Aus dem Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

# DISSERTATION

*In vitro*-Analyse des Potentials extrazellulärer Vesikel von Mesenchymalen Stromazellen für die Nierentransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julie Gauchel

aus Heidelberg

Datum der Promotion: 05.06.2016

Für meine Eltern.

### Inhaltsverzeichnis

Wic	lmung		I
Inha	altsverze	ichnis	II
AbkürzungsverzeichnisV			
Zus	ammenf	assung	VIII
1.	EINLEI	ſUNG	1
	1.1. I	Mesenchymale Stromazellen	1
	1.1.1.	Eigenschaften Mesenchymaler Stromazellen	1
	1.1.2.	Klinisches Potential von MSC	2
	1.1.3.	Therapeutischer Einsatz von MSC	6
	1.1.4.	Einsatz von MSC bei Nierenerkrankungen und Nierentransplantationen	7
	1.1.5.	Grenzen des Einsatzes zellbasierter Therapien mit MSC	8
	1.2. E	Extrazelluläre Vesikel	9
	1.2.1.	Eigenschaften von extrazellulären Vesikeln	9
	1.2.2.	Potential von extrazellulären Vesikeln mesenchymaler Stromazellen	12
	1.3. 2	Zielstellung	12
2.	MATER	IAL UND METHODEN	14
	2.1. I	Material	14
	2.1.1.	Geräte	.14
	2.1.2.	Software	15
	2.1.3.	Chemikalien, Reagenzien	15
	2.1.4.	Antikörper	17
	2.1.5.	Verbrauchsmaterialien	17
	2.1.6.	Zell- und Tiermaterial	18
	2.1.7.	Medien- & Puffer-Rezepturen	18
	2.2.	Methoden	19
	2.2.1.	Allgemeines Arbeiten in der Zellkultur	19
	2.2.1.1.	Kultivierung	.19
	2.2.1.2.	Einfrieren und Auftauen	20
	2.2.2.	Gewinnung von Zellmaterial	20
	2.2.3.	Herstellung von konditioniertem Medium und extrazellulären Vesikeln	21
	2.2.3.1.	Produktion von konditioniertem Medium	21
	2.2.3.2.	Produktion und Quantifizierung von extrazellulären Vesikeln	22
	2.2.4.	Zellschädigungs-Ansätze	23
	2.2.4.1.	Wahl, Dosierung und Vorbereitung der schädigenden Induktoren	23

	2.2.4.2. Durchführung der Schädigungs-Induktion	23
	2.2.4.3. Anti-CD90-Färbung	28
	2.2.4.4. Viabilitäts-Färbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD	29
	2.2.4.5. Gating-Strategie	29
	2.2.5. Proliferation von Ratten T-Lymphozyten im Beisein von MSC oder ihrer Produkte	30
	2.2.5.1. Durchführung der Proliferationsansätze	30
	2.2.5.2. Färbung	33
	2.2.5.3. Gatingstrategie	34
	2.2.6. Zytokinanalyse	36
	2.2.6.1. Vorbereitung von Material und Proben	36
	2.2.6.2. Experimentelle Durchführung	36
	2.2.6.3. Gewinnung und Verarbeitung der Werte	38
	2.2.7. FACS-Analytik	
	2 2 8 Computergestützte Auswertung und Statistik	39
	2 2 9 Grundsätze des wissenschaftlichen Arbeitens	39
3	ERGEBNISSE	40
0.	3.1. Analyse anti-apoptotischer Effekte auf NRK-Zellen durch MSC und MSC-	40
	3.1.1 Etablierung der Zellschödigungs-Induktion in NRK-Zellen	40
	3.1.2 Auswirkung der verwendeten Induktoren auf die Zell-Viabilität	<del>4</del> 0
	3.1.3 Auswirkung von MSC auf die Schödigung von NRK-Zellen	+1
	2.1.4 Wirkung konditionierter Medien aus MSC Kulturen auf sterbande NPK Zelle	4Z
	3.1.4. Wilkung konditionierten medien aus MSC-Ruituren auf sterbende NRR-zeite	;1144
	3.1.5. Effekte von MSC-EV auf den Zeiltod von NRK-Zeilen durch serümireles Medium	46
	3.2. Anti-proliferative Effekte von MSC sowie davon abgeleiteter CM und EV	
	3.2.1. Effekt der MSC-Ko-Kultur auf die Mitogen-induzierte Proliferation von T- Lymphozyten	47
	3.2.2. Einfluss konditionierter Medien von MSC auf die Mitogen-induzierte Prolifer von T-Lymphoyzten	ation 48
	3.2.3. Wirkung von MSC-EV auf die Mitogen-induzierte Proliferation von T-Zellen	50
	3.3. Modulierende Effekte von MSC oder MSC-Produkten auf die IFNγ-Sekretion durch Leukozyten	51
	3.3.1. Auswirkung von MSC und MSC-EV auf die IFNγ-Freisetzung Mitogen- stimulierter Leukozyten	51
	3.3.2. Wirkung konditionierter Medien von MSC auf die IFNγ-Freisetzung aktivierte Leukozyten	ər 52

4.	DISKU	SSION	53
	4.1. protek	MSC und ihre Produkte wirken unter NTx-ähnlichen Bedingungen <i>in vitro</i> tiv auf geschädigte Nierentubulus-Zellen	53
	4.1.1.	Auswirkung der Induktoren auf das Zellsterben	53
	4.1.2.	Interpretations-Möglichkeiten der Annexin V/7-AAD-Färbung	54
	4.1.3. Nähe I	Zur Reduktion der Apoptose von NRK-Zellen müssen sich MSC in unmittelba pefinden	arer 55
	4.1.4. Anteil	Lösliche Faktoren und EV senken durch eine gesteigerte Proliferation den nekrotischer Zellen in Kultur	56
	4.2. Immur	MSC haben einen anti-inflammatorischen Einfluss auf Mitogen-induzierte zellen	59
	4.2.1. räumlie	Die Proliferation von T-Lymphozyten wird nur durch MSC in unmittelbarer cher Nähe gehemmt	59
	4.2.2. durch	Die Reduktion der IFNγ-Ausschüttung durch Leukozyten wird von den MSC parakrine Mechanismen beeinflusst	60
	4.3.	Ausblick	62
Lite	raturve	zeichnis	64
Eig	enständ	ligkeitserklärung/Eidesstattliche Versicherung	XI
Leb	enslauf	·	XII
Dar	nksagur	ng	XII

# Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D		
Abb.	Abbildung		
AK	Antikörper		
bzw.	beziehungsweise		
ca.	circa		
сСМ	Kontroll-konditioniertes Medium		
CD	Cluster of Differentiation ( <i>engl.</i> ),		
CD4+	CD4-positiv, positiv für den Marker CD4		
CD8+	CD8-positiv, positiv für den Marker CD8		
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester		
СМ	conditioned medium (engl.), konditioniertes Medium		
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter (10 <sup>-4</sup> Quadratmeter)		
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid		
CoCl <sub>2</sub>	Cobaltchlorid (genauer: Cobalt(II)chlorid-hexahydrat)		
ConA	Concanavalin A		
COX2	Zyklooxygenase 2		
EPO	Erythropoetin		
EV	extrazelluläre Vesikel		
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (engl.), Form der Durchflusszytometrie		
FBS	Fetales Bovines Serum		
FCS	fetal calf serum (engl.), fetales Kälberserum		
FGF	Fibroblast Growth Factor (engl.), Fibroblasten-Wachstumsfaktor		
FSC	Forward Scatter (engl.), Vorwärtsstreulicht		
g	gravitiy acceleration (engl.), Erdbeschleunigung		
GvHD	Graft-versus-Host-Disease (engl.), Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion		
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid		
HGF	Hepatocyte Growth Factor (engl.), Leberzellwachstumsfaktor		

HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1α		
HLA	human leukocyte antigen ( <i>engl.</i> ), humanes Leukozyten-Antigen		
HRP	horseraddish peroxidase (engl.), Meerrettich-Peroxidase		
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase		
IFNγ	Interferon-Gamma		
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 (engl.), Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1		
IL	Interleukin		
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxyd-Synthase		
ISCT	International Society for Cellular Therapy ( <i>engl.</i> ), Internationale Gesellschaft für Zelluläre Therapien		
LK	Lymphknoten		
MEM	minimal essential medium ( <i>engl.</i> ), Zellkulturmedium (Zusammensetzung nach H. Eagle)		
mg	Milligramm (10 <sup>-3</sup> Gramm)		
MHC	Major Histocompatibility Complex (engl.), Haupt-Histokompatibilitätskomplex		
MLC	Mixed Lymphocyte Cluture (engl.), gemischte Lymphozyten-Kultur		
Mio.	Millionen		
Min.	Minuten		
ml	Milliliter		
mM	millimolar		
MSC	Mesenchymal Stem Cells / Mesenchymal Stromal Cells ( <i>engl.</i> ), Mesenchymale Stammzellen / Mesenchymale Stromazellen		
ng	Nanogramm (10 <sup>-9</sup> Gramm)		
NO	Stickstoffmonoxid		
NTx	Nierentransplantation		
o.g.	oben genannt		
OPTN	Organ Procedure and Transplantation Network ( <i>engl.</i> ), Organhandhabungs- und Transplantations-Netzwerk		
PBS	Phosphate Buffered Saline (engl.), Phosphat-gepufferte Salzlösung		
PFA	Paraformaldehyd		

pg	Pikogramm (10 <sup>-12</sup> Gramm)		
PHA	Phytohämagglutinin		
rpm	rotations per minute (engl.), Umdrehungen pro Minute		
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium ( <i>engl</i> .), Zellkulturmedium (Zusammensetzung nach G.E. Moore und Kollegen)		
RT	Raumtemperatur		
S.	siehe		
S.O.	siehe oben		
SEM	standard error of the mean (engl.), Standardfehler		
SDF-1	stromal-cell derived factor ( <i>engl.</i> ), von Bindegewebszellen stammender Wachstumsfaktor		
SSC	Sideward Scatter (engl.), Seitwärtsstreulicht		
Tab.	Tabelle		
TCR	T-Zell-Rezeptor		
TCR+	TCR-positiv, positiv für den T-Zell-Rezeptor		
TGFβ	$\beta$ transforming growth factor ( <i>engl</i> .), Transformationswachstumsfaktor $\beta$		
TNFα	Tumornekrosefaktor α		
Tregs	regulatorische T-Zellen		
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling ( <i>engl.</i> ), TdT-vermittelte d-UDP- Biotin Nick-Ende Markierung		
VEGF	vascular endothelial growth factor ( <i>engl.</i> ), Gefäß-endothelialer Wachstumsfaktor		
z.B.	zum Beispiel		
μg	Mikrogramm (10 <sup>-6</sup> Gramm)		

### Zusammenfassung

Nieren-transplantierte Patienten leben im ständigen Bewusstsein einer jederzeit möglichen Abstoßung ihres Spenderorgans und mit den Nebenwirkungen der Immunsuppressiva, deren Einnahme für das Transplantat-Überleben unverzichtbar ist. Unter diesen Gesichtspunkten erscheinen Mesenchymale Stromazellen (MSC) mit ihrem regenerativen und immunmodulatorischen Potential als vielversprechende neue Therapieoption. Doch eine Zelltherapie mit MSC kann potentielle Risiken bergen, wie z.B. die maligne Entartung sowie die Induktion einer Immunantwort und dadurch beschleunigter Transplantat-Abstoßung. Diese Risikofaktoren könnten durch die Verwendung von extrazellulären Vesikeln (EV) der MSC umgangen werden. Dabei handelt es sich um kleine, Membran-umhüllte Körperchen, die von den Zellen in die Umgebung freigesetzt werden und als Signalvermittler und Transportmedium, u.a. für Proteine und RNA, fungieren können. Die EV tragen Eigenschaften ihrer Ursprungszelle und vermitteln einen Teil der MSC-typischen Effekte. Durch eine Anwendung der MSC-EV könnten demnach die positiven Effekte der MSC genutzt und gleichzeitig die angesprochenen Risiken umgangen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte durch *in vitro*-Experimente eine Basis für die Testung der MSC-EV in einem Nierentransplantations-Modell in der Ratte geschaffen werden. Dazu wurden MSC und abgeleitete MSC-EV aus Ratten der Stämme Lewis und Dark Agouti isoliert. Zur Untersuchung der regenerativen Fähigkeiten der MSC-EV auf Nierenepithel-Zellen unter Bedingungen einer Transplantations-Situation wurden Rattenzellen der Linie NRK52e mit verschiedenen Induktoren - Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), serumfreies Medium, Vincristin und Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>) - behandelt und der Anteil geschädigter Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Außerdem wurden die immunmodulatorischen Eigenschaften der MSC-EV hinsichtlich der Proliferation von T-Lymphozyten und der IFNγ-Ausschüttung von Leukozyten mittels Durchflusszytometrie und ELISA analysiert.

Es zeigte sich, dass die Schädigung von NRK-Zellen, die durch serumfreies Medium geschädigt wurden, durch den Einsatz von MSC-EV signifikant verringert werden konnte, wohingegen die EV keinen Einfluss auf die Schädigung durch die verbleibenden Induktoren hatten. Im Weiteren konnte demonstriert werden, dass MSC-EV im Gegensatz zu MSC selbst keinen Einfluss auf die Mitogen-induzierte Proliferation von T-Zellen haben. Die physische Anwesenheit der MSC ist demnach für diese immunmodulierende Fähigkeit notwendig. Die IFNγ-Produktion durch Leukozyten hingegen konnte durch den Zusatz von EV signifikant verringert werden. In ihrer Zusammenschau weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass MSC-EV durchaus das Potential für die Protektion geschädigter Nierenzellen besitzen und auch Teile der Immunreaktion beeinflussen können, sodass sie in einem relevanten prä-klinischen Tiermodell untersucht werden könnten. Die Resultate machen gleichzeitig aber auch deutlich, dass es zur Suppression der T-Zell-Proliferation noch ergänzender Mittel bedarf, wie beispielsweise die Kombination mit einem Immunsuppressivum zur Hemmung der T-Zell-Proliferation.

### Abstract

Renal transplant patients must cope with the knowledge that donor organ rejection can occur at any time, and with the side effects of immunosuppressive agents which are necessary for graft survival. Treatment with mesenchymal stromal cells (MSC) could address these issues due to their regenerative and immunomodulatory properties. However, cell therapy with MSC can pose potential risks such as malignancy or the induction of an immune response leading to accelerated graft rejection. These risk factors could be circumvented by the use of extracellular vesicles (EV) from MSC. EVs are small, membrane-bound bodies released by cells into the environment where they can act as signal mediators and transporters, acting on proteins and RNA, for example. The EVs carry properties of their cell of origin and could transmit some MSC-type effects. Therefore, use of MSC-EV could provide the benefits of MSC while avoiding the risks identified with whole cell application.

In the present work, the MSC-EVs were tested in a rat renal transplant model *in vitro*. MSC and MSC-EV were isolated from Lewis and Dark Agouti rat strains and applied in order to investigate the regenerative capabilities of the MSC-EV on the kidney epithelial cell line NRK52e under different conditions. Damage inducers including hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), serum-free medium, vincristine, or cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) were applied with or without addition of MSC-EV, and the proportion of damaged cells was determined by flow cytometry. In addition, the immunomodulatory properties of the MSC-EV in terms of T-lymphocyte proliferation and IFNy secretion were analyzed using flow cytometry and ELISA.

It was determined that NRK cell damage mediated by serum-free medium could be significantly reduced through the use of MSC-EV, whereas the EV had no impact on the level of damage that occurred with the other inducers. In addition, it was demonstrated that MSC-EV, unlike MSC themselves, have no influence on the mitogen-induced proliferation of T cells, therefore the physical presence of the MSC is necessary for their immunomodulatory capacity. However, IFNγ production by leukocytes could be significantly reduced by the addition of EV. In summary, these results suggest that MSC-EV certainly have the potential for providing protective treatment during kidney damage and can also partially affect the immune response, making them a good candidate for study in relevant preclinical animal models. The results suggest that MSC-EV treatment might complement an immunosuppressive agent used to inhibit T cell proliferation to improve the overall outcome.

### 1. EINLEITUNG

Basierend auf Daten des Organhandhabungs- und Transplantations-Netzwerkes (Organ Procurement and Transplantation Network, OPTN) von 2015 wurden alleine im Jahr 2014 in den Vereinigten Staaten von Amerika 17106 Nierentransplantationen (NTx) durchgeführt [1]. Nahezu alle dieser Patienten müssen Zeit ihres Lebens immunsuppressive Medikamente einnehmen, um einer Abstoßung des Organs vorzubeugen [2]. Die Einnahme dieser Medikamente kann jedoch mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden sein [2, 3]. Zudem ist bei einer NTx die Schädigung des Spenderorgans durch temporäre Ischämie unvermeidbar. Die Minderversorgung des Gewebes führt zu einer verstärkten Immunogenität sowie zu einem möglichen frühen Funktionsverlust des Organs [4]. Daher besteht das Ziel, eine Toleranz des Empfängerorganismus gegenüber dem Fremdorgan zu induzieren [3]. Außerdem wird nach Möglichkeiten gesucht, die Schädigung der Spenderniere durch Ischämie zu minimieren und so das Transplantatüberleben zu verlängern [5]. Eine mögliche Option für beide Forschungsansätze stellt die Therapie mit Mesenchymalen Stammzellen, auch Mesenchymale Stromazellen (MSC) genannt, dar [3, 6].

### 1.1. Mesenchymale Stromazellen

### 1.1.1. Eigenschaften Mesenchymaler Stromazellen

MSC wurden 1970 erstmalig durch Friedenstein et al. beschrieben [7]. Caplan et al. prägten für diese Zellen dann 1991 erstmalig die Bezeichnung der Mesenchymalen Stammzelle [8]. Sie erfüllen aber nicht die Kriterien vollwertiger Stammzellen, sodass man sich für die alternative Bezeichnung "Mesenchymale Stromazelle" aussprach [9]. Bis heute werden in der Literatur beide Begriffe verwendet.

Bei MSC handelt es sich um spindelförmige, Fibroblasten-artige Zellen [10], die in nahezu allen Geweben von Wirbeltieren vorkommen, zum Beispiel (z.B.) in Knochenmark, Binde- und Fettgewebe, Skelettmuskel, peripherem und Nabelschnurblut, Nebelschnurwand, Herz, Lunge, Niere, Leber, Gehirn und Amnionflüssigkeit [11, 12, 13]. Am besten untersucht sind die MSC des Knochenmarks [14]. Abhängig von Ursprungsgewebe und -organismus können die Eigenschaften von MSC variieren [8, 15]. Es existieren jedoch bestimmte Merkmale, die allen MSC gemein sind und diese als solche definieren. Hierfür müssen, gemäß der Internationalen Gesellschaft für Zelluläre Therapie (International Society for Cellular Therapy, ISCT), definierte Minimalkriterien erfüllt sein. Dazu gehören die Fähigkeit zur Adhärenz an Plastik sowie die Expression der spezifischen Oberflächenmoleküle CD (engl. Cluster of Differentiation)73, CD90 und CD105. Zusätzlich dürfen sich hämatopoetische Marker wie CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 und CD79a sowie HLA (humanes Leukozyten-Antigen)-Klasse II (HLA-DR) nicht

auf der Zelloberfläche nachweisen lassen [9]. MSC zeichnen sich ferner durch ihre Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien des Mesoderms (z.B. Osteozyten, Adipozyten sowie Myozyten, Chondrozyten und Fibrozyten) und einigen Zelllinien des Endo- und Ektoderms aus [11]. Sie sind in der Lage, sich durch Teilung selbst zu erneuern [9]. Ihre Proliferation ist auch *in vitro* möglich. [7].

### 1.1.2. Klinisches Potential von MSC

Mesenchymale Stromazellen sind für die klinische Anwendung aus verschiedenen Gründen interessant: Zum einen besitzen sie Regenerationspotential für geschädigtes Gewebe, zum anderen können sie modulierend auf das Immunsystem wirken [16].

Im Allgemeinen kann man die regenerativen Einflüsse von MSC (s. Abbildung (Abb.) 1 A) in drei große Kategorien einteilen. Sie können a) differenzieren und geschädigte Zellen ersetzen, sie können b) die Nährstoffzufuhr steigern und sie können c) durch parakrine Mechanismen protektiv auf die geschädigten Zellen einwirken [14].

Die Differenzierung von MSC *in vitro* ist abhängig von den Kulturbedingungen und kann durch verschiedene Kultivierungs-Protokolle in unterschiedliche Richtungen gelenkt werden [17]. Die Fähigkeit zur Differenzierung, sofern sie tatsächlich existiert, scheint jedoch *in vivo* eine untergeordnete Rolle zu spielen [11, 14]. In der Literatur wird sie jedoch vielfach in Frage gestellt [13, 18, 19].

Die Effekte von MSC scheinen vorwiegend auf ihren parakrin freigesetzten Mediatoren zu beruhen [18]. Dabei werden zahlreiche Wachstumsfaktoren, wie z.B. der Leberzellwachstumsfaktor (Hepatocyte Growth Factor, HGF), Erythropoetin (EPO), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor, FGF), sowie Zytokine (u.a. Interleukin(IL)-6 und 8) und extrazelluläre Vesikel (EV) sezerniert [16, 19, 20]. Effekte dieses Cocktails sind die Förderung der Angiogenese, die Verhinderung von Apoptose sowie die Unterstützung der Reparatur geschädigter Zellen [8, 16]. Lokal im Gewebe ansässige Vorläuferzellen können chemotaktisch rekrutiert und zur Mitose stimuliert werden. Außerdem schaffen die MSC, u.a. durch ihr Sekretom, ein optimales Mikromilieu, das die Reifung beziehungsweise (bzw.) Differenzierung dieser Zellen fördert. Die entscheidende Rolle hierfür wird dem Chemokin SDF-1 (stromal cell-derived factor-1, Bindegewebszell-Faktor-1) zugeschrieben, dessen Konzentration insbesondere in geschädigtem Gewebe erhöht ist [8]. In anderen Publikationen wird jedoch bezweifelt, dass eine Migration in Richtung des SDF-1 Gradienten überhaupt existiert [21].



Abb. 1.: Schematisierte Darstellung der regenerativen (A) und immunmodulatorischen Wirkungen (B) von Mesenchymalen Stromazellen (MSC). A: In seltenen Fällen wurde beschrieben, dass MSC in vivo differenzieren und als Ersatz für zuvor geschädigte Zellen dienen. Hauptsächlich wirken die MSC jedoch durch ihre sezernierten Produkte, wie Wachstumsfaktoren (WF), Zytokine (ZK) und extrazelluläre Vesikel (EV), regenerativ auf ihre Umgebung und können so (I) die Apoptose von ansässigen Zellen verhindern, (II) bereits entstandene Zellschäden beheben, (III) die Differenzierung lokaler Stammzellen (SZ) anregen und (IV) ihre Proliferation fördern. Zudem (V) unterstützen sie die Angiogenese. B: MSC beeinflussen außerdem in vielfältiger Art und Weise das Immunsystem. Sie nehmen u.a. Einfluss auf die T-Lymphozyten. Dabei hemmen sie (Ia) die Proliferation von T-Zellen durch Zell-Zell-Kontakt und lösliche Faktoren, induzieren (Ib) deren Apoptose durch die Interaktion von Fas mit Fas-Ligand (FasL), fördern (Ic) die Herunterregulation von Aktivierungsmarkern und begünstigen (Id) eine Verschiebung des Gleichgewichts von T-Helferzellen in Richtung der Th2-Zellen. Zudem wird die Bildung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) unterstützt. Weiterhin wirken die MSC auf B-Lymphozyten, indem sie (IIa) auch deren Proliferation hemmen, auch hier zur (IIb) verminderten Expression von Aktivierungsmarkern beitragen und zusätzlich (IIc) die Antikörper(AK)-Sekretion hemmen. Auch NK-Zellen werden durch MSC (IIIa) an der Proliferation gehindert sowie (IIIb) in ihrer Sekretion von IFNy eingeschränkt. Außerdem regulieren MSC auch dendritische Zellen (DC), indem sie (IVa) ihren Reifungsprozess behindern und so indirekt eine Aktivierung von T-Zellen verhindern. (IVb) Durch ihren Einfluss auf DC verschieben sie das Gleichgewicht der T-Helferzellen hin zum Th<sub>2</sub>-Typ und (IVc) induzieren Toleranz gegenüber Antigenen. Zusätzlich (IVd) hemmen sie die Migration von DC. Legende: grüne Pfeile: Prozess wird gefördert, rote Pfeile: Prozess wird gehemmt.

Die immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSC (s. Abb. 1B) können sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beeinflussen [22]. Entscheidend für die Art des Einflusses ist das vorherrschende Mikromilieu aus Zusammensetzung und Konzentration von Zytokinen. Diese stimulieren die MSC zu unterschiedlichen Reaktionen [22].

Unter dem Einfluss hoher Zytokin-Konzentrationen sowie bestimmter –Typen können MSC die Immunreaktion unterdrücken, indem sie u.a. hemmend auf die Aktivierung, Proliferation und Reaktion von T-Zellen einwirken [15, 22, 23]. Die Hemmung der T-Zell-Proliferation erfolgt jedoch nur bei Mitogen- oder Fremdantigen-assoziierter T-Zell-Vermehrung, nicht aber bei einem viralen Stimulus [9]. In verschiedenen Spezies wird dieser Effekt durch unterschiedliche Enzyme und Substanzen vermittelt. In humanen MSC ist hierfür unter anderem das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und dessen Produkt Kynurenin verantwortlich, wohingegen diese Funktion bei MSC von Nagetieren von der induzierbaren Strickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) durch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) übernommen wird [9].

Die Immunreaktion wird darüber hinaus durch eine MSC-vermittelte, verstärkte Ausreifung regulatorischer T-Zellen (Tregs) gehemmt. Durch den Einfluss von MSC reagieren die T-Lymphozyten mit der Stimulation von M2-Makrophagen [16, 24], die hierdurch zur Produktion von Transformationswachstumsfaktor-beta (TGF $\beta$ ) angeregt werden [22]. Dieser Wachstumsfaktor induziert die Differenzierung von Tregs [22], welche u.a. dämpfend auf die weitere T-Zell-Proliferation wirken [25]. Zudem verhindern MSC die Ausbildung von Gedächtniszellen [19]. Beide Effekte favorisieren eine tolerante Immunlage gegenüber dem ursprünglich immunogenen Auslöser [26].

Auch B-Zellen werden durch die MSC beeinflusst, wobei die Art der Effekte noch Gegenstand kontroverser Diskussionen ist [27]. Comoli et al. vertreten die These, dass eine Hemmung von B-Zellen durch MSC stattfindet [28]. Es besteht die Vermutung, dass dies durch die Arretierung des Zellzyklus mit Übergang in die G0-Phase geschieht. Zudem gibt es Hinweise für die Hemmung der Plasmazell-Differenzierung und der Produktion von Immunglobulinen [15]. Andere Arbeiten sehen den Grund in einer indirekten Beeinflussung der B-Zellen über die Hemmung der T-Zellen [9]. Es existieren aber auch Daten, dass MSC zu einer verstärkten Antikörper(AK)-Sekretion und damit zu einer gesteigerten B-Zell-Aktivität führen könnten [22].

Neben einer Wirkung auf T- und B-Lymphozyten sind MSC in der Lage, auch die Funktion von Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und dendritischen Zellen (DC) zu modulieren. So können naive DC an ihrer Reifung gehindert werden, wodurch eine Aktivierung von T-Zellen durch DC verhindert wird. Zudem können MSC über ihren Einfluss auf DC bei T-Zellen Toleranz gegenüber Antigenen induzieren und das Gleichgewicht bei CD4-positiven T-Zellen vom Th1-Typ hin zum Th2-Typ verschieben. Auf diese Weise wird eine anti-inflammatorische Immunlage

gefördert [23]. Auch die Migration von DC kann durch MSC eingeschränkt werden. MSC verhindern außerdem die Proliferation von NK-Zellen sowie deren Produktion von Interferongamma (IFNγ) und damit die Generierung eines pro-inflammatorischen Milieus [23].

TGF $\beta$ , ein wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin, wirkt den immunsuppressiven Auswirkungen von MSC entgegen. Sein extrazelluläres Vorkommen bedingt in humanen MSC eine reduzierte Expression von IDO. TGF $\beta$  wird von MSC sogar selbst produziert und sezerniert, sodass eine autokrin bedingte, hemmende Rückkopplung in Bezug auf die Immunsuppression erfolgt [22]. Die immunsuppressiven Effekte von MSC können auch durch die externe Induktion eines anti-inflammatorischen Milieus aufgehoben werden, beispielsweise durch Applikation des Immunsuppressivums und Kortikosteroids Dexamethason [22].

Bei Vorliegen niedriger Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine (IFNγ und Tumornekrosefaktor-alpha (TNFα)) können MSC das Immunsystem sogar anregen. Eine Schlüsselrolle nimmt in dieser Hinsicht das Enzym IDO bzw. iNOS ein [22]. Li et al. fanden heraus, dass die fehlende Aktivität von iNOS zur Unfähigkeit der MSC führte, ihre immunsupprimierenden Funktion zu entfalten. Dies kann auf einer verminderten Expression des Enzyms aufgrund niedriger Zytokin-Spiegel, auf fehlender Expression durch Knock-Out oder auch auf dessen Hemmung durch verschiedene Substanzen basieren [29].

Für den klinischen Einsatz von MSC sprechen neben ihren regeneratorischen und immunmodulatorischen Fähigkeiten außerdem ihre einfache Verfügbarkeit und Aufbereitung. MSC können unkompliziert, z.B. aus Fettgewebe [11], gewonnen und innerhalb weniger Tage in vitro kultiviert werden. Insbesondere während der ersten Passagen kann sich ihre Population bis zu 50 Mal verdoppeln, sodass die zur Behandlung erforderlichen Mengen zur Verfügung gestellt werden könnten [8]. Die Literatur betont außerdem auch die, zumindest angeblich, nicht vorhandene Immunogenität der MSC, ihr sogenanntes Immunprivileg. Durch die fehlende Expression von HLA-Molekülen entgingen die MSC der Immunantwort eines fremden Organismus, was die Nutzung von sowohl autologen als auch allogenen MSC bei der Therapie von Erkrankungen möglich machen würde [16]. In der aktuelleren Literatur mehren sich jedoch Veröffentlichungen, die zeigen, dass MSC durchaus Auslöser einer Immunantwort sein können [23]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass infundierte, autologe MSC länger im Organismus nachweisbar sind als die allogenen Ursprungs [23]. Für ihre Immunogenität spricht ebenfalls, dass die Infusion allogener MSC die Abstoßung eines Transplantates beschleunigte, bei zeitgleicher Applikation von Immunsuppressiva (IS) wurde diese wiederum hinaus gezögert [23]. Vermutlich stimulieren die allogenen MSC bei ihrer Applikation ohne IS die Immunreaktion des Empfängerorganismus, was zu einer beschleunigten Abstoßung führt. Werden gleichzeitig IS gegeben, hemmen diese die Reaktion des Immunsystems auf die MSC und verzögern so auch die Abstoßungsreaktion [23]. Der Empfängerorganismus bildet CD4positive (CD4+) und CD8-positive (CD8+) T-Zellen gegen Haupt-Histokompatibilitätskomplex

(Major Histocompatibility Complex, MHC)-Klasse I und II auf MSC. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass bereits vorsensibilisierte CD4+ T-Lymphozyten durch die Ko-Kultur mit MSC zur Proliferation angeregt werden [23]. Neben einer zellulären Immunreaktion wurde außerdem die Bildung von Antikörpern gegen allogene MSC nachgewiesen. So zeigten Tiere, denen MSC infundiert wurden, höhere Antikörper-Titer, als Tiere, denen man ein IS oder eine Kombination aus MSC und IS verabreichte [23].

Bei der Entstehung einer Immunreaktion gegen MSC spielt das vorhandene pro-inflammatorische Milieu eine wichtige Rolle. IFNγ beispielsweise steigert die Expression von Molekülen der MHC-Klasse I und II auf MSC und damit auch deren Immunogenität [23].

#### 1.1.3. Therapeutischer Einsatz von MSC

Gegenwärtig befassen sich bereits mehr als 500 klinische Studien mit dem Behandlungspotential von MSC [30]. Zudem erfolgte in zahlreichen Tiermodellen eine Evaluation ihres therapeutischen Potentials [31]. Dabei stehen vier Schwerpunkte im Fokus der Forschung: Geweberegeneration, Generation von Zellvehikeln zur Gentherapie, Verbesserung der Ansiedlung neuer, hämatopoetischer Stromazellen und Behandlung von Immunerkrankungen, insbesondere autoreaktiver Natur [31].

Ihre Differenzierungsfähigkeit ist einer der Gründe, warum die Regenerative Medizin Mesenchymale Stromazellen als hoffnungsvolle Kandidaten für die Behandlung zahlreicher Krankheiten handelt [7, 11]. Am vielversprechendsten sind bis dato die Erkenntnisse aus Versuchsreihen zur Regeneration von Knochen und Knorpel [8]. Aber auch die experimentelle Behandlung von Organschädigungen nach Ischämie und Reperfusion durch MSC zeigt erfolgversprechende Ergebnisse [16].

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Immunmodulation ist die Behandlung von Fehlregulationen des Immunsystems durch MSC, wie sie bei Autoimmunerkrankungen und der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-host-Disease, GvHD) vorliegt, ebenfalls ein wichtiges Forschungsgebiet. Die GvHD war die erste Erkrankung, bei der MSC im Jahr 2004 erfolgreich klinisch eingesetzt wurden [15, 22].

MSC sind ebenfalls eine mögliche Therapieoption für weitere Krankheiten, u.a. zur Behandlung von Herzinfarkt, akuter Pankreatitis, Diabetes mellitus Typ 1 und 2, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Multipler Sklerose, systemischem Lupus erythematodes, Leber- und Lungenfibrose sowie rheumatoider Arthritis. Im Rahmen der Forschungen hierzu wurden auch bereits klinischen Studien durchgeführt [15, 22]. Die anfängliche Euphorie hielt aufgrund der zum Teil widersprüchlichen Resultate der einzelnen Untersuchungen jedoch nicht lange an. Es scheint, als ob das Ergebnis einer Behandlung mit MSC von verschiedenen Faktoren abhängig ist, welche je nach Erkrankung variieren können. Zu diesen Faktoren können Zeitpunkt

der Behandlung, Patientengruppe, Herkunftsgewebe und -organismus sowie die Applikationsform der MSC zählen [15].

### 1.1.4. Einsatz von MSC bei Nierenerkrankungen und Nierentransplantationen

Erforscht wird der Einsatz von MSC auch zur Behandlung renaler Erkrankungen, u.a. von akutem Nierenversagen, und als Therapeutikum für Nieren-transplantierte Patienten, um eine Abstoßung des Fremdorgans zu verhindern [3, 12].

Ein Akutes Nierenversagen ist definiert als "akut einsetzende, rasche Abnahme der Nierenfunktion, die über Tage anhält und prinzipiell reversibel ist" [32]. Dabei kommt es zum Anstieg der Retentionsparameter durch die verminderte Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen sowie zu einer Störung des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts [32]. Die Ursachen können vielfältig sein. Sie werden in prärenal, intrarenal und postrenal unterteilt [32]. Ein prärenales, akutes Nierenversagen wird durch eine verminderte Perfusion des Organs ausgelöst. Bezogen auf die Richtung des Blutflusses liegt die auslösende Pathologie vor der Niere. Ursachen hierfür können eine Verminderung des Herzzeitvolumens durch Herzinsuffizienz oder Volumenmangelschock, aber auch eine Nierenarterienstenose sein [32, 33]. Durch die entstehende absolute oder relative Ischämie und damit einhergehende, mangelnde Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, wird das Organ nach einiger Zeit geschädigt, insbesondere in Regionen vermehrten Energieverbrauchs, wie dem Tubulusepithel [34]. Das prärenale Nierenversagen geht damit in ein intrarenales Nierenversagen über [33].

Das intrarenale Nierenversagen ist auf eine direkte Schädigung des Organs zurückzuführen. Dies kann u.a. durch Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Kontrastmittel oder Verstopfung der Nierentubuli durch unterschiedliche Substanzen, aber auch aufgrund medikamentöser Toxizität ausgelöst werden [32]. Beim postrenalen Nierenversagen ist ein Abflusshindernis für den Rückstau des Harns bis in die Nieren und damit für die Einschränkung der renalen Funktion verantwortlich [32]. Der Druck innerhalb der Nierentubuli steigt. Wenn der Filtrationsdruck des Glomerulus erreicht ist, sistiert die Filtration des Primärharns. Konsekutiv kommt es zur Gefäßkonstriktion und die Durchblutung der Niere wird gedrosselt [33].

Das chronische Nierenversagen ist von einem Funktionsverlust der Niere gekennzeichnet, welcher länger als drei Monate andauert. Es bestehen Zeichen der Nierenschädigung, wie zum Beispiel eine Proteinurie oder eine Verminderung der glomerulären Filtrationsrate auf weniger als 60 ml/Min./1,73m<sup>2</sup> Körperoberfläche [35, 36].

Nach einer NTx tritt bei 30 bis 40% aller Organempfänger eine akute Niereninsuffizienz auf. Als Ursache nimmt dabei die Schädigung des Transplantates durch Ischämie und Reperfusion eine zentrale Stellung ein [37]. Diese Form des Nierenversagens kann aufgrund des Schädigungs-Mechanismus als prärenal eingestuft werden. Aber auch Stoffe mit nephrotoxischen

Wirkungen können die Funktion des Transplantates einschränken. Dazu zählen bei Nierentransplantierten Patienten vorrangig die immunsuppressiven Medikamente, insbesondere die Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren, sowie bestimmte Antibiotika [37]. Auch viele Zytostatika können die Niere schädigen [38]. Da Patienten nach einer NTx durch die Einnahme der immunsuppressiven Medikamente gehäuft an malignen Erkrankungen leiden [23], stellen diese Substanzen ebenfalls eine Gefährdung für das Transplantatüberleben dar.

MSC zeigen eine proliferative sowie anti-apoptotische Wirkung auf renale Zellen und wirken stabilisierend auf die mikrovaskuläre Struktur der Niere [12]. Zudem hemmen sie Immunzellen, die an der pro-inflammatorischen Reaktion im Rahmen eines akuten Nierenversagens beteiligt sind und fördern über eine veränderte Genexpression ein anti-oxidatives Milieu im geschädigten Gewebe [7]. Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass MSC die Einschränkung der Nierenfunktion durch Cisplatin-Einwirkung, einem nephrotoxischen Medikament [38], verhindern können [12].

Zudem wird ein möglicher Einsatz von MSC bei Nieren-transplantierten Patienten als Chance gesehen, Toleranz des Empfängers gegenüber dem Fremdorgan induzieren zu können [3]. In ersten klinischen Studien konnte bereits demonstriert werden, dass ihre Applikation die Ausbildung von Gedächtniszellen mit Spezifität für Transplantat-Antigene reduzierte und die Zahl regulatorischer T-Zellen steigerte. Eine vergleichbare Hemmung der Gedächtniszell-Bildung, kann durch die gängige immunsuppressive Medikation nicht erzielt werden [3, 26].

#### 1.1.5. Grenzen des Einsatzes zellbasierter Therapien mit MSC

Durch die unmittelbare Injektion von Zellen, möglicherweise auch allogener Herkunft, bestehen jedoch Risiken, die den klinischen Einsatz von MSC verzögern oder einschränken können. Aufgrund ihres Proliferations-Potentials birgt die Applikation von MSC die Gefahr der Tumorbildung. Die Untersuchungsergebnisse in Bezug auf die Entstehung von Malignomen sprechen zwar mehrheitlich für eine Unbedenklichkeit der klinischen Anwendung [39, 40], wenige wissenschaftliche Arbeiten weisen jedoch darauf hin, dass MSC auch in der Lage sind, Ursprung und Auslöser von Malignomen zu sein [41, 42]. Zudem besteht der Verdacht, dass MSC bereits vorhandene, möglicherweise noch okkulte Tumore in ihrem Wachstum begünstigen können [43].

Ein weiteres Risiko stellt eine mögliche ektope Neubildung von Gewebe durch MSC dar, wie sie von einzelnen Gruppen beschrieben wurde [44, 45].

Die Immunogenität der MSC könnte eine weitere Hürde auf dem Weg zu ihrer klinischen Anwendung sein. Dies gilt für den Einsatz allogener MSC, also auch für die industriell hergestellten, sogenannten "off-the-shelf"-Produkte [23]. Durch die ausschließliche Verwendung autologer MSC könnte dieses Problem vermieden werden. Bei einigen Erkrankungen bzw. unter

bestimmten Voraussetzungen weisen die MSC betroffener Patienten jedoch teilweise Abnormalitäten oder eine verminderte Funktionstüchtigkeit auf [15, 23], sodass ihre Verwendung keine Option darstellt.

Es wäre daher optimal, die vorteilhaften Eigenschaften der MSC nutzen zu können, gleichzeitig jedoch auf die Spende körpereigenen Materials durch den Patienten verzichten und zusätzlich die genannten Risiken minimieren zu können. Als mögliche Alternative bieten sich hier extrazelluläre Vesikel (EV) der MSC an [19, 46].

### 1.2. Extrazelluläre Vesikel

### 1.2.1. Eigenschaften von extrazellulären Vesikeln

EV sind als runde Membrankörperchen definiert, die Charakteristika ihrer Ursprungszelle tragen [47]. Deshalb kann man auch von den EV auf den Zelltyp rückschließen, von dem sie abstammen [19]. Abhängig von der Literatur-Quelle werden EV, je nach Größe und Art ihres Entstehens, in zwei bzw. drei Unterformen unterteilt. Die Namensgebung der unterschiedlichen Typen ist noch Gegenstand der Diskussion [48]. Eine Form der extrazellulären Vesikel, 30-120 nm groß, wird in der Zelle durch Membraneinstülpungen in das Endosom produziert und in diesem, dann auch als multivesikuläres Körperchen bezeichnet, gelagert [19, 48]. Durch Verschmelzung der multivesikulären Körperchen mit der Plasmamembran werden sie schließlich von der Zelle sezerniert [13, 19, 46]. Eine weitere Gruppe der EV, zwischen 100 nm und 1 µm durchmessend, entsteht durch Abknospung von der Zelloberfläche [46]. Der Vorgang ist abhängig von der Kalzium-Konzentration in der Zelle. Kalzium-Ionen aktivieren Enzyme, die dann wiederum eine spezifische Verteilung der Phospholipid-Reste in der Membran begünstigen. Insbesondere Phosphatidylserin gelangt auf diese Weise auf die äußere Membranseite und somit auch auf die späteren EV. Diese Verteilung ist Grundvoraussetzung für den Prozess der Abknospung [46]. In einigen Veröffentlichungen werden sogenannte apoptotische Körperchen als dritte Gruppe der EV definiert [13].

Die Sekretion der EV kann konstitutiv oder als Folge eines Stimulus erfolgen [46]. Einmal gebildet, verbleiben EV entweder im näheren Umfeld der Ursprungszelle oder sie werden mit den Körperflüssigkeiten in andere Körperregionen transportiert [46]. Es ist ihnen möglich, in andere Zellen aufgenommen zu werden.



Abb. 2: Vereinfachte Darstellung eines Ausschnitts von Entstehung und Prozessierung extrazellulärer Vesikel (EV). EV können per Endozytose aufgenommen werden. Das hierdurch entstandene Endosom kann in der Zelle unterschiedliche Wege nehmen. Die EV können mit der Endosomen-Membran verschmelzen, sodass ihr Inhalt ins Zytosol gelangt. Das Endosom kann auch mit einem Lysosom verschmelzen, sodass ihr Inhalt degradiert wird. Außerdem können die Endosomen als sogenannte Multivesikuläre Körperchen (MVK) im Zytosol verbleiben und in der Folge, meist Stimulus-getriggert, mit der Plasmamembran (PM) verschmelzen und so die Vesikel nach extrazellulär entlassen. Auch durch Einknospung in ein Endosom können EV in das Endosom gelangen. Von dort aus stehen ihnen ebenfalls die zuvor beschriebenen Prozessierungs-Wege offen. Zum anderen können EV durch die Abknospung von der PM entstehen und durch Verschmelzen mit der PM von extrazellulär kommend aufgenommen werden.

Der erste Kontakt hierzu erfolgt durch Interaktion von Rezeptor und Ligand, wobei sich einer der beiden Interaktionspartner auf dem Vesikel und der andere auf der Zielzelle befindet [46]. Je nach Ursprungs- und Zielzelle, wurden hierfür bereits verschiedenste Paare von Rezeptor und Ligand beschrieben [19, 48]. Die Aufnahme der EV erfolgt dann entweder endozytotisch, durch Pinozytose oder Phagozytose, oder durch direkte Fusion mit der Plasmamembran [19, 48]. Im Fall der Endozytose können die EV unterschiedlich weiterprozessiert werden: Sie können mit der Membran des Endosoms verschmelzen und so ihren Inhalt ins Zytosol der Zielzelle entleeren. Die Endosomen können aber auch mit einem Lysosom verschmelzen, sodass es zur Degradierung der enthaltenen Vesikel und deren Inhalts kommt. Eine weitere Möglichkeit ist die transzytotische Passage der EV durch die Zelle, indem das Endosom an anderer Stelle erneut mit der Plasmamembran verschmilzt [46].

EV werden von nahezu jedem Zelltyp gebildet [19]. Vielfältig ist aber nicht nur ihr Ursprung, sondern auch ihre Funktion. Sie dienen unter anderem dem Transport verschiedener Substan-

zen. Diese können über die Oberfläche der EV, aber auch über deren zytoplasmatischen Innenraum transportiert werden [46, 47]. Über die EV-Oberfläche ist u.a. eine Übertragung von Oberflächenproteinen und –rezeptoren möglich. Beispiele sind der Fas-Ligand, der die Empfängerzelle gegenüber Zelltodsignalen von außen zugänglich macht, die Oberflächenrezeptoren CXCR4 und CCR5, wodurch die beziehende Zelle vulnerabel für das HI-Virus wird oder das CD41-Molekül, das den aufnehmenden Zellen die adhäsive Eigenschaft von Thrombozyten verleiht [46, 47]. Ein solcher Transfer bedeutet aber nicht nur einen Zugewinn von Rezeptoren für die Empfängerzelle. Auch der Verlust von Oberflächenmolekülen hat Auswirkungen für die betreffende Zelle. Durch Abknospung von Vesikeln, die den Fas-Liganden oder den Membranangriffskomplex tragen, ist die Zelle beispielsweise weniger empfindlich gegenüber Zelltod-Induktion von außen [46, 47].

Auch der Innenraum der EV kann dem Transport dienen. Transferiert werden können u.a. Proteine, wie Caspasen, die in der Zielzelle einen Apoptose-Signalweg induzieren können. Es gibt außerdem Hinweise, dass Prionen und Viren Transportgut der EV sein könnten [46, 47]. Darüber hinaus ist der Transfer verschiedener Formen von RNA, wie mRNA und miRNA, belegt. Hierdurch kann die Genexpression der Empfängerzelle verändert werden. Besonders eindrucksvoll zeigt sich das am Beispiel Spezies-fremder mRNA in Vesikeln, die zur Expression Spezies-fremder Proteine in der Empfängerzelle führt [19]. Auch miRNA beeinflusst die Genregulation [47]. Sie bindet spezifisch an mRNA der Empfängerzelle und verhindert auf diesem Weg deren Translation [49]. Es gibt Hinweise darauf, dass EV keine zufällig zusammengewürfelte Mischung von RNA enthalten, sondern vielmehr eine gezielte Komposition, um eine gerichtete Wirkung in der Empfängerzelle zu entfalten [46, 47]. Unklar ist noch, ob ein RNA Transport sowohl über den EV-Innenraum als auch über die EV-Oberfläche geschieht, oder nicht. Denn durch die Behandlung von EV mit RNAse, welche nicht membrangängig ist [48], kann in einigen Experimenten die Wirkung von EV aufgehoben werden. Andere Versuche zeigen aber, dass sich auch nach Zusatz von RNAse noch die gleiche Menge RNA in den EV befindet, wie zuvor [50].

Neben dem Transport erfüllen EV aber noch weitere Funktionen, u.a. auch in der Blutgerinnung. Der hohe Anteil an Phosphatidylserin auf der Oberfläche bereitet eine optimale Basis für den Start der Gerinnungskaskade. Zusätzlich tragen einige EV den Gewebefaktor (auch: Gerinnungsfaktor III oder Tissue Factor, TF) [47]. Von diesem kann der extrinsische Weg der Blutgerinnung seinen Ursprung nehmen. Auch bereits die Bindung von EV an die Zielzelle kann Auswirkungen auf diese haben. Hierdurch ist eine Aktivierung zum Beispiel von Endothelzellen und Monozyten beschrieben [46, 47]. Befindet sich der Fas-Ligand auf dem EV, ist es diesem möglich, durch Bindung an den Fas-Oberflächenkomplex der Zielzelle in dieser den programmierten Zelltod auszulösen [46].

#### 1.2.2. Potential von extrazellulären Vesikeln Mesenchymaler Stromazellen

MSC sind ebenfalls in der Lage, EV zu bilden oder zu internalisieren [51]. Es zeigte sich, dass die zellfreien Überstände aus MSC-Kultur (konditioniertes Medium, CM) ebenfalls die positiven Effekte der MSC vermitteln können [19]. Dieser Effekt wird, zumindest teilweise, den im CM vorhandenen EV zugeschrieben [19, 46].

Bezogen auf die Regeneration von Geweben, konnte für verschiedene Organe bereits eine durch MSC-EV vermittelte Unterstützung des Wiederherstellungs-Prozesses nachgewiesen werden. So zum Beispiel nach Herzinfarkt, Tetrachlorid-induzierter Leberfibrose und neuronaler Ischämie [50]. Außerdem stellte man fest, dass EV von MSC einen protektiven Einfluss auf die Niere im Zustand des akuten Nierenversagens haben, welcher mit dem der direkten Zelltherapie vergleichbar ist [50]. Auch in Hinsicht auf den immunmodulatorischen Aspekt scheinen MSC-EV eine potentielle Alternative zur zellbasierten Therapie zu sein. Durch die Anwendung von MSC-EV ist es *in vitro* möglich, die Bildung von Tregs zu induzieren. Diese können dann eine tolerante Immunlage, beispielsweise gegenüber den Fremdantigenen eines Transplantates, induzieren [26]. Zudem gibt es Daten, die darauf hinweisen, dass MSC-EV die Proliferation von T-Zellen einschränken und außerdem Apoptose von T-Lymphozyten initiieren können [52]. Sie zeigten auch eine den MSC äquivalente Hemmung auf die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen in Kultur sowie auf die Produktion von Immunglobulinen [52].

#### 1.3. Zielstellung

MSC sind in mehrerer Hinsicht als perspektivische Therapie-Option für Nieren-transplantierte Patienten interessant. Zum einen sind sie einfach zu gewinnen und können problemlos kultiviert sowie expandiert werden. Zum anderen erscheint ihr Profil von Fähigkeiten, insbesondere ihre regenerativen und immunmodulierenden Eigenschaften, verheißungsvoll im Hinblick auf eine Verlängerung des Transplantatüberlebens. Um mögliche Risiken, die mit einer Zelltherapie einhergehen können, zu umgehen, ist der Einsatz von MSC-EV eine vielversprechende Möglichkeit.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein *in vitro* System etabliert werden, in dem die Verhältnisse bei NTx nachgeahmt werden. Der Fokus lag dabei auf dem Nachstellen einer kalten Ischämie, da dies der klinischen Realität am nächsten kommt und nur wenige experimentelle Vordaten dazu existieren. Weiterhin sollte das Wirken von MSC-EV *in vitro* in Bezug auf ihr regeneratives und immunmodulatorisches Potential untersucht werden. Durch die ausschließliche Verwendung von Zellmaterial aus der Ratte sollte die Grundlage für eine perspektivische Testung in einem prä-klinischen Tiermodell geschaffen werden.

Die Arbeit beinhaltet folgende Teilaspekte:

- Untersuchung der protektiven Wirkung von MSC sowie der von ihnen abgeleiteten Zellprodukte in Form von konditioniertem Medium und extrazellulären Vesikeln auf Nierentubulus-Zellen der Ratte nach Schädigung durch verschiedene Induktoren. Diese Induktoren simulieren verschiedene Schädigungsfaktoren, die während oder auch nach einer NTx auftreten.
- Analyse der immunmodulierenden Effekte von MSC oder den von ihnen abgeleiteten Produkte (konditioniertes Medium bzw. extrazelluläre Vesikel). Dabei lag der Fokus auf der Analyse ihrer Einflüsse auf
  - die Proliferation von T-Lymphozyten sowie der
  - IFNγ-Produktion durch Leukozyten.

### 2. MATERIAL UND METHODEN

#### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

<u>Gerät</u> Wasserbad

Lichtmikroskop Leica DMIL

Zellen-Zähler CASY

Fuchs Rosenthal Zählkammer, Laboroptik Fuchs Rosenthal Zählkammer, Assistent

Tischzentrifuge Allegra<sup>TH</sup>X-22R Inkubator Innova CO170

Absaug-System Integra Vacusafe comfort plus

FACS-Gerät Licht- und Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Ultrazentrifuge Beckman L7 Tischzentrifuge Minispin Abzug Airflow Control

Sterilbank Safe 2020

Eismaschine

Einkanal-Pipetten

- 2,5 µl (schwarz)
- 10 µl (weiß)
- 20 µl (gelb)
- 100 µl (gelb)
- 1000 µl (blau)

Mehrkanal-Pipette 250µl (8-Kanal) mech. Multistepper-Pipette Handy Step Plattenauslese-Gerät Spectra max

Plattenauslese-Gerät

Mikroskop-Kamera Axio Cam MR

Firma Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany Roche Innovatis AG, Reutlingen, Germany Laboroptik, Friedrichsdorf, Germany Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG - Assistent, Sondheim/Rhön, Germany Beckman Coulter GmbH, Brea, USA New Brunswick Scientific, Enfield, USA Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Germany BD Biosciences, Franklin Lakes, USA Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany Beckman Coulter GmbH, Brea, USA Eppendorf AG, Hamburg, Germany Die Laborfabrik - Gesellschaft für effiziente Laboreinrichtung mbH, Bremen, Germany Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA Scotsman Ice Systems Frimont SPA, Milan, Italy Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Brand Tech Scientific, Essex, USA Molecular Devices LLC, Sunnyvale, USA Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany

Autoklav	WEBECO Hygiene in Medizin und La- bor GmbH & Co. KG, Selmsdorf, Ger- many
Feinwaage	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Swizerland
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Vortexer	IKA-Works, Inc., Wilmington, USA
Metallbox	VWR International, Dresden, Germany
Nanodrop Spektrometer	PEQ-LAB Biotechnologie GmbH, Er- langen, Germany
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Germany
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Germany
Tischzentrifuge Sigma	Thermo Fischer Scientific Inc., Wal- tham, USA
Pinzette	WPI Germany GmbH, Berlin, Ger- many

### 2.1.2. Software

<u>Software</u>	<u>Version</u>	<u>Firma</u>
BD FACS Diva Software	6.13	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Analyse-Software FlowJo	8.8.6	Tree Star Inc, Ashland, USA
Statistik- & Analyseprogramm GraphPad Prism	5	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
MS Office	2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Mikroskop-Software Axio Vision Release	4.7.2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany
CASY Software TTC Measuring and Monitoring Device CASY measure	1.56	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Germany
Auswerte-Software des Plattenlese- gerätes "Microplate Manager"	5.2	

Nanodrop 1000 Operating Software

### 2.1.3. Chemikalien, Reagenzien

<u>Chemikalien</u>	<u>Katalog-Nr.</u>	<u>Firma</u>
Dulbecco's PBS	H15-002	PAA Laboratories GmbH, Pa- sching, Austria
Accutase	L11-007	PAA Laboratories GmbH, Pa- sching, Austria
Vincristin	V8879	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

Cobalt(II)chlorid-hexahydrat	C8661-25G	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Kälberserum (FCS Gold)	A15-151 lot #: A15106-0754	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Kälberserum (FCS)	SV 30160.03 lot#: RVG 35422	Hyclone, Loghan, USA
Annexin V-FITC	640906	Biolegend, San Diego, USA
7-AAD	A9400	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 %	3070.1	Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, Germany
Annexin-Bindepuffer	422201	Biolegend, San Diego, USA
ConA	C0412	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Live/Dead Marker	L34955	Molecular Probes - Invitrogen Cor- poration, Carlsbad, USA
CFSE	C1157	Molecular Probes - Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Glutamin	25030-024	GIBCO Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Aqua ad iniectabilia Braun	2351744	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
CASY-Tone	05651808001	Roche Diagnostica GmbH, USA
αMEM	E15-832	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
HEPES, 1M	L1316	Biochrom AG, Berlin, Germany
Trypan-Blau, 0,4 %	T8154	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
ELISA-Kit Rat IFNγ ELISA Ready-Set-Go!	88-7315-88	EMELCA Bioscience, Breda, Netherlands
Trypsin/EDTA	15400-054	GIBCO Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
RPMI 1640	E15039	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Paraformaldehyde (PFH)	P6148	Serva Fein Biochemicals, Heidel- berg, Germany
R Margantaathanal (R ME)		Sigma Aldrich St. Louis LISA
p-mercaptoetrianor (p-m⊑)	MF522	Sigina-Alunon, St. Louis, USA
Dulbecco's MEM	MF522 FG0415	Biochrom AG, Berlin, Germany
Dulbecco's MEM Gentamicin 50 ug/ml	MF522 FG0415 G1397l	Biochrom AG, Berlin, Germany Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's MEM Gentamicin 50 ug/ml Tween 20	MF522 FG0415 G1397I P2287	Biochrom AG, Berlin, Germany Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

## 2.1.4. Antikörper

Antikörper	<u>Katalog-Nr.</u>	<u>Firma</u>
Maus anti-Ratte-CD9-APC-AK	202526	Biolegend, San Diego, USA
Maus anti-Ratte-CD3-TCR-PE-AK	201107	BD Pharmingen, San Diego, USA
Maus anti-Ratte-CD8-PerCP-AK	201712	BD Pharmingen, San Diego, USA
Maus anti-Ratte-CD4-APC-AK	201509	BD Pharmingen, San Diego, USA

## 2.1.5. Verbrauchsmaterialien

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Katalog-Nr.</u>	<u>Firma</u>
Zellkulturflasche Corning T75 mit TC-behandelter Oberfläche	430641	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturflasche Corning T175 mit TC-behandelter Oberfläche	431080	Corning Incorporated, Corning, USA
Falcon high clarity Polypropylen conical Tubes, 15ml	352096	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Falcon high clarity Polypropylen conical Tubes, 50ml	352070	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen		
• blau (Ultratip)	686290	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany
• gelb	70.760.002	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Ger- many
• weiß	70.1130	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Ger- many
serologische Pipetten		BD Falcon, Franklin Lakes, USA
• 2 ml	357507	
• 5 ml	357543	
• 10 ml	357551	
• 25 ml	357535	
FACS-Röhrchen m. Deckel, 5 ml	352054	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
CASY-Cups	05651794001	Roche Innovatis AG, Reutlingen, Germany
Eppendorf-Gefäße		Eppendorf AG. Hamburg. Germany
Self Lock Tube		
• 0,5 ml	0030121023	
• 1,5 ml	0030120086	
• 2,0 ml	0030120094	
Pasteurpipetten f. Absaugpumpe		Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, Germany
Ultrazentrifugen-Röhrchen	344Ø48	Beckman Coulter, Brea, USA
Sterilisations-Filter Minisart Syringe Filter	16534	Satorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany
Nylon-Sieb 100µm	352360	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Spritzen BD Plastipak 20 ml	300629	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Sterilisationsfilter Stericup	SC GPU02RE	Merck Millipore, Billerica, USA
•		• •

Transferpipetten 3,5 ml	86.1171.001	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Germany
<ul> <li>Petrischalen aus Polystyren</li> <li>35 mm x 10 mm</li> <li>100 mm x 20 mm</li> </ul>	353001 351005	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
<ul><li>Zellkulturplatten, 6 Vertiefungen</li><li>Einzelverpackung</li><li>5er Pack</li></ul>	3516 3506	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturplatten, 24 Vertiefungen		Corning Incorporated, Corning, USA
ELISA Platten Nunc Maxisorp	44-2404-21	eBioscience Inc., San Diego, USA
ELISA Klebefolien	736-0127	VWR International, Dresden, Germany
Cryotube Vials	368632	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Descosept	301010	Dr. Schuhmacher GmbH, Malsfeld, Germany
Sterilium	975513	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Germany

### 2.1.6. Zell- und Tiermaterial

Zell-/Tiermaterial	<u>Firma</u>
Ratten, Stamm LEWIS, männlich (RT1A <sup>I</sup> )	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany
Ratten, Stamm Dark Agouti, männlich (RT1A <sup>sv</sup> )	Harlan Winkelmann, Borchen, Germany
Nierenepithelzellen NRK52e vom Rattenstamm Osborne Mendel (NRK)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Germany
Mesenchymale Stromazellen (MSC)	Gewinnung aus LEWIS- und DA-Ratten (s.o.)

### 2.1.7. Medien- & Puffer-Rezepturen

Medium	Zusammensetzung
NRK-Medium, serumhaltig	Dulbecco's MEM, 5 % FCS (PAA), 5ml Glutamin, 0,5 ml Gentamicin
NRK-Medium, serumfrei	Dulbecco's MEM, 5 ml Glutamin, 0,5 ml Gentamicin
MSC-medium, serumhaltig	MEM $\alpha\text{-Modification},$ 5 % FCS (Hyclone), 5 ml Glutamin, 0,5 ml Gentamicin
MSC-Medium, serumfrei	MEM $\alpha$ -Modification, 5 ml Glutamin, 5 ml Gentamicin
MLC-Medium	RPMI, 1 % Glutamin, 0,5 ml Gentamicin, βME
FACS-Puffer	PBS, 1 % FCS (PAA)
ELISA-Waschpuffer	PBS, 0,05 % Tween 20
Einfriermedium	90% FCS (PAA), 10% DMSO

#### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Allgemeines Arbeiten in der Zellkultur

#### 2.2.1.1. Kultivierung

MSC bzw. NRK52e-Zellen (kurz: NRKs oder NRK-Zellen) wurden in Zellkulturflaschen der Größen T75 (75 cm<sup>2</sup>) und T175 (175 cm<sup>2</sup>) im Inkubator kultiviert (siehe 2.1.5.). Dabei waren die Bedingungen im Inkubator, soweit nicht anders beschrieben, die folgenden: 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit. Als Medium für MSC wurde MEM Alpha-Modification verwendet, dem außerdem Serum, Glutamin und ein Antibiotikum zugesetzt wurden. NRK-Zellen wurden in Dulbecco's MEM herangezogen. Auch hier wurde das Medium durch Serum, Glutamin und ein Antibiotikum ergänzt (ausführlichere Beschreibung der Medienzusammensetzung s. 2.1.7.). Das Kulturmedium wurde alle drei bis vier Tage vollständig ausgetauscht, um optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen zu schaffen. Dabei wurde das Medium entfernt, verworfen und frisches Medium des gleichen Volumens in die Kulturflasche gegeben. In einer T175-Kulturflasche befanden sich jeweils 20-25 ml Medium, eine T75-Kulturflasche enthielt 10-12 ml Medium.

Um die gegenseitige Kontakt-Inhibition und andere metabolische Veränderungen als Reaktion auf die zunehmende Zelldichte zu verhindern, wurden die Zellen bei einer Dichte des Zellrasens von circa (ca.) 90 % der Kulturfläche passagiert. Dazu wurde das Medium zunächst vollständig entfernt und die Zellen dann enzymatisch von der Oberfläche gelöst. Dies geschah bei den MSCs mit Hilfe von ca. 2-3 ml Trypsin pro 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschenfläche. Unter o.g. Bedingungen wirkte dieses drei bis vier Minuten (Min.) auf die Zellen ein. Die Reaktion wurde, bezogen auf das verwendete Volumen der Enzymlösung, mit der ca. zweieinhalb-fachen Menge serumhaltigen Kulturmediums gestoppt. Die NRK-Zellen wurden durch Accutase während einer Einwirkphase von 5-10 Min. im Inkubator gelöst. Auch hier betrug das benötigte Volumen etwa 3 ml pro 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschenfläche. Beendet wurde die Reaktion, bezogen auf das verwendete Volumen der Accutase-Lösung, durch Verdünnung mit der zweieinhalb-fachen Menge Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS). Danach wurden die Zell-Suspensionen 5 Min. bei 1200 Rotationen pro Minute (rpm) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Sofern nicht anders angegeben, fanden alle in den folgenden Abschnitten beschriebenen Zentrifugationsschritte unter den genannten Bedingungen statt. Die Zellen wurden schließlich gezählt (Fuchs-Rosenthal-Zählkammer) und gemeinsam mit frischem Medium wieder in neue Zellkulturflaschen eingebracht.

#### 2.2.1.2. Einfrieren und Auftauen

Ein durch die Expansion entstandener Überschuss an Zellen wurde nach dem Erntevorgang in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Zellen wurden, wie unter 2.2.1.1. beschrieben, geerntet, und nach dem Zählen erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das entstandene Pellet in Gefriermedium (1,5 ml/Einfrier-Röhrchen) resuspendiert. Dann wurde die Zell-Suspension zügig in bereits zuvor beschriftete Gefrier-Röhrchen überführt. Mit einer Einfrierhilfe wurden die Gefrierproben in einem Gefrierschrank langsam auf -80°C herunter gekühlt, um die Kristallbildung und damit das Absterben der Zellen zu verhindern. Nach einem oder zwei Tagen im Gefrierschrank wurden die Gefrierröhrchen dann der Lagerung im flüssigen Stickstoff zugeführt.

#### 2.2.2. Gewinnung von Zellmaterial

Alle Arbeiten unter Verwendung von Tieren oder Tiermaterial wurden entsprechend der Richtlinien des Tierschutzgesetzes und mit Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) durchgeführt.

Im Vorfeld des Projekts wurden die MSC aus dem Knochenmark (Femur und Tibia) verschiedener Ratten des Stammes Lewis und Dark Agouti (DA) isoliert.

Jede Zellcharge ist einem Versuchstier zugeordnet, wobei die Nummerierung der Reihenfolge der Isolation entspricht. Die Knochen der Hinterbeine wurden entnommen und in kaltes PBS gegeben. Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochen anschließend unter Zuhilfenahme von Präparations-Besteck von Weichteilgewebe befreit und gesäubert. Dann wurde der Knochen mittig mit einem Skalpell eingeschnitzt, in zwei Teile gebrochen und mit der offenen Bruchseite nach unten in Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden dann bei 3500 rpm für 2 Min. bei RT zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in MSC-Medium resuspendiert und dann durch ein Zellsieb (Porengröße: 100 µm) filtriert. Die so isolierten Zellen wurden in MSC-Medium auf zwei bzw. drei T75-Zellkulturflaschen aufgeteilt und im Inkubator kultiviert. Nach zwei und vier Tagen wurde das Medium komplett ausgetauscht und dabei nicht adhärente Zellen entfernt. Nach ca. sieben bis zehn Tagen Kultivierung erreichten die MSC eine Konfluenz von ca. 80 % und konnten weiter passagiert werden. Das Vorliegen von reinen MSC-Präparationen wird mittels spezifischer Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie überprüft. Die Zellen sind positiv für MHC-Klasse I, CD29 und CD90. Sie können außerdem, geringfügig positiv sein für CD80 und CD86. Gleichzeitig sind sie negativ für MHC-Klasse II und CD45. Nach der dritten oder vierten Passage lag bei den Ratten-MSC ein Anteil von weniger als zwei Prozent CD45-positiven Zellen vor. Die MSC wurden in serumhaltigem MSC-Medium (s.o.) kultiviert oder in flüssigem Stickstoff bei ca. -190 °C für gefroren. Zur Durchführung der verschiedenen Versuchsreihen wurden MSC der Passagen fünf bis elf verwendet.

Die verwendeten Lymphozyten für die Proliferationsuntersuchungen wurden aus den Lymphknoten (LK) von LEWIS und DA-Ratten isoliert. Es wurden axilläre, inguinale und abdominelle Lymphknoten der getöteten Ratte präpariert, in kalte PBS-Lösung überführt und unter sterilen Arbeitsbedingungen mit einer Pinzette von anhaftendem Fettgewebe befreit. Die enthaltenen Leukozyten wurden in ein Zellsieb (Porengröße: 100 µm) überführt, das sich in einer Petrischale mit kaltem PBS befand. Durch senkrechten Druck mit einem Spritzenstempel auf die LK im Sieb wurden die Zellen mechanisch extrahiert und durch die Siebporen in die PBS-Lösung gepresst. Der bindegewebige Anteil des LK (Stroma) verbleibt dabei im Sieb. Anschließend wurde die entstandene Einzelzell-Suspension zentrifugiert (10 Min., 1200 rpm, RT) und das Pellet erneut in kaltem PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal wiederholt, um beigemischte Erythrozyten und andere Zellen zu entfernen. Nach dem dritten Resuspendierungs-Vorgang wurde das Pellet dann in MLC-Medium aufgenommen.

Die Gewinnung des Zellmaterials fand mit freundlicher Unterstützung von Frau Meaghan Stolk statt.

Die NRK-Zellen wurden käuflich von der Firma Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erworben und in Kultur expandiert (siehe 2.2.1.1.). Für die Versuche wurden die Passagen fünf bis zwölf verwendet.

### 2.2.3. Herstellung von konditioniertem Medium und extrazellulären Vesikeln

### 2.2.3.1. Produktion von konditioniertem Medium

Hierzu wurden jeweils MSC (LEWIS und DA) der verschiedenen Chargen in T75- oder T175-Zellkulturflaschen in serumhaltigem MSC-Medium kultiviert (siehe 2.2.1.1.). Beim Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurde das serumhaltige Kulturmedium entfernt und eine äquivalente Menge PBS in die Kulturflaschen gegeben. Durch sanfte Schwenkbewegungen (fünf Mal vorsichtig zu jeder Seite) wurde die Flüssigkeit über die Zelladhäsionsfläche bewegt, anschließend wieder abgenommen und verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt bevor 10 ml (T75) bzw. 25 ml (T175) serumfreies MSC-Medium in die jeweilige Kulturflasche gefüllt wurden. Die Zellen wurden dann 24 Stunden darin kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und zentrifugiert (10 Min., 1200 rpm, RT). Mithilfe eines Spritzenfilter-Systems (Porengröße: 0,2 µm) wurde der entstandene Überstand von möglichen Zellbruchstücken befreit. In die Kulturflaschen wurde wieder 10-12 ml (T75) bzw. 20-25 ml (T175) serumhaltiges MSC-Medium gegeben und die MSC darin weiterkultiviert. Die Kulturansätze wurden bei entsprechender Konfluenz der Zellen erneut zur Produktion von konditioniertem Medium (CM) herangezogen. Das gewonnene Medium wurde aliquotiert und in Volumenportionen von 10-12 ml bis zur weiteren Verwendung gefroren (-80 °C). Neben CM verschiedener Spender wurde außerdem ein Kontrollmedium (Kontroll-konditioniertes Medium, cCM) hergestellt. Hierfür wurde lediglich serumfreies Medium ohne Zellen für 24 Stunden inkubiert, alle weiten Schritte waren dann mit denen der CM-Herstellung der verschiedenen Zellspender identisch.

### 2.2.3.2. Produktion und Quantifizierung von extrazellulären Vesikeln

Bei der Produktion von extrazellulären Vesikeln (EV) wurde zunächst, wie unter 2.2.3.1. beschrieben, konditioniertes Medium mit Lewis-MSC produziert. Dies geschah zeitgleich in etwa zehn T175-Kulturflaschen (insgesamt ca. 250 ml CM), um am Ende des Herstellungsprozesses über eine ausreichende Menge EV verfügen zu können. Die MSC wurden bei einer Konfluenz von 90 % ebenfalls für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Aufgrund des höheren Volumens wurden die Überstände nach Zentrifugation jedoch durch einen großen Sterilisationsfilter (Porengröße: 0,22 µm) geleitet. Das Filtrat wurde dann gleichmäßig auf spezielle Ultrazentrifugen-Röhrchen verteilt. Die Differenz darf dabei maximal 3 µl zwischen dem Röhrchen mit dem höchsten und dem geringsten Volumen betragen. Aus diesem Grund musste die Verteilung sehr genau mit einer Feinwaage unter optimierten Bedingungen (Klimaanlage abgeschaltet, geschlossener Waagendeckel) kontrolliert werden. Die Ultrazentrifugen-Röhrchen wurden dann in spezielle Halterungen gesteckt und mit dem zugehörigen Halterungs-Deckel fest verschlossen. Der auf 4 °C vorgekühlte Ultrazentrifugen-Rotor wurde dann in der Zentrifuge befestigt und die Röhrchen-Halterungen mit Inhalt hinein gesteckt. Im Anschluss werden diese bei 29000 rpm für dreieinhalb Stunden bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend verworfen, wobei ein kleiner Rest als Negativkontrolle für die spätere Protein-Messung beiseite genommen und eingefroren wurde. Dann wurden die einzelnen Röhrchen mit Parafilm verschlossen und das entstandene Pellet mit Hilfe eines Schüttlers in einem geringen Volumen (0,5-1 ml) über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde auf Eis gelöst. Die entstandene EV-Lösung wurde portioniert und für die folgenden Experimente eingefroren (-80 °C), darunter auch eine separate, kleine Probe zur späteren Quantifizierung der Protein-Menge.

Die Menge an isolierten EV wurde indirekt über die Messung des Gehalts an Protein in der Lösung mit Hilfe des Analyse-Systems Nanodrop und der zugehörigen Softwarefunktion A280 bestimmt. Dies geschah auf folgende Weise:

Das Messgerät wurde zunächst geeicht, indem die Absorption von sterilisiertem Wasser als Null definiert wurde. Um zu wissen, welcher Teil der Absorption auf den Proteingehalt durch EV zurück zu führen ist, bestimmten wir die Absorption des serumfreien MSC-Mediums als Hintergrundabsorption. Diesen Wert zogen wir später vom Wert der EV-Lösung ab und erhielten so die Protein-Konzentration, die mit dem EV-Gehalt in der Lösung korrespondiert. Durch

Messung des Protein-Gehaltes des Überstandes nach Ultrazentrifugation konnten wir außerdem verifizieren, ob sich die EV nach Ultrazentrifugation wirklich im Pellet anreicherten.

### 2.2.4. Zellschädigungs-Ansätze

### 2.2.4.1. Wahl, Dosierung und Vorbereitung der schädigenden Induktoren

Zum Herbeiführen des Zelltodes wurden vier verschiedene Induktoren verwendet: Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), serumfreies Medium, Vincristin und Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>). Die Auswahl stützte sich dabei zum einen auf Angaben der Literatur, zum anderen sollen die Stoffe auch klinisch relevante Stressoren repräsentieren.

Bei der Dosierung dieser Stoffe orientierten wir uns zunächst ebenfalls an Literaturangaben, um diese dann im Rahmen von Vorexperimenten auf unser Projekt abzustimmen. Für  $H_2O_2$ wurde eine optimale Wirk-Konzentration von 2 mM ermittelt. Die Ausgangslösung wurde dafür entsprechend kurz vor der Verwendung im jeweiligen Experiment mit PBS verdünnt. Das serumfreie Medium wurde nach o.g. Angaben (s. 2.1.7.) hergestellt. Für Vincristin lag die optimale Wirkkonzentration bei 100 ng/ml. Um diese zu erstellen, wurde das in Pulverform vorliegende Zytostatikum zunächst durch Lösen in PBS auf eine Vorverdünnung von 1mg/ml eingestellt, die dann als Ausgangs-Konzentration für die weiteren Versuche diente. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Bei CoCl<sub>2</sub> fanden wir eine optimale Wirkkonzentration von 2000  $\mu$ M. Der kristalline Feststoff wurde in sterilem Ampullenwasser auf die Arbeitskonzentration von 100 mM gebracht. Auch diese Lösung wurde portioniert und für die kommenden Experimente bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.4.2. Durchführung der Schädigungs-Induktion

Im Vorfeld der Versuche wurden NRK-Zellen und MSCs in T75- oder T175-Zellkulturflaschen in jeweils serumhaltigem NKR-Medium oder MSC-Medium kultiviert. Am Tag der Zellaussaat wurden die Zellen dann geerntet und gezählt (s. 2.2.1.1.).

Final war eine Gesamtzahl von 10<sup>5</sup> Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturplatte (insgesamt sechs Vertiefungen) vorgesehen. Bei einer geplanten Behandlung mit CM oder EV wurden folglich je Vertiefung 10<sup>5</sup> NRK-Zellen ausgesät. In der direkten Ko-Kultur mit MSC, welche einen zahlenmäßigen Anteil von 25 % bzw. 50 % ausmachten, wurden entsprechend 7,5 x 10<sup>4</sup> bzw. 5 x 10<sup>4</sup> NKR-Zellen pro Vertiefung eingebracht. Hinzu kamen jeweils 2,5 x 10<sup>4</sup> bzw. 5 x 10<sup>4</sup> MSC. Es wurden zwei Vertiefungen für unbehandelte Kontrollansätze (nur NRK-Zellen plus Medium) und, pro Behandlungsform und Dosierung, ebenfalls je zwei Vertiefungen angelegt (Doppelansatz). Zur korrekten Voreinstellung der Gerätesoftware des Durchflusszytome-

ters (Vorgang der Kompensation) waren außerdem fünf weitere Zellproben, also fünf zusätzliche Vertiefungen nötig. In vier davon wurden jeweils 10<sup>5</sup> NRK-Zellen ausgesät. Von diesen sollte ein Ansatz später ungefärbt bleiben, je einer sollte ausschließlich mit Annexin V-FITC bzw. 7-AAD gefärbt werden und der letzte sollte beide Farbstoffe enthalten. In die verbleibende fünfte Vertiefung wurden je 5 x 10<sup>4</sup> NRK-Zellen und MSC gegeben und diese nach der Ernte ausschließlich mit anti-CD90 gefärbt. Zur Durchführung der Kompensation für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Färbe-Kontrollen einzeln gemessen.

Als Kulturmedium diente serumhaltiges NRK-Medium. In Ansätzen mit Behandlung durch CM bestand das Kulturmedium zu 50 % aus NRK-Medium und zu 50 % aus CM. Für die Kompensations-Kulturen wurde lediglich NRK-Medium verwendet. Das Gesamtvolumen betrug 2 ml pro Vertiefung. Um ihre Adhäsion zu ermöglichen, wurden die Zellen über Nacht im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

Nach 24 Stunden wurde das Medium verworfen und abhängig vom Induktor durch serumhaltiges oder serumfreies NRK-Medium ersetzt. In Ansätzen mit CM stellte dieses erneut einen Volumenanteil von 50% des Kulturmediums.



**Abb. 3: Exemplarisches Pipettierschema der Apoptose-Experimente.** In jede Vertiefung wurden  $5 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Für die Ansätze ohne Behandlung, für solche mit Behandlung durch konditioniertes Medium (CM) Mesenchymaler Stromazellen (MSC) und extrazellulären Vesikels (EV) von MSC sowie für drei der vier Kompensations-Vertiefungen wurden  $5 \times 10^5$  NRK-Zellen ausgesät. In Vertiefungen mit MSC/NRK-Ko-Kulturen wurden abhängig vom zahlenmäßigen MSC-Anteil (50 % bzw. 25 %)  $5 \times 10^4$  bzw.  $2,5 \times 10^4$  MSC vom Stamm Lewis oder Dark Agouti (DA) ausgesät und entsprechend  $5 \times 10^4$  bzw.  $7,5 \times 10^4$  NRK-Zellen hinzupipettiert. Dann wurde je Ansatz 2 ml Kulturmedium hinzugefügt. Mit Ausnahme der Ansätze mit CM entsprach dieses dem NRK-Medium. In Vertiefungen mit CM-Behandlung bestand es zu 50% aus NRK-Medium und zu 50% aus CM. Nach 24-stündiger Inkubationszeit fand ein Mediumwechsel statt (erneut überall 2ml NRK-Medium, ausgenommen sind CM-Ansätze mit 50 % NRK-Medium und 50 % CM). In Vertiefungen mit EV Behandlung wurden, wurden 10µg EV zugesetzt. Zudem verblieben Ansätze ohne Behandlung. Im Anschluss wurde je eine Kultur eines Doppelansatzes (rote Umrandung) einem der vier Induktoren ausgesetzt: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 µl pro Ansatz) serumfreies Medium (1ml CM ersetzt 1ml NRK-Medium), Vincristin (20 µl pro Ansatz). Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und mit Annexin V-FITC und 7-AAD gefärbt wurden.

Im Folgenden ist die Behandlung der experimentellen Ansätze beschrieben:

<u>Wasserstoffperoxid</u>: Nach Verwerfen des alten Mediums wurde frisches, serumhaltiges NRK-Medium in die Vertiefungen gegeben. Die Wasserstoffperoxid-Stammlösung wurde durch die Verdünnung von 1 : 50 auf eine Konzentration von 200 millimolar (mM) eingestellt. Dies geschah unmittelbar vor deren Einsatz im Versuch. Von dieser Lösung wurde nun je 20  $\mu$ l in eine beider Vertiefungen jedes Doppelansatzes (2 ml Volumen) gegeben, sodass dort eine Endkonzentration von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erreicht wurde. Die verbleibende Kultur dieses Ansatzpaares blieb uninduziert.

<u>Serumfreies Medium</u>: Nach Verwerfen des Ursprungsmediums wurden die Zellen drei Mal gewaschen, um sicher alle Reste von Serum zu entfernen. Im Anschluss wurde jeweils einem Ansatz jedes Paares serumfreies NRK-Medium (100% Volumenanteil) zugesetzt. Der jeweils andere erhielt serumhaltiges NRK-Medium und blieb so uninduziert.

<u>Vincristin:</u> Es wurde, nach Entfernung des Mediums vom Vortag, erneut serumhaltiges NRK-Medium in die Vertiefungen gegeben. Danach wird die Vincristin-Stammlösung nochmals im Verhältnis von 1:100 vorverdünnt. In die Vertiefung je eines der beiden Ansatz-Partner wurden dann davon 20 µl pipettiert, sodass die finale Vincristin-Konzentration in diesen Vertiefungen 100 ng/ml betrug.

<u>CoCl<sub>2</sub></u>: Auch hier wird, nach Verwerfen des alten Mediums, serumhaltiges NRK-Medium auf die Zellen gegeben. Aus einer der beiden Vertiefungen eines Doppelansatzes wurden 40  $\mu$ l des Kulturmediums entnommen. Anschließend wurden in die gleiche Vertiefung 40  $\mu$ l der vorbereiteten CoCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben, sodass sich dort eine Endkonzentration von 2 mM einstellte.

Abb. 3 zeigt ein vereinfachtes Pipettierschema der Zellschädigungs-Ansätze. In Tabelle (Tab.) 1 sind noch einmal Ausgangs-, Zwischen- und Endkonzentrationen der unterschiedlichen Zelltod-Induktoren in einer Übersicht zusammengefasst. Hier ist außerdem auch die Inkubationsdauer in Abhängigkeit vom Induktor aufgelistet. In Tab. 2 findet sich eine Pipettieranleitung für die Zelltod-Ansätze, nach Induktor sortiert.

Tab. 1: Übersicht über Konzentration und Inkubationsdauer der verwendeten Zelltod-Induktoren. Abkürzungserläuterung:
Konz.: Konzentration, Vol.: Volumen, m: milli, M: molar, g: Gramm, μ: mikro, n: nano, l: Liter h: Stunde, d: Tag, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : Wasser-
stoffperoxid, SFM: serumfreies Medium, CoCl <sub>2</sub> : Cobalt(II)chlorid

	Konz. der	Konz. der	Endkonz.	Inkubationszeit	
	Orsprungs-Losung	vorverdurinding	(Alisalz)		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 M	200 mM	2 mM	1 h	
SFM	-	-	-	1 d	
Vincristin	1 mg/ml	10 µg/ml	100 ng/ml	1 d	
CoCl <sub>2</sub>	100 mM	-	2 mM	1 d	

### MATERIAL UND METHODEN

**Tab. 2: Pipettieranleitung der Zelltod-Kulturen in Abhängigkeit vom Induktor.** Dargestellt ist die Pipettieranleitung der Zelltod-Kulturen mit Kompensationen (Komp.), Kontrollkulturen (Kontrolle) und den verschiedenen Behandlungsoptionen: Mesenchymale Stromazellen (MSC; Anteil 50% bzw. 25% der Gesamtzellzahl eines Ansatzes), konditioniertes Medium (CM) und extrazelluläre Vesikel (EV). Diese Ansätze sind in Abhängigkeit von den Induktoren (grau unterlegt) aufgetragen: I) Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), II) serumfreies Medium (SFM), III) Vincristin (Vincr.), IV) Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>), weitere Abkürzungen: Konz.: Konzentration, ind.: induziert, m: milli, M: molar, μ: Mikro, I: Liter, g: Gramm.

1	NRK	MSC	СМ	EV	$H_2O_2$	NRK-	Gesamt-
	10 <sup>6</sup> /ml	10 <sup>6</sup> /ml			10M	Medium	Volumen
	[µl]	[µl]	[µl]	[µg]	[µl]	[µl]	[µl]
Komp.	100	-	-	-	-	1900	2000
Kontrolle	100	-	-	-	-	1900	2000
Kontrolle (ind.)	100	-	-	-	20	1880	2000
MSC - 50% - 25%	50 75	50 25	-	-	-	1900	2000
MSC (ind.) - 50% - 25%	50 75	50 25	-	-	20	1880	2000
СМ	100	-	1000	-	-	900	2000
CM (ind.)	100	-	1000	-	20	880	2000
EV	100	-	-	10	-	1900	2000
EV (ind.)	100	-	-	10	20	1880	2000

П	NRK	MSC	СМ	EV	SFM	NRK-	Gesamt-
	10 <sup>6</sup> /ml	10 <sup>6</sup> /ml				Medium	Volumen
	[µl]	[µl]	[µl]	[µg]	[µl]	[µl]	[µl]
Komp.	100	-	-	-	1900	1900	2000
Kontrolle	100	-	-	-	-	1900	2000
Kontrolle (ind.)	100	-	-	-	1900	-	2000
MSC - 50% - 25%	50 75	50 25	-	-	-	1900	2000
MSC (ind.) - 50% - 25%	50 75	50 25	-	-	1900	-	2000
СМ	100	-	1000	-	-	900	2000
CM (ind.)	100	-	1000	-	900	-	2000
EV	100	-	-	10		1900	2000
EV (ind.)	100	-	-	10	1900	-	2000
# MATERIAL UND METHODEN

ш	NRK	MSC	СМ	EV	Vincristin	NRK-	Gesamt-
	10 <sup>6</sup> /ml	10 <sup>6</sup> /ml			10µg/ml	Medium	Volumen
	[µl]	[µl]	[µl]	[µg]	[µl]	[µl]	[µl]
Komp.	100	-	-	-	-	1900	2000
Kontrolle	100	-	-	-	-	1900	2000
Kontrolle (ind.)	100	-	-	-	20	1880	2000
MSC - 50% - 25%	50 75	50 25	-	-	-	1900	2000
MSC (ind.) - 50% - 25%	50 75	50 25	-	-	20	1880	2000
СМ	100	-	1000	-	-	900	2000
CM (ind.)	100	-	1000	-	20	880	2000
EV	100	-	-	10	-	1900	2000
EV (ind.)	100	-	-	10	20	1880	2000

IV	NRK	MSC	СМ	EV	CoCl <sub>2</sub>	NRK-	Gesamt
	10 <sup>6</sup> /ml	10 <sup>6</sup> /ml			100 mM	Medium	Volumen
	[µl]	[µl]	[µl]	[µg]	[µl]	[µl]	[µl]
Komp.	100	-	-	-	-	1900	2000
Kontrolle	100	-	-	-	-	1900	2000
Kontrolle (ind.)	100	-	-	-	40	1860	2000
MSC - 50% - 25%	50 75	50 25	-	-	-	1900	2000
MSC (ind.) - 50% - 25%	50 75	50 25	-	-	40	1860	2000
СМ	100	-	1000	-	-	900	2000
CM (ind.)	100	-	1000	-	40	860	2000
EV	100	-	-	10	-	1900	2000
EV (ind.)	100	-	-	10	40	1860	2000

Alle Zellkulturplatten wurden nach Zugabe des jeweiligen Induktors vorsichtig geschwenkt und daraufhin im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Ernte der verschiedenen Versuchsansätze fand zeitlich abhängig vom Induktor statt: Bei Verwendung von  $H_2O_2$  bereits nach einer Stunde Inkubationsdauer, bei den übrigen Induktionsformen 24 Stunden nach Zelltod-Induktion. Alle Einzelschritte der Zellernte wurden auf Eis vorgenommen.

Zunächst wurden die Kulturüberstände aller experimentellen Ansätze abgenommen in Durchflusszytometrie-Röhrchen gesammelt. Danach wurden die Zellen in den Vertiefungen mit 500 µl PBS gewaschen und diese Flüssigkeit mit dem jeweiligen Überstand gepoolt. Die Zellen wurden im nächsten Schritt mit Hilfe von Accutase aus den Vertiefungen gelöst. Dazu wurden ca. 900 µl Accutase in jede Vertiefung gegeben und die Platten für 5-10 Min. inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen wurden verbleibend-adhärente Zellen nach Ablauf dieser Zeit noch gelöst und die Zell-Suspension der verschiedenen Vertiefungen in die jeweils korrespondierenden Röhrchen pipettiert. Dann wurde ein weiteres Mal mit 500 µl PBS gewaschen. Auch diese Flüssigkeit wurde in den jeweiligen Röhrchen aufgefangen und diese schließlich alle bei 1200 rpm für 5 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Zellpellet vorsichtig im Flüssigkeits-Rückstand resuspendiert.

## 2.2.4.3. Anti-CD90-Färbung

Bevor die Viabilität der Zellen festgestellt werden kann, ist es wichtig MSC und NRK-Zellen voneinander abgrenzen zu können. Hierzu wird die Zell-Suspension mit einem anti-CD90-APC-Antikörper versetzt, der nur die MSC, aber nicht die NRK-Zellen färbt. Dafür wurde zunächst ein Mastermix angefertigt, indem anti-CD90-APC-AK im Verhältnis von 1 : 3000 in Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Puffer verdünnt wurde. Mit Ausnahme der Kompensations-Kontrollen, wurden 50 µl davon auf alle Proben gegeben. Von den Kompensations-Ansätzen erhielt lediglich die Probe mit der MSC/NRK-Ko-Kultur ebenfalls 50 µl des Mastermixes. In die übrigen vier Kompensations-Kontrollen wurden 50 µl reiner FACS-Puffer pipettiert. Anschließend inkubierten dann alle Proberöhrchen bei 4 °C in Dunkelheit für 30 Min., bevor die Bindungsreaktion des AK durch die Zugabe von je 2 ml kaltem FACS-Puffer abgestoppt wurde. Die Proben wurden erneut bei 1200 rpm, 5 Min. und 4 °C zentrifugiert und die Überstände im Anschluss verworfen.

## 2.2.4.4. Viabilitäts-Färbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD

Um Aufschluss über die Viabilität der Zellen zu erhalten, sollen diese mit Annexin V-FITC und 7-AAD gefärbt werden. Im Vorfeld wurde deshalb zunächst eine 7-AAD-Vorverdünnung erstellt. Hierfür wurde die zugehörige Basislösung im Verhältnis 1:8 mit Annexin-Bindepuffer verdünnt. Auf dieser Basis wurde dann ein Mastermix erstellt, der pro gefärbter Probe 2 µl Annexin V-FITC, 2 µl 7-AAD-Vorverdünnung und 50 µl Annexin-Bindepuffer enthielt. Alle Proben, mit Ausnahme der Kompensations-Kontrollen, wurden mit 50 µl dieses Mixes versetzt. Auch eine der Kompensations-Kontrollen, nämlich die, welche für eine kombinierte Färbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD vorgesehen war, erhielt ebenfalls 50 µl des Mastermixes. Von den übrigen Kompensations-Ansätzen wurden die Probe mit der anti-CD90-Färbung sowie die uninduzierte Kompensations-Kontrolle mit 50 µl des Annexin-Bindepuffers versetzt. Zu den beiden verbleibenden Kompensations-Kontrollen wurde ebenfalls 50 µl Annexin-Bindepuffer gegeben, wobei in ein Ansatz zusätzlich mit 2 µl Annexin V-FITC und der andere mit 2 µl 7-AAD-Vorverdünnung versetzt wurde. Die Proben inkubierten 15 Min. bei Raumtemperatur, bevor die Bindungsreaktion durch Zugabe von 200 µl kaltem Annexin-Bindepuffer beendet wurde. Gemäß der Vorgabe des Herstellers fand die anschließende, durchflusszytometrische Analyse innerhalb einer Stunde statt.

## 2.2.4.5. Gating-Strategie

Zur Analyse der gewonnen FACS Daten wurde die Software FlowJo verwendet. Nach der Kalibrierung durch die Kompensations-Proben, konnte der Messprozess beginnen. Da sowohl vitale als auch tote Zellen betrachtet werden sollten, wurden bei der Auftragung von Vorwärtsgegen Seitwärts-Scatter alle Zellen mit eingeschlossen. Lediglich die Punkte, die aufgrund ihrer Position im Streudiagramm Zellbruchstücke repräsentierten, wurden von dieser Auswahl ausgeschlossen. Um die beiden kultivierten Zelltypen, MSC und NRK-Zellen, voneinander unterscheiden zu können, wurde dann die anti-CD90-Färbung gegen den Vorwärts-Scatter aufgetragen. Wichtig hierfür ist, dass CD90 als ein Marker definiert ist, der auf MSC aber nicht auf NRK-Zellen vorkommt. Die beiden Populationen wurden dann getrennt voneinander weiteranalysiert. Im letzten Schritt wurden beide Zelltypen anhand ihrer Positivität für Annexin V und 7-AAD auf Viabilität analysiert. Die beschriebene Gating-Strategie ist beispielhaft nochmals in Abb. 4 aufgeführt.



Abb. 4: Beispielhafte Darstellung der Gating-Strategie zur Viabilitäts-Färbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD und zur anti-CD90-Färbung. A: Die gewünschte Zellpopulation wurde über den Vorwärts- und Seitwärts-Scatter eingegrenzt. Dabei wurden sowohl die Population aus kleineren Zellen (links im Streudiagramm) als auch die der größeren Zellen (rechts im Streudiagramm) eingeschlossen. B: Die eingeschlossenen Zellen werden durch Auftragen der CD90 Färbung gegen den Vorwärts-Scatter auf ihren Ursprung untersucht, wobei sich CD90 nicht auf NRK-Zellen, sondern auf MSC befindet. Beide Zelltypen werden getrennt voneinander jeweils durch Auftragen der Marker Annexin V-FITC und 7-AAD gegeneinander auf ihre Viabilität untersucht. Bild C zeigt dabei die Viabilität der MSCs, Bild D die der NRK52 Zellen.

# 2.2.5. Proliferation von Ratten T-Lymphozyten im Beisein von MSC oder ihrer Produkte

## 2.2.5.1. Durchführung der Proliferationsansätze

Zur Induktion der T-Zell-Proliferation wurde Concanavalin A (ConA) verwendet. Es wurde ausgehend von einer Stammlösung von 1 mg/ml mit gemischtem Lymphozyten-Kultur(MLC)-Medium auf eine Arbeitskonzentration von 40 µg/ml verdünnt. Einen Tag vor Proliferations-Induktion der T-Zellen wurden die MSC aus Zellkulturflaschen geerntet (s. 2.2.1.1.) und nach dem Zählen zu je 2 x 10<sup>5</sup> Zellen in einem Volumen von 1 ml pro Vertiefung ausgesät. Hierbei wurden Zellkultur-Platten mit je 24 Vertiefungen verwendet. Dann wurden in die Zellen über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Am Folgetag wurden die aus den Ratten-Lymphknoten isolierten Leukozyten zunächst, wie unter 2.2.2. beschrieben, aufbereitet, dann gezählt und, nachdem ein kleiner Teil der Zellen abgenommen wurde, schließlich mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) markiert. Dazu wurden 3,2 µl CFSE-Stammlösung auf 100 Millionen (Mio.) Leukozyten in Lösung gegeben und diese dann bei RT für 3 Min. im Dunkeln unter vorsichtigem Schwenken inkubiert. Die Reaktion wurde durch Beigabe eines äquivalenten Volumens Fetales Bovines Serum (FBS) und Mischung der Lösung über 1 Min. gestoppt. Anschließend wurde noch drei Mal mit MLC-

Medium gewaschen (Zentrifugation und Resuspendierung des Pellets), die Zellzahl in der Suspension anschließend erneut bestimmt und mit MLC-Medium auf eine Dichte von 4 x 10<sup>6</sup> Leukozyten gebracht. In alle Kavitäten, die Versuchskulturen enthalten sollten, wurden dann je 2 x 10<sup>6</sup> der gefärbten Leukozyten in einem Volumen von 0,5 ml eingebracht. Neben den mit MSC behandelten Kulturen wurden außerdem Ansätze zur Behandlung mit CM und EV sowie Kontroll-Kulturen ohne Behandlung und Kompensations-Kulturen angelegt. Mit Ausnahme der Kompensations-Kontrollen wurden alle Ansätze in doppelter Form vorbereitet: uninduziert (ohne ConA) und induziert, also mit ConA-Zugabe. Für jeden Ansatz-Typ gab mehrere Kulturen (meist zwei bis drei Stück), abhängig von der Verfügbarkeit von Zellmaterial bzw. Behandlungssubstanz. In den Vertiefungen mit MSC-Ko-Kultur betrug das Verhältnis von MSC : Leukozyten 1:10. Ein exemplarisches Pipettierschema für die Proliferations-Experimente zeigt Abb. 5. Eine Pipettieranleitung mit Mengenangaben zeigt Tab. 3.

In die Kavitäten mit der Leukozyten-Suspension wurde MLC-Medium hinzu pipettiert, außerdem wurde in Abhängigkeit von der geplanten Behandlungsmethode MSC-Suspension, CM und EV der Lösung zugegeben. Die Hälfte aller Ansätze identischer Zusammensetzung wurden dann mit ConA-Arbeitslösung versetzt, sodass die Endkonzentration von ConA in den



Abb. 5: Exemplarisches Pipettierschema der Proliferations-Experimente. Es wurden je 200 000 Mesenchymale Stromazellen (MSC) verschiedener Spender (Lewis (Lew) oder Dark Agouti (DA)) mit MLC-Medium in dafür vorgesehene Vertiefungen ausgesät und über Nacht inkubiert. Dann wurden zu diesen Kulturen 2 Mio. Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester(CFSE)-gefärbte Leukozyten (LZ) pipettiert (Verhältnis MSC: Leukozyten 1 : 10). Zudem wurden 2 Mio. CFSE-gefärbte Leukozyten in MLC-Medium in weitere Vertiefungen eingebracht. Jeweils die Hälfte dieser Ko-Kultur- bzw. Monokultur-Ansätze wurden mit Concanavalin A (ConA, gelber Blitz, Endkonzentration in Kavität 10µg/ml) versetzt. Die andere Hälfte blieb uninduziert (durchgestrichener Blitz). In Vertiefungen ohne MSC wurden entweder konditioniertes Medium verschiedener Spender (CM, ersetzt 50% des Kulturmediums), ein Kontrollmedium (cCM, ersetzt 50% des Kulturmediums) oder extrazelluläre Vesikel (EV) zugesetzt. Einige Vertiefungen blieben unbehandelt, um später als Kontroll-Kulturen oder für Kompensationen genutzt werden zu können. Für weitere Kompensations-Kulturen wurden außerdem auch ungefärbte Leukozyten-Kulturen angelegt. Zur Vereinfachung steht das X für verschiedene Isolationen von MSC und MSC-CM aus Lewis-Ratten. Leere Kavitäten auf der Zellkulturplatten sind mit einem "/" gekennzeichnet.

10 µg/ml betrug. Eine genaue Übersicht der jeweiligen Zusammenstellung findet sich in Tab. 3. Daneben wurden für jedes Experiment zusätzlich Kompensations-Kontrollen angesetzt. Mit Ausnahme von zwei Proben wurden hierfür die Leukozyten verwendet, welche vor dem Färben zur Seite gestellt worden waren und daher keine Färbung durch CFSE erhalten hatten. Den Kompensations-Kulturen wurde dann ConA zugesetzt.

Die Proben wurden für vier Nächte im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach dieser Inkubations-Periode wurden aus jedem Ansatz zweimal je 400 µl Überstand abgenommen. Dies musste vorsichtig nahe der Oberfläche geschehen, um möglichst keine der nicht adhärenten Leukozyten in die Pipette aufzunehmen, die sich auf den Boden der Kavität befanden. Die Kulturflüssigkeit wurde in beschrifteten Eppendorf-Gefäßen bei -80 °C für die spätere Zytokin-Analyse eingefroren. Dann wurden die Kulturen mikroskopiert (20-fache Vergrößerung) und repräsentative Areale fotografiert.

Danach fand die Zellernte statt. Dazu wurde die Leukozyten-Suspension mit einer Pipette aufgenommen und die Vertiefung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren ausgewaschen. Bei der Aufnahme der Flüssigkeit wird dabei der Boden der Kavität nicht unmittelbar berührt. Die Zell-Suspension wurde schließlich vollständig aufgenommen und in zuvor beschriftete, kleine FACS-Röhrchen pipettiert.

Die Durchführung der Proliferations-Versuchsreihen fand mit freundlicher Unterstützung von Frau Meaghan Stolk statt.

Tab. 3: Pipettieranleitung der Proliferations-Ansätze. Dargestellt ist die Pipettieranleitung der Prolifertions-Kulturen mit Kom-
pensationen (Komp.), Kontrollkulturen (Kontrolle) und den verschiedenen Behandlungsoptionen: Mesenchymale Stromazellen
(MSC; Anteil 50% bzw. 25% der Gesamtzellzahl eines Ansatzes), konditioniertes Medium (CM) und extrazelluläre Vesikel (EV).
Diese Ansätze sind in Abhängigkeit von der Mitogen-Stimulation mit Concanavalin A (ConA; grau unterlegt) aufgelistet. weitere
Legende: Komp.: Kompensationen, LZ: Leukozyten, MLC-Med.: Medium für die gemischte Lymphozyten-Kultur (mixed lympho-
cyte culture medium), Lsg.: Lösung, Ges.Vol.: Gesamtvolumen, ml: Milliliter, g: Gramm.

	LZ-Suspen-	MLC-	MSC-Suspen-	СМ	EV	ConA-	Ges.
	sion [ml]	Med. [ml]	sion [ml]	[ml]	[µg]	Lsg. [ml]	Vol. [ml]
Komp.	0,5	1,5	-	-	-	-	2
Kontrolle	0,5	1,5	-	-	-	-	2
Kontrolle (ConA)	0,5	1	-	-	-	0,5	2
MSC	0,5	0,5	1	-	-	-	2
MSC (ConA)	0,5	-	1	-	-	0,5	2
CM	0,5	0,5	-	1	-	-	2
<b>CM</b> (ConA)	0,5	-	-	1	-	0,5	2
EV	0,5	1,5	-	-	10	-	2
EV (ConA)	0,5	1	-	-	10	0,5	2

## 2.2.5.2. Färbung

Zur Färbung der Leukozyten wurde ein Mastermix angefertigt, bestehend aus verschiedenen murinen, monoklonalen AK gegen Ratten-Antigene sowie Live/Dead-Marker gelöst in FACS-Puffer. Dabei färbt Anti-TCR-PE den T-Zell-Rezeptor (TCR), anti-CD4-APC markiert das für T-Helferzellen typische Oberflächenantigen CD4 und anti-CD8-PerCP bindet an das für T-Killerzellen spezifische Epitop CD8. Der Live/Dead Marker markiert tote Zellen. Die Herstellung des Mastermixes erfolgte nach dem folgenden Schema: Pro anzufärbender Probe wurde je 1 µl anti-TCR-PE, anti-CD4-APC und anti-CD8-PerCP sowie 0.4 µl des Live/Dead-Markers und 50 µl FACS-Puffer gemischt. Von dieser Mischung wurde allen Proben, mit Ausnahme der Kompensations-Kontrollen, je 50 µl zugesetzt. Bei vier der Kompensations-Kontrollen mit ungefärbten Leukozyten wurde je nur ein Marker zur Färbung verwendet. In je ein Röhrchen wurde also entweder 1 µl anti-TCR-PE, 1 µl anti-CD4-APC, 1 µl anti-CD8-PerCP oder 0,4 µl Live/Dead-Marker Lösung pipettiert. Eine weitere Probe mit CFSE-gefärbten sowie eine mit nativen Leukozyten blieben frei von weiterer Färbung. Die verbleibenden Proben, eine mit nativen und eine mit gefärbten Leukozyten, erhielten ebenfalls 50 µl des genannten Mastermixes. Die Proben wurden dann 30 Min. bei 4 °C und Dunkelheit in dieser Mischung inkubiert und nach Beendigung durch Zugabe von je 200 µl FACS-Puffer pro Röhrchen mit kaltem Paraformaldehyd (PFA, 1%) fixiert. Bis zur Messung mit dem FACS (s. 2.3.3.) wurden die Proben bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Es wurden unstimulierte T-Lymphozyten mit durch ConA stimulierte T-Zellen verglichen. Entsprechende Messungen wurden für TCR-positive (TCR+) T-Zellen, sowie für die Subpopulationen der CD4-positiven (CD4+) und CD8-positiven (CD8+) T-Lymphozyten durchgeführt. Bei der Auswertung wurde der Anteil proliferierter T-Zellen der jeweiligen Population aus den ConA-stimulierten Proben zum Kontrollwert erklärt und dieser als 1 definiert. Dann wurde der Anteil proliferierter T-Lymphozyten in den unstimulierten Kulturen hierzu in Relation gesetzt. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abb. 6 graphisch zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass sowohl unter den TCR+ T-Zellen als Ganzes als auch in den Subpopulationen (CD4+ oder CD8+) eine signifikante Steigerung (jew. p < 0.001) der Proliferation in den mit ConA stimulierten Proben stattfand. Im Pool aller T-Zellen im Gesamten beträgt der Anteil proliferierter Zellen in den unstimulierten Kulturen lediglich 0,04 ± 0,01 gegenüber dem Anteil in den induzierten Proben, bei den CD4+ T-Helferzellen sind es 0,03 ± 0,01 und bei den T-Killerzellen (CD8+) 0,07 ± 0,02.



Abb. 6: Concanavalin A (ConA) induziert die Proliferation von T-Lymphozyten verschiedener Populationen. Einer Lewis-Ratte wurden Lymphknoten entnommen, die Leukozyten daraus extrahiert und aufgereinigt. Die Zellen wurden dann mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) angefärbt und anschließend 2 x  $10^6$  Zellen in jede Vertiefung einer Zellkulturplatte pipettiert. Einem Teil der Proben wurde außerdem Concanavalin A (ConA, dunkelblaue Balken) zugegeben, der Rest wird ohne weiteren Zusatz belassen (hellblaue Balken). Die Kulturen wurden dann über vier Tage im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und hinsichtlich ihrer Expression von TCR, CD4 sowie CD8 gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil CFSE-positiver proliferierter Zellen erfasst und die Daten mittels T-Test ausgewertet. Dargestellt ist der Anteil proliferierter Lymphozyten ConA-Stimulation (dunkelblaue Balken) bzw. ohne Stimulation (hellblaue Balken) als Mittelwert ± SEM (n = 14-17; \*\*\* p < 0,001).

## 2.2.5.3. Gatingstrategie

Wie bei den Zellschädigungs-Experimenten auch, werden die durch Durchflusszytometrie gewonnenen Daten mit der Software FlowJo analysiert. Damit die Messwerte nicht durch aneinander haftende Zellen (Doubletten) verfälscht werden, mussten diese im Vorfeld ausgeschlossen werden. Dazu wurde ein standardisiertes Verfahren angewandt (exemplarisch dargestellt in Abb. 7). Dabei wurden zuerst einmal die Zelltrümmer ausgeschlossen. Dann wurde der Forwardscatter (FSC)-W gegen den FSC-H aufgetragen. Dabei werden alle von der Haupt-Population abweichenden Zellen ausgenommen. Danach wird der SSC-W gegen SSC-H aufgetragen und auch hier die Zellen, die sich deutlich von der Hauptpopulation abheben, aus dem Analyse-Fokus (Gate) entfernt. Gleiches geschah nach Auftragen von FSC-A gegen FSC-H. Die verbleibende Zellpopulation wurde der weiteren Analyse zugeführt.

Im Anschluss wurde der FSC-A gegen den Live/Dead-Marker aufgetragen. Vitale Zellen sind negativ für diesen Marker. Diese wurden selektiert und im nächsten Schritt gegen den TCR-PE aufgetragen. Durch gezielte Auswahl der TCR+ Zellen wurde ausschließlich Augenmerk auf T-Zellen gelegt. Die T-Lymphozyten werden durch Auftragung von CD8-PerCP versus CD4-APC im Streudiagramm voneinander getrennt angezeigt. Durch Selektion von CD4+ Zellen wurde die Population der T-Helferzellen definiert. Gleiches geschah durch selektive Auswahl von CD8+ Zellen (zytotoxische T-Zellen). Das dargelegte Analyseschema ist beispielhaft in Abb. 8 aufgeführt.



Abb. 7: Gating-Strategie zum Ausschluss von Dubletten im Streudiagramm. Nachdem (A) die Zellbruchstücke ausgeschlossen sen wurden, wurden die Dubletten ausgeschlossen. Dies geschah in folgenden drei Schritten, wobei immer das zuerst genannte auf der x-Achse, das an zweiter Stelle stehende auf der y-Achse aufgetragen wurde. B: FSC-W gegen FSC-H. C: SSC-W gegen SSC-H. D: FSC-A gegen FSC-H. Jeweils die Zellen, die sich von der Haupt-Population abhoben, wurden bei den einzelnen Schritten ausgeschlossen.



Abb. 8: Gating-Strategie zur Anfärbung von T-Zellen (TCR+) und deren CD4+ oder CD8+ Subpopulationen. Im Vorwärts-(FSC) und Seitwärts-Scatter (SSC) wurden (A) zunächst Zellbruchstücke ausgeschlossen. Nach dem Ausschluss der Doubletten (s. Abb. 7) wurden (B) die lebenden Zellen selektiert. D: Durch Eingrenzung von TCR+ Zellen wurden dann die T-Lymphozyten ausgewählt. E: Ihre Proliferation wurde mittels Quantifizierung der Fluoreszenz-Intensität von CFSE in den Zellen bestimmt. D: Die T-Zellen wurden dann nochmals in ihre Subpopulationen unterteilt, indem die CD4+ von den CD8+ Zellen gegeneinander aufgetragen wurden. Auch hier wurde, analog zur Vorgehensweise in E, die Proliferation der CD4+ (F) und die der CD8+ T-Zellen (G) bestimmt.

## 2.2.6. Zytokinanalyse

## 2.2.6.1. Vorbereitung von Material und Proben

Die folgenden Arbeitsschritte entsprachen den Empfehlungen und Vorgaben des Herstellers der verwendeten Produkte und Materialen. Für die Durchführung der ELISAs für IFNγ wurde ein ELISA-Test-Kit verwendet

Zu Beginn wurde der Beschichtungs-Puffer hergestellt. Hierzu wurde der Inhalt des im ELISA-Kit enthaltenen Beschichtungspuffers in einem Liter doppelt destillierten Wassers (ddH<sub>2</sub>O) gelöst. Diese Lösung wurde dann durch Filtration (Porengröße: 0,22  $\mu$ m) sterilisiert. Auch der Waschpuffer wurde vorbereitet. Hierzu wurden 250  $\mu$ l Tween in 500 ml PBS gelöst. Der Verdünnungspuffer (engl.: assay diluent) liegt ebenfalls in konzentrierter Form im ELISA-Kit vor und muss zur Versuchs-Durchführung verdünnt werden. Deshalb wurde ein Teil Verdünnungspuffer-Konzentrat mit vier Teilen ddH<sub>2</sub>O versetzt. Für jede Vertiefung waren hiervon 200  $\mu$ l nötig.

Der zur primären Beschichtung der Platte notwendige "Fang"-AK wurde auf Arbeitskonzentration gebracht, indem eine kleine Menge der entsprechenden, konzentrierten AK-Lösung (im Test-Kit enthalten) im fertiggestellten Beschichtungspuffer im Verhältnis 1 : 250 verdünnt wurde. Die Gesamtmenge musste ausreichend sein, sodass in jede Kavität der ELISA-Platte 100 µl der AK-Lösung eingebracht werden konnten. Auch der Detektions-AK wurde im Verhältnis 1 : 250 mit dem Beschichtungspuffer zu einer Arbeitslösung verdünnt. Die hier benötigte Menge errechnet sich analog zur Menge der Fang-AK-Lösung.

Darüber hinaus musste die mitgelieferte Standard-Lösung stufenweise mit Verdünnungspuffer herunterverdünnt werden. Die Standard-Konzentrationen dienten gemeinsam mit ihren späteren, korrespondierenden Messwerten dem Erstellen einer Standardkurve für den Versuch. Um eine Konzentration von 2000 pg/ml zu erzielen, mussten 10 µl dieser Lösung in 5 ml Verdünnungspuffer gelöst werden.

Die Werte aus Überständen ConA-stimulierter Leukozyten lagen deutlich über dem Maximalwert der Standardkurve erwartet. Um auch diese mit dem geringstmöglichen Fehler analysieren zu können, wurden die betreffenden Proben nach dem Auftauen in Verdünnungs-Puffer im Volumen-Verhältnis 1:10 (Probe : Verdünnungspuffer) verdünnt.

## 2.2.6.2. Experimentelle Durchführung

Am Tag vor der Versuchs-Durchführung wurden abhängig von der Anzahl der auszuwertenden Proben die Böden der Vertiefungen einer oder mehrerer ELISA-Mikrotiterplatten mit einem "Fang"-Antikörper beschichtet. Nach dem Benetzen der Vertiefungsböden mit je 100 µl Fang-AK-Vorverdünnung wurden die Platten mit speziellen Klebefolien verschlossen und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Das Volumen wurde am nächsten Tag mittels Absaugpumpe aus den Vertiefungen entfernt. Dabei musste genau darauf geachtet werden, die AK-Schicht auf dem Boden nicht durch Berühren mit der Absaugspitze zu beschädigen. Es folgten fünf Waschschritte, um alle freien Rückstände der Lösung zuverlässig zu beseitigen. Jeweils 250 µl ELISA-Waschpuffer wurden dabei in jede Vertiefung gegeben und nach 1 Min. Inkubationszeit durch Abschütten und Ausklopfen der Platte wieder entfernt wird. Nach fünfmaliger Wiederholung wurden schließlich 200 µl des vorbereiteten Proben-Lösungsmittels (engl.: assay diluent) in jede Kavität pipettiert, um durch Blockade spätere Kreuzreaktionen zwischen Antigen und unspezifischen Bindungsstellen an Platte oder AK zu verhindern. Nach einer Stunde Inkubation bei Zimmertemperatur wurde das Volumen erneut vorsichtig abgesaugt, es folgten dann weitere fünf Waschungen mit dem vorgesehenen Waschpuffer.

Es wurden dann die Standard-Verdünnungen aufgetragen. Dazu wurden 200 µl der vorbereiteten Lösung von 2000 pg/ml auf die Platte aufgetragen. In der folgenden Kavität wurde dann 100 µl von ebenfalls dieser Lösung mit 100 µl Verdünnungspuffer durch auf- und abpipettieren gemischt. Aus der nun entstandenen Verdünnung wurden 100 µl abgenommen und in die nächste Vertiefung mit ebenfalls 100 µl Verdünnungspuffer gegeben und wie zuvor gemischt. Diese Verdünnungen im Verhältnis 1 : 2 wurden bis zu einer Konzentration von 16 pg/ml fortgesetzt.

Nach sorgfältigem Mixen wurden schließlich 100 µl der einzelnen Proben zügig nach Vorlage eines Pipettierschemas auf die Platten aufgebracht. Die Platten wurden nun erneut mit Folie abgedeckt und für zwei Stunden im Dunkeln inkubiert.

Im Anschluss an diese Inkubations-Periode wurde erneut die Flüssigkeit durch Absaugen entfernt und fünf Mal gewaschen, wie bereits oben beschrieben. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe des Detektions-AK. Dieser wurde in einem Volumen von 100 µl vorbereiteter Vorverdünnung (s. 2.2.6.1.) pro Vertiefung eingebracht und die Platten wieder abgedeckt. Nach einer weiteren Inkubation von einer Stunde Dauer folgten wieder Absaugen und fünf-faches Waschen jeder Vertiefung. Danach wurden pro Kavität 100 µl Lösung zugegeben, die an Avidin gebundene Meerrettich-Peroxidase (HRP) enthielt. Diese konnte potentiell an die zu diesem Zweck mit Biotin konjugierten Detektions-AK binden. Es wird danach erneut für 30 Min. inkubiert, wieder abgesaugt und dieses Mal sieben Waschschritte durchgeführt. Es folgte die Zugabe von Substrat (100 µl Lösung je Kavität). Im Verlauf der Inkubationszeit von 15 Min. wird das Substrat durch die HRP in einen gelben Farbstoff umgewandelt. Diese Reaktion wurde dann durch Zugabe von 50 µl der vorbereiteten Stopp-Lösung in jede Vertiefung beendet.

### 2.2.6.3. Gewinnung und Verarbeitung der Werte

Die Daten wurden an Plattenlesegeräten ausgelesen. Dies geschah jeweils für die Wellenlängen 450 und 570 nm. Die Werte bei 570 nm wurden schließlich von denen bei 450 nm subtrahiert und die Resultate jeweils digital erfasst. Diese wurden dann graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet. Abb. 9 veranschaulicht die zugehörigen Resultate graphisch.

Dabei wurde deutlich, dass, wie bereits erwartet, in den mit ConA zur Proliferation angeregten Leukozyten-Kulturen signifikant größere Mengen IFN $\gamma$  im Zellüberstand vorhanden waren, als in den unstimulierten Proben. Es handelte sich dabei um eine Reduktion auf 0,10 ± 0,07 bezogen auf den Wert aus ConA-stimulierten Kulturen.



Abb. 9: In Concanavalin A (ConA) induzierten Proben ist die IFNγ-Konzentration signifikant höher als in nicht stimulierten Kulturen. Nach viertägiger Kultur von Lewis-Leukozyten mit ( $\emptyset$  ConA, hellrosa Balken) und ohne Stimulation durch ConA (ConA, pinker Balken) zum Kulturmedium wurden von jeder Probe Überstände entnommen und diese mittels ELISA auf ihren IFNγ-Gehalt analysiert. Dabei wurde der IFNγ-Wert der stimulierten Proben zum Kontrollwert erklärt und dieser als 1 definiert. Zu diesem wurden die Messwerte aus unstimulierten Leukozyten-Kulturen in Relation gesetzt. Gezeigt ist die relative IFNγ-Sekretion (jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 14-17) in Bezug auf den Kontrollwert (rote Linie). \*\*\* für p < 0,001, analysiert mittels T-Test.

## 2.2.7. FACS-Analytik

Die Versuchsproben zur Zelltod-Induktion und zur Proliferation von Immunzellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Das Prinzip beruht auf dem Auslesen optischer Signale, die durch Emission entstehen. Die Zellen sind durch spezielle Fluoreszenz-Färbungen markiert. Sie treten in einem Hüllstrom in einen Mikrokanal einer Küvette ein. Ein Laserstrahl kann durch das Material der Küvette (Glas oder Quarz) hindurch dringen. Bei der Passage dieses Strahls werden die verschiedenen Farbstoffe und Fluorochrome angeregt und senden daraufhin Licht aus, das als Streulicht oder auch Fluoreszenzlicht eingefangen und gemessen werden kann.

Über die Auswertung des gemessenen Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) ist die Bestimmung der Zellgröße möglich, das Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter, SSC) entsteht durch die Reflexion von Zellorganellen im Inneren der Zelle und dient zur Quantifizierung der Zellgranularität. Jede Färbung beschreibt für gewöhnlich eine Eigenschaft oder ein Merkmal einer Zelle. So kann man mit Fluoreszenz-markierten AK beispielsweise charakteristische Oberflächenmoleküle der Zellen optisch sichtbar machen. Andere Marker, wie z. B. das CFSE, färben ganz allgemein das Zytoplasma der Ursprungszellen, sodass man durch die Intensität der am Versuchsende vorhandenen Zytoplasma-Färbung auf die Häufigkeit der in der Zwischenzeit stattgehabten Zellteilungen rückschließen kann. Wieder andere Farbstoffe kennzeichnen selektiv bestimmte Strukturen innerhalb und außerhalb der Zelle. So interkaliert 7-AAD beispielsweise mit DNA, Annexin V bindet an bestimmte Phospholipide, sogenannte Phosphatidylserine, in der Membran von Zellen. Diese Strukturen werden durch das Farbsignal spezifisch markiert und die Zellen so charakterisiert. Auf diese Weise kann unter Berücksichtigung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der einzelnen Marker auf Eigenschaften, Typ-Zugehörigkeit und Zustände der gemessenen Zellen geschlossen werden. Innerhalb eines kurzen Zeitraums können sehr viele Ereignisse gemessen werden und ermöglichen es schon in nach kurzer Zeit, anhand der markierten Strukturen repräsentative Aussagen über die gemessene Zellpopulation treffen zu können.

## 2.2.8. Computergestützte Auswertung und Statistik

Die gewonnen Messdaten der Durchflusszytometrie wurden mit Hilfe der Software FlowJo ausgewertet. Die angewandte Gatingstrategie ist im Unterabschnitt der jeweiligen Versuchsreihe zu finden (s. 2.2.4.5 für die Zellschädigungs-Ansätze und 2.2.5.3. für die Proliferationsansätze). Um die verschiedenen Experimente besser miteinander vergleichen zu können, wurden die erhaltenen Werte normiert. Im Anschluss an die Normierung wurden die Daten mit dem One-sample T-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Ab einem Wert von p < 0,05 sprachen wir von statistischer Signifikanz. Diese wurde, abhängig vom p-Wert, wie folgt dargestellt: \*: p < 0,05, \*\*: p < 0,01, \*\*\*: p < 0,001. Bei der Wiedergabe der Ergebnisse ist immer der Mittelwert ± Standardfehler (SEM) dargestellt.

## 2.2.9. Grundsätze des wissenschaftlichen Arbeitens

Die Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden bei der Erstellung dieser Arbeit eingehalten.

## 3. ERGEBNISSE

# 3.1. Analyse anti-apoptotischer Effekte auf NRK-Zellen durch MSC und MSC-Produkte

Das Ziel dieser Versuchsreihe war die Untersuchung eines möglichen protektiven Effekts von MSC oder MSC-Produkten (CM oder EV) auf den Zelltod von Nierentubulus-Zellen. Hierzu wurde der Anteil toter bzw. absterbender NRK-Zellen gemessen, nachdem diese im Beisein von MSC oder ihren Produkten (CM oder EV) für eine definierte Zeit einem der Zelltod-Induktoren (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, serumfreies Kulturmedium, Vincristin oder CoCl<sub>2</sub>) ausgesetzt wurden. Zum Vergleich wurde die Anzahl toter NRK-Zellen aus Kulturen ohne eine Ko-Kultivierung mit MSC oder Zugabe von MSC-Produkten bestimmt.

## 3.1.1. Etablierung der Zellschädigungs-Induktion in NRK-Zellen

Bei der Analyse wurden verschiedene Formen von Zelltod unterschieden. Anhand der Färbung mit Annexin V und 7-AAD wurden die toten oder absterbenden Zellen entweder dem apoptotischen oder dem nekrotischen Zelltod zugeordnet. Die Summe beider Anteile wird im Folgenden unter dem Begriff Gesamtzelltod zusammengefasst. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt.

Anhand der Darstellungen im Streudiagramm lassen sich bereits Rückschlüsse auf die Viabilität der NRK-Zellen ziehen. Hierzu kann die beim Gating-Prozess erfolgte Aufteilung in Quadranten herangezogen werden. Dabei werden die Populationen der verschiedenen Quadranten bei der Annexin V/7-AAD-Färbung wie folgt definiert:

Lebendige Zellen befinden sich im unteren linken Quadranten, da sie sowohl negativ für Annexin V als auch für 7-AAD sind. Beide Substanzen sind nicht plasmamembrangängig und können so in intakte Zellen nicht aufgenommen werden. Im unteren rechten Quadranten sind die Zellen apoptotisch. Sie sind negativ für 7-AAD, aber positiv für Annexin V, das in der äußeren Lipidschicht der Plasmamembran lokalisierte Phosphatidylserin-Reste färbt. In der intakten Zelle sind Phosphatidylserin-Reste dem Extrazellulärraum nicht exponiert. Der FlipFlop-Prozess der Phopsphatidylserin-Reste von der Innen- an die Außenseite der Plasmamembran sowie die erhaltene Integrität der Plasmamembran sind Charakteristika der Apoptose. Da Annexin V die intakte Zellmembran nicht passieren kann, bindet es ausschließlich an außen liegende Reste. Die Zellen im oberen rechten Quadranten sind im Prozess der Nekrose, was u.a. bedeutet, dass die Integrität ihrer Plasmamembranen nicht mehr gewährleistet ist. Aus diesem Grund können sowohl Annexin V als auch 7-AAD in das Zytoplasma der Zellen eindringen und entsprechende Strukturen färben. Diese Zellpopulation zeigt sich positiv für beide Marker. Im oberen linken Quadranten sind die Zellen positiv für 7-AAD, aber negativ für Annexin V. Es handelt es sich bei diesen Ereignissen vermutlich um Zellbruchstücke mit Anteil von Nukleinsäuren (7-AAD positiv), jedoch ohne Bestandteile der Plasmamembran (negativ für Annexin V), die beim anfänglichen Gating mit eingeschlossen wurden. Sie werden keiner der besagten Zelltodformen zugeordnet, da zum Zeitpunkt der Messung nicht mehr nachvollzogen werden kann, welcher Form des Zelltodes die Zellen unterlagen, und auch keine genauen Rückschlüsse mehr auf die Anzahl der so abgestorbenen Zellen gezogen werden können.

Bei der Auswertung der Streudiagramme basierend auf dieser Einteilung zeigte sich, dass in den Proben ohne Induktor (Abb. 10 A a) große Mengen intakter Zellen vorhanden waren. Der Anteil intakter Zellen in Kulturen, die dem Induktor ausgesetzt waren, fiel deutlich geringer aus (Abb. 10 A b). Gleichzeitig zeigten sich in den Kulturen mit Induktor vermehrt geschädigte Zellen.

## 3.1.2. Auswirkung der verwendeten Induktoren auf die Zell-Viabilität

Bei der statistischen Auswertung der Anteile geschädigter NRK-Zellen wurden zunächst die Proben als Kontrollkultur erklärt, die mit einem Induktor versetzt, aber nicht mit MSC, CM oder EV behandelt wurden. Aus diesen wurde der Anteil geschädigter Zellen eines Zelltod-Typs zum Kontrollwert erklärt (apoptotisch, nekrotisch oder die Summe beider als Gesamtheit der geschädigten Zellen). Der Kontrollwert wurde dann als 1 definiert. Die Anteile der entsprechenden Zelltod-Form aus den behandelten Kulturen (Ko-Kultur mit MSC oder Zusatz von CM oder EV) wurden zum Kontrollwert in Relation gesetzt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind für die Gesamtheit der geschädigten Zellen stellt Abb. 10 B dar.

Im Vergleich zu den induzierten Kulturen, befanden sich in Proben, die nicht mit einem Induktor behandelt wurden, signifikant (p < 0,001) geringere Mengen geschädigter Zellen. Die Menge geschädigter NRK-Zellen in nicht-induzierten Kulturen verglichen mit der Zahl geschädigter NRK-Zellen in den induzierten Kulturen betrug im Falle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,34 ± 0,05 (Mittelwert ± Standardfehler/SEM), bei serumfreiem Kulturmedium 0,32 ± 0,05, unter Einfluss von Vincristin 0,42 ± 0,05 und 0,45 ± 0,08 für Kulturen, die mit CoCl<sub>2</sub> versetzt wurden.



Abb. 10: Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), serumfreies Medium, Vincristin und Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>) steigern den Anteil geschädigter Zellen in Kultur. NRK-Zellen wurden ohne und mit Zugabe eines Induktors (I: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, II: serumfreies Medium, III: Vincristin, IV: CoCl<sub>2</sub>) für einen Tag kultiviert und dann der Anteil geschädigter Zellen in den einzelnen Kulturen mit der Annexin V/7-AAD-Methode bestimmt. **A**: Darstellung der Anteile geschädigter Zellen im Streudiagramm, wobei in **A a**) Kulturen ohne Induktor-Zusatz und in **A b**) Kulturen mit Induktion gezeigt werden. **B**: Der Anteil der aller geschädigten NRK-Zellen (apoptotisch + nekrotisch) aus Kulturen mit Induktor wurde zum Kontrollwert erklärt und als 1 definiert (schwarze Balken) und der Anteil aller geschädigten NRK-Zellen aller aus Kulturen ohne Induktor hierzu in Relation gesetzt (graue Balken). Bei der statistischen Auswertung mittels T-Test (Mittelwert ± SEM, n = 4-6) zeigte sich im Gegensatz zu den nicht induzierten Proben ein signifikant größerer Anteil geschädigter Zellen in den induzierten Kulturen. \* p < 0,05; \*\* p < 0,001.

### 3.1.3. Auswirkung von MSC auf die Schädigung von NRK-Zellen

Für die Versuchsreihe wurden NRK-Monokulturen sowie MSC/NRK-Ko-Kulturen mit einem zahlenmäßigen Anteil der MSC von 50 % bzw. 25 % angelegt und unter Einfluss der verschiedenen Induktoren kultiviert. In allen Proben wurde der Anteil geschädigter Zellen bestimmt, wobei anhand der Annexin V/7-AAD-Methode zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen unterschieden wurde. Die Effekte der Ko-Kultur mit MSC auf das Zellsterben von NRK-Zellen in Bezug auf den Kontrollwert (s. 3.1.2.) zeigt Abb. 11.

Im Hinblick auf den Gesamtzelltod konnte unter keinem der angewandten Induktoren ein Effekt der MSC auf die Schädigung der NRK-Zellen gezeigt werden (Abb. 11 A). Bei selektiver Betrachtung der Apoptose zeigte sich unter den NRK-Zellen, die mit MSC unter  $H_2O_2$  kultiviert wurden, eine signifikant (p < 0,05) geringere Menge geschädigter Zellen (Abb. 11 B).



Abb. 11: Mesenchymale Stromazellen (MSC) haben eine protektive Wirkung auf die Apoptose von NRK-Zellen unter Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). NRK-Zellen wurden in Ko-Kultur mit Lewis-MSC (zahlenmäßiger Anteil 50% bzw. 25%) ausgesät und nach 24 Stunden einem der folgenden Induktoren für eine definierte Zeit ausgesetzt: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (hellgraue Balken), serumfreies Medium (mittelgraue Balken), Vincristin (dunkelgraue Balken) oder Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>, schwarze Balken). Nach der Ernte wurden die Zellen mit anti-CD90-APC-Antikörper, 7-AAD und Annexin V gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt ist der Anteil (A) geschädigter NRK-Zellen insgesamt, (B) apoptotischer und (C) nekrotischer NRK-Zellen (jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 4-8) nach Ko-Kultur mit MSC und Induktion. Sie wurden zum jeweiligen Kontrollwert (Anteil entsprechend geschädigter Zellen aus der induzierten NRK-Monokultur) in Relation gesetzt (Ø MSC; weiße Balken; Wert definiert als 1, rote Linie). \* p < 0,05 in Bezug auf den Kontrollwert, analysiert mittels T-Test.

In Kulturen mit einem Zellanteil von 50 % MSC betrug der Anteil apoptotischer NRK-Zellen unter Einfluss von  $H_2O_2$  nur 0,63 ± 0,07 und bei einem Anteil von 25 % MSC 0,78 ± 0,07 bezogen auf den Kontrollwert. Unter den übrigen Induktoren konnte keine Auswirkung der MSC auf den programmierten Zelltod von NRK-Zellen erfasst werden. Zudem konnte unter keinem der Induktoren ein Effekt der MSC/NRK-Ko-Kultur auf die Nekrose festgestellt werden (Abb. 11 C).

## 3.1.4. Wirkung konditionierter Medien aus MSC-Kulturen auf sterbende NRK-Zellen

Die Versuchsreihe diente der Untersuchung eines möglichen Effekts von MSC-CM auf das Sterben von NRK-Zellen. Für die Experimente wurden NRK-Zellen während ihrer Kultivierung im Beisein von CM verschiedener Spender je einem Induktor ausgesetzt. Die Kontrollkulturen wurden mit einem Kontrollmedium (cCM) anstelle des CM kultiviert. Der jeweilige Anteil geschädigter Zellen aus diesen Kulturen wurde gemäß dem Vorgehen in 3.1.2. zum Kontrollwert erklärt und als 1 definiert. Die übrigen Werte geschädigter Zellen unter CM und Induktor-Einfluss wurden zu diesem in Relation gesetzt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 12.

Die Zugabe von CM eines Spenders zeigte im Falle der Induktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Vincristin oder CoCl<sub>2</sub> keine Effekte auf die Menge aller geschädigter Zellen (apoptotisch + nekrotisch) gegenüber dem Kontrollwert (Abb. 12 A). Unter serumfreiem Medium hingegen konnte durch Zugabe der CM aller vier Spender (LEW-I bis -III und DA) ein signifikant geringerer Anteil geschädigter Zellen nachgewiesen werden (Abb. 12A). Dabei sank die Menge betroffener Zellen durch den Zusatz von CM des Spenders LEW-I auf 0,87  $\pm$  0,02 (p < 0,01), durch LEW-II-CM auf 0,76  $\pm$  0,08 (p < 0,05), nach Behandlung mit LEW-III-CM auf 0,74  $\pm$  0,08 (p < 0,05) und durch DA-CM auf 0,76  $\pm$  0,05 (p < 0,01).

Der Anteil apoptotischer NRK-Zellen konnte durch die Behandlung mit CM unter den verschiedenen Induktoren nicht reduziert werden (Abb. 12 B). Hingegen konnte unter serumfreiem Medium und Behandlung mit CM ein signifikant verminderter Anteil nekrotischer Zellen ermittelt werden (Abb. 12C). Dabei zeigte sich bei LEW-I-CM verglichen mit dem Kontrollwert eine Reduktion nekrotischer Zellen auf 0,71 ± 0,03 (p < 0,01), für LEW-II-CM auf 0,60 ± 0,04 (p < 0,01), bei Zugabe von LEW-III-CM auf 0,68 ± 0,06 (p < 0,01) und durch DA-CM auf 0,71 ± 0,03 (p < 0,001). Bei der Schädigung durch Vincristin war mit einem Anteil nekrotischer Zellen von 0,87 ± 0,05 in Relation zum Kontrollwert durch Zugabe von LEW-III-CM eine mögliche Tendenz zu verringerter Nekrose erkennbar (p = 0,067). Unter den anderen Induktoren zeigte sich kein Effekt des CM auf die Nekrose.



Abb. 12: Konditionierte Medien (CM) von Mesenchymalen Stromazellen (MSC) zeigen protektive Effekte auf das nekrotische Sterben von NRK-Zellen durch serumfreies Medium. 100 000 NRK-Zellen wurden pro Vertiefung ausgesät, in Kulturmedium inkubiert (50% Volumenanteil CM eines Spenders, 50% Volumenanteil NRK-Medium) und nach 24 Stunden einem der Induktoren für weitere 24 Stunden ausgesetzt: Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hellgraue Balken), serumfreies Medium (mittelgraue Balken, ersetzt dann den Anteil serumhaltigen NRK-Mediums), Vincristin (dunkelgraue Balken) und Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>, schwarze Balken). Die Kontrollkulturen (weiße Balken) enthielten in ihrem Medium ein Kontrollmedium (cCM) anstelle des CM und wurden ebenfalls induziert. Nach der Ernte wurden die Zellen mit anti-CD90-APC-Antikörper, 7-AAD und Annexin V-FITC gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aufgetragen sind der Anteil (A) geschädigter NRK-Zellen insgesamt, (B) apoptotischer und (C) nekrotischer NRK-Zellen (jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4-5) in Relation zum jeweiligen Kontrollwert (cCM; definiert als 1, rote Linie). Die Darstellung erfolgt in Abhängigkeit vom jeweiligen Induktor. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 in Bezug auf den Kontrollwert, analysiert mittels T-Test.

## 3.1.5. Effekte von MSC-EV auf den Zelltod von NRK-Zellen durch serumfreies Medium

Bereits unter dem Einfluss konditionierter Medien zeigten sich deutliche Schutzeffekte auf den Tod von NRK-Zellen unter serumfreien Kulturbedingungen. Um einen Effekt von EV auf das Sterben von NRK-Zellen zu untersuchen, wählten wir deshalb als Induktor serumfreies Medium. Es wurden NRK-Kulturen angelegt und ein Teil dieser mit EV versetzt. Dann wurden die Kulturen mit den unterschiedlichen Induktoren inkubiert. Gemäß 3.1.2. wurden die unbehandelten Kulturen als Kontrollkulturen gewählt und der jeweilige Anteil geschädigter Zellen zum Kontrollwert erklärt und als 1 definiert. Die Werte geschädigter Zellen in den behandelten Kulturen (geschädigte Zellen insgesamt, apoptotische oder nekrotische Zellen) wurden zu ihrem Kontrollwert in Relation gesetzt. Abb. 13 zeigt die Ergebnisse.

Im Hinblick auf den Kontrollwert fanden sich in den durch EV behandelten Kulturen mit  $0,78 \pm 0,04$  (p < 0,01) signifikant geringere Mengen geschädigter Zellen im Gesamten. Der Anteil nekrotischer Zellen zeigte sich unter EV-Behandlung im Vergleich zum Kontrollwert mit  $0,70 \pm 0,04$  ebenfalls signifikant (p < 0,01) reduziert. Dagegen ließ sich unter EV-Behandlung keine Reduktion des apoptotischen Zellanteils demonstrieren.



Abb. 13: Extrazelluläre Vesikel (EV) von Mesenchymalen Stromazellen (MSC) bewirken unter serumfreien Kulturbedingungen eine Reduktion geschädigter NRK-Zellen im Allgemeinen sowie nekrotischer NRK-Zellen. Je Vertiefung wurden 100 000 NRK-Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt, wobei nun 50% des Volumenanteils serumhaltiges und 50% des Volumenanteils serumfreies NRK-Medium war. Einem Teil der Ansätze wurden 10  $\mu$ g EV zum Medium zugesetzt. Die Kontrollwerte (Ø EV; weißer Balken) wurden aus Kulturen ohne EV-Zugabe abgeleitet. Nach der Ernte wurden die Zellen mit anti-CD90-APC-Antikörper, 7-AAD und Annexin V-FITC gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die apoptotischen Zellen (dunkelgraue Balken) wurden getrennt von nekrotischen Zellen (schwarze Balken) aufgetragen. Beide Gruppen gemeinsam bilden die Summe der geschädigten Zellen im Allgemeinen (Gesamtzelltod, hellgraue Balken). Dargestellt ist der Anteil geschädigter NRK-Zellen aus Kulturen, die mit EV behandelt wurden (Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 4-5), in Abhängigkeit vom Kontrollwert (Ø EV; definiert als 1, rote Linie). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 in Bezug auf den Kontrollwert, analysiert mittels T-Test.

## 3.2. Anti-proliferative Effekte von MSC sowie davon abgeleiteter CM und EV

Mit diesen Untersuchungen sollte analysiert werden, ob MSC oder ihre Produkte einen Einfluss auf die ConA-induzierte Proliferation von Lymphozyten haben. Hierfür wurden ConA-stimulierte, CFSE-markierte T-Lymphozyten aus Ratten vier Tage im Beisein von MSC, MSC-CM oder MSC-EV kultiviert und dann der Anteil proliferierter T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Als Vergleich dienten Proben, deren T-Lymphozyten ebenfalls Mitogen-stimuliert, jedoch nicht mit MSC selbst oder MSC-EV kultiviert wurden. Für Kulturen mit CM-Zusatz wurden zum Vergleich Kulturen mit einem Kontrollmedium (cCM) versetzt. Behandlung mit CM war die Vergleichsprobe mit einem Kontrollmedium (cCM) versetzt. Der Anteil proliferierter Zellen aus der untersuchten T-Zell-Population (TCR+, CD4+ oder CD8+) dieser Kulturen diente als Kontrollwert, welcher als 1 definiert wurde.

# 3.2.1. Effekt der MSC-Ko-Kultur auf die Mitogen-induzierte Proliferation von T-Lymphozyten

Nach Ende der Inkubationszeit in Ko-Kultur wurde der Anteil proliferierter T-Zellen in den Ansätzen ermittelt. Die Werte der der proliferierten T-Zellen aus den Ko-Kulturen wurden zum Kontrollwert (s. 3.2.) ins Verhältnis gesetzt. Abb. 14 fasst die Ergebnisse graphisch zusammen.

Mit Ausnahme von LEW-IV-MSC konnte in den MSC/T-Lymphozyten-Ko-Kulturen aller Spender eine signifikante Reduktion des Anteils proliferierter T-Zellen im Gesamten (TCR+) festgestellt werden (Abb. 14 A). Dieser sank, verglichen mit dem Kontrollwert, bei gemeinsamer Kultivierung mit LEW-I-MSC auf 0,63 ± 0,06 (p < 0,001), mit LEW-II-MSC auf 0,78 ± 0,07 (p < 0,05), in Ko-Kultur mit LEW-III-MSC auf 0,51 ± 0,13 (p < 0,01) und mit DA-MSC auf 0,27± 0,13 (p < 0,05).

Analoge Ergebnisse zeigen sich auch bei der Betrachtung der Subpopulationen der CD4+ und CD8+ T-Zellen. Bei den CD4+ T-Zellen (Abb. 14 B) sanken die Werte auf 0,51 ± 0,06 mit LEW-I-MSC (p < 0,001), unter Ko-Kultur mit LEW-II-MSC auf 0,72 ± 0,09 (p < 0,05), bei LEW-III-MSC auf 0,44 ± 0,12 (p < 0,01) und auf 0,21 ± 0,11 bei gemeinsamer Kultur mit DA-MSC (p < 0,01). In der Population der CD8+ T-Lymphozyten (Abb. 14 C) verringerte sich der Anteil proliferierter Zellen unter LEW-I-MSC auf 0,65 ± 0,06 (p < 0,01), mit LEW-II-MSC auf 0,75 ± 0,09 (p < 0,05), in Ko-Kultur mit LEW-III-MSC auf 0,52 ± 0,12 (p < 0,01) und in Anwesenheit von DA-MSC auf 0,27 ± 0,13 (p < 0,05) bezogen auf den Kontrollwert. Lediglich bei LEW-IV-MSC fand sich auch in den Subpopulationen keine signifikante Reduktion der T-Zell-Proliferation.



Abb. 14: Mesenchymale Stromazellen (MSC) zeigen hemmende Effekte auf die Mitogen-stimulierte Proliferation von T-Zellen. Pro Vertiefung wurden 200 000 MSC verschiedener Spender vom Stamm Lewis (LEW I-IV; blaue Balken) oder vom Dark Agouti(DA)-Stamm (schwarze Balken) ausgesät. Nach 24 Stunden wurden isolierte Lymphknotenzellen einer Ratte vom Stamm Lewis mit CFSE markiert und zu den MSC hinzugefügt, pro Vertiefung 2 Millionen Zellen (Verhältnis MSC : Leukozyten 1:10). Als Kontrolle wurden weitere Leukozyten-Kulturen ohne MSC angelegt (Ø MSC, weißer Balken). Die Lymphozyten wurden mit Concanavalin A (ConA) zur Proliferation angeregt. Nach vier Tagen Inkubation wurden die Zellen geerntet, mit Live/Dead-Marker, anti-TCR-PE-, anti-CD4-APC- und anti-CD8-PerCP-Antikörpern gefärbt und dann mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Relation zum Kontrollwert (Wert definiert als 1; rote Linien) ist für (A) alle TCR+ T-Zellen, (B) CD4+ und (C) CD8+ T-Zellen der Anteil proliferierter Zellen ihres Typs dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 3-14). \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 in Bezug auf den Kontrollwert, analysiert mittels T-Test.

# 3.2.2. Einfluss konditionierter Medien von MSC auf die Mitogen-induzierte Proliferation von T-Lymphozyten

Es wurden Leukozyten ausgesät und mit Zusatz von CM verschiedener Spender kultiviert. Weitere Leukozyten-Kulturen erhielten anstelle des CM ein Kontrollmedium (cCM). In allen Kulturen wurden die Lymphozyten durch ConA zur Proliferation stimuliert. Der Kontrollwert wurde gemäß 3.2.aus den Kulturen mit cCM bestimmt und als 1 definiert. Die Anteile proliferierter T-Zellen der jeweiligen Population werden dann zum Kontrollwert in Relation gesetzt. Abb. 15 demonstriert die Resultate graphisch.

Die Messungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsrate der T-Zellen nach Behandlung mit CM gegenüber dem jeweiligen Kontrollwert, weder für die Gesamtheit der T-Lymphozyten (TCR+), noch für die Subpopulation der CD4+ oder der CD8+ T-Zellen.

Für die Gesamtheit der T-Lymphozyten (TCR+) zeigte sich jedoch eine Tendenz zur verminderten Proliferation der T-Zellen bei der Behandlung mit LEW-I-CM (p = 0,06, Abb. 15 A). Bei selektiver Betrachtung der CD4+ und CD8+ T-Zellen (Abb. 15 A) ließ sich eine solch tendenzielle Suppression nicht erkennen (Abb. 15 C). Auch bei den CD4+ T-Zellen waren keine Effekte des CM-Zusatzes festzustellen (Abb. 15 B).



Abb. 15: Konditionierte Medien (CM) von Mesenchymalen Stromazellen (MSC) haben keinen Einfluss auf die Mitogeninduzierte Proliferation von T-Zellen. Isolierte Lymphknotenzellen von Lewis Ratten wurden mit CFSE markiert und mit zwei Mio. Zellen/Vertiefung in Kavitäten einer Zellkulturplatte ausgesät. Als Kulturmedium diente ein Gemisch aus 50% NRK-Medium und 50% CM eines Spenders vom Lewis- (LEW, blaue Balken) oder DA-Stamm (schwarze Balken), die Referenzkultur (weißer Balken) erhielt anstelle des CM ein Kontrollmedium (cCM). Die Lymphozyten wurden mit Concanavalin A (ConA) zur Proliferation stimuliert. Nach vier Tagen Kultur wurden die Zellen geerntet, mit Live/Dead-Marker, anti-TCR-PE-, anti-CD4-APC- und anti-CD8-PerCP-Antikörpern gefärbt und dann mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Relation zum Kontrollwert (Wert definiert als 1; rote Linien) ist für (A) alle TCR+ T-Zellen, (B) CD4+ und (C) CD8+ T-Zellen der Anteil proliferierter Zellen ihres Typs dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 3-14). Für p < 0,05 in Bezug auf den Kontrollwert, analysiert mittels T-Test.

### 3.2.3. Wirkung von MSC-EV auf die Mitogen-induzierte Proliferation von T-Zellen

Nach Untersuchungen zu Effekten von MSC und CM auf die durch ConA-stimulierte Proliferation von T-Zellen wurden weitere Leukozyten-Kulturen angelegt. Einem Teil dieser Kulturen wurden EV von zwei verschiedenen Lewis-Spendern hinzugesetzt. In allen Ansätzen wurden die Lymphozyten mit ConA zur Proliferation stimuliert. Nach viertägiger Kultivierung wurden die Zellen geerntet. Der Anteil proliferierter Zellen der verschiedenen T-Zell-Populationen (TCR+, CD4+, CD8+) aus den unbehandelten Kulturen wurde gemäß 3.2. zum Kontrollwert erklärt und als 1 definiert. Die entsprechenden Werte der proliferierten T-Zellen mit EV-Behandlung wurden hierzu in Relation gesetzt. Abb. 16 zeigt die Resultate.

In den mit EV behandelten Proben zeigten sich, bezüglich der Proliferationsrate der T-Zellen im Gesamten (TCR+), keine signifikanten Unterschiede gegenüber Kontrollwert. Ähnlich verhielt es sich auch in den Subpopulationen der CD4+ (Abb. 16 B) und CD8+ T-Lymphozyten (Abb. 16 C). Auch hier konnte im Vergleich zum Kontrollwert kein Unterschied des Anteils proliferierter Zellen festgestellt werden.



Abb. 16: Extrazelluläre Vesikel (EV) von Mesenchymalen Stromazellen (MSC) haben keinen Einfluss auf die Mitogeninduzierte Proliferation von T-Zellen. Isolierte Lymphknotenzellen von Lewis-Ratten wurden mit CFSE markiert und anschließend ausgesät, pro Vertiefung 2 Mio. Zellen. Dem Kulturmedium wurden 10 µg EV aus Lewis-Spendern (LEW I-II, blaue Balken) zugesetzt. Die Kontrollkulturen (Ø EV, weißer Balken) verblieben ohne EV-Zusatz. Die Lymphozyten der Ansätze wurden mit Concanavalin A (ConA) zur Proliferation angeregt. Nach vier Tagen Kultur wurden die Zellen geerntet, mit Live/Dead-Marker, anti-TCR-PE-, anti-CD4-APC- und anti-CD8-PerCP-Antikörpern gefärbt und dann mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Relation zum Kontrollwert (Wert definiert als 1, rote Linie) ist für (A) alle TCR+ T-Zellen im Gesamten, (B) CD4+ und (C) CD8+ T-Zellen der Anteil proliferierter T-Zellen dargestellt (jeweils Mittelwert ± SEM; n = 6-14). Für p < 0,05 in Bezug auf den Kontrollwert, analysiert mittels T-Test.

# 3.3. Modulierende Effekte von MSC oder MSC-Produkten auf die IFNγ-Sekretion durch Leukozyten

In dieser Versuchsreihe wurde die IFNγ-Konzentration aus den Überständen der Proliferationsansätze (siehe 3.2.) bestimmt. Aus den Werten sollten Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand der darin enthaltenen Leukozyten gezogen werden. Dazu wurden nach Ende der Inkubationsperiode von vier Tagen Überstände aus allen Ansätzen abgenommen mit mittels ELISA auf ihren IFNγ-Gehalt analysiert.

# 3.3.1. Auswirkung von MSC und MSC-EV auf die IFNγ-Freisetzung Mitogen-stimulierter Leukozyten

Die IFNγ-Konzentrationen der unbehandelten Leukozyten-Kulturen wurden zum Kontrollwert erklärt und als 1 definiert. Dann wurden die Messwerte aus Kulturen mit Behandlung durch MSC-Ko-Kultur oder MSC-EV in Bezug zu diesem Kontrollwert gesetzt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 17.

In Ko-Kultur mit MSC lag eine signifikant geringere IFNγ-Konzentration in den Zellüberständen vor als in der Kontrollkultur (Abb. 17 A). Dies konnte für die Ko-Kultur von Leukozyten mit den MSC aller getesteten Spender (LEW-I bis -V und DA) demonstriert werden. Verglichen mit dem Kontrollwert war die relative IFNγ-Konzentration bei LEW-I-MSC auf 0,09 ± 0,07 (p < 0,001), unter LEW-II-MSC auf 0,39 ± 0,08 (p < 0,01) und bei Zugabe von LEW-III-MSC



Abb. 17: Mesenchymale Stromazellen (MSC) und ihre extrazellulären Vesikel (EV) haben einen hemmenden Effekt auf die IFNY-Ausschüttung von Leukozyten. Die Überstände wurden von Kulturen aus Concanavalin A(ConA)-stimulierten Leukozyten aus Lewis-Ratten mit (A) MSC verschiedener Spender von Lewis- (grüne Balken) oder DA-Ratten (schwarzer Balken) und (B) EV von Lewis-MSC (blauer Balken) gewonnen. Außerdem wurden Überstände aus den unbehandelten, ConA-stimulierten Leukozyten-Kulturen abgenommen (weiße Balken). Die Abnahme der Überstände fand nach viertägiger Kultur statt. Danach erfolgte die Analyse der sezernierten IFNY-Menge mittels ELISA. Die IFNY-Konzentration der unbehandelten Kulturen wurde zum Kontrollwert erklärt. Dargestellt ist die relative Zytokin-Konzentration in den Kulturen mit MSC bzw. EV (Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 2-14) bezogen auf den Kontrollwert (in A: Ø MSC, in B: Ø EV; Wert definiert als 1, rote Linie). \* p < 0,05 , \*\* p < 0,01 , \*\*\* p < 0,05 in Bezug auf den Kontrollwert, analysiert mittels T-Test.

auf 0,16  $\pm$  0,08 (p < 0,001) reduziert. Unter LEW-IV-MSC war die relative Zytokin-Konzentration auf 0,05  $\pm$  0,03 (p < 0,001), mit LEW-V-MSC auf 0,06  $\pm$  0,03 (p < 0,05) und in Ko-Kultur mit DA-MSC auf 0,34  $\pm$  0,15 (p < 0,05) herabgesetzt.

Auch bei Betrachtung der mit EV versetzten Proben zeigte sich gegenüber dem Kontrollwert eine auf  $0,59 \pm 0,14$  signifikant (p < 0,05) verringerte, relative IFNγ-Konzentration (Abb. 17 B).

# 3.3.2. Wirkung konditionierter Medien von MSC auf die IFNγ-Freisetzung aktivierter Leukozyten

Die IFNγ-Konzentrationen von ConA stimulierten Leukozyten-Kulturen mit Zusatz von cCM (anstelle von CM) wurden als Kontrollwert verwendet und mit einem Wert von 1 definiert. Die IFNγ-Werte aus den ConA stimulierten Kulturen mit CM sowie aus ConA stimulierten Kulturen ohne jeglichen Zusatz von CM oder cCM wurden dann in Relation zum Kontrollwert gesetzt. Abb. 18 veranschaulicht die Resultate.

Bei keinem der eingesetzten CM verschiedener Spender ließ sich eine signifikante Differenz der relativen IFNγ-Werte zum Kontrollwert feststellen. Als signifikant unterschiedlich erwies sich jedoch sowohl der Vergleich der IFNγ-Werte in ConA-stimulierten, Leukozyten-Monokulturen ohne Zusätze mit dem Kontrollwert als auch mit den CM-Kulturen. In den Kulturen ohne CM oder cCM war das IFNγ-Niveau signifikant niedriger.



Abb. 18: Konditionierte Medien (CM) von Mesenchymalen Stromazellen (MSC) haben keinen hemmenden Effekt auf die IFNγ-Ausschüttung von Leukozyten. Die Überstände wurden von Kulturen aus Concanavalin A(ConA)-stimulierten Leukozyten aus Lewis-Ratten mit CM verschiedener Spender von Lewis- (LEW-I bis -III, lila Balken) oder DA-Ratten (schwarzer Balken) gewonnen. Das Kulturmedium setzte sich zusammen aus 50% MLC-Medium und 50% CM eines Spenders. In den Kontrollkulturen wurde der Anteil konditionierten Mediums durch ein Kontrollmedium (cCM, weißer Balken) ersetzt. Außerdem wurden Überstände aus Leukozyten-Kulturen genommen, die ausschließlich in MLC-Medium ohne jegliche Zusätze kultiviert wurden ( $\emptyset$  cCM, grauer Balken). Die Abnahme der Überstände fand nach viertägiger Kultur statt. Danach erfolgte die Analyse der sezernierten IFNγ-Menge mittels ELISA. Die IFNγ-Konzentration der cCM-Kulturen wurde zum Kontrollwert erklärt. Dargestellt ist die relative Zytokin-Konzentration in den Kulturen mit CM sowie in den unbehandelten Leukozyten-Kulturen (Mittelwert ± SEM; n = 2-14) bezogen auf den Kontrollwert (cCM; Wert definiert als 1, rote Linie). \* p < 0,05 in Bezug auf den Kontrollwert, analysiert mittels T-Test.

## 4. DISKUSSION

# 4.1. MSC und ihre Produkte wirken unter NTx-ähnlichen Bedingungen *in vitro* protektiv auf geschädigte Nierentubulus-Zellen

## 4.1.1. Auswirkung der Induktoren auf das Zellsterben

Die für die Zelltod-Induktion verwendeten Mediatoren, Wasserstoffperoxid, serumfreies Medium, Vincristin und Cobaltchlorid, schädigen Zellen auf unterschiedliche Art und Weise. Wasserstoffperoxid ist ein Stoff, der unter Einwirkung von Eisen-Ionen (enthalten in DMEM) im Zuge der sogenannten Fentonreaktion, in Kombination mit der Haber-Weiss-Reaktion, zu Hydroxyl-Radikalen zerfällt [53, 54]. Hydroxyl-Radikale gehören zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species, ROS) [55]. ROS haben wiederum das Potential sowohl mit den Nukleinsäuren der Zelle als auch mit deren Membranlipiden sowie Proteinen, Enzymen und vielen weiteren Zellbestandzeilen zu reagieren und diese zu schädigen [56, 57]. Das kann bis zum Zelltod führen [57]. Bei einer NTx entsteht durch die Schädigung des Transplantats eine hohe Konzentration von ROS im Gewebe des Spenderorgans [16]. Diese ROS werden bei der *in vitro*-Simulation der Transplantations-Situation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erzeugt.

Durch Kultivierung in serumfreiem Medium werden den Zellen Wachstumsfaktoren und Nährstoffe entzogen. Ihren ATP-Bedarf kann die Zelle zeitweise durch Autophagie kompensieren. Dabei werden zelleigene Organellen durch die Zelle degradiert und die Bestandteile zur ATP-Produktion herangezogen [58]. Bei länger andauernder Nährstoff- und Wachstumsfaktor-Deprivation stirbt die Zelle schließlich. Ob diese Form des Zelltodes einen eigenständigen Autophagie-Zelltod darstellt oder in Zusammenhang mit der Apoptose steht, ist noch nicht abschließend geklärt [58]. Tritt der ATP-Mangel sehr abrupt ein, stirbt die Zelle den nekrotischen Zelltod, da sie ohne jegliches ATP ihre Membran-Integrität nicht aufrechterhalten kann [58, 59]. Da im Zuge einer NTx die Blutzufuhr zum Spenderorgan temporär unterbrochen wird, entsteht ein Mangelzustand, der zu einer Schädigung der Niere führt. Serumfreies Medium imitiert diesen Mangelzustand und eignet sich deshalb zur Simulation einer NTx-Situation *in vitro*.

Vincristin ist ein Zytostatikum, das die Ausbildung von Mikrotubuli hemmt [60]. Treten Zellen in die Zellteilung ein, wird die Verteilung der Chromosomen auf die neu entstehenden Zellen in der Metaphase durch die fehlende Funktion des Spindel-Apparates verhindert. Die Zellteilung kann nicht vollendet werden und die betroffenen Zellen sterben [61]. Nieren-transplantierte Patienten, so wie die meisten Patienten nach Transplantation, erkranken aufgrund ihrer immunsuppressiven Medikation gehäuft an Malignomen [23], welche mit Zytostatika behandelt werden. Viele Zytostatika sind nephrotoxisch. Eines davon ist Vincristin [38]. Daher und aus Gründen des Vergleichs mit anderen Arbeiten wählten wir Vincristin als Repräsentant der Nieren-Schädigung durch Zytostatika.

Cobaltchlorid erzeugt reaktive Sauerstoffradikale (ROS) [62], die ähnlich wie bei Wasserstoffperoxid, zum Zelltod durch Schädigung von Membran und Nukleinsäuren führen. Zudem ahmt CoCl<sub>2</sub> ein hypoxisches Milieu nach, indem es die Expression des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) induziert. Dieser reguliert dann wiederum Hypoxie-typische Vorgänge [63]. Da auch bei NTx während der Phase der kalten Ischämie hypoxische Zustände im Transplantat herrschen, bietet sich CoCl<sub>2</sub> zur *in vitro*-Simulierung eines Transplantations-Milieus an.

## 4.1.2. Interpretations-Möglichkeiten der Annexin V/7-AAD-Färbung

Die Färbung mit Annexin V und 7-AAD trifft in erster Linie Aussagen zur Membranintegrität einer geschädigten Zelle. Bei nicht gewährleisteter Membranintegrität, wie es bei der Nekrose der Fall ist, ist es beiden Farbstoffen möglich, zu binden. Liegt jedoch eine intakte Plasmamembran, vor, wie bei der Apoptose, ist es nur Annexin V möglich, von außen an die Phosphatidylserin-Reste zu koppeln, während 7-AAD aus Mangel an exponierter DNA nicht interkalieren kann. Dies ermöglicht eine Interpretation der Färbe-Ergebnisse hinsichtlich der Form des Zelltodes. Dabei erweitert eine stetig wachsende Anzahl von Publikationen den Interpretations-Spielraum fortwährend. So wird beispielsweise der Zelltod inzwischen als ein Kontinuum mit fließenden Übergängen gesehen, an dessen gegensätzlichen Extremen sich Apoptose und Nekrose befinden [64]. Vor diesem Hintergrund kommt es unweigerlich zu abweichenden Auslegungen der Ergebnisse der Annexin V/7-AAD Färbung [65, 66, 67, 68]. Um dem gerecht zu werden, kann man, anstatt von apoptotischen Zellen, von toten Zellen mit erhaltener Membranintegrität und, anstelle von nekrotischen Zellen, von toten Zellen mit gestörter Membranintegrität sprechen. Der Einfachheit halber werden die betreffenden Zell-Populationen aber weiterhin als nekrotisch und apoptotisch bezeichnet.

Anmerken muss man außerdem, dass die Interpretation der Färbung dadurch eingeschränkt ist, dass auch vitale Zellen gegebenenfalls positiv für Annexin V gefärbt werden können. Ursache dafür sind EV, die in der nach extern gerichteten Schicht ihrer Hülle einen hohen Anteil an Phosphatidylserin-Resten enthalten können [46]. Die EV verschmelzen beim Aufnahmeprozess teilweise mit der Plasmamembran der NRK-Zellen [46]. Das Phosphatidylserin befindet sich folglich unmittelbar nach der Verschmelzung innerhalb der äußeren Schicht der Plasmamembran [69], bevor es vermutlich enzymatisch wieder in die innere Schicht verlagert wird. Obwohl die Zelle also vital ist, wäre in dieser Zeit eine Bindung von Annexin V an die exponierten Phosphatidylserin-Reste möglich [69].

# 4.1.3. Zur Reduktion der Apoptose von NRK-Zellen müssen sich MSC in unmittelbarer Nähe befinden

Eine signifikante Minderung der NRK-Zell-Apoptose zeigte sich ausschließlich bei MSC/NRK-Ko-Kulturen nach Schädigung der Zellen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Unter der Einwirkung der übrigen Induktoren konnte keine protektive Wirkung der MSC festgestellt werden. Ebenso führte die Zugabe von CM und EV zu keiner signifikanten Reduktion der Apoptoserate im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur.

Auf die Apoptose durch serumfreies Medium, Vincristin oder  $CoCl_2$  scheint die Ko-Kultur keinen Einfluss zu haben. Da die Apoptose über verschiedene Mechanismen und Signalwege initiiert werden kann [70], wäre es denkbar, dass  $H_2O_2$  die Apoptose über einen anderen Signalweg induziert als die übrigen Induktoren. Möglicherweise können die MSC nicht auf alle Wege der Apoptose-Induktion protektiv agieren. Deshalb könnte ein schützender Effekt auf die Apoptose durch  $H_2O_2$  möglich sein, während die Signalwege der Apoptose durch serumfreies Medium, Vincristin und CoCl<sub>2</sub> nicht durch MSC beeinflusst werden.

Die reduzierte Apoptose in MSC/NRK-Ko-Kulturen sowie die fehlenden Effekte von CM und EV auf den programmierten Zelltod von NRK-Zellen könnten für den Zell-Zell-Kontakt als notwendige Voraussetzung zum Schutz der NRK-Zellen vor dieser Form des Zelltodes sprechen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Zhu et al. überein, die *in vitro* einen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Schutz vor Thapsigargin-induzierter Apoptose bei Nierentubulus-Zellen vom Schwein demonstrieren konnten [71]. Durch räumliche Trennung der MSC von den Nierentubulus-Zellen mit der Möglichkeit zum freien Austausch von Medium zwischen den Kompartimenten, konnte aber gezeigt werden, dass tatsächlich der direkte Kontakt der MSC mit den Nierentubulus-Zellen entscheidend für die protektiven Effekte war [71]. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich auch mit Nierentubulus-Zellen der Ratte so verhält.

Gleichzeitig widersprechen publizierte Daten von Bruno et al. unseren Ergebnissen. Die Gruppe konnte in ihren *in vitro*-Versuchen zeigen, dass die Anwendung von MSC-CM oder -EV in Kulturen mit Nierentubulus-Zellen, die mit Cisplatin und Vincristin geschädigt wurden, eine Senkung des apoptotischen Zellanteils bewirkte [72, 73]. Auch in der aktuellen Literatur gibt es Hinweise auf einen anti-apoptotischen Effekt durch lösliche Faktoren von MSC. Einige dieser Botenstoffe, wie der Gefäß-endotheliale Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), HGF und Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), sind bereits identifiziert [7]. Diese, verglichen mit unseren Resultaten, widersprüchlichen Daten können verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte es an der Herkunft der Nierenepithel-Zellen aus unterschiedlichen Spezies liegen. Bruno et al. arbeiteten beispielsweise mit humanen sowie murinen Zellen, unsere Ergebnisse basieren aber auf Zellmaterial aus der Ratte. Zum anderen könnte auch die Wahl einer anderen Methode zur Apoptose-Bestimmung Grund für

abweichende Ergebnisse sein. Die von uns verwendete Annexin V/7-AAD Färbung kann nur geschädigte Zellen mit intakter und nicht intakter Membranintegrität differenzieren und diese vom Anteil gesunder Zellen abgrenzen (s. 4.1.2.). In der Literatur wird häufig jedoch vom Zelltod als ein Kontinuum gesprochen, dessen Extreme Apoptose und Nekrose sind [64]. Geschädigte Zellen, die aufgrund der noch vorhandenen Membranintegrität durch die Annexin V/7-AAD-Methode als apoptotisch charakterisiert wurden, müssen im Umkehrschluss durch die von Bruno et al. angewendete TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbung nicht ebenfalls als apoptotisch typisiert werden. Hierdurch sind die Ergebnisse nicht mehr unmittelbar miteinander vergleichbar. Hinzu kommt, dass die Aussagekraft der TUNEL-Methode eingeschränkt ist, da sie zwischen den verschiedenen Zelltod-Formen nicht mit Sicherheit unterscheiden kann [74]. Es wäre also möglich, dass, durch die Vereinheitlichung der Methode, die reduzierte Apoptose in der Arbeit von Bruno et al. der von uns ermittelten, verringerten Nekroserate unter EV entspricht.

Die Resultate von Zhu et al. sprechen außerdem gegen die Theorie, dass der protektive Effekt auf dem durch MSC und NRK-Zellen entstandenen Mikromilieu und deren interzellulärer Kommunikation [18] basieren könnte [71]. Denn, im Gegensatz zur direkten Ko-Kultur, konnte auch durch den gewährleisteten Medium-Austausch zwischen den Zell-Populationen bei getrennten Kompartimenten keine reduzierte Apoptose nachgewiesen werden.

Denkbar wäre auch, dass die verminderte Apoptose-Rate in MSC/NRK-Ko-Kultur auf die relative Steigerung der NRK-Proliferation und damit auf einen Anstieg des intakten Zellanteils zurückzuführen ist. Dagegen spricht die in Ko-Kultur vorliegende, erhöhte Zelldichte im Vergleich zur Monokultur. Die MSC sind deutlich größer als die NRK-Zellen, wodurch in Ko-Kultur die Wahrscheinlichkeit einer Kontaktinhibition und damit einer Proliferations-Hemmung höher ist, als in der Monokultur. Es ist jedoch fraglich, wie stark dieser Effekt im vorliegenden Fall tatsächlich zum Tragen kommt. Ob die Protektion der bestehenden NRK-Zellen oder die Proliferation überlebender NRK-Zellen den Hauptanteil an der Reduktion der Apoptose-Rate bewirkt, ließe sich in Folgeexperimenten beispielsweise mit der CFSE-Methode (Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester-Methode) genauer bestimmen.

# 4.1.4. Lösliche Faktoren und EV senken durch eine gesteigerte Proliferation den Anteil nekrotischer Zellen in Kultur

Ein protektiver Einfluss auf die nekrotische Zellschädigung zeigte sich nur beim Einsatz von MSC-Produkten. Durch den Einsatz von CM sowie EV konnte eine signifikante Reduktion der Nekrose-Rate in den NRK-Zellkulturen erzielt werden, deren Schädigung auf dem serumfreien Kulturmilieu beruhte. In Ansätzen mit durch Vincristin geschädigten NRK-Zellen konnte nach

CM-Zugabe lediglich die Tendenz zu verminderter Nekrose festgestellt werden. Eine Signifikanz war nicht nachweisbar. Gleichzeitig zeigte sich unter serumfreiem Medium und CM- bzw. EV-Zusatz ebenfalls ein signifikant geringerer Teil geschädigter Zellen insgesamt. Auf die Schädigung durch die übrigen Induktoren konnte keine Wirkung des CM festgestellt werden.

Unsere Ergebnisse werden durch Publikationen von Bruno et al. bestätigt. Auch sie konnten in Zellkulturversuchen einen schützenden Effekt von MSC-EV auf Nierentubulus-Zellen demonstrieren, die durch serumfreie Kultivierung geschädigt wurden. Für Zellen, die durch Vincristin geschädigt wurden, konnte die Gruppe sogar eine signifikante Abnahme des geschädigten Zellanteils nachweisen [73]. In einer weiterführenden Arbeit konnte dieselbe Gruppe den *in vitro* nachgewiesenen, protektiven Effekt der EV außerdem auch *in vivo* in einem Ratten-Modell bestätigen [75].

Bezogen auf den Vergleich unserer Resultate mit denen von Bruno et al. ist aber kritisch anzumerken, dass Bruno et al. als Maß der Zellschädigung die Apoptose von Nierentubulus-Zellen mit dem TUNEL-Assay bestimmten. Wir dagegen konnten mit der Annexin V/7-AAD-Färbung nur einen Effekt der MSC-EV auf nekrotische NRK-Zellen zeigen, also auf solche mit gestörter Membranintegrität. Wie aber bereits unter 4.1.1. diskutiert, werden durch die beiden Methoden zur Bestimmung der Zell-Viabilität unterschiedliche Merkmale der Apoptose erfasst. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, sollten weitere experimentelle Ansätze nach identischem Versuchsprotokoll durchgeführt werden. Die gewonnen Zellproben sollten aber dieses Mal mit dem TUNEL-Assay analysiert werden.

Der Anteil nekrotischer Zellen bleibt in der MSC/NRK-Ko-Kultur im Vergleich zur unbehandelten NRK-Kultur unverändert. Einen protektiven Effekt scheint es durch die MSC hier also nicht zu geben. Eine Erklärung hierfür wäre, dass eine Zelle bei gestörter Integrität, wie sie bei der Nekrose vorliegt [58], womöglich nicht mehr von protektiven Effekten der Zell-Zell-Kontakte profitieren kann. Es wäre denkbar, dass interzelluläre Prozesse und Signalwege im Bereich der Membran, die im Rahmen der Protektion ablaufen, gestört werden und damit ineffektiv sind.

Trotzdem stellt sich die Frage, warum auch die löslichen Faktoren und EV, die in Ko-Kultur durch MSC gebildet wurden, nicht protektiv wirkten. Denn in NRK-Monokulturen zeigte sich durch CM- sowie EV-Zugabe eine Reduktion des nekrotischen NRK-Anteils. Diese Tatsache demonstriert einerseits, dass eine protektive Wirkung auf nekrotische Zellen mit gestörter Membranintegrität vordergründig durch lösliche Faktoren vermittelt wird. Andererseits macht sie deutlich, dass die Ko-Kultur von MSC und NRK-Zellen die Sekretion und bzw. oder die Wirkung löslicher Faktoren und EV von MSC zu beeinflussen scheint. Denkbar sind hierfür bidirektionale Wechselwirkungen beider Zelltypen.

57

Ein möglicher Mechanismus wäre, dass der verringerte Anteil nekrotischer Zellen durch CM und EV nicht auf einer Rettung vorhandener NRK-Zellen beruht, sondern vielmehr auf einer verstärkten Proliferation der überlebenden Zellen. Dass sowohl MSC-CM [46] als auch -EV die Proliferation von Zellen in der Umgebung fördern, wurde bereits in diversen Arbeiten beschrieben [7, 76]. Es wäre weiter denkbar, dass MSC im Vergleich zu den NRK-Zellen mehr Nährstoffe verbrauchen und es deshalb in der gemeinsamen Kultur zu einem gesteigerten Gesamt-Nährstoffverbrauch gegenüber der NRK-Monokultur kommt. Hierdurch könnte ein Nährstoffmangel entstehen. Aus diesem könnte wiederum eine verringerte Proliferations- sowie Regenerationskapazität resultieren, da für diese Energie-aufwändigen Vorgänge weniger Ressourcen zur Verfügung stehen. Die Zelle sistiert also beim Durchlaufen des Zellzyklus [77] und die Zellteilung ist damit erst einmal unterbunden. Sind die MSC als Nährstoffverbraucher nicht mehr vorhanden, können die löslichen Faktoren im CM und die EV ihre Wirkung vermitteln und die NRK-Zellen zu gesteigerter Proliferation anregen.

Ursache für die, im Vergleich zu den anderen Induktoren, deutliche Wirksamkeit von CM und EV unter serumfreien Kulturbedingungen könnte eine Art "Priming" der MSC auf den schädigenden Einfluss sein. MSC können entsprechend ihrer Umgebung bzw. den Kulturbedingungen reagieren [23, 27], u.a. mit der Produktion und Sekretion von Faktoren [11]. Das bedeutet, dass die MSC abhängig vom Kulturmilieu ihr umgebendes Medium mit unterschiedlichen Sekretions-Produkten anreichern [78, 79, 80].

Für unsere Versuchsansätze wird das CM ausschließlich unter serumfreien Kulturbedingungen produziert (s. 2.2.3.1.) und wäre, entsprechend der formulierten Hypothese, daher nur optimal bei den durch Serumentzug geschädigten Zellen wirksam. Da das CM bzw. die EV nicht unter Einwirkung der übrigen Induktoren gebildet wurden, könnten sie dementsprechend auf die Schädigung durch diese auch nicht protektiv wirken. Diese Annahme deckt sich mit den von uns erhobenen Daten. Aus diesem Grund sollte in zukünftigen Versuchsreihen angestrebt werden, CM oder EV jeweils unter Einwirkung der später genutzten Induktoren herzustellen.

Führt man den Gedankengang zur Induktor-spezifischen Wirksamkeit von CM und EV fort, würde das bedeuten, dass sich die Spektren Zell-protektiver, löslicher Faktoren, induziert durch Vincristin und durch serumfreie Kultivierung, partiell überschneiden. Denn durch CM war in unseren Untersuchungen unter der Schädigung mit Vincristin eine Tendenz zu reduzierter Nekrose erkennbar. Das Faktorenspektrum, welches unter serumfreien Kulturbedingungen induziert wurde, führt also möglicherweise zu einer eingeschränkten, aber vorhandenen Wirksamkeit auf die NRK-Zellen, die durch Vincristin geschädigt wurden.

Bruno et al. konnten einen signifikanten, protektiven Effekt von EV auf humane Nierentubulus-Zellen nachweisen, die durch Vincristin geschädigt waren [73]. Unter der Annahme, dass die

58

Wirkungen von CM im Wesentlichen mit denen von daraus isolierten EV übereinstimmen [19], stützen diese Ergebnisse unsere eigenen Resultate. Es wäre denkbar, dass die Konzentration der von Bruno et al. verwendeten EV von 30 µg/ml deutlich höher war, verglichen mit dem Gehalt im von uns eingesetzten CM. Eine dosisabhängige Wirkung vorausgesetzt, wäre bei höherer EV-Konzentration ein deutlicherer Effekt und damit auch eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine statistische Signifikanz zu erwarten. Es sollten daher weitere Versuchsreihen durchgeführt werden, in denen NRK-Kulturen mit Vincristin geschädigt und mit EV in definierter Konzentration versetzt werden. Findet sich auch hier keine statistisch signifikante Protektion durch EV, ist davon auszugehen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse andere Ursachen haben, z.B. die Verwendung von Zellmaterial unterschiedlicher Spezies.

# 4.2. MSC haben einen anti-inflammatorischen Einfluss auf Mitogen-induzierte Immunzellen

# 4.2.1. Die Proliferation von T-Lymphozyten wird nur durch MSC in unmittelbarer räumlicher Nähe gehemmt

In der Ko-Kultur von MSC mit Ratten-Leukozyten zeigte sich im Vergleich zur MSC-freien Kontrollkultur eine Verminderung des Anteils proliferierender T-Zellen in der Gesamtheit der T-Zellen sowie in den CD4+ und CD8+ T-Zell-Subpopulationen. Durch CM oder EV hingegen konnte keine Proliferations-Reduktion erzielt werden.

Unsere Ergebnisse bezüglich der Effekte von MSC in Ko-Kultur mit Leukozyten befinden sich in Übereinstimmung mit Aggarwal et al. [81]. Es muss hierzu aber angemerkt werden, dass die von Aggarwal et al. verwendeten Nierentubulus-Zellen, im Gegensatz zu unseren NRK-Zellen, humanen Ursprungs waren. In der Literatur gibt es aber auch Hinweise, dass EV auf die Proliferation von T-Zellen zumindest einen geringen Einfluss haben [82]. Es scheint jedoch unstrittig, dass die räumliche Nähe der MSC selbst Haupteinflussfaktor für die Inhibition der T-Zell-Proliferation ist.

Diese Schlussfolgerung wird durch die Resultate von Zinöcker et al. [83] gestützt. Die Gruppe untersuchte ebenfalls MSC und T-Lymphozyten der Ratte. Aus diesem Grund sind ihre Resultate mit unseren eigenen gut vergleichbar. Zinöcker et al. konnten zeigen, dass mittels räumlicher Separation von MSC und T-Zellen in der Kultur der hemmende Effekt auf die T-Zell-Proliferation aufgehoben werden kann [83]. Vermittelt wird der Proliferations-hemmende Effekt durch das Enzym iNOS, wobei die Stärke der Enzym-Expression mit der Intensität der Proliferations-Einschränkung korreliert [83]. iNOS produziert NO, ein Radikal, das äußert reaktiv und instabil ist, und somit nur innerhalb der unmittelbaren Umgebung wirksam werden kann [84, 85]. Ob bei Rattenzellen tatsächlich der direkte physische Kontakt beider Zellgruppen zur Hemmung der Proliferation notwendig ist oder ob sich die Zellen nur in unmittelbarer Nähe zueinander befinden müssen, um die Wirkung des kurzlebigen NO zu gewährleisten, kann nicht eindeutig festgelegt werden. Mit Sicherheit ist aber zumindest die unmittelbare räumliche Ko-Lokalisation Voraussetzung. In Zukunft sollten ergänzende Versuchsreihen durchgeführt werden, um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen.

Dies erklärt auch, warum CM oder EV in Bezug auf die Reduktion der T-Zell-Proliferation unwirksam sind. Das durch die MSC produzierte NO reagiert unmittelbar nach Produktion weiter, sodass im CM keine entsprechende Rest-Aktivität mehr vorhanden ist. EV hingegen enthalten mit großer Wahrscheinlichkeit selbst keine bzw. keine ausreichenden Mengen an iNOS, um antiproliferativ wirken zu können. Möglicherweise fehlte bei der Produktion der pro-inflammatorische Stimulus, der bei MSC zur Induktion von iNOS Voraussetzung ist [83]. Die Herstellung des CM in der vorliegenden Arbeit erfolgte jedoch nicht unter den erforderlichen pro-inflammatorischen Bedingungen (u.a. erhöhte Konzentration von TNF $\alpha$  [83]. Daher ist eine ausreichende Expression von iNOS in MSC und damit auch ein entsprechendes Vorliegen in den EV nicht wahrscheinlich. Obwohl iNOS in verschiedenen Zellkompartimenten, u.a. auch der Plasmamembran, lokalisiert ist [86], findet sich in der Literatur bisher generell kein Hinweis auf ihr Vorhandensein in oder auf EV.

# 4.2.2. Die Reduktion der IFNγ-Ausschüttung durch Leukozyten wird von den MSC durch parakrine Mechanismen beeinflusst

Im Gegensatz zur Proliferation, die nur in MSC/Leukozyten-Ko-Kultur beeinflusst wird, zeigen sich im Vergleich zur Mitogen-stimulierten, unbehandelten Leukozyten-Kultur niedrigere IFNγ-Werte sowohl in Ko-Kultur mit MSC als auch durch die Zugabe von EV. Überraschenderweise verzeichneten wir in den Kulturen mit Zusatz von CM sowie von Kontroll-CM (cCM) ein erhöhtes IFNγ-Niveau.

Die Stimulation von Immunzellen mit ConA bewirkt neben der Proliferation von T-Zellen auch eine Anregung der Leukozyten zur Sekretion von IFNγ [87].

Hinsichtlich des Effekts von MSC auf die IFN $\gamma$ -Produktion werden unsere Ergebnisse durch Zinöcker et al. gestützt [83]. Diese Autoren demonstrierten in Ko-Kultur mit MSC ebenfalls eine Reduktion der IFN $\gamma$ -Sekretion durch T-Zellen. Darüber hinaus zeigten sie, dass die Hemmung der IFN $\gamma$ -Sekretion unabhängig von der Hemmung der Proliferation erfolgt. Sie konnten durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren verschiedener Enzyme in ihren Versuchsreihen nachweisen, dass das Enzym Zyklooxygenase 2 (COX2) und dessen Produkt Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) für die Suppression der IFN $\gamma$ -Ausschüttung verantwortlich ist [83].

Das Enzym Zyklooxygenase ist in der Membran verschiedener Zellkompartimente lokalisiert, u.a. in der des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates [88]. Es wäre also

möglich, dass es auch in der Membran von EV vorkommt. Auf diese Weise könnte auch in Abwesenheit der MSC PGE<sub>2</sub> gebildet werden, das dann wiederum biologisch wirksam werden kann.

Es wäre aber auch denkbar, dass, bei einer Halbwertszeit von  $8,8 \pm 3,4$  Stunden [89], bereits biologisch aktives PGE<sub>2</sub> im CM vorliegt. Da wir in unseren Versuchsreihen jedoch häufig auf zuvor gefrorenes CM zurückgegriffen haben, stellt sich die Frage, wie stabil das Prostaglandin unter kryokonservierten Bedingungen ist und ob nach dem Auftauvorgang seine biologische Aktivität überhaupt noch nachweisbar ist. Um dies zu klären, wären weiterführende Untersuchungen nötig.

Conforti et al. untersuchten sowohl die Wirkung von MSC in Ko-Kultur als auch von MSC-EV auf die IFNγ-Ausschüttung durch Leukozyten. Ihre Resultate stimmen jedoch nur in Teilen mit unseren Ergebnissen überein [90]. Conforti et al. demonstrierten eine signifikante Abnahme der IFNγ-Konzentration in Ko-Kultur von PHA (Phyothämagglutinin(PHA)-stimulierten Leukozyten und MSC im Vergleich zur Leukozyten-Monokultur. Sie konnten aber keine hemmende Wirkung der MSC-EV auf die IFNγ-Sekretion feststellen [90]. Diese Abweichung könnte auf unterschiedlichen Herkunftsspezies des Zellmaterials (MSC, EV und Leukozyten) zurückzuführen sein; die Analysen von Conforti et al. basierten auf Zellen humanen Ursprungs, während unsere Versuchsreihen mit Rattenzellen durchgeführt wurden.

Die Reduktion des IFNγ-Spiegels in der MSC/Leukozyten-Ko-Kultur fällt stärker aus als in Monokulturen mit EV-Zusatz. Deshalb stellt sich die Frage, ob die physische Anwesenheit der MSC auch für die Hemmung der IFNγ-Ausschüttung von Belang ist und möglicherweise additiv zu den MSC-EV auf die IFNγ-Sekretion einwirkt. Da die Konzentration von EV in der Ko-Kultur von Leukozyten und MSC nicht bekannt ist, kann sie nicht mit der Konzentration in der Monokultur mit EV-Zusatz verglichen werden. Deshalb kann man nur schlussfolgern, dass ein Teil des Effektes auf der Wirkung der EV beruhen muss. Eine mögliche Rolle der physischen Anwesenheit der MSC oder des Zell-Zell-Kontaktes zwischen MSC und Leukozyten muss in weiteren Experimenten analysiert werden.

Durch CM und cCM zeigte sich eine Steigerung des IFNγ-Niveaus. Da sowohl CM als auch cCM auf serumfreiem Kulturmedium basieren, liegt die Vermutung nahe, dass der Anstieg der IFNγ-Konzentration in diesen Ansätzen durch den Anteil serumfreien Mediums induziert wird. Das serumfreie Medium scheint hierbei eine Art pro-inflammatorischen Stimulus darzustellen, der die Leukozyten neben ConA additiv zu verstärkter IFNγ-Bildung anregt. Sollte, wie zuvor angesprochen, eine biologische Wirksamkeit von PGE<sub>2</sub> im CM vorliegen, wird diese jedoch vollständig durch die gegenläufigen Effekte des serumfreien Mediums aufgehoben. MSC-CM, das auf Basis von serumfreiem Medium hergestellt wurde, scheint somit keine vielversprechende Option zur Inhibition unerwünschter Immunreaktionen zu sein. Man sollte deshalb in

zukünftigen Experimenten der Möglichkeit nachgehen, ein CM auf Basis eines anderen Stimulus herzustellen, um die pro-inflammatorischen Auswirkungen des serumfreien Mediums auf die Leukozyten zu vermeiden.

Die ausbleibende Induktion einer T-Zell-Proliferation unter CM oder cCM bei gleichzeitig verstärkter IFNγ-Ausschüttung bestätigt nochmals, dass die Proliferation von Lymphozyten und deren Produktion von IFNγ auf unterschiedlichen Regulations-Mechanismen beruht.

## 4.3. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MSC-EV eine mögliche Therapie-Option zur Behandlung Nieren-transplantierter Patienten darstellen.

Sie zeigen einen protektiven Einfluss auf die Schädigung von Nierentubulus-Zellen. Ihre regeneratorischen Fähigkeiten entfalten sich aber möglicherweise nur spezifisch unter den Konditionen, die auch als Kulturbedingungen zur EV-Produktion dienten. Sollte sich dies in Folgeexperimenten bestätigen, müssten in zahlreichen, weiteren Versuchsreihen die Kulturbedingungen zur EV-Produktion so optimiert werden, dass eine Transplantations-Situation auch *in vitro* möglichst exakt nachempfunden werden kann.

Vorstellbar wäre z.B. dass die Produktion von MSC-EV unter der Einwirkung multipler Induktoren stattfindet, sodass eine Protektion gegenüber verschiedenen schädigenden Einflüssen, u.a. Hypoxie, Ischämie und medikamentöse Toxine unterschiedlicher Art, gewährleistet ist. Hierfür wäre es entscheidend, jeweils den Induktor zu identifizieren, der einen bestimmten Schädigungsmechanismus in vivo am besten in vitro repräsentiert. Zudem könnten die MSC zusätzlich mit einem Cocktail pro-inflammatorischer Zytokine (u.a. mit TNFα und IFNy) durch Prä-Inkubation zur gesteigerten Sekretion von EV und löslichen Faktoren angeregt werden. Darüber hinaus wäre auch eine detaillierte Analyse von Art und Menge der durch EV transportierten Moleküle denkbar, z.B. durch ELISA und verschiedene elektrophoretische Untersuchungsmethoden (u.a. Western und Southern Blot). Die Kenntnis der exakten molekularen Zusammensetzung der protektiven Faktoren bezogen auf eine spezifische Schädigungs-Situation, wie der Nierentransplantation, könnte eine spezifische Produktion der wirksamen Substanzen im Einzelnen und deren zielgerichtete Zusammenstellung ermöglichen. Eine solche Herstellung von individuell auf eine Situation zugeschnittenen Medikamenten, wäre eine neue Behandlungs-Option für Nieren-transplantierte Patienten, aber auch für Patienten mit anderen Erkrankungen.

Weiterhin konnte demonstriert werden, dass sich MSC-EV auch bedingt zur Immunmodulation eignen. Eine Hemmung der T-Zell-Proliferation, wie sie für Transplantat-Patienten entscheidend ist, konnte jedoch durch EV nicht erreicht werden. Möglicherweise wäre bei therapeutischer Applikation der EV aus diesem Grund noch die additive Gabe von Immunsuppressiva

62
notwendig. Optionen wären in dieser Hinsicht die Cacineurin-Inhibitoren Cycosporin A oder Tacrolimus, welche die T-Zell-Proliferation spezifisch hemmen. Zukünftig wären auch hier weitere Versuchsreihen notwendig, um mögliche Wechselwirkungen der Immunsuppressiva mit den MSC-EV detailliert zu analysieren. Ferner wäre es auch hier denkbar, die MSC beispielsweise mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  zu prä-inkubieren. Möglicherweise würde die Inhibition der IFN $\gamma$ -Sekretion im Anschluss stärker ausfallen, sodass man das Potential der MSC effektiver nutzen könnte.

Um MSC-EV in der Zukunft auch klinisch anwenden zu können, bedarf es also weiterer, intensiver Forschung. Ein nächster Schritt wäre, neben den bereits genannten, die Untersuchung der Wirksamkeit von MSC-EV im Tiermodell der Ratte. Sollten diese vielversprechend verlaufen, wäre ein erster Einsatz der MSC-EV im Rahmen von klinischen Studien zur Untersuchung von Verträglichkeit und Wirksamkeit sowie zur Dosisbestimmung möglich.

## Literaturverzeichnis

1. http://optn.transplant.hrsa.gov/

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group.
 KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. American Journal of Transplantation. 2009. Vol. 9 (Issue Sup. 3): 1-155.

3. Cortinovis M, Casiraghi F, Remuzzi G, Perico N. Mesenchymal stromal cells to control donor-specific memory T cells in solid organ transplantation. Current Opinion in Organ Transplantation. 2015. Vol. 20 (Issue 1): 79–85.

4. Souidi N, Stolk M, Seifert M. Ischemia – reperfusion injury: beneficial effects of mesenchymal stromal cells. Current Opinion in Organ Transplantation. 2013. Vol. 18 (Issue 1): 34-43.

5. Erpicum P, Detry O, Weekers L, Bonvoisin C, Lechanteur C, Briquet A, Bequin Y, Krzesinski JM, Jouret F. Mesenchymal stromal cell therapy in conditions of renal ischaemia/reperfusion. Nephrology Dialysis Transplantation. 2014. Vol. 29 (Issue 8): 1487-1493.

6. Qiu Z, Zhou D, Sun D. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on renal ischaemia-reperfusion injury in rats. International Braz J Urol. 2014. Vol. 40 (Issue 4): 553-561.

7. de Almeida DC, Donizetti-Oliveira C, Barbosa-Costa P, Origassa CS, Câmara NO. In search of mechanisms associated with mesenchymal stem cell-based therapies for acute kidney injury. The Clinical Biochemist Reviews. 2013. Vol. 34 (Issue 3): 131-144.

8. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. Cryobiology. 2015. Vol. 71 (Issue 2): 181-197.

9. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. Annual Review of Immunology. 2013. Vol 31: 285-316.

10. Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. World Journal of Stem Cells. 2014. Vol. 6 (Issue 5): 526-539.

11. Lavoie JR, Rosu-Myles M. Uncovering the secretes of mesenchymal stem cells. Biochimie. 2013. Vol. 95 (Issue 12): 2212-2221.

12. Morigi M, Benigni A. Mesenchymal stem cells and kidney repair. Nephrology Dialysis Transplantation. 2013. Vol. 28 (Issue 4): 788-793.

13. Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. Nephrology Dialysis Transplantation. 2012. Vol. 27 (Issue 8): 3037-3042.

14. Huang YC, Parolini O, Deng L. The potential role of microvesicles in mesenchymal stem cell-based therapy. Stem Cells and Development. 2013. Vol. 22 (Number 6): 841-844.

15. Kim N, Cho SG. New strategies for overcoming limitations of mesenchymal stem cellbased immune modulation. International Journal of Stem Cells. 2015. Vol. 8 (Number 1): 54-68.

16. Rowart P, Erpicum P, Detry O, Weekers L, Grégoire C, Lechanteur C, Briquet A, Beguin Y, Krzesinski JM, Jouret F. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Ischemia/Reperfusion Injury. Journal of Immunology Research. 2015. Vol. 2015. Article ID 602 597, 8 pages.

17. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999. Vol. 284 (Number 5411): 143-147.

18. He J, Wang Y, Sun S, Yu M, Wang C, Pei X, Zhu B, Wu J, Zhao W. Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model. Nephrology. 2012. Vol. 17 (Issue 5): 493-500.

19. Tetta C, Bruno S, Fonsato V, Deregibus MC, Camussi G. The role of microvesicles in tissue repair. Organogenesis. 2011. Vol. 7 (Issue 2): 105-115.

20. Tamama K, Kerpedjieva SS. Acceleration of Wound Healing by Multiple Growth Factors and Cytokines Secreted from Multipotential Stromal Cells/Mesenchymal Stem Cells. Advances in Wound Care. 2012. Vol. 1 (Number 4): 177-182.

21. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, Baan CC, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. Frontiers in Immunology. 2012. Vol. 3: Article 297, 8 pages.

22. Cao W, Cao K, Cao J, Wang Y, Shi Y. Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses. Immunology Letters. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.06.003.

23. Sivanathan KN, Gronthos S, Rojas-Canales D, Thierry B, Coates PT. Interferongamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. Stem Cell Reviews and Reports. 2014. Vol. 10 (Issue 3): 351-375.

24. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. Cell Stem Cell. 2013. Vol. 13 (Issue 4): 392-402.

25. Engela AU, Baan CC, Dor FJ, Weimar W, Hoogduijn MJ. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. Frontiers in Immunology. 2012. Vol. 3: Article 126, 8 pages. 51-59.

26. Perico N, Casiraghi F, Introna M, Gotti E, Todeschini M, Cavinato RA, Capelli C, Rambaldi A, Cassis P, Rizzo P, Cortinovis M, Marasà M, Golay J, Noris M, Remuzzi G. Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2011. Vol. 6 (Issue 2): 412-422.

27. English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2013. Vol. 3: a015560, 15 pages.

28. Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A, Cometa A, Cioni M, Porretti L, Barberi W, Frassoni F, Locatelli F. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. Nephrology Dialysis Transplantation. 2008. Vol. 23 (Issue 4): 1196-1202.

29. Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, Chen X, Cao K, Chen Q, Shou P, Zhang L, Yuan ZR, Roberts AI, Shi S, Le AD, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. 2012. Vol. 19 (Issue: 9): 1505-1513.

30. http://clinicaltrials.gov; Eingabe von "Mesenchymal Stem Cells" in das Suche-Feld

31. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. Archives of Pharmacal Research. 2012. Vol. 35 (Issue 5): 213-221.

32. Herold G und Mitarbeiter. Innere Medizin 2011. Köln: Herold, Gerd, 2010: 612-614.

33. Schoenenberger R, Häferli W, Schifferli J. Internistische Notfälle, 8. Vollst. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2009: 158-159.

34. Ghadially F. Diagnostic Electron Microscopy of Tumors. 2nd Edition. London: Butterworth & Co, 1985: 163.

35. Herold, G und Mitarbeiter. Innere Medizin 2011. Köln: Herold, Gerd, 2010: 617.

36. Hobert E, Galle JC, Bjarnason-Wehrens B, Cordes C, Klein G, Willemsen D, Wirth A, Witt T, Völler H. Umsetzungsempfehlungen von Diagnose- und Therapieleitlinien bei chronischen Nierenerkrankungen. Herzmedizin. 2007. Band 24 (Heft-Nr. 3): 136-146.

37. Sommerer C, Schmidt J, Zeier M. Differentialdiagnose des akuten Nierenversagens nach Nierentransplantation. Intensivmedizin und Notfallmedizin. 2005. Band 42 (Heft-Nr. 3): 241-249.

38. Karow T, Lang-Roth, R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis, 19. vollst. überarbeitete Auflage. Köln: Karow, 2010: 896-897.

39. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, Zhang Q, Xu F, Yang Z, Meng L, Yang S, Yan S, Mao A, Zhang J, Yang Y, Wang S, Cui J, Liang L, Ji Y, Han ZB, Fang X, Han ZC. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. Cell Death & Disease. 2013. Vol. 4: e950. 11 pages.

40. von Bahr L, Batsis I, Moll G, Hägg M, Szakos A, Sundberg B, Uzunel M, Ringden O, Le Blanc K. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. Stem Cells. 2012. Vol. 30 (Issue 7): 1575-1578.

41. Røsland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwietz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lønning PE, Bjerkvig R, Schichor C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. Cancer Research. 2009. Vol. 69 (Issue 13): 5331-5339.

42. Cui X, Liu J, Bai L, Tian J, Zhu J. Interleukin-6 induces malignant transformation of rat mesenchymal stem cells in association with enhanced signaling of signal transducer and activator of transcription 3. Cancer Science. 2014. Vol. 105 (Issue 1): 64-71.

43. Arango-Rodriguez ML, Ezquer F, Ezquer M, Conget P. Could cancer and infection be adverse effects of mesenchymal stromal cell therapy? World Journal of Stem Cells. 2015. Vol. 7 (Issue 2): 408-417.

44. Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. Blood. 2007. Vol. 110 (Issue 4): 1362-1369.

45. Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Müller-Newen G, Djuric Z, van Roeyen CR, Konieczny A, Ostendorf T, Villa L, Milovanceva-Popovska M, Kerjaschki D, Floege J. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. Journal of the American Society of Nephrology. 2007. Vol. 18 (Issue 6): 1754-1764.

46. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. Kidney International. 2010. Vol. 78 (Issue 9): 838-848.

47. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. American Journal of Cancer Research. 2011. Vol. 1 (Issue 1): 98-110.

48. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. Annual Review of Cell and developmental Biology. 2014. Vol. 30: 225-289.

49. Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development. FEBS Letters. 2005. Vol. 579 (Issue 26): 5911-5922.

50. Sabin K, Kikyo N. Microvesicles as mediators of tissue regeneration. Translational Research. 2014. Vol. 163 (Issue 4): 286-295.

51. Bissels U, Bosio A, Wagner W. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. Articles and Brief Reports. 2012. Vol. 97 (Issue 2): 160-167.

52. Fierabracci A, Del Fattore A, Luciano R, Muraca M, Teti A, Muraca M. Recent advances in mesenchymal stem cell immunomodulation: the role of microvesicles. Cell Transplantation. 2015. Vol. 24 (Issue 2): 133-149.

53. García-Castiñeiras S. Iron, the retina and the lens: a focused review. Experimental Eye Research. 2010. Vol. 90 (Issue 6): 664-678.

54. Ferrari, RS, Andrade CF. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015. Vol. 2015. Article ID 590987, 14 pages.

55. Vara D, Pula G. Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. Current Molecular Medicine. 2014. Vol. 14 (Issue 9): 1103-1125.

56. Iwabuchi T, Yoshimoto C, Shigetomi H, Kobayashi H. Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Endometriosis and Its Malignant Transformation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015. Vol. 2015: Article ID 848595, 7 pages.

57. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000. Vol. 408 (Issue 6809): 239-247.

58. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell Death. New England Journal of Medicine. 2009. Vol. 361 (Issue 16): 1570-1583.

59. Breggia AC, Himmelfarb J. Primary mouse renal tubular epithelial cells have variable injury tolerance to ischemic and chemical mediators of oxidative stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2008. Vol. 1 (Issue 1): 33-38.

60. White JG, Rao GH. Effects of a microtubule stabilizing agent on the response of platelets to vincristine. Blood. 1982. Vol. 60 (Issue 2): 474-483.

61. Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS, Longo DL. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. Molecular and Cellular Biology. 1998. Vol. 18 (Issue 6). 3509-3517.

62. Kotake-Nara E, Saida K. Endothelin-2/vasoactive intestinal contractor: regulation of expression via reactive oxygen species induced by CoCl2, and Biological activities including neurite outgrowth in PC12 cells. The Scientific World Journal. 2006. Vol. 6: 176-186.

63. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. Journal of Visualized Experiments. 2011. Issue 54: e2899, 4 pages.

64. Greenfield J, Love S, Louis D. Neuropathology. Volume 1. 8th Edition. Boca Raton: Hodder Arnold Publication, 2008: 746.

65. Kung CT, Su CM, Chang HW, Cheng HH, Hsiao SY, Tsai TC, Tsai NW, Wang HC, Su YJ, Lin WC, Cheng BC, Chang YT, Chiang YF, Lu CH. The prognostic value of leukocyte apoptosis in patients with severe sepsis at the emergency department. Clinica Chimica Acta. 2015. Vol. 438: 364-369.

66. Jia J, Yang M, Chen Y, Yuan H, Li J, Cui X, Liu Z. Inducing apoptosis effect of caffeic acid 3,4-dihydroxy-phenethyl ester on the breast cancer cells. Tumor Biology. 2014. Vol. 35 (Issue 12): 11781-11789.

67. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev YI. Effect of Erythropoietin on Lymphocytes Apoptosis in Experimental Chronic Renal Failure. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015. Vol. 159 (Issue 3): 348-350.

68. Balmer J, Zulliger R, Roberti S, Enzmann V. Retinal Cell Death Caused by Sodium Iodate Involves Multiple Caspase-Dependent and Caspase-Independent Cell-Death Pathways. International Journal of Molecular Sciences. 2015. Vol. 16 (Issue 7): 15086-15103.

Bakouboula B, Morel O, Faller AL, Freyssinet JM, Toti F. Significance of membrane microparticles in solid graft and cellular transplantation. Frontiers in Bioscience. 2011. Vol. 16: 2499-2514.

70. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic Pathology.2007. Vol. 35 (Issue 4): 495-516.

71. Zhu XY, Urbieta-Caceres V, Krier JD, Textor SC, Lerman A, Lerman LO. Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells decrease renal injury in experimental swine renal artery stenosis through different mechanisms. Stem Cells. 2013. Vol. 31 (Issue 1): 117-125.

72. Bruno S, Grange C, Collino F, Deregibus MC, Cantaluppi V, Biancone L, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. PLOS One. 2012. Vol. 7 (Issue 3): e33115, 11 pages.

73. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. Journal of the American Society of Nephrology. 2009. Vol. 20 (Issue 5): 1053-1967.

74. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. Hepatology. 1995. Vol. 21 (Issue 5): 1465-1468.

75. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemiareperfusion-induced acute and chronic kidney injury. Nephrology Dialysis Transplantation. 2011. Vol. 26 (Issue 5): 1474-1483.

76. Bonventre JV. Microvesicles from mesenchymal stromal cells protect against acute kidney injury. Journal of the American Society of Nephrology. 2009. Vol. 20 (Issue 5): 927-928.

77. Hong B, van den Heuvel AP, Prabhu VV, Zhang S, El-Deiry WS. Targeting tumor suppressor p53 for cancer therapy: strategies, challenges and opportunities. Current Drug Targets. 2014. Vol. 15 (Issue 1): 80-89.

78. Ulivi V, Tasso R, Cancedda R, Descalzi F. Mesenchymal stem cell paracrine activity is modulated by platelet lysate: induction of an inflammatory response and secretion of factors maintaining macrophages in a proinflammatory phenotype. Stem Cells and Development. 2014. Vol. 23 (Issue 16): 1858-1869.

79. Page P, DeJong J, Bandstra A, Boomsma RA. Effect of serum and oxygen concentration on gene expression and secretion of paracrine factors by mesenchymal stem cells. International Journal of Cell Biology. 2014. Vol. 2014: Article ID 601063, 7 pages.

80. Zimmermann JA, McDevitt TC. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. Cytotherapy. 2014. Vol. 16 (Issue 3): 331-345.

81. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005. Vol. 105 (Issue 4): 1815-1822.

82. Favaro E, Carpanetto A, Lamorte S, Fusco A, Caorsi C, Deregibus MC, Bruno S, Amoroso A, Giovarelli M, Porta M, Perin PC, Tetta C, Camussi G, Zanone MM. Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes. Diabetologica. 2014. Vol. 57 (Issue 8): 1664-73.

83. Zinöcker S, Vaage JT. Rat mesenchymal stromal cells inhibit T cell proliferation but not cytokine production through inducible nitric oxide synthase. Frontiers in Immunology. 2012.

84. Kuriyama K, Ohkuma S. Role of nitric oxide in central synaptic transmission: effects on neurotransmitter release. Japanese Journal of Pharmacology. 1995. Vol. 96 (Issue 1): 1-8.

85. Raikov ZD, Raikova ET, Atanasov AT. Nitric oxide and free stable nitroxyl radicals in the mechanism of biological action of the spin-labeled compounds. Medical Hypotheses.
2001. Vol. 57 (Issue 3): 302-305.

86. Stolz DB, Zamora R, Vodovotz Y, Loughran PA, Billiar TR, Kim YM, Simmons RL, Watkins SC. Peroxisomal localization of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. Hepatology. 2002. Vol. 36 (Issue 1): 81-93.

87. Wu H, Nardone A, Lacetera N. Effects of a standardized purified dry extract from Echinacea angustifolia on proliferation and interferon gamma secretion of peripheral blood mononuclear cells in dairy heifers. Research in Veterinary Science. 2008. Vol. 87 (Issue 3): 396-398.

88. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacological Reviews. 2004. Vol. 56 (Issue 3): 387-437.

89. Ishihara O, Sullivan MH, Elder MG. Differences of metabolism of prostaglandin E2 and F2 alpha by decidual stromal cells and macrophages in culture. Eicosanoids. 2001. Vol. 4 (Issue 4): 203-207.

90. Conforti A, Scarsella M, Starc N, Giorda E, Biagini S, Proia A, Carsetti R, Locatelli F, Bernardo ME. Microvescicles derived from mesenchymal stromal cells are not as effective as

their cellular counterpart in the ability to modulate immune responses in vitro. Stem Cells and Development. 2007. Vol. 23 (Issue 21): 2591-2599.

## Eigenständigkeitserklärung/Eidesstattliche Versicherung

Ich, Julie Gauchel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

*In vitro*-Analyse des Potentials extrazellulärer Vesikel von Mesenchymalen Stromazellen für die Nierentransplantation

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, 17.03.2016

(Julie Gauchel)

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich von der Findung meines Themas bis zur Vollendung der Monographie beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Martina Seifert, die meine Arbeit und mich betreut hat. Ich danke ihr für diese wirklich exzellente Betreuung, eine bessere hätte ich mir nicht wünschen können. Ihre kontinuierliche Motivation und die zahlreichen konstruktiven Gespräche haben einen wichtigen Beitrag zur Vollendung dieser Arbeit geleistet. Außerdem haben es mir ihr Verständnis und ihre Geduld ermöglicht, die Arbeit fokussiert zu Ende zu führen. Nicht zuletzt möchte ich ihr dafür danken, dass sie mir freundlicherweise dieses hochinteressante Thema überlassen hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Meaghan Stolk bedanken, die mir während der Arbeit an dem Projekt und beim Anfertigen der Monographie jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Besonders danke ich ihr für die kompetente Betreuung bei der praktischen Laborarbeit. Sie hat mir viel beigebracht und ohne Sie wäre mein Wunsch nach einer experimentellen Arbeit im Labor vielleicht so nicht möglich gewesen.

Ich danke auch allen weiteren Mitgliedern der AG Seifert, insbesondere Frau Naïma Souidi. Sie hatten für meine Fragen rund um die Arbeit in der experimentellen Forschung immer ein offenes Ohr.

Ebenfalls bedanke ich mich bei der Studienstiftung des deutschen Volkes, die mich während meiner gesamten Studienzeit finanziell und ideell förderte. Durch diese Förderung war es mir möglich, mich in dieser Zeit voll und ganz auf mein Studium und im Urlaubssemester auf das Forschungsprojekt zu fokussieren, das dieser Arbeit zugrunde liegt.

Daneben gilt mein Dank Frau Friederike Marth und Herrn Ronny Edler, die zahlreichen Stunden damit zugebracht haben, diese Arbeit Korrektur zu lesen. Sie haben mich auf Schwächen hingewiesen und in der Schlussphase nochmals angespornt. Ich danke ihnen für ihre Unterstützung und dafür, dass sie sich so viel Zeit genommen und so viel Mühe gegeben haben!

Sehr großer Dank gilt außerdem meinen Eltern, die mich Zeit meines Lebens immer unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit schon im Vorhinein niemals zustande gekommen.