antikörper) direkt zu benutzen. Es wird erneut WT- und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Lungengewebe von Mäusen verwendet. Auf beiden Geweben ist eine Färbung zu sehen, jedoch gibt es keinen Unterschied in der Intensität der Färbung zwischen WT- und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen (Abb. 13 C, D).

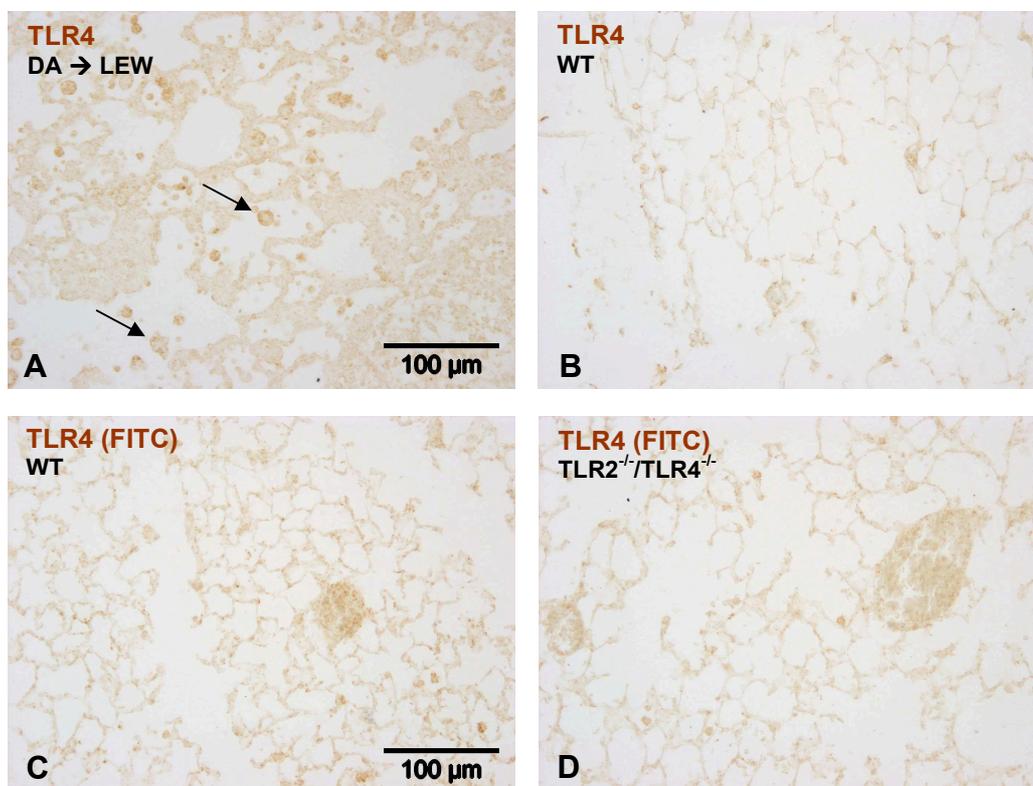


Abb. 13: Immunhistochemische Färbung in braun mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR4 auf Paraffinschnitten transplantierte Lungen von Ratten (DA → LEW) und auf Lungengewebeschnitten von Wildtyp- (WT) und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen. Auf transplantierten Lungen der Ratte (DA → LEW, d 4 nach Transplantation, Modell der akuten Transplantatabstoßung) ist nach Inkubation mit Antikörpern gegen TLR4 (ebioscience) und zusätzlicher Verwendung des Verstärkungssystems eine deutliche punktförmige Färbung, vor allem in Alveolarmakrophagen zu erkennen (Pfeile in A). Auf Lungengewebe aus WT-Mäusen ist nach HRP-Markierung des gleichen Antikörpers und Verwendung des Verstärkungssystems eine schwache Färbung sichtbar. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper gegen TLR4 (FITC-markiert, Imgenex) und zusätzlicher Verwendung des Verstärkungssystems auf Lungengewebe von WT- (C) und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen (D) zeigt auf beiden Geweben eine deutliche Färbung. TLR = Toll-like Rezeptor, WT = Wildtyp, LEW = Lewis, DA = Dark Agouti.

Der in immunhistochemischen Färbungen verwendete Antikörper gegen TLR4 (ebioscience) wird auch im WB verwendet. Hier kann ein ähnliches Bild beobachtet

werden, wie bereits oben für TLR2 beschrieben. Im Bereich zwischen 50-75 kDa des Molekulargewichtsmarkers werden zwei unspezifische Banden detektiert (Abb. 20). Die Positivkontrolle (THP-1-Zellen) zeigt eine schwache, unspezifische Bande im unteren Bereich der Membran (Abb. 14). Die verwendete Membran wird nach dem Nachweis des Antikörpers zur Kontrolle mit Coomassie Blue-Färbelösung gefärbt. Es zeigt sich eine adäquate Proteinbeladung des WB.

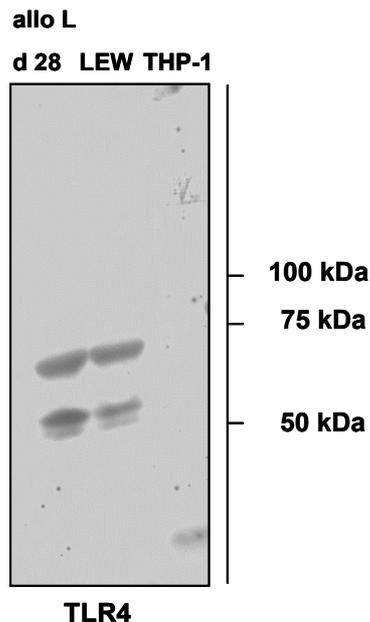


Abb. 14: Proteindetektion im *western blot* (WB) mit Antikörpern gegen TLR4 in Lungenhomogenaten von allogenen Lungentransplantaten am d 28 nach der Transplantation (allo L d 28), von unbehandelten LEW-Ratten und von THP-1-Zellen (Positivkontrolle). Im WB werden nach Inkubation mit Antikörpern gegen TLR4 (ebioscience) für allo L d 28 und LEW-Ratten nur zwei unspezifische Banden zwischen 50–75 kDa detektiert. In der Positivkontrolle (THP-1) wird nichts detektiert. TLR = Toll-*like*-Rezeptor, allo L = linke allogene transplantierte Lunge, THP-1 = humane Zelllinie einer akuten monozytären Leukämie, LEW = Lewis, kDa = Kilodalton.

3.6 Verteilung von Nestin in Transplantaten am d 28

In transplantierten Lungen werden am d 28 immunhistochemische Färbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen Nestin durchgeführt. Als Kontrolle der Färbung werden Schnitte mitgeführt, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert werden und keine Färbung zeigen. In rechten Lungen isogener Transplantatempfänger (Abb. 15 A) und linken Lungen allogener Transplantatempfänger (Abb. 15 C) zeigt sich eine ähnliche Verteilung von vereinzelt Nestin-positiven Zellen. In allogenen Lungentransplantaten (Abb. 15 C) liegen diese hauptsächlich im Bereich der mononukleären Infiltrate rings um Bronchiolen und Gefäße, wo sie durch ihre lang gestreckte und schmale Form auffallen (siehe Pfeile in Abb. 15 C). In isogenen Lungentransplantaten (Abb. 15 B) sind mehr Nestin-positive Zellen zu finden als in rechten Lungen isogener Transplantatempfänger und in allogenen Lungentransplantaten (siehe Abb. 15 A und 15 C). Die Nestin-positiven Zellen treten in den Wänden der Alveolen (siehe Pfeil in Abb. 15 B) auf, wobei es sich vermutlich um Perizyten handelt [13, 135]. Im perivaskulären und peribronchiolären Raum können außerdem Nestin-positive Zellen mit einer irregulären Form und unbekanntem Ursprung gefunden werden (siehe Pfeilköpfe in Abb. 15 B). Der Proteingehalt von Nestin in transplantierten und unbehandelten Lungen wird im WB mit dem gleichen monoklonalen Antikörper detektiert, der auch in den immunhistochemischen Färbungen verwendet wird. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen kann im WB kein Unterschied zwischen isogenen und allogenen Transplantaten gefunden werden. Deshalb sind nur die Ergebnisse untransplantierte LEW-Ratten dargestellt, um die Spezifität des verwendeten Antikörpers zu belegen (Abb. 15 D). In allen untersuchten Proben können mehrere Banden detektiert werden, die zwischen 120-260 kDa liegen (Abb. 15 D). Die zwei stärksten Banden befinden sich bei etwa 150 und 200 kDa. Zur Kontrolle der Beladung des WB wird die gleiche Membran zusätzlich mit Antikörpern gegen Lamin A/C inkubiert (Abb. 15 D).

Die mRNA Expression von Nestin wird in der qRT-PCR untersucht. In Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Daten ist die Expression von Nestin in isogenen Lungentransplantaten am Stärksten und zeigt im Vergleich zu linken Lungen unbehandelter LEW-Ratten und allogenen Lungentransplantaten eine signifikante Erhöhung ($p = 0,021$). Zur Kontrolle werden Negativkontrollen ohne cDNA auf jeder Platte pipettiert, hier gibt es keine Amplifizierung und im Agarosegel

wird kein Produkt nachgewiesen. Die Produktgröße von allen analysierten Proben wird ebenfalls im Agarosegel überprüft und stimmt mit der in Tab. 7 beschriebenen überein. Die Sequenzierung des Produkts bestätigt zusätzlich die Spezifität des Nachweises. Die verwendeten *primer* wurden bereits von Skwirba et al. [2014] eingesetzt und ihre Spezifität konnte hier bereits belegt werden [153].

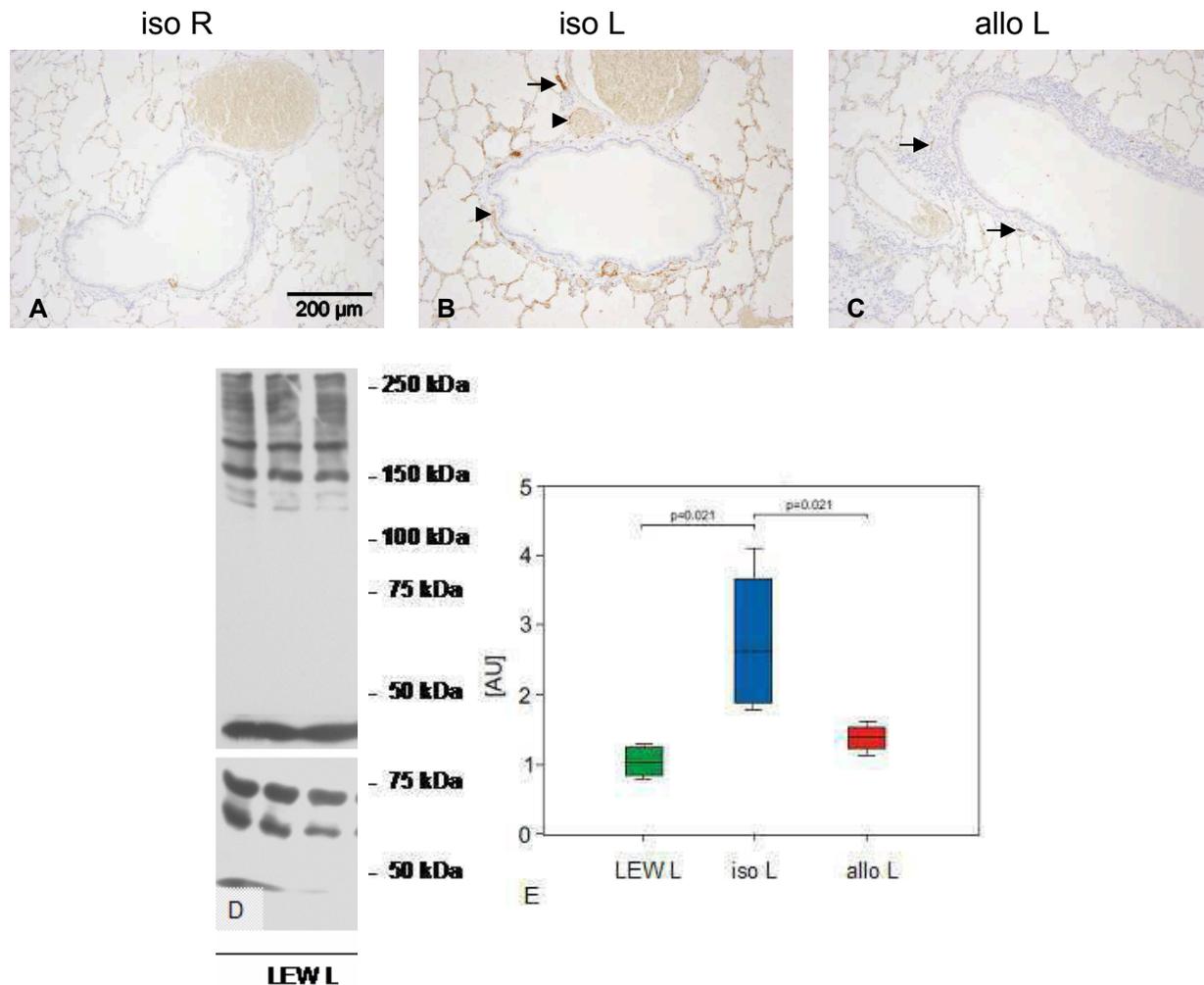


Abb. 15: Immunhistochemische Färbung in braun (A-C) auf Paraffinschnitten und Proteindetektion im *western blot* (WB, D) mit monoklonalen Antikörpern gegen Nestin, sowie die mRNA-Expression (E) von Nestin in Lungen un behandelter LEW-Ratten, sowie isogenen und allogenen Lungentransplantaten (iso L, allo L) am d 28 nach Transplantation. In isogenen Lungentransplantaten (A, iso L) sind die meisten Nestin-positiven Zellen zu finden, während in rechten Lungen isogener Transplantatempfänger (iso R) und allogenen Lungentransplantaten (allo L) nur wenige gefärbte Zellen vorhanden sind (B und C). Im WB finden sich nach Inkubation mit anti-Nestin-Antikörpern verschiedene Banden in un behandelten linken Lungen von LEW-Ratten (D oben). Die zwei deutlichsten Banden liegen bei 150 und etwa 200 kDa. Zur Kontrolle wird der gleiche WB mit Antikörpern gegen Lamin A/C inkubiert (D unten). In allen untersuchten Proben werden zwei Banden mit einer molekularen Masse von 69 kDa (Lamin A) und 62 kDa (Lamin C) nachgewiesen. Die mRNA Expression ist am d 28 in iso L ebenfalls am Stärksten (E) und im Vergleich zu LEW L und allo L signifikant erhöht ($p = 0,021$). In der qRT-PCR werden die Werte un behandelter LEW L auf 1 normalisiert. Dargestellt sind, der Median als breiter schwarzer Querstrich in den Boxplots, sowie die Perzentile 25 und 75 als schmale schwarze Querstriche. LEW = Lewis, LEW L = linke Lunge un behandelter LEW, iso R = rechte Lunge isogener Transplantatempfänger, iso L = linke isogen transplantierte Lunge, allo L = linke allogene transplantierte Lunge, jeweils $n = 4$, kDa = Kilodalton, AU = *arbitrary units*.

3.7 T-Zellproliferation in Milzen von Transplantatempfängern

Um den Anteil doppelpositiver Zellen in den T-Zellzonen isogener und allogener Transplantatempfänger zu bestimmen, werden immunhistochemische Doppelfärbungen mit den monoklonalen Antikörpern gegen PCNA und den α/β T-Zellrezeptor (R73) auf Gefrierschnitten von Milzen durchgeführt. Dazu werden Milzen von Transplantatempfängern zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation bzw. vor und nach LPS-Behandlung sowie von unbehandelte LEW-Ratten verwendet. Zur Kontrolle werden Schnitte ohne Inkubation mit den beiden Primärantikörpern mitgeführt, auf denen keine Färbung zu sehen ist. Außerdem werden jeweils Schnitte mit einem der beiden Antikörper inkubiert, um eventuelle Umfärbungen und Veränderungen der ersten Färbung durch die zweite Färbung zu kontrollieren. Hierbei können keine Umfärbungen oder Veränderungen beobachtet werden, PCNA-positive Zellen sind braun, R73-positive Zellen sind blau. In den T-Zellzonen dominieren die blau gefärbten T-Zellen (Abb. 16 A und B). In diesem Experiment werden die doppelpositiven Zellen (siehe Abb. 16 und Tab. 9-15 im Anhang) im Bereich der T-Zellzonen ausgezählt.

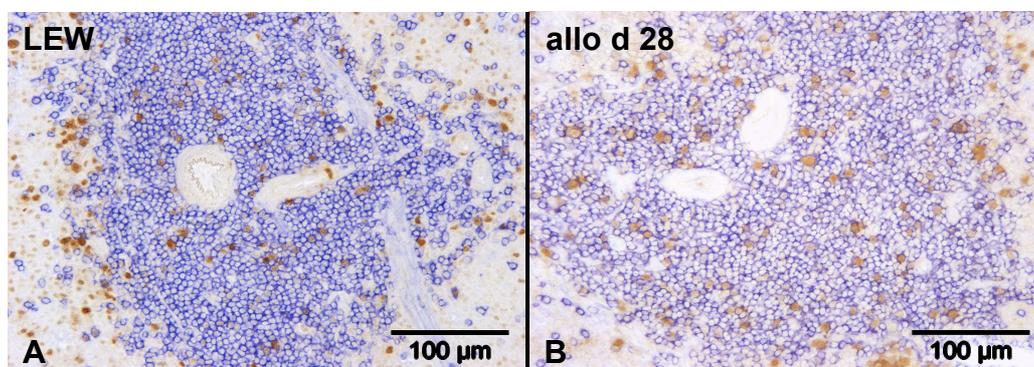


Abb. 16: Immunhistochemische Doppelfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen PCNA (braun) und den α/β T-Zellrezeptor (R73, blau) auf Gefrierschnitten von nativen Milzen unbehandelter LEW-Ratten und allogenen Transplantatempfängern am d 28 (allo d 28). In Milzen von allo Transplantatempfängern (B) finden sich am d 28 mehr doppelpositiv gefärbte Zellen als in LEW-Ratten (A). PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LEW = Lewis, allo = allogenen, jeweils $n = 4$.

Die unbehandelten LEW-Milzen zeigen insgesamt den niedrigsten Anteil von doppelpositiven Zellen im Bereich der T-Zellzonen (5%, Abb. 17). Im Vergleich dazu ist der Anteil doppelpositiver Zellen in isogenen Transplantatempfängern am d 28 nach der Transplantation signifikant erhöht ($p = 0,011$, Abb. 17). Zwischen isogenen und allogenen Transplantatempfängern am d 28 gibt es nur geringe Unterschiede im Anteil doppelpositiver Zellen. Das gilt auch für isogene und allogene LPS-

behandelte Transplantatempfänger am d 29 und d 33 nach der Transplantation (Abb. 17).

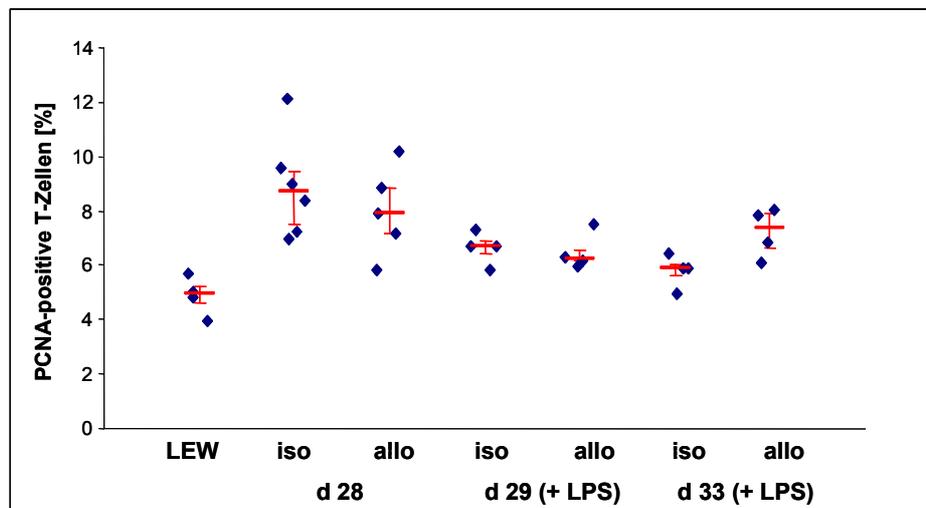


Abb. 17: Prozentualer Anteil PCNA-exprimierender T-Zellen in Milzen von isogenen (iso) und allogenen (allo) Lungentransplantatempfängern, zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach LPS-Behandlung, sowie unbehandelten LEW-Ratten. Im Vergleich zu LEW ist der Anteil PCNA-positiver T-Zellen zu allen Zeitpunkten, mit Ausnahme von iso d 33, signifikant erhöht ($p \leq 0,05$). Dargestellt sind die Einzelpunkte in blau, der Median als breiter roter Querstrich, sowie die Perzentile 25 und 75 als schmale rote Querstriche. PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LEW = Lewis, iso = isogen, allo = allogene, LPS = Lipopolysaccharid, jeweils $n = 4$.

3.8 T-Zellproliferation in Lungen allogener Transplantatempfänger

Um den Anteil doppelpositiver Zellen in Lungen allogener Transplantatempfänger vor und nach LPS- bzw. PBS-Behandlung zu bestimmen, werden immunhistochemische Doppelfärbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen PCNA und gegen den α/β T-Zellrezeptor (R73) auf Lungengewebeschnitten durchgeführt. Zur Kontrolle werden Schnitte ohne Inkubation mit den beiden Primärantikörpern mitgeführt, auf denen keine Färbung zu sehen ist. Außerdem werden jeweils Schnitte mit einem der beiden Antikörper inkubiert, um eventuelle Umfärbungen oder Veränderungen der ersten Färbung durch die zweite Färbung zu kontrollieren. Hierbei können keine Umfärbungen beobachtet werden, R73-positive Zellen sind braun, PCNA-positive Zellen sind blau. Als Referenz dienen Färbungen auf Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 28 nach der Transplantation. Im Bereich des Hauptbronchus sowie rings um kleine Gefäße dominieren braune R73-positive Zellen (Abb. 18 A und B), während im Alveolarraum nur einzelne R73-positive Zellen zu finden sind (Abb. 18 C). Im Bereich des Bindegewebes rings um Hauptbronchus und

kleine Gefäße sind mehr doppelpositive Zellen vorhanden als im Alveolarraum (Abb. 18).

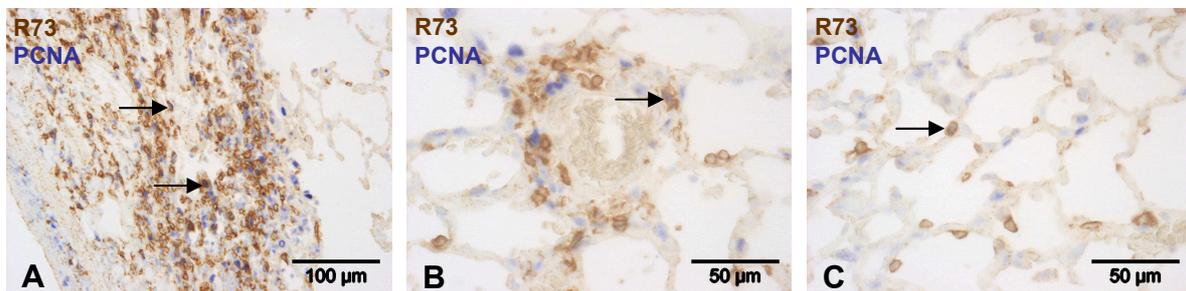


Abb. 18: Exemplarische Darstellung immunohistochemischer Doppelfärbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen den α/β T-Zellrezeptor (R73, braun) und gegen PCNA (blau) auf Paraffinschnitten von allogenen Lungentransplantaten am d 28 nach der Transplantation. Für die Auszählung der doppelpositiven Zellen (Pfeile in A-C) werden die drei dargestellten Bereiche ausgewählt, der Bindegewebsraum rings um den Hauptbronchus (A, repräsentativer Ausschnitt) und kleine Gefäße (≤ 100) (B), sowie der Alveolarraum (C), jeweils $n = 4$. PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*.

Die Auswertung erfolgt wie unter Material & Methoden beschrieben. Dabei wird die Anzahl doppelpositiver Zellen, sowie der R73-einzelpositiven Zellen (braun) bestimmt, so dass der prozentuale Anteil doppelpositiver Zellen berechnet werden kann (siehe Tab. 16-20 im Anhang). Der berechnete Wert darf jedoch nicht als absolut quantifizierter Wert, sondern nur als eine Abschätzung betrachtet werden.

Die berechneten prozentualen Anteile doppelpositiver Zellen werden einzeln für die drei untersuchten Bereiche der Lunge dargestellt. Im Bereich des Hauptbronchus und rings um kleine Gefäße gibt es keine Unterschiede in der Anzahl doppelpositiver Zellen zwischen den Transplantatempfängern vor und nach LPS- bzw. PBS-Behandlung (Abb. 19 A und C). Im Alveolarraum ist zwischen Transplantatempfängern vom d 28 und vom d 40 eine statistisch signifikante Verringerung des prozentualen Anteils doppelpositiver Zellen zu finden (Abb. 19 B). Dieser Unterschied im Alveolarraum kann außerdem zwischen Transplantatempfängern vom d 28 und PBS-behandelten Transplantatempfängern vom d 33 beobachtet werden (Abb. 19 B).

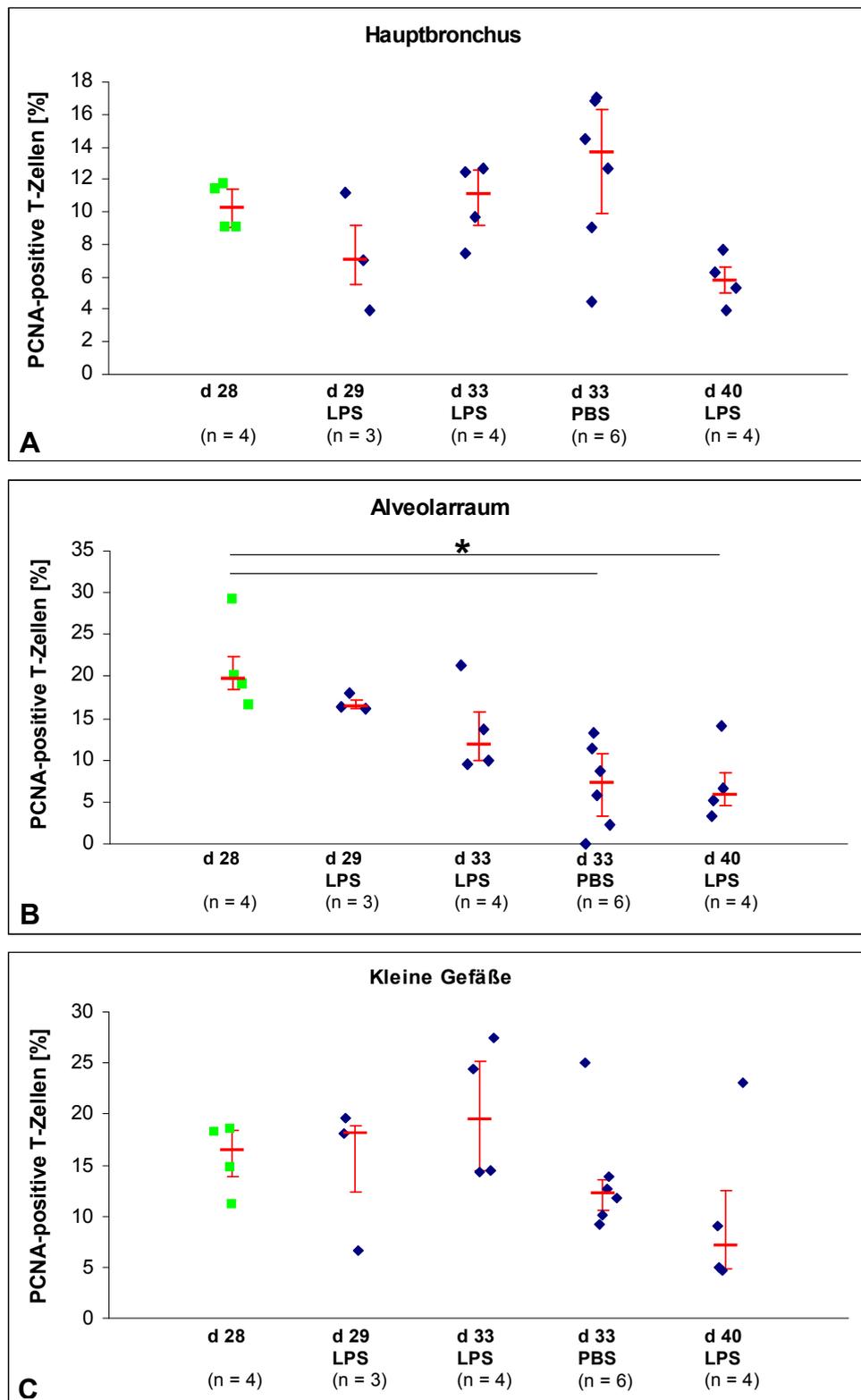


Abb. 19: Prozentualer Anteil PCNA-exprimierender T-Zellen in allogenen Lungentransplantaten, zu verschiedenen Zeitpunkten vor (d 28) und nach LPS-Behandlung (d 29, d 33, d 40), sowie in PBS-behandelten Transplantatempfängern am d 33. Der Anteil doppelpositiver Zellen wird in drei verschiedenen Bereichen der Lunge für jedes Tier bestimmt, im Bereich des Hauptbronchus (A), im Alveolarraum (B) und rings um kleine Gefäße ($\leq 100 \mu\text{m}$, C). Die statistischen Vergleiche werden mit dem Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Dargestellt sind die Einzelpunkte in grün (Referenzgruppe) bzw. blau, der Median als breiter roter Querstrich, sowie die Perzentile 25 und 75 als schmale rote Querstriche. * = signifikant ($p \leq 0,05$), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LPS = Lipopolysaccharid, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung.

3.9 Mixed lymphocyte reaction (MLR)

Um herauszufinden, wie die mononukleären Blutleukozyten allogener Transplantatempfänger nach Behandlung mit PBS oder LPS auf einen allogenen Stimulus in Form von F344-Leukozyten (Stimulatorzellen) reagieren, wird eine MLR durchgeführt. Die Zellen von Transplantatempfängern werden zusammen mit Mitomycin C-behandelten F344-Leukozyten in Kultur genommen und anschließend wird der BrdU-Einbau mit einem *Cell Proliferation ELISA* bestimmt (alle Originaldaten und Berechnungen siehe Tab. 21-24 im Anhang).

Zur Kontrolle der Methode wird eine MLR mit Zellen aus unbehandelten LEW-Ratten durchgeführt, die mit F344-Leukozyten stimuliert werden (Abb. 20, LEW + F344). Dabei zeigt sich ein schwacher BrdU-Einbau der Zellen, der in einem ähnlichen Bereich liegt wie bei PBS- oder LPS-behandelten Transplantatempfängern am d 33 nach allogener Stimulation (siehe Abb. 20). Zur weiteren Kontrolle wird ein Versuch mit einer Stammkombination durchgeführt, die im *in vivo*-Experiment zu einer fatalen akuten Abstoßung führt und für die MLR bereits mit einer starken Proliferation beschrieben ist [192]. Dazu werden Zellen von unbehandelten LEW-Ratten mit Zellen von DA-Ratten stimuliert (Abb. 20, LEW + DA). In der Auswertung zeigt sich für diese Kombination ein fünfmal höherer BrdU-Einbau und damit ein signifikanter Unterschied zur Kombination der Stämme LEW und F344 ($p \leq 0,05$; siehe Abb. 20).

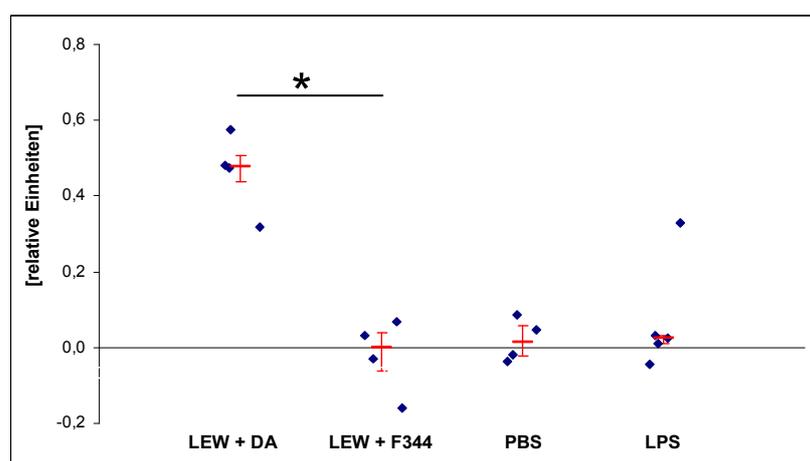


Abb. 20: Darstellung des relativen, spezifischen BrdU-Einbaus in mononukleäre Blutleukozyten von PBS- bzw. LPS-behandelten allogenen Transplantatempfängern nach Stimulation (mit F344-Leukozyten) bzw. von unbehandelten LEW-Ratten nach Stimulation (mit F344- oder DA-Leukozyten). Die aufgetragenen Werte stellen den berechneten BrdU-Einbau dar (Formel, siehe 2.4.13.2). Die statistischen Vergleiche werden mit dem Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Dargestellt sind die Einzelpunkte in blau, der Median als breiter roter Querstrich, sowie die Perzentile 25 und 75 als schmale rote Querstriche. * = signifikant ($p \leq 0,05$), BrdU = 5-Bromo-2'-Deoxyuridin, LEW = Lewis, F344 = Fischer-344, DA = Dark Agouti, LEW + F344 = Stimulation unbehandelter LEW- mit F344-Zellen, LEW + DA = Stimulation unbehandelter LEW- mit DA-Zellen, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, LPS = Lipopolysaccharid, $n \geq 5$.

4. Diskussion

In dem verwendeten experimentellen Modell für BOS (siehe Kapitel 1.6 und 2.5.3) werden allogene Lungentransplantate bis zum 28. postoperativen Tag diversen kumulativen Schädigungen ausgesetzt, die alle zur Pathogenese von BOS beitragen könnten:

- 1) Beatmungs- und Narkoseschäden
- 2) I/R-Schäden
- 3) Schäden durch Alloimmunreaktionen

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Empfänger am d 28 nach der Transplantation mit dem Ziel analysiert, die Relevanz dieser einzelnen Komponenten für die Pathogenese von BOS zu verstehen.

Vergleiche zwischen unbehandelten Kontrolllungen von LEW-Ratten und rechten Lungen isogener Transplantatempfänger ermöglichen die Analyse des Beatmungs- und Narkoseschadens (1). Die I/R-Schäden (2) lassen sich nach isogener Transplantation durch den Vergleich von nativen rechten Lungen und transplantierten linken Lungen ermitteln. Schäden durch Alloimmunreaktionen (3) können durch den Vergleich isogener und allogener Transplantate beurteilt werden.

4.1 Histopathologie

Isogene und allogene Transplantate am d 28 sollen histologisch auf mögliche Unterschiede und Veränderungen des Gewebes hin untersucht werden, die möglicherweise zur Pathogenese von BOS im Langzeitverlauf beitragen könnten. Dazu werden histologische Standardfärbungen, sowie Immunhistochemie auf Lungengewebeschnitten von isogenen und allogenen Transplantatempfängern und unbehandelten LEW-Ratten durchgeführt.

Diskussion technischer Aspekte

Zur Charakterisierung des Abstoßungsprozesses in den Transplantaten werden Färbungen mit H&E, Orcein und Azan, sowie mit Antikörpern gegen Glattmuskelaktin (α SMA), gegen ein CD68-artiges Antigen und gegen CD163 durchgeführt. Als Kontrollen bzw. Referenzen für die Standardfärbungen dienen die rechten Lungen der isogenen und allogenen Transplantatempfänger. Die rechten Lungen der Transplantatempfänger werden jeweils im Körper belassen. Außerdem werden

Färbungen unbehandelter Lungen von LEW-Ratten als Referenz verwendet. Mit den Standardfärbungen und der Immunhistochemie mit Antikörpern gegen α SMA können Aussagen zu den für BOS beschriebenen histologischen Charakteristika gemacht werden.

α SMA wird zur Darstellung von glatten Muskelzellen sowie von Myofibroblasten verwendet [201]. Färbungen mit Antikörpern gegen ein CD68-artiges Antigen (ED1) und gegen CD163 (ED2) dienen zur Identifizierung und Überprüfung der Verteilung von Makrophagen/Alveolarmakrophagen und Monozyten (ED1) und von residenten/interstitiellen Makrophagen (ED2) in Transplantaten am d 28. Mit Antikörpern gegen CD163 werden in der gesunden Lunge interstitielle Makrophagen nachgewiesen, außerdem ist er ein bekannter Marker für M2-Makrophagen [19, 146]. Um sicher zu gehen, dass die beobachtete immunhistochemische Färbung nicht durch unspezifische Bindungen des Nachweissystems entstand, werden in jeder Färbung Kontrollen mitgeführt. Hier werden die Schnitte nicht mit Primärantikörperlösung inkubiert, jedoch mit allen Komponenten des Nachweissystems und sind weitgehend ungefärbt. Damit bestätigt sich, dass der verwendete Nachweis nicht zu einer unspezifischen Färbung führt. Diese Prozedur wird auch in allen beschriebenen immunhistochemischen Färbungen der folgenden Kapitel durchgeführt. Zusätzlich werden alle Färbungen auf Schnitten linker Lungen unbehandelter LEW-Ratten, sowie auf rechten Lungen der Transplantatempfänger zur internen Kontrolle angefertigt.

Aufgrund der fehlenden Färbung in den mitgeführten Kontrollen, ist die Aussage möglich, dass durch das Nachweissystem keine unspezifische Färbung entsteht und die gefundene Färbung auf dem spezifischen Nachweis des Primärantikörpers beruht. Für die beschriebenen Färbungen werden monoklonale Primärantikörper aus der Maus verwendet. Diese können auf Rattengewebe zu Kreuzreaktionen mit den IgG und damit zu einem unspezifischen Nachweis führen. Um das zu verhindern wird dem verwendeten Sekundärantikörper Normalrattenserum zugesetzt, was zu einer Absättigung unspezifischer Bindungsstellen führt. Damit ist davon auszugehen, dass es sich bei den gefundenen Färbungen um einen spezifischen Nachweis des jeweiligen Antikörpers handelt.

Für die immunhistochemischen Färbungen werden sehr gut etablierte Antikörper gegen bekannte Marker eingesetzt [40, 77, 82, 147, 158].

Diskussion der Ergebnisse

Am d 28 sind in allogenen Transplantaten Zeichen einer milden bis moderaten akuten Abstoßung zu sehen (Grad A2/B1R, A3/B1R laut ISHLT) [46, 156], die in isogenen Transplantaten nicht auftreten. In allogenen Transplantaten sind perivaskuläre und peribronchioläre Infiltrate mit mononukleären Zellen zu finden, was mit H&E-Färbungen sichtbar wird. Es ist bekannt, dass im Falle einer chronischen Transplantatschädigung Intimahyperplasien in den Gefäßen auftreten [136, 156, 199]. Am d 28 sind die Gefäße in Lungen isogener und allogener Transplantatempfänger nicht umgebaut und sind histologisch nicht von Gefäßen unbehandelter LEW-Ratten zu unterscheiden. Auch die Extrazellulärmatrix ist in isogenen und allogenen Transplantatempfängern am d 28 unverändert.

Diese Befunde werden auch in immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen α SMA bestätigt. Im Gegensatz zu klassischen Fibroblasten exprimieren Myofibroblasten α SMA. Mit der durchgeführten Färbung soll eine mögliche Expansion von Myofibroblasten identifiziert werden, die durch die Synthese von Extrazellulärmatrix für fibrotische Veränderungen verantwortlich sind [68, 195]. Färbungen mit Antikörpern gegen α SMA ergeben keinen Hinweis auf eine Vermehrung von Myofibroblasten. Am d 28 nach der Transplantation sind schmale α SMA-positive Ringe glatter Muskulatur um Gefäße und Bronchiolen sichtbar, die sich nicht von normalen Lungen unterscheiden [201].

In immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen ein CD68-artiges Antigen (ED1) zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen isogenen und allogenen Transplantaten, der vor allem durch das Vorkommen ED1-positiver Makrophagen in den peribronchiolären und perivaskulären Infiltraten bestimmt wird. In isogenen Transplantaten gibt es kleinere Infiltrate ED1-positiver Zellen, sowie einzelne positive Alveolarmakrophagen. In allogenen Transplantaten sind sehr viele Zellen innerhalb der großen perivaskulären und peribronchiolären Infiltrate ED1-positiv und es können erneut positive Alveolarmakrophagen identifiziert werden. Unbehandelte LEW-Ratten und rechte Lungen von Transplantatempfängern weisen nur wenige ED1-positive Zellen, zumeist Alveolarmakrophagen, auf.

ED1-positive Monozyten wandern in Folge einer Entzündung oder Verletzung zu den entsprechenden Stellen im Körper und differenzieren dort zu ED1-positiven Makrophagen [40]. Durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine rekrutieren sie daraufhin weitere Monozyten aber auch Granulozyten oder T-Zellen

zur Unterstützung der Abwehrreaktion [61, 147]. Weiterhin können Makrophagen in Transplantaten proliferieren [60, 118]. Diese Prozesse werden sichtbar anhand der perivaskulären und peribronchiolären Infiltrate [6, 77, 147]. Die in rechten Lungen von Transplantatempfängern beobachteten kleinen Ansammlungen ED1-positiver Zellen lassen sich durch die Beatmung der Lungen erklären, die immer zu einer Gewebeschädigung und der Freisetzung von DAMPs führt [45]. Außerdem kann die Entzündung der linken Lunge durch die Fernwirkung von inflammatorischen Zytokinen über das Blut auch zu einer Entzündungsreaktion in der rechten Lunge führen.

Im Gegensatz zu ED1-positiven Makrophagen tritt bei Färbungen mit Antikörpern gegen CD163 (ED2) insgesamt eine geringere Anzahl ED2-positiver interstitieller Makrophagen in Transplantaten auf. In allogenen Transplantaten scheint ihre Zahl im Vergleich zu isogenen Transplantaten leicht reduziert zu sein. In untransplantierten Lungen von LEW-Ratten und in rechten Lungen von Transplantatempfängern können nur vereinzelt positive Zellen beobachtet werden. Die geringere Anzahl ED2-positiver Zellen und die erhöhte Anzahl ED1-positiver Zellen in allogenen Transplantaten am d 28 spricht für eine Dominanz pro-inflammatorischer M1-Makrophagen [77, 146, 147].

Mit dem histologischen Vergleich isogener und allogener Transplantate am d 28 nach der Transplantation kann gezeigt werden, dass vor der LPS-Instillation in allogenen Transplantaten Zeichen einer akuten Transplantatabstoßung zu finden sind. Die Unterschiede zwischen isogenen und allogenen Transplantaten liefern möglicherweise die Grundlage, die nach der LPS-Instillation in allogenen Transplantaten im Langzeitverlauf zur Pathogenese von BOS führt. Durch eine LPS-induzierte Entzündung, werden leukozytäre Infiltrate deutlich verstärkt [6, 177]. Isogene Transplantate zeigen nach LPS-Instillation ebenfalls eine Entzündung, die jedoch im Gegensatz zu allogenen Transplantaten rasch zurückgeht und nicht zu chronischen Schädigungen führt [6].

Im Hinblick auf die oben genannten Aspekte der Transplantatschädigungen, die zur Pathogenese von BOS beitragen könnten, ist histologisch folgendes festzuhalten:

Die Schäden durch Beatmung und Narkose fallen nur sehr gering aus, da zwischen rechten Lungen isogener Transplantatempfänger und unbehandelten Kontrolllungen histologisch kaum Unterschiede bestehen. In isogenen Transplantaten lässt sich im Vergleich zu rechten Lungen isogener Transplantatempfänger eine leichte

Vermehrung kleiner Infiltrate erkennen. Diese leichte Entzündung ist vermutlich durch I/R-Schäden begründet, die mit Gewebeschädigungen und der Freisetzung von DAMPs einhergehen [45]. Der größte Unterschied besteht histologisch zwischen isogenen und allogenen Transplantaten, so dass davon auszugehen ist, dass er hauptsächlich auf Alloimmunreaktionen beruht und zu einem geringen Teil durch I/R-Schäden getriggert wird. Allogene Transplantate sind deutlich stärker mit Makrophagen und T-Zellen infiltriert als isogene Transplantate [6, 147].

Die Zeichen einer chronischen Transplantatabstoßung - BO, Gefäßremodeling und Fibrose - sind am d 28 nach allogener Transplantation histologisch nicht nachweisbar. Alle diese Zeichen sind in dem hier beschriebenen experimentellen Modell in allogenen transplantierten Lungen erst im Langzeitverlauf nach LPS-Instillation zu finden [6].

Kurz zusammengefasst zeigen allogene Transplantate am d 28 nach der Transplantation histologische Zeichen akuter Abstoßung. Im Gegensatz dazu weisen isogene Transplantate nur geringe histologische Veränderungen auf.

4.2 Expression von Genen des TLR-Systems

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden in dieser Arbeit Komponenten des TLR-Systems untersucht, um mögliche Unterschiede der Empfindlichkeit isogener und allogener Transplantate gegenüber von LPS zu analysieren. Dazu werden auch hier verschiedene Vergleiche zwischen Kontrolllungen, isogenen und allogenen Transplantatempfängern durchgeführt (siehe 4.1, 1-3).

Diskussion technischer Aspekte

Mittels qRT-PCR wird die mRNA-Expression der wesentlichen Komponenten des TLR-Systems in Lungen isogener und allogener Transplantatempfänger analysiert. Zur Kontrolle der Methode werden Ansätze ohne cDNA pipettiert, um mögliche Kontaminationen mit DNA auszuschließen. Hier findet keine DNA-Amplifikation statt und im Agarosegel wird kein PCR-Produkt nachgewiesen. Nach jeder durchgeführten qRT-PCR kann mit dem Auftragen aller Proben in ein Agarosegel anhand der gleich starken Banden des *housekeeping*-Gens PBGD gezeigt werden, dass RNA-Aufreinigung und die reverse Transkription funktioniert haben. Die Überprüfung der Amplikongröße im Agarosegel und die zusätzliche Sequenzierung der PCR-Produkte

bestätigt die Identität der erwarteten Sequenzen. Auf Grund dieser Tatsachen können die gezeigten Daten als valide betrachtet werden.

Durch eine automatische Einstellung der für die Auswertung der Ergebnisse verwendeten Software, ergeben sich teilweise große Verschiebungen der ΔCt -Werte für eine Probe, die mehrfach auf unterschiedlichen Platten analysiert wird. Dieses Problem fällt dadurch auf, dass die mRNA-Expression in Lungen isogener Transplantatempfänger auf zwei unterschiedlichen Platten analysiert wird. Mit einer manuellen Einstellung des *threshold*, kann dieses Problem größtenteils gelöst werden. Im Falle von TLR2 unterscheiden sich die Ergebnisse auf beiden Platten jedoch um eine Zehnerpotenz. Das liegt vermutlich an der sehr niedrigen Expression von TLR2, was in diesem Fall die exakte Quantifizierung erschwert. Für alle anderen untersuchten Gene kann mit der angewendeten Methode die starke Verschiebung aufgehoben werden. Die Gruppe der isogenen Transplantatempfänger liegt nach der Auswertung der zwei unabhängigen Platten im selben Bereich, womit davon auszugehen ist, dass die manuelle Einstellung des *threshold* zu validen Ergebnissen führt. Zusätzlich bestätigt wird dies durch die Untersuchung der Ct-Werte des *housekeeping*-Gens (PBGD) in allen analysierten Proben. Dabei wird deutlich, dass für PBGD fast immer ein identischer Ct-Wert gemessen wird und es sich damit als Referenzgen eignet. Das zeigt, dass die manuelle Einstellung des *threshold* notwendig ist, wenn Daten, die auf unterschiedlichen Platten analysiert werden, miteinander verglichen werden sollen.

Die Stärke der mRNA-Expression eines Zielgens wird immer im Verhältnis zu einem nicht regulierten *housekeeping*-Gen von der Software des *Quantitative RT-PCR Cyclers* berechnet und nicht direkt bestimmt. Deshalb dürfen die Ergebnisse grundsätzlich nur als Abschätzung gewertet werden. Jedoch wird mit dem Einsatz gleicher Mengen *template* (cDNA) und der Überprüfung der *primer*-Effizienz im Vorfeld eine einheitliche Bewertung der Expression möglich, weil die interne Kontrolle gleiche Signale für alle untersuchten Proben liefern sollte. Das kann in allen für diese Arbeit durchgeführten Analysen bestätigt werden. Die qRT-PCR wird mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green durchgeführt, der doppelsträngige DNA färbt. Die verwendeten Substanzen werden bis zur Benutzung bei -20°C gelagert und die Platten werden direkt nach dem Pipettieren von Mastermix und cDNA in das Gerät überführt. Durch die strikte Einhaltung des vom Hersteller angegebenen Protokolls und die einheitliche Durchführung der Versuche wird gewährleistet, dass es sich bei

den gefundenen Expressionsunterschieden der einzelnen Gene um tatsächliche Unterschiede handelt und diese nicht auf technischen Problemen beruhen. Das kann zusätzlich immer anhand des Ct-Wertes des *housekeeping*-Gens überprüft werden, der wie bereits erwähnt auf allen Platten und in allen untersuchten Proben sehr ähnlich ist.

In Expressionsanalysen werden von anderen Autoren häufig mehrere *housekeeping*-Gene in die Untersuchung einbezogen [47, 178]. Aufgrund der großen Anzahl der analysierten Proben und der robusten Ergebnisse der PBGD-Expression wird im Rahmen dieser Arbeit jedoch darauf verzichtet.

TLR6 mRNA ist mit den verwendeten *primern* in der Milz und der Lunge von LEW-Ratten nachweisbar. Die Produkte entsprechen jeweils der erwarteten Amplikongröße und die Sequenzierung bestätigt die Identität der amplifizierten DNA. Daraus schließe ich, dass die Methode des TLR6 mRNA-Nachweises valide ist. In Transplantatempfängern kann TLR6 mRNA nicht in allen Proben nachgewiesen werden. Die Expression ist bestenfalls sehr schwach und wird in Zyklen zwischen 34-35 detektiert. Daher wird die geringe bis fehlende TLR6 mRNA-Expression in dieser Arbeit nicht grafisch dargestellt.

Diskussion der Ergebnisse

Für die Beurteilung des Beatmungs- und Narkoseschadens (1) werden die Lungen von LEW-Ratten mit rechten Lungen isogener Transplantatempfänger verglichen. Dabei zeigen sich keine Unterschiede in der mRNA-Expression der untersuchten Gene. Andere Autoren zeigen jedoch, dass z.B. TLR4 [179, 183] und TLR2 [179] nach mechanischer Beatmung eine stärkere mRNA-Expression in den Lungen von Mäusen aufweisen. In beiden genannten Modellen werden die Tiere 4 h mechanisch beatmet. Bei Villar et al. [2010] werden 6 und 20 ml/kg Atemzugsvolumen für die Induzierung des Lungenschadens verwendet, bei Vaneker et al. [2008] 8 ml/kg [179, 183]. Bei einem Volumen von 20 ml/kg ist ein großer mechanischer Schaden des Lungengewebes zu erwarten. Im Vergleich dazu liegt das Volumen in dem hier untersuchten Modell in der Ratte bei 10 ml/kg und die Tiere werden zudem nur während der Transplantation beatmet (~ 1 h). Dreyfuss et al. [1998] zeigen, dass durch die mechanische Beatmung in experimentellen Modellen eine Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen induziert wird [42]. Dieser induzierte Schaden zeigt bei Mäusen histologisch und auf der Ebene der induzierten Zytokine das gleiche Bild

wie nach einer Verabreichung von LPS [66]. Es muss außerdem berücksichtigt werden, dass die Daten aller erwähnten Untersuchungen in den ersten Stunden nach der Beatmung erhoben werden, während in dieser Arbeit die Lungen erst am d 28 nach der Beatmung untersucht werden. Zudem sind die Ergebnisse aus den experimentellen Modellen aufgrund der Auswahl unterschiedlicher Spezies nicht direkt miteinander zu vergleichen.

In einer Veröffentlichung aus unserer Arbeitsgruppe werden von Schmidt et al. [2007] bereits isogene Lungentransplantate (LEW → LEW) in Tagesabständen bis zum d 6 nach der Transplantation untersucht [147]. In den rechten Lungen isogener und allogener Transplantatempfänger können hier keine histologischen Veränderungen nach der Transplantation nachgewiesen werden. Aus diesen und aus den hier gezeigten Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die gewählten Einstellungen für die Beatmung der Ratten während der Transplantation nicht zu längerfristigen Schädigungen führen und dementsprechend vermutlich auch keinen Einfluss auf die TLR-Expression am d 28 nach der Transplantation haben.

Um die Effekte des I/R-Schadens (2) zu untersuchen, wird die mRNA-Expression der einzelnen Zielgene von Kontrolllungen und isogenen Transplantaten verglichen. Dabei können nur vereinzelt Unterschiede in der mRNA-Expression gefunden werden. Rechte und linke Lungen von LEW-Ratten und isogenen Transplantatempfängern zeigen eine sehr ähnliche Expression fast aller untersuchten Moleküle. Nur für TLR3, TLR4 und TLR7 kann eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression in isogen transplantierten Lungen im Vergleich zu linken unbehandelten Lungen festgestellt werden. Dabei ist die Expression von TLR4 und TLR7 im Vergleich zu allen anderen untersuchten Genen relativ stark.

Die leichte Infiltration der isogenen Transplantate mit Immunzellen, wie sie in den histologischen Untersuchungen sichtbar wird, könnte eine Erklärung für die verstärkte mRNA-Expression der genannten TLRs in isogenen Transplantaten sein, da TLRs besonders von Leukozyten exprimiert werden [75].

Andere Autoren haben bereits eine Erhöhung der Expression von TLR-Komponenten nach I/R-Schäden gezeigt. Wolfs et al. [2002] haben herausgefunden, dass die mRNA-Expression von TLR2 und TLR4 nach I/R-Schäden in der Niere von Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen signifikant erhöht ist [193]. In dieser Studie finden die Untersuchungen jedoch bereits sehr schnell (24 h – d 3) nach der Transplantation statt und können deshalb nicht mit den Ergebnissen in dem hier

untersuchten Modell verglichen werden. Nach humaner Lungen- bzw. Nierentransplantation haben Andrade et al. [2006] und Krüger et al. [2009] gezeigt, dass eine erhöhte Expression der jeweils untersuchten TLR nach I/R-Schaden scheinbar von der inflammatorischen Antwort des Transplantats selbst abhängt [5, 90]. Der Fokus fast aller Untersuchungen zur TLR-Expression nach I/R-Schäden liegt auf TLR2 und TLR4, so dass zu den Effekten des Schadens auf die Expression anderer TLRs bis jetzt nichts bekannt ist.

Mit dem Vergleich der mRNA-Expression aller TLR-Komponenten in isogenen und allogenen Transplantaten kann der Effekt der Alloimmunreaktion (3) untersucht werden. Hier zeigt sich, dass die Expression fast aller analysierten Gene in allogenen transplantierten Lungen signifikant erhöht ist. Dies kann für TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR7, TLR9, TLR10, CD14 und MD2 im Vergleich zur Expression in isogenen Transplantaten gezeigt werden. Die Expression von TLR7 und TLR9 ist in Lungen isogener und allogener Transplantatempfänger zudem besonders stark.

In allogenen Transplantaten könnte die stärkere Infiltration mit Immunzellen zu einer Erhöhung der TLR-mRNA führen. Für die Bewertung der erhöhten mRNA-Expression verschiedener TLR in isogenen und allogenen Transplantaten müssen außerdem Infektionen der Transplantatempfänger und/oder der Spender im Vorfeld bedacht werden. Alle für den Versuch verwendeten Tiere werden bei den Händlern pathogenfrei erworben. Infektionen sind zwar unwahrscheinlich, können trotz hoher Hygienestandards in der Haltung jedoch nicht ausgeschlossen werden und müssen deshalb für die Interpretation der Ergebnisse in Erwägung gezogen werden.

Besonders auffällig ist, dass die mRNA-Expression der Adaptermoleküle TRIF, TRAM, MyD88 und TIRAP in den Lungen aller Untersuchungsgruppen gleich stark ist. Das lässt den Schluss zu, dass die mRNA-Expression dieser Adaptermoleküle grundsätzlich und unabhängig von den hier untersuchten Schädigungen eine starke Expression im Organismus aufweist. Möglicherweise ist das darauf zurückzuführen, dass die Beteiligung dieser Moleküle in jeder Immunreaktion des Organismus und einer Aktivierung von TLR benötigt wird und deshalb ein hohes Expressionsniveau wichtig ist. Damit wäre sichergestellt, dass nach einer Aktivierung der Rezeptoren ein weiteres *signaling* möglich ist.

Die Adaptermoleküle CD14 und MD2 werden beide für ein *signaling* von TLR4 benötigt. Die Expression von CD14 ist verhältnismäßig schwach, jedoch ist sie in linken Kontrolllungen und in allogenen Transplantaten im Vergleich zu isogenen

Transplantaten signifikant erhöht. Mit steigender Schädigung des Transplantates nimmt auch die Expression von MD2 zu und ist in allogenen Transplantaten signifikant erhöht. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Alloimmunreaktion nach der Transplantation zu einer Erhöhung der Expression von CD14 und MD2 führt, was wiederum zu einer verstärkten Reaktion auf LPS führt.

Eine Erhöhung der mRNA-Expression von Komponenten des TLR-Systems nach allogener Transplantation wird bisher nur in wenigen Veröffentlichungen gezeigt. In einer Studie von Dessing et al. [2010] wird die mRNA-Expression von TLRs in humanen Biopsien von Nierentransplantaten nach akuter Abstoßung untersucht [37]. Im Vergleich zu Patienten ohne akute Abstoßung kann hier für alle untersuchten TLRs (TLR1-4, 7, 8 sowie CD14 und MD2) ein signifikant erhöhtes mRNA-Level in akut abgestoßenen Organen gefunden werden [37]. Für alle untersuchten TLRs, außer für TLR3, kann zudem eine Korrelation mit der Leukozyteninfiltration der Transplantate nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der in dieser Arbeit gefundenen verstärkten mRNA-Expression von TLR-Komponenten in allogenen Transplantaten am d 28 überein. Die histologischen Untersuchungen machen auch in allogenen Transplantaten Zeichen akuter Abstoßung deutlich.

In einer weiteren Veröffentlichung von Krams et al. [2010] wird die mRNA-Expression von TLR2 und TLR4 in isogenen und allogenen intestinalen Transplantaten von Mäusen verglichen [88]. In dem verwendeten Modell zur akuten Abstoßung der intestinalen Transplantate kann eine verstärkte Expression beider Rezeptoren in allogenen Transplantaten gefunden werden. Während die Expression von TLR2 im Vergleich zu untransplantierten Mäusen nur um das 5-fache verstärkt ist, ist die von TLR4 bis zu 200-fach stärker. Isogene Transplantate zeigen nur eine geringe Expressionsverstärkung im Vergleich zu unbehandeltem Darm von C57Bl/6 Mäusen. Wie bereits erwähnt können in der vorliegenden Arbeit keine Ergebnisse für TLR6 dargestellt werden. Auch für TLR2 zeigt sich in allen untersuchten Proben nur eine sehr schwache Expression. Die Aktivierung von TLR6 erfolgt nach Dimer-Bildung mit TLR2 [84, 176], deshalb kann man vermuten, dass diese Rezeptoren möglicherweise in dem untersuchten Zusammenhang keine entscheidende Rolle spielen.

Man kann spekulieren, dass die hier gefundene starke Expression verschiedener TLRs auch nach einer Transplantation im Menschen auftritt. Das könnte eine Erklärung dafür liefern, warum bestimmte Polymorphismen der TLRs im Menschen bei der Pathogenese von BOS eine entscheidende Rolle spielen [58, 83, 121]. Die

Beteiligung verschiedener TLR an chronischen Entzündungen der Lunge und chronischer Transplantatschädigung ist bereits bekannt [41, 186]. In dem hier untersuchten experimentellen Modell ist die verstärkte mRNA-Expression der TLR-Komponenten am d 28 in allogenen Transplantaten eventuell eine entscheidende Grundlage für die Pathogenese von BOS im Langzeitverlauf.

Die hier erhobenen Daten lassen zusammenfassend den Schluss zu, dass am d 28 nach der Transplantation die mRNA-Expression fast aller untersuchten TLR-Komponenten in allogenen Transplantaten im Vergleich zu isogenen Transplantaten und rechten Lungen der Transplantatempfänger verstärkt ist.

Nachweis von TLR2 und TLR4 auf Proteinebene

Um die Expression der TLR auch immunhistochemisch darzustellen und so möglicherweise zeigen zu können, welche Zellen für die Expression verantwortlich sind, werden Färbungen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 und TLR4 durchgeführt. Diese zwei Rezeptoren sind am besten untersucht und deshalb ist eine Reihe von Antikörpern verschiedener Hersteller auf dem Markt.

Die verwendeten Antikörper sind laut Hersteller für die Anwendung von verschiedenen Techniken (Immunhistochemie, FACS, WB) und in verschiedenen Organismen geeignet (Maus, Ratte, Kaninchen). Referenzen dafür sind jedoch nur eingeschränkt vorhanden.

Für alle durchgeführten Untersuchungen wird jeweils Material von Transplantatempfängern und LEW-Ratten, sowie von WT- und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen verwendet. Um die Antigene in immunhistochemischen Färbungen nachzuweisen, werden in allen Schritten der Färbeprozedur diverse Varianten versucht. Dies reicht von verschiedenen Antigendemaskierungsmethoden über Modifikationen der Lösungen, die zur Absättigung von Proteinbindungsstellen und zum Verdünnen der Antikörper verwendet werden, bis hin zum Einsatz unterschiedlich sensitiver Detektionssysteme. Auch für die durchgeführten WB werden, soweit vorhanden, Angaben des Herstellers berücksichtigt und diverse Protokolle ausprobiert.

Immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 und TLR4 liefern keine validen Ergebnisse, Gleiches gilt auch für den Einsatz derselben Antikörper im WB: Gewebe von TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen zeigt mit den selben Antikörpern sowohl die gleiche Färbung als auch die gleiche Bande im

WB wie in WT-Mäusen, unbehandelten LEW-Ratten und Transplantatempfängern. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die verwendeten Antikörper für die durchgeführten Methoden nicht geeignet sind, da sie keine spezifische Bindung zeigen.

In verschiedenen Veröffentlichungen werden die gleichen Antikörper eingesetzt und z.B. überexprimierende humane und murine Makrophagen [108], sowie Nierengewebe von Wildtyp und *knock-out* Mäusen mit Antikörpern gegen TLR2 gefärbt [150]. Von Meng et al. [2004] werden Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet, die zu einer deutlichen Färbung an der Zelloberfläche der Makrophagen führen [108]. Diese Färbung ähnelt den in dieser Arbeit dargestellten Färbungen. Die eingestellte Fluoreszenz der Aufnahmen wirkt jedoch zu stark und könnte damit ein übertriebenes Bild der eigentlichen Färbung oder möglicher Artefakte darstellen. Die Überexpression in einzelnen Zellen lässt sich zudem nicht mit der Färbung auf Gewebeschnitten vergleichen. Die Färbungen auf Nierengewebe von Shigeoka et al. [2007] werden ebenfalls mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern durchgeführt [150]. Die abgebildeten mikroskopischen Aufnahmen sind hauptsächlich in schwarz/weiß dargestellt und wirken teilweise überstrahlt [150]. Durch derartige Aufnahmen lassen sich auch ganz geringe Färbungen und möglicherweise Artefakte deutlich hervorheben. In beiden Arbeiten ist die Färbung des jeweiligen Materials von TLR2^{-/-}-Mäusen negativ, was im Widerspruch zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen steht.

Mit anderen Antikörpern gegen TLR2 und TLR4 werden z.B. LPS-stimulierte Zellen gefärbt [168], Färbungen mit Antikörpern gegen TLR4 in Gewebeschnitten der Lunge von COPD-Patienten durchgeführt [117] und ein Nachweis mit polyklonalen Antikörpern gegen TLR2 und TLR4 auf Rattengewebe durchgeführt [152]. Die Qualität der verwendeten Antikörper und die damit erzielten Ergebnisse sind jedoch fragwürdig, da die Spezifität dieser Färbungen meistens nicht überprüft wird.

Es wäre von sehr großem Interesse nachzuweisen, welche Zellen in der Lunge hauptsächlich für die starke TLR-mRNA-Expression verantwortlich sind. Mit einer Klärung der Lokalisation könnten eventuell Therapien entwickelt werden, die speziell gegen diese Zellen gerichtet sind. Aus den hier diskutierten Ergebnissen muss jedoch geschlossen werden, dass der immunhistochemische Nachweis von TLR2 und TLR4 in der Lunge, sowie der Nachweis im WB nicht möglich ist.

4.3 Expression von Nestin

Nestin ist ein Marker für eine Subpopulation von Progenitorzellen, die im adulten Organismus in Organen zu finden ist, in denen Proliferation und Regeneration stattfinden [97, 109]. Hier wird die Hypothese überprüft, dass in allogenen Lungentransplantaten vermehrt Nestin-positive Zellen vorkommen. Dafür werden immunhistochemische Färbungen, WB und qRT-PCR durchgeführt.

Diskussion technischer Aspekte

Die Kontrollen der immunhistochemischen Färbungen werden auch hier wie unter 4.1 beschrieben durchgeführt und bestätigen, dass das Nachweissystem nicht zu unspezifischen Färbungen führt. Mit den immunhistochemischen Färbungen können bereits veröffentlichte Daten bestätigt werden, die die beschriebenen Nestin-positiven Zellen als Perizyten identifiziert haben [13, 135]. Die Proteinbeladung im WB wird durch die Inkubation der gleichen Membran mit Antikörpern gegen Lamin A/C kontrolliert. Im Gegensatz zu Nestin hat Lamin A/C ein geringes Molekulargewicht und interferiert nicht mit dem Nestinnachweis, so dass die einheitliche Proteinbeladung des WB bestätigt werden kann. Die Spezifität des für immunhistochemische Färbungen und WB verwendeten Antikörpers ist bereits aus anderen Untersuchungen bekannt [13, 36, 53, 70, 135, 153]. Kontrollen für die qRT-PCR werden durchgeführt wie unter 4.2 beschrieben und zeigen, dass hier keine unspezifische DNA-Amplifikation stattfindet.

Diskussion der Ergebnisse

Überraschenderweise wird in immunhistochemischen Färbungen eine höhere Dichte Nestin-positiver Zellen in isogenen Transplantaten am d 28 im Vergleich zu allen anderen untersuchten Lungen einschließlich der allogenen Transplantate gefunden. Dabei können einerseits einzelne Nestin-positive Zellen in den Wänden von Alveolen gefunden werden, bei denen es sich vermutlich um Perizyten handelt [13, 195]. Um genau zu belegen, dass es sich hier um Perizyten handelt, wären jedoch ultrastrukturelle Analysen der Zellen notwendig. Bei weiteren Nestin-positiven Zellen im peribronchiolären und perivaskulären Raum der hier untersuchten Lungen könnte es sich um eingewanderte Zellen aus einem Bereich an der Grenze von Media und Adventitia handeln. In dieser sogenannten *vasculogenic zone*, befindet sich ein Reservoir von Stamm- bzw. Progenitorzellen [195]. Auch auf mRNA-Ebene in der

qRT-PCR ist die Expression von Nestin in isogenen Transplantaten im Vergleich zu den anderen untersuchten Lungen signifikant erhöht. Lediglich im WB ist kein Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen sichtbar, was eventuell an einer geringeren Genauigkeit dieser Methode in der Nachweisbarkeit quantitativer Unterschiede liegen könnte. Anhand der WB Daten von unbehandelten LEW-Ratten können jedoch die Ergebnisse anderer Autoren für den Proteinnachweis von Nestin in der Ratte bestätigt werden [14, 137, 153, 161].

Die verstärkte Expression in isogenen Transplantaten scheint hauptsächlich durch I/R-Schäden (2) begründet zu sein und deutet auf ein besseres regeneratives Potential hin. Die durch Beatmung und Narkose (1) induzierten Schäden haben keinen Einfluss auf die Expression von Nestin. Auch die zusätzliche Alloimmunreaktion (3) hat in Kombination mit den anderen genannten Schädigungen keine verstärkte Nestin-Expression zur Folge, was vermutlich ein Zeichen für das schlechtere regenerative Potential dieser Transplantate ist.

In Veröffentlichungen wird gezeigt, dass die I/R-Schäden in isogenen Transplantaten für die histologisch sichtbaren Veränderungen hauptverantwortlich sind, aber in der Regel durch einen regenerativen Prozess des verletzten Gewebes im Langzeitverlauf ausgeglichen werden können [6, 38, 77, 142, 147].

Diese Ergebnisse stehen nicht nur im Widerspruch zur oben formulierten Hypothese, sondern zu diversen Literaturdaten, die eine vermehrte Nestin-Expression während der Pathogenese des BOS vermuten lassen: Während der akuten und chronischen Abstoßung von Nierentransplantaten (F344 → LEW) wird eine mögliche Beteiligung der Nestin-Expression an interstitieller Fibrose und chronischem Gefäßremodeling gezeigt [153]. In dem untersuchten Nierengewebe ist eine stärkere Nestin-Expression in allogenen Transplantaten im Vergleich zu Normalnieren und isogenen Transplantaten zu finden. Weiterhin wird von Saboor [2012] gezeigt, dass in Lungengewebe von Ratten und Menschen mit PH, Nestin in vaskulären Glattmuskelzellen exprimiert wird [135]. In experimentellen Modellen zur PH und Fibrose in der Ratte und im Menschen kann außerdem gezeigt werden, dass Nestin-positive Zellen am *remodeling* beteiligt sind [135].

Bei der chronischen Abstoßung von Lungentransplantaten tritt eine sehr ähnliche Form des *remodelings* auf wie in den beiden genannten Krankheiten [10, 46, 140, 142, 143, 156, 185]. Bei der chronischen Abstoßung sind unter anderem fibrotische Veränderungen des Gewebes und Gefäßremodeling zu finden, die z.B. einhergehen

mit epithelialer-mesenchymaler Transdifferenzierung, der Beteiligung zirkulierender oder residenter Progenitorzellen und zu einer Vermehrung von α SMA-positiven Zellen bzw. zu einer Verdichtung von Gefäßen und einer Vernarbung des Gewebes führen [9, 23, 195].

Die Vermutung liegt nahe, dass die vermehrte Nestin-Expression in isogenen Transplantaten die Regeneration der operativen Schäden widerspiegelt. Abstoßungsprozesse in allogenen Transplantaten führen möglicherweise zu einer gestörten Regeneration, die sich in der vergleichsweise geringen Nestin-Expression manifestiert und die potentiell zur Pathogenese des BOS beiträgt.

Das komplexe Bandenmuster im WB bedarf einer gesonderten Diskussion: Die immunpositiven Banden erstrecken sich im Bereich von etwa 150-260 kDa und enthalten damit diverse für Nestin in der Ratte beschriebenen Varianten [14, 137, 153, 161]. Erklärungen für die verschiedenen Banden liefern Veröffentlichungen [14, 137, 153, 161], in denen proteolytische Spaltung von Nestin während der Apoptose beschrieben wird, sowie eine Erhöhung des Molekulargewichts durch Phosphorylierung und Glykosilierung. Das vielfältige Bandenmuster im Nestin-WB ist jedenfalls ein bekanntes Phänomen [14, 137, 153, 161] und spricht in diesem Fall eher für als gegen die Spezifität des verwendeten Antikörpers.

4.4 Proliferation von T-Zellen

Um die Beteiligung von T-Zellen an der chronischen Transplantatabstoßung in dem hier beschriebenen experimentellen Modell zu untersuchen, werden immunhistochemische Nachweise proliferierender T-Zellen in Milz und Lunge durchgeführt, sowie eine MLR mit mononukleären Leukozyten von LPS- und PBS-behandelten Transplantatempfängern. Mit diesen Versuchen soll geklärt werden, ob es in Transplantatempfängern nach der Instillation von LPS zu einer erhöhten Proliferation von T-Zellen kommt. Als Referenz dienen allogene Transplantatempfänger vom d 33, die statt LPS mit PBS behandelt werden, sowie unbehandelte allogene Transplantatempfänger vom d 28.

Diskussion technischer Aspekte: Immunhistochemie

Es werden immunhistochemische Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen den α/β T-Zellrezeptor (R73) und gegen PCNA in Milzen von isogenen und allogenen Transplantatempfängern vom d 28, d 29 und d 33, sowie in unbehandelten LEW-

Ratten durchgeführt. Zur Kontrolle der Färbungen wurden Gewebeschnitte mit nur einem der beiden Primärantikörper, jedoch mit allen Komponenten der Antikörpernachweissysteme inkubiert, um eventuelle Umfärbungen identifizieren zu können. Es konnten keine Umfärbungen beobachtet werden. Die weiteren Kontrollen der Färbung erfolgen wie unter 4.1 bereits beschrieben. Die verwendeten Antikörper sind gut charakterisiert und werden mit bereits etablierten Protokollen eingesetzt [147].

Mit dem verwendeten Antikörper können nur Zellen identifiziert werden, die den α/β T-Zellrezeptor exprimieren. T-Zellen, die den γ/δ T-Zellrezeptor exprimieren, können deshalb nicht in die Auswertung einbezogen werden. PCNA ist als Proliferationsmarker bekannt, der in der G1-, S- und G2-Phase der Mitose exprimiert wird [163]. In der frühen S-Phase ist er im Zytoplasma der Zellen verteilt, während er in der späten S-Phase im Nucleus konzentriert ist. Durch die Doppelfärbung mit den beiden Antikörpern können proliferierende T-Zellen identifiziert werden.

Die in der Auswertung bestimmten Werte können nur als Abschätzung bewertet werden. Eine genaue Quantifizierung ist mit der beschriebenen Methode nicht möglich. Hierfür wären sehr viel aufwändigere stereologische Untersuchungsmethoden notwendig. Weiterhin limitieren verschiedene Faktoren die Aussagekraft der Färbung: In der T-Zellzone der Milz liegen die T-Zellen so dicht, dass nicht auszuschließen ist, dass dazwischen liegende α/β -T-Zellrezeptor-negative Zellen mit T-Zellen verwechselt werden. Weiterhin können Anschnitte zweier einfach positiver Zellen im Schnitt übereinander liegen und als doppelt markierte Zelle gewertet werden. Schließlich hängt es von der Sensitivität der Färbung ab, wie lange vor und nach der S-Phase das PCNA nachweisbar ist.

Die oben beschriebenen Doppelfärbungen werden zusätzlich auf linken allogen transplantierten Lungen vor (d 28) und nach LPS- (d 29, d 33, d 40) bzw. PBS-Behandlung (d 33) durchgeführt. Die Qualität der Färbungen wird auch hier mit den oben beschriebenen Kontrollen überprüft. Als Referenz für die Auswertung der ausgezählten Zellen dienen allogene Transplantatempfänger ohne LPS-Behandlung (d 28), sowie PBS-behandelte allogene Transplantatempfänger vom d 33. Um eine Aussage über die Verteilung der doppelpositiven Zellen treffen zu können, werden diese in drei unterschiedlichen Bereichen der Lunge ausgezählt. Auch bei dieser Auswertung handelt es sich aufgrund der oben beschriebenen Einschränkungen der Färbung nicht um exakte Werte, sondern um eine Abschätzung.

Diskussion technischer Aspekte: *Mixed lymphocyte reaction*

MLRs werden durchgeführt, um eine Alloimmunreaktion bzw. eine MHC-Inkompatibilität zwischen den Lymphozyten zweier Individuen zu überprüfen. Die Proliferation der APC (Stimulator) wird durch Mitomycin C blockiert, die Responder-T-Zellen proliferieren, wenn sie Antigen-MHC-Komplexe der APC erkennen.

Aus Vorversuchen zur Auswahl des geeigneten Gewebes zur Durchführung der MLR ist bekannt, dass die Verwendung von aufgereinigten mononukleären Leukozyten aus dem Blut im Gegensatz zu isolierten Milzzellen einheitlichere Ergebnisse beim Vergleich des BrdU-Einbaus der Quadruplikate liefert. Aufgrund dieser Vorversuche wird für die Durchführung der MLRs Blut aus der *Vena cava* der Ratten verwendet.

Die Analyse der MLR erfolgt mit einem colorimetrischen BrdU-Proliferations-ELISA. Damit wird der Einbau von BrdU in Zellen nachgewiesen, der als Maß für die Proliferation der Zellen gewertet wird. Der Einbau von BrdU kann jedoch nicht ausschließlich mit der Proliferation der Zellen gleichgesetzt werden, da auch bei Reparaturprozessen von Zellen ein Einbau von BrdU an Bruchstellen der DNA möglich ist. BrdU ist ein Analogon von Thymidin, das von der Zelle aufgenommen wird und während der S-Phase des Zellzyklus in phosphorylierter Form anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat in die synthetisierte DNA eingebaut wird [44, 125]. Die Verwendung von BrdU soll eine vergleichbare Sensitivität haben, wie der radioaktive Einbau von ³H-Thymidin [125, 130].

Die für die Stimulation verwendeten Zellen werden mit dem Zytostatikum Mitomycin C behandelt, so dass ihre Proliferation gestoppt wird, ihre Zelloberflächenmoleküle jedoch aktiv bleiben [182]. In weiteren Vorversuchen zur Überprüfung der Methode wird geklärt, dass das verwendete Mitomycin C nur die Stimulatorzellen in ihrer Aktivität hemmt. Es wird mit den durchgeführten Waschschrritten so gut entfernt, dass es keinen Einfluss auf die Aktivität der Responderzellen hat. Überprüft wird dies durch einen experimentellen Ansatz (siehe 2., Exp.+PHA-L), der zusätzlich mit PHA-L versetzt wird. PHA-L ist ein bekannter Stimulator für die Proliferation von Lymphozyten, so dass ein verstärkter BrdU-Einbau in diesen Ansätzen im Vergleich zu dem experimentellen Ansatz ohne Zusatz von PHA-L zu erwarten ist. Das konnte durch den Nachweis des eingebauten BrdUs bestätigt werden, so dass die gefundenen Ergebnisse als valide betrachtet werden können. Die Durchführung von MLRs ist eine anerkannte Methode zur Analyse der Alloreaktivität [141, 180, 192].

Diskussion der Ergebnisse

In Milzen von Transplantatempfänger sind keine Unterschiede in der Anzahl proliferierender T-Zellen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten zu finden. Milzen unbehandelter LEW-Ratten zeigen eine niedrigere Anzahl doppeltpositiver Zellen im Vergleich zu Milzen isogener Transplantatempfänger. Weder die allogene Transplantation, noch die LPS-Behandlung der Empfänger führt zu Veränderungen im Vergleich zu den entsprechenden isogenen Transplantatempfängern.

Mit immunhistochemischen Doppelfärbungen in Lungen von Transplantatempfängern vom d 28 und LPS- bzw. PBS-behandelten Transplantatempfängern vom d 29, d 33 und d 40 können in allen untersuchten Bereichen der Lunge keine deutlichen Unterschiede in der Anzahl doppeltpositiver Zellen gefunden werden. Nur im Bereich des Alveolarraums werden in LPS-behandelten allogenen Transplantaten am d 40 weniger proliferierende T-Zellen gezählt als in allogenen Transplantaten am d 28. Festzuhalten ist jedoch, dass T-Zellen in allogenen Transplantaten proliferieren. Ein Vergleich mit isogenen Transplantaten ist aufgrund der geringen T-Zellinfiltration jedoch nicht möglich.

In der MLR kann nach der Stimulierung der mononukleären Leukozyten von PBS- oder LPS-behandelten allogenen Transplantatempfänger am d 33 mit allogenen F344-Leukozyten, kein Unterschied im BrdU-Einbau nachgewiesen werden. Zur Kontrolle werden Experimente durchgeführt, in denen mononukleäre Leukozyten aus unbehandelten LEW-Ratten mit F344-Leukozyten oder mit DA-Leukozyten stimuliert werden. Die Stimulation mit F344-Leukozyten zeigt einen ähnlichen BrdU-Einbau in die Zellen wie bei den Transplantatempfängern, während die Stimulation mit DA-Leukozyten im Vergleich zu den anderen Versuchen einen deutlich verstärkten BrdU-Einbau aufweist. MLRs für die beiden Kontrollansätze werden bereits von Wilson et al. [1967] beschrieben und können durch die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden [192]. Aus den geschilderten Daten lässt sich schließen, dass am d 28 nach allogener Lungentransplantation keine verstärkte systemische Alloreaktivität vorliegt. Im Transplantat hingegen ist eine nennenswerte T-Zellreaktivität nachweisbar. Die Instillation von LPS führt weder systemisch noch lokal zu einer Verstärkung der Alloreaktivität.

Roussey-Kesler et al. [2006] zeigen, dass sich nach einer Organtransplantation eine spontane operative Toleranz des Empfängers gegenüber dem Transplantat entwickeln kann [134]. Andere Autoren zeigen, dass diese etablierte Toleranz z.B.

von verschiedenen Krankheitserregern oder Reagenzien gebrochen werden kann [187, 198]. Nach dem Brechen einer etablierten Toleranz wäre mit einer erneuten Alloimmunreaktion des Empfängers gegenüber dem Transplantat zu rechnen. Diese Alloimmunreaktion wäre mit einem verstärkten Einbau von BrdU in der MLR verbunden, der durch eine erhöhte Proliferation von T-Zellen begründet ist. Die hier gezeigten Ergebnisse weisen jedoch weder auf die Induktion noch auf ein Brechen von Toleranz hin.

In verschiedenen Veröffentlichungen gibt es Hinweise, dass eine Abstoßung von Lungentransplantaten unabhängig von sekundären lymphatischen Organen erfolgen kann [56, 89, 141]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass im Gegensatz zu unbehandelten LEW-Ratten eine erhöhte Anzahl doppelpositiver Zellen in Milzen isogener Transplantatempfänger zu finden ist. Zwischen den isogenen und allogenen Transplantatempfängern besteht jedoch zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten und unabhängig von der LPS-Behandlung kein Unterschied, was darauf hindeutet, dass auch hier die Alloimmunreaktion nicht in der Milz abläuft.

In den oben genannten Veröffentlichungen weisen die Autoren neben einer schwächeren Proliferation in lymphatischen Organen eine stärkere lokal beschränkte Proliferation von T-Zellen im Transplantat nach [56, 89, 141]. In einem experimentellen Modell in der Maus zu obliterativer Bronchiolitis nach intrapulmonaler Tracheatransplantation wird gezeigt, dass residente $CD8^+$ Effektorzellen in der Lunge für die Abstoßung und die allogene Reaktion verantwortlich sind [189]. In diesem Modell sind auch $CD8^+$ Zellen aus Lymphknoten und der Milz nach allogener Aktivierung an der Abstoßung beteiligt. Nach einer intrapulmonalen Tracheatransplantation gefolgt von einer orthotopen Lungentransplantation in der Ratte zeigen von Sato et al. [2009a], dass es eine lokale Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen in der Lunge gibt [141]. Dabei wird eine signifikant erhöhte Anzahl dieser Zellen im Transplantat gefunden, während rechte Lungen, Lymphknoten und Milz eine deutlich niedrigere Anzahl aufweisen. In dieser Studie finden sich auch in humanen Proben von BOS Patienten $CD8^+$ T-Zellen im entzündeten Gewebe [141]. Gelman et al. [2009]. und Kreisel et al. [2011]. weisen nach einer Lungentransplantation residente $CD8^+$ Gedächtniszellen ausschließlich in den Lungen und nicht in Lymphknoten und Milz nach [56, 89]. Gelman et al. [2009] zeigen außerdem, dass in einem transgenen Mausstamm ohne sekundäre

lymphatische Organe trotzdem eine Aktivierung alloreaktiver T-Zellen stattfindet und die akute Abstoßung der transplantierten Lunge folgt [56]. Bei Kreisel et al. [2011] wird ein transgenes System benutzt, bei dem CFSE-markierte CD8⁺ T-Zellen in Lungentransplantatempfänger transferiert werden [89]. Die Teilung dieser Zellen wird anschließend in den ersten vier Tagen nach der Transplantation im Transplantat untersucht und zeigt, dass sich bis zum d 4 alle transferierten Zellen geteilt haben. In mediastinalen Lymphknoten und der Milz können jedoch keine dieser transgenen Zellen nachgewiesen werden.

Die beschriebenen Untersuchungen erfolgen in Modellen der akuten Transplantatabstoßung, in denen Mäuse mit größeren Unterschieden in ihren MHC verwendet werden und es werden deutlich frühere Zeitpunkte nach der Transplantation untersucht, als in dem in dieser Arbeit untersuchten Modell zur chronischen Abstoßung. Das könnten Gründe dafür sein, dass hier keine Unterschiede in der Proliferation von T-Zellen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten gefunden werden. Außerdem wäre es möglich, dass solche Unterschiede zu einem früheren Zeitpunkt nach der Transplantation sichtbar werden. Möglicherweise sind solche Ergebnisse eher in experimentellen Modellen zu erwarten, in denen größere Unterschiede in den MHC-Klassen der verwendeten Spender und Empfänger bestehen. Hier wäre die allogene Reaktion insgesamt stärker und könnte mit einer deutlich höheren Zahl proliferierender T-Zellen und einer anderen Verteilung im Organismus verbunden sein.

Eine Bestätigung der Ergebnisse aus Doppelfärbungen und MLR liefern zusätzliche Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur mRNA-Expression verschiedener Marker (PCNA, T-Zellmarker) in mediastinalen Lymphknoten, Milz und Lunge von Transplantatempfängern [6]. Auch hier sind keine Unterschiede der Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten vor und nach LPS-Behandlung sichtbar.

Andere Autoren zeigen, dass Treg maßgeblich an der Etablierung einer Toleranz gegenüber einem Transplantat beteiligt sind [52, 59, 115, 164, 181]. Man weiß außerdem, dass dies durch eine Hemmung der Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen geschieht [138, 139, 162, 171, 181]. Damit liegt die Vermutung nahe, dass solche Zellen eventuell auch in diesem Modell eine Rolle spielen könnten. Aus weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass der Treg Marker Foxp3 in mediastinalen Lymphknoten, Milz und Lunge der Transplantatempfänger nur schwach exprimiert wird und außerdem keine lokalen Veränderungen der mRNA-

Expression in allogenen Transplantatempfängern zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation und unabhängig von der LPS-Behandlung zu finden sind [6].

Die starke Expression verschiedener TLRs in allogenen Transplantaten könnte in diesem Modell eine wichtige Rolle spielen. Chen et al. zeigen, dass nach einer Transplantation die zusätzliche Stimulation mit TLR-Liganden (CpG) nach einer Toleranz-induzierenden Behandlung mit anti-CD154 und einer Spender-spezifischen Transfusion zur Transplantatabstoßung führt [29]. Auch Thornley et al. zeigen, dass sich mit einer zweistufigen Toleranzinduktion durch eine Spender-spezifische Transfusion und die zusätzliche Behandlung mit anti-CD154 das Überleben von allogenen Hauttransplantaten in Mäusen deutlich verlängert [169]. Die folgende Behandlung mit verschiedenen TLR-Agonisten (LPS, Poly I:C) führt in diesem Modell ähnlich wie bei Chen et al. [2006] zu einer schnellen Transplantatabstoßung [29, 169]. Die gleiche Arbeitsgruppe zeigt in einem ähnlichen Modell, dass der Typ I IFN-Signalweg scheinbar ein zentraler Mechanismus in der durch TLR-Agonisten getriggerten Transplantatabstoßung ist [170].

Für die Beschreibung der vorhandenen T-Zellpopulationen und der damit verbundenen Immunantworten über den Verlauf des Untersuchungszeitraums hat meine Kollegin Dr. Srebrena Atanasova verschiedene Transkriptionsfaktoren für T_H1- und T_H2-Zellen in der qRT-PCR analysiert. Hier zeigt sich deutlich, dass die Immunreaktion in den allogenen Transplantaten über den gesamten Verlauf der Untersuchung T_H1-geprägt ist. Die untersuchten Transkriptionsfaktoren sind jeweils in allogenen Lungentransplantaten vor und nach LPS-Gabe hochreguliert. Mit Färbungen von Monozyten/Makrophagen- (ED1, ED2) und T-Zell-Markern (R73) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation wird außerdem deutlich, dass signifikante Unterschiede zwischen isogenen und allogenen Transplantaten in der Infiltration mit den entsprechenden Zellen bestehen. Es gibt jedoch keine Unterschiede in der Infiltration allogener Transplantate zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten vor und nach LPS-Behandlung [Atanasova, 2013, noch nicht veröffentlicht].

Die hier erhobenen Daten erlauben die Schlussfolgerung, dass in dem hier untersuchten experimentellen Modell der chronischen Schädigung von Lungentransplantaten die Applikation von LPS nicht zu einer Verstärkung der T-Zell-vermittelten Alloreaktivität führt.

4.5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in dem untersuchten experimentellen Modell zur chronischen Abstoßung von Lungentransplantaten am d 28 auf histologischer Ebene, in der Aktivität des angeborenen Immunsystems und des regenerativen Potentials deutliche Unterschiede zwischen isogenen und allogenen Transplantaten bestehen. Allogene Transplantate weisen am d 28 Zeichen akuter Abstoßung auf und zeigen eine verstärkte mRNA-Expression von verschiedenen Komponenten des TLR-Systems. Beides könnte die Grundlage dafür liefern, dass die folgende LPS-Behandlung zu einer Verstärkung der Transplantatschädigung und zu chronischen Veränderungen in transplantierten Lungen führt.

Isogene Transplantate zeigen nur leichte Veränderungen, die vermutlich durch I/R-Schäden getriggert werden. Durch eine verstärkte Nestin-Expression in isogenen Transplantaten kann auf ein besseres regeneratives Potential im Vergleich zu allogenen Transplantaten geschlossen werden. Nach der LPS-Behandlung weisen isogene Transplantate zunächst Zeichen einer Entzündung auf, die aber im Verlauf des Untersuchungszeitraumes wieder verschwinden [6].

Die LPS-Behandlung führt weder systemisch noch lokal im Transplantat zu einer verstärkten T-Zell-Alloreaktivität.

5. Zusammenfassung

Das Langzeitüberleben von Patienten nach einer Lungentransplantation wird stark durch das *Bronchiolitis obliterans* Syndrom (BOS) limitiert. Akute Transplantatabstoßungsepisoden und Infektionen der Atemwege sind wesentliche Risikofaktoren für die Entstehung des BOS. Die Etablierung eines neuen experimentellen Modells in der Ratte sollte eine Grundlage für die Untersuchung der Pathogenese von BOS liefern. Nach einer allogenen (F344 → LEW), orthotopen, linksseitigen Lungentransplantation und zehntägiger Immunsuppression mit Ciclosporin, erhalten die Ratten eine intratracheale Instillation von Lipopolysaccharid (LPS) am Tag 28. Das führt zur Entwicklung histopathologischer Anzeichen von BOS - Fibrose, Gefäß*remodeling* und BO - bis zum Endpunkt der Untersuchung (Tag 90). Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung von Unterschieden zwischen isogenen (LEW → LEW) und allogenen (F344 → LEW) Lungentransplantaten am Tag 28 nach Lungentransplantation vor der Instillation von LPS. Dazu wurden die Transplantate histologisch auf für BOS beschriebene Veränderungen (Fibrose (Azan), Gefäß*remodelling* (α SMA, Orcein)) untersucht und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, um Immunzellen (ED1, ED2, R73) und Progenitorzellen (Antikörper gegen Nestin) zu identifizieren. Bezüglich des angeborenen Immunsystems wurde durch qRT-PCRs für verschiedene Moleküle des Toll-*like* Rezeptor (TLR) -Systems in Lungen von Transplantatempfängern nachgewiesen. Die mögliche Beteiligung von proliferierenden T-Zellen an der chronischen Abstoßung von Lungentransplantaten wurde histologisch in Milzen und Lungen, sowie in *mixed lymphocyte reactions* (MLR) mit isolierten Blutleukozyten aus Transplantatempfängern nach Kontroll- (phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)) oder LPS-Behandlung untersucht.

Im Vergleich zu isogenen Transplantaten zeigen allogene Transplantate am Tag 28 nach der Transplantation Zeichen einer akuten Abstoßung. Gefäß*remodeling* und fibrotische Veränderungen sind am Tag 28 nach der Transplantation nicht vorhanden. Die peribronchiolären Infiltrate in isogenen und allogenen Lungentransplantaten enthalten zahlreiche ED1-positive Makrophagen. Die mRNA-Expression fast aller untersuchten Komponenten des TLR Systems ist in allogenen Lungentransplantaten hochreguliert. In isogenen Transplantaten wird am Tag 28 nach der Transplantation mehr Nestin exprimiert als in allogenen Transplantaten. Zu

den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (Tag 28, 29, 33, 40) konnten keine Unterschiede im Vorhandensein von proliferierenden T-Zellen, unabhängig von der LPS-Behandlung gefunden werden. Diese Ergebnisse werden von der MLR bestätigt, wo ebenfalls keine Unterschiede im BrdU-Einbau zwischen PBS- oder LPS-behandelten Transplantatempfängern auftreten.

Folgende Schlussfolgerungen können gezogen werden: Am Tag 28 nach der Transplantation sind keine Zeichen einer chronischen Abstoßung vorhanden. Isogene und allogene Transplantate unterscheiden sich jedoch zu diesem Zeitpunkt in der Infiltration mit Immunzellen und in ihrem regenerativen Potential. Außerdem ist die Aktivität des angeborenen Immunsystems, im Hinblick auf die untersuchten Komponenten des TLR-Systems, in allogenen Transplantaten hochreguliert. Diese Veränderungen könnten für die erhöhte Empfindlichkeit der allogenen Transplantate gegenüber TLR-Liganden verantwortlich sein.

6. Summary

The long-term survival of patients after lung transplantation is limited by bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). Acute rejection episodes and infections of the pulmonary system are major risk factors for the development of BOS. Our laboratory established a new experimental model for BOS in the rat to study its pathogenesis. After allogeneic (Fischer 344 → Lewis, F344 → LEW) orthotopic, left lung transplantation and immunosuppression with ciclosporin for ten days, the rats obtained an intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) on day 28. This led to the development of histopathological hallmarks of BOS – fibrosis, vascular remodeling and BO – until the end of the study (day 90).

The focus of this work was the characterization of differences between isogenic (LEW → LEW) and allogeneic (F344 → LEW) lung transplants on day 28 after transplantation before instillation of LPS. The histopathology of the transplants was investigated regarding changes characteristic for BOS such as fibrosis (azan) and remodelling (α SMA, orcein) and immunohistochemistry was performed with specific antibodies to identify immune cells (ED1, ED2, R73) and progenitor cells (antibodies to nestin). Regarding the innate immune system various molecules of the Toll-like receptor (TLR) system were analyzed by qRT-PCR in lungs of transplant recipients. A potential contribution of proliferating T cells to chronic rejection of lung transplants was studied histologically in spleens and lungs, as well as in mixed lymphocyte reactions (MLR) with isolated blood leukocytes of transplant recipients after vehicle or LPS treatment.

In comparison to isogenic transplants, allogeneic transplants on day 28 after transplantation show signs of acute rejection. Remodelling and fibrotic changes are not visible on day 28 after transplantation. Peribronchiolar infiltrates in isogenic and allogeneic lung transplants predominantly consist of ED1-positive macrophages. The mRNA-expression of most analyzed components of the TLR system is upregulated in allogeneic lung transplants. Isogenic transplants show a higher expression of nestin than allogeneic transplants on day 28 after transplantation. At different timepoints of the study (days 28, 29, 33, 40) no differences are found in the presence of proliferating T cells, independent of LPS treatment. These results are confirmed by MLR, where no differences in BrdU-incorporation between vehicle- and LPS-treated transplant recipients are seen.

In conclusion, no signs of chronic rejection are detected on day 28 after transplantation. Allografts, however, display signs of mild to moderate acute rejection as well as a decreased regenerative potential. In addition the activity of the innate immune system is up-regulated in allogeneic transplants compared to isografts. These changes may be responsible for the increased susceptibility of allografts towards TLR ligands.

7. Literatur

Internet

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
www.ishlt.org

Publikationen

- [1] Aihara, M, Sugawara, K, Torii, S, Hosaka, M, Kurihara, H, Saito, N, Takeuchi, T. Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene. *Lab Invest*, 2004; 84:1581–1592.
- [2] Allan, JS, Wain, JC, Schwarze, ML. Modeling chronic lung allograft rejection in miniature swine. *Transplantation*, 2002; 73:447–453.
- [3] Amoh, Y, Li, L, Yang, M, Moossa, AR, Katsuoka, K, Penman, S, Hoffman, RM. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004;101:13291-13295
- [4] Andrade, CF, Waddell, TK, Keshavjee, S and Liu, M. Innate Immunity and Organ Transplantation: The Potential Role of Toll-like Receptors. *Am J Transplant*, 2005; 5:969–975.
- [5] Andrade, CF, Kaneda, H, Der, S, Tsang, M, Lodyga, M, Chimisso Dos Santos, C, Keshavjee, S, Liu, M. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*; 2006; 25:1317-1323.
- [6] Atanasova, S, Hirschburger, M, Jonigk, D, Obert, M, Petri, K, Evers, A, Hecker, A, Schmitz, J, Kaufmann, A, Wilhelm, J, Chakraborty, T, Padberg, W, Grau, V. Chronic lung allograft damage in the rat - a relevant model for human bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). *J Heart Lung Transplant*, 2013; 32:1131-1139.
- [7] Auchincloss, H, Lee, R, Shea, S, Markowitz, JS, Grusby, MJ, Glimcher, LH. The role of 'indirect' recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90:3373 –3377.
- [8] Banchereau, J, Steinman, RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998; 392:245-252.
- [9] Beers, MF, Morrisey, EE. The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. *J Clin Invest*, 2011; 121:2065-2073.
- [10] Belperio, JA, Weigt, S, Fishbein, MC, and Lynch, JP. Chronic Lung Allograft Rejection. Mechanisms and Therapy. *Proc Am Thorac Soc*, 2009; 6:108–121.
- [11] Benichou, G, Takizawa, PA, Olson, CA, McMillan, M, Sercarz, EE. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med*, 1992; 175:305-308.

-
- [12] Berke, G. The CTL's kiss of death. *Cell*, 1995; 81:9-12
- [13] Berndt, C. Expression und Lokalisation des neuronalen Stammzellmarkers Nestin in den Gefäßwänden der Lunge von neugeborenen und adulten Mäusen. Dissertation, 2011.
- [14] Bertelli, E, Regoli, M, Fonzi, L, Occhini, R, Mannucci, S, Ermini, L, Toti, P. Nestin expression in adult and developing human kidney. *J Histochem Cytochem*, 2007; 55:411-421.
- [15] Bevan, MJ, Goldrath, AW. T-cell memory: You must remember this.... *Curr Biol*, 2000; 10:338-340
- [16] Bianchi, ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, 2007; 81:1-5.
- [17] Billingham, RE, Brent, L, Medawar, PB. 'Actively acquired tolerance' of foreign cells. *Nature*, 1953; 172:603-606.
- [18] Birbrair, A, Wang, ZM, Messi, ML, Enikolopov, GN, Delbono, O. Nestin-GFP transgene reveals neural precursor cells in adult skeletal muscle. *PLoS One*, 2011; 6:e16816.
- [19] Biswas, SK and Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, 2010; 11:889-896.
- [20] Bluestone, JA. Costimulation and its role in organ transplantation. *Clin Transplant*, 1996; 10:104-109.
- [21] Boom, WH, Liano, D, Abbas, AK. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. II. Effects of interleukin 4- and interleukin 2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. *J Exp Med*, 1988; 167:1350-1363.
- [22] Borel, JF, Feurer, C, Magnée, C, Stähelin, H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology*, 1977; 32:1017-1025.
- [23] Borthwick, LA, Parker, SM, Brougham, KA, Johnson, GE, Gorowiec, MR, Ward, C, Lordan, JL, Corris, PA, Kirby, JA, Fisher, AJ. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. *Thorax*, 2009; 64:770-777.
- [24] Bowie, A and O'Neill, LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leuk Biol*, 2000; 67:508-514.
- [25] Brodsky, FM, Guagliardi, LE. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol*, 1991; 9:707-744.
- [26] Calderone, A. Nestin⁺ cells and healing the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012; 302:H1-9.

- [27] Campbell, NA, Reece, JB. Biologie. Spektrum, Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 6. Auflage, 2003.
- [28] Cattaneo, E, McKay, R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature*, 1990; 347:762-765.
- [29] Chen, L, Wang, T, Zhou, P, Ma, L, Yin, D, Shen, J, Molinero, L, Nozaki, T, Phillips, T, Uematsu, S, Akira, S, Wang, CR, Fairchild, RL, Alegre, ML, Chong, A. TLR engagement prevents transplantation tolerance. *Am J Transplant*; 2006; 6:2282-91.
- [30] Christie, JD, Edwards, LB, Anna Y. Kucheryavaya, AY, Benden, C, Dipchand, AI, Dobbels, F, Kirk, R, Rahmel, AO, Stehlik, J and Hertz, MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report—2012. *J Heart Lung Transplant*, 2012; 31:1073–1086.
- [31] Chronos, ZC, Sever-Chronos, Z, Shepherd, VL. Pulmonary Surfactant: An Immunological Perspective. *Cell Physiol Biochem*, 2010; 25:13-26
- [32] Cooper, JD. Lung transplantation: a new era. *Ann Thorac Surg*, 1987; 44:447-8.
- [33] Cottrex, F, Groux, H. Specialization in tolerance: innate CD4⁺CD25⁺ versus acquired Tr1 and Th3 regulatory T cells. *Transplantation*, 2004; 77:12–15.
- [34] Dallman, MJ. Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance. *Curr Opin Immunol*, 1993; 5:788-793.
- [35] Dark, JH, Patterson, GA, Al-Jilaihawi, AN, Hsu, H, Egan, T, Cooper, JD. Experimental en bloc double-lung transplantation. *Ann Thorac Surg*, 1986; 42:394-8
- [36] Davidoff, MS, Middendorff, R, Enikolopov, G, Riethmacher, D, Holstein, AF, Muller, D. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol*, 2004; 167:935-944.
- [37] Dessing, MC, Bemelman, FJ, Claessen, N, ten Berge, IJM, Florquin, S, Leemans, JC. Intragraft Toll-like receptor profiling in acute renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*, 2010; 25:4087-4092.
- [38] De Vleeschauwer, S, Jungraithmayr, W, Wauters, S, Willems, S, Rinaldi, M, Vaneylen, A, Verleden, S, Willems-Widyastuti, A, Bracke, K, Brusselle, G, Verbeken, E, Van Raemdonck, D, Verleden, G, Vanaudenaerde, B. Chronic rejection pathology after orthotopic lung transplantation in mice: The Development of a murine BOS model and its drawbacks. *PLoS One*, 2012; 12:e29802.
- [39] Dierich, M, Fuehner, T, Welte, T, Simon, A, Gottlieb, J. Lungentransplantation – Indikationen, Langzeitergebnisse und die besondere Bedeutung der Nachsorge. *Der Internist*, 2009;50:561-571.
- [40] Dijkstra, CD, Döpp, EA, Joling, P, Kraal, G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat

recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*, 1985; 54:589-599.

[41] Drexler, SK, Foxwell, BM. The role of Toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010; 42:506-518.

[42] Dreyfuss, D, Saumon, G. Ventilator-induced lung injury. Lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 157:294-323.

[43] Dutly, AE, Andrade, CF, Verkaik, R, Kugathasan, L, Trogadis, J, Liu, M, Waddell, TK, Stewart, DJ, Keshavjee, S. A novel model for post-transplant obliterative airway disease reveals angiogenesis from the pulmonary circulation. *Am J Transplant*, 2005; 5:248-254.

[44] Eidinoff, ML, Cheong, L, Rich, MA. Incorporation of unnatural pyrimidine bases into deoxyribonucleic acid of mammalian cells. *Science*, 1959; 129:1550-1551.

[45] Eppinger, MJ, Deeb, GM, Bolling, SF, Ward, PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol*, 1997; 150:1773-1784.

[46] Estenne, M, Maurer, JR, Boehler, A, Egan, JJ, Frost, A, Hertz, M, Mallory, GB, Snell, GI, and Yousem, S. Bronchiolitis Obliterans Syndrome 2001: An Update of the Diagnostic Criteria. *J Heart Lung Transplant*, 2002; 21:297-310.

[47] Everaert, BR, Boulet, GA, Timmermans, JP, Vrints, CJ. Importance of suitable reference gene selection for quantitative real-time PCR: special reference to mouse myocardial infarction studies. *PLoS One*, 2011; 6:e23793.

[48] Fan, L, Benson, H, Vittal, R, Mickler, E, Presson, R. Neutralizing IL-17 prevents Obliterative Bronchiolitis in murine orthotopic lung transplantation. *Am J Transplant*, 2011; 11: 911-22.

[49] Fan, K, Qiao, XW, Nie, J, Yuan, L, Guo, H, Zheng, Z, Li, J, Wang, J, Jiang, K. Orthotopic and heterotopic tracheal transplantation model in studying obliterative bronchiolitis. *Transplant Immunol*, 2013, in press.

[50] Fiser, SM, Tribble, CG, Long, SM. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg*, 2002; 73:1041-1048.

[51] Fowlkes, BJ, Schwartz, RH, Pardoll, DM. Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4⁺8⁺ precursor stage. *Nature*, 1988; 334:620-623.

[52] Francis, RS, Feng, G, Tha-In, T, Lyons, IS, Wood, KJ, Bushell, A. Induction of transplantation tolerance converts potential effector T cells into graft-protective regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 2011; 41:726-738.

[53] Frederiksen, K and McKay, R. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci*, 1988; 8:1144-1151.

- [54] Frid, MG, Kale, VA, Stenmark, KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res*, 2002; 90:1189-1196
- [55] Glasser, JR, Mallampalli, RK. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes Infect*, 2012; 14:17-25
- [56] Gelman, AE, Li, W, Richardson, SB, Zinselmeyer, BH, Lai, J, Okazaki, M, Kornfeld, CG, Kreisel, FH, Sugimoto, S, Tietjens, JR, Dempster, J, Patterson, GA, Krupnick, AS, Miller, MJ, Kreisel, D. Cutting Edge: acute lung allograft rejection is independent of secondary lymphoid organs. *J Immunol*, 2009; 182:3969-3973.
- [57] Gimmi, CD, Freeman, GJ, Gribben, JG, Gray, G, Nadler, LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90:6586-6590.
- [58] Goldstein, DR, Palmer, SM. Role of toll-like receptor-driven innate immunity in thoracic organ transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2005; 24:1721-1729.
- [59] Golshayan, D, Jiang, S, Tsang, J, Garin, MI, Mottet, C, Lechler, RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*, 2007; 109:827-835.
- [60] Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3:23-35.
- [61] Grau, V, Herbst, B, Steiniger, B. Dynamics of monocytes/macrophages and T lymphocytes in acutely rejecting rat renal allografts. *Cell Tissue Res*, 1998; 291:117-126.
- [62] Grover, FL, Fullerton, DA. The past, present, and future of lung transplantation. *Am J Surg*, 1997; 173:523-33.
- [63] Guy-Grand, D, Malassis-Seris, M, Briottet, C, Vassalli, P. Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally. Correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts, and cytoplasmic granules. *J Exp Med*, 1991; 173:1549-1552.
- [64] Hale, DA, Dhanireddy, K, Bruno, D, Kirk, DA. Induction of transplantation tolerance in non-human primate preclinical models. *Phil Trans R Soc B*, 2005; 360:1723-1737.
- [65] Hardy, JD, Webb, WR, Dalton, ML, Walker, GR. Lung homotransplantation in man: report of the initial case. *JAMA*, 1963; 186:1065-74.
- [66] Held, HD, Boettcher, S, Hamann, L, Uhlig, S. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor- κ B and is blocked by steroids. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 163:711-716.

- [67] Hertz, M, Jessurun, J, King, MB, Savik, SK, Murray, JJ. Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways. *Am J Pathol*, 1993; 142:1945-1951.
- [68] Hinz, B, Phan, SH, Thannickal, VJ, Galli, A, Bochaton-Piallat, ML, Gabbiani, G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 2007; 170:1807–1816
- [69] Hirschburger, M, Greschus, S, Kuchenbuch, T, Plötz, C, Obert, M, Traupe, H, Padberg, W, Grau, V. Lung transplantation in the Fischer 344 → Wistar Kyoto rat strain combination is not suitable to study Bronchiolitis Obliterans. *J Heart Lung Transplant*, 2006; 26:390-398.
- [70] Hockfield, S, McKay, R. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci*, 1985; 5:3310-3328.
- [71] Hori, S, Nomura, T, Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299:1057-1061.
- [72] Howland, KC, Ausubel, LJ, London, CA, Abbas, AK. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *J Immunol*, 2000; 164:4465-4470.
- [73] Hyun Sung, S, Warnock, M, Fang, KC, Hall, KW, Hall, TS. A comparison of rat tracheal transplant models: Implantation verses anastomotic techniques for the study of airway rejection. *Transplantation*, 2002; 73:695–700.
- [74] Ikonen, TS, Brazelton, TR, Berry, GJ, Shorthouse, RS, Morris, RE. Epithelial re-growth is associated with inhibition of obliterative airway disease in orthotopic tracheal allografts in non-immunosuppressed rats. *Transplantation*, 2000; 70:857–863.
- [75] Janssens, S, Beyaert, R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev*, 2003; 16:637-646.
- [76] Jungraithmayr, W, Korom, S, Hillinger, S, Weder, W. A mouse model of orthotopic, single-lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009; 137: 486–91.
- [77] Jungraithmayr, W, Vogt, P, Inci, I., Hillinger, S, Arni, S, Korom, S, Weder, W. A model of chronic lung allograft rejection in the rat. *Eur Resp J*, 2010; 35:1354-1363.
- [78] Jungraithmayr, W, Jang, JH, Schrepfer, S, Inci, I, Weder, W. Small animal models of experimental obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013; 48: 675-684.
- [79] Kägi, D, Ledermann, B, Bürki, K, Zinkernagel, R, Hengartner, H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol*, 1996; 14:207-232.
- [80] Kahan, BD. Cyclosporin A: A new advance in transplantation. *Tex Heart Inst J*, 1982; 9:253-266.

- [81] Kappler, JW, Roehm, N, Marrack, P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 1987; 49:273-280.
- [82] Karvonen, HM, Lehtonen, ST, Harju, T, Sormunen, RT, Lappi-Blanco, E, Mäkinen, JM, Laitakari, K, Johnson, S, Kaarteenaho, RL. Myofibroblast expression in airways and alveoli is affected by smoking and COPD. *Resp Res*, 2013; 14:84.
- [83] Kastelijn, EA, van Moorsel, CHM, Rijkers, GT, Ruven, HJT, Karthaus, V, Kwakkel-van Erp, JM, van de Graaf, EA, Zanen, P, van Kessel, DA, Grutters, JC and van den Bosch, JMM. Polymorphisms in innate immunity genes associated with development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2009; 29:665-671.
- [84] Kawai, T, Akira, S. TLR signalling. *Cell Death Differ*, 2006; 13:816-825.
- [85] Keane, MP, Gomperts, BN, Weigt, S, Xue, YY, Burdick, MD, Nakamura, H, Zisman, DA, Ardehali, A, Saggari, R, Lynch, JP, Hogaboam, C, Kunkel, SL, Lukacs, NW, Ross, DJ, Grusby, MJ, Strieter, RM, Belperio, JA. IL-13 is pivotal in the fibro-obliterative process of Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *J Immunol*, 2007; 178:511-519.
- [86] Kirk, AD, Harlan, DM, Armstrong, NN, Davis, TA, Dong, Y, Gray, GS, Hong, X, Thomas, D, Fechner, JH, Knechtle, SJ. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci*, 1997; 94:8789-8794.
- [87] Klein, T, Ling, Z, Heimberg, H, Madsen, OD, Heller, RS, Serup, P. Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas. *J Histochem Cytochem*, 2003; 51:697-706.
- [88] Krams, SM, Wang, M, Castillo, RO, Ito, T, Phillips, L, Higgins, J, Kambham, N, Esquivel, CO, Martinez, OM. Toll-like receptor 4 contributes to small intestine allograft rejection. *Transplantation*, 2010; 90:1272-1277.
- [89] Kreisel, D, Lai, J, Richardson, SB, Ibricevic, A, Nava, RG, Lin, X, Li, W, Kornfeld, CG, Miller, MJ, Brody, SL, Gelman, AE, Krupnick, AS. Polarized alloantigen presentation by airway epithelial cells contributes to direct CD8⁺ T cell activation in the airway. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011; 44:749-754.
- [90] Krüger, B, Krick, S, Dhillon, N, Lerner, SM, Ames, S, Bromberg, JS, Lin, M, Walsh, L, Vellam J, Fischeder, M, Krämer, BK, Colvin, RB, Heeger, PS, Murphy, BT, Schröppel, B. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *PNAS*, 2009; 106:3390-3395.
- [91] Kück, U. *Praktikum der Molekulargenetik*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005.
- [92] Land, WG. Injury to allografts: innate immune pathways to acute and chronic rejection. *Saudi J Kidney Dis Transplant*, 2005; 16:520-539.

- [93] Larsen, CP, Morris, PJ, Austyn, JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med*, 1990; 171:307–314.
- [94] Larsen, CP, Elwood, ET, Alexander, DZ, Ritchie, SC, Hendrix, R, Tucker-Burden, C, Cho, HR, Aruffo, A, Hollenbaugh, D, Linsley, PS, Winn, KJ, Pearson, TC. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature*, 1996; 381:434-438.
- [95] Lechler, RI, Batchelor, JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med*, 1982; 155: 31-41.
- [96] Lemaitre, B, Nicolas, E, Michaut, L, Reichhart, JM, Hoffman, JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 1996; 86:973–983.
- [97] Lendahl, U, Zimmerman, LB, McKay, R. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 1990; 60:585-595.
- [98] Leventhal, JS, Schröppel, B. Toll-like receptors in transplantation: sensing and reacting to injury. *Kidney International*, 2012; 81:826-832.
- [99] Li, L, Mignone, J, Yang, M, Matic, M, Penman, S, Enikolopov, G, Hoffman, RM. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100:9958-9961.
- [100] Li, T, Chen, G, Zhang, Z. Roles of toll-like receptors signaling in organ transplantation. *J Cent South Univ (Med Sci)*, 2011; 36:1125-1133.
- [101] Lin, T, Zhou, W, Sacks, SH. The role of complement and toll-like receptors in organ transplantation. *Transpl Int*, 2007; 20:481-489.
- [102] Lüllmann-Rauch, R. Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 3. Auflage, 2011.
- [103] Magombedze, G, Reddy, PBJ, Eda, S, Ganusov, VV. Cellular and population plasticity of helper CD4⁺ T cell responses. *Front Physiol*, 2013; 4:206.
- [104] Matsumura, Y, Marchevsky, A, Zuo, XJ, Kass, RM, Matloff, JM, Jordan, SC. Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation. *Transplantation*, 1995; 59:1509-1517.
- [105] Mayer, EJ, Hughes, EH, Carter, DA, Dick, AD. Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol*, 2003; 87:1154-1158.
- [106] Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2001; 1:135-145.

- [107] Medzhitov, R, Janeway, CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, 2002; 296:298-300.
- [108] Meng, G, Rutz, M, Schiemann, M, Metzger, J, Grabiec, A, Schwandner, R, Lippa, PB, Ebel, F, Busch, DH, Bauer, S, Wagner, H, Kirschning, CJ. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest*, 2004; 113:1473-1481.
- [109] Michalczyk, K, Ziman, M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol*, 2005; 20:665-671.
- [110] Minamoto, K, Pinsky, DJ. Recipient iNOS but not eNOS deficiency reduces luminal narrowing in tracheal allografts. *J Exp Med*, 2002; 196:1321-1333.
- [111] Mizuta, T, Kawaguchi, A, Nakahara, K, Kawashima, Y. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 1989; 97:578-581.
- [112] Mokry, J, Cizkova, D, Filip, S, Ehrmann, J, Osterreicher, J, Kolar, Z, English, D. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev*, 2004; 13:658-664.
- [113] Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, Giedlin, MA, Coffman, RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 1986; 136:2348-2357.
- [114] Mulisch, M und Welsch, U. Romeis - Mikroskopische Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 18. Auflage, 2010.
- [115] Muller, YD, Seebach, JD, Bühler, LH, Pascual, M, Golshayan, D. Transplantation tolerance. Clinical potential of regulatory T cells. *Self/Nonself*, 2011, 2:26-34.
- [116] Murphy, KM, Stockinger, B (2010). Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol*, 2010; 11:674-680.
- [117] Nadigel, J, Préfontaine, D, Bagloli, CJ, Maltais, F, Bourbeau, J, Eidelman, DH, Hamid, Q. Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8⁺ T cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Resp Res*, 2011; 12:149.
- [118] Nathan, CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*, 1987; 79:319-326.
- [119] Okazaki, M, Krupnick, AS, Kornfeld, C, Lai, J, Ritter, J. A mouse model of orthotopic vascularized aerated lung transplantation. *Am J Transplant*, 2007;7: 1672-9.
- [120] Okumi, M, Fishbein, JM, Griesemer, AD, Gianello, PR, Hirakata, A, Nobori, S, Moran, S, Samelson-Jones, E, Shimizu, A, Sachs, DH, Yamada, K. Role of persistence of antigen and indirect recognition in the maintenance of tolerance to renal allografts. *Transplantation*, 2008, 85:270-280.

- [121] Palmer, SM, Burch, LH, Davis, RD, Herczyk, WF, Howell, DN, Reinsmoen, NL, Schwartz, DA. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003; 168:628-633.
- [122] Palmer, SM, Burch, LH, Trindade, AJ, Davis, RD, Herczyk, WF, Reinsmoen, NL, Schwartz, DA. Innate immunity influences long-term outcomes after human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005;171:780–785.
- [123] Park, D, Xiang, AP, Mao, FF, Zhang, L, Di, C, Liu, X, Shao, Y, Ma, B, Lee, J, Ha, K, Walton, N, Lahn, BT. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells*, 2010; 28:2162-2171.
- [124] Pirenne, J, Pirenne-Noizat, F, de Groote, D, Vrindts, Y, Lopez, M, Gathy, R, Jacquet, N, Meurisse, M, Honore, P, Franchimont, P. Cytokines and organ transplantation. A review. *Nucl Med Biol*, 1994; 21:545-555.
- [125] Porstmann, T, Ternyck, T, Avrameas, S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods*, 1985; 82:169-179.
- [126] Povoleri, GAM, Scottà, C, Nova-Lamperti, EA, John, S, Lombardi, G, Afzali, B. Thymic versus induced regulatory T cells – who regulates the regulators? *Front Immunol*, 2013; 4:1-22.
- [127] Punt, JA, Osborne, BA, Takahama, Y, Sharrow, SO, Singer, A. Negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes by t cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J Exp Med*, 1994; 179:709-713.
- [128] Ramirez, AM, Shenb, Z, Ritzenthaler, JD, Roman, J. Myofibroblast transdifferentiation in obliterative bronchiolitis: TGF- β signaling through Smad3-dependent and -independent pathways. *Am J Transplant*, 2006; 6:2080-2088.
- [129] Reynolds, SD, Malkinson, AM. Clara cell: Progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010; 42:1–4.
- [130] Roche, Protocol “Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)”, Version 14.0; 2010.
- [131] Rock, FL, Hardiman, G, Timans, JC, Kastelein, RA, Bazan, JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci*, 1998; 95:588-593.
- [132] Rogers, NJ, Lechler, RI. Allorecognition. *Am J Transplant*, 2001; 1:97-102.
- [133] Rosengard, BR, Ojikutu, CA, Guzzetta, PC, Smith, CV, Sundt, TM, Nakajima, K, Boorstein, SM, Hill, GS, Fishbein, JM, Sachs, DH. Induction of specific tolerance to class I-disparate renal allografts in miniature swine with cyclosporine. *Transplantation*, 1992; 54:490-497.

[134] Roussey-Kesler, G, Giral, M, Moreau, A, Subra, JF, Legendre, C, Noel, C, Pillebout, E, Brouard, S, Souillou, JP. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant*, 2006; 6:736-746.

[135] Saboor, F. Nestin expressing progenitor cells in pulmonary vasculature. Dissertation, 2012.

[136] Saggar, R, Ross, DJ, Saggar, R, Zisman, DA, Gregson, A, Lynch, JP, Keane, MP, Weigt, SS, Ardehali, A, Kubak, B, Lai, C, Elashoff, D, Fishbein, MC, Wallace, WD, Belperio, JA. Pulmonary hypertension associated with lung transplantation obliterative bronchiolitis and vascular remodeling of the allograft. *Am J Transplant*, 2008;8:1921-1930.

[137] Sahlgren, CM, Mikhailov, A, Hellman, J, Chou, YH, Lendahl, U, Goldman, RD, Eriksson, JE. Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J Biol Chem*, 2001; 276:16456-16463.

[138] Sakaguchi, S, Fukuma, K, Kuribayashi, K, Masuda, T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance: deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med*, 1985; 161:72–87.

[139] Sakaguchi, S, Sakaguchi, N, Asano, M, Itoh, M, Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 1995; 155:1151-1164.

[140] Sato, M, Liu, M, Anraku, M, Ogura, T, D’Cruz, G, Alman, BA, Waddell, TK, Kim, E, Zhang, L, Keshavjee, S. Allograft fibrosis in the pulmonary milieu: a disorder of tissue remodeling. *Am J Transplant*, 2008; 8:517-528.

[141] Sato, M, Hirayama, S, Hwang, DM, Lara-Guerra, H, Wagnetz, D, Waddell, TK, Liu, M, Keshavjee, S. The role of intrapulmonary de novo lymphoid tissue in Obliterative Bronchiolitis after lung transplantation. *J Immunol*, 2009a; 182:7307-7316.

[142] Sato, M, Keshavjee, S, Liu, M. Translational research: animal models of Obliterative Bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Transplant*, 2009b; 9:1981-1987.

[143] Sato, M, Hirayama, S, Lara-Guerra, H, Anraku, M, Waddell, TK, Liu, M, Keshavjee, S. MMP-dependent migration of extrapulmonary myofibroblast progenitors contributing to posttransplant airway fibrosis in the lung. *Am J Transplant*, 2009c; 9:1027-1036.

[144] Schaub, M, Stadlbauer, THW, Chandraker, A, Vella, JP, Turka, LA, Sayegh, MH. Comparative strategies to induce long-term graft acceptance in fully allogeneic renal versus cardiac allograft models by CD28-B7 T cell costimulatory blockade: role of thymus and spleen. *J Am Soc Nephrol*, 1998; 9:891-898.

-
- [145] Schiebler, TH. Anatomie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 9. Auflage, 2005.
- [146] Schmid, MC, Varner, JA. Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *J Oncol*, 2010; ID 201026.
- [147] Schmidt, A, Sucke, J, Fuchs-Moll, G, Freitag, P, Hirschburger, M, Kaufmann, A, Garn, H, Padberg, W, Grau, V. Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ. *J Leukoc Biol*, 2007; 81:186-194.
- [148] Schwartz, RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*, 1990; 248:1349-1356.
- [149] Sharples, LD, McNeil, K, Stewart, S, Wallwork, J. Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J Heart Lung Transplant*, 2002; 21:271-281.
- [150] Shigeoka, AA, Holscher, TD, King, AJ, Hall, FW, Kiosses, WB, Tobias, PS, Mackman, N, McKay, DB. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and independent pathways. *J Immunol*, 2007; 178:6252-6258.
- [151] Shoji, T, Wain, JC, Houser, SL. Indirect recognition of MHC class I allopeptides accelerates lung allograft rejection in miniature swine. *Am J Transplant*, 2005; 5:1626-1634.
- [152] Silva, MA, Jury, J, Porras, M, Vergara, P, Perdue, MH. Intestinal epithelial barrier dysfunction and dendritic cell redistribution during early stages of inflammation in the rat: role for TLR-2 and -4 blockage. *Inflamm Bowel Dis*, 2008; 14:632-644.
- [153] Skwirba, M, Zakrzewicz, A, Atanasova, S, Wilker, S, Fuchs-Moll, G, Müller, D, Padberg, W, Grau, V. Ectopic expression of the progenitor cell marker nestin after renal transplantation in the rat. *APMIS*, 2014, in press.
- [154] Smith, CA, Williams, GT, Kingston, R, Jenkinson, EJ, Owen, JJT. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*, 1989; 337:181-184.
- [155] Steinman, RM, Witmer, MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75:5132-5136.
- [156] Stewart, S, Fishbein, MC, Snell, GI, Berry, GJ, Bohler, A, Burke, MM, Glanville, A, Gould, FK, Magro, C, Marboe, CC, McNeil, KD, Reed, EF, Reinsmoen, NL, Scott, JP, Studer, SM, Tazelaar, HD, Wallwork, JL, Westall, G, Zamora, MR, Zeevi, A, and Yousem, SA. Revision of the 1996 Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Lung Rejection. *J Heart Lung Transplant*, 2007; 26:1229-1242.

- [157] Storch, V und Welsch, U. Kükentahl, Zoologisches Praktikum. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, 24. Auflage, 2002.
- [158] Stratman, AN, Malotte, KM, Mahan, RD, Davis, MJ, Davis, GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*, 2009; 114:5091-5101.
- [159] Stucker, F, Ackermann, D. Immunsuppressiva – Wirkungen, Nebenwirkungen und Interaktionen. *Therapeutische Umschau*, 2011, 68:679-686.
- [160] Suri-Payer, E, Amar, AZ, Thornton, AM, Shevach, EM.. CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*, 1998; 160:1212–1218.
- [161] Takahashi, N, Itoh, MT, Ishizuka, B. Human chorionic gonadotropin induces nestin expression in endothelial cells of the ovary via vascular endothelial growth factor signaling. *Endocrinology*, 2008; 149:253-260.
- [162] Takahashi, T, Kuniyasu, Y, Toda, M, Sakaguchi, N, Itoh, M, Iwata, M, Shimizu, J, Sakaguchi, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*, 1998; 10:1969–1980.
- [163] Takasaki, Y, Deng, JS, Tan, EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med*, 1981; 154:1899-1909.
- [164] Tang, Q, Bluestone, JA. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master regulation. *Nat Immunol*, 2008; 9:239-244.
- [165] Teranishi, N, Naito, Z, Ishiwata, T, Tanaka, N, Furukawa, K, Seya, T, Shinji, S. Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *Int J Oncol*, 2007; 30:593–603.
- [166] Théry, C, Amigorena, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 2001; 13:45-51.
- [167] Thompson, CB, Lindsten, T, Ledbetter, JA, Kunkel, SL, Young, HA, Emerson, SG, Leiden, JM, June, CH. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86:1333-1337.
- [168] Thorley, AJ, Grandolfo, D, Lim, E, Goldstraw, P, Young, A, Tetley, TD. Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung – role of alveolar epithelial TLR expression and signaling. *PLoS One*, 2011; 7:e21827.
- [169] Thornley, TB, Brehm, MA, Markees, TG, Shultz, LD, Mordes, JP, Welsh, RM, Rossini, AA, Greiner, DL. TLR agonists abrogate costimulation blockade-induced prolongation of skin allografts. *J Immunol*, 2006; 176:1561-1570.
- [170] Thornley, TB, Philips, NE, Beaudette-Zlatanova, BC, Markees, TG, Bahl, K, Brehm, MA, Shultz, LD, Kurt-Jones, EA, Mordes, JP, Welsh, RM, Rossini, AA,

Greiner, DL. Type I IFN mediates cross-talk between innate and adaptive immunity that abrogates transplantation tolerance. *J Immunol*, 2007; 179:6620-6629.

[171] Thornton, AM, Shevach, EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 1998; 188:287–296.

[172] Toma, JG, Akhavan, M, Fernandes, KJ, Barnabe-Heider, F, Sadikot, A, Kaplan, DR, Miller, FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*, 2001; 3:778-784.

[173] Tsan, MF, Gao, B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*, 2004; 76:514-519.

[174] Tschopp, J. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 1990; 8:279-302.

[175] Turka, LA, Linsley, PS, Lin, H, Brady, W, Leiden, JM, Wei, RQ, Gibson, ML, Zheng, XG, Myrdal, S, Gordon, D, Bailey, T, Bolling, SF, Thompson, CB. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89:11102-11105.

[176] Uematsu, S, Akira, S. Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem*, 2007; 282:15319-15323.

[177] Ulich, TR, Watson, LR, Yin, S, Guo, K, Wang, P, Thang, H, del Castillo, J. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol*, 1991; 138:1485-1496.

[178] Vandesompele, J, De Preter, K, Pattyn, F, Poppe, B, van Roy, N, De Paepe, A, Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 2002; 3:0034.1-0034.11.

[179] Vaneker, M, Joosten, LA, Heunks, LMA, Snijdelaar, DG, Halbertsma, FJ, van Egmond, J, Netea, MG, van der Hoeven, JG, Scheffer, GJ. Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a Toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice. *Anesthesiology*, 2008; 109:465-472.

[180] van de Berg, PJEJ, Yong, SL, Koch, SD, Lardy, N, van Donselaar-van der Pant, KAMI, Florquin, S, Bemelman, FJ, van Lier, RAW, ten Berge, IJM. Characteristics of alloreactive T cells measured before renal transplantation. *Clin Exp Immunol*, 2011, 168:241-250.

[181] van Maurik, A, Herber, M, Wood, KJ, Jones, ND. Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8⁺ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *J Immunol*, 2002; 169:5401-5404.

- [182] Victorino, RMM, Hodgson, HJF. Studies on the suppression of a one-way mixed lymphocyte reaction by mitomycin-C treated responder cells. *Immunology*, 1980; 40:447-453.
- [183] Villar, J, Cabrera, NE, Casula, M, Flores, C, Valladares, F, Diaz-Flores, L, Muros, M, Slutsky, AS, Kacmarek, RM. Mechanical ventilation modulates TLR4 and IRAK-3 in a non-infectious, ventilator-induced lung injury model. *Respir Res*, 2010, 11:27.
- [184] von Süßkind-Schwendi, M, Ruemmele, P, Schmid, C, Hirt, SW, Lehle, K. Lung transplantation in the fischer 344–wistar kyoto strain combination is a relevant experimental model to study the development of bronchiolitis obliterans in the rat. *Exp Lung Res.*, 2012; 38:111-23
- [185] Walker, N, Badri, L, Wettlaufer, S, Flint, A, Sajjan, U, Krebsbach, PH, Keshamouni, VG, Peters-Golden, M, Lama, VN. Resident tissue-specific mesenchymal progenitor cells contribute to fibrogenesis in human lung allografts. *Am J Pathol*, 2011; 178:2461-2469.
- [186] Wang, S, Schmaderer, C, Kiss, E, Schmidt, C, Bonrouhi, M, Porubsky, S, Gretz, N, Schaefer, L, Kirschning, CJ, Popovic, ZV, Gröne, HJ. Recipient Toll-like receptors contribute to chronic graft dysfunction by both MyD88- and TRIF-dependent signaling. *Dis Model Mech*, 2010; 3:92-103.
- [187] Wang, T, Ahmed, EB, Chen, L, Xu, J, Tao, J, Wang, CR, Alegre, ML, Chong, AS. Infection with the intracellular bacterium, *Listeria monocytogenes*, overrides established tolerance in a mouse cardiac allograft model. *Am J Transplant*, 2010; 10:1524-1533.
- [188] Weibel, ER. What makes a good lung? The morphometric basis of lung function. *Swiss Med Wkly*, 2009; 139:375-386.
- [189] West, EE, Lavoie, TL, Orens, JB, Chen, ES, Ye, SQ, Finkelman, FD, Garcia, JGN, McDyer, JF. Pluripotent allospecific CD8⁺ effector T cells traffic to lung in murine obliterative airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006; 34:108-118.
- [190] Wiebe, K, Fraund, S, Steinmuller, C, Steinhoff, G. Rat cytomegalovirus and *Listeria monocytogenes* infection enhance chronic rejection after allogenic rat lung transplantation. *Transpl Int*, 2005; 18:1166-1174.
- [191] Wiese, C, Rolletschek, A, Kania, G, Blyszczuk, P, Tarasov, KV, Tarasova, Y, Wersto, RP, Boheler, KR, Wobus, AM. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci*, 2004; 61:2510-2522.
- [192] Wilson, DB. Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. *J Exp Med.*, 1967; 126:625-54.
- [193] Wolfs, TG, Buurman, WA, van Schadewijk, A, de Vries, B, Daemen, MA, Hiemstra, PS, van 't Veer, C. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN- γ and TNF- α mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*, 2002; 168:1286-1293.

-
- [194] Wyburn, KR, Jose, MD, Wu, H, Atkins, RC, Chadban, SJ. The role of macrophages in allograft rejection. *Transplantation*, 2005; 80:1641-1647.
- [195] Yaeger, ME, Frid, MG, Stenmark, KR. Progenitor cells in pulmonary vascular remodeling. *Pulm Circ*, 2011; 1:3-16.
- [196] Yamamoto, M, Sato, S, Mori, K, Hoshino, K, Takeuchi, O, Takeda, K, Akira, S. Cutting edge: A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002; 169:6668-6672.
- [197] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science*, 2003; 301:640-643.
- [198] Yamamoto, S, Nava, RG, Zhu, J, Huang, HJ, Ibrahim, M, Mohanakumar, T, Miller, MJ, Krupnick, AS, Kreisel, D, Gelman, AE. Cutting edge: *Pseudomonas aeruginosa* abolishes established lung transplant tolerance by stimulating B7 expression on neutrophils. *J Immunol*, 2012; 189:4221-4225.
- [199] Yousem, SA, Berry, GJ, Cagle, PT. Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*, 1996; 15:1-15.
- [200] Yu, L, Wang, L, Chen, S. Endogenous toll-like-receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med*, 2010; 14:2592-2603.
- [201] Zhang, K, Rekhter, MD, Gordon, D, Phan, SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol*, 1994; 145:114-125.
- [202] Zhu, J, Paul, WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 2008; 112:1557-1569.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Überleben nach Lungentransplantation (1994-2010).....	4
Abb. 2: Schema der in dieser Arbeit untersuchten Teile des Toll- <i>like</i> Rezeptor (TLR)-Systems mit den dazugehörigen Liganden.....	14
Abb. 3: Experimentelles Modell zur chronischen Abstoßung von allogenen (allo) Lungentransplantaten in der Ratte mit zehntägiger Immunsuppression und intratrachealer Instillation von LPS.....	33
Abb. 4: Histologische Färbungen mit Hämalaun & Eosin (H&E; A), Orcein (B) und Azan (C) auf Paraffinschnitten von Lungengewebe isogener Transplantatempfänger (iso R, iso L) sowie allogener Lungentransplantate (allo L) am d 28 nach linksseitiger Lungentransplantation.....	52
Abb. 5: Immunhistochemische Färbung in braun mit monoklonalen Antikörpern gegen Glattmuskelaktin (α SMA) auf Paraffinschnitten von Lungengewebe isogener Transplantatempfänger (iso R (A); iso L (B)) und allogener Lungentransplantate (allo L (C)) am d 28 nach linksseitiger Lungentransplantation.....	53
Abb. 6: Immunhistochemische Färbung in braun mit monoklonalen Antikörpern gegen ein CD68-artiges Antigen (ED1; A-C) und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD163 (ED2; D-F) auf Gefrierschnitten von Lungen isogener Transplantatempfänger (iso R, iso L) und allogenen Lungentransplantaten (allo L) am d 28 nach linksseitiger Lungentransplantation.....	54
Abb. 7: Die PCR-Produkte aller verwendeten <i>primer</i> -Paare (Tab. 7), aus einer qRT-PCR mit cDNA von linken Lungen unbehandelter LEW-Ratten.....	55
Abb. 8: Darstellung der mRNA-Expression verschiedener Gene des TLR-Systems in Lungen unbehandelter LEW-Ratten (LEW R, LEW L) und in rechten und linken Lungen isogener (iso R, iso L) und allogener (allo R, allo L) Transplantatempfänger am d 28.....	57-61
Abb. 9: Darstellung aller <i>cycle threshold</i> (Ct)-Werte des <i>housekeeping</i> -Gens (PBGD) in der qRT-PCR in rechten und linken Lungen unbehandelter LEW-Ratten (LEW R, LEW L), isogener (iso R, iso L) und allogener (allo R, allo L) Transplantatempfänger.....	61

- Abb. 10:** Immunhistochemische Färbungen in braun mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 auf Paraffinschnitten von Lungentransplantaten von Ratten (DA → LEW), Wildtyp- (WT) und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen.....63
- Abb. 11:** Immunhistochemische Färbung (A, B) in braun mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 auf Paraffinschnitten von Lungengewebe von Wildtyp- (WT) und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen (TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}).....64
- Abb. 12:** Proteindetektion im *western blot* (WB) mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR2 in Lungenhomogenaten von isogenen und allogenen Lungentransplantaten (iso L, allo L) am d 28 nach der Transplantation und in THP-1-Zellen (Positivkontrolle), sowie in Nierengewebe von Wildtyp- (WT) und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen (KO) sowie Lungenhomogenat von unbehandelten LEW-Ratten.....64
- Abb. 13:** Immunhistochemische Färbung in braun mit monoklonalen Antikörpern gegen TLR4 auf Paraffinschnitten transplantiertter Lungen von Ratten (DA → LEW) und auf Lungengewebeschnitten von Wildtyp- (WT) und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-Mäusen.....66
- Abb. 14:** Proteindetektion im *western blot* (WB) mit Antikörpern gegen TLR4 in Lungenhomogenaten von allogenen Lungentransplantaten am d 28 nach der Transplantation (allo L d 28), von unbehandelten LEW-Ratten und von THP-1-Zellen (Positivkontrolle).....67
- Abb. 15:** Immunhistochemische Färbung in braun (A-C) auf Paraffinschnitten und Proteindetektion im *western blot* (WB, D) mit monoklonalen Antikörpern gegen Nestin, sowie die mRNA-Expression (E) von Nestin in Lungen unbehandelter LEW-Ratten, sowie isogenen und allogenen Lungentransplantaten (iso L, allo L) am d 28 nach Transplantation.....69
- Abb. 16:** Immunhistochemische Doppelfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen PCNA (braun) und α/β T-Zellrezeptor (R73, blau) auf Gefrierschnitten von nativen Milzen unbehandelter LEW-Ratten und allogenen Transplantatempfängern am d 28 (allo d 28).....70
- Abb. 17:** Prozentualer Anteil PCNA-exprimierender T-Zellen in Milzen von isogenen (iso) und allogenen (allo) Lungentransplantatempfängern, zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach LPS-Behandlung, sowie unbehandelten LEW-Ratten.....71
- Abb. 18:** Exemplarische Darstellung immunhistochemischer Doppelfärbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen den α/β T-Zellrezeptor (R73, braun) und gegen

PCNA (blau) auf Paraffinschnitten von allogenen Lungentransplantaten am d 28 nach der Transplantation.....	72
Abb. 19: Prozentualer Anteil PCNA-exprimierender T-Zellen in allogenen Lungentransplantaten, zu verschiedenen Zeitpunkten vor (d 28) und nach LPS-Behandlung (d 29, d 33, d 40), sowie in PBS-behandelten Transplantatempfängern am d 33.....	73
Abb. 20: Darstellung des relativen, spezifischen BrdU-Einbaus in mononukleäre Blutleukozyten von PBS- bzw. LPS-behandelten allogenen Transplantatempfängern nach Stimulation (mit F344-Leukozyten) bzw. von unbehandelten LEW-Ratten nach Stimulation (mit F344- oder DA-Leukozyten).....	74

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gründe für den Tod nach einer Lungentransplantation im Verlauf von zehn Jahren.....	5
Tab. 2: Klassifizierung des <i>Bronchiolitis obliterans Syndrom</i> (BOS).....	6
Tab. 3: Klassifizierung der pulmonalen allogenen Transplantatabstoßung.....	8
Tab. 4: TLR mit ihren entsprechenden endogenen Liganden.....	13
Tab. 5: Verwendete Primärantikörper in immunhistochemischen Färbungen (IHC) und <i>western blots</i> (WB).....	40
Tab. 6: Verwendete Nachweisreagenzien in immunhistochemischen Färbungen (IHC) und <i>western blots</i> (WB).....	41
Tab. 7: Sequenzen der verwendeten <i>primer</i> in der qRT-PCR.....	46
Tab. 8: Pipettierschema der <i>mixed lymphocyte reaction</i> (MLR).....	49

Tabellen im Anhang:

Tab. 9: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von LEW-Ratten.....	121
Tab. 10: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von isogenen Lungentransplantatempfängern am d 28.....	121
Tab. 11: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von allogenen Lungentransplantatempfängern am d 28.....	122
Tab. 12: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von isogenen LPS-behandelten Lungentransplantatempfängern am d 29.....	123

Tab. 13: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von allogenen LPS-behandelten Lungentransplantatempfängern am d 29.....	124
Tab. 14: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von isogenen LPS-behandelten Lungentransplantatempfängern am d 33.....	125
Tab. 15: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von allogenen LPS-behandelten Lungentransplantatempfängern am d 33.....	126
Tab. 16: R73- und PCNA-positive Zellen im Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 28.....	127
Tab. 17: R73- und PCNA-positive Zellen im Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 29 nach LPS-Behandlung.....	128
Tab. 18: R73- und PCNA-positive Zellen im Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 33 nach LPS-Behandlung.....	129
Tab. 19: R73- und PCNA-positive Zellen im Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 40 nach LPS-Behandlung.....	130
Tab. 20: R73- und PCNA-positive Zellen im Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 33 nach PBS-Behandlung.....	131-132
Tab. 21: Gemessene Extinktionswerte (Spalte 2-5) und berechnete, relative Einheiten (Spalte 6) für die Proliferationsrate in der <i>mixed lymphocyte reaction</i> (MLR) für Zellen von mit LPS-behandelten Transplantatempfängern am d 33 nach der Transplantation und Stimulation mit F344-Zellen.....	133-134
Tab. 22: Gemessene Extinktionswerte (Spalte 2-5) und berechnete, relative Einheiten (Spalte 6) für die Proliferationsrate in der <i>mixed lymphocyte reaction</i> (MLR) für Zellen von mit PBS-behandelten Transplantatempfängern am d 33 nach der Transplantation und Stimulation mit F344-Zellen.....	135
Tab. 23: Gemessene Extinktionswerte (Spalte 2-5) und berechnete, relative Einheiten (Spalte 6) für die Proliferationsrate in der <i>mixed lymphocyte reaction</i> (MLR) für Zellen von untransplantierten LEW-Ratten nach Stimulation mit DA-Zellen.....	136
Tab. 24: Gemessene Extinktionswerte (Spalte 2-5) und berechnete, relative Einheiten (Spalte 6) für die Proliferationsrate in der <i>mixed lymphocyte reaction</i> (MLR) für Zellen von untransplantierten LEW-Ratten nach Stimulation mit F344-Zellen...	137

9. Anhang

Tab. 9: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von LEW-Ratten

Tier (Nr.)	1832		1834		1836		1838	
Zellzahl	E	D	E	D	E	D	E	D
	400	14	800	43	200	16	600	22
	300	26	400	23	300	14	900	34
	800	25	800	41	200	20	200	20
	700	18	250	19	100	11	600	27
	900	36	700	34	200	9	850	34
	300	17	700	26	600	22	800	32
	850	35	250	13	600	25	900	44
	800	22	800	53	700	27	450	40
	250	16	500	35	450	26	400	21
	600	24	600	42	850	32	450	36
Summe	5900	233	5800	329	4200	202	6150	310
%	3,95		5,67		4,81		5,04	

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppelpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LEW = Lewis

Tab. 10: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von isogenen Lungentransplantatempfängern am d 28

Tier (Nr.)	96		97		98		99		100		101	
Zellzahl	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D
	100	19	450	43	700	46	600	32	200	39	600	23
	100	18	500	56	300	42	600	27	800	66	800	29
	300	27	500	58	600	49	200	11	850	44	600	26
	700	57	200	41	300	37	300	21	300	43	100	11
	800	61	300	54	300	35	250	27	200	28	500	26
	200	35	100	18	250	22	500	28	300	26	900	56
	300	45	600	63	200	21	200	14	600	38	250	27
	250	53	50	9	150	16	250	18	600	39	800	53
	800	77	100	19	100	14	800	56	700	49	100	21
	700	37	200	43	800	73	700	58	450	37	900	61
	450	29	700	51			700	47	450	41	700	39
	700	26	800	93			450	43	800	63	300	45
			200	22			400	17	300	41	200	26
			600	59			250	23	450	37	850	81
			200	31			200	21	50	16	800	68
			450	43			200	24	850	59	700	42
			100	29			200	20	300	22	200	26
			400	42			850	39	300	27	250	23
			50	13			500	34	300	33	450	37
							800	66	800	59	600	46
Summe	5400	484	6500	787	3700	355	8950	626	9600	807	10600	766
%	8,96		12,11		9,59		6,99		8,41		7,23	

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppelpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*

Tab. 11: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von allogenen Lungentransplantatempfängern am d 28

Tier (Nr.)	106		107		108		109		110	
Zellzahl	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D
	250	27	200	13	850	48	400	31	900	45
	250	24	400	22	400	36	450	44	450	42
	300	26	800	26	700	53	300	28	200	34
	100	17	100	13	600	33	200	19	700	58
	400	38	400	13	700	42	200	18	100	35
	300	34	200	10	400	31	600	46	400	44
	200	38	200	13	450	38	700	51	500	38
	250	31	450	39	300	33	850	63	250	33
	100	19	300	21	700	41	500	52	450	28
	150	18	600	42	850	60	900	63	800	46
	500	23			400	34	100	17	600	35
	200	22			700	48	400	26	250	29
	300	30			400	31	250	29	200	32
	200	24			800	38	300	25	800	47
	150	14			400	22	500	62	850	59
	200	27			400	44	500	68	300	36
	700	58			50	19	600	47	800	56
	250	37			100	31	300	21	450	35
	800	55			700	32	450	48	900	62
	100	18			400	23	800	63	700	42
Summe	5700	580	3650	212	10300	737	9300	821	10600	836
%	10,18		5,81		7,16		8,83		7,89	

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppelpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*

Tab. 12: R73-positive und PCNA-positive Zellen in Milzen von isogenen LPS-behandelten Lungentransplantatempfängern am d 29

Tier (Nr.)	152		153		154		155	
Zellzahl	E	D	E	D	E	D	E	D
	150	17	100	12	150	16	250	9
	400	23	400	28	300	29	800	45
	200	12	100	12	300	23	400	36
	450	25	300	23	700	25	450	35
	50	9	150	18	400	21	850	56
	400	21	200	19	150	12	200	14
	400	20	300	27	150	15	200	21
	100	6	400	25	200	17	100	22
	100	9	800	45	700	29	200	26
	900	55	800	44	850	59	500	28
	400	23	100	12	200	12	500	48
	100	13	500	24	150	16	100	18
	900	52	400	29	100	9	100	13
	600	23	250	26	700	41	300	21
	400	27	300	13	400	32	400	28
	400	35	800	46	500	38	200	21
	400	16	50	10	850	49	300	38
	400	23	700	18	250	21	700	36
	750	25	700	52	600	41	850	53
	200	14	400	34	500	43	800	33
Summe	7700	448	7750	517	8150	548	8200	601
%	5,82		6,67		6,72		7,33	

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppelpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LPS = Lipopolysaccharid

Tab. 13: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von allogenen LPS-behandelten Lungentransplantatempfängern am d 29

Tier (Nr.)	177		201		202		213	
Zellzahl	E	D	E	D	E	D	E	D
	700	30	600	19	450	18	800	39
	100	14	500	21	100	8	250	23
	450	31	200	17	400	21	700	32
	250	28	450	26	250	22	150	11
	200	21	300	19	50	7	600	28
	100	13	600	28	100	15	400	30
	150	19	400	23	600	32	450	46
	600	52	500	43	50	5	300	26
	800	58	200	16	800	39	400	33
	400	42	100	17	700	37	700	43
	250	30	300	24	400	29	800	41
	750	53	450	35	150	11	500	26
	600	34	100	9	200	15	300	27
	500	41	200	14	300	26	300	30
	850	49	300	23	700	34	850	37
	300	27	300	22	250	19	300	19
	200	19	100	11	300	22	500	33
	100	14	450	28	400	23	800	34
	250	27	600	31	100	8	600	41
	800	26	500	22	800	34	300	19
Summe	8350	628	7150	448	7100	425	10000	618
%	7,52		6,27		5,99		6,18	

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppeltpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LPS = Lipopolysaccharid

Tab. 14: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von isogenen LPS-behandelten Lungentransplantatempfängern am d 33

Tier (Nr.)	147		149		150		151	
Zellzahl	E	D	E	D	E	D	E	D
	300	29	700	23	250	22	800	59
	50	4	100	9	600	40	700	41
	100	13	300	21	400	33	300	17
	150	17	800	34	500	42	250	19
	500	28	400	23	800	41	100	12
	700	46	700	38	600	40	800	31
	400	23	400	16	300	37	900	45
	200	19	600	28	400	29	600	43
	700	21	400	23	400	26	700	47
	300	24	450	29	800	37	700	29
	300	19	800	31	500	41	600	38
	100	15	100	14	500	23	450	34
	300	18	600	31	200	30	700	34
	300	18	850	37	800	41	150	17
	700	35	400	17	600	31	800	35
	150	12	500	37	400	28	800	51
	900	37	700	22	800	47	700	36
	400	21	100	15	50	13	450	18
	300	14	850	43	700	19	400	28
	700	32	700	28	700	44	800	55
Summe	7550	445	10450	519	10300	664	11700	689
%	5,89		4,97		6,45		5,89	

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppeltpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LPS = Lipopolysaccharid

Tab. 15: R73- und PCNA-positive Zellen in Milzen von allogenen LPS-behandelten Lungentransplantatempfängern am d 33

Tier (Nr.)	220		221		222		223	
Zellzahl	E	D	E	D	E	D	E	D
	200	18	250	18	800	61	400	26
	150	18	300	25	150	17	200	6
	300	29	100	13	200	19	200	13
	400	34	150	26	700	53	300	24
	300	17	300	25	600	35	100	13
	600	24	600	31	800	56	800	44
	800	48	400	29	900	69	100	14
	500	26	800	31	100	11	500	39
	200	23	150	12	600	38	450	31
	850	57	150	16	600	33	700	38
	800	66	250	14	300	22	100	19
	100	16	200	11	300	19	450	34
	200	20	500	23	400	28	600	60
	500	31	300	18	900	61	100	26
	150	21	700	34	450	35	100	24
	300	28	800	38	250	12	250	26
	800	86	500	32	700	39	300	37
	700	49	300	17	200	16	800	48
	850	74	400	21	850	52	400	27
	800	62	600	41	600	33		
Summe	9500	747	7750	475	10400	709	6850	549
%	7,86		6,13		6,82		8,01	

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppelpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LPS = Lipopolysaccharid

Tab. 16: R73- und PCNA-positive Zellen im Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 28

Tier (Nummer)	Hauptbronchus		Alveolarraum		kleine Gefäße ($\leq 100\mu\text{m}$)	
	E (Anzahl)	D (Anzahl)	E (Anzahl)	D (Anzahl)	E (Anzahl)	D (Anzahl)
188	27	2	1	0	0	0
	32	5	2	0	4	1
	44	5	2	0	20	3
	33	2	0	0	6	0
	35	3	2	0	2	0
	8	0	2	0	0	0
	35	0	2	1	7	1
	37	3	0	0	3	0
	41	8	7	1	1	0
38	2	0	1	2	0	
Summe	330	30	18	3	45	5
189	23	4	4	1	4	0
	22	2	1	2	25	2
	17	1	3	0	8	0
	55	2	9	0	4	0
	21	2	27	3	39	8
	22	4	2	0	13	3
	7	0	8	3	4	1
	11	3	2	0	4	1
	19	4	2	2	7	4
25	4	2	1	5	2	
Summe	222	26	60	12	113	21
191	35	6	7	1	33	5
	26	1	4	1	5	3
	10	0	13	3	19	4
	29	4	1	0	19	5
	8	0	4	3	26	4
	20	3	3	1	3	0
	20	0	3	2	22	4
	5	1	9	2	14	4
	32	1	3	0	3	0
37	4	1	1	26	2	
Summe	222	20	48	14	170	31
203	6	0	1	1	36	3
	24	4	5	3	8	1
	13	1	3	1	7	3
	4	1	0	0	23	1
	19	5	1	0	2	0
	43	4	8	0	5	0
	13	0	6	1	8	2
	18	1	6	1	18	3
	6	1	8	0	12	3
30	3	9	2	30	6	
Summe	176	20	47	9	149	22

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppelpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*

Tab. 17: R73- und PCNA-positive Zellen im Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 29 nach LPS-Behandlung

Tier (Nummer)	Hauptbronchus		Alveolarraum		kleine Gefäße ($\leq 100\mu\text{m}$)	
	E (Anzahl)	D (Anzahl)	E (Anzahl)	D (Anzahl)	E (Anzahl)	D (Anzahl)
127	27	0	5	0	50	8
	33	1	9	2	23	7
	21	2	18	5	31	1
	19	0	6	1	32	6
	18	4	12	2	23	2
	37	0	11	0	3	3
	16	0	6	0	16	3
	29	2	7	1	12	2
	20	0	7	1	6	2
	8	0	12	3	26	6
Summe	228	9	93	15	222	40
128	nicht auswertbar					
Summe						
174	11	2	3	1	17	3
	13	0	2	0	2	0
	9	0	3	0	16	2
	3	0	5	0	6	0
	10	0	3	1	5	2
	15	1	6	1	7	4
	1	0	2	0	6	0
	5	0	11	3	3	0
	15	3	3	1	19	5
	3	0	5	0	6	1
Summe	85	6	43	7	87	17
176	16	0	12	1	16	1
	18	3	9	2	10	1
	12	1	3	1	2	0
	48	5	6	3	5	1
	29	2	12	1	5	0
	5	1	6	0	7	0
	3	1	8	1	6	1
	15	1	5	2	0	0
	37	4	6	0	7	0
	4	3	11	3	3	0
Summe	187	21	78	14	61	4

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppeltpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LPS = Lipopolysaccharid

Tab. 18: R73- und PCNA-positive Zellen im Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 33 nach LPS-Behandlung

Tier (Nummer)	Hauptbronchus		Alveolarraum		kleine Gefäße ($\leq 100\mu\text{m}$)	
	E (Anzahl)	D (Anzahl)	E (Anzahl)	D (Anzahl)	E (Anzahl)	D (Anzahl)
123	38	5	4	0	6	2
	17	2	8	0	16	10
	37	9	1	0	24	3
	9	2	5	1	27	6
	14	1	8	1	17	0
	45	5	3	0	6	1
	29	2	7	1	12	6
	38	3	1	0	21	5
	24	4	5	0	14	3
21	1	11	2	21	4	
Summe	272	34	53	5	164	40
216	8	2	0	0	9	0
	7	1	9	1	0	0
	9	1	4	1	4	1
	4	1	0	0	3	0
	3	0	0	0	5	0
	6	2	6	0	0	0
	9	0	2	2	2	1
	24	1	0	1	21	3
	3	0	1	0	17	2
6	2	6	1	1	2	
Summe	79	10	28	6	62	9
224	10	0	18	1	17	4
	17	0	12	0	34	5
	25	2	5	0	14	0
	26	2	5	1	24	0
	12	0	8	1	14	5
	13	2	11	2	39	0
	14	2	25	3	7	0
	23	3	7	0	6	5
	3	1	21	4	21	4
22	4	8	0	41	8	
Summe	165	16	120	12	217	31
273	25	1	39	5	10	1
	37	1	11	2	17	5
	19	1	34	1	8	2
	28	0	33	3	3	1
	42	0	14	3	6	2
	24	3	21	4	24	8
	28	2	7	2	23	7
	25	0	14	1	6	3
	23	3	16	3	25	4
56	12	15	4	24	7	
Summe	307	23	204	28	146	40

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppeltpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LPS = Lipopolysaccharid

Tab. 19: R73- und PCNA-positive Zellen im Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 40 nach LPS-Behandlung

Tier (Nummer)	Hauptbronchus		Alveolarraum		kleine Gefäße ($\leq 100\mu\text{m}$)	
	E (Anzahl)	D (Anzahl)	E (Anzahl)	D (Anzahl)	E (Anzahl)	D (Anzahl)
9	nicht auswertbar		4	0	0	1
			0	1	5	3
			6	0	0	0
			5	0	0	0
			13	1	4	1
	9	0	9	0	6	2
	45	3	3	1	7	0
	24	3	4	0	11	1
6	1	8	0	6	1	
20	1	9	1	0	0	
Summe	104	8	61	4	39	9
125	19	0	12	0	15	0
	29	2	10	0	20	0
	25	0	31	0	35	1
	36	0	17	2	14	1
	15	1	12	0	21	0
	10	0	7	0	33	4
	32	2	11	0	33	0
	9	1	5	1	8	3
	19	2	22	0	45	3
	9	0	21	2	18	0
Summe	203	8	148	5	242	12
205	9	1	13	1	23	1
	10	1	7	0	26	3
	36	1	11	1	10	0
	17	1	7	1	8	0
	30	1	8	3	23	0
	27	1	10	1	14	2
	22	2	12	4	1	0
	14	0	15	1	7	0
	38	2	0	0	15	0
	3	1	2	0	24	1
Summe	206	11	85	12	151	7
214	6	1	19	1	5	1
	10	2	19	2	4	0
	8	1	12	0	5	0
	29	0	4	0	16	2
	27	1	5	0	3	0
		nur ein Schnitt auswertbar				
Summe	80	5	59	3	33	3

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppelpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, LPS = Lipopolysaccharid

Tab. 20: R73- und PCNA-positive Zellen im Lungengewebe von allogenen Transplantatempfängern am d 33 nach PBS-Behandlung

Tier (Nummer)	Hauptbronchus		Alveolarraum		kleine Gefäße ($\leq 100\mu\text{m}$)	
	E (Anzahl)	D (Anzahl)	E (Anzahl)	D (Anzahl)	E (Anzahl)	D (Anzahl)
237	9	2	6	0	55	8
	19	1	6	1	28	3
	30	0	0	0	31	2
	31	1	5	0	4	0
	24	1	5	0	23	3
	24	0	3	0	11	2
	36	3	5	0	46	4
	13	0	3	0	22	8
	23	1	5	0	9	0
	16	1	5	0	7	0
Summe	225	10	43	1	236	30
239	28	1	3	0	26	2
	13	1	1	1	25	4
	17	2	6	0	8	0
	11	2	10	1	23	5
	29	2	0	0	6	0
	29	3	2	0	23	4
	20	5	3	0	39	4
	40	3	2	0	3	0
	19	1	3	0	6	0
	16	0	4	0	27	3
Summe	222	20	34	2	186	22
257	21	2	0	0	5	0
	7	3	1	0	11	3
	5	0	3	0	21	3
	29	4	1	0	5	0
	21	3	1	0	2	0
	20	3	3	0	16	1
	17	6	2	0	7	2
	38	5	1	0	8	0
	27	1	2	0	14	0
	15	2	4	0	31	2
Summe	200	29	18	0	120	11
274	4	1	3	1	4	1
	22	3	3	0	0	0
	6	0	4	1	1	0
	21	1	2	0	10	1
	5	0	4	2	3	0
	6	1	5	0	3	1
	13	1	3	0	2	0
	6	1	2	0	9	2
	20	5	2	0	4	0
	23	3	2	0	0	0
Summe	126	16	30	4	36	5
275	6	2	7	2	5	0
	9	4	5	0	9	2
	27	1	9	3	2	0
	19	2	8	0	7	0
	12	1	5	0	0	0
	19	2	4	0	23	3
	16	3	7	2	3	1
	11	1	6	0	19	1
	14	5	5	0	10	0
	8	3	5	0	1	1
Summe	141	24	61	7	79	8

281	20	3	0	0	11	4
	3	1	3	0	5	0
	6	1	5	1	0	0
	28	5	1	0	0	0
	5	0	4	1	0	0
	12	3	2	0	7	1
	3	0	0	0	15	3
	5	0	2	0	5	2
	17	4	3	0	1	1
	2	0	3	0	0	0
	Summe	101	17	23	2	44

E = einzelpositive Zellen (R73), D = doppelpositive Zellen (R73 und PCNA), PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung

Tab. 21: Gemessene Extinktionswerte (Spalte 2-5) und berechnete, relative Einheiten (Spalte 6) für die Proliferationsrate in der *mixed lymphocyte reaction* (MLR) für Zellen von mit LPS-behandelten Transplantatempfängern am d 33 nach der Transplantation und Stimulation mit F344-Zellen.

Tier	Resp.	Exp.	Pos. 1	Stim.	Exp.-Stim.-Resp./Pos. 1-Resp.
1 LPS	0,45	1,64	2,46	0,02	
	0,46	1,71	3,13	0,05	
	0,56	1,10	3,10	0,04	
	0,47	1,20	3,05	0,05	
	0,21	1,73	3,48	0,03	
	0,25	0,43	3,16	0,02	
	0,45	1,78	3,68	0,05	
	0,44	1,16	3,44	0,04	
				0,01	
				0,002	
				0,04	
				0,03	
				0,02	
				0,03	
Mittelwert	0,41	1,34	3,19	0,03	0,33
2 LPS	0,27	0,37	1,43	wie Tier 1	
	0,27	0,44	2,35		
	0,22	0,42	2,35		
	0,44	0,34	2,24		
	0,27	0,40	2,55		
	0,53	0,26	1,67		
	0,12	0,30	2,10		
0,32	0,30	2,32			
Mittelwert	0,30	0,35	2,13	0,03	0,01
3 LPS	0,53	1,01	1,92	-0,004	
	0,54	0,27	3,75	0,02	
	0,29	0,84	3,68	0,04	
	0,43	0,14	3,15	-0,05	
	0,41	0,30	2,09	-0,002	
	0,10	0,36	2,73	0,003	
	0,22	0,29	2,62	0,01	
	0,21	0,17	3,08	0,01	
				0,05	
				-0,01	
				0,01	
				0,003	
				0,02	
			0,03		
			0,03		
			0,04		
Mittelwert	0,34	0,42	2,88	0,01	0,03

4 LPS	0,25	0,29	2,70	wie	
	0,50	0,43	3,41	Tier	
	0,49	0,60	3,25	3	
	0,24	0,48	3,01		
	0,26	0,33	1,45		
	0,25	1,01	2,68		
	1,00	0,26	2,58		
	0,68	0,98	2,82		
	Mittelwert	0,46	0,55	2,74	
5 LPS	0,36	0,40	2,97	wie	
	0,36	0,43	3,62	Tier	
	0,59	0,65	3,27	3	
	0,63	0,26	3,62		
	0,64	0,89	3,06		
	0,46	0,17	3,41		
	0,72	0,30	2,25		
	0,33	0,31	1,88		
Mittelwert	0,51	0,43	3,01	0,01	-0,04

Resp. = Responderzellen, Exp. = Experimenteller Ansatz, Pos. 1 = Positivkontrolle, Stim. = Stimulator,
LPS = Lipopolysaccharid, F344 = Fischer-344

Tab. 22: Gemessene Extinktionswerte (Spalte 2-5) und berechnete, relative Einheiten (Spalte 6) für die Proliferationsrate in der *mixed lymphocyte reaction* (MLR) für Zellen von mit PBS-behandelten Transplantatempfängern am d 33 nach der Transplantation und Stimulation mit F344-Zellen.

Tier	Resp.	Exp.	Pos. 1	Stim.	Exp.-Stim.-Resp./Pos.1-Resp.
6 PBS	0,27	0,42	2,28	wie	
	0,22	0,39	2,57	Tier	
	0,20	0,38	2,34	1	
	0,16	0,50	2,28	Tab. 9	
	0,10	0,16	2,19		
	0,13	0,15	2,21		
	0,04	0,18	2,39		
	0,16	0,16	1,91		
Mittelwert	0,16	0,29	2,27	0,03	0,05
7 PBS	0,47	1,23	3,41	wie	
	0,63	0,81	3,20	Tier	
	0,54	0,99	2,96	1	
	0,41	1,46	2,70	Tab. 9	
	0,60	0,57	2,40		
	0,79	0,37	2,43		
	0,94	0,98	2,46		
	0,34	0,46	2,45		
Mittelwert	0,59	0,86	2,75	0,03	0,11
8 PBS	0,34	0,25	2,89	wie	
	0,41	0,62	1,95	Tier	
	0,28	0,28	2,61	3	
	0,34	0,18	2,28	Tab. 9	
	0,57	0,25	2,82		
	0,15	0,32	2,79		
	0,11	0,17	1,87		
	0,23	0,14	2,78		
Mittelwert	0,30	0,28	2,50	0,01	-0,02
9 PBS	0,15	0,41	2,72	wie	
	0,18	0,16	2,48	Tier	
	0,70	0,12	2,24	3	
	0,24	0,12	0,53	Tab. 9	
	0,15	0,16	2,58		
	0,09	0,14	1,33		
	0,12	0,13	2,11		
	0,20	0,18	2,20		
Mittelwert	0,23	0,18	2,02	0,01	-0,04

Resp. = Responderzellen, Exp. = Experimenteller Ansatz, Pos. 1 = Positivkontrolle, Stim. = Stimulator, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, F344 = Fischer-344

Tab. 23: Gemessene Extinktionswerte (Spalte 2-5) und berechnete, relative Einheiten (Spalte 6) für die Proliferationsrate in der *mixed lymphocyte reaction* (MLR) für Zellen untransplanterter LEW-Ratten nach Stimulation mit DA-Zellen.

Tier	Resp.	Exp.	Pos. 1	Stim.	Exp.-Stim.-Resp./Pos.1-Resp.
10 mit DA	0,20	0,55	1,62	0,05	
	0,21	1,30	1,78	0,05	
	0,18	0,93	1,90	0,04	
	0,15	1,05	2,10	0,05	
	0,14	1,09	2,15		
	0,17	1,14	1,32		
Mittelwert	0,18	1,01	1,81	0,05	0,48
11 mit DA	0,75	0,73	1,01	wie	
	0,20	0,62	1,43	Tier	
	0,17	1,06	1,27	10	
	0,13	0,82	1,20		
	0,21	0,99	0,92		
	0,04	0,30	1,45		
Mittelwert	0,25	0,75	1,21	0,05	0,48
12 mit DA	0,35	1,97	1,54	0,04	
	0,15	2,01	2,77	0,03	
	0,43	1,13	2,86	0,05	
	0,28	1,53	2,73	0,04	
	0,44	1,64	2,85		
	0,54	1,70	2,60		
Mittelwert	0,36	1,66	2,56	0,04	0,58
13 mit DA	0,14	0,50	2,55	wie	
	0,27	0,84	1,80	Tier	
	0,16	0,87	2,23	12	
	0,16	0,99	1,76		
	0,20	0,80	1,89		
	0,13	0,84	2,00		
Mittelwert	0,18	0,81	2,04	0,04	0,32

Resp. = Responderzellen, Exp. = Experimenteller Ansatz, Pos. 1 = Positivkontrolle, Stim. = Stimulator, LEW = Lewis, DA = Dark Agouti

Tab. 24: Gemessene Extinktionswerte (Spalte 2-5) und berechnete, relative Einheiten (Spalte 6) für die Proliferationsrate in der *mixed lymphocyte reaction* (MLR) für Zellen untransplanterter LEW-Ratten nach Stimulation mit F344-Zellen.

Tier	Resp.	Exp.	Pos. 1	Stim.	Exp.-Stim.-Resp./Pos.1-Resp.
14 mit F344	0,20	0,62	1,62	wie	
	0,21	0,30	1,78	Tier	
	0,18	0,23	1,90	10	
	0,15	0,23	2,10	Tab. 11	
	0,14	0,25	2,15		
	0,17	0,37	1,32		
Mittelwert	0,18	0,33	1,81	0,05	0,07
15 mit F344	0,75	0,39	1,01	wie	
	0,20	0,18	1,43	Tier	
	0,17	0,07	1,27	10	
	0,13	0,06	1,20	Tab. 11	
	0,21	0,09	0,92		
	0,04	0,06	1,45		
Mittelwert	0,25	0,14	1,21	0,05	-0,16
16 mit F344	0,35	1,07	1,54	wie	
	0,15	0,32	2,77	Tier	
	0,43	0,28	2,86	12	
	0,28	0,27	2,73	Tab. 11	
	0,44	0,45	2,85		
	0,54	0,40	2,60		
Mittelwert	0,36	0,47	2,56	0,04	0,03
17 mit F344	0,14	0,15	2,55	wie	
	0,27	0,13	1,80	Tier	
	0,16	0,13	2,23	12	
	0,16	0,32	1,76	Tab. 11	
	0,20	0,10	1,89		
	0,13	0,13	2,00		
Mittelwert	0,18	0,16	2,04	0,04	-0,03

Resp. = Responderzellen, Exp. = Experimenteller Ansatz, Pos. 1 = Positivkontrolle, Stim. = Stimulator, LEW = Lewis, F344 = Fischer 344

10. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

10.1 Veröffentlichungen

Atanasova, S, Hirschburger, M, Jonigk, D, Obert, M, Petri, K, **Evers, A**, Hecker, A, Schmitz, J, Kaufmann, A, Wilhelm, J, Chakraborty, T, Padberg, W, Grau, V. **Chronic lung allograft damage in the rat - a relevant model for human bronchiolitis obliterans syndrome (BOS)**. *J Heart Lung Transplant*, 2013; 32(11):1131-1139.

Evers, A, Atanasova, S, Fuchs-Moll, G, Petri, K, Zakrzewicz, A, Hirschburger, M, Padberg, W, Grau, V. **Adaptive and innate immune responses in experimental Bronchiolitis obliterans syndrome**. Eingereicht Dezember 2013.

10.2 Kongressbeiträge

2010

ECCPS Retreat, Bad Nauheim 28.-29.5.2010

T cells – Subsets and Functions, Marburg 30.6.-1.7.2010

A new model for chronic rejection of rat lung allografts. GGL Annual Conference, Gießen (29.-30.09.2010), **Poster**

Chronic rejection of experimental lung allografts. 2nd Autumn School (Deutsche Gesellschaft für Immunologie), Bad Schandau (3.-7.10.2010), **Vortrag**

2011

UGMLC School, Reprogramming the lung 18.-19.4.2011

UGMLC School Micromanaging the lung 9.-10.5.2011

Changes in the innate immune system of experimental lung allografts might predispose for the development of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). ECCPS Retreat, 2nd International Symposium, Bad Nauheim (16.-18.06.2011), **Poster**

T cells – Subsets and Functions, Marburg

20.-21.6.2011

Changes in the innate immune system of experimental lung allografts might predispose for the development of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS).

GGL Annual Conference, Gießen (21.-22.9.2011), **Poster**

Veränderungen im angeborenen Immunsystem von experimentellen allogenen Lungentransplantaten könnten zur chronischen Transplantatschädigung beitragen. Mittelrheinischer Chirurgenkongress, Gießen (29.-30.09.2011), **Poster**

2012

T cells – Subsets and Functions, Marburg

18.-19.6.2012

UGMLC and DZL Meeting, Marburg

21.-23.6.2012

Pathogenesis of Bronchiolitis obliterans syndrome: Why are lung allografts highly susceptible to LPS-induced damage? GGL Annual Conference, Gießen (18.-19.09.2012), **Poster**

Pathogenesis of Bronchiolitis obliterans syndrome: Why are lung allografts highly susceptible to LPS-induced damage? Chirurgische Forschungstage, Regensburg (04.-06.10.2012), **Vortrag**

2013

Experimental Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS): Increased Susceptibility of Pulmonary Allografts to Toll-Like Receptor Activation. 2nd Meeting of the DZL, Bad Nauheim (29.-30.01.2013), **Poster**

11. Danksagung

Am Ende dieser Arbeit gebührt sehr vielen Personen mein größter Dank:

Prof. Veronika Grau für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit in Ihrem Labor zu arbeiten. Für Ihr Vertrauen, Ihr Verständnis und Ihre Unterstützung zu jeder Zeit und in jeder Situation möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken.

Prof. Adriaan Dorresteijn, der mich in meiner gesamten universitären Laufbahn mit seiner freundlichen Art begleitet hat, für die Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Tina Trenczek und **Prof. Dr. Ralph Schermuly** für die Bewertung meiner Disputation.

Srebrena Atanasova-Koch und **Anna Zakrzewicz** für Ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in allen wissenschaftlichen Fragen.

Dr. Markus Hirschburger, der maßgeblich an der Etablierung des experimentellen Modells beteiligt war.

Dem gesamten Labor der Experimentellen Chirurgie und den Ärzten der chirurgischen Klinik für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft, Offenheit und Menschlichkeit.

Besonderer Dank gilt **Sigrid Wilker**, **Gabi Fuchs-Moll** und **Kathrin Petri** für Ihre exzellente technische Unterstützung und Hilfe, sowie **Sandra Iffländer** für die Versorgung der Tiere.

Kathrin, Jessi, Mira, Astrid, Dorothee, Sabine und Andreas, ohne Euch wäre die (Labor)Zeit nur halb so schön gewesen!

Dr. Anne Holz, die auch nach meiner Diplomarbeit immer ein offenes Ohr und einen guten Rat für mich hatte...

Meinen Freunden, die immer für mich da waren, die richtigen Worte fanden, mich auf andere Gedanken gebracht haben und mit ihrer Unterstützung einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben!

Meiner großartigen Familie, deren Vertrauen, Unterstützung, Motivation und Liebe mich dahin gebracht haben, wo ich jetzt bin. Es ist schwer in Worte zu fassen wie groß Euer Anteil an dieser Arbeit ist!