

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht – Karls – Universität

Heidelberg

vorgelegt von

M.Sc. Laura Kummer

aus Heppenheim

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2021

Häm-Oxygenase-1 reduziert anti-HLA-I-Antikörper-induzierte Adhäsion und
Transmigration von Monozyten *in vitro* und verringert
die Transplantatvaskulopathie in Mäusen

Gutachter: Prof. Dr. Ilse Hofmann

Prof. Dr. med. Markus Weigand

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnisse	1
Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
Zusammenfassung	5
Abstract	6
1. Einleitung	7
1.1 Das Immunsystem im Zusammenhang mit soliden Organtransplantationen	7
1.1.1 Häufigkeit solider Organtransplantationen.....	7
1.1.2 Immunologische Grundlage allogener Abstoßungsreaktionen.....	7
1.1.3 Abstoßungsreaktionen in Folge einer soliden Organtransplantation	8
1.2 Die Pathophysiologie der Transplantatvaskulopathie	11
1.2.1 Die Gefäßwand besitzt eine mehrschichtige Struktur.....	11
1.2.2 Ausprägung der Transplantatvaskulopathie	12
1.2.3 Inzidenz und Therapieoptionen der Transplantatvaskulopathie	13
1.3 Die Aktivierung des Endothels ist der initiale Schritt der Transplantatvaskulopathie	15
1.3.1 Anti-HLA-Antikörper vermitteln komplementunabhängige Effekte in Endothelzellen	15
1.3.2 Weitere immunologische Faktoren der Endothelaktivierung	17
1.3.3 Nicht-immunologische Faktoren der Endothelaktivierung	18
1.3.4 Die Endothelaktivierung führt zu einer chronischen Inflammation der Gefäßwand ...	19
1.4 Rekrutierung und Transmigration von Leukozyten	20
1.4.1 Aktivierte Endothelzellen ändern ihr Expressionsspektrum	20
1.4.2 Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten mittels Chemokinen	20
1.4.3 Die Transmigration von Leukozyten läuft in mehreren Stufen ab	22
1.5 Das mononukleäre Infiltrat	24
1.5.1 Monozyten und Makrophagen stellen eine heterogene Leukozytenpopulation dar ...	24
1.5.2 Die Rolle der Makrophagen in der Transplantatvaskulopathie	25
1.6 Akkommodation im Zuge der Transplantatvaskulopathie	27
1.6.1 Die Expression antiinflammatorischer Gene beeinflusst das Organüberleben positiv.	27
1.6.2 Die HO-1 vermittelt immunmodulatorische Effekte	28
1.6.3 Die Aktivität der HO-1 wird durch Häm Analoga und Statine moduliert	30
1.7 Fragestellung	33
2. Material	34
2.1 Eukaryontische Zellen	34

2.2	Zellkulturmedium	34
2.3.	Versuchstiere	35
2.4	Plastikware	35
2.5	Reagenzien.....	36
2.6	Antikörper.....	37
2.7	Molekularbiologische Kits	38
2.8	TaqMan® Genexpressions-Assay	38
2.9	Immunhistologie	38
2.10	si-RNA- Transfektion.....	39
2.11	Medikamente.....	39
2.12	Puffer und Lösungen.....	39
2.13	Operationsbesteck.....	41
2.14	Sonstiges.....	41
2.15	Geräte/Instrumente	42
2.16	Software	43
3.	Methoden.....	44
3.1	Zellbiologische Methoden.....	44
3.1.1	Kultivierung der primären Endothelzellen (human & murin)	44
3.1.2	Kultivierung der monozytären Zelllinien	45
3.1.3	Stimulation der Endothelzellen mit dem anti-HLA-I bzw. anti-MHC-I-Antikörpern.....	47
3.1.4	Modulation der HO-1-Aktivität in humanen Endothelzellen	47
3.1.5	si-RNA-induzierter HO-1-Knockdown.....	48
3.1.6	Adhäsions-Assay mit Endothelzellen und Monozyten (human & murin)	49
3.1.8	Transmigrations-Assay mit Endothelzellen und Monozyten.....	52
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	56
3.2.1	Genexpressionsanalyse durch qRT-PCR	56
3.2.2	Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot.....	59
3.2.3.	CD62E-Expressionsanalyse mittels durchflusszytometrischer Verfahren.....	63
3.3	Tierexperimentelle Methoden	65
3.3.1	Zucht und Haltung der Versuchstiere.....	65
3.3.2	Etablierung des allogenen Aorten-Transplantationsmodells.....	66
3.3.3	Versuchsaufbau	70
3.3.4	Histologische Aufarbeitung des Gewebes.....	75
3.3.5	Durchflusszytometrischer SF1-1.1-Nachweis.....	79
3.3.6	Ethische Begutachtung des Tierversuches	81

3.4	Statistik.....	81
4.	Ergebnisse.....	83
4.1.	Quantifizierung der Effekte des si-RNA-induzierten HO-1-Knockdowns	83
4.1.1	Reduktion der HO-1-mRNA in HCAEC durch si-RNA-Transfektion	83
4.1.2	HO-1 si-RNA-Transfektion führt zu verminderter HO-1-Proteinexpression in HCAEC..	84
4.2	Quantifizierung der Adhäsion von Monozyten an einen endothelialen Monolayer	85
4.2.1	w6/32-Antikörper induziert konzentrationsabhängige Steigerung der Adhäsion	85
4.2.2	Expression und Aktivität der HO-1 beeinflusst w6/32-induzierte Adhäsion.....	86
4.3	Quantifizierung der Transmigration von Monozyten über den endothelialen Monolayer	89
4.3.1	w6/32-Antikörper induziert Steigerung der Transmigration	89
4.3.2	Expression und Aktivität der HO-1 beeinflusst w6/32-induzierte Transmigration	90
4.4	Stimulation mit dem w6/32-Antikörper induziert CD62E-Expression in HCAEC	92
4.4.1	Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene	92
4.4.2	Expressionsnachweis auf Proteinebene	94
4.4.3	HO-1-Aktivität reduziert w6/32-induzierte CD62E-Expression	96
4.5	CD62E-Blockade reduziert w6/32-induzierte Adhäsion und Transmigration.....	99
4.6	SF1-1.1-Antikörper induziert Adhäsion und Transmigration im murinen System	100
4.7	SF1-1.1-Antikörper verursacht eine Transplantatvaskulopathie <i>in vivo</i>	102
4.7.1	SF1-1.1-Antikörper induziert neointimale Hyperplasie.....	102
4.7.2	SF1-1.1-Antikörper vermittelt keine Effekte in den nativen Gefäßen.....	103
4.7.3	SF1-1.1-Antikörper induziert ein monozytären Infiltrates und CD62E-Expression	104
4.8	HO-1 Aktivität moduliert die Ausprägung der Transplantatvaskulopathie <i>in vivo</i>	109
4.8.1	Aktivierte HO-1 reduziert die neointimale Hyperplasie	109
4.8.2	Aktivierte HO-1 verringert das monozytäre Infiltrat in der Gefäßwand	111
4.8.3	CORM-401 vermittelte Effekte sind unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel ..	113
4.9	CD62E-blockierender Antikörper reduziert Transplantatvaskulopathie.....	116
4.9.1	CD62E-Blockade verringert SF1-1.1-induzierte Neointima	116
4.9.2	CD62E-Blockade verringert SF1-1.1-induziertes monozytäres Infiltrat.....	117
5.	Diskussion.....	119
5.1	HO-1 schützt vor antikörperinduzierter Monozyten-Endothelinteraktion <i>in vitro</i>	120
5.2	HO-1 reduziert Ausprägung der Transplantatvaskulopathie <i>in vivo</i>	125
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	130
6.	Literaturverzeichnis.....	132
	Anhang	153
	Danksagung	155

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

AUC	Area Under the Curve, Fläche unterhalb der Kurve	EtOH	Ethanol
APC	Antigen Presenting Cells, Antigen-präsentierende Zellen	FC	Flow Cytometry, Durchflusszytometrie
AT1R	Angiotensin II Receptor Type I, Angiotensin-II-Rezeptor Typ I	FcγR	Fcγ-Rezeptor
Bregs	Regulatory B cells, regulatorische B-Zellen	FCS	Fetal Calv Sreum, fetales Kälberserum
BSA	Bovine Serum Albumin, bovines Serumalbumin	FSC/SSC	Forward Scatter/Side Scatter, Vorwärts-/Seitwärtsstreuung
CAV	Cardiac Allograft Vasculopathy, kardiale allogene Vaskulopathie	FGF	Fibroblast Growth Factor, fibroblastischer Wachstumsfaktor
CD	Cluster of Differentiation	FRET	Förster Resonance Energy Transfers
cDNA	copy DNA	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
CIM-Platte	Cell Invasion and Migration - Platte	gDNA	genomische DNA
CLAD	Chronic Lung Allograft Dysfunction, chronische Dysfunktion des Lungentransplantats	GV-SO-LAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde/ Society of Laboratory Animal Science
CO	Kohlenstoffmonoxid	h	Hour, Stunde
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cells, humane koronararterielle Endothelzellen
CoPPIX	Cobalt (III) Protoporphyrin IX Chlorid	HLA	Human Leukocyte Antigen, humanes Leukozytenantigen
(i)CORM	(inactive) CO Releasing Molecule, (inaktives) CO-freisetzendes Molekül	HMGB1	high-mobility group box protein-1
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern, mit Schädigung assoziierten molekularen Strukturen	HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells, humane vernöse Endothelzellen der Nabelschnur
DC	Dendritic Cells, dendritische Zellen	HO-1	Häm Oxygenase-1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	HRP	HorseRadish Peroxidase, Meerrettichperoxidase
DNA	DeoxyriboNucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure	IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
DSA	Donor Specific Antibodies, donorspezifische Antikörper	ICAM	InterCellular Adhesion Molecule, interzelluläres Adhäsionsmolekül
EC	Endothelial Cells, Endothelzellen	IL	Interleukin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	i.p.	Intraperitoneal
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor	IQGAP1	IQ-domain GTPase-activating Protein
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	I-TAC	Interferon-inducible T-cell Alpha Chemoattractant
ESAM	Endothelial cell Selective Adhesion Molecule, Endothelzell-selektives Adhäsionsmolekül	JAM	Junctional Adhesion Molecule, junctionales Adhäsionsmolekül
ET-1	Endothelin-1	kDA	Kilodalton
		KEB	Klinisch Experimenteller Bereich

KG	Körpergewicht	PE	Phycoerythrin
KO	Knockout	PET	Polyethylenterephthalat
LPS	Lipopolysaccharid	PFA	Paraformaldehyd
MAC	Membrane attack complex, Membran-attackierender Kom- plex	qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
MeOH	Methanol	Rag2	Recombinase activating gene 2
MCP	Monozyten Chemoattractant Protein,	RNA	RiboNucleic Acid, Ribonuklein- säure
mg	Milligramm	ROS	Reactive Oxygen Species, reak- tive Sauerstoffspezies
µg	Mikrogramm	rpm	rounds per minute
MHC	Major Histocompatibility Com- plex, Haupthistokompatibilitäts- komplex	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
MICA	MHC I chain-related-gene-A, MHC-Klasse-I-Polypeptid-ver- wandte Sequenz A	RT	Raumtemperatur
min	Minute	ROI	Region Of Interest
MIP	Macrophages inflammatory pro- tein, Makrophagen-inflammatori- sches Protein	SD	Standard Deviation, Standardab- weichung
ml	Milliliter	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Mregs	regulatorische Monozyten	sec	Sekunde
mRNA	messenger RNA	si-RNA	small interfering RNA
NaCl	Natriumchlorid	SMC	Smooth Muscle Cells, glatte Mus- kelzellen
nt-RNA	non-target RNA	αSMA	α Smooth Muscle Actin
OT	Objektträger	SPF	Spezifische Pathogene frei
PBS	Phosphat Buffered Saline, Phos- phat-gepufferte Kochsalzlg.	TBS-T	Tris Buffered Saline-Tween
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	TEMED	Tetramethylethyldiamin
PCR	Polymerase Chain Reaction, Poly- merase_kettenreaktion	TNF	Tumornekrosefaktor
PDFG	Platelet-Derived Growth Factor, Thrombozyten-produzierter Wachstumsfaktor	Treg	Regulatorische T Zellen
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1	TV	Transplantatvaskulopathie
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule	VCAM	Vascular Adhesion Molecsule, va- skuläres Adhäsionsmolekül
		VE-Cad- herin	Vascular Endothelial Cadherin, vaskuläres endotheliales Cad- herin
		VGEF	Vascular Endothelial Growth Fac- tor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
		VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells, vaskuläre glatte Muskelzellen
		vWF	Von-Willebrand-Faktor
		ZnPPiX	Zink (II) Protoporphyrin IX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der arteriellen Gefäßwand	11
Abbildung 2: Induzierte Endothelaktivierung durch donorspezifische Antikörper.	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Transmigration von Leukozyten.....	22
Abbildung 4: Chemische Struktur des HO-1 Substrates.....	28
Abbildung 5: Übersicht über die Interaktionen zwischen EC und Leukozyten.....	32
Abbildung 6: Hämozytometer nach Neubauer	45
Abbildung 7: Strahlengang des Lasers der auf ein Event trifft	51
Abbildung 8: Gating-Strategie für die Auswertung der Adhäsions-Assays	52
Abbildung 9: Aufbau des Transwell-Systems	53
Abbildung 10: Schematischer Aufbau des xCELLigence-System von OMNI Life Science	54
Abbildung 11: Schematische Darstellung der AUC einer Impedanzmessung	55
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Western Blots	61
Abbildung 13: Darstellung von Proteinbanden und des korrespondierende Profilplots	62
Abbildung 14: Gating-Strategie zur Quantifizierung der CD62E-Oberflächenexpression	64
Abbildung 15: Schematische Darstellung der anatomischen Abschnitte der murinen Aorta.	67
Abbildung 16: Positionsbeschreibung der Implantation des Aortensegmentes	69
Abbildung 17: Schematischer Versuchsaufbau zur Induktion der TV.....	70
Abbildung 18: Schematisches Applikationsschema zur Testung des Einflusses von CoPPIX	71
Abbildung 19: Schematisches Applikationsschema zur Testung des Einflusses von Statinen	72
Abbildung 20: Schematisches Applikationsschema zur Testung des Einflusses von CORM-401.....	73
Abbildung 21: Schematisches Applikationsschema zur Testung einer CD62E-Blockade	73
Abbildung 22: Gating-Strategie zum qualitativen Nachweis der SF1-1.1-Antikörper im Plasma	80
Abbildung 23: Effekte des si-RNA-induzierten Knockdowns auf die HO-1-Expression	84
Abbildung 24: Relative Quantifizierung der w6/32-induzierten Adhäsion von THP-1.....	86
Abbildung 25: Effekte der HO-1-Aktivität bzw. Expression auf die w6/32-induzierte THP-1-Adhäsion	88
Abbildung 26: Relative Quantifizierung der Transmigration von THP-1	90
Abbildung 27: Auswirkung der HO-1-Aktivität auf die w6/32-induzierte Transmigration.....	91
Abbildung 28: mRNA-Expressionsanalysen in Abhängigkeit der w6/32-Stimulation	94
Abbildung 29: CD62E-Proteinexpressionsanalysen in HCAEC nach w6/32-Stimulation	96
Abbildung 30: Quantifizierung des Effekts der HO-1-Modulation auf die CD62E-mRNA-Expression.....	97
Abbildung 31: CD62E-Oberflächenexpression in Abhängigkeit der HO-1-Aktivität	98
Abbildung 32: Effekte der CD62E-Blockade auf die w6/32-induzierte Adhäsion und Transmigration.....	100
Abbildung 33: Quantifizierung der SF1-1.1-Antikörper-induzierten Adhäsion und Transmigration	101
Abbildung 34: Quantifizierung der SF1-1.1-induzierten neointimalen Hyperplasie <i>in vivo</i>	103
Abbildung 35: HE-Bilder der Kryoschnitte von Segmenten der nativen Rag2-KO Aorta.....	104
Abbildung 36: Quantifizierung des SF1-1.1 induzierten monozytären Infiltrats	105
Abbildung 37: Quantifizierung der CD62E-Expression auf EC in Transplantaten	107
Abbildung 38: Quantifizierung der CD62E-Expression auf VSMC in Transplantaten.....	108
Abbildung 39: Quantifizierung des Effekts der HO-1-Modulation auf die neointimalen Hyperplasie.....	110
Abbildung 40: Quantifizierung des Effekts der HO-1-Modulation auf das monozytären Infiltrates	112
Abbildung 41: Quantifizierung des Effekts von DMSO auf die neointimale Hyperplasie.....	114
Abbildung 42: Quantifizierung des Effekts von DMSO auf das monozytäre Infiltrat.....	115
Abbildung 43: Effekte der CD62E-Blockade auf die neointimale Hyperplasie	116
Abbildung 44: Quantifizierung des Effekts der CH62E-Blockade auf das monozytären Infiltrat	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der häufigsten Ursachen einer Endothelaktivierung	22
Tabelle 2: Komponenten und Volumina der gDNA-Eliminations-Reaktion	60
Tabelle 3: Komponenten und Volumina des RT-Mastermixes	60
Tabelle 4: Komponenten und Volumina des qRT-PCR Master Mixes	61
Tabelle 5: Im Western Blot verwendete Antikörper	64
Tabelle 6: Angewendete Anästhesie- und Analgesieverfahren	71
Tabelle 7: Übersicht über alle in diesem Experiment durchgeführten Versuchsgruppen	77
Tabelle 8: Verwendete Antikörper der CD68-Färbung	80
Tabelle 9: Verwendete Antikörper der CD62E/Endothel-Färbung	80
Tabelle 10: Verwendete Antikörper der CD62E/ α -SMA-Färbung	82

Zusammenfassung

Die Transplantation solider Organe ist bis heute die beste Möglichkeit zur Behandlung eines terminalen Organversagens. Die *de novo* Synthese von donorspezifischen Antikörpern (DAS), die gegen das humane Leukozyten Antigen (HLA) gerichtet sind, zeichnen für die Ausbildung einer chronischen Abstoßungsreaktion, einer Transplantatvaskulopathie (TV), verantwortlich. Diese Antikörper induzieren durch ihre Bindung an Endothelzellen (EC) in den Gefäßen des Transplantats deren Aktivierung. Die aktivierten EC rekrutieren und aktivieren ihrerseits Immunzellen in das Transplantat, in deren Folge es zu einer neointimalen Hyperplasie und der Bildung eines monozytären Infiltrates in der Gefäßwand kommt. Die neugebildete Neointima besteht vornehmlich aus glatten Muskelzellen, die aus der Media migriert sind, und resultiert in der Reduktion des Gefäßlumens. Die TV ist damit vergleichbar mit einer chronischen Inflammation des Endothels und der Gefäßwand des Transplantats.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von humanen EC mit dem anti-HLA-I-Antikörper w6/32 zu einer Expression des Adhäsionsrezeptors CD62E auf der Oberfläche der EC führt. Des Weiteren verursachte die Antikörperstimulation die Adhäsion und Transmigration von Monozyten. Diese zellulären Interaktionen konnten durch einen si-RNA-induzierten Knockdown des anti-inflammatorischen Enzyms Häm-Oxygenase (HO)-1 verstärkt werden. Die pharmakologische Aktivierung der HO-1 durch CoPPiX oder Statine führte dahingegen zu einer Reduktion der Adhäsion und Transmigration. Die antikörperinduzierte CD62E-Expression zeigte sich ebenfalls sensitiv gegenüber einer gezielten Aktivierung der HO-1 in den EC. Darüber hinaus führte die Blockade dieses Oberflächenmoleküls zu einer reduzierten Interaktion zwischen Monozyten und EC.

In einem murinen allogenen Transplantationsmodell konnten die *in vitro* Ergebnisse verifiziert werden. Hierzu wurde ein Segment der thorakalen Aorta von Balb/c Mäusen infrarenal in die *Aorta abdominalis* von Rag2 Knockout (KO) Mäusen transplantiert. Durch die Applikation des MHC-I-spezifischen-Antikörpers SF1-1.1 gelang es in dem Transplantat eine TV zu induzieren. Dies konnte anhand der neointimalen Hyperplasie und des monozytären Infiltrats quantifiziert werden. Die Applikation des SF1-1.1-Antikörpers führte darüber hinaus zu einer verstärkten CD62E-Expression in dem Transplantat. Durch die pharmakologische Induktion der HO-1 oder die Behandlung mit dem HO-1-Metaboliten Kohlenstoffmonoxid konnte die SF1-1.1-induzierte Neointima, als auch das monozytäre Infiltrat in der Gefäßwand signifikant reduziert werden. Die Behandlung mit einem CD62E-blockierenden Antikörper resultierte in einer geringeren Transmigration von monozytären Zellen in die Gefäßwand und einer reduzierten neointimalen Hyperplasie. Die Modulation der HO-1 stellt damit eine vielversprechende therapeutische Intervention zur Behandlung einer TV dar.

Abstract

To this day, the transplantation of solid organs is the only sufficient therapeutic option for patients suffering from end stage organ failure. One of the risk factors for developing a chronic organ rejection, a transplant vasculopathy (TV), is *de novo* synthesized donor-specific antibodies against human leukocyte antigens (HLA). These antibodies bind and activate endothelial cells (EC) of the transplant's vasculature. Once activated, EC start to recruit immune cells into the vessel wall of the transplanted organ resulting in neointimal hyperplasia and the formation of a monocytic infiltrate. The newly formed neointima primarily consists of vascular smooth muscle cells (VSMC) that have migrated from the media and leads to a reduction of the vessel lumen. Therefore, TV comprises to a chronic inflammation of the transplant vessel wall.

In this thesis, it is demonstrated that stimulation of human EC with the anti-HLA I antibody w6/32 induces adhesion and transmigration of monocytes. These cellular interactions have been reinforced by si-RNA mediated knockdown of the anti-inflammatory enzyme heme oxygenase (HO)-1. A pharmacologically induced activation of HO-1 by CoPPiX or statins counteracts w6/32 generated adhesion as well as transmigration. Furthermore, w6/32 stimulation induces expression of the adhesion receptor E-selectin on the surface of EC which proved to be sensitive towards target activation of HO-1. The incubation of EC with E-selectin blocking antibodies after w6/32 stimulation led to a reduced interaction between monocytes and EC.

Following these *in vitro* findings, an allogenic transplantation model in mice was successfully established to verify the results. Segments of the thoracic aorta from Balb/c mice were implanted in an infrarenal position into the *Aorta abdominalis* of Rag2 knockout (KO) mice. After the transplantation, Rag2 KO mice were injected with the anti-MHC I antibody SF1-1.1 to evoke TV in the donor vessels. Development of TV was assessed by neointimal hyperplasia and monocytic infiltrate quantification. Additionally, it could be shown that SF1-1.1 treatment increases E-selectin expression within the transplant.

Matching the *in vitro* experiments, HO-1 activity was intensified by CoPPiX and statins and its effects on TV development were tested in the mouse model. Both the target activation of HO-1 and its metabolite carbon monoxide led to a significant decrease in SF1-1.1 induced neointima and monocytic infiltrate formation. The application of an E-Selectin blocking antibody was shown to diminish the number of transmigrated monocytes into the vessel wall and the neointimal hyperplasia. In conclusion, HO-1 modulation might be a promising therapeutic approach to treat life-threatening TV.

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem im Zusammenhang mit soliden Organtransplantationen

1.1.1 Häufigkeit solider Organtransplantationen

Die Transplantation von Organen ist bis heute vielfach die beste therapeutische Behandlungsoption für Patienten, die unter einem Organversagen im Endstadium leiden. Die Stiftung Eurotransplant stellt einen Zusammenschluss von acht europäischen Ländern dar und regelt die Allokation (Zuteilung) von Spenderorganen auf Grundlage medizinischer und ethischer Aspekte. Im Jahr 2020 wurden 6.348 solide Organe über Eurotransplant vermittelt und erfolgreich transplantiert. Zu den vaskularisierten, soliden Organen zählen (gelistet nach der Häufigkeit ihrer Transplantation im Jahr 2020): Niere (2.839), Lunge (1.277), Leber (1.466), Herz (586), Pankreas (169) und Teile des Darms (11). Dem gegenüber standen zum Jahresende 14.020 Patienten auf der Warteliste, die noch auf ein passendes Spenderorgan warten (Eurotransplant 2021).

Neben der Transplantation solider Organe können auch (Knochenmarks-)Stammzellen und verschiedene Gewebe, wie Herzklappen, Augenhornhaut oder Knochen transplantiert werden. Da die Transplantation von Stammzellen aus dem Knochenmark einen immunologischen Sonderfall darstellt, wird dies in der vorliegenden Arbeit nicht behandelt. Auch die transplantierbaren Gewebe sind nur der Vollständigkeit halber erwähnt, da diese nicht oder nur schwach vaskularisiert sind und daher nicht den gleichen immunologischen Zusammenhängen unterliegen wie solide Organe.

1.1.2 Immunologische Grundlage allogener Abstoßungsreaktionen

Die häufigste Form der Transplantation ist eine allogene Organspende. Hierbei wird ein Organ zwischen zwei nicht identischen Individuen derselben Art transplantiert. Aufgrund unterschiedlicher immunogener Strukturen kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems des Empfängers und dem Ausbilden einer allogenen Abstoßungsreaktion gegenüber dem transplantierten Organ. Neben dem ABO-System der Blutgruppen spielen bei der Differenzierung zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ durch das Immunsystem des Empfängers im Besonderen die Haupthistokompatibilitätskomplexe (Major Histocompatibility Complex, MHC) der Klasse I und II eine Rolle (Afzali, Lombardi et al. 2008).

Bei den MHC-Moleküle handelt es sich um Polypeptidketten, die sich zu Heterodimeren zusammenschließen und in hochpolymorphen Genen des Chromosoms 6 codiert sind (Reed 2015). Im humanen System werden die MHC-Moleküle der Klasse I und II als humane Leukozyten Antigene (Human Leukocyte Antigen, HLA) Klasse I und II bezeichnet.

MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf der Oberfläche aller nukleären Zellen des Organismus sowie auf Thrombozyten exprimiert und dienen ursprünglich der Bindung und Präsentation von Antigenen, die beispielsweise aufgrund einer viralen Infektion intrazellulär produziert werden. Als Antigene werden

Stoffe oder Strukturen bezeichnet, die dem Immunsystem die Unterscheidung zwischen „selbst“ und „nicht selbst“ ermöglichen und eine Immunreaktion auslösen können.

Zytotoxische T-Zellen ($CD3^+CD8^+$ T-Zellen) erkennen die Komplexe aus körpereigenen MHC-Klasse-I-Molekülen und dem gebundenen Antigen und werden dadurch aktiviert (Neefjes, Jongasma et al. 2011). MHC-Klasse-II-Moleküle hingegen werden nur von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (Antigen Presenting Cells, APCs) exprimiert. Zu den APCs zählen dendritische Zellen (Dendritic Cells, DC), Monozyten, Makrophagen und B-Zellen. Diese Immunzellen können extrazellulär aufgenommene Antigene über ihre MHC-Klasse-II-Moleküle den T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$ T-Zellen) präsentieren (Unanue, Turk et al. 2016). Eine T-Zellantwort wird nur dann ausgelöst, wenn die T-Zelle das präsentierende MHC Molekül als „selbst“ und das gebundene Antigen als „nicht-selbst“ erkennt (Smith-Garvin, Koretzky et al. 2009).

1.1.3 Abstoßungsreaktionen in Folge einer soliden Organtransplantation

Abstoßungsreaktionen, die auch als Alloreaktionen bezeichnet werden, können, abhängig von ihrem zeitlichen Auftreten nach der Transplantation, als hyperakut, akut oder chronisch klassifiziert werden.

1.1.3.1 Donorspezifische Antikörper verursachen eine hyperakute Abstoßungsreaktion

In vaskularisierten Organen tritt eine hyperakute Abstoßungsreaktion innerhalb der ersten Minuten nach der Reperfusion des Transplantats auf. Als Reperfusion wird die Wiederherstellung der Blutzirkulation im Organ bezeichnet. Ursächlich für die hyperakute Abstoßungsreaktion sind donorspezifische Antikörper (Donor Specific Antibodies, DSA), die sich bereits vor der Transplantation in der Zirkulation des Empfängers befinden (Moreau, Varey et al. 2013). DSA sind Antikörper die gegen die HLA-Moleküle des Spenders gerichtet sind und können entweder aufgrund von Bluttransfusionen oder vorangegangener Transplantationen gebildet worden sein. Bei Frauen kommen noch vorherige Schwangerschaften als mögliche Ursache für das Auftreten von DSA hinzu.

Endothelzellen (Endothelial Cells, EC) kleiden als Monolayer die Gefäßwand aus und bilden das Interface zwischen dem transplantierten Organ und der Blutzirkulation des Empfängers. Aufgrund ihrer Größe können DSA nicht ohne weiteres aus der Zirkulation in das Gewebe diffundieren und somit sind EC die ersten Zielstrukturen der sich im Blut befindlichen Antikörper (Chen, Pouliquen et al. 2018). Des Weiteren sind EC semi-professionelle Antigen-präsentierende Zellen (Savage, Brooks et al. 1995) und exprimieren selbst alle Antigengruppen, die für das Immunsystem des Empfängers notwendig sind, um zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ differenzieren zu können (Glotz, Lucchiari et al. 2006, Piotti, Palmisano et al. 2014).

Das Anlagern der DSA an die EC führt zu einer Aggregation von Neutrophilen und Thrombozyten und zu einer Aktivierung des Komplementsystems (Frost, Jammal et al. 1996). Das Komplementsystem besteht aus einer enzymatischen Kaskade von Plasmaproteinen, die durch proteolytische Spaltung

inaktiver Vorläuferproteine aktiviert und als Komplementfaktoren bezeichnet werden. Die Aktivierung der Komplementfaktoren führt unter anderem zu der Formation eines Membranangriffskomplex (Membrane Attack Complex, MAC), der sich in die Plasmamembran der EC einlagert. Dadurch wird eine Porenbildung in der Membran verursacht, was zu einer unweigerlichen Zellyse und einem Absterben der EC führt (Wehner, Morrell et al. 2007). Hyperakute Abstoßungsreaktionen treten heutzutage nur noch sehr selten auf, da der Nachweis solcher DSA vor der Transplantation mittlerweile zur klinischen Routine gehört (Moreau, Varey et al. 2013).

1.1.3.2 Die Aktivierung von Lymphozyten induziert eine akute Abstoßungsreaktion

Die akuten Abstoßungsreaktionen gegenüber transplantierten Organen entwickeln sich in einem Zeitraum von mehreren Tagen bis Monaten nach der Transplantation (Mengel, Sis et al. 2012) und stellen eine sehr heterogene Gruppe von immunologischen Vorgängen dar. Die akute zelluläre Abstoßungsreaktion beruht auf der Aktivierung verschiedener T-Zellpopulationen.

Die direkte Aktivierung der CD3⁺CD4⁺ T-Helferzellen wird durch fremde HLA-Antigenkomplexe auf der Oberfläche von APCs aus dem Spenderorganismus verursacht (Sandner, Salama et al. 2003). Diese APCs, vornehmlich dendritische Zellen, sind als gewebsresidente Zellen bei der Organtransplantation mit dem Organ in den Empfänger übertragen worden. Durch den Prozess der Transplantation werden diese APCs aktiviert, verändern ihre Zytokin- und Rezeptorexpression und wandern aus dem Transplantat in die lymphatischen Gewebe des Empfängers ein. In den immunologischen Strukturen des lymphatischen Gewebes treffen die Spender-APCs auf die T-Helferzellen des Empfängers und präsentieren diesen über ihre HLA-Moleküle gebundene Antigene aus dem transplantierten Organ. Durch das Erkennen der gebundenen Antigene wird eine T-Zellaktivierung ausgelöst (Richters, van Gelderop et al. 1999). Die aktivierten T-Helferzellen induzieren die Generierung von CD3⁺CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und verursachen dadurch eine akute Abstoßungsreaktion (Taylor, Negus et al. 2007). Die durch diesen Signalweg initiierte Immunreaktion schwächt sich mit der Anzahl der APCs, die bei der Transplantation übertragen wurden und kontinuierlich das Gewebe verlassen, wieder ab (Braun, McCormack et al. 1993).

Im Gegensatz dazu werden über den indirekten Signalweg Fragmente der fremden HLA-Moleküle des Transplantats über die HLA-Moleküle von Empfänger-APCs den residenten T-Helferzellen präsentiert und diese dadurch aktiviert (Ochando, Krieger et al. 2006). Auch hierbei führt die Aktivierung der CD3⁺CD4⁺ T-Helferzellen zu einer Induktion der CD3⁺CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und einer akuten Schädigung des Transplantats (Taylor, Negus et al. 2007).

Neben der akuten zellulären Abstoßungsreaktion kann es durch die indirekte Aktivierung der T-Helferzellen auch zu einer akuten humoralen Alloreaktion des Immunsystems kommen (Moreau, Varey et al. 2013). Ursächlich für eine humorale Alloreaktion sind aktivierte B-Zellen, die DSA *de novo* gegen die

HLA-Moleküle der Klasse I und II auf der Oberfläche der EC des transplantierten Organs bilden (Walsh, Brailey et al. 2011).

Bei der Entwicklung von immunsupprimierenden Therapiemöglichkeiten lag der Fokus in den letzten Jahrzehnten vor allem auf der Behandlung der T-Zell-vermittelten akuten Abstoßungsreaktion. Dies hat dazu geführt, dass diese Form der Abstoßung nur noch bei etwa 15 % der Patienten auftritt, sofern sie nicht schon vor der Transplantation DSA gebildet hatten (Najarian, Fryd et al. 1985, Gonzalez-Molina, Burgos et al. 2014).

1.1.3.3 Donorspezifische Antikörper sind ein Risikofaktor für eine chronische Abstoßungsreaktionen

Der Rückgang der akuten Abstoßungsreaktionen und das dadurch verlängerte Organüberleben nach einer Transplantation haben das Auftreten chronischer Abstoßungsreaktion in den Mittelpunkt wissenschaftlicher und therapeutischer Bemühungen gerückt. Eine chronische Abstoßungsreaktion entwickelt sich innerhalb von Monaten bis Jahren nach der Transplantation und wird im Allgemeinen als Transplantatvaskulopathie (TV) bezeichnet. Tritt sie nach einer Lungentransplantation auf, wird sie als chronische Lungen-Allograft-Dysfunktion (Chronic Lung Allograft Dysfunction, CLAD), nach einer Herztransplantation als kardiale allogene Vaskulopathie (Cardiac Allograft Vasculopathy, CAV) und nach einer Nierentransplantation als renale Transplantat Arteriosklerose bezeichnet (Pedagogos, Hewitson et al. 1997, Pilmore, Painter et al. 2000).

Ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer TV ist die *de novo* Synthese von DSA (Smith, Banner et al. 2011). Hierbei ist die Unterscheidung zwischen einer akuten und einer chronischen antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion fließend. Nach der aktuellen Banff-Klassifikation von 2019 wird eine akute antikörpervermittelte Abstoßungsreaktion bei einem histologischen Nachweis einer akuten Gewebsschädigung, dem Vorhandensein von DSA und einer nachgewiesenen Interaktion zwischen DSA und EC diagnostiziert. Für die Diagnose einer chronischen antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion wird der Nachweis der akuten Gewebsschädigung durch den morphologischen Nachweis einer chronischen Gewebsschädigung ersetzt (Loupy, Haas et al. 2020).

Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass das Auftreten *de novo* synthetisierter DSA mit einem 2-fach erhöhten Risiko für eine TV assoziiert ist (Tikkanen, Singer et al. 2016), eine Reduktion des Gefäßlumens verursacht (Pazdernik, Bedanova et al. 2021) und mit einer verkürzten Funktionszeit des Transplantats korreliert (Mao, Terasaki et al. 2007). Uehara et al. wiesen bereits 2007 nach, dass die Applikation von anti-MHC-I-Antikörpern in T- und B-Zell-defizienten Mäusen (Mäuse, die über keine endogene adaptive Immunität verfügen) eine chronische Abstoßungsreaktion induzieren kann (Uehara, Chase et al. 2007). Dies zeigt, dass das Ausbilden einer TV auch in Abwesenheit weiterer wichtiger Zellpopulationen des Immunsystems induziert werden kann. Auch ist das Vorhandensein eines intakten Komplementsystems nicht zwangsläufig eine Voraussetzung für die Entstehung einer TV (Hirohashi, Uehara et al. 2010).

1.2 Die Pathophysiologie der Transplantatvaskulopathie

1.2.1 Die Gefäßwand besitzt eine mehrschichtige Struktur

Die Gefäßwand der Arterien besteht aus drei distinkten Schichten, die von verschiedenen Zelltypen gebildet werden und unterschiedliche Funktionen ausüben (Abb.1). Die *Tunica intima* (Intima) stellt die innerste Schicht dar und wird von vaskulären Endothelzellen gebildet, die als Monolayer die Gefäßwand auskleiden und somit das Transplantat von der Zirkulation des Empfängers abgrenzt. Durch die Expression verschiedener Rezeptoren auf der Oberfläche der EC und durch die Exozytose unterschiedlicher Signalmoleküle werden über das Endothel Gefäßtonus, Blutgerinnung, Angiogenese, Extravasation von Leukozyten und die Synthese von extrazellulärer Matrix (Extracellular Matrix, ECM) reguliert. Verankert wird der endotheliale Monolayer auf der Basallamina, wobei er durch die *Membrana elastica interna* von der *Tunica media* (Media) separiert wird.

Die Media besteht aus glatten Muskelzellen (Vascular Smooth Muscle Cells, VSMC) und erhält ihre Struktur durch mehrere Bindegewebschichten aus Kollagen und Elastin, die sie konzentrisch durchziehen. Über die Kontraktion der VSMC wird Gefäßwiderstand, Lumen und Blutfluss moduliert (Libby 1987, Lüscher 2000).

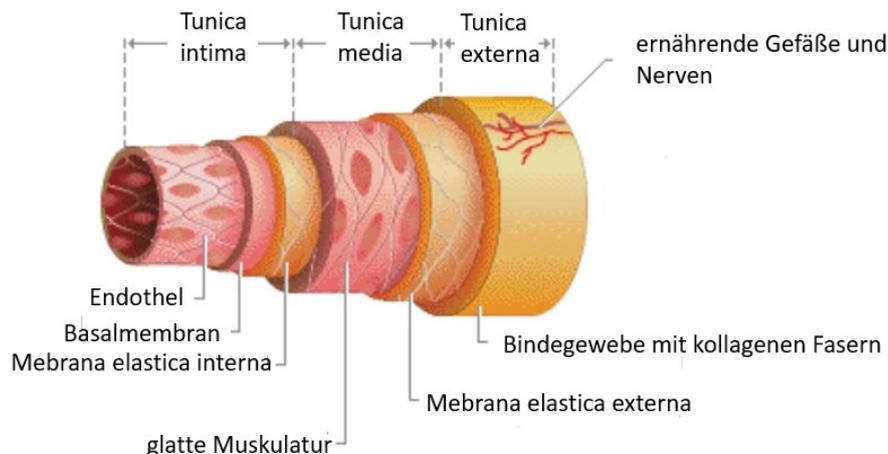


Abbildung 1: Aufbau der arteriellen Gefäßwand

Die Gefäßwand setzt sich aus 3 Schichten zusammen, die aus unterschiedlichen Zellen bestehen und durch elastische Membranen (*Membranae elasticae*) voneinander getrennt sind. Die innerste Schicht wird von einem endothelialen Monolayer gebildet und stellt das Interface zwischen Gefäß und Zirkulation dar. Modifiziert nach (Joubert-Huebner 2009).

Die *Membrana elastica externa* trennt die Media von der *Tunica externa* (Adventitia). Diese äußerste Schicht der Gefäßwand besteht aus lockerem Bindegewebe und Kollagenfasern und verankert das Blutgefäß in dem umgebenden Gewebe. Die Adventitia enthält neben Nervenenden und Adipozyten auch Blutgefäße für die Versorgung der Gefäßwand über die *Vasa vasorum* (ernährende Gefäße) (Mitchell and Libby 2007).

1.2.2 Ausprägung der Transplantatvaskulopathie

Die TV ist durch die Entstehung einer Neointima, eine so genannten neointimalen Hyperplasie gekennzeichnet (Chenzbraun, Pinto et al. 1995). Eine Dysfunktion der EC, die Proliferation und Transmigration der VSMC sowie die Akkumulation von ECM sind hierbei für die diffuse, konzentrische Verdickung der Intima und die dadurch gebildeten Neointima verantwortlich (Lin, Wilson et al. 1996, Rahmani, Cruz Rani et al. 2006).

Durch die neointimale Hyperplasie und die damit verbundene Reduktion des Gefäßlumens kommt es zu einer veränderten Gewebsperfusion und zu einer ischämischen Schädigung der dahinterliegenden Bereiche (Chih, Chong et al. 2016). Der Großteil der Intimaverdickung tritt schon zu Beginn der TV auf (Tsutsui, Ziada et al. 2001), kann aber teilweise durch eine Relaxierung der Media und damit einer Vergrößerung des gesamten Gefäßdurchmessers (outward remodeling) ausgeglichen werden (Huibers, Vink et al. 2014).

Dennoch kommt es bereits in diesem frühen Stadium zu einer endothelialen Dysfunktion, was sich in einer reduzierten endothelabhängigen Vasodilatation des Gefäßes manifestiert (Hollenberg, Klein et al. 2004). Zusätzlich zu dem verringerten Gefäßlumen führt die verstärkte Produktion der Vasokonstriktoren Endothelin (ET)-1 und Thromboxan zu einer Versteifung der Gefäßwand, was den ischämischen Zustand des Gewebes weiter vorantreibt (Rahmani, Cruz Rani et al. 2006). ET-1 ist einer der stärksten Vasokonstriktoren im Menschen und vermittelt eine Vielzahl proinflammatorischer Effekte. Er konnte bereits als unabhängiger Prädiktor für eine beschleunigte Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation in die klinische Routine implementiert werden (Parikh, Khush et al. 2019).

Die dysfunktionalen EC induzieren eine Transdifferenzierung der ruhenden VSMC von einem kontraktilen in einen synthetischen Phänotyp (Shi and Chen 2014). Diese dedifferenzierten VSMC migrieren in die Neointima, wo sie proliferieren und die Verringerung des Gefäßlumens verstärken (Autieri 2003). In einem Mausmodell und in *ex vivo* Kulturen von humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass VSMC unter Stressbedingungen die Expression und Aktivität der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (Mitogen Activating Proteinkinase, MAPK) 14 verstärken und deren Deletion zu einer reduzierten Neointima führt, was auf eine verminderte VSMC-Proliferation zurückzuführen ist (Wu, Zhang et al. 2019). Die VSMC stellen somit den vorherrschenden Zelltyp in der Neointima dar und sind für die Ausprägung der TV mitverantwortlich.

In einem späteren Stadium der TV kann die Neointima in zwei distinkte Schichten unterteilt werden. Die innere Schicht wird aus lockerem Bindegewebe gebildet und die umgebende Schicht bis zur *Membrana elastica interna* besteht aus den VSMC, die aus der Media in die Neointima migriert sind (Atkinson, Horsley et al. 2004, Devitt, Rice et al. 2013).

Neben den veränderten vaskulären Strukturen der Transplantate kommt es darüber hinaus zu einer Transmigration von vornehmlich CD3⁺ Lymphozyten und CD68⁺ Makrophagen aus der Zirkulation in die Gefäßwand (Lu, Palatnik et al. 2011).

1.2.3 Inzidenz und Therapieoptionen der Transplantatvaskulopathie

Die mediane Überlebenszeit nach einer Herztransplantation liegt bei zehn Jahren, wobei 30 % der Todesfälle innerhalb der ersten fünf Jahren durch eine CAV verursacht werden. Zehn Jahre nach der Transplantation leiden bereits mehr als 50 % der Patienten unter dieser Erkrankung (Wilhelm 2015). Die zehn Jahres-Überlebensrate bei Lungentransplantierten beträgt lediglich 27 % und bereits 50 % aller Transplantierten entwickeln in den ersten fünf Jahren eine CLAD entwickeln (Royer, Olivera-Botello et al. 2016). Auch das Langzeitüberleben nach einer Nierentransplantation sinkt mit jedem weiteren Jahr nach der Transplantation um 4 % (Nankivell and Kuypers 2011) und die zehn Jahresüberlebensrate liegt hier bei 58 % (Wolfe, Roys et al. 2010). Die TV stellt somit den größten limitierenden Faktor für das Langzeitüberleben nach der Transplantation eines soliden Organs dar. Auch sind die bisherigen Therapieoptionen einer TV überschaubar.

Für die Behandlung einer akuten humoralen Abstoßungsreaktion konnten mit dem Einsatz des anti-CD20-Antikörpers Rituximab, der normalerweise in der Krebstherapie eingesetzt wird, erste Resultate erzielt werden. Der chimäre Antikörper bindet an B-Lymphozyten, depletiert diese und führt somit zu einer Verringerung der zirkulierenden B-Lymphozyten. In den betreffenden Studien wurde zwar kein gesteigertes Überleben der Patienten nachgewiesen, jedoch verbesserte sich durch die Behandlung sowohl die mediane Überlebenszeit als auch die Funktion des transplantierten Organs (Kaposztas, Podder et al. 2009, Gulleroglu, Baskin et al. 2013, Gheith, Al-Otaibi et al. 2017). Demgegenüber steht eine einzige Studie, die auch für die Behandlung einer chronischen Abstoßungsreaktion einen Mehrwert durch den Einsatz von Rituximab nachweisen konnte (Chung, Kim et al. 2014). Die überwiegende Mehrheit der Studien weisen allerdings keinen Vorteil oder sogar Nachteile durch die Anwendung von Rituximab nach (Smith, Malik et al. 2012, Ghouti-Terki L 2013, Anwar, Delos Santos et al. 2014, Monteverde, Chaparro et al. 2014, Bachelet, Nodimar et al. 2015, Redfield, Ellis et al. 2016). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die antikörperproduzierenden Plasmazellen kaum CD20 exprimieren und Rituximab somit keinen direkten Einfluss auf die Antikörperkonzentration hat (McLaughlin, Grillo-Lopez et al. 1998).

Auch der Proteasominhibitor Bortezomib, der in der Therapie multipler Myelome erfolgreich eingesetzt wird und einen direkten Effekt auf die Plasmazellen hat, führte weder zu einer verbesserten Transplantatfunktion noch induzierte er eine Reduktion der DSA in der Zirkulation der Patienten (Eskandary, Regele et al. 2018).

Ein weiterer Ansatz zur Reduktion der DSA kombiniert den Einsatz von Plasmapherese mit der intravenösen Applikation von Immunglobulinen. In einer kleinen, monozentrischen Studie wurde eine signifikante Reduktion der DAS-Konzentration im Plasma von Transplantierten nachgewiesen. Allerdings konnte keine Kausalität zu einem gesteigerten Organüberleben gezeigt werden (Lefaucheur, Nochy et al. 2009).

Die bisher fehlenden erfolgsversprechenden Therapiemöglichkeiten einer chronischen Transplantatvaskulopathie machen es unerlässlich, die zugrundeliegenden Mechanismen der Entstehung zu untersuchen. Ein dezidierteres Verständnis der initialen Zusammenhänge und Interaktionen, die zu einer TV führen, sind notwendig, um geeignete Interventionen zu etablieren, um sowohl den Beginn als auch die Entwicklung dieser Erkrankung hinauszuzögern beziehungsweise zu verlangsamen.

1.3 Die Aktivierung des Endothels ist der initiale Schritt der Transplantatvaskulopathie

1.3.1 Anti-HLA-Antikörper vermitteln komplementunabhängige Effekte in Endothelzellen

Durch die Expression von HLA-Klasse-I und II-Molekülen auf ihrer Oberfläche sind EC ein präferiertes Ziel für eine immunologische Reaktion. Zusätzlich exprimieren EC costimulierende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die für eine T-Zellaktivierung obligatorisch sind. Somit sind sie nicht nur Ziel, sondern auch Auslöser einer Immunreaktion (Gavlovsky, Tonnerre et al. 2016). Diese costimulierenden Eigenschaften der EC hängen von ihrem vaskulären Ursprung, dem präsentierten Antigen sowie der Reife der zu aktivierenden T-Zellen ab (Rothermel, Wang et al. 2004).

Während und nach einer Transplantation gibt es mehrere unterschiedliche Faktoren, die zu einer Endothelaktivierung führen. Einer dieser Faktoren ist das Vorhandensein von DSA (Haas and Mirocha 2011, Sis, Jhangri et al. 2012). Wie im Falle einer hyperakuten Abstoßungsreaktion können die DSA über das Komplementsystem die Zusammenlagerung eines MAC und durch eine Zellyse der EC verursachen. Wird das Komplementsystems allerdings nur bis zu einem sublytisches Niveau aktiviert, induzieren die DSA eine phänotypische Konvertierung der EC in einen aktivierten Status, was ein geändertes Expressionsmuster und eine Änderung der endothelialen Oberflächenproteine zur Folge hat (Abb.2). *Colvin et al* haben die chronische antikörpervermittelte Abstoßungsreaktion daher als verlangsamte beziehungsweise partiell unterbundene akute antikörpervermittelte Abstoßungsreaktion bezeichnet (Colvin and Smith 2005).

Das Binden von anti-HLA-Antikörpern der Klasse I an EC kann neben der Aktivierung des Komplementsystems auch zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führen. Diese komplementunabhängigen Effekte der DSA auf EC werden sowohl durch den MAPK-Signalweg als auch durch den extrazellulär-regulierte-Kinase (Extracellular Regulated Kinase, ERK)-, Kernfaktor (Nuclear-Factor, NF)- κ B- und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor, FGF)-Signalwege vermittelt (Thomas, Valenzuela et al. 2015).

Die Quervernetzung mehrerer anti-HLA-I-Antikörper auf EC induziert darüber hinaus die Zusammenlagerung des intrazellulären mTOR/Rictor/Sin1-Komplexes und führt zu der Bildung des mTORC2-Komplexes (Jin, Valenzuela et al. 2014). Der aktivierte mTORC2 Komplex ist für die Umstrukturierung des endothelialen Zytoskelettes und die Zellmigration verantwortlich. Die gesteigerte EC-Proliferation wird durch den induzierten mTOR-Raptor Komplex und der daraus resultierende Formation des mTORC1 Komplexes vermittelt (Sarbasov, Ali et al. 2004).

All diese Änderungen verschiedener und gleichzeitig konvergierenden intrazellulären Signalwege führen zu einer Hochregulation der Expression von proinflammatorischen Adhäsionsrezeptoren und Zytokinen. Dazu zählen beispielsweise das interzelluläre Adhäsionsmolekül (Intercellular Adhesion Molecule, ICAM)-1, das vaskuläre Adhäsionsmolekül (Vascular Cell Adhesion Molecule, VCAM)-1 und

das Monozyten-anlockenden-Protein (Chemoattractant Protein, MCP)-1 (Naemi, Carter et al. 2013, Zilian, Saragih et al. 2015).

Neben den Adhäsionsrezeptoren spielt die verstärkte Synthese von Wachstumsfaktoren und deren korrespondierenden Rezeptoren für die Aktivierung der EC ebenso eine wichtige Rolle. Die prominentesten Wachstumsfaktoren sind hierbei der von Thrombozyten produzierte Wachstumsfaktor (Platelet-Derived Growth Factor, PDG), der epidermale Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF, der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor, FGF), der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) und ET-1 (Bian and Reed 2001, Chen, Fabry et al. 2001, Rossini, Cheunschon et al. 2005). Die erhöhte Bindungskapazität von FGF induziert eine Aktivierung des intrazellulären MAPK/ERK Signalwegs in EC, was zu einer gesteigerten Proliferation führt (Jin, Korin et al. 2007).

Diese Signalwege sind mögliche Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen der Endothelaktivierung, die am Beginn einer sich entwickelnden TV steht. Beispielsweise konnten erste Erfolge durch den Einsatz des Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib erzielt werden. Durch das gleichzeitige Blockieren der PDGF- und VEGF-Signalwege konnten in einem Nierentransplantationsmodell eine chronische Entzündung und die Neointima verringert werden. Darüber hinaus zeigte sich bei den Ratten eine deutlich verbesserte Organfunktion (Rintala, Savikko et al. 2016).

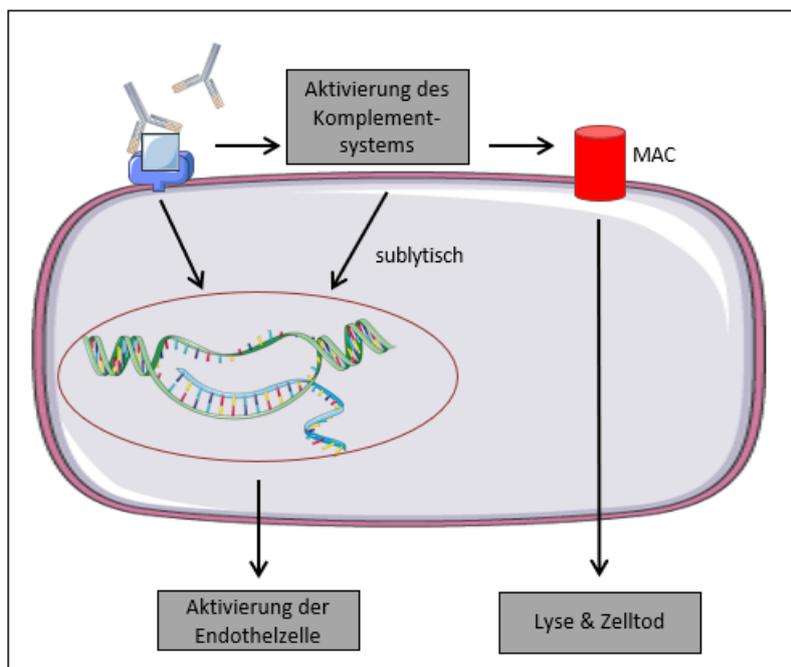


Abbildung 2 Induzierte Endothelaktivierung durch donorspezifische Antikörper.

Das Binden von DSA verursacht, teilweise komplementunabhängig, die phänotypische Konvertierung der EC in einen aktivierten Status. Dies ist durch ein geändertes Expressionsspektrum der EC gekennzeichnet. Modifiziert nach (Kummer, Zaradzki et al. 2020)

Im Gegensatz zu den relativ gut untersuchten Effekten der anti-HLA-I-Antikörpern auf EC ist über den Einfluss von anti-HLA-Klasse-II-Antikörpern auf EC deutlich weniger bekannt. EC präsentieren erst nach einer Aktivierung HLA-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche, da sie diese in einem nativen Zustand nicht exprimieren (Pober, Collins et al. 1986).

Monoklonale anti-HLA-II-Antikörper modulieren die Aktivität der Proteinkinase C und der Proteinkinase B/Akt Signalkaskade, was in vaskulären EC und B-Zellen zu unterschiedlichen Effekten führt. Während bei B-Zellen durch die Antikörperbindung apoptotische Prozesse initiiert werden, können zuvor IFN- γ -aktivierte EC diesem Schicksal entgehen. Durch die Aktivierung des PI3K-Signalwegs in EC werden antiapoptotische Vorgänge gestartet, die wichtig für den Erhalt der endothelialen Homöostase sind (Le Bas-Bernardet, Coupel et al. 2004).

Die Stimulation von EC mit einem monoklonalen anti-HLA-II-Antikörper als auch mit anti-HLA-II-Antikörper-positivem Plasma von Patienten induziert die Phosphorylierung der Proteinkinase B/Akt und resultiert in einer verstärkten Exozytose des proinflammatorischen Zytokins Interleukin (IL)-6. In einer EC/PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell, mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut) Kokultur führte die erhöhte IL-6 Konzentration zu einer Verminderung von regulatorischen T-Zellen (Treg) und einer verstärkten Expansion von Th17 (CD3⁺CD4⁺ β 7⁺) Zellen. Diese CD3⁺CD4⁺ β 7⁺ T-Zellen sind mit einer beschleunigten Abstoßungsreaktion assoziiert (Lion, Taflin et al. 2016).

Ähnlich wie bei den anti-HLA-Antikörpern der Klasse I konnte auch für die anti-HLA-II-Antikörper eine induzierte Proliferation und Migration der EC nachgewiesen werden (Jin, Valenzuela et al. 2018).

1.3.2 Weitere immunologische Faktoren der Endothelaktivierung

Neben den HLA-Klasse-I und II-Molekülen gibt es noch weitere Strukturen auf der Oberfläche von EC, die durch Antikörper gebunden werden können. Dazu zählen zum einen polymorphe Alloantigene, zum Beispiels die mit dem MHC-I-Protein verwandte Sequenz A (MHC-I-chain-related-Protein A, MICA) (Zou and Stastny 2009), und zum anderen endotheliale Autoantigene, zu denen verschiedene Oberflächen- als auch intrazelluläre Proteine gehören. Eines dieser Proteine ist der G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-anti-Angiotensin-II-Type-I-Rezeptor (AT1R), der für die Angiotensin-II-Effekte in den Blutgefäßen relevant ist (Dragun, Catar et al. 2016). In mehreren aktuellen klinischen Studien zu Nierentransplantationen wurde eine Assoziation dieser non-HLA-Antikörper, die gegen endotheliale Autoantigene gerichtet sind, mit einer schlechteren klinischen Entwicklung nachgewiesen (Cardinal, Dieude et al. 2017, Delville, Lamarthee et al. 2019, Lefaucheur, Viglietti et al. 2019).

Über welchen Mechanismus beziehungsweise über welche Signalwege diese non-HLA-Antikörper ihren Beitrag zu einer chronischen Abstoßungsreaktion leisten, ist bisher noch wenig bekannt. Vermutlich haben diese Antikörper auch einen Einfluss auf die intrazellulären Signalkaskaden der EC (Zhang and Reed 2009).

1.3.3 Nicht-immunologische Faktoren der Endothelaktivierung

Vor und während des Transplantationsprozesses kommt es bereits zu einer Reihe von nicht-immunologischen Ereignissen, die ebenfalls zu einer Endothelaktivierung führen.

Die überwiegende Anzahl von Organen wird von Patienten gespendet, bei denen der Hirntod aufgrund einer irreversiblen kranialen Schädigung diagnostiziert wurde. Durch das Trauma oder die intrakraniale Blutung kommt es im Schädel zu einem Druckanstieg, der durch Ausschüttung von Katecholaminen kompensiert wird, was in einer arteriellen Hypertension (Bluthochdruck) und Bradykardie (Abfall der Pulsfrequenz) resultiert (Smith 2004). Der Katecholaminspiegel im Blut des Organspenders führt zu einer Dysfunktion der EC und zu einer peripheren Vasodilatation, was eine mögliche Hypoperfusion des Organs zur Folge haben kann (Szabo, Buhmann et al. 2002).

Die kardialen Transplantate von Spendern, denen ein sich rapide entwickelnder Hirntod (sprunghafte Erhöhung des intrakranialen Drucks) diagnostiziert wurde, haben eine geringere Überlebenszeit als die Transplantate von Spendern, die keinen schnellen Hirntod erlitten. Hier zeigte sich, dass es im Gefäßsystem der Organspender mit sich rapide entwickelndem Hirntod zu einer gesteigerten Zytokinfreisetzung und Leukozytenaktivierung in allen peripheren Organen gekommen ist. Die transplantierten Herzen entwickelten im Anschluss daran eine deutlich ausgeprägtere Neointima als diejenigen, die diesem Zytokinsturm nicht ausgesetzt waren (Mehra, Uber et al. 2004).

Ein weiterer, nicht-immunologischer Faktor, der zu einer Endothelaktivierung führt, ist eine Ischämie-Reperfusion-Schädigung (I/R Schädigung). Diese Schädigung kommt durch die unterbrochene Blutzirkulation und der gestörten Sauerstoffversorgung des Gewebes, sowohl während der Ex- als auch der Implantationsphase der Transplantation, zu Stande. Die Schädigung wird durch apoptotische und nekrotische Prozesse im Gewebe manifestieren, während gleichzeitig Regenerationsprozesse angestoßen werden (Nordling, Brannstrom et al. 2018). Durch die I/R Schädigung kommt es zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der betroffenen EC, was vor allem ein Anhaften von Neutrophilen an das aktivierte Endothel zur Folge hat (Tsukimori, Tsushima et al. 2008). Die Adhäsion der Neutrophilen induziert sowohl verschiedene strukturelle Änderungen der EC (Wang and Doerschuk 2000) sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS), was zu einer Nekrose der EC führt (Francis and Baynosa 2017).

Darüber hinaus kommt es durch die Gewebsschädigung zu einer Freisetzung zellulärer Bestandteile. Diese, mit einer Schädigung assoziierten molekularen Strukturen (Damage Associated Molecular Pattern, DAMP) fungieren als endogene Liganden und können inflammatorische Prozesse auslösen oder vermitteln. Zu den DAMP zählt beispielsweise das Hitze-Schock-Protein (HSP) 70, das über die toll-like-Rezeptoren (TLR) auf der Oberfläche der Leukozyten gebunden wird und diese aktiviert (Millington and Madsen 2010).

Diese Ergebnisse zeigen, dass neben immunologischen Faktoren auch physikalische Einflüsse in die Regulation der vaskulären endothelialen Homöostase eingreifen und für das Verständnis einer so komplexen Pathophysiologie wie der TV relevant sind.

1.3.4 Die Endothelaktivierung führt zu einer chronischen Inflammation der Gefäßwand

Im zeitlichen Umfeld einer Transplantation, also von der Explantation eines Organs über die Implantation in den Empfänger bis zur Wiederaufnahme der Funktion, gibt es eine Reihe verschiedener Ereignisse, die zu einer sterilen Inflammation des Endothels führen. Darunter wird eine Schädigung von Gewebe, die in Abwesenheit eines Pathogens eine Aktivierung des Immunsystems und einer Rekrutierung von Leukozyten verursacht, subsumiert (Zindel and Kubes 2020). Der sterilen Inflammation steht eine Inflammation aufgrund von viralen, bakteriellen oder fungalen Infektionen gegenüber.

Die initiale Dysfunktion und Nekrose des Endothels entstehen sowohl durch physikalische und zunächst nicht-immunologischen Schädigung aufgrund des Hirntods der Organspender als auch der Kaltischämiezeit des Organs und der I/R Schädigung während der Transplantation (Tab.1). Dies induziert die Rekrutierung von Leukozyten des angeborenen Immunsystems (Li, Feng et al. 2019) und später auch die Aktivierung von Lymphozyten des adaptiven Immunsystems (Schnare, Barton et al. 2001). Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems führt zu der Produktion von DSA, die an die EC binden und eine akute Abstoßungsreaktion induzieren. Die phänotypische Konvertierung der EC in einen aktivierten Zustand äußert sich in einer erhöhten Permeabilität des Monolayers, einer verstärkten Zytokinausschüttung und einer gesteigerten Adhäsion von Leukozyten (Pofer and Cotran 1990).

Tabelle 1: Auflistung der häufigsten Ursachen einer Endothelaktivierung

Ursache	Zeitpunkt	Mechanismus	Referenz (u.A.)
Hirntod	vor der Transplantation	physikalisch, nicht-immunologisch	(Floerchinger, Oberhuber et al. 2012)
Kaltischämiezeit	vor der Transplantation	nicht-immunologisch	(Kayler, Srinivas et al. 2011)
I/R Schädigung	während der Transplantation	nicht-immunologisch	(Bharat and Kreisel 2018)
DSA	nach der Transplantation	immunologisch	(Thomas, Valenzuela et al. 2015)
Antikörper gegen endotheliale Autoantigene	nach der Transplantation	immunologisch	(Lefaucheur, Viglietti et al. 2019)

Schafft es das Immunsystem nicht, die initiale Endothelschädigung zu reparieren und persistiert der inflammatorische Status der Endothelaktivierung, führt dies zu einer chronischen antikörpervermittelten Abstoßungsreaktion. Diese ist somit vergleichbar mit einer chronischen sterilen Inflammation der Endothelzellen des transplantierten Organs.

1.4 Rekrutierung und Transmigration von Leukozyten

1.4.1 Aktivierte Endothelzellen ändern ihr Expressionsspektrum

Für eine effektive Immunantwort ist das Zusammenspiel verschiedener Zellpopulationen obligatorisch. Daher werden Leukozyten durch proinflammatorische Signale aktiv in die Bereiche rekrutiert, in denen ihre Effektorfunktionen benötigt werden.

Bei einer TV produzieren EC und VSMC der Gefäßwand des Transplantats neben verschiedenen Zytokinen auch ROS, die in den extrazellulären Raum sekretiert werden und Leukozyten anlocken. Diese durch den Rekrutierungsprozess aktivierten Leukozyten beginnen ebenfalls mit der Produktion von ROS, was zu einer Verstärkung des ursprünglichen Effekts führt (Land 2012).

Die Aktivierung der EC führt darüber hinaus zu einer Freisetzung des Glykoproteins von-Willebrand-Faktor (vWF) und zu einer verstärkten Expression einer Vielzahl verschiedener Adhäsionsmoleküle, wie E (Endothel)- und P (Platelet, Thrombozyten) -Selektin, ICAM-1 und VCAM-1. (Salom, Maguire et al. 1998, Valenzuela, Hong et al. 2013, Fenton, Simmonds et al. 2016).

Durch die Bindung der Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche zweier Zellen kommt es zu der Ausbildung von engen Zell-Zell-Kontakten. Dies ermöglicht beispielsweise den Transfer von intakten HLA-Antigen-Komplexen von Spender-EC auf DC des Organempfängers, was einen Übergang von direkter zu indirekter Alloreaktion darstellt (Herrera, Golshayan et al. 2004).

Die Adhäsion von proinflammatorischen Leukozyten wird zusätzlich über Fcγ-Rezeptor-abhängige Mechanismen verstärkt. Über die Fcγ-Rezeptoren sind Leukozyten in der Lage den konstanten Teil der EC-gebundenen DSA zu binden. Dies führt zu einer Aktivierung der Leukozyten und resultiert in einem zellulär-vermittelten Absterben der EC (Hirohashi, Chase et al. 2012).

Die Interaktionen zwischen EC und Leukozyten werden nicht exklusiv über direkte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten mittels verschiedener Rezeptoren auf der Oberfläche vermittelt. Ein Großteil der Funktionen wird über die Exozytose von Signalmolekülen ausgeübt, über die wiederum andere Zellen reguliert werden können

1.4.2 Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten mittels Chemokinen

Chemokine vermitteln sowohl die Signaltransduktion zwischen verschiedenen als auch innerhalb der gleichen Zellpopulationen. Darüber hinaus sind sie allerdings auch in der Lage Angiogenese, also Bildung neuer Blutgefäße, und strukturelle Änderungen der Gefäßwand zu induzieren (Belperio and Ardehali 2008).

In einem kardialen Transplantationsmodell konnten erhöhte Konzentrationen der Chemokine CCL3 und CCL5 gemessen werden. Beide Chemokine binden an den Rezeptor CCR1 und dessen Blockade reduzierte die Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand des Transplantats. Möglicherweise

beeinflusst der Rezeptor beziehungsweise die Bindung seiner Liganden die Integrin-vermittelte Adhäsion von Immunzellen an EC (Gao, Topham et al. 2000, Horuk, Clayberger et al. 2001).

Ein weiteres Chemokin, das die Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand vermittelt, ist das Interferon-induzierbare-T-Zell-alpha-Chemoattraktant (Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant I-TAC). In einer prospektiven Studie mit Patienten, die bereits an einer CAV litten, gelang es eine erhöhte Plasmakonzentration von I-TAC nachzuweisen. Des Weiteren konnte dieses Chemokin auch als genereller Risikoprädiktor für die Entwicklung einer chronischen Abstoßungsreaktion etabliert werden. I-TAC bindet den Rezeptor CXCR3 auf der Oberfläche von Immunzellen. Diese CXCR3⁺ Leukozyten wurden als mononukleäres Infiltrat bei immunhistologischen Analysen der Gefäßwand nachgewiesen (Kao, Kobashigawa et al. 2003). Im Zusammenhang mit einer CLAD konnten ebenfalls erhöhte Plasmakonzentrationen für I-TAC gemessen werden. Hierbei fungierte es als Chemoattraktant für aktivierte T-Zellen und für NK-Zellen (Shino, Weigt et al. 2017). CXCR3 und die entsprechenden Liganden sind in einer Vielzahl von inflammatorischen Erkrankungen, wie Atherosklerose oder Hepatitis, involviert. Ein therapeutischer Ansatz für die Behandlung dieser Erkrankungen und einer TV könnte darin liegen, die Aktivierung dieser Signalwege zu verhindern (Van Raemdonck, Van den Steen et al. 2015). In einem Nierentransplantationsmodell mit Mäusen konnte eine Hochregulation des HMGB-1 Proteins (High-Mobility Group Box-1 Protein) nachgewiesen werden. Dieses Protein wird von apoptotischen Zellen freigesetzt oder aktiv sekretiert (Herzog, Lorenz et al. 2014) und induziert die Expression von weiteren Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche der EC. Dies wiederum führt zu einer verstärkten EC-Leukozyten Interaktion und einer beschleunigten Schädigung des Organs. Nach einer Herztransplantation wird HMGB-1 sowohl von nekrotischen EC als auch von Kardiomyozyten freigesetzt und ruft eine Aktivierung verschiedener proinflammatorischer Signalwege hervor (Park, Svetkauskaite et al. 2004, Rovere-Querini, Capobianco et al. 2004, Bell, Jiang et al. 2006). Durch das Blockieren des HMGB-1-Signalwegs konnten diese Effekte vermindert werden (Wu, Ma et al. 2010, Chen, John et al. 2011).

1.4.3 Die Transmigration von Leukozyten läuft in mehreren Stufen ab

Die Transmigration von Leukozyten über einen endothelialen Monolayer hinweg setzt eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der EC voraus. Über die Adhäsionsmoleküle können die Leukozyten gebunden werden und deren Adhäsion ist somit essentiell für die Transmigration aus der Zirkulation in die Gefäßwand. Bevor der eigentliche Prozess der Transmigration stattfindet, werden die Leukozyten abgebremst und beginnen über das Endothel zu rollen (Abb.3).

Diese ersten lockeren Interaktionen zwischen EC und den Leukozyten werden vornehmlich durch die Bindung von Integrinen und Selektinen auf der Oberfläche der beteiligten Zellen vermittelt (Muller 2003). Für die anschließende Transmigration sind weitere spezialisierte Rezeptoren, beispielsweise PECAM, JAM-A und CD99, verantwortlich. Die Rezeptoren werden von EC in recycelbaren Vesikeln direkt unterhalb der Plasmamembran gelagert. Diese Vesikel werden exozytiert und die Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche präsentiert, wo sie die Leukozyten umschließen und so eine Bindung initiieren (Mamdouh, Mikhailov et al. 2009).

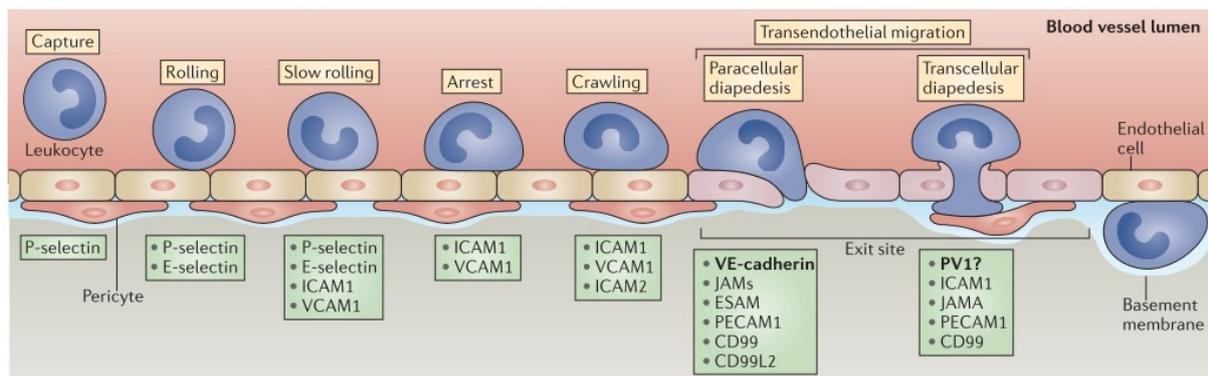


Abbildung 3: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Transmigration von Leukozyten

Die Transmigration erfolgt hier über einen endothelialen Monolayer in die Gefäßwand. In verschiedenen Stadien einer vollständigen Transmigration sind unterschiedliche Rezeptoren auf der Oberfläche der beteiligten Zellen involviert. Modifiziert nach (Vestweber 2015).

Leukozyten können auf zwei verschiedenen Wegen in die Gefäßwand transmigrieren. Die transzelluläre Transmigration führt direkt durch den Zellkörper der EC hindurch, stellt aber eine seltene Route der Leukozyten dar. Bei der parazellulären Transmigration geschieht dies über engen Zell-Zell-Verbindungen (Tight Junctions) zwischen einzelnen EC. (Vestweber 2015). Diese interendothelialen Verbindungen werden über vaskuläre endotheliale (Vascular Endothelial, VE) Cadherine ausgebildet und reguliert und gewährleisten die Integrität des Endothels (Gotsch, Borges et al. 1997).

Eine weitere Barriere, die von den Leukozyten während ihrer Transmigration in die Gefäßwand überwunden werden muss, ist die Basallamina, auf der das Endothel verankert ist. Die Hauptbestandteile

der Basallamina sind Glykoproteine aus der Familie der Laminine, die sich zu Heterotrimeren zusammenlagern und zwölf verschiedene Isoformen bilden. Laminin 411 wird ubiquitär in der Basallamina exprimiert, wohin gegen Laminin 511 nur an distinkten Stellen zu finden ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Transmigration der Leukozyten bevorzugt in Bereichen stattfindet, in denen kein Laminin 511 exprimiert wird (Sixt, Engelhardt et al. 2001). Eine Ursache für diese Beobachtung liegt in der, durch Laminin 511 verstärkten, Lokalisation von VE-Cadherinen im Bereich der endothelialen Tight Junctions. Aufgrund der höheren Konzentration der VE-Cadherine kommt es zu einer Stabilisierung dieser Zell-Zell-Verbindungen und geht mit einer verminderten Transmigration einher (Song, Zhang et al. 2017). In Zellkulturexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass Leukozyten bereits unmittelbar vor der Transmigration dreidimensionale, mechanische Spannungen im Endothel aufbauen können, was im weiteren Verlauf eine reduzierte Integrität des Endothels zur Folge hat (Yeh, Serrano et al. 2018).

Immunhistochemische Analysen der Gefäßwände von explantierten Organen, die eine TV entwickelt hatten, haben gezeigt, dass die Mehrzahl der infiltrierten Leukozyten zu den T-Zellen gehören und 8 - 15 % den Makrophagen zugeordnet werden können. Vereinzelt konnten auch B- und NK-Zellen nachgewiesen werden (van Loosdregt, van Oosterhout et al. 2006, Hidalgo, Sis et al. 2010). Somit stellt die Prävention der Leukozytenrekrutierung eine mögliche Therapieoption für eine TV dar.

Eine aktuelle Studie hat gezeigt, dass das Makromolekül Corline-Heparin-Konjugat in der Konservierungslösung eine Schutzschicht auf dem renalen Endothel während der Kaltischämiezeit bildet. Nach der Transplantation war die Anzahl der infiltrierten Leukozyten signifikant geringer als in Organen die in einer Konservierungslösung ohne das Corline-Heparin-Konjugat gelagert wurden (Nordling, Brannstrom et al. 2018).

Eine weitere therapeutische Möglichkeit, um das Voranschreiten einer TV in Zusammenhang mit der Leukozyten-Transmigration zu verlangsamen, stellt die aktive Rekrutierung von immunsupprimierenden oder antiinflammatorischen Leukozyten in die Gefäßwand dar. In einer Vielzahl von Experimenten und klinischen Studien konnten solche tolerogenen Eigenschaften für Tregs (Safinia, Grageda et al. 2018), T- (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2011) und B-Zellen (Alhabbab, Nova-Lamperti et al. 2019), NK-Zellen (Yu, Xu et al. 2006) und NKT-Zellen (Seino, Fukao et al. 2001) nachgewiesen werden. Beispielsweise resultiert die Stimulation von CD4⁺ T-Zellen in Mäusen mit der gleichzeitigen Inhibition der Phosphodiesterase 3 in einer Expansion der Treg-Population und führt zu einem verlängerten Transplantatüberleben (Feng, Nadig et al. 2011).

In einer klinischen Studie mit nierentransplantierten Patienten führte die Behandlung mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Alemtuzumab zu einer Zunahme der naiven und regulatorischen B-Zellen. Diese Zellen sekretieren das antiinflammatorische Zytokin IL-10 und sind mit einer verbesserten Organfunktion assoziiert (Heidt, Hester et al. 2012).

1.5 Das mononukleäre Infiltrat

1.5.1 Monozyten und Makrophagen stellen eine heterogene Leukozytenpopulation dar

Monozyten sind ein Teil des mononukleären Phagozytensystems und zählen zu den Effektorzellen des Immunsystems. Sie besitzen sowohl Rezeptoren für Zytokine als auch für pathogene Strukturen, können aber auch selbst inflammatorische Zytokine produzieren (Geissmann, Manz et al. 2010).

Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass Monozyten eine sehr heterogene Leukozytenpopulation darstellen, die sich hinsichtlich Morphologie, Metabolismus und Phänotyp unterscheiden lassen (Schmidl, Renner et al. 2014). Anhand der Expressionsstärke des LPS-Rezeptors CD14 und des FcγIII-Rezeptor CD16 auf der Oberfläche werden sie als klassische, nicht-klassische und intermediäre Monozyten klassifiziert. Ungefähr 85 % der Monozyten, die in der Blutbahn zirkulieren, zählen zu den klassischen Monozyten (Passlick, Flieger et al. 1989, Wong, Tai et al. 2011).

Besonders für nicht-klassischen Monozyten konnte eine ausgeprägte Patrouillekapazität nachgewiesen werden. Über Adhäsionsrezeptor-vermittelte Interaktionen wandern diese Monozyten langsam über die luminal Seite des Endothels. Sie sind besonders sensitiv gegenüber Nukleinsäure und induzieren hier den Abbau geschädigter EC (Cros, Cagnard et al. 2010, Carlin, Stamatiades et al. 2013).

Intermediären Monozyten exprimieren eine hohe Anzahl an MHC-Klasse-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche und können dadurch eine adaptive Immunantwort auslösen (Grage-Griebenow, Zawatzky et al. 2001).

Klassischen Monozyten präsentieren eine Vielzahl an Chemokin- und Adhäsionsrezeptoren auf ihrer Oberfläche, wie ICAM-1, den Rezeptor für P-Selektin und PECAM-1 und zeigen eine ausgeprägtere Migrationskapazität unter einem MCP-1 Gradienten (Ancuta, Rao et al. 2003). Sowohl klassischen als auch nicht-klassischen und intermediären Monozyten können zu Makrophagen ausdifferenzieren, wobei klassischen Monozyten dabei die höchste Phagozytosekapazität entwickeln (Boyette, Macedo et al. 2017).

Im murinen System werden Monozyten anhand ihrer Ly6C- und CD43-Expression klassifiziert. Ly6C⁺CD43⁻ Monozyten sind in Mäusen das Äquivalent zu klassischen Monozyten in Menschen, Ly6C⁻CD43⁺ Zellen entsprechen nicht-klassischen Monozyten (Thomas, Tacke et al. 2015).

Makrophagen spielen eine tragende Rolle bei einer Vielzahl von chronisch-entzündlichen Krankheitsbildern, wie Atherosklerose, chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen und Alzheimer. (Doty, Guillot-Sestier et al. 2015, Cornwell, Kim et al. 2018, Back, Yurdagul et al. 2019). Die im Gewebe nachweisbaren Makrophagen entstehen entweder durch Proliferation von gewebsresidenten Makrophagen oder durch die Differenzierung aus Monozyten im Zuge der Makrophagenaktivierung (Davies and Taylor 2015).

1.5.2 Die Rolle der Makrophagen in der Transplantatvaskulopathie

Die Differenzierung von Makrophagen erfolgt entweder Pathogen- und Interferon (IFN)- γ -induziert zu klassischen, inflammatorischen M1-Makrophagen oder zu alternativ-aktivierten M2-Makrophagen. M1-Makrophagen sekretieren verschiedene proinflammatorische Zytokine und aktivieren das adaptive Immunsystem. Die Differenzierung zu M2-Makrophagen wird durch IL-4 oder IL-13 induziert und diese Zellen sind für Wundheilung und Abklingen von Entzündungen verantwortlich (Wynn, Chawla et al. 2013).

Histopathologische Analysen von transplantierten Organen zeigten, dass es in der Gefäßwand zu einer gesteigerten MCP-1-Expression kommt und dass der Großteil des mononukleären Infiltrates von Makrophagen gebildet wird (Grandaliano, Gesualdo et al. 1997).

Die Relevanz dieser Leukozytenpopulation zeigt sich auch bei Patienten, die unter einer chronischen Abstoßungsreaktion leiden. Bereits früh nach der Transplantation ist bei diesen Patienten eine signifikant höhere Anzahl von Makrophagen in der Gefäßwand nachzuweisen als Patienten, die keine chronische Abstoßungsreaktion ausbilden (Pilmore, Painter et al. 2000). Bei dieser Patientenkohorte ist die Ausprägung des monozytären Infiltrates streng mit dem Voranschreiten einer Fibrose der Gefäßwand assoziiert. Dabei ist zu beobachten, dass im Laufe der Abstoßungsreaktionen der Anteil der M1- gegenüber den M2-Makrophagen in der Gefäßwand zunimmt (Toki, Zhang et al. 2014). Das transplantierte Organ nimmt somit einen inflammatorischen Phänotyp an. In einem Mausmodell einer chronischen Abstoßungsreaktion hingegen wurden die gewebsinfiltrierenden Makrophagen eher dem M2-Kompartiment zugeschrieben (Wu, Zhao et al. 2016).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein DSA mit der Größe des monozytären Infiltrates der Gefäßwand korreliert und Aufschluss über die schwere der sich entwickelnden TV gibt (Xu, Collins et al. 2014).

Viele verschiedene Experimentalansätze beschäftigen sich damit, den Beitrag der infiltrierten Monozyten auf die Ausprägung einer TV zu untersuchen oder deren Rekrutierung zu verhindern. Hier zeigte sich, dass der Einsatz des T-Zell-depletierenden Antikörpers Alemtuzumab nach Nierentransplantationen zwar zu einer Reduktion von infiltrierten T-Zellen in der Gefäßwand führt, aber nicht vor Abstoßungsreaktionen oder der Ausprägung eines monozytären Infiltrates schützt (Kirk, Hale et al. 2003). Die Anzahl der transmigrierten Monozyten und somit die Größe des monozytären Infiltrats korreliert eng mit der Organfunktion (Girlanda, Kleiner et al. 2008).

Durch den Einsatz eines P-Selektin-blockierenden-Antikörpers konnte die anti-MHC-I-Antikörper-induzierte Rekrutierung von Makrophagen sowohl *in vitro* als auch in einem allogenen Transplantationsmodell *in vivo* verhindert werden. Dies führte zu einer geringeren Ausprägung der experimentell-induzierten TV (Valenzuela, Hong et al. 2013).

In einem weiteren kardialen Transplantationsmodell konnte durch die systemische Depletion der Makrophagen die Abstoßungsreaktion in immunkompetenten Mäusen verringert werden (Oberbarnscheidt, Zeng et al. 2014). Des Weiteren fand man eine Korrelation zwischen DSA und der Größe des monozytären Infiltrates und dem Auftreten einer antikörpervermittelten Abstoßung in Menschen (Xu, Collins et al. 2014).

In vitro Experimente erzielten mit den mTOR Inhibitoren Sirolimus und Everolimus eine Repression der mTORC1- und mTORC2- abhängigen Mechanismen in EC, resultierend in einer verringerten Adhäsion von Monozyten an EC. Diese Ergebnisse konnten auch durch ein reduziertes monozytäres Infiltrat in einem kardialen Transplantationsmodell *in vivo* verifiziert werden (Salehi, Sosa et al. 2018).

In einem kardialen Transplantationsmodell verminderte die Depletion von mTOR in Makrophagen zwar nicht deren Infiltrationskapazität, induzierte allerdings deren Differenzierung zu M2-Makrophagen und war mit einer reduzierten chronischen Abstoßungsreaktion assoziiert. Darüber hinaus exprimierten die gewebsinfiltrierenden Makrophagen große Mengen des programmierten-Zelltod-Liganden (Programmed Cell Death Ligand, PD-L)-1, welcher eine wichtige Rolle bei der Toleranz gegenüber Transplantaten spielt (Zhao, Chen et al. 2018).

Die teilweise deutlich divergierenden Befunde bezüglich des Phänotyps der transmigrierten Makrophagen lassen sich zum einen durch speziesspezifische Unterschiede zwischen dem humanen und murinen System erklären. Zum anderen spielen aber auch der Experimentalaufbau der murinen Transplantationsmodell eine Rolle, sowie die Zeitpunkte zu denen die klinischen Studien durchgeführt wurden. Hierbei kann nicht immer eindeutig zwischen akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion unterschieden werden, da diese viele gemeinsame Merkmale teilen und in einander übergehen.

Neben den klassischen M1-Makrophagen und den antiinflammatorischen M2-Makrophagen gibt es noch die Population der regulatorischen Makrophagen (Mregs). Diese Zellpopulation vermittelt immunsupprimierende Eigenschaften sowohl auf die angeborene als auch auf die adaptive Immunität. Über die Sekretion von IL-10 und des transformierenden Wachstumsfaktors (TGF)- β induzieren Mregs die Proliferation von Tregs, die verschiedene tolerogene Effekte vermitteln (Schmidt, Zhang et al. 2016), beispielsweise die Inhibierung der Reifung von DC (Riquelme, Haarer et al. 2018).

In Transplantationsmodellen bei Mäusen wurden für Mregs ebenfalls vorteilhafte Eigenschaften gefunden, diese Ergebnisse konnten jedoch noch nicht in klinischen Studien verifiziert werden (Zhang, Zhang et al. 2021).

1.6 Akkommodation im Zuge der Transplantatvaskulopathie

1.6.1 Die Expression antiinflammatorischer Gene beeinflusst das Organüberleben positiv

Akkommodation bedeutet im Zusammenhang mit soliden Organtransplantationen eine anhaltende stabile Organfunktion ohne das Auftreten pathologischer Veränderungen des Gewebes trotz der Präsenz von DSA und einer Anlagerung von einzelnen Bestandteilen des Komplementsystems an EC (Smith and Colvin 2012).

Erstmalig beschrieben wurde dieses Phänomen zu Beginn der 1990er Jahre in einem kardialen Hamster-zu-Ratte Xenotransplantationsmodell (Bach, Turman et al. 1991). Die Akkommodation äußerte sich in einer verstärkten Expression von antiapoptotischen und antioxidativen Genen in Endothelzellen des Transplantats. Neben der Expression eines antiinflammatorischen Phänotyps der EC kam es auch zu einer verstärkten Exozytose der Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13. Diese Zytokine sind Bestandteil der Th2 Immunantwort und verhindern eine Aktivierung der Monozyten, die in die Gefäßwand des Transplantats transmigrieren (Bach, Ferran et al. 1997).

In einem nachfolgenden Maus-zu-Ratte Transplantationsmodell konnte gezeigt werden, dass die induzierbare Isoform der Häm-Oxygenase 1 (HO-1) einen Hauptteil dieser antiinflammatorischen Effekte vermittelt (Soares, Lin et al. 1998). In einer klinischen Studie in deren Rahmen Patienten nach einer Nierentransplantation mit anti-HLA-Antikörper sensibilisiert wurden, konnte auch eine Abhängigkeit der Akkommodation von der Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL im Endothel nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen drauf schließen, dass eine geringe Konzentration an anti-HLA-Antikörpern eine Akkommodation induziert beziehungsweise fördert (Salama, Delikouras et al. 2001). In einem aktuelleren humanisierten Maustransplantationsmodell konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation der protektiven Gene Bcl-2, Bcl-xL und HO-1 ebenfalls vor einer Abstoßungsreaktion schützt. Darüber hinaus kam es in den Organen im Zuge der Akkommodation zu einer Reduktion der proinflammatorischen Rezeptoren ICAM-1 und VCAM-1 sowie zu einer verminderten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α und IL-6 (Fukami, Ramachandran et al. 2012). In Einklang mit diesen Ergebnissen konnten *Zilian et al* zeigen, dass die gezielte Hochregulation der HO-1 gegen eine anti-HLA-I-Antikörper-induzierte inflammatorische Aktivierung der EC schützt (Zilian, Saragih et al. 2015).

In Zellkulturexperimenten führte die Bindung von Antikörpern gegen ABO-Blutgruppenantigene auf EC zu einer gesteigerten Expression der komplementregulierenden Proteine CD55 und CD59, und zwar sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Iwasaki, Miwa et al. 2012). Durch die gezielte Überexpression des humanen CD55 und CD59 in Mäusen konnten die Rekrutierung von Monozyten in die Gefäßwand und eine Schädigung der Niere verhindert werden (Bongoni, Lu et al. 2017). Bestätigt werden konnten diese Experimente durch eine retrospektive Studie, in der eine geringe CD55-Expression

in transplantierten Nieren als Risikofaktor für eine beschleunigte Entwicklung einer chronischen Abstoßungsreaktion identifiziert wurde (Cernoch, Hruby et al. 2018).

1.6.2 Die HO-1 vermittelt immunmodulatorische Effekte

Das Enzym Häm-Oxygenase (HO) katalysiert die Umwandlung von Häm zu Biliverdin unter Freisetzung äquimolarer Mengen Kohlenstoffmonoxid (CO) und Eisen (Fe (II)). Biliverdin wird von der Biliverdin-Reduktase weiter zu Bilirubin verstoffwechselt. Häm b, auch bekannt als Fe (II) Protoporphyrin IX (Fe-PPIX), ist eine prosthetische Gruppe und somit integraler Bestandteil verschiedener Proteine. Es spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen oxidativen Reaktionen und mitochondrialen Elektronentransportprozessen, am besten charakterisiert ist es jedoch als Sauerstoff-bindende Komponente des Hämoglobins.

Die Grundstruktur des Häm ist ein Porphyrinmolekül, das durch vier Pyrrolringe gebildet wird, die über Methinbrücken miteinander verbunden sind (Abb.4). Die Koordinierung des Fe (II) Atoms erfolgt durch zwei Iminostickstoffatome (=N-) sowie zwei Pyrrol-Stickstoffatome (-NH-) (Maines 1997).

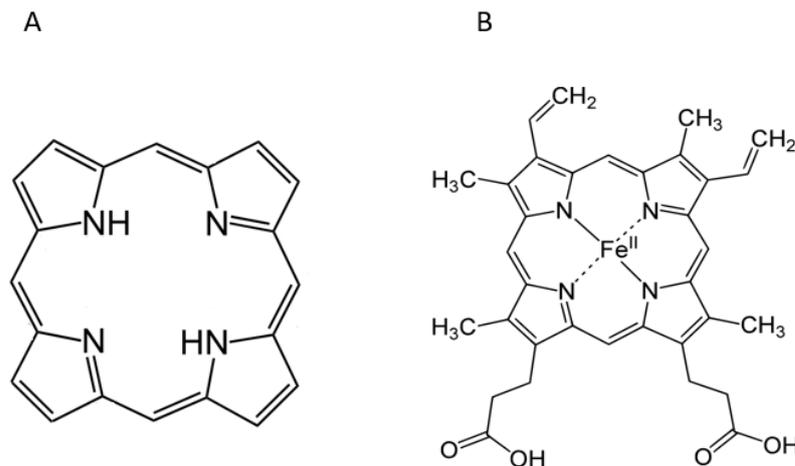


Abbildung 4: Chemische Struktur des HO-1 Substrates

(A) Die Grundstruktur der Häme wird durch vier Pyrrolringe gebildet, die sich zu einem Porphyrinmolekül zusammenlagern. Durch vier innere Stickstoffatome, können verschiedene Kationen komplexiert werden. (B) Häm b, die prosthetische Gruppe des Hämoglobins, beinhaltet ein zentrales Fe (II) Ion und unterscheidet sich durch seine Kohlenwasserstoffreste am Porphyrinring von anderen Hämen. Modifiziert nach (Montellano 2000).

Die HO existiert in zwei distinkten Isoformen, die als HO-1 und HO-2 bekannt sind. Die Isoform HO-2 wird konstitutiv im Gewebe von Gehirn und Hoden exprimiert (Trakshel, Kutty et al. 1986), wohingegen die induzierbare Isoform HO-1 in den meisten Geweben nur schwach vorhanden ist. Unter oxidativem Stress oder durch das Vorhandensein des Substrates Häm selbst wird das Expressionslevel der HO-1 in den Zellen hochreguliert (Keyse, Applegate et al. 1990, Vile, Basu-Modak et al. 1994, Immenschuh and Ramadori 2000).

In verschiedenen Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich eine erhöhte HO-1-Aktivität oder eine gezielte Überexpression des Enzyms positiv auf inflammatorische Phänotypen auswirkt (Willis, Moore et al. 1996, Soares, Marguti et al. 2009). Im Einklang damit stehen Experimente, in denen Mäuse eine verstärkte Vulnerabilität gegenüber proinflammatorischen Stimuli und eine chronische Inflammation nach einem HO-1-Knockdown aufwiesen (Poss and Tonegawa 1997).

Die experimentelle Induktion der HO-1-Aktivität führt zu einer verringerten Interaktion zwischen Leukozyten und EC in einem oxidativen Stress Setting. Dies macht sich in einer verminderten Adhäsion von Leukozyten bemerkbar. Vermittelt werden diese Effekte durch das HO-1 Produkt Biliverdin, welches eine verminderte P-Selektinexpression auf der Oberfläche der EC induziert und die VCAM-1 getriebene Leukozytenmigration blockiert (Hayashi, Takamiya et al. 1999, Keshavan, Deem et al. 2005). Auch im Zusammenhang mit chronischen inflammatorischen Erkrankungen schützt eine induzierte HO-1-Expression vor der Aktivierung der vaskulären EC (Berberat, Yi et al. 2005, Kawamura, Ishikawa et al. 2005).

Für CO, das zweite wichtige Produkt des Häm Metabolismus, konnten ebenfalls protektive Effekte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Schon geringe Konzentrationen des in höheren Konzentrationen toxischen Gases, verhindern die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β und des Makrophagen-inflammatorischen-Proteins (MIP)-1 β . Gleichzeitig führt CO zu einer gesteigerten Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (Otterbein, Bach et al. 2000). Das Molekül spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Regulierung des Gefäßtonus, in dem es die Konzentration intrazellulärer Signalstoffe erhöht und die Gefäßkontraktilität verringert (Sammut, Foresti et al. 1998). Die pharmakologische Inaktivierung der HO-1 in EC resultiert in einer verstärkten TNF- α -induzierten Apoptose, ein Effekt, der durch die exogene Applikation von CO wieder aufgehoben werden kann (Brouard, Otterbein et al. 2000). Durch Erhöhung der CO-Konzentration in der Leber während der Transplantationsphase kommt es zu einer geringeren Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls ICAM in EC und einer damit einhergehenden Reduzierung des mononukleären Infiltrats in der Gefäßwand des Transplantats (Ikeda, Ueki et al. 2009). Des Weiteren verhindert die HO-1-Expression in T-Zellen deren Proliferation. Dieser Effekt konnte ebenfalls dem gasförmigen CO zu geschrieben werden., da CO zu einer Hemmung der autokrin-wirkenden IL-2 Sekretion der T-Lymphozyten führt (Pae, Oh et al. 2004).

1.6.3 Die Aktivität der HO-1 wird durch Häm Analoga und Statine moduliert

Um die protektiven Eigenschaften der HO-1 auch therapeutisch nutzbar zu machen, wurden verschiedene Substanzen untersucht, die entweder die HO-1-Expression oder die Aktivität des translatierten Proteins verstärken.

Abhängig von dem gebundenen Metallion in der Mitte des Protoporphyrinrings entstehen verschiedene Häm Derivate, wie Zink (II) Protoporphyrin IX (ZnPPIX) oder Cobalt (III) Protoporphyrin IX Chlorid (CoPPIX). ZnPPIX ist ein nicht-metabolisierbares Derivat des HO-1 Substrates Häm und inhibiert bereits bei einer Konzentration von $\leq 5 \mu\text{M}$ die HO-1 selektiv (Appleton, Chretien et al. 1999). Die Inkubation mit ZnPPIX führt *in vitro* nur zu einer schwachen Reduktion der HO-1-Expression, induziert aber gleichzeitig eine Caspase-3-vermittelte Apoptose. Durch die Inhibition der HO-1 kommt es zwangsläufig auch zu einer reduzierten Bilirubin-Konzentration und einer verminderten antioxidativen Wirkung (Hirai, Sasahira et al. 2007).

Für CoPPIX lässt sich hingegen eine Aktivierung der HO-1-Expression in EC sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisen. Darüber hinaus kommt es zu einer erhöhten Expression des proangiogenen IL-8, das essentiell für die Homöostase der EC ist (Loboda, Jazwa et al. 2005). Neben den Häm Analoga CoPPIX und ZnPPIX, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften einen direkten Effekt auf die Aktivität der HO-1 haben gibt es weitere pharmakologische Substanzen, welche die immunmodulatorischen Eigenschaften der HO-1 beeinflussen.

Statine sind Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme-A-Reduktase-Inhibitoren und werden zum Senken des Lipidspiegels im Plasma eingesetzt, vermitteln aber auch eine Vielzahl pleiotroper Effekte. Dazu zählen die Reduktion der ROS-Produktion, verminderte Exozytose proinflammatorischer Zytokine und eine verstärkte Aktivität der endothelialen Stickstoffoxidsynthase, die wichtig für die endotheliale Homöostase ist (Takemoto and Liao 2001, Wierzbicki, Poston et al. 2003). Der Mechanismus für die antiinflammatorischen Eigenschaften der Statine liegt unter anderem in ihrem Einfluss auf die HO-1-Expression begründet. Die Stimulation von EC mit Statinen führt zu einer zeit- und dosisabhängigen Steigerung der HO-1-mRNA-Expression und einer nachfolgenden erhöhten Proteinkonzentration in den Zellen (Grosser, Hemmerle et al. 2004). Darüber hinaus konnte für Herztransplantationen gezeigt werden, dass die Behandlung mit Statinen nicht nur zu einem geringeren Cholesterolverwert der Patienten führt, sondern auch die Entwicklung einer Neointima und damit die Ausprägung der CAV verringert (Kobashigawa, Katznelson et al. 1995, Wenke, Meiser et al. 1997).

Wie bereits dargelegt, kommt es aufgrund der genetischen Unterschiede zwischen dem transplantierten Organ und dem Empfänger zu der Ausbildung einer immunologischen Reaktion gegen das Transplantat, wobei EC eine der ersten Zielstrukturen darstellen. Abhängig von der Anzahl und der Stärke der Interaktionen mit verschiedenen Zellpopulation des Immunsystems oder dem Komplementsystem werden unterschiedliche Signalwege in EC aktiviert. Viele dieser Signalwege regulieren und beeinflussen sich gegenseitig und können daher zu einer Vielzahl verschiedener Resultate führen (Abb.5).

Durch das Binden der DSA kann es zu einer Aktivierung des Komplementsystems kommen, das durch unmittelbare Lyse der Zellen zu einer hyperakuten oder durch die Aktivierung des adaptiven Immunsystems zu einer akuten Abstoßungsreaktion führt. Kommt es durch die Interaktion der DSA mit den EC zu keiner Komplementaktivierung, führt dies zu einer Endothelaktivierung und einem Verlust der endothelialen Homöostase. Im weiteren Verlauf wird eine morphologische Umstrukturierung der Gefäßwand verursacht, durch die neointimale Hyperplasie verringert sich das Lumen und Monozyten transmigrieren aus der Zirkulation in die Gefäßwand. Dies führt zu der Manifestation einer chronischen Abstoßungsreaktion.

Die Involvierung weiterer Zellpopulation des Immunsystems führt ebenso zu einer Aktivierung der EC und resultiert in einer Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat. Aus bisher noch nicht vollständig verstandenen Gründen kann es zu einer Anpassungsreaktion der Endothelzellen kommen und die Abstoßungsreaktionen können herausgezögert werden. Durch die Hochregulierung antiapoptotischer und antiinflammatorischer Proteine im Endothel kann statt einer Abstoßungsreaktion eine so genannte Akkommodation initiiert werden.

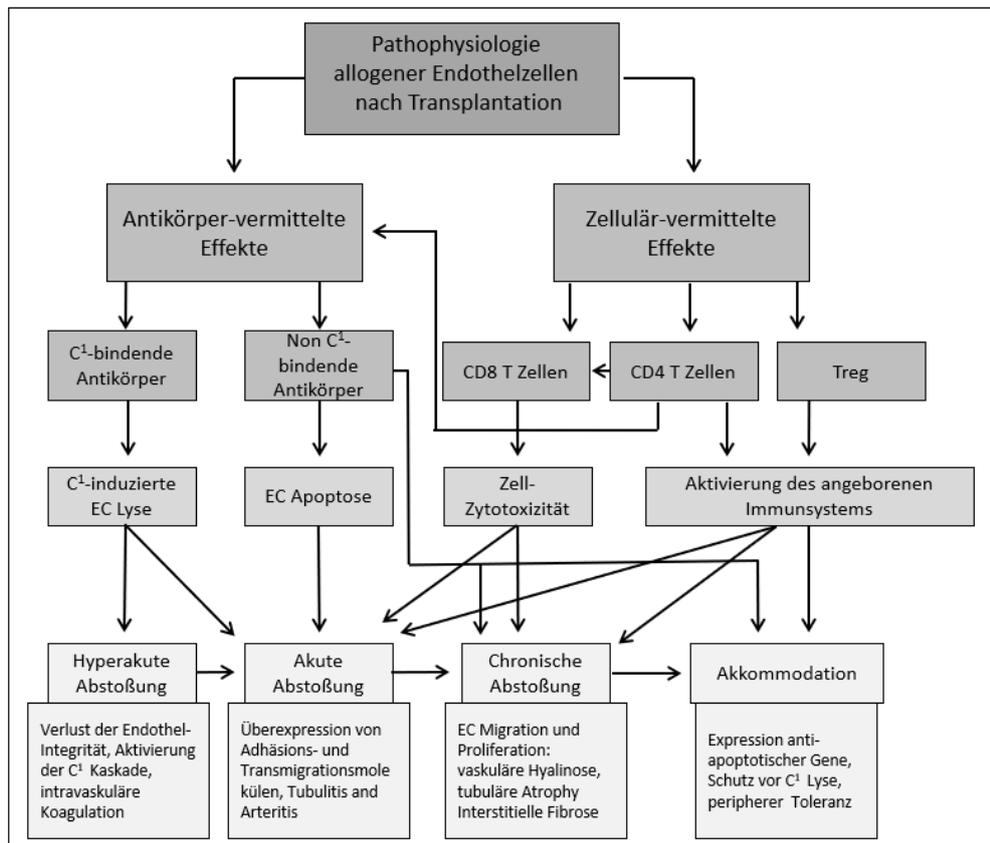


Abbildung 5: Übersicht über die Interaktionen zwischen EC und Leukozyten

Im Zuge einer Transplantation kommt es durch diese Interaktionen zur Ausbildung von unterschiedlichen allogenen Abstoßungsreaktionen oder einer Akkommodation. EC, Endothelzellen; C¹, Faktor des Komplementsystems. Modifiziert nach (Kummer, Zaradzki et al. 2020).

1.7 Fragestellung

Die bisher einzige kurative Option für Patienten, die unter einem terminalen Organversagen von Niere, Leber oder Herz leiden, stellt eine Transplantation des betreffenden Organs dar. Da die Anzahl der benötigten Organe die Anzahl der verfügbaren Organe deutlich übersteigt, ist die Gruppe der Patienten, die von dieser Therapie profitieren können, stark begrenzt. Innerhalb der ersten Jahre nach einer Transplantation entwickeln die Organempfänger Abstoßungsreaktionen gegen das Transplantat, was zu dessen Funktionsverlust führen kann. Die betroffenen Patienten müssen dann erneut auf die Warteliste für eine Transplantation gesetzt werden. In den vergangenen Jahrzehnten wurden daher große Anstrengungen unternommen, die Qualität und Leistungsfähigkeit von transplantierten Organen zu verbessern. Im Bereich der akuten Abstoßungsreaktionen sind hierbei beträchtliche Erfolge erzielt worden. Lediglich für die Behandlung einer chronischen Abstoßungsreaktion, der Transplantat Vaskulopathie, gibt es noch keine zufriedenstellende Therapie. Bekannt ist, dass die *de novo* Synthese von donor-spezifischen anti-HLA-Antikörpern ein Risikofaktor für die Entstehung der TV ist. Diese Antikörper binden unter anderem an die Endothelzellen der Gefäße des transplantierten Organs und induzieren eine chronische Inflammation der Endothelzelle, was zu einer Transplantatvaskulopathie führt.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit besteht in der Beantwortung folgender Fragestellungen:

- I. Kann die gezielte Induktion der Aktivität des antiinflammatorischen Enzyms HO-1 durch CoPPIX die anti-HLA-I-Antikörper-vermittelten Interaktionen zwischen Endothelzellen und Monozyten beeinflussen?
- II. Induziert die Stimulation mit einem Statin ähnliche Effekte wie CoPPIX und wäre damit eine therapeutische Option für Patienten, die unter einer Transplantat Vaskulopathie leiden?
- III. Führt die gezielte Induktion der HO-1 in einem allogenen Transplantationsmodell zu einer reduzierten Infiltration von Monozyten in die Gefäßwand des Transplantats?
- IV. Werden die durch die HO-1 Aktivierung beobachteten Effekte möglicherweise über den HO-1 Metaboliten Kohlenstoffmonoxid vermittelt?
- V. Über welche Adhäsionsrezeptoren werden mögliche Effekte vermittelt? Kann eine Blockade dieser Rezeptoren gegebenenfalls therapeutisch genutzt werden?

2. Material

2.1 Eukaryontische Zellen

Bezeichnung	Herkunft	Distributor
Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)	humane primäre Endothelzellen aus der Nabelschnur	#C-12203, PromoCell, Heidelberg, DE
Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)	humane primäre Endothelzellen aus den Herzkranzgefäßen	#C-1222, PromoCell, Heidelberg, DE
THP-1	humane monozytäre Leukämiezelllinie	#88081201, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA
BALB/c Endothelial cells	murine aortale primäre Endothelzellen	#BALB-5052, PELOBiotech GmbH, Planegg, DE
RAW 264.7	murine monozytäre Leukämiezelllinie	#91062702, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA

2.2 Zellkulturmedium

HUVEC/HCAEC	Zusammensetzung	Distributor
Kulturmedium	Basal Medium MV2	#C-22221, PromoCell, Heidelberg, DE
	Growth Medium MV 2 Supplement Kit	#C-39226, PromoCell, Heidelberg, DE
Starvationmedium	Basal Medium MV2	#C-22221, PromoCell, Heidelberg, DE
	2 % FCS	#S-EUR30-1, Cell Concepts, Umkirch, DE
Transmigrationsmedium	50 % Starvationmedium	
	50 % THP-1 Kulturmedium	
Kryo-Medium	Kulturmedium	
	10 % DMSO	#K44917950, Billerica, MA, USA

THP-1	Zusammensetzung	Distributor
Kulturmedium	RPMI	#72400-021, life technologies, Carlsbad, CA, USA
	10 % FCS	#S-EUR30-1, Cell Concepts, Umkirch, DE
Kryo-Medium	Kulturmedium	
	10 % DMSO	#K44917950, Billerica, MA, USA

BALB/c EC	Zusammensetzung	Distributor
Kulturmedium	Mouse Basal Medium	#M1168b, PELOBiotech GmbH, Planegg, DE
	Endothelial Cell Medium Supplement Kit	# M1168-Kit, PELOBiotech GmbH, Planegg, DE
Starvationmedium	Mouse Basal Medium	#M1168b, PELOBiotech GmbH, Planegg, DE
	2 % FCS	#S-EUR30-1, Cell Concepts, Umkirch, DE
Kryo-Medium	Kulturmedium	
	5 % DMSO	#K44917950, Billerica, MA, USA

RAW 264.7

Kulturmedium	DMEM high glucose, GlutaMAX	#10566-016, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
	10 % FCS	#S-EUR30-1, Cell Concepts, Umkirch, DE
Kryo-Medium	Kulturmedium	
	5 % DMSO	#K44917950, Billerica, MA, USA

2.3. Versuchstiere

Stamm (offizielle Nomenklatur)	Beschreibung	Alter	Distributor
BALB/c Stock No. 000651	Expression der MHC Klasse I Moleküle H-2K ^d	8 – 10 Wochen	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, FR
B6.129S7- Rag2 ^{tm1Mom} /J (B6.RAG2 KO) Stock No. 008449	RAG2 knockout, keine funktionellen B- und T-Zellen, Expression der MHC Klasse I Moleküle H-2K ^b	8 – 10 Wochen	Dr. Thomas Fleming, Klinik für Endokrinologie, Stoffwechsel und Klinische Chemie, Universitätsklinikum Heidelberg, DE

2.4 Plastikware

Cellstar® Cell Culture Plate (6-, 12- und 24-Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® Cell Culture Flask (T25, T75)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® Suspension Flask (T25, T75)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Tissue-Tek® Cryomold®, intermediate	Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, USA
Transwell Plate (24-Well)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CIM Plate	OMNI Life Science, Bremen, DE
E 16 Plate	OMNI Life Science, Bremen, DE
PCR Platten MicroAmp™ Fast Optical 96-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Cellstar® Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Maxymum Recovery™ Pipettenspitzen, RNase-, DNase-, pyrogenfrei (0.5-10 µl; 1-200 µl, 100-1000 µl)	Axygen® Scientific, Inc., Union City, CA, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Cryo.s™ Röhrchen (2 ml)	Nunc, Naperville, IL, USA
EASYstrainer™, (40 µm, 70 µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellschaber	Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA
Omnican Feindosierungsspritzen (1ml)	B. Braun, Melsungen, DE
Microlance3™ Kanülen (20 G, 23 G, 27 G)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Plastipak™ Spritze (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Innertkammer	Marke Eigenbau

2.5 Reagenzien

Recombinant human MCP-1 (CCL2)	#300-04, PeproTech, Winterhude, DE
Recombinant mouse MCP-1	#SRP4207, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA
Zn (II) Protoporphyrin IX	#Zn625-9, Frontier Scientific Services, Inc., Newark, DE, USA
Co (III) Protoporphyrin IX	#Co654-9, Frontier Scientific Services, Inc., Newark, DE, USA
CORM-401	#SML1930-5mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA
iCORM-401	CORM-401 über Nacht auf 60 °C erhitzen
CellTracker™ Green CMFDA Dye	#C7025, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd	#158127, Merck KGaA, Darmstadt, DE
β-Mercaptoethanol	#M6250, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA
Trypanblau	#T6146, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	#34075, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypsin-EDTA PBS, 1x, 0.05/0,02 %	#R-L5100-H, Cell Concepts GmbH, Umkirch, DE
Accutase®-Lösung	#A6964-100ml, Merck KGaA, Darmstadt, DE
UltraPure™ 0.5 M EDTA, pH 8.0	#15575020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tween® 20	#37470.01, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	#11836153001, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA
RIPA Lyse- und Extraktionspuffer	#89900, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.6 Antikörper

Zellkultur	
Mouse anti-human HLA-A, B, C (Klon: w6/32, Isotyp: IgG2a)	#MA1-19027, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mouse anti-mouse H-2K ^d (Klon: SF1-1.1, Isotyp: IgG2a)	#116601, BioLegend, San Diego, CA, USA
Mouse IgG2a Isotypkontrolle (Klon: MOPC-173)	#400201, BioLegend, San Diego, CA, USA
Mouse anti-human CD62E	#ab18981, Abcam, Cambridge, UK
PE mouse anti-human CD62E	#322605, San Diego, CA, USA
Rabbit anti-human HO1 (Hsp32) polyclonal	#SPA-895, Enzo Life Science, New York, NY, USA
Rabbit anti-human CD62E	#NBP1-45545ss, Novus Biologicals, CO, USA
Rabbit anti-human β Actin	#4967, Cell Signaling Technology, Leiden, NL
Goat anti-rabbit HRP konj.	#R1364HRP, OriGene, Herford, DE
Experimentelles Tiermodell	
Mouse anti-mouse H-2K ^d (Klon: SF1-1.1, Isotyp IgG2a)	#116601, BioLegend, San Diego, CA, USA
Mouse IgG2a Isotypkontrolle (Klon: MOPC-173)	#400201, BioLegend, San Diego, CA, USA
Mouse anti-mouse CD62E (Klon: RME-1, Isotyp IgG1)	#148802, BioLegend, San Diego, CA, USA
Mouse IgG1 Isotypkontrolle (Klon: MG1-45)	#401402, BioLegend, San Diego, CA, USA
FITC Rat anti-mouse CD3	#100204, BioLegend, San Diego, CA, USA
PE Goat anti-mouse IgG	#405307, BioLegend, San Diego, CA, USA
Immunhistologie	
Rat anti-mouse CD68	#MCA1957, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Rabbit anti-mouse CD62E	#ab2497, Abcam, Cambridge, UK
Mouse anti-vWF	#CBMAB-V0158-YC, Creative Biolabs, Shirley, NY, USA
Mouse anti-mouse SMA	#A2547, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA
Goat anti-rat F(ab) Alexa Fluor [®] 555	#ab21434, Abcam, Cambridge, UK
Goat anti-rabbit F(ab) Alexa Fluor [®] 555	#A21428, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Goat anti mouse F(ab) Alexa Fluor [®] 488	#A11017, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.7 Molekularbiologische Kits

RNeasy Micro Kit	#74004, Qiagen, Hilden, DE
QuantiTect Rev. Transcription Kit	#205310, Qiagen, Hilden, DE
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	#4444557, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	#23225, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.8 TaqMan® Genexpressions-Assay

Zielgen	Assay-ID	Distributor
HMOX-1	Hs01110250_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ESAM	Hs00332781_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PECAM-1	Hs01065282_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ICAM-2	Hs00609563_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CD99	Hs00908458_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
JAM-1	Hs00170991_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
JAM-3	Hs00230289_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
E-Selectin	Hs00174057_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
P-Selectin	Hs00927900_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GAPDH	Hs03929097_g1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.9 Immunhistologie

Adhäsionsobjektträger, Polysine®, Menzel Gläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Knittel Gläser Deckgläser, 24x50mm	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, DE
Dako PAP Pen	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
DAPI	#5748, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, DE
Mouse on Mouse (M.O.M.) Blocking Reagent	#MKB2213, VECTOR LABORATORIES, INC., Burlingame, CA, USA
Fluorescence Mounting Medium	Dako North America, Inc., CA, USA
Eukitt® Eindeckmittel	O Kindler, ORSAtec GmbH, Freiburg, DE
Eosin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Mayers Hämalun	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Triton® X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE

2.10 si-RNA- Transfektion

ON-TARGETplus Human HMOX1 (3162) si-RNA	#L-006372-00-0005, Dharmacon, Lafayette, CL, USA
ON-TARGETplus Non-targeting RNA	#D-001810-01-05, Dharmacon, Lafayette, CL, USA
OptiMEM-Medium	#31985-047, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lipofectamin RNAi/Max	#13778-075, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.11 Medikamente

Buprenorphin	PZN 6318298, RB Pharma, Slough GB
Heparin-Natrium-25000	PZN 3029843, Ratiopharm, Ulm, DE
Pravastatin	PZN-00483843, Hexal AG, Holzkirchen, DE
Baytril® 25 mg/ml Injektionslösung	PZN-11004142, Bayer Vital, Leverkusen, DE
Ketanest®-S 25 mg/ml Injektionslösung	PZN 08509909, Pfizer DE GmbH, Berlin, DE
Xylavet® 20 mg/ml Injektionslösung	CP-Pharma Handels GmbH, Burgdorf, DE

2.12 Puffer und Lösungen

Bindungspuffer	HBSS	500 ml
	BSA	5 g
	Ca ²⁺	2 mM
	Mg ²⁺	2 mM
Ladepuffer 5x	Tris-HCl	62,5 mM
	SDS	2 %
	Glycerol	10 %
	β-Mercaptoethanol	5 %
	Bromphenolblau	0,002 %
	ddH ₂ O	0,9 ml
Trenngel 10 %	Acrylamid/Bis-acrylamid (30 %/0,8 % w/v)	3,4 ml
	1,5 M Tris (pH=8,8)	2,6 ml
	10 % (w/v) SDS	0,1 ml
	10 % (w/v) Ammonium Persulfat	100µl
	TEMED	10µl
	ddH ₂ O	3,8 ml

2. Material

Sammelgel	Acrylamid/Bis-acrylamid (30%/0,8% w/v)	0,67 ml
	0,5 M Tris (pH=8,8)	1,25 ml
	10% (w/v) SDS	50 µl
	10% (w/v) Ammonium Persulfat	50 µl
	TEMED	5 µl
	ddH ₂ O	2,975 ml
SDS-PAGE Laufpuffer (pH=8,3)	Tris	60g
	Glycin	288 g
	SDS	20 g
	ddH ₂ O	pH mit HCl einstellen, dann auf 2 l auffüllen
Transferpuffer (pH=8,3)	Tris	60 g
	Glycin	288 g
	Methanol	20 %
	10 % SDS	0,0002 %
	ddH ₂ O	pH mit HCl einstellen, dann auf 2 l auffüllen
TBS Puffer 10X (pH=7,5)	0,5 M Tris	121,1 g
	1,5 M NaCl	175,32 g
	ddH ₂ O	pH mit HCl einstellen, dann auf 2 l auffüllen
TBS-T Puffer 1x	1x TBS	1 l
	Tween® 20	0,5 ml
Blockingpuffer	BSA	5 g
	TBS-T	100 ml
ACK Lyse-Puffer	Ammoniumchlorid	4,2 g
	Kaliumhydrogencarbonat	0,5 g
	0,5 M EDTA	100 µl
	ddH ₂ O	500 ml
Eosin Stock-Lösung	Eosin	1g
	ddH ₂ O	100 ml
0,1 % Eosinlösung	Eosin Stock-Lösung	10 ml
	ddH ₂ O	90 ml

	Essigsäure	1 Tropfen
Blocking-Lösung (Immunhisto)	BSA	1 g
	PBS	100 ml

2.13 Operationsbesteck

Dumont forceps no. 5, extra fine	#2-1033, neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Mikro-Knüpppinzette	#FD280R, B. Braun, Melsungen, DE
Mini-Arterienklemme	#FD560R, B. Braun, Melsungen, DE
Anlegepinzette	#FD568R, B. Braun, Melsungen, DE
Mikro-Nadelhalter	#FM021R, B. Braun, Melsungen, DE
Mikro-Nadelhalter, 14,5 cm, gebogen	Medicon eG, Tuttlingen, DE
Wundspreitzer, Alm Retractor, 7 cm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
S&T Forceps, SuperGrip-Spitzen, 45° abgewinkelt	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Präparierschere, Cottle-Knapp, 10,5 cm	Aesculap AG, Tuttlingen, DE
Nahtmaterial, Polypropylen, monofil blau, USP 6-0, 45cm	Ethicon Inc., Somerville, MA, USA
Nahtmaterial 7 V 33, Rundspitze, schwarz, USP 11-0, 10 cm	#03170, EPM Medizintechnik, Bütthard, DE

2.14 Sonstiges

Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	#14190144 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hanks balanced salt solution (HBSS)	#15356878, Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumchloridlösung 0,9 %	PZN 2737756, B. Braun, Melsungen, DE
Corning™ Matrigel™ Membrane Matrix	# CB-40234C, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TruStain FcX™	#101320, Biolegend, San Diego, CA, USA
CellWash	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BSA (Albumin Fraktion V, proteasefrei)	#T844.3, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE
Normal Goat Serum	#AB_2336990, Jackson Immuno Research, Cambridge, UK
Methanol	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen, DE
Stickstoff, flüssig	Linde, Dublin, IRL
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards	#1610375, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Western Blotting Filter Papers	#88620, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Immobilon® PVDF Membran	#IPVH00010, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Henry Schein Blutlanzetten	Henry Schein Inc., Melville, NY, USA
Vliesskompressen	Fink und Walter GmbH, Merchweiler, DE
Alkoholisches Hautantiseptikum	Schülke & Mayr, Norderstedt, DE
Sterile Applikatoren	Paul Böttiger OHG, Bodenmais, DE
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen, DE
Tissue Tek® O.C.T.™ Compound Einbettmedium	Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, USA

2.15 Geräte/Instrumente

Heracell™ 240i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Olympus BX 63 Fluoreszenz Mikroskop	Olympus Life Science Solutions, Waltham, MA, USA
Leica M651 Operationsmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Leitz Cryostat MGW Lauda 1720 Digital	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Matrx™ Isoflurane Key-fill VIP 3000® Vaporizer	Midmark Corporation, Versailles, OH, USA
Multifuge 3 S-R, Rotor 6445	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Varifuge 3. OR, Rotor 5315	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Hettich® Mikroliter Zentrifuge MIKRO 200R, Rotor 2428	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
Polymax 1040 Orbitalschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
NanoDrop 2000c Spectrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mastercycler® nexus X2	Eppendorf AG, Hamburg, DE
StepOnePlus™ System Real-Time PCR Systems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FACSVerse™ Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, DE
xCELLigence® RTCA DP instrument	ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München, DE
Criterion™ Blotter	Bio-Rad, München, DE
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
FUSION FX Spectra	Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, FR
Vortex-Reagenzglas mixer (7-2020)	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Hot Plate 062	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Göttingen, DE

2.16 Software

Microsoft Office, Version 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism Version 9.0.0	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
IBM SPSS Statistics Version 24.0	IBM, New York, NY, USA
EndNote X7.7.1	Thompson Reuters, New York, NY, USA
NanoDrop 2000 / 2000c DataAssist™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
StepOnePlus Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FACSuite Software Version 1.0.5.3840	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CellSens Software	Olympus Life Science Solutions, Waltham, MA, USA
FusionCapt Advance	Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, FR
Software xCELLigence® RTCA DP instrument	ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA
ImageJ	Wayne Rasband

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung der primären Endothelzellen (human & murin)

Auftauen der Zellen

Die Endothelzellen wurden auf Trockeneis vom jeweiligen Distributor geliefert und sofort nach Erhalt für zwei Minuten in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt. Nach Desinfizieren mit 70 %-igem EtOH konnte das Vial unter der Sterilbank geöffnet werden und durch das Hinzufügen von 1 ml warmem Kulturmedium tauten die Zellen vollständig auf. Die Zellen wurden in eine T75 Kulturflasche für adhärenz Zellen überführt und mit 10 ml warmem Kulturmedium bedeckt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einen Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Sobald die Zellen adhärenz waren, konnte das Kulturmedium aspiriert und durch 10 ml frisches Kulturmedium ersetzt werden. Nach dem Auftauen befanden sich die Zellen in Passage eins.

Passagieren der Zellen

Ein Wechsel des Kulturmediums fand alle zwei Tage statt, indem das verbrauchte Medium aspiriert und durch 10 ml frisches Medium ersetzt wurde. Unter dem Lichtmikroskop wurde regelmäßig die Konfluenz des endothelialen Monolayers überprüft. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80 – 90 % erreicht hatten, konnten diese passagiert werden. Dazu wurde das Kulturmedium aspiriert und der Zellrasen zweimal mit 10 ml warmem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation von fünf Minuten mit 3 ml Trypsin/EDTA Lösung im Inkubator, um sowohl die Zell-Zell-Verbindungen, als auch die Adhäsion am Kulturflaschenboden zu lösen. Die Zugabe von 15 ml Basalmedium + 10 % FCS stoppte die Trypsinierung ab. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und für fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml warmem Kulturmedium resuspendiert.

Mit einem Hämozytometer wurde die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Der Mittelsteg der Neubauer Zählkammer ist um 0,1 mm abgesenkt und durch Aufbringen des dazugehörigen Deckglases bildet sich ein Hohlraum, der ein genormtes Volumen von 0,1 µl aufnimmt. Auf dem Mittelsteg sind mehrere vertikale und horizontale Linien eingraviert, die es erlauben, Zellen eines genau definierten Bereiches zu zählen (Abb.6). Für die Quantifizierung der Zellzahl einer Suspension wurden vier Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl anhand folgender Formel bestimmt:

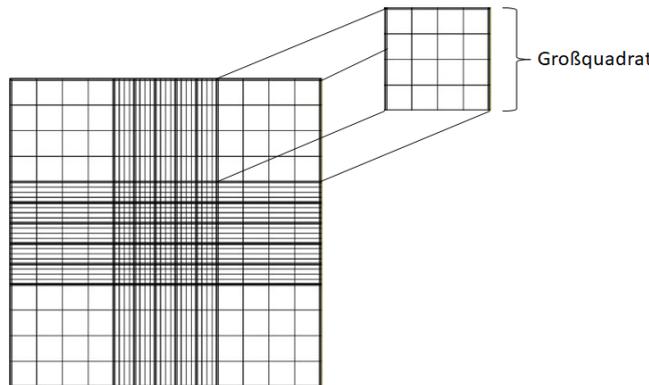
$$\text{Zellzahl ml}^{-1} = \frac{\text{Zellzahl gesamt}}{4} \times 10^4 \times \text{VF} \quad (\text{VF} = \text{Verdünnungsfaktor})$$


Abbildung 6: Hämozytometer nach Neubauer

Für die Quantifizierung der Zellzahl $\times \text{ml}^{-1}$ wurde die durchschnittliche Anzahl der Zellen in den 4 Großquadraten gezählt und mit 10^4 multipliziert.

Die Endothelzellen wurden mit einer Dichte von $5\text{-}10 \times 10^4$ Zellen/ cm^2 in einer neuen Kulturflasche ausgesät, mit 10 ml warmem Kulturmedium überdeckt und kultiviert. In der vorliegenden Arbeit fanden Endothelzellen der Passagen vier bis sechs Verwendung.

Kryokonservierung der Zellen

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte in Passage drei. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 4°C kaltem PBS wurden die Zellen für fünf Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 4°C kaltem Kryo-Medium resuspendiert. Das Einfrieren von 5×10^5 Zellen $\times \text{ml}^{-1}$ in beschrifteten Vials erfolgte bei -80°C und die Langzeitlagerung bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

3.1.2 Kultivierung der monozytären Zelllinien

Auftauen der Zellen

Sowohl die humane monozytäre Zelllinie THP-1, als auch die murine monozytäre Zelllinie RAW 264.7, wurden von Sigma-Aldrich tiefgefroren auf Trockeneis geliefert und für zwei Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach der Desinfektion des Vials mit 70 %-igem EtOH konnte es unter der Sterilbank geöffnet werden und durch Hinzufügen von 1 ml warmem Kulturmediums tauten die Zellen vollständig auf. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt, mit 30 ml 37°C warmes Kulturmedium überschichtet und für fünf Minuten mit $600 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert.

Die semi-adhärenen RAW 264.7 Zellen wurden in eine Zellkulturflasche für adhärenente Zellen überführt, mit 20 ml 37°C warmem Kulturmedium überdeckt und im Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Alle 48 Stunden musste das verbrauchte Kulturmedium aspiriert und durch 20 ml frisches Kulturmedium ersetzt werden.

Die Kultivierung der THP-1 Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen für Suspensionszellen. Für die Anzucht wurde das resuspendierte Zellpellet in ein Well einer 6-Well-Platte pipettiert, 4 ml 37°C warmes

Kulturmedium dazu gegeben und die Zellen im Inkubator kultiviert. Der Eintritt der Zellen in die Proliferationsphase wurde lichtmikroskopisch sichtbar, sobald die normalerweise freischwimmenden Zellen begannen, Cluster zu bilden. Die Zellsuspension wurde in eine T75 Kulturflasche für Suspensionszellen überführt, das Kulturmedium auf 10 ml aufgefüllt und nach 48 Stunden erneut 10 ml Kulturmedium hinzugefügt.

Passagieren der Zellen

Das Passagieren der THP-1 Zellen erfolgte alle 48 Stunden durch das Ersetzen von 10 ml Zellsuspension mit 10 ml frischem Kulturmedium.

Die RAW 264.7 Zellen bilden als semi-adhärenente Zellen einen Zellrasen, dessen Konfluenz regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wurde. Sobald sie eine Konfluenz von 80 – 90 % erreicht hatten erfolgte das Passagieren. Das Kulturmedium wurde aspiriert und der Zellrasen zweimal mit 10 ml 4 °C kaltem PBS gewaschen, um abgestorbene Zellreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml frischem Kulturmedium und einem Zellschaber mechanisch vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt, für fünf Minuten mit 600 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in einer Dichte von 10^5 Zellen/cm² in einer neuen Kulturflasche mit 20 ml frischem Kulturmedium weiterkultiviert.

Kryokonservierung der Zellen

Für die Kryokonservierung der Zelllinien wurden diese aus der laufenden Kultur entnommen, für fünf Minuten bei 4 °C mit 600 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml 4 °C kaltem Kryo-Medium resuspendiert. Es wurden jeweils 10^6 vitale Zellen x ml⁻¹ in einem beschrifteten Vial bei -80 °C tiefgefroren und anschließend in den Stickstofftank zur Langzeitlagerung bei -196 C überführt.

Im Unterschied zu den adhärenenten und semi-adhärenenten Zellen, bei denen sich tote Zellen vom Boden ablösen, ist die Vitalität der THP-1 Zellen nicht ohne Hilfsmittel im Lichtmikroskop zu erkennen. Um zwischen lebenden und toten THP-1 Zellen differenzieren zu können, wurde nach dem Resuspendieren des Pellets 10 µl Zellsuspension entnommen und mit 10 µl Trypanblau, einem anionischen Bisazofarbstoff, vermischt. Trypanblau ist nicht membrangängig und färbt daher keine vitalen Zellen blau an. Bei abgestorbenen oder früh-apoptotischen Zellen hingegen bilden sich kleine Poren in der Membran, die Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau.

3.1.3 Stimulation der Endothelzellen mit dem anti-HLA-I bzw. anti-MHC-I-Antikörpern

Um die Effekte von anti-HLA-I-Antikörpern auf humane EC und deren Interaktionen mit Monozyten *in vitro* zu untersuchen, wurden die EC mit dem mouse anti-human HLA-I-Antikörper (Thermo Fisher; Klon: w6/32) stimuliert. Als Kontrolle diente eine Stimulation mit der Isotypkontrolle des w6/32-Antikörpers. Anschließend wurden Adhäsions- und Transmigrations-Assays durchgeführt.

Für die murinen Adhäsions- und Transmigrations-Assays wurden die Mausendothelzellen mit dem mouse anti-mouse MHC-I-Antikörper (Biolegend; Klon: SF1-1.1) beziehungsweise mit der entsprechenden Isotypkontrolle stimuliert.

Die Endothelzellen wurden mit einer Antikörperkonzentration von 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml für die jeweils angegebene Dauer inkubiert. Hierzu wurden die Stocklösungen der Antikörper direkt im entsprechenden Starvationmedium verdünnt und die Endothelzellen damit stimuliert. Die Stocklösungen der Isotypkontrollen wurden ebenfalls auf 1 µg/ml im Starvationmedium verdünnt und verwendet. Die Stimulation erfolgte in Well-Platten unterschiedlicher Größe, sobald der endotheliale Monolayer die angegebene Konfluenz erreicht hatte. Die in den folgenden Experimenten angegebenen Zellzahlen konnten zuvor durch Titrationsexperimente für die unterschiedlichen Wellgrößen ermittelt werden. Die stimulierten Endothelzellen fanden sowohl für die Adhäsions- und Transmigrations-Assays als auch für molekularbiologischen Gen- und Proteinexpressionsanalysen Verwendung. Alle Inkubations- und Stimulationsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂.

3.1.4 Modulation der HO-1-Aktivität in humanen Endothelzellen

Mit der experimentellen Induktion der HO-1-Aktivität in humanen EC wurde deren Auswirkungen auf die w6/32-induzierten Effekte in Adhäsions- und Transmigrations-Assays untersucht. Hierzu wurden die Endothelzellen mit verschiedenen HO-1-Modulatoren vor der w6/32-Antikörperstimulation behandelt.

Der HO-1-Aktivator Cobalt (III) Protoporphyrin IX Chlorid (CoPPIX) wurde in ddH₂O gelöst und eine Stocklösung der Konzentration 30 mM angesetzt. Zinc (II) Protoporphyrin IX (ZnPPIX) fungierte als Inhibitor der HO-1-Aktivität. Hierzu wurde das ZnPPIX Pulver in DMSO gelöst und ebenfalls eine Stocklösung der Konzentration 30 mM angesetzt. Durch die Verdünnung der CoPPIX und ZnPPIX Stocklösungen im Starvationmedium entstanden Arbeitslösungen einer Konzentration von 5 µM.

Um einen potentiellen therapeutischen Ansatz für die Hemmung der w6/32-Antikörper-induzierten Effekte zu untersuchen, wurde die Verwendung eines Statins getestet. Wie alle Statine vermittelt auch Pravastatin pleiotrope Effekte und verstärkt u.a. die Expression und Aktivität der HO-1 (Piechota-Polanczyk, Kopacz et al. 2018). Die Pravastatin Filmtablette wurde in einem Mörser zerkleinert und mit ddH₂O die pharmakologisch aktiven Substanzen herausgelöst, sodass eine Stocklösung der Konzentration 1 mM entstand. Die nicht-löslichen Partikel konnten über einen EASYstrainerTM mit der

Porengröße 70 µm und 40 µm herausgefiltert und die Lösung mit einem Spritzenvorsatzfilter mit der Porengröße 0,2 µm steril filtriert werden. Die Statin-Stocklösung wurde für die Stimulation der Endothelzellen im Starvationmedium auf 1 µM verdünnt.

Für die Experimente wurden die Zellen 24 Stunden mit einem der drei HO-1-Modulatoren im Starvationmedium inkubiert, gefolgt von weiteren 24 Stunden Stimulation mit dem entsprechenden HO-1-Modulator und zusätzlich 1 µg/ml des w6/32-Antikörpers. Als Kontrolle für die Auswirkungen der HO-1-Modulation diente die alleinige Stimulation mit dem w6/32-Antikörper. Hierbei wurden die Endothelzellen für 24 Stunden im Starvationmedium kultiviert, gefolgt von der Stimulation mit 1 µg/ml w6/32, ebenfalls im Starvationmedium. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass alle Zellen in den betreffenden Versuchen für 48 Stunden im Starvationmedium kultiviert wurden und die beobachteten Unterschiede nicht aufgrund unterschiedlicher Kultivierungszeiten zustande kamen.

Nach der 48-stündigen Stimulation der EC mit ZnPPiX, zeigten diese unter dem Lichtmikroskop deutliche morphologische Änderungen und eine erhöhte Apoptoserate (Hirai, Sasahira et al. 2007), im Vergleich zu den CoPPiX- und Statin-behandelten Zellen. Die signifikante Zunahme der Adhäsion und Transmigration von Monozyten an beziehungsweise über einen endothelialen Monolayer in diesen Ansätzen kann daher nicht alleine der inhibierten HO-1 zugeschrieben werden. Daher wurde die ZnPPiX-behandelten Ansätze in den Auswertungen nicht weiter berücksichtigt.

3.1.5 si-RNA-induzierter HO-1-Knockdown

Die Auswirkungen einer reduzierten HO-1-Expression in EC auf die Adhäsion und Transmigration der Monozyten konnte mit einem zielgerichteten posttranskriptionalen HO-1-Gen-Silencing untersucht werden (Scherer and Rossi 2003). Hierbei führt die Transfektion der HCAEC mit einem si-RNA (small interfering, RNA)-Konstrukt, das spezifisch an die HO-1-mRNA bindet, zu einem Abbau der gebundenen mRNA.

Um festzustellen, ob die für die Transfektion verwendeten Reagenzien Auswirkungen auf die HO-1-mRNA-Konzentration haben, wurde neben der HO-1-spezifischen si-RNA eine non-target (nt)-RNA als Kontrolle verwendet. Diese bindet keine mRNA in den transfizierten Zellen und hat somit keine Auswirkungen auf das mRNA-Expressionsprofil (Transkriptom) der Zellen.

Die si-RNA- und nt-RNA-Stocklösungen mit einer Konzentration von 100 mM wurden mit Nukleasefreiem Wasser auf eine 20 mM Arbeitslösung verdünnt. Für jeden Transfektionsansatz wurde in zwei Eppendorf Reaktionsgefäße je 150 µl OptiMEM Medium vorgelegt, das erste Reaktionsgefäß mit 2,5 µl Lipofectamin RNAi/Max (Transfektions-Reagenz) komplettiert und für fünf Minuten bei RT inkubiert. In das andere Reaktionsgefäß wurde 1 µl der si-RNA- bzw. nt-RNA-Arbeitslösung hinzugegeben. Der Lipofectamin RNAi/Max-Ansatz wurde mit dem si-RNA- (bzw. nt-RNA)-Ansatz unter Vermeidung von

Scherkräften vermischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Hierbei bildet das Lipofectamin in dem OptiMEM Medium kleine Lipid-Mizellen, die die si-RNA- bzw. nt-RNA-Moleküle umschließen.

Es wurden 5×10^4 HCAEC/Well in einer 12-Well-Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Das Kulturmedium wurde von den Endothelzellen aspiriert, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 700 μ l OptiMEM Medium überdeckt und für zehn Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde in jedes Well ein Lipofectamin/si-RNA- bzw. nt-RNA-Komplex pipettiert und die Zellen für die Transfektion für vier Stunden in den Inkubator gestellt. Die mit si-RNA- bzw. nt-RNA-beladenen Lipid-Mizellen verschmelzen mit der Lipid-Doppelmembran der EC und setzen dadurch die si-RNA bzw. die nt-RNA im Zytoplasma der Zellen frei. Nach vier Stunden wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und die Zellen in 1 ml Kulturmedium weiterkultiviert. Nach 24, 36 und 48 Stunden erfolgte die Isolierung des Transkriptoms der EC und der HO-1-mRNA-Knockdown konnte mittels qPCR (Abschnitt 3.2.1) semi-quantifiziert werden. Um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt nach dem Knockdown die HO-1-Proteinkonzentration in den EC am niedrigsten ist, wurde zu den gleichen Zeitpunkten auch das Proteom der Zellen gesammelt und ebenfalls semi-quantitativ ausgewertet (Abschnitt 3.2.2).

3.1.6 Adhäsions-Assay mit Endothelzellen und Monozyten (human & murin)

Die Auswirkungen der Endothelstimulation mit dem w6/32-Antikörper und der HO-1-Modulation auf die Adhäsion der THP-1 Monozyten an den endothelialen Monolayer wurde mittels eines Adhäsions-Assays untersucht. Hierzu wurden in einer 12-Well-Platte 10^5 HCAEC/Well ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit dem w6/32-Antikörper oder mit den HO-1-Modulatoren (Abschnitt 3.1.4).

Die Proteomanalyse nach dem si-RNA-induzierten HO-1-Knockdown zeigte eine signifikante Reduktion der HO-1-Expression 36 bis 48 Stunden nach der Transfektion. Daher erfolgte die 24-stündige Stimulation mit dem w6/32-Antikörper beziehungsweise mit der Isotypkontrolle in diesem Experimententeil 24 Stunden nach dem Knockdown.

Die Stimulation mit dem w6/32-Antikörper evozierte eine Zunahme der CD62E-Expression auf der Oberfläche der EC. Um festzustellen, ob die Expression dieses Rezeptors für die Adhäsion der Monozyten an den endothelialen Monolayer relevant ist, wurde das Adhäsions-Assay auch in Gegenwart eines CD62E-blockierenden Antikörpers durchgeführt. Hierzu erfolgte die Inkubation der w6/32-stimulierten HCAEC für eine Stunde mit 5 μ g/ml eines mouse anti-human CD62E-Antikörpers im Starvationmedium, bevor das Adhäsions-Assay durchgeführt wurde.

Um eine vergleichende Interpretation mit den im Mausmodell gewonnenen Daten zu ermöglichen, wurde das Adhäsions-Assay auch mit murinen Zellen durchgeführt. Hierzu wurden 2×10^5 EC aus

Balb/c-Mäusen bis zur Konfluenz in einer 12-Well-Platte kultiviert. Die Stimulation mit dem SF1-1.1-Antikörper beziehungsweise mit der Isotypkontrolle erfolgte für 24 Stunden im Starvationmedium.

Versuchsaufbau

Für die Fluoreszenz-basierte Auswertung der adhärenzten Monozyten wurden diese mit dem CellTracker™ Green CMFDA (CTG)-Farbstoff gefärbt. CTG kann frei durch die Zellmembran diffundieren und wird im reduzierenden intrazellulären Milieu zu einem nicht-membrangängigen Produkt verstoffwechselt. Der Farbstoff kann mit einem Laser der Wellenlänge $\lambda = 492 \text{ nm}$ angeregt werden, emittiert Licht der Wellenlänge $\lambda = 517 \text{ nm}$ und liegt damit im Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffs Phycoerythrin (PE).

Die humanen oder murinen Monozyten wurden aus der entsprechenden Erhaltungskultur entnommen, für fünf Minuten mit $600 \times g$ in einem 50 ml Falcon abzentrifugiert, das Pellet in HBSS Puffer resuspendiert und eine Zellzahl von $10^6 \text{ Zellen} \times \text{ml}^{-1}$ eingestellt. Der CTG-Farbstoff wurde mit einer Konzentration von $0,5 \mu\text{l} \times \text{ml}^{-1}$ Zellsuspension hinzugefügt und die Zellen anschließend für 45 Minuten in einem $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Wasserbad inkubiert. Um das überschüssige CTG abzuwaschen wurde das Falcon auf 50 ml mit HBSS aufgefüllt und die Zellen erneut für fünf Minuten mit $600 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in Bindungspuffer, bestehend aus HBSS + 2 mM CaCO_3 und 2 mM MgCl_2 , zur Aktivierung der Monozyten resuspendiert. Zweiwertige Kationen sind essentiell für die funktionale Ausbildung der Zell-Zell-Kontakten über Integrine (Frenette and Wagner 1996). Eine Zellzahl von $10^5 \times \text{ml}^{-1}$ wurde eingestellt und die Zellen für 15 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Das Stimulationsmedium wurden von den Endothelzellen aspiriert, die Zellen zweimal mit $1 \text{ ml } 37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen PBS gewaschen und $500 \mu\text{l}$ Bindungspuffer/Well vorgelegt. Die 12-Well-Platte wurde auf einem Orbitalschüttler, mit einer Geschwindigkeit von $20 \text{ Umdrehungen} \times \text{min}^{-1}$, fixiert und in jedes Well zentral 1 ml der gefärbten Monozytenzellsuspension pipettiert. Die Adhäsion erfolgte für 30 Minuten bei RT auf dem Orbitalschüttler. Nach der Inkubation wurde jedes Well fünfmal mit 2 ml Bindungspuffer gewaschen, um alle nicht adhärenzten Monozyten abzuwaschen. Nach dem fünften Waschschritt wurden die EC und die Monozyten mit Trypsin/EDTA Lösung abgelöst und die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt. Die FACS-Röhrchen wurden für fünf Minuten bei $600 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in $300 \mu\text{l}$ FACFlow™ resuspendiert und analysiert.

Auswertung

Die Quantifizierung der Adhäsions-Assays erfolgte mit dem Durchflusszytometer, um eine experimentatorunabhängige Auswertung zu gewährleisten. Die physikalische Grundlage der Durchflusszytometrie beruht auf der Detektion von Fluorophoren, die entweder an spezifische Antikörper gekoppelt sind oder, wie der Farbstoff CTG, direkt von Zellen aufgenommen werden können. Zusätzlich zu der Detektion des emittierten Fluoreszenzsignals kann das Durchflusszytometer aufgrund der Streuung und

Beugung des Laserstrahls Rückschlüsse auf die Größe (forward scatter, FSC) und Granularität (side scatter, SSC) der detektierten Zellen ziehen (Abb.7). Jede detektierte Zelle wird hierbei als „Event“ bezeichnet.

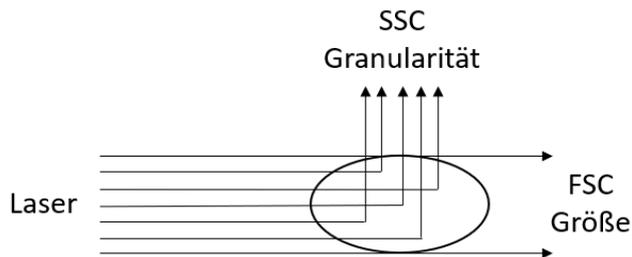


Abbildung 7: Strahlengang des Lasers der auf ein Event trifft

Die Streuung und Beugung des Laserstrahls ermöglicht eine Charakterisierung der Zellmorphologie. Granularität (SSC) führt zu einer Beugung, Größe (FSC) zu einem „Schatten“.

Gating-Strategie

Die EC und Monozyten stellen sich im Density-Plot als zwei Zellpopulationen, die sich in ihrer Größe und Granularität unterscheiden lassen, dar. Im ersten Gate (Abb.8, A) wurden die intakten Zellen beider Populationen anhand ihres FSC und SSC von Zelltrümmern separiert (P1). Um auszuschließen, dass Zellen, die sich trotz Trypsinierung nicht vollständig voneinander gelöst hatten, fälschlicherweise als ein Event detektiert werden, wurde mit dem zweiten Gate (Abb.8, B) alle noch zusammenhängenden Zellen (Dubletten) exkludiert (P2). Letztlich wurde der prozentuale Anteil der CTG (PE)-positiven Zellen (P3) an der Gesamtpopulation P2 bestimmt (Abb.8, C). Die Voltage-Einstellungen des Durchflusszytometers, die entsprechenden Schwellenwerte der Fluoreszenzintensitäten sowie die Hintergrundfluoreszenz der Zellpopulationen zum Erstellen der Gating-Strategie wurden zuvor mit Negativ- beziehungsweise Positivkontrollen ermittelt.

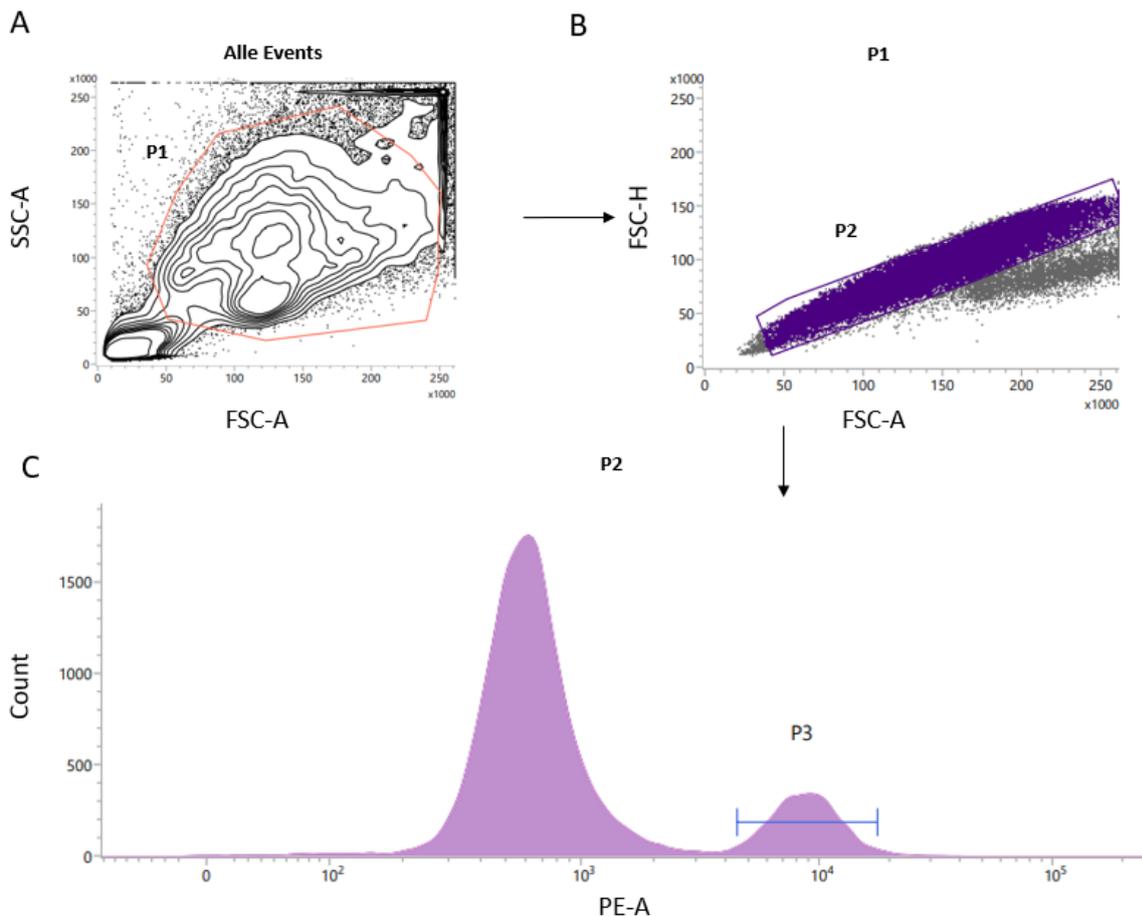


Abbildung 8: Gating-Strategie für die Auswertung der Adhäsions-Assays

(A) FSC und SSC dargestellt als Density-Plot zeigt das Vorhandensein von 2 Zellpopulationen mit unterschiedlicher Größe und Granularität. Dies stellen die Endothelzellen und Monozyten dar (P1). (B) Ausschluss von Dubletten aus P1 (P2). (C) Die einzelnen Zellen aus P2 wurden anhand ihrer CTG (PE) Intensität in einem Histogramm dargestellt. Die CTG positiven Zellen (Monozyten) bilden die von den ungefärbten Endothelzellen getrennte Population P3.

3.1.8 Transmigrations-Assay mit Endothelzellen und Monozyten

In den Transmigrations-Assays wurde der Einfluss des w6/32-Antikörpers und der HO-1-Modulation auf die Rate der transmigrierenden THP-1 Zellen über den endothelialen Monolayer hinweg untersucht. Die Transmigrations-Assays wurden zunächst mit HUVEC in einem Transwell-Ansatz durchgeführt, aber im Laufe dieser Dissertation durch das xCELLigence-System ersetzt. Grund hierfür war die experimentatorunabhängige, quantitative Auswertung der Transmigration durch die gemessene elektrische Impedanz des xCELLigence-Systems.

3.1.8.1 Transmigration humaner Zellen im Transwell-System

Das Transwell-System besteht aus einer 24-Well-Platten mit Einsätzen, deren Boden aus einem Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 8 μm besteht. In jedes Well wurde 750 μl Kulturmedium vorgelegt, die Transwell-Einsätze eingesetzt und auf dem Filter 10⁵ HUVEC ausgesät (Abb.9). Die EC wurden mit 250 μl Kulturmedium überdeckt und für 24 Stunden inkubiert, bis sie einen konfluenten Monolayer gebildet hatten. Eine freie Diffusion gelöster Stoffe ist nur über den endothelialen

Monolayer möglich. Sobald der Monolayer vollständig ausgebildet war, erfolgte die Stimulation mit dem w6/32-Antikörper beziehungsweise der Isotypkontrolle oder den HO-1-Modulatoren.

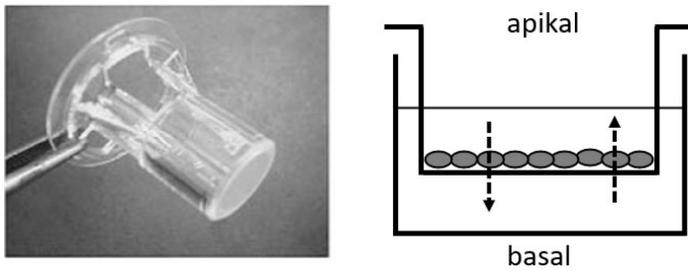


Abbildung 9: Aufbau des Transwell-Systems

Links: Transwell-Einsatz mit Filter, rechts: Schematische Abbildung eines Monolayers. Jeder Einsatz wird in das Well einer 24-Well-Platte gesetzt, sodass sich der Filter, auf dem sich die EC festgesetzt haben, beidseitig von Medium umgeben ist.

Für die spätere fluoreszenzmikroskopische Auswertung der transmigrierten THP-1 wurden diese mit CTG im Transmigrationsmedium eingefärbt (Abschnitt 3.1.6) und anschließend eine Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ THP-1 $\times \text{ml}^{-1}$ eingestellt.

Versuchsaufbau

Auf die Unterseite des Filters wurden 50 μl Matrigel (Proteingemisch, das eine basalmembranartige Matrix bildet) aufgetragen, damit die transmigrierten THP-1 an der Unterseite der Membran hängen bleiben. Hierfür wurde das Matrigel bei 4 °C verflüssigt und auf die Filter aufgetragen. Matrigel bildet bei 37 °C ein gallertartiges Hydrogel und härtet im Inkubator innerhalb von zwei Minuten aus.

Für die Transmigration wurden 600 μl Transmigrationsmedium, supplementiert mit 20 ng/ml humanem MCP-1, in das untere Kompartiment vorgelegt und die Einsätze mit dem Matrigel in die Wells gesetzt. In das obere Kompartiment wurden 100 μl der THP-1 Zellsuspension pipettiert und die Transwellplatte für vier Stunden in den Inkubator gestellt. In diesem Zeitraum transmigrierten die Monozyten. Die Transmigration wurde abgestoppt, indem das Medium aus dem oberen Kompartiment vorsichtig aspiriert und die Filter mit einem Skalpell ausgeschnitten wurden. Die Filter wurden auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem Tropfen Fluoreszenz Mounting Medium beträufelt und unter einem Deckglas eingedeckt.

Auswertung

Die Quantifizierung der transmigrierten THP-1 erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung. Für jeden Filter wurde die Anzahl der THP-1, die sich auf dessen Unterseite befanden, in 15 zufällig ausgewählten Sichtfeldern gezählt und daraus der Mittelwert für einen einzelnen Filter errechnet.

3.1.8.2 Transmigration humaner und muriner Zellen im xCELLigence-System

Bei diesem Ansatz erfolgte die Kultivierung des endothelialen Monolayer auf den Filtern einer CIM-Platte. Eine CIM-Platte besteht aus zwei Kompartimenten, die durch eine PET-Membran mit einer Porengröße von 8 µm getrennt sind (Abb.10). Im Unterschied zum Transwell-Ansatz erfolgte die Auswertung nicht fluoreszenzmikroskopisch, sondern über die Ermittlung der elektrischen Impedanz. An der Unterseite der PET-Membranen ist eine Goldelektrode angebracht, die den Stromfluss misst. Hierbei besteht eine positive Korrelation zwischen der gemessenen Impedanz und der Anzahl der Monozyten, die durch den Filter transmigrieren und an der Goldelektrode anhaften.

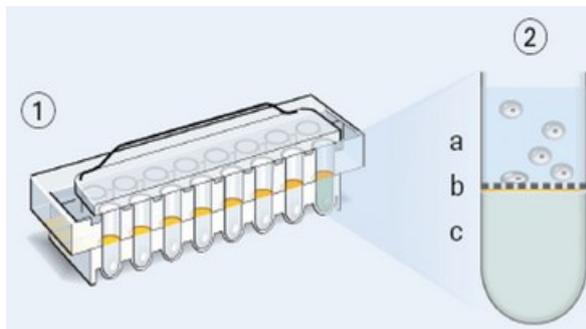


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des xCELLigence-System von OMNI Life Science

1: CIM-Platte, 2: Einzelnes Well einer CIM-Platte. a) oberes Kompartiment mit Zellen, b) Membran mit Goldelektrode an der Unterseite, c) unteres Kompartiment.

In das untere Kompartiment wurden 160 µl Kulturmedium vorgelegt und im obere Kompartiment 4×10^3 HCAEC beziehungsweise 5×10^3 Balb/c Endothelzellen in 150 µl des entsprechenden Kulturmediums ausgesät. Nach einer 24-stündigen Kultivierungszeit war der endotheliale Monolayer vollständig ausgebildet und es erfolgte die Stimulation mit den Antikörpern beziehungsweise den Isotypkontrollen im Starvationmedium.

Die Knockdown-Versuche mit der HO-1-si-RNA hatten ergeben, dass die HO-1-Proteinexpression 36 bis 48 Stunden nach der Transfektion am niedrigsten ist. Daher wurden die transfizierten HCAEC nach dem Knockdown auf die Transwell-Einsätze ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. In diesem Zeitraum bildet sich ein konfluenter Monolayer und es erfolgte die Stimulation mit dem w6/32-Antikörper beziehungsweise der Isotypkontrolle.

Für das CD62E-blockierende-Assay wurden die w6/32-stimulierten HCAEC konkordant zu dem Adhäsions-Assay eine Stunde vor der Transmigration mit 5 µg/ml des mouse anti-human CD62E-Antikörpers im Starvationmedium inkubiert.

Versuchsaufbau

Für das Transmigrations-Assay wurde das Medium aus dem unteren Kompartiment aspiriert und durch 160 µl Transmigrationsmedium, supplementiert mit 20 ng/ml humanem beziehungsweise murinem

MCP-1, ersetzt. Die Monozyten wurden aus der Erhaltungskultur entnommen und eine Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen $\times \text{ml}^{-1}$ im Transmigrationsmedium eingestellt. In den oberen Kompartimenten wurde das Medium ebenfalls aspiriert und durch $100 \mu\text{l}$ der Zellsuspension ersetzt. Die CIM-Platte wurde in das xCELLigence-System im Inkubator gesetzt und für vier Stunden die Impedanzmessung gestartet.

Auswertung

Zur Quantifizierung der transmigrierten Monozyten wurde die Fläche unter der Kurve (area under the curve (AUC)) der Impedanzmessungen berechnet (Abb.11) und statistisch ausgewertet. Das xCELLigence System misst alle 15 Minuten die Impedanz an der Goldelektrode, die sich an der Unterseite der Membran befindet. Jede Zelle, die an die Goldelektrode gebunden hat, unterbricht partiell den Stromfluss der Goldelektrode und erhöht damit die Impedanz, die in den dimensionslose Zellindex (Cell Index, CI) umgerechnet wird.

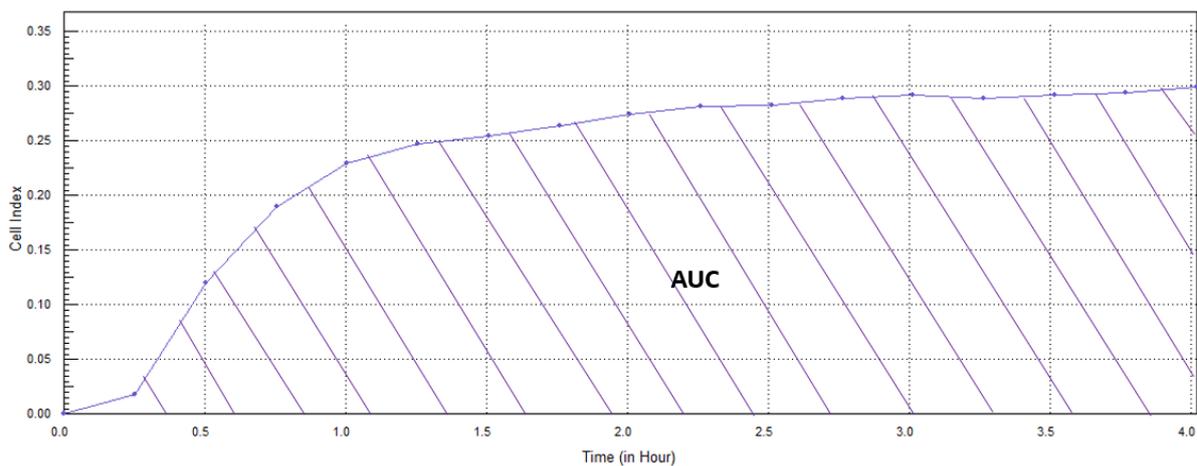


Abbildung 11: Schematische Darstellung der AUC einer Impedanzmessung

In einem Zeitraum von 4 h wird alle 15 min die Impedanz an der Goldelektrode gemessen und als dimensionsloser Zellindex (Cell Index, CI) dargestellt. Durch das Berechnen der AUC - im Gegensatz zum absoluten CI - nach 4 h kann eine real-time Messung durchgeführt werden.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Genexpressionsanalyse durch qRT-PCR

Der Einfluss des w6/32-Antikörpers und die HO-1-Modulation auf die Genexpression verschiedener Adhäsions- und Transmigrationsrezeptoren in HCAEC konnte mit qRT-PCR-Analysen quantifiziert werden. Des Weiteren wurde auch die Effizienz des si-RNA-induzierten HO-1-Knockdowns mit dieser Technik überprüft.

Probengenerierung

5×10^4 HCAEC wurden in einer 12-Well-Platte im Kulturmedium ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Danach erfolgte die Stimulation mit den HO-1-Modulatoren oder mit dem w6/32-Antikörper beziehungsweise der Isotypkontrolle (Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4).

Das Transkriptom der HCAEC wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der w6/32-Stimulation beziehungsweise nach erfolgter si-RNA-Transfektion (Abschnitt 3.1.5) isoliert.

RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Die Isolation und Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem Qiagen RNeasy MicroKit nach Herstellerprotokoll. Das Stimulationsmedium wurde aus den Wells aspiriert, die Endothelzellen mit 1 ml PBS gewaschen und die Zellyse durch die Zugabe von 350 μ l RLT Puffer induziert. Das gesamte Lysat wurde auf eine QIAshredder Säule pipettiert und für zwei Minuten bei 8.000 x g zentrifugiert. Das homogenisierte Lysat wurde anschließend auf eine gDNA-Eliminations-Säule pipettiert und für 30 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert, die Säule verworfen und die 350 μ l Eluat 1:2 v/v mit EtOH durch mehrfaches Pipettieren vermischt. Das Eluat/EtOH-Gemisch wurde auf eine RNeasy Säule pipettiert, für 15 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Bei diesem Schritt band die RNA an der Säulenmatrix. Als Waschschrift wurden 700 μ l RW1 Puffer auf die Säule pipettiert, für 15 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Als zweiter Waschschrift wurden 500 μ l RPE Puffer auf die Säule pipettiert, für zwei Minuten bei 8.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die Säule vollständig zu trocknen, wurde diese auf ein leeres 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gesetzt und für eine Minute bei 15.000 x g zentrifugiert. Zum Eluieren der RNA wurden 15 μ l RNase-freies Wasser mittig auf die Membran pipettiert und die Säule für eine Minute bei 8.000 x g zentrifugiert. In dem aufgefangenen Eluat befand sich die RNA, deren Quantität und Qualität mit dem NanoDrop 2000c Spektralphotometer bestimmt wurde. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Die aus den HCAEC isolierte einzelsträngige RNA wurde durch eine reverse Transkription (RT) in doppelsträngige cDNA (copy DNA) umgeschrieben. Dies erfolgte mit dem QuantiTect Rev. Transcription Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll. Für jeden Ansatz wurden 500 ng RNA eingesetzt und zunächst mit folgenden Komponenten eine gDNA (genomische DNA)-Eliminations-Reaktion durchgeführt:

Tabelle 2: Komponenten und Volumina der gDNA-Eliminations-Reaktion

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
gDNA Whipeout Puffer, 7x	2 µl	1x
RNA	variabel (500 ng)	-
RNase-freies H ₂ O	variabel	-
Endvolumen	14 µl	-

Die Proben wurden im Mastercycler® nexus X2 für zwei Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Zu jedem Ansatz wurde ein, auf Eis vorbereiteter, RT-Mastermix hinzugefügt, der aus folgenden Komponenten bestand.

Tabelle 3: Komponenten und Volumina des RT-Mastermix

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
Reverse Transkriptase	1 µl	-
RT-Puffer, 5x	4 µl	1x
RT Primer-Mix	1 µl	-
gDNA Eliminations-Reaktion	14 µl	-
Endvolumen	20 µl	-

Es folgte eine Inkubation der Proben im Mastercycler® nexus X2 für 15 Minuten bei 42 °C, gefolgt von drei Minuten bei 92 °C zur Inaktivierung der reversen Transkriptase. Der RT Primer-Mix bestand aus Oligo(dT)-Primern, einzelsträngige Oligonukleotide der Nukleobase Thymin. Diese Oligo(dT)-Primer binden den poly(A)-Schwanz der mRNA und gewährleisten somit, dass nur die mRNA des Transkriptoms in cDNA transkribiert wird. Die synthetisierte cDNA wurde im Anschluss in die qPCR Reaktion eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

qPCR

Das Verfahren der quantitativen PCR (qPCR) ermöglicht es, die Amplifikation spezifischer cDNA-Abschnitte in Echtzeit zu messen und dadurch Rückschlüsse auf deren Ausgangskonzentration zu ziehen. Jede qPCR-Reaktion beinhaltete ein TaqMan® Genexpressions-Assay von Thermo Fisher, das spezifisch für ein Zielgen war (Abschnitt 2.8).

Die TaqMan® Sonden bestehen aus einer Oligonukleotid-Sequenz mit einem kovalent an das 5' Ende gebundenen Fluorophor und einem Quencher am 3'-Ende. Die Oligonukleotid-Sequenz ist spezifisch für das Zielgen und bindet die TaqMan® Sonde an dieses. Das Fluorophor wird durch den Laser des PCR-Cyclers angeregt und das emittierte Licht durch den Quencher auf Grundlage des *Förster Resonance Energy Transfers (FRET)* unterdrückt.

Die Taq-Polymerase ist eine thermostabile, DNA-abhängige-DNA-Polymerase und synthetisiert an jeden cDNA Strang einen komplementären DNA-Strang. Aufgrund ihrer zusätzlichen Exonuklease-Funktion baut die Taq-Polymerase während der Synthese die TaqMan® Sonde ab, die an das Zielgen gebunden ist. Dadurch kommt es zu einer räumlichen Trennung von Fluorophor und Quencher der abgebauten TaqMan® Sonde und das vom Fluorophor emittierte Licht wird nicht länger unterdrückt. Die Messung des emittierten Lichtes erfolgt vom PCR-Cycler nach jedem Zyklus.

Die qPCR Reaktionen wurden mit dem StepOnePlus™ System im Fast 40-Zyklen Modus durchgeführt. Jeder Ansatz wurde als Duplikat pipettiert, um den Einfluss von Pipettierungenauigkeiten auf die Expressionsquantifizierung der Zielgene auszuschließen.

Tabelle 4: Komponenten und Volumina eines qPCR Ansatzes

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
TaqMan® Fast Advanced Master Mix, 2x	10 µl	1x
TaqMan® Genexpressions-Assay, 20x	1 µl	1x
Nuclease-freies H ₂ O	8 µl	-
cDNA	1 µl	
Endvolumen	19 µl	-

Ein Zyklus umfasste zwei Minuten bei 50 °C für die Aktivierung der Uracil-N Glykollyase, gefolgt von 20 Sekunden bei 95 C, um die Taq-DNA-Polymerase zu aktivieren und die cDNA Doppelstränge zu denaturieren. Das Primer Annealing und die Elongation erfolgten für 20 Sekunden bei 60 °C.

Auswertung

Die relative Genexpression wird mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode quantifiziert. Hierbei gibt der CT-Wert eines qPCR Ansatzes die Zyklusanzahl wieder, nach welcher der entsprechende Ansatz ein konstantes, zuvor definiertes Fluoreszenzniveau erreicht hat. Das definierte Fluoreszenzniveau ist für alle qPCR-Ansätze einer Analyse gleich.

Um die durch Matrixeffekte verursachte Varianz der Expressionsergebnisse reduzieren zu können, wird die Expression des Zielgenes in jedem Ansatz auf die Expression eines ubiquitär konstant exprimierten Referenzgens (Housekeeping Gen) in dem gleichen Ansatz normalisiert. In den hier durchgeführten qRT-PCR-Analysen wurde GAPDH als Housekeeping Gen verwendet. Die Differenz der CT-Werte des Housekeeping Gens und des Zielgens bildet den ΔCT -Wert. GAPDH wurde als Housekeeping Gen ausgewählt, da nicht davon auszugehen ist, dass die Stimulation mit dem w6/32-Antikörper oder die Modulation der HO-1-Aktivität einen Einfluss auf dessen Expressionsniveau hat.

Die Differenz zwischen dem ΔCT -Wert der experimentell-behandelten Probe und dem ΔCT -Wert einer Kontrolle ergibt den $\Delta\Delta CT$ -Wert. Für die Berechnung der relativen Genexpression der experimentell-behandelten Probe zur Kontrolle wird der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Wert bestimmt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass es nach jedem qPCR-Zyklus zu einer exponentiellen Zunahme der DNA-Konzentration kommt.

3.2.2 Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot

Für die Quantifizierung unterschiedlicher Proteinexpressionen in HCAEC, verursacht durch die w6/32-Stimulation und die HO-1-Modulation, wurde ein elektrophoretisches Trennverfahren mit nachfolgendem Western Blot angewendet.

Probengenerierung

In den qRT-PCR-Analysen der verschiedenen Adhäsions- und Transmigrationsrezeptoren auf der Oberfläche der HCAEC hatte sich die mRNA-Expression von CD62E als sensitiv gegenüber einer Stimulation mit dem w6/32-Antikörper gezeigt. Mit einer Proteinexpressionsanalyse wurde untersucht, ob sich die gesteigerte CD62E-mRNA-Expression auch in einer gesteigerten CD62E-Proteinkonzentration niederschlägt. Hierfür wurden 10^5 HCAEC/Well in 6-Wells kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, für 24 Stunden mit dem w6/32-Antikörper beziehungsweise der Isotypkontrolle im Starvation-medium stimuliert und anschließend das Proteom extrahiert.

Für die HO-1-si-RNA-Transfektion zeigten die qRT-PCR-Analysen bereits nach 24 Stunden eine deutliche Reduktion der HO-1-mRNA-Expression. Um festzustellen, ob dies einen Einfluss auf die HO-1-Proteinkonzentration in den Zellen hat, erfolgte eine HO-1-Proteinexpressionsanalyse. Hierzu wurde 24, 36 und 48 Stunden nach dem si-RNA-induzierten HO-1-Knockdown (Abschnitt 3.1.5) ebenfalls das Proteom der HCAEC isoliert.

Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Für die Proteinextraktion wurde eine cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail-Tablette in 7 ml RIPA Lyse- und Extraktionspuffer gelöst und bei 4 °C gelagert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach den Stimulationen der HCAEC oder dem si-RNA-Knockdown wurde das Medium vorsichtig von den EC aspiriert, 70 µl RIPA Puffer auf die Zellen pipettiert und diese für zwei Minuten auf Eis lysiert. Anschließend erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung der Zelllysate.

Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Ein Mischen der Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 50:1 ergab das Arbeitsreagenz. Mit der BSA-Stocklösung und dem RIPA-Puffer wurde eine Standardreihe mit Konzentrationen von 25 µg/ml – 2.000 µg/ml hergestellt. Von jedem Standard und jeder Probe wurden 25 µl in eine 96-Well-Platte in Duplikaten pipettiert. In jedes Well wurden 200 µl des Arbeitsreagenz hinzugefügt und die Platte für 30 Sekunden auf einen Schüttler gestellt, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten. Nach einer anschließenden Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wurde die Absorption der einzelnen Standards und Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm mit einem Spektralphotometer gemessen. Die unbekannt Proteinkonzentrationen der Proben konnten mithilfe der bekannten Proteinkonzentrationen der Standardreihe berechnet werden.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Als elektrophoretisches Trennverfahren wurde eine SDS-PAGE mit einem 10 %-igem Trenngel durchgeführt. Für jede Probe wurde eine Proteinmenge von 10 µg in einem Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit 6 µl Probenpuffer (5x) vermischt, sodass der Probenpuffer zum Schluss in einfacher Endkonzentration vorlag. Anschließend erfolgte eine Denaturierung der Proben für zehn Minuten bei 65 °C, diese wurden dann für eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert und auf Eis zwischengelagert. In die erste Tasche des Gels wurden 5 µl des Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards pipettiert, gefolgt von den einzelnen Proben in den restlichen Taschen.

Mit einer Spannung von 30 V wurde für 30 Minuten ein Sammeln der Proteine induziert. Sobald die einzelnen farbigen Banden des Markers zu erkennen waren, erfolgte eine Erhöhung der Spannung auf 170 V, bis die Laufbande das untere Ende des Gels erreicht hatten.

Western Blot

Der Transferpuffer wurde bei 4 °C gekühlt und die Filterpapiere sowie die Immobilon® PVDF Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde für 20 Sekunden in MeOH, gefolgt von einer Minute in ddH₂O, aktiviert und anschließend in Transferpuffer gelegt.

Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer ausgebaut, auf die aktivierte PVDF Membran gelegt und beides blasenfrei zwischen drei Filterpapieren in die Blottingkammer geklemmt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für eine Stunde bei 110 mA und 4 °C. Durch das Anlegen der

elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Anode und bleiben dabei auf der PVDF Membran hängen.

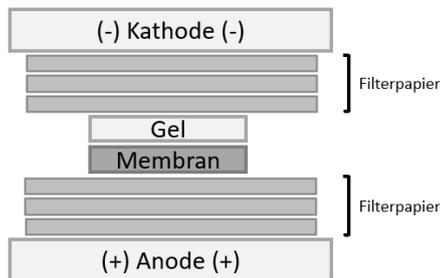


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Western Blots

Aufgrund der elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Anode und bleiben dabei auf der PVDF Membran hängen.

Nach dem Blotten erfolgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C in einem Blockingpuffer aus TBS-T und 5 % BSA, um die unspezifischen Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nach dem Blocken wurde die Membran dreimal für fünf Minuten in TBS-T bei RT gewaschen und mit dem jeweiligen primären Antikörper für das Zielprotein beziehungsweise für die Ladekontrolle, gemäß Tabelle 5, inkubiert. Die Menge des zu analysierenden Proteins wurde relativ zu einer Ladekontrolle ausgedrückt, um den Einfluss einer unterschiedlichen aufgetragenen Proteinmenge auszugleichen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet, da dessen Proteinexpression nicht von der w6/32-Stimulation oder dem si-RNA-induzierten Knockdown beeinflusst wird.

Tabelle 5: Im Western Blot verwendete Antikörper mit Verdünnung und Inkubationszeit

Antikörper	Verdünnung	Verwendung	Inkubation
Rabbit anti-human HO-1	1:1000	primär	1h, RT
Rabbit anti-human CD62E	1:1000	primär	1h, RT
Rabbit anti-human β -Actin	1:5000	primär	1h, RT
Goat anti-rabbit HRP konj.	1:10.000	sekundär	1h, RT

Die in Blockingpuffer verdünnten Antikörper wurden auf die Membran aufgetragen und für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit je fünf Minuten in TBS-T und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Tab.5) für eine Stunde bei RT. Es folgten drei weitere Waschschriffe für fünf Minuten mit TBS-T.

Auswertung und relative Quantifizierung

Die Detektion des HRP-konjugierten sekundären Antikörpers erfolgte mit dem SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrat. Die Peroxid Lösung wurde mit der Luminol/Enhancer Lösung 1:2 v/v gemischt und 1 ml dieser Detektionslösung für drei Minuten auf der Membran inkubiert. Nach dem Entfernen überschüssige Detektionslösung konnte das Signal mit dem FUSION FX Spectra Chemiluminescence Imaging System detektiert werden. Die Quantifizierung des Signals erfolgte mit ImageJ. Hierzu wurde die Bilddatei des Western Blots in ImageJ geöffnet und um jede Bande ein Rechteck gezogen. Die ausgewählten Banden wurden in einen Profil-Plot konvertiert, der die relative Dichte der einzelnen Banden, dargestellt als Peaks, angibt. Höhere Peaks repräsentieren hierbei dunklere Banden und breitere Peaks spiegeln die Breite der Banden wider (Abb.13). Nach Bestimmung des Hintergrundes für jeden Peak, konnte die Fläche der Peaks kalkuliert und auf die Peakfläche der Ladekontrolle in der gleichen Bahn normalisiert werden. Somit konnten die relativen Proteinintensitäten der Zielproteine in unterschiedlichen Bahnen untereinander in Relation gesetzt werden.

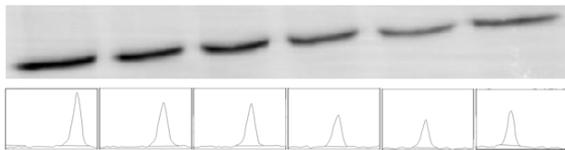


Abbildung 13: Darstellung von Proteinbanden und des korrespondierende Profilplots
Die Intensität und die Größe der Bande korrelieren mit der Höhe und der Breite des dazugehörigen Peaks.

3.2.3. CD62E-Expressionsanalyse mittels durchflusszytometrischer Verfahren

Mit dem Western Blot der Proteine konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation der HCAEC mit dem w6/32-Antikörper eine gesteigerten CD62E-Proteinexpression induziert. Um festzustellen, ob die Antikörperstimulation und die Modulation der HO-1-Aktivität auch zu einer gesteigerten CD62E-Expression auf der Oberfläche der HCAEC führen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der CD62E-Oberflächenexpression durchgeführt.

Probengenerierung

5×10^4 HCAEC wurden in 12-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Danach erfolgte die Inkubation mit den HO-1-Modulatoren und die Stimulation mit dem w6/32-Antikörper beziehungsweise der Isotypkontrolle, im Starvationmedium (Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4).

Färbeprotokoll

Nach der Stimulation wurde das Medium aspiriert und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen aus den Wells zu lösen, wurden sie für fünf Minuten mit 500 μ l Accutase-Lösung inkubiert, die Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 μ l des mouse anti-human CD62E-Antikörpers, der mit dem Fluorophor Phycoerythrin (PE) gekoppelt war, für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen der Zellen wurde jedem FACS-Röhrchen 2 ml CellWash hinzugefügt und für fünf Minuten bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 300 μ l FACFlow™ resuspendiert und die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

Gating-Strategie

Abbildung 14 stellt die angewendete Gating-Strategie dar. Im FSC und SSC konnten zunächst alle intakten HCAEC von im Ursprung des Koordinatensystems sichtbaren Zelltrümmern getrennt werden (P1) (Abb.14, A). Mit dem zweiten Gate (P2) wurden alle Dubletten exkludiert (Abb.14, B). Dies verhinderte, dass zwei Zellen die noch über Zell-Zell-Kontakte adhärerten, fälschlicher Weise als singuläres Event detektiert werden. Von allen in P2 inkludierte Zellen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity, MFI) des PE-Farbstoffes in einem Histogramm dargestellt (Abb.14, C). Abhängig von ihrer CD62E-Expression auf der Oberfläche binden HCAEC unterschiedlich viele anti-CD62E-Antikörper und unterscheiden sich in ihrer Fluoreszenzemission.

Die Spannungseinstellungen des Durchflusszytometers, die entsprechenden Schwellenwerte der Fluoreszenzintensitäten sowie die Hintergrundfluoreszenz der Zellpopulation zum Erstellen der Gating-Strategie wurden mit Negativ- beziehungsweise Positivkontrollen ermittelt. Als Negativkontrolle dienten ungefärbte HCAEC und als Positivkontrolle gefärbte HCAEC nach einer 24-stündigen Stimulation mit TNF- α .

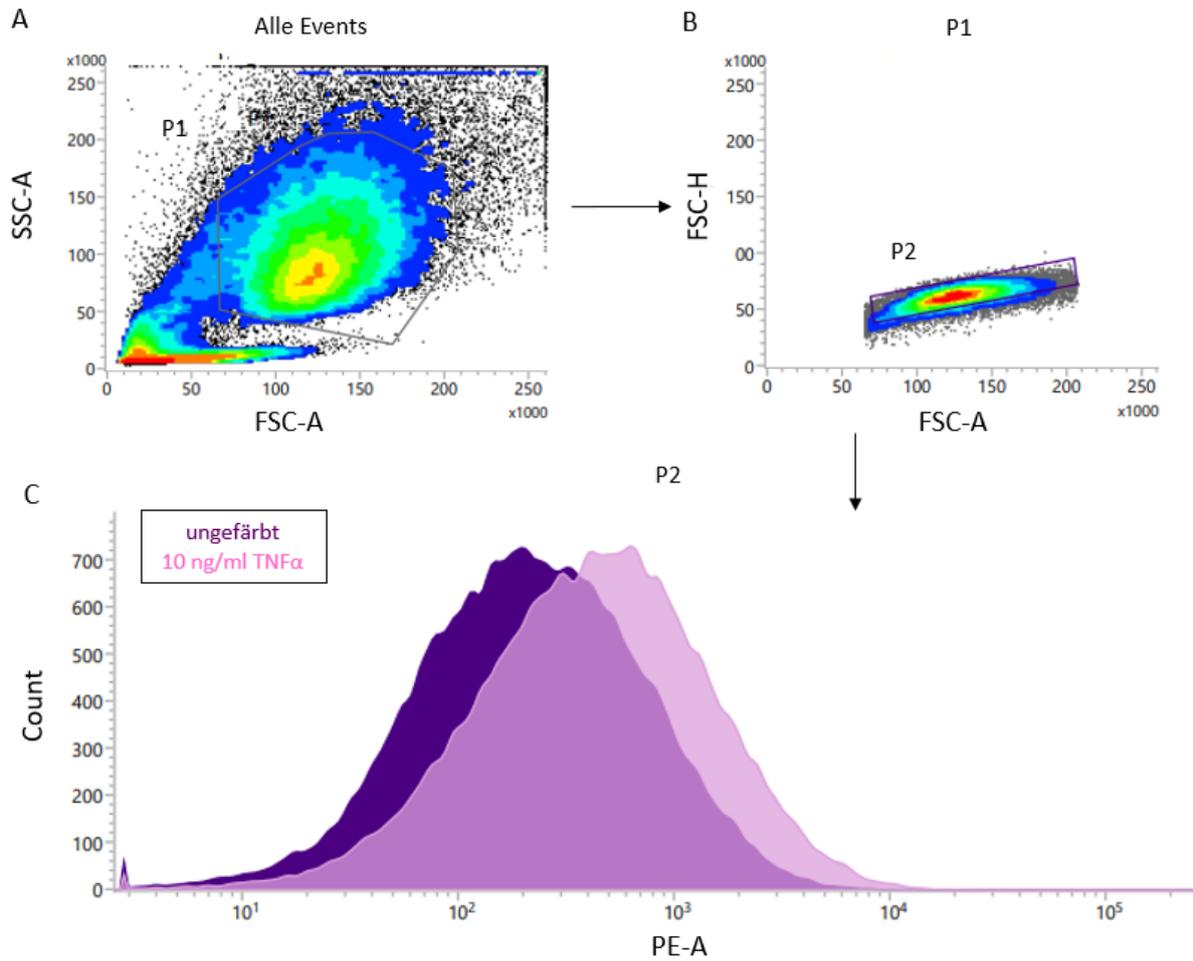


Abbildung 14: Gating-Strategie zur Quantifizierung der CD62E-Oberflächenexpression

(A) Darstellung der HCAEC anhand ihrer Größe (FSC (Vorwärtsstreuung)) und Granularität (SSC (Seitwärtsstreuung)). (B) Ausschluss von Dubletten. (C) Overlay; Histogramm der durchschnittlichen PE-Fluoreszenz einzelner HCAEC aus P2.

3.3 Tierexperimentelle Methoden

3.3.1 Zucht und Haltung der Versuchstiere

Aufzucht und Haltung aller verwendeter Mauslinien erfolgte innerhalb der interfakultären biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg streng nach den aktuellen Richtlinien der Gesellschaft für Versuchstierkunde/ *Society of Laboratory Animal Science* (GV-SOLAS). Die Zucht erfolgte exklusiv im Barrierebereich der Unit 6, Haltung und Durchführung der Experimente im klinisch experimentellen Bereich (KEB) der IBF. Beide Einrichtungen haben einen „spezifische Pathogene freien“ (SPF) Status und standardisierte Umweltbedingungen. Dies bedeutete eine kontinuierliche Hygieneüberwachung der Tiere, 50 - 60 % Luftfeuchtigkeit, 12-stündiger hell-dunkel Zyklus und eine Raumtemperatur von $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Es wurden Käfige des Typus II und II L mit ABBEDD LT-E-001 Einstreu und Haltungsanreicherungen verwendet. Futter (Altromin Rod 16 oder Rod 18) sowie Wasser wurden den Tieren *ad libitum* angeboten.

B6.129S7-Rag2^{tm1Mom}/J (B6.RAG2 KO)

Zwei Zuchtpaare der Linie B6.129S7-Rag2^{tm1Mom}/J (B6.RAG2 KO) (im folgenden Rag2-KO) wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Fleming gestellt.

Bei dieser Mauslinie führte die Insertion einer Neomycin-Resistenzkassette zu einer Depletion von Exon 3, welches das einzige codierende Exon des Rekombinase-aktivierenden-Gens (Recombinase activating gene, Rag)2 darstellt (Shinkai, Rathbun et al. 1992). Eine homozygote Rag2-Knockout (KO)-Mutation verhindert die Produktion reifer B- und T-Zellen, was bei Mäusen, die diese KO-Mutation tragen, eine B- und T-Zell Defizienz zur Folge hat.

Die Zuchttiere wurden in regelmäßigen Abständen durch Tansnetyx® Inc. genotypisiert, um den homozygoten KO-Status nachweisen zu können. Die dafür notwendigen Bioproben wurden durch Ohrbiopsien im Rahmen der routinemäßigen Markierung der Mäuse gewonnen. Die Kolonie der Rag2-KO Mäuse wurde durch Zuchttrios (ein Männchen und zwei Weibchen) aufrechterhalten. Nach Feststellung einer Fertilisation eines Weibchens, wurde dieses Tier separiert, um die zulässige Besatzungsdichte der Käfige in Folge einer Geburt nicht zu überschreiten. Die Jungtiere verblieben bis zum Alter von zwei Wochen bei den Muttertieren und nach einer Markierung am Ohr in Dreiergruppen in eigene Käfige gesetzt. Im Alter von fünf bis sechs Wochen wurden die Männchen aus der Unit 6 ins KEB transferiert und die Weibchen, sofern sie nicht für die Zucht eingesetzt wurden, abgetötet.

Balb/c

Die Balb/c Mäuse wurden käuflich bei Janvier Labs erworben und direkt ins KEB geliefert. Die Haltung der Tiere erfolgte bis zu ihrer Verwendung unter den gleichen standardisierten Bedingungen wie die der Rag2-KO Mäuse.

Für das heterotope Aorten-Transplantationsmodell wurden, sowohl von den Rag2-KO als auch den Balb/c-Mäusen, nur Männchen verwendet.

3.3.2 Etablierung des allogenen Aorten-Transplantationsmodells

Das Modell einer chronischen Abstoßungsreaktion im Rahmen einer aortalen Transplantation in Mäusen ist ursprünglich von *Koulack et al* entwickelt worden (Koulack, McAlister et al. 1995). Für die vorliegende Arbeit wurde diese Model adaptiert und modifiziert.

Genetische Grundlage

Balb/c Mäuse exprimieren den MHC-I-Haplotyp H-2K^d und fungierten als Spender eines Segmentes der thorakalen Aorta. Rag2-KO Mäuse exprimieren den MHC-I-Haplotyp H-2K^b und dienten als Empfänger des explantierten Aortensegmentes. Aufgrund der unterschiedlichen Allelexpression (H2-K^d vs. H2-K^b) stellen die hier verwendeten Mäuse ein „MHC-Mismatch“ Modell dar. Da Rag2-KO Mäuse keine funktionalen B- und T-Zellen bilden können, kommt es trotz der genetischen Unterschiede zwischen Spender und Empfänger zu keiner spontanen Abstoßungsreaktion des Transplantats. Die TV wurde in den Rag2-KO Mäusen nach erfolgreicher Transplantation experimentell durch die Applikation des anti-H2-K^d-Antikörpers (Biolegend; Klon: SF1-1.1, Isotyp: IgG2a) induziert.

Entnahme des Transplantats

Die für den Versuch verwendete Balb/c Mäuse befanden sich in einem Alter von acht bis zehn Wochen und für die Entnahme der thorakalen Aorta mit CO₂ euthanasiert. Nach einer medianen Thorako-Laparotomie (Eröffnung des Bauchraums und des Brustkorbs) erfolgte eine Inzision der Leber. Der linke Ventrikel des Herzens wurde punktiert und das Tier mit 2 ml NaCl perfundiert, bis die Blutgefäße blutleer waren. Anschließend wurde die *Aorta descendens* bis zum Durchtritt durch das *Diaphragma* (Zwerchfell) von Binde- und Fettgewebe freipräpariert (Abb.15). Nach dem Durchtrennen der dorsal (zum Rücken hin) abgehenden interkostalen Arterien wurde die thorakale Aorta entnommen. Hierzu erfolgte das Absetzen der *Aorta descendens* sowohl direkt distal (von der Körpermitte weg) zum Aortenbogen als auch am *Hiatus aorticus* (der Durchtritt der *Aorta descendens* durch das *Diaphragma*). Die Aorta wurde nach Möglichkeit in mehrere Segmente unterteilt, um die Anzahl der benötigten Spendermäuse so gering wie möglich zu halten.

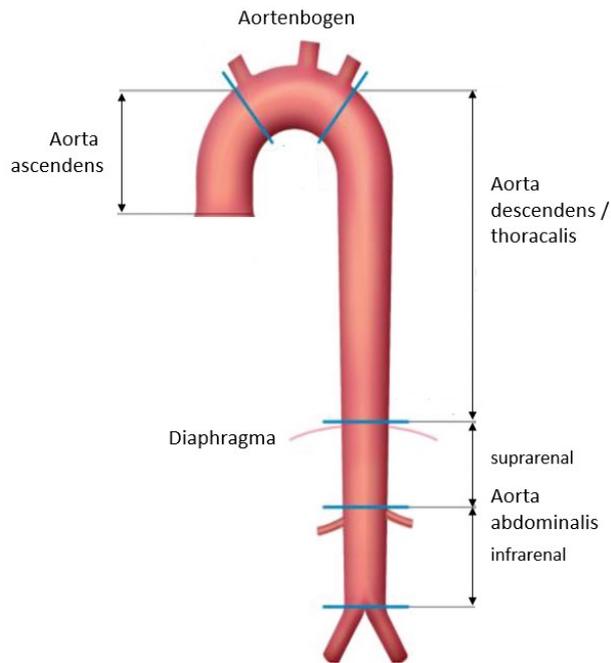


Abbildung 15 Schematische Darstellung der anatomischen Abschnitte der murinen Aorta.

Aorta bis Diaphragma überproportional, Aorta abdominalis verkürzt dargestellt. Modifiziert nach (Briston and Daniels 2019).

Anästhesie und Analgesie der Rag2-KO Mäuse

Die Rag2-KO Mäuse wurden in einem Alter von acht bis zehn Wochen für die Transplantation verwendet. Die Operation erfolgte in Rückenlage und unter Inhalationsanästhesie. Die komplette Operation wurde unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt. Zum Einleiten der Anästhesie wurden die Mäuse in eine Plastikkammer gesetzt und diese mit $600 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ Sauerstoff und 5 Vol. % Isofluran kontinuierlich geflutet. Sobald die Mäuse einen ausreichend tiefen Anästhesiestatus erreicht hatten, wurden diese auf einer $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Heizplatte mit Klebestreifen an den Pfoten vorsichtig fixiert. Die Augen wurden mit Bepanthenalbe gegen Austrocknung geschützt. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde durch Maskenbeatmung mit einer Sauerstoffflussrate von $400 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ und 1,5 – 2,5 Vol. % Isofluran gewährleistet. Die Analgesie wurde durch die intraperitoneale (i.p.) Applikation von $0,05 \text{ mg/kg}$ Körpergewicht (KG) Buprenorphin zu Beginn der Anästhesie initiiert. Tabelle 6 listet die verwendeten Anästhesie- und Analgesieverfahren für das Transplantationsmodell inklusive Organentnahme nach Beendigung des Experiments auf.

Tabelle 6: Angewendete Anästhesie- und Analgesieverfahren

Eingriffe	Wirkstoff	Dosis	Applikationsart
Euthanasie Spendertier	CO ₂	letal	Inhalation
Aortentransplantation via Laparotomie	Sauerstoff/ Isofluran	<u>Einleitung:</u> 5 Vol. % in 100 % O ₂ <u>Erhaltung:</u> 1.5-2.5 Vol. % in 100 % O ₂	Inhalation
	Buprenorphin	0,05 mg/kg KG	i.p., unmittelbar vor Operationsbeginn
	Buprenorphin	0,05 mg/kg KG	i.p., unmittelbar nach Beendigung der Ope- ration dann alle 6 h (für 48 h)
Transplantat- und finale Blutentnahme	Ketamin/Xylazin	120 mg/kg KG Keta- min + 16 mg/kg KG Xylazin auf 10ml ver- dünnen; Dosis: 10 ml/kg KG	i.p.

Ablauf der Operation

Der Bauch der Rag2-KO Mäuse wurde sorgfältig rasiert und großflächig desinfiziert, das Abdomen durch eine mediane Laparotomie eröffnet und die Blase gegebenenfalls mit einer 1 ml Spritze und einer 27G Kanüle entleert. Der Wundspritzer wurde an beiden Seiten der Bauchdecke angesetzt und die Eröffnung vorsichtig erweitert. Anschließend wurde der Darm mobilisiert und mit zwei sterilen Applikatoren nach außen verlagert. Um ein Austrocknen während der Narkose zu verhindern, wurde der Darm in Kompressen gewickelt und regelmäßig mit NaCl hydriert. Die *Aorta abdominalis* wurde frei präpariert und von der *Vena cava inferior* getrennt; etwaige abgehende Arterien wurden ligiert und durchtrennt. Danach wurden zwei Gefäßklemmen infrarenal (unterhalb der Nierenarterien) an der *Aorta abdominalis* angebracht, um den Blutfluss zu unterbrechen. Zwischen den beiden Klemmen wurde die Aorta mit einem sauberen Schnitt durchtrennt (Abb.16) und die Stümpfe mit NaCl ausgespült, um Blutfreiheit sicherzustellen. Ein passendes Segment der Spenderaorta wurde anschließend in End-zu-End Technik in die durchtrennte *Aorta abdominalis* integriert. Dafür wurde eine Anastomose (Verbindung zwischen zwei Blutgefäßen) proximal (zur Körpermitte hin) und eine Anastomose distal mit Prolen 11-0 Fäden in Einzelknopfnähten gesetzt. Es folgte die Eröffnung der Aortenklammer unter Entlüftung und Wiederherstellung der Blutzirkulation. Die mediane Laparotomie wurde zweimal (Peritoneum und Haut) mit Prolen 6-0 Fäden verschlossen, wobei der Verschluss des Peritoneums mit einer durchgehenden Naht und der Verschluss der Haut mit Einzelknopfnähten erfolgte. Vor Schluss des Situs wurde zur Flüssigkeitssubstitution 0,5 ml NaCl appliziert und erneut 0,05 mg/kg KG Buprenorphin verabreicht.

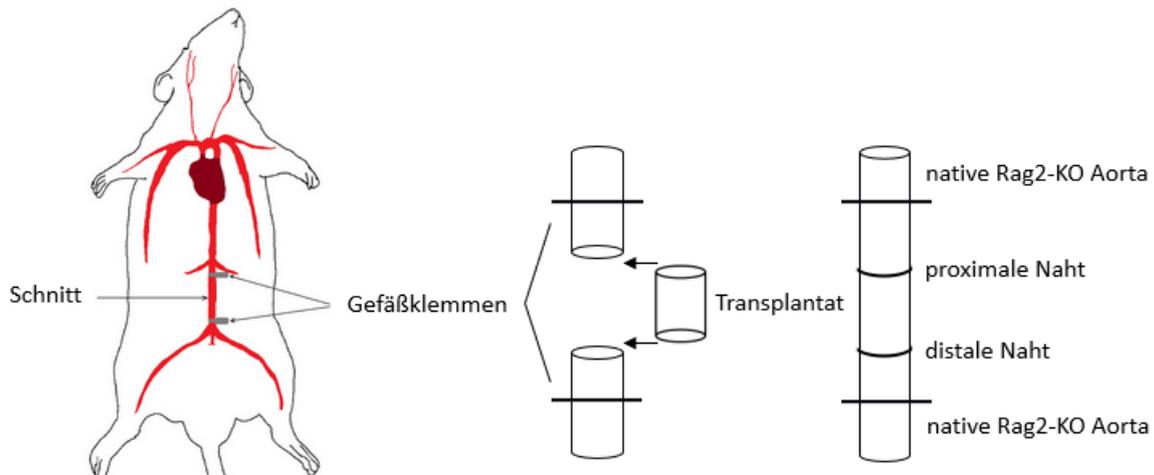


Abbildung 16: Positionsbeschreibung der Implantation des Aortensegmentes

A. *abdominalis* der Rag2-KO Maus wurde infrarenal geklemmt und durchtrennt. In anschließender End-zu-End Technik wurde das Transplantat, das zuvor einer Balb/c Maus entnommen worden war, mit der nativen Aorta der Rag2-KO Maus vernäht.

Postoperative Behandlung

Während der Aufwachphase wurden die Rag2-KO Mäuse in einen Käfig auf eine Heizplatte gesetzt und für die ersten vier Stunden postoperativ mit Rotlicht bestrahlt. Hierbei zeigte sich bereits früh, ob der Schwanz und die Hinterläufe bewegt werden konnten, oder ob in Folge der Operation und der Ischämiezeit des Rückenmarks und der hinteren Extremitäten eine Paraplegie aufgetreten war. Die Schmerzmedikation mit Buprenorphin wurde für die ersten 48 Stunden nach der Operation alle sechs Stunden aufrechterhalten.

Während der Implantation des Aortensegmentes kommt es zu einer starken Manipulation des Darms und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dadurch vereinzelte Bakterien aus dem Darm austreten und die Mäuse aufgrund ihrer genetischen Immunsuppression eine Peritonitis entwickeln. Daher bekamen die Mäuse an den ersten drei postoperativen Tagen prophylaktisch 0,3 ml/kg KG des Antibiotikums Baytril. Dies führte zu einer engmaschigen Überwachung der Tiere für die ersten drei postoperativen Tage. Das Entwickeln einer Paraplegie oder eine anhaltenden Schmerzsymptomatik (Verhaltensauffälligkeiten, äußerlichen Belastungsmerkmale) der Tiere über den dritten postoperativen Tag hinaus, führte zum Abbruch des Versuchs.

Versuchsende und Organentnahme

An Tag 30 nach der Transplantation wurden die Mäuse in tiefe Ketamin/Xylazin Narkose (Tab.6) versetzt. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgte eine mediane Thorako-Laparotomie, der linke Herzventrikel wurde mit einer 24G Kanüle punktiert und Blut mit einer 1 ml Spritze entnommen. Hierbei verstarben die Tiere. Um eine Koagulation des Blutes zu verhindern wurde das Innere der Spritze mit 0,5 M EDTA Lösung benetzt. Das Blut wurde bei 2.500 x g für zehn Minuten abzentrifugiert und das daraus gewonnene Plasma bei -80 °C gelagert. Nach der Blutentnahme erfolgte eine erneute

Herzpunktion und eine Perfusion der Tiere mittels 0,9 %-iger NaCl-Lösung. Anschließend wurde der Darm vorsichtig mobilisiert und das neu gebildete Binde- sowie Fettgewebe von der *V. cava inferior* und der *A. abdominalis* entfernt. Das Transplantat der Balb/c Maus wurde chirurgisch freipräpariert und ungefähr 5 mm unterhalb der distalen Naht sowie direkt oberhalb der proximalen Naht abgesetzt. Das Transplantat wurde entnommen, in ein Cryomold Schälchen gelegt und mit O.C.T.TM (Optimal Cutting Temperatur) Einbettmedium bedeckt. Somit wurde nicht nur das Transplantat, sondern auch ein Stück der nativen Rag2-KO Aorta explantiert (Abb.16). Alle Proben lagerten bis zur weiteren immunhistologischen Verarbeitung bei -80 °C.

3.3.3 Versuchsaufbau

3.3.3.1 Versuchsteil 1 - Experimentelle Induktion der Transplantatvaskulopathie

Die experimentelle Induktion der Transplantatvaskulopathie begann drei Tage nach erfolgreicher Transplantation eines Segmentes der thorakalen Aorta einer Balb/c Maus in die *Aorta abdominalis* einer Rag2-KO Maus. Abbildung 17 zeigt den schematischen Ablauf der experimentellen Induktion der Transplantatvaskulopathie. Den Mäusen wurden wöchentlich 1,5 µg/g KG des anti-H2-K^d-Antikörpers (Klon: SF1-1.1) i.p. appliziert (Gruppe II, Tab.7). Die Mäuse in der Kontrollgruppe bekamen statt des Antikörpers 1,5 µg/g KG der Isotypkontrolle (Klon: MOPC-173) ebenfalls durch i.p. Injektion appliziert (Gruppe I, Tab.7). Das hierbei angewendete Behandlungsschema und die Antikörperkonzentrationen wurden von einem bereits publizierten Mausmodell einer chronischen Abstoßungsreaktion adaptiert (Valenzuela, Hong et al. 2013).

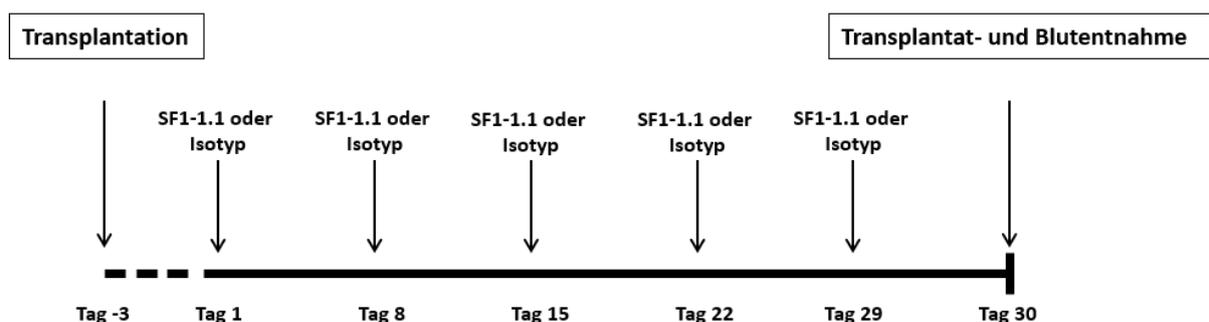


Abbildung 17: Schematischer Versuchsaufbau zur Induktion der TV

3 Tage nach erfolgreicher Transplantation eines Segmentes der thorakalen Aorta beginnt der Versuch. Den Tieren wurde wöchentlich der SF1-1.1-Antikörper zur Induktion der TV oder die Isotypkontrolle appliziert. Nach 30 Tagen endet der Versuch mit Transplantat- und Blutentnahme.

Die Rag2-KO Mäuse wurden jede Woche vor der Antikörperapplikation gewogen, um die Konzentrationen der Reagenzien an die Gewichtszunahme anpassen zu können. Des Weiteren diente die Gewichtskontrolle dem Monitoring des Gesundheitszustandes der Tiere.

3.3.3.2 Versuchsteil 2 - Einfluss der HO-1-Modulation auf die Transplantatvaskulopathie

Effekte des HO-1 Aktivators CoPPIX

Der Experimentalaufbau der Induktion der Transplantatvaskulopathie wurde erweitert, um den Einfluss der HO-1-Aktivität auf die pathophysiologische Ausbildung der TV zu untersuchen. Abbildung 18 zeigt den schematischen Aufbau des Versuches. Zusätzlich zu der wöchentlichen Applikation des SF1-1.1-Antikörpers wurde den Mäusen einmal pro Woche 5 µg/g KG Cobalt (III) Protoporphyrin IX (CoPPIX) (Gruppe III, Tab.7) über eine i.p. Injektion appliziert. Das CoPPIX Pulver wurde in H₂O (pH-Wert = 9,5) gelöst und eine Stocklösung von 25 mg/ml hergestellt. Um ein praktikables Injektionsvolumen zu erreichen, wurde das benötigte Volumen der Stocklösung in 100 µl des entsprechenden Solvens gelöst.

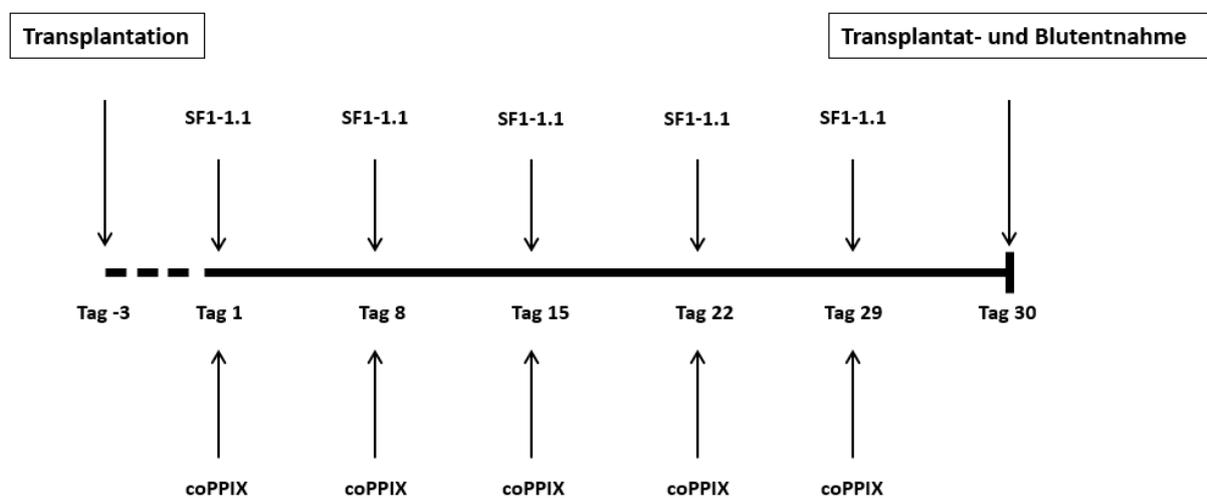


Abbildung 18: Schematisches Applikationsschema zur Testung des Einflusses von CoPPIX auf die Entstehung und Ausbildung der Transplantatvaskulopathie. Zusätzlich zu der SF1-1.1-Antikörperapplikation wurde den Mäusen 1 x in der Woche 5 µg/g KG des HO-1 Aktivators CoPPIX i.p. gespritzt.

Statine als mögliche therapeutische Intervention der Transplantatvaskulopathie

Um die Wirkung einer kontinuierlichen Gabe von Statinen auf die pathophysiologische Entwicklung der TV zu untersuchen, bekamen die Rag2-KO Mäusen nach der Transplantation über den kompletten Zeitraum von 30 Tagen täglich 40 µg/g KG Statine über das Trinkwasser zugeführt (Gruppe IV, Tab.7). Die Konzentration des Statins stammt aus vorherigen Tierversuchen der Arbeitsgruppe, bei denen für die verwendete Konzentration Effekte nachgewiesen werden konnten.

Es wurde eine Pravastatin-Stocklösung mit einer Konzentration von 8 mg/ml hergestellt (Abschnitt 3.1.4). Eine Maus nimmt ungefähr 6 ml Wasser am Tag auf, daher wurden die Trinkflaschen mit 0,1 ml der Statin-Stocklösung pro 6 ml Wasser aufgefüllt, um die anvisierte Dosis von 40 µg/g KG zu erreichen. Abbildung 19 zeigt den schematischen Ablauf der Statin-Applikation im Rahmen des Versuches.

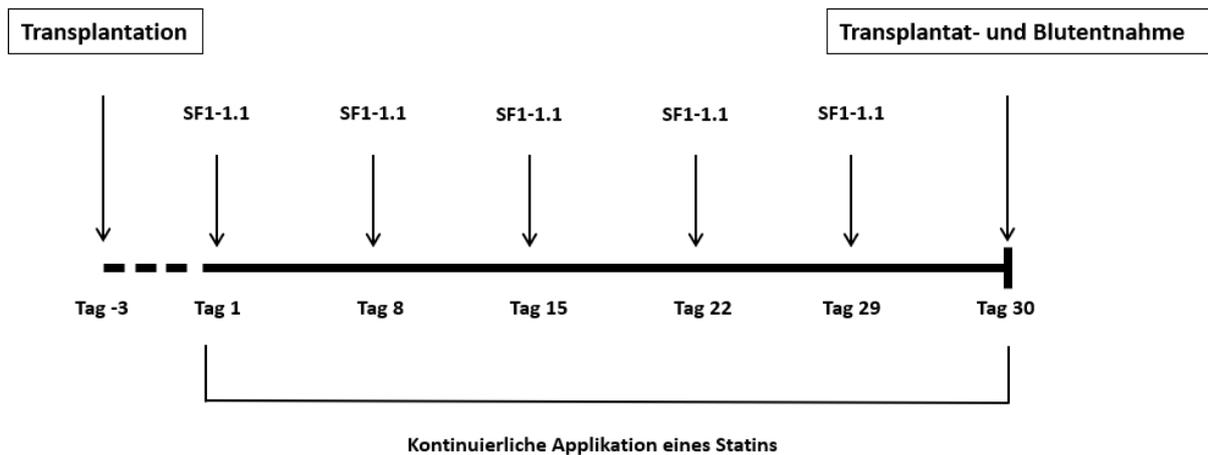


Abbildung 19: Schematisches Applikationsschema zur Testung des Einflusses von Statinen als mögliche therapeutische Intervention der Transplantatvaskulopathie. Zusätzlich zu der wöchentlichen SF1-1.1-Antikörperapplikation wurden den Mäusen täglich 40 µg/g KG Statin über das Trinkwasser verabreicht.

Einfluss des HO-1 Metaboliten Kohlenstoffmonoxid auf die Transplantatvaskulopathie

Der HO-1 Metabolit Kohlenstoffmonoxid (CO) vermittelt teilweise die antiinflammatorischen Eigenschaften der HO-1 (Otterbein, Bach et al. 2000). Um den Einfluss von CO auf die Ausprägung der TV zu quantifizieren, wurde den Rag2-KO Mäusen in einer weiteren Versuchsgruppe das CO-freisetzende Molekül (CO-Releasing Molecule, CORM)-401 über eine Schlundsonde verabreicht (Gruppe V, Tab.7). Hierfür wurde eine Stocklösung von 10 mg/ml CORM-401 in DMSO hergestellt. Da die Stocklösung an Luft instabil ist, musste diese in einer Inert-Kammer unter N₂-Atmosphäre hergestellt werden. Die Applikation erfolgte dreimal pro Woche mit einer Konzentration von 30 µg/g KG (Adach and Olas 2019). In hohen Konzentrationen und über längere Zeiträume verabreicht, vermittelt DMSO zytotoxische Eigenschaften, wohingegen geringere Konzentrationen antiinflammatorische Effekte haben (de Abreu Costa, Henrique Fernandes Ottoni et al. 2017). Um auszuschließen, dass das Lösungsmittel DMSO und nicht das freigesetzte CO Auswirkungen auf die Entstehung einer TV hat, wurde einer entsprechende Kontrollgruppe eine inaktivierte Form (iCORM) verabreicht (Gruppe VI, Tab.7). Für die Inaktivierung wurde eine Stocklösung von 10 mg/ml CORM-401 in DMSO hergestellt und über Nacht bei 60 °C inkubiert, um eine vollständige CO-Liberation zu gewährleisten. Applikationsschema und Konzentration waren kongruent zur CORM-401 Gruppe. Abbildung 20 zeigt das schematische Applikationsschema zur Testung des Einflusses von CORM-401 auf die Entstehung und Ausbildung der TV.

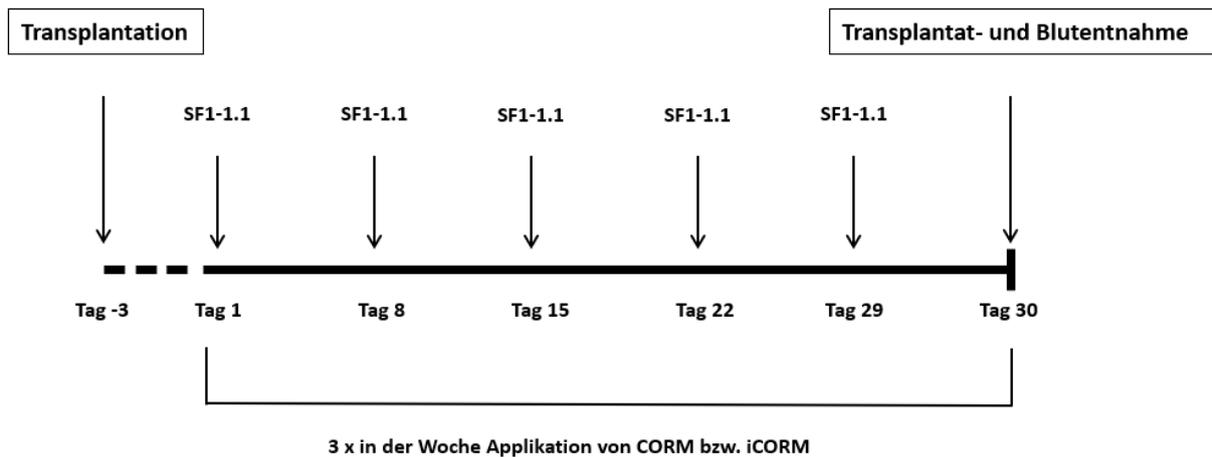


Abbildung 20: Schematisches Applikationsschema zur Testung des Einflusses von CORM-401 auf die Entstehung und Ausbildung der Transplantatvaskulopathie. Zusätzlich zu der wöchentlichen SF1-1.1-Antikörperapplikation wird den Mäusen 3 x in der Woche 30 µg/g KG CORM-401 bzw. iCORM-401 über eine Schlundsonde appliziert.

3.3.3.3 Versuchsteil 3 – CD62E-Blockade zur Reduktion des monozytären Infiltrats

In den *in vitro* Versuchen zeigte sich, dass es durch die Stimulation der EC mit dem w6/32-Antikörper zu einer verstärkten Expression des Adhäsionsrezeptors CD62E kommt. Dies spiegelte sich auch in einer signifikant höheren Oberflächenexpression des Proteins wider. Um festzustellen, inwieweit die CD62E-vermittelte Adhäsion von Monozyten an EC einen Beitrag zu der Formierung eines monozytären Infiltrats *in vivo* leistet, wurden die Mäuse in diesem Versuchsteil (Versuchsteil 3) zusätzlich zu der Applikation des SF1-1.1-Antikörpers zweimal die Woche mit dem CD62E-blockierenden Antikörper (Klon: RME-1) behandelt (Gruppe VII, Tab.7) (Abb.21).

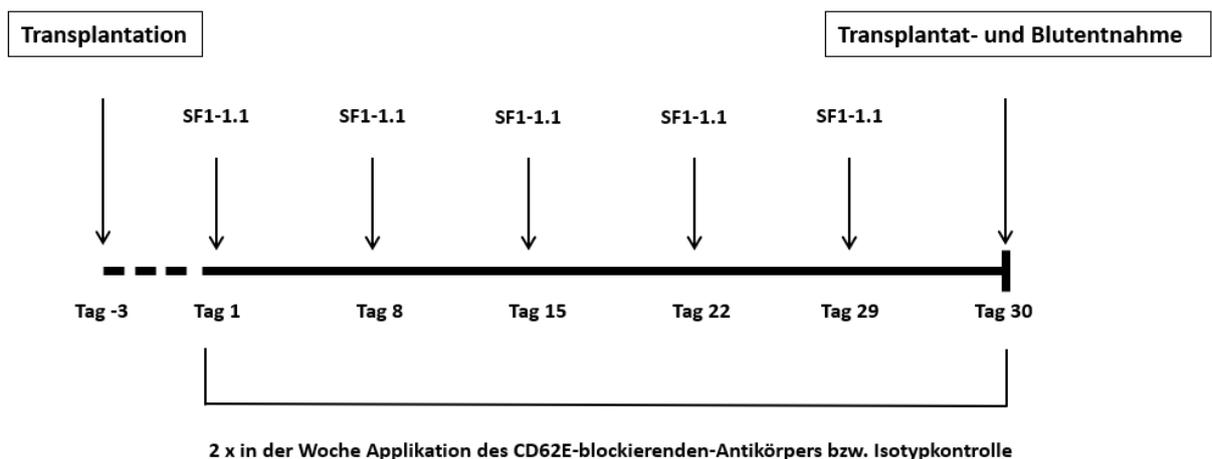


Abbildung 21: Schematisches Applikationsschema zur Testung einer CD62E-Blockade auf die Entstehung der Transplantatvaskulopathie. Die Transplantatvaskulopathie wurde durch die wöchentliche Applikation des SF1-1.1-Antikörper induziert. Zusätzlich dazu wurde den Mäusen 2 x in der Woche 3,5 µg/g KG des CD62E-blockierenden Antikörpers bzw. die Isotypkontrolle appliziert.

Den Mäusen wurde 3,5 µg/g KG des Antikörpers (Valenzuela, Hong et al. 2013) beziehungsweise der entsprechenden Isotypkontrolle (Klon: MG1-45) (Gruppe VIII, Tab.7) i.p. appliziert.

Tabelle 7 gibt eine Übersicht über alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchsgruppen. Dargestellt sind die Induktion der TV durch den SF1-1.1-Antikörper sowie die zusätzlichen applizierten Reagenzien. Diese fungierten entweder als Aktivator (CoPPIX) der HO-1-Aktivität oder als eine mögliche therapeutische Intervention der TV (Statin).

In den Gruppen V und VI wurde untersucht, ob der HO-1 Metabolit CO zu einer Verminderung der Transplantatvaskulopathie führt. Gruppe VI ist in diesem Fall die Kontrollgruppe zu Gruppe V. Die Intervention in den Gruppen VII und VIII hat keinen direkten Einfluss auf die Aktivität oder auf das Expressionsniveau der HO-1.

Tabelle 7: Übersicht über alle in diesem Experiment durchgeführten Versuchsgruppen

Versuchs- teil	Gruppe	TV Induktion	HO-1-Modulator bzw. Metabolit		HO-1-Aktivität / Schweregrad der TV
1	I	Isotyp	-		= / 0
	II	SF1-1.1	-		= / ↑
2	III		CoPPIX		↑ / ↓
	IV		Statin		↑ / ↓
	V		CORM		↑ / ↓
	VI		iCORM		= / ↑
3	VII		CD62E-blockierender- Antikörper		-
	VIII		CD62E-Isotypkontrolle		-

3.3.4 Histologische Aufarbeitung des Gewebes

3.3.4.1 Herstellung von Gefrier-Schnittpräparaten

Der Querschnitt des explantierten Transplantats wurde durch transversale Gefrierschnitte am Kryotom bei -24 °C dargestellt. Hierfür wurden serielle Schnitte mit einer Stärke von 5 µm/Schnitt angefertigt. Startpunkt der Schnitte war die Einzelknopfnah der proximalen Anastomose und es wurden alle Schnitte bis zum Erreichen der distalen Anastomose abgenommen. Um durch die verschiedenen Färbungen eine gute Übersicht über das gesamte Transplantat zu erhalten, erfolgte die Anfertigung von Serien bestehend aus jeweils 15 Objektträgern (OT) mit je vier Schnitten. Hierzu wurden die ersten 15 Schnitte auf 15 verschiedene OT aufgetragen, wobei der 16. Schnitt wieder auf den ersten OT aufgetragen wurde und somit der zweite Schnitt auf dem ersten OT war. Die Schnitte auf einem OT repräsentierten damit einen Abstand von 75 µm im Transplantat. Das bedeutet, dass durch das Färben eines einzelnen OT alle 75 µm des Transplantats die gleiche Färbung angefertigt wird. Eine Serie, bestehend aus 15 OT mit jeweils vier Schnitten, deckt somit 300 µm des gesamten Transplantats ab. Ein Transplantat wurde in drei bis fünf OT-Serien geschnitten und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Um einen Vergleich der transplantierten Aortensegmenten aus Balb/c Mäusen mit der nativen Aorta der Rag2-KO Mäuse anstellen zu können, wurde auch der explantierte Teil dieser Aorta mit dem Kryotom geschnitten und immunhistologisch aufgearbeitet.

3.3.4.2 Berechnung des Neointimal-Indexes

Eine Zielgröße der pathophysiologischen Veränderung, die im Zuge einer sich entwickelnden TV entsteht, ist die Quantifizierung des Neointima-Indexes (NI-Index) (Armstrong, Strauch et al. 1997). Der NI-Index wird durch folgende Formel berechnet:

$$NI = \frac{\text{Intimafläche}}{\text{Lumenfläche} + \text{Intimafläche}} \times 100$$

Um den Bereich der Intima von der Media unterscheiden zu können, wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde jeweils der erste OT einer Serie verwendet. Die OT wurden für 20 Minuten bei RT vollständig an der Luft getrocknet, bevor sie für fünf Minuten in eine Kernfärbungslösung mit Häma-laun nach Meyer inkubiert wurden.

Die Bindung des Häma-laun erfolgt an allen basophilen Strukturen der Zellen in einem stark sauren Milieu. Die typische Blaufärbung entsteht nach einer Erhöhung des pH-Wertes auf > 3. Dafür wurden die OT nach der Inkubation für fünf Minuten unter lauwarmes, fließendes Leitungswasser gehalten. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung für vier Minuten in 0,1 %-iger Eosin-Lösung. Eosin ist ein

Farbstoff, der alle eosinophilen Strukturen, wie das Zytoplasma und Proteine, rot beziehungsweise rötlich färbt.

Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die OT entwässert. Hierzu wurden die OT kurz in 70 %-igen Alkohol gehängt, bevor sie zweimal für jeweils eine Minute in 96 %-igem Alkohol inkubierten. Anschließend erfolgte eine dreimalige Inkubation in 100 %-igem Alkohol für jeweils zwei Minuten bevor die OT durch zweimal fünf Minuten Inkubation in dem organischen Lösungsmittel Roticlear® in selbiges überführt wurden. Die OT wurden mit Eukitt® Eindeckmedium eingedeckt und für 24 h bei RT getrocknet.

Für die Auswertung wurden die gefärbten Schnitte mit 100-facher Vergrößerung durch das Olympus BX 63 Fluoreszenz-Mikroskop eingescannt. Für die Berechnung des NI-Indexes wurde mit der dazugehörigen CellSens Software sowohl die Fläche, die von der *Membrana elastica interna* (trennt die Intima von der Media) umschlossen wird, als auch die Fläche des Lumens berechnet. Die Fläche der Neointima ergibt sich aus der Differenz der von der *Membrana elastica interna* umschlossenen Fläche und dem Lumen. Es wurde der NI-Index des jeweils ersten und dritten Gewebeschnittes auf jedem gefärbten Objektträger gemessen und somit alle 150 µm des Transplantats der NI-Index kalkuliert. Aus diesen Werten wurde dann der durchschnittliche NI-Index für das jeweilige Transplantat berechnet.

3.3.4.3 Quantifizierung des monozytären Infiltrates

Eine weitere Zielgröße für die Quantifizierung der TV stellt die Größe des monozytären Infiltrates in der Gefäßwand des Transplantats dar. Zur Quantifizierung der Größe der monozytären Infiltrats wurde der jeweils zweite OT jeder Serie mit einem anti-CD68-Antikörper gefärbt. CD68 ist ein Oberflächenprotein, das sowohl von zirkulierenden als auch von gewebsresidenten Makrophagen exprimiert (Wang, Jiang et al. 2017) und daher zur Anfärbung dieser Zellpopulation verwendet wird. Tabelle 8 zeigt die verwendeten Antikörper und deren Inkubationszeiten.

Die zu färbenden OT wurden für 30 Minuten bei RT getrocknet, bevor sie zum Fixieren der Schnitte für zehn Minuten in eiskaltes Aceton gehängt wurden. Anschließend erfolgte wieder eine Trocknungsphase für 20 Minuten bei RT. Die weitere Färbeprozedur erfolgte in einer Feuchtkammer.

Die Schnitte wurden für fünf Minuten mit PBS-T (0,05 %) rehydriert, gefolgt von 30 Minuten Inkubation mit dem M.O.M. Blocking-Reagenz. Der primäre Antikörper wurde mit dem Blocking-Reagenz verdünnt und auf den Gewebeschnitten inkubiert. Am nächsten Tag wurden die OT dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen, um die überschüssige Färbelösung zu entfernen, bevor der sekundäre Antikörper verdünnt und auf die Schnitte pipettiert wurde. Die Inkubationszeit für den sekundären Antikörper betrug zwei Stunden bei RT. Anschließend wurden die Schnitte erneut für fünf Minuten mit PBS gewaschen und eine Färbung der Zellkerne mit DAPI für weitere fünf Minuten durchgeführt. Zum Schluss wurden die OT dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen und kurz in ddH₂O gehängt. Auf jeden Gewebeschnitt wurde ein Tropfen Fluoreszenz Mounting Medium aufgetragen und ein Deckglas

vorsichtig auf den OT gedrückt. Nachdem Trocknen der OT für zwei Stunden bei RT, wurden sie bis zum Einscannen bei 4 °C gelagert.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper der CD68-Färbung

Antikörper	Verdünnung	Inkubation
Rat anti-mouse CD68	1:400	über Nacht, 4 °C
Goat anti-rat AF555	1:100	2h, RT

Für die Quantifizierung des CD68⁺-Zellen wurden die OT bei 100-facher Vergrößerung durch das Olympus BX 63 Fluoreszenz-Mikroskop eingescannt und mit der CellSens Software ausgewertet. Durch die Autofluoreszenz der *Membrana elastica interna* und *externa* konnte auf den Aufnahmen zwischen Media und Neointima unterschieden werden. In beiden anatomischen Strukturen wurden zufällig vier gleichgroße ROIs (Region of Interest) umrandet, die absolute Anzahl der CD68⁺ Zellen innerhalb der ROIs gezählt und normalisiert.

3.3.4.4 Quantifizierung der CD62E-Expression auf Endothelzellen

In den *in vitro* Versuchen hatte sich gezeigt, dass der w6/32-Antikörper sowohl eine gesteigerte CD62E-Expression auf mRNA- als auch auf Proteinebene in HCAEC induziert. Um zu untersuchen, ob der SF1-1.1-Antikörper auch im Mausmodell zu einer gesteigerten CD62E-Expression auf den Endothelzellen führt, erfolgte eine CD62E/Endothel-Doppelfärbung. Als Endothelzellmarker wurde der von-Willebrand-Faktor (vWF) verwendet (Kanaji, Fahs et al. 2012).

Für diese Färbung wurden von jeder Maus der Gruppe I und II (Isotyp und SF1-1.1) je zwei OT und die in Tabelle 9 gelisteten Antikörper verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper der CD62E/Endothel-Färbung

Antikörper	Verdünnung	Inkubation
Rabbit anti-mouse CD62E	1:300	über Nacht, 4 °C
Mouse anti-mouse vWF	1:50	über Nacht, 4 °C
Goat anti-rabbit AF 555	1:200	2h, RT
Goat anti-mouse AF 488	1:100	2h, RT

Nach Lufttrocknung der OT für 30 Minuten bei RT erfolgte anschließend für zehn Minuten die Fixierung in eiskaltem Aceton und erneut eine Trocknung für 20 Minuten. Die OT wurden in eine Feuchtkammer gelegt, um sie gegen das Austrocknen zu schützen und für 5 Minuten mit PBS-T (0,05 %) rehydriert. Die 30-minütige Inkubation in 0,2 % Triton X-100 in PBS permeabilisierte die Zellmembranen und machten die intrazellulären Epitope zugänglicher für den Antikörper. Danach erfolgte das Blocken der

unspezifischen Bindungsstellen mit dem M.O.M Blocking-Reagenz für 30 Minuten. Die primären Antikörper wurden in PBS + 1 % BSA verdünnt und auf den Schnitten inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Gewebeschnitte dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und mit den verdünnten sekundären Antikörpern für zwei Stunden bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden erneut für fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für die Kernfärbung für fünf Minuten mit DAPI inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen für fünf Minuten mit PBS und die OT wurden anschließend kurz in ddH₂O gehängt. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit je einem Tropfen Fluoreszenz Mounting Medium beträufelt und mit einem Deckglas eingedeckt. Nach einer Trocknungsphase von zwei Stunden bei RT wurden die OT bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung bei 4 °C gelagert.

Für die Quantifizierung der CD62E⁺/vWF⁺-Zellen wurden die OT bei 100-facher Vergrößerung durch das Olympus BX 63 Fluoreszenz-Mikroskop eingescannt und anschließend mit der ImageJ Software der prozentuale Anteil der CD62E⁺/vWF⁺-Zellen an der Population der vWF⁺-Zellen berechnet. Hierzu wurden zunächst alle vWF⁺-Zellen mit einem Zellkern bestimmt (vWF und DAPI doppelpositiv) und dann der Anteil der CD62E⁺/vWF⁺-Zellen kalkuliert.

3.3.4.5 Quantifizierung der CD62E-Expression auf glatten Muskelzellen

Der Großteil der Zellen, die die Neointima im Zuge der Entwicklung einer TV bildet, sind glatte Muskelzellen. Vaskuläre glatte Muskelzellen, die sich während einer pathologischen Dedifferenzierung gebildet haben, können mit einem Antikörper gegen die α -Untereinheit des muskulären Aktins (α SMA) visualisiert werden (Yan, Liu et al. 2016).

Um die CD62E-Expression auf der Oberfläche der Zellen in der Neointima des Transplantats zu quantifizieren, erfolgte eine CD62E/ α SMA Doppelfärbung. Für diese Färbung wurden von jeder Maus der Gruppe I und II (Isotyp und SF1-1.1) je zwei OT und die in Tabelle 10 gelisteten Antikörper verwendet. Die OT wurden für 30 Minuten bei RT luftgetrocknet, anschließend für zehn Minuten in eiskaltem Aceton fixiert und für 20 Minuten bei RT getrocknet. Die weitere Färbeprozedur erfolgte in einer Feuchtkammer, um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern. Um diese zu rehydrieren wurden sie für fünf Minuten mit PBS-T (0,05 %) inkubiert und dann für 30 Minuten mit dem M.O.M Blocking-Reagenz, das die unspezifischen Epitope blockiert, inkubiert. Die primären Antikörper wurden in dem Blocking-Reagenz verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die OT dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und die sekundären Antikörper, ebenfalls in Blocking-Reagenz verdünnt, für zwei Stunden bei RT auf den Schnitten inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift für fünf Minuten mit PBS, bevor die Zellkerne der Gewebeschnitte für fünf Minuten mit DAPI gefärbt wurden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils fünf Minuten wurden die OT kurz in ddH₂O getaucht, mit Fluoreszenz Mounting Medium beträufelt und mit

einem Deckglas abgedeckt. Nachdem die OT für zwei Stunden bei RT getrocknet waren, wurden sie bei 4 °C gelagert und anschließend eingescannt.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper der CD62E/ α -SMA-Färbung

Antikörper	Verdünnung	Inkubation
Rabbit anti-mouse CD62E	1:200	über Nacht, 4 °C
Mouse anti-mouse α SMA	1:400	über Nacht, 4 °C
Goat anti-rabbit AF 555	1:200	2h, RT
Goat anti-mouse AF 488	1:100	2h, RT

Für die Quantifizierung der CD62E⁺/ α SMA⁺-Zellen wurden die OT bei 100-facher Vergrößerung durch das Olympus BX 63 Fluoreszenz-Mikroskop eingescannt. Anschließend wurde mit der ImageJ Software der prozentuale Anteil der CD62E⁺/ α SMA⁺-Zellen an der Population der α SMA⁺-Zellen berechnet. Hierzu wurden zunächst alle α -SMA⁺-Zellen mit einem Zellkern bestimmt (α -SMA und DAPI doppeltpositiv) und dann der Anteil der CD62E⁺/ α SMA⁺-Zellen kalkuliert.

3.3.5 Durchflusszytometrischer SF1-1.1-Nachweis

Das Vorhandensein des SF1-1.1-Antikörpers im Blut der Mäuse wurde mittels eines durchflusszytometrischen Ansatzes nachgewiesen. Als zelluläre Grundlage für dieses Assay dienen CD3⁺ Zellen aus der Milz (Splenozyten) von Balb/c Mäusen. Hierfür wurde die Milz entnommen und in einem 50 ml Falcon mit 30 ml eiskaltem PBS, 2 mM EDTA und 0,1 % BSA auf Eis gelagert. Um eine Einzelzell-Suspension herzustellen, wurde die Milz zerkleinert und durch eine Zellsieb mit der Porengröße 70 μ m gedrückt. Anschließend wurde die Suspension für fünf Minuten bei 4 °C und 1.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 6 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und für acht Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Um die Lyse abzustoppen, wurde das Falcon mit 30 ml PBS aufgefüllt, die Suspension erneut zentrifugiert, das Pellet in PBS resuspendiert und eine Zellzahl von 5 x 10⁶ Zellen x ml⁻¹ eingestellt.

Für jeden Messung wurden 0,5 x 10⁶ Zellen in ein FACS Tube transferiert und für zehn Minuten mit 2 μ l TruStain auf Eis inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen auf den Splenozyten zu blockieren. Danach wurden in jedes FACS Tube 25 μ l Plasma einer Maus gegeben und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Da die CD3⁺ Splenozyten aus einer Balb/c Maus stammten, exprimieren sie neben dem Oberflächenmolekül CD3 auch das H2-K^dMHC Molekül, das der SF1-1.1-Antikörper spezifisch bindet.

Nach der Zugabe von 2 ml CellWash wurden die FACS Tubes für fünf Minuten bei 1.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jedem Tube wurden 1 μ l FITC Rat anti-mouse CD3-Antikörper und 1 μ l PE Goat anti-mouse IgG-Antikörper zugegeben, gevortext und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln

inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschgang mit 2 ml CellWash und einer anschließenden Zentrifugation von fünf Minuten bei 1.000 x g. Nachdem der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl FACS-Flow™ resuspendiert wurde, konnte die durchflusszytometrische Messung durchgeführt werden.

Gating-Strategie

Für den qualitativen Nachweis des SF1-1.1-Antikörpers wurde die MFI der CD3⁺ Splenozyten bewertet. Hierzu wurden zunächst die intakten Splenozyten von Zelltrümmern und abgestorbenen Zellen anhand des FSC und SSC separiert (Abb.22, A). CD3⁺ Splenozyten konnten anhand ihrer FITC-Emission im Gate P1 identifiziert werden (Abb.22, B). Für den schlussendlichen SF1-1.1-Nachweis wurde die MFI des PE-Farbstoffes der Zellpopulation in Gate P2 ermittelt (Abb.22, C).

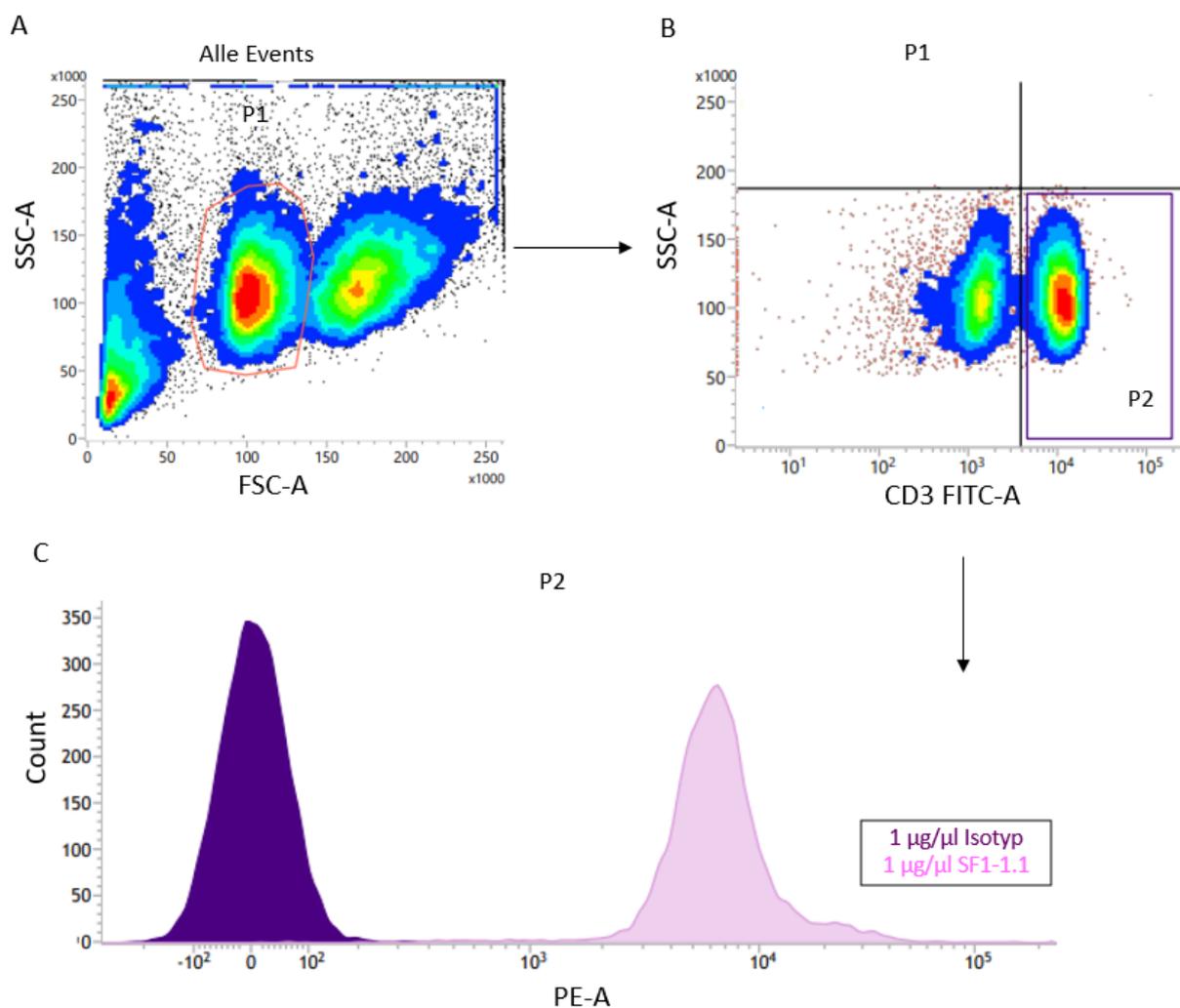


Abbildung 22: Gating-Strategie zum qualitativen Nachweis der SF1-1.1-Antikörper im Plasma

(A) Darstellung der Zellen anhand ihrer Größe (FSC (Vorwärtsstreuung)) und Granularität (SSC (Seitwärtsstreuung)). (B) Identifizierung der FITC gefärbten CD3⁺ Splenozyten (C) Darstellung der Intensität des Fluorochroms PE der CD3⁺ Splenozyten aus Gate 2. Zum Erstellen der Gating-Strategie wurde 1 µl SF1-1.1 (rosa) bzw. 1 µl der Isotypkontrolle (violett) den Splenozyten vor der Färbung hinzugefügt.

Die Spannungseinstellungen des Durchflusszytometer, die entsprechenden Schwellenwerte der Fluoreszenzintensitäten sowie die Hintergrundfluoreszenz der Zellpopulationen zum Erstellen der Gating-Strategie wurden mit Negativ (1 µg/µl Isotyp)- beziehungsweise Positivkontrollen (1µg/µl SF1-1.1) ermittelt.

3.3.6 Ethische Begutachtung des Tierversuches

Zum Erlernen des in der vorgelegten Arbeit angewendeten allogenen Aorten-Transplantationsmodells wurde dem Regierungspräsidium Karlsruhe eine Ausbildungsanzeige vorgelegt und am 12.06.2019 unter dem Aktenzeichen A-9/18 genehmigt.

Für die Durchführung der tiereperimentellen Arbeiten wurde ein vollumfänglicher Tierversuchsantrag beim Regierungspräsidium Karlsruhe gestellt und am 17.10.2019 unter dem Aktenzeichen G-222/19 genehmigt. Die Laufzeit dieses Tierversuchsantrages beläuft sich auf fünf Jahre. Zusätzlich zu dem Tierversuchsantrag wurde eine nicht-technische Projektzusammenfassung (NTP) beim Bundesinstitut für Risikobewertung hinterlegt (NTP-ID: 00030992-1-0). Jegliche Änderungen an dem genehmigten Tierversuchsantrag wurden vorab dem Regierungspräsidium Karlsruhe vorgelegt und genehmigt.

Alle hier an Tieren durchgeführten Arbeiten erfolgten in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz und der Tierschutz-Tierversuchsordnung.

3.4 Statistik

Die Daten wurden mit GraphPad Prism 9.0.0 ausgewertet und dargestellt. Die Balkendiagramme sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Bei allen Datensätzen wurde die ROUT-Methode angewandt, um mögliche Ausreißer zu identifizieren und diese dann in den weiteren statistischen Analysen zu exkludieren.

Alle Werte wurden bei ausreichend großem Stichprobenumfang mittels D'Agostino-Pearson Test auf Normalverteilung getestet. Bei einem Stichprobenumfang, der für diesen statistischen Test nicht ausreichend groß war, wurde der Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung durchgeführt.

Gruppenvergleiche mit nur einer unabhängigen Variablen (einfaktoriell) wurden durch eine One-Way ANOVA Varianzanalyse der Mittelwerte durchgeführt und durch die anschließende Holm-Šidák's Korrektur für multiples Testen korrigiert. Konnte bei einzelnen oder mehrere Datensätzen innerhalb eines Gruppenvergleiches keine Normalverteilung nachgewiesen werden, erfolgte der Gruppenvergleich ausschließlich mit einem nicht-parametrischen Testverfahren. Der hierfür angewendete Kruskal-Wallis Test wurde mit dem *post-hoc* Dunn's Test für multiples Testen korrigiert.

Mehrfaktorielle Gruppenvergleiche wurden mit einer Two-Way ANOVA Varianzanalyse der Mittelwerte durchgeführt. Die Korrektur für multiples Testen erfolgte hierbei mit dem Šidák's Test.

Ein Vergleich zweier Mittelwerte aus parametrischen Datensätzen wurde mit dem Student's t-Test durchgeführt. Lagen nicht-parametrische Datensätze zugrunde, erfolgte der Vergleich unter der Annahme gleicher Varianzen durch einen Mann-Whitney-U Test für kontinuierlich verteilte Variablen. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Quantifizierung der Effekte des si-RNA-induzierten HO-1-Knockdowns

Um die Rolle der HO-1-Expression in HCAEC in Zusammenhang mit der w6/32-antikörperinduzierten Adhäsion und Transmigration von Monozyten zu untersuchen, erfolgte ein HO-1-Knockdown. Hierzu wurden die HCAEC mit einem HO-1-si-RNA Konstrukt transfiziert. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach erfolgter Transfektion generiert, um den zeitlichen Verlauf dokumentieren zu können. Die Effizienz des si-RNA-induzierten Knockdowns auf die HO-1-Expression konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene quantifiziert werden.

Für die folgenden Adhäsions- und Transmigrations-Assays erfolgte die Stimulation der HCAEC mit dem w6/32-Antikörper zu dem Zeitpunkt der geringsten HO-1-Proteinexpression.

4.1.1 Reduktion der HO-1-mRNA in HCAEC durch si-RNA-Transfektion

Der Effekt der si-RNA-Transfektion auf die HO-1-mRNA-Expression wurde mit einer qRT-PCR-Analyse quantifiziert. Das Transkriptom der HCAEC wurde 24, 36 und 48 Stunden nach erfolgtem si-RNA-induzierten Knockdown isoliert und die HO-1-mRNA-Expression in si-RNA-transfizierten HCAEC relativ zur Kontrolle (nt-RNA) angegeben.

Bereits 24 Stunden nach dem induzierten Knockdown kam es zu einer signifikanten Reduktion der HO-1-mRNA-Expression in si-RNA-transfizierten HCAEC um 90,8 % im Vergleich zur Kontrolle (nt-RNA [100 %] vs. si-RNA [9,8 %]; $p < 0,0001$). Die signifikante Reduktion blieb auch 36 Stunden (nt-RNA [100 %] vs. si-RNA [9,8 %]; $p < 0,0001$) und 48 Stunden (nt-RNA [100 %] vs. si-RNA [10,5 %]; $p < 0,0001$) nach der Transfektion bestehen (Abb.23, A).

Diese Ergebnisse konnte die erfolgreiche Reduktion der HO-1-mRNA in HCAEC durch eine Transfektion mit einem HO-1-spezifischen si-RNA-Konstrukt verifiziert.

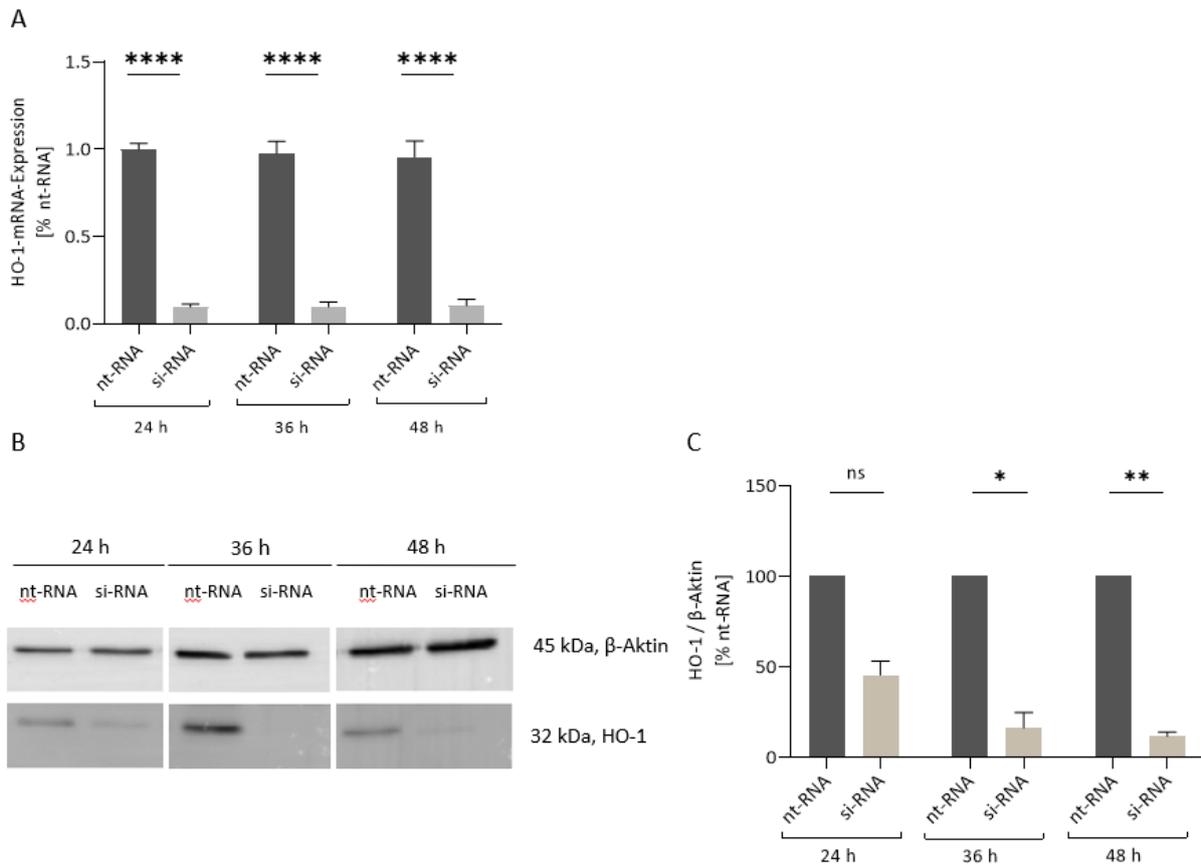


Abbildung 23: Effekte des si-RNA-induzierten Knockdowns auf die HO-1-Expression

(A) RT-qPCR der HO-1-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach si-RNA-induziertem Knockdown. Darstellung der HO-1-mRNA in si-RNA-behandelten HCAEC relativ zur nt-RNA Kontrolle. (B) Repräsentativer Western Blot der HO-1-Proteinkonzentration. Das Proteom der HCAEC wurde zu den indizierten Zeitpunkten nach der Transfektion isoliert und analysiert, als Ladekontrolle diente β -Aktin. (C) Relative Quantifizierung und statistische Auswertung des HO-1-Western Blots. Darstellung der si-RNA-behandelten Ansätze in Relation zu der zeitlich korrespondierenden nt-RNA Kontrolle.

Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, Werte wurden mit einer Two-Way ANOVA Varianzanalyse auf signifikante Differenzen getestet, Korrektur für multiples Testen erfolgte mit dem Šidák's Test (ns: nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$); $n = 3$.

4.1.2 HO-1 si-RNA-Transfektion führt zu verminderter HO-1-Proteinexpression in HCAEC

Für den Nachweis, ob und zu welchem Zeitpunkt nach dem si-RNA-induzierten Knockdown eine Reduktion der HO-1-Proteinexpression folgt, wurde die HO-1-Proteinexpression quantifiziert. Hierzu wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot der Proteinproben durchgeführt, welche 24, 36 oder 48 Stunden nach dem si-RNA-induzierten HO-1-Knockdown gewonnen wurden (Abb.23, B). Zum Vergleich der HO-1 Proteinkonzentration in den unterschiedlichen Laufbahnen des Gels wurden diese auf die jeweilige β -Aktin-Proteinkonzentration normalisiert.

Bereits 24 Stunden nach dem si-RNA-induzierten HO-1-mRNA-Knockdown kam es zu einer numerisch verringerten HO-1-Proteinexpression in HCAEC relativ zu der Proteinexpression in den Kontrollzellen (nt-RNA [100 %] vs. si-RNA [45,39 %]; $p = 0,059$) (Abb.23, C). Die Proteinexpression sank in den folgenden Stunden weiter und erreichte 36 Stunden nach dem Knockdown einen signifikanten Unterschied

zwischen si-RNA- und nt-RNA-behandelten Zellen (nt-RNA [100 %] vs. si-RNA [16,26 %]; $p = 0,03$). Dieser Effekt verstärkte sich weiter, so dass 48 Stunden nach dem Knockdown der Proteingehalt der HO-1 in si-RNA-transfizierten HCAEC auf 11,7 % relativ zur Kontrolle gesunken war (nt-RNA [100 %] vs. si-RNA [11,7 %]; $p = 0,0022$).

Somit lässt sich feststellen, dass die Transfektion von HCAEC mit einer HO-1-si-RNA neben einer Reduktion der Genexpression ebenso in einer signifikanten Verringerung der Proteinexpression resultiert. Für die nachfolgenden Experimente, in denen der Einfluss des HO-1-Knockdowns auf die Adhäsion (Abschnitt 4.2) und Transmigration (Abschnitt 4.3) der Monozyten quantitativ untersucht wurde, erfolgte die Stimulation mit dem w6/32-Antikörper beziehungsweise der Isotypkontrolle 24 Stunden nach si-RNA-induziertem Knockdown.

4.2 Quantifizierung der Adhäsion von Monozyten an einen endothelialen Monolayer

4.2.1 w6/32-Antikörper induziert konzentrationsabhängige Steigerung der Adhäsion

Mit einem Adhäsions-Assay wurde der Einfluss der Endothelstimulation mit dem w6/32-Antikörper auf die Adhäsion der Monozyten (THP-1) quantifiziert. Die HCAEC wurden 24 Stunden mit 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml des w6/32-Antikörpers inkubiert und anschließend das Adhäsions-Assay durchgeführt. Als Kontrolle diente die Stimulation mit 1 µg/ml der Isotypkontrolle für den gleichen Zeitraum. Als Zielgröße wurde der prozentuale Anteil der zuvor CTG-gefärbten Monozyten (P3) an der Gesamtzellzahl mit einer durchflusszytometrischen Messung erfasst (Abb.24, A).

Die 24-stündige Stimulation der Endothelzellen mit 0,1 µg/ml w6/32 führte zu einer signifikanten Zunahme der adhärenz THP-1 um das 2,5-fache relativ zu einer Stimulation mit der Isotypkontrolle (1 µg/ml Isotyp [100%] vs. 0,1 µg/ml w6/32 [264,8 %]; $p = 0,0004$) (Abb.24, B). Dieser Wert konnte durch eine Stimulation mit der 10-fachen Konzentration des w6/32-Antikörpers weiter gesteigert werden. Wurden die HCAEC mit 1 µg/ml w6/32 stimuliert, kam es zu einer Steigerung der THP-1 Adhäsion auf 360,2 % im Vergleich zur Isotypkontrolle (1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [360,2 %]; $p < 0,0001$).

Da es auch zwischen den Experimentalansätzen, in denen die verschiedenen Konzentrationen des w6/32-Antikörper verwendet wurden, zu einer statistisch signifikanten Zunahme der THP-1 Adhäsion kam (0,1µg/ml w6/32 [264,8 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [360,2 %]; $p = 0,03$), kann von einem konzentrationsabhängigen Effekt der w6/32-induzierten Adhäsion gesprochen werden.

Mit den hier durchgeführten Assays konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der humanen Endothelzellen mit dem anti-HLA-I-Antikörper w6/32 zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Adhäsion von Monozyten an den endothelialen Monolayer führt.

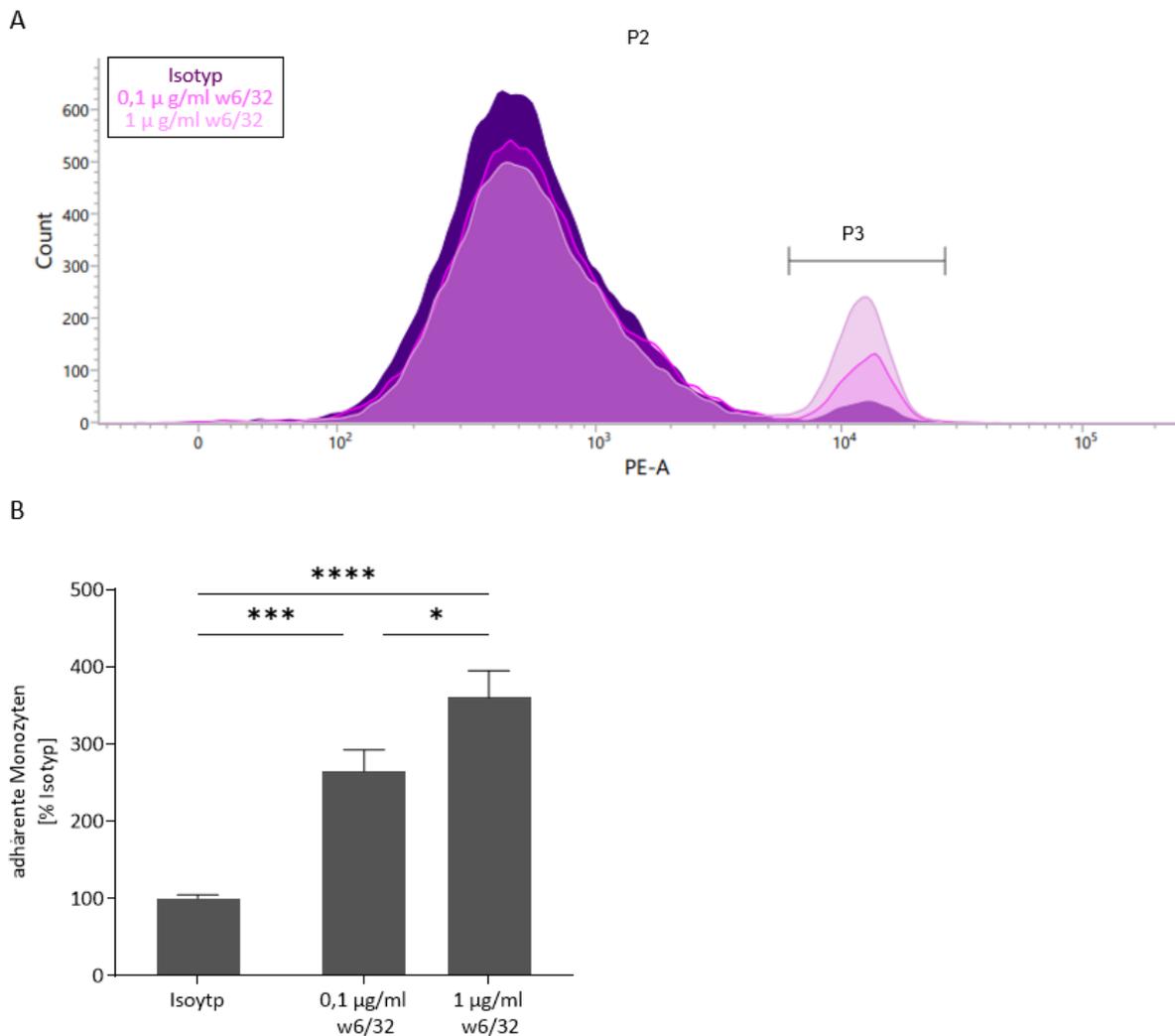


Abbildung 24: Relative Quantifizierung der w6/32-induzierten Adhäsion von THP-1

Stimulation der EC erfolgte für 24 h mit 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml des w6/32-Antikörpers bzw. der Isotypkontrolle (1 µg/ml). (A) Repräsentatives durchflusszytometrisches Schaubild zeigt eine deutliche Zunahme der adhären, gefärbten Monozyten in Gate P3 in Abhängigkeit der Intervention. (B) Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten. Ergebnisse sind dargestellt als MW ± SEM relativ zur Isotypkontrolle. Die parametrischen Werte wurden durch eine One-Way ANOVA Varianzanalyse verglichen. Eine Korrektur für multiples Teste erfolgte durch die Šidák's Korrektur (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$); $n = 9$

4.2.2 Expression und Aktivität der HO-1 beeinflusst w6/32-induzierte Adhäsion

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss der HO-1-Aktivität beziehungsweise deren Expression auf die w6/32-induzierte Adhäsion der Monozyten untersucht. Die HCAEC wurden 24 Stunden mit dem HO-1-Aktivator CoPPiX oder einem Statin (Pravastatin) inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 1 µg/ml des w6/32-Antikörpers in Gegenwart des entsprechenden HO-1-Modulators. Als Kontrolle dienten HCAEC, die 24 Stunden mit 1 µg/ml w6/32 stimuliert wurden. Auch in diesem Ansatz wurde der prozentuale Anteil der CTG-gefärbten THP-1 Monozyten an der Gesamtzellzahl bestimmt (Abb.25, A).

Die Inkubation der HCAEC mit dem HO-1-Aktivator CoPPIX führte zu einer signifikanten Reduktion der w6/32-induzierten Adhäsion von THP-1 im Vergleich zum Kontrollansatz (1 µg/ml w6/32 [100 %] vs. CoPPIX + 1 µg/ml w6/32 [42,3 %]; $p < 0,0001$).

Ähnliche Ergebnisse konnte die Inkubation der HCAEC mit dem Statin erzielen. Auch hier zeigte sich, dass die Stimulation mit dem Statin die w6/32-induzierte Adhäsion gegenüber einer alleinigen Stimulation des Antikörpers um signifikant 65,8 % verringerte (1 µg/ml w6/32 [100 %] vs. Statin + 1 µg/ml w6/32 [34,2 %]; $p < 0,0001$) (Abb.25, B).

Wie bereits gezeigt, ließ sich durch eine si-RNA-Transfektion die HO-1-Proteinexpression in HCAEC reduzieren (Abschnitt 4.2.1). Dementsprechend wurden die HCAEC 24 Stunden nach erfolgter Transfektion mit dem w6/32-Antikörper stimuliert, um die Auswirkungen der reduzierten HO-1-Proteinexpression auf die antikörperinduzierte Adhäsion der THP-1 zu quantifizieren.

Die 24-stündige Stimulation der HCAEC mit 1 µg/ml w6/32 führte in Abwesenheit einer HO-1-Proteinreduktion (nt-RNA) zu einer signifikanten Steigerung der Adhäsion im Vergleich zu isotypstimulierten HCAEC (nt-RNA: 1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [176,3 %]; $p = 0,0002$) (Abb.25, C).

Der si-RNA-induzierte HO-1-Knockdown verursachte eine signifikante Steigerung der w6/32-vermittelten THP-1 Adhäsion relativ zu den nt-RNA transfizierten HCAEC (nt-RNA: 1 µg/ml w6/32 [176,3 %] vs. si-RNA: 1 µg/ml w6/32 [309,2 %]; $p < 0,0001$).

Die Stimulation mit dem Isotyp hatte diesen Effekt nicht auf si-RNA-transfizierte HCAEC. Vergleicht man nt-RNA-transfizierte-HCAEC mit si-RNA-transfizierten, zeigte sich nach Isotypstimulation keine signifikante Zunahme in der Adhäsionsrate der Monozyten (nt-RNA: 1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. si-RNA: 1 µg/ml Isotyp [129,3 %]; $p = 0,28$).

Dahingegen kam es bei HCAEC nach erfolgtem HO-1-Knockdown und anschließender w6/32-Stimulation zu einer signifikanten Steigerung der Adhäsion im Vergleich zur Stimulation mit dem Isotyp (si-RNA: 1 µg/ml Isotyp [129,3 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [309,2 %]; $p < 0,0001$).

Diese Ergebnisse zeigen den Einfluss einer HO-1-Aktivität beziehungsweise Expression auf die Monozyten-EC-Interaktionen. Die gezielte Induktion der HO-1-Aktivität in HCAEC mit CoPPIX oder dem Statin resultiert in einer Reduktion der w6/32-induzierte Adhäsion von Monozyten. Demgegenüber bewirkt ein HO-1-Knockdown in HCAEC eine Intensivierung der w6/32-abhängigen Adhäsion.

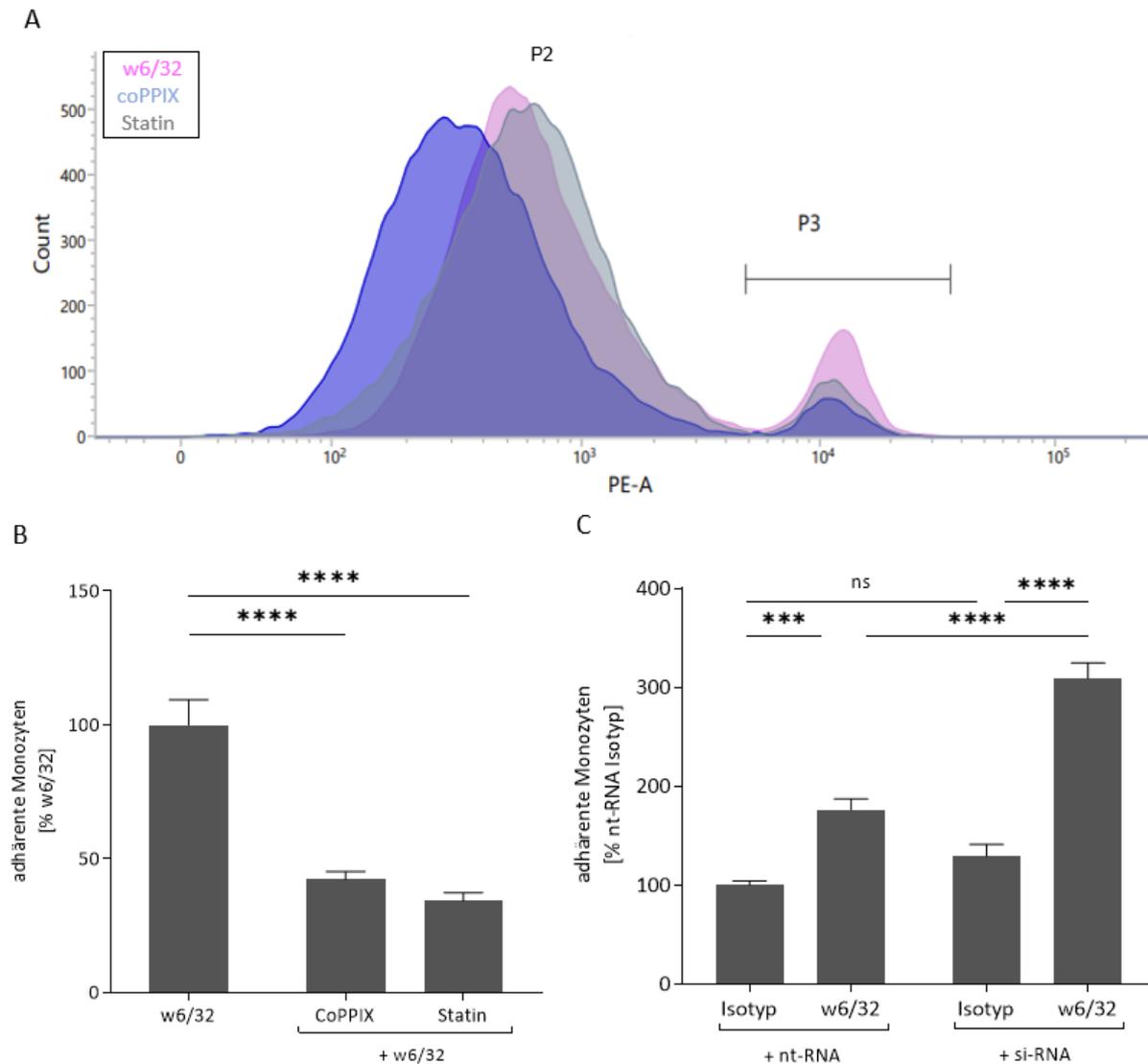


Abbildung 25: Effekte der HO-1-Aktivität bzw. Expression auf die w6/32-induzierte THP-1-Adhäsion

Relative Quantifizierung der Adhäsion von THP-1 Monozyten an einen HCAEC Monolayer nach Stimulation mit dem w6/32-Antikörper und in Abhängigkeit der HO-1-Modulation. (A) Das repräsentative durchflusszytometrische Schaubild zeigt eine deutliche Zunahme der CTG gefärbten THP-1 Zellen in Gate P3 in Abhängigkeit der Intervention. (B) Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten relativ zur Kontrolle (1 µg/ml w6/32). (C) Statistische Auswertung des Adhäsions-Assays nach erfolgtem HO-1-Knockdown und w6/32-Stimulation relativ zu der Isotypkontrolle im nt-RNA Ansatz.

Daten sind dargestellt als MW ± SEM. Auswertung erfolgte mit einer One-Way ANOVA Varianzanalyse für parametrische Daten. Signifikante Änderungen wurden mit einer Šidák's Korrektur für multiples Testen korrigiert. CoPPiX = HO-1-Aktivator, Statin = gesteigerte HO-1-Aktivität und Expression (ns: nicht signifikant; ***p < 0,001; ****p < 0,0001); n = 9.

4.3 Quantifizierung der Transmigration von Monozyten über den endothelialen Monolayer

4.3.1 w6/32-Antikörper induziert Steigerung der Transmigration

Mit den folgenden Assays wurde die Transmigration der THP-1 über einen endothelialen Monolayer untersucht. Die Stimulation der HCAEC erfolgte 24 Stunden mit 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml des w6/32-Antikörpers. Die Zielgröße der Experimente war die Messung der Impedanz des xCELLigence-Systems, die proportional zu der Anzahl der transmigrierten Monozyten ist (Abb.26, A). Um der zeitlichen Komponente der Transmigration der THP-1 Rechnung zu tragen, wurde die AUC des dimensionslosen Zellindexes berechnet. Als Kontrolle diente die Rate der transmigrierten Monozyten über einen isotypstimulierten endothelialen Monolayer.

Die Stimulation mit 0,1 µg/ml w6/32 induzierte eine signifikante Steigerung der Transmigration auf 280 % im Vergleich zu isotypstimulierten HCAEC (1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 0,1 µg/ml w6/32 [280,4 %]; $p = 0,025$) (Abb.26, B). Dieser Effekt konnte durch eine Stimulation der HCAEC mit 1 µg/ml w6/32 weiter verstärkt werden. Hierbei stieg die Transmigration auf 449 % gegenüber der Kontrolle (1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [449,4 %]; $p < 0,0001$).

Durch die Stimulation mit 1 µg/ml w6/32 konnte die Transmigration fast verdoppelt werden gegenüber der Stimulation mit 0,1 µg/ml w6/32 (1 µg/ml w6/32 [280,4 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [449,4 %]; $p = 0,025$).

Hiermit ließ sich nachweisen, dass die Stimulation von HCAEC mit dem anti-HLA-I-Antikörper w6/32 eine signifikante Zunahme der Transmigration von THP-1 über den Monolayer bewirkt. Dieser Effekt trat, wie bei den Adhäsions-Assays, ebenfalls in einer Konzentrationsabhängigkeit des w6/32-Antikörpers auf.

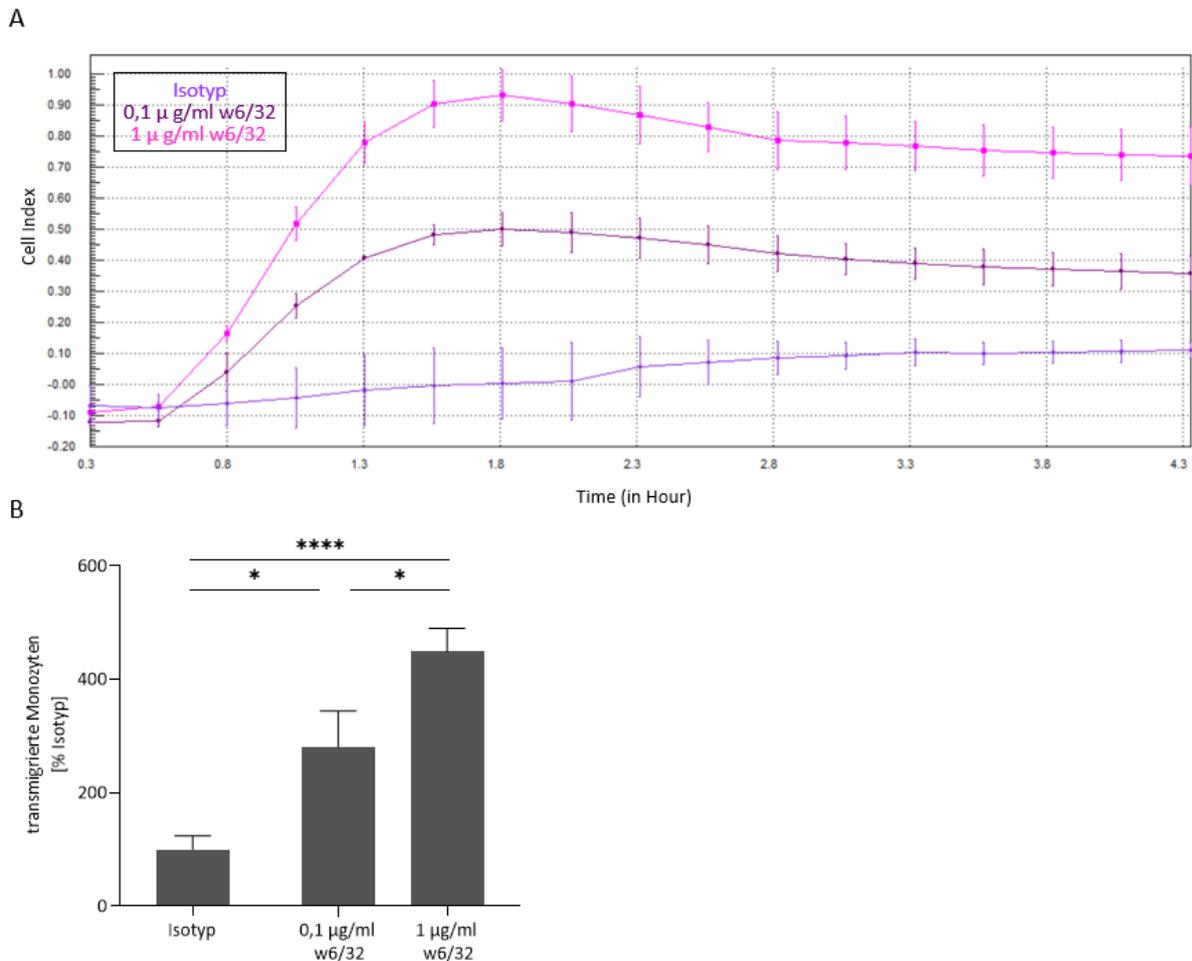


Abbildung 26: Relative Quantifizierung der Transmigration von THP-1

Stimulation der EC erfolgte 24 h mit 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml des w6/32-Antikörpers bzw. der Isotypkontrolle (1 µg/ml). (A) Repräsentatives Schaubild der Impedanzkurve. Für die Inkorporierung der zeitlichen Komponente wurde die Area-under-the-curve (AUC) berechnet. (B) Statistische Auswertung des dimensionslosen Zellindexes, dargestellt sind die MW ± SEM. Werte wurden mittels One-Way ANOVA Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede getestet. Mit einer Šidák's Analyse wurden die Ergebnisse der Signifikanzauswertung für multiples Testen korrigiert (*p < 0,05; ****p < 0,0001); n = 9.

4.3.2 Expression und Aktivität der HO-1 beeinflusst w6/32-induzierte Transmigration

Um den Einfluss der HO-1 auch auf die w6/32-induzierte Transmigration zu untersuchen, wurde erneut der HO-1-Aktivator CoPPIX und ein Statin getestet. Mit der Stimulation der HCAEC nach dem si-RNA induzierten HO-1-Knockdown wurde simultan zu den Adhäsions-Assays die Auswirkungen einer reduzierten HO-1-Proteinkonzentration auf die Rate der transmigrierten THP-1 Monozyten über den endothelialen Monolayer quantifiziert.

Die 24-stündige Inkubation mit CoPPIX, gefolgt von weiteren 24 Stunden Stimulation mit CoPPIX und 1 µg/ml w6/32 führte zu einer signifikanten Reduktion der Transmigration im Vergleich zu dem Kontrollansatz, welcher ausschließlich für 24 Stunden mit 1 µg/ml w6/32 inkubiert wurde (1 µg/ml w6/32 [100 %] vs. CoPPIX + 1 µg/ml w6/32 [84,3 %]; p = 0,013) (Abb.27, A).

Die Stimulation der Endothelzellen mit dem Statin führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der w6/32-evozierten Transmigration der THP-1 um 33 % (1 µg/ml w6/32 [100 %] vs. Statin + 1 µg/ml w6/32 [77 %]; $p = 0,0005$).

Um die Auswirkungen der HO-1-Reduktion auf die w6/32-induzierte Transmigration zu untersuchen, wurden die HCAEC 24 Stunden nach dem si-RNA induzierten Knockdown mit 1 µg/ml w6/32 beziehungsweise der Isotypkontrolle stimuliert, (Abb.27, B). In Einklang mit den Ergebnissen in Abschnitt 4.3.1 resultierte die Stimulation mit dem w6/32-Antikörper im Vergleich zum Isotyp zu einer signifikanten Zunahme der Transmigration bei nt-RNA-transfizierten HCAEC (nt-RNA: 1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [169,5 %]; $p = 0,046$).

Der HO-1-Knockdown verstärkte den w6/32-verursachten Effekt. Die Antikörperstimulation der si-RNA-transfizierten HCAEC induzierte eine signifikante Steigerung der Transmigration im Vergleich zum nt-RNA-transfizierten-Ansatz (nt-RNA: 1 µg/ml w6/32 [169,5 %] vs. si-RNA: 1 µg/ml w6/32 [383,81 %]; $p = 0,009$). Der w6/32-Antikörper führte nach einem HO-1-Knockdown ebenso zu einer verstärkten Transmigration der THP-1 im Vergleich zu den isotypbehandelten Zellen (si-RNA: 1 µg/ml Isotyp [208,48 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [383,81 %]; $p = 0,046$).

Interessanterweise verursachte bereits der si-RNA-induzierte HO-1-Knockdown, unabhängig von einer Stimulation mit dem w6/32-Antikörper, eine signifikante Steigerung der THP-1 Transmigration um das 2-fache (nt-RNA: 1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. si-RNA: 1 µg/ml Isotyp [208,48 %]; $p = 0,009$).

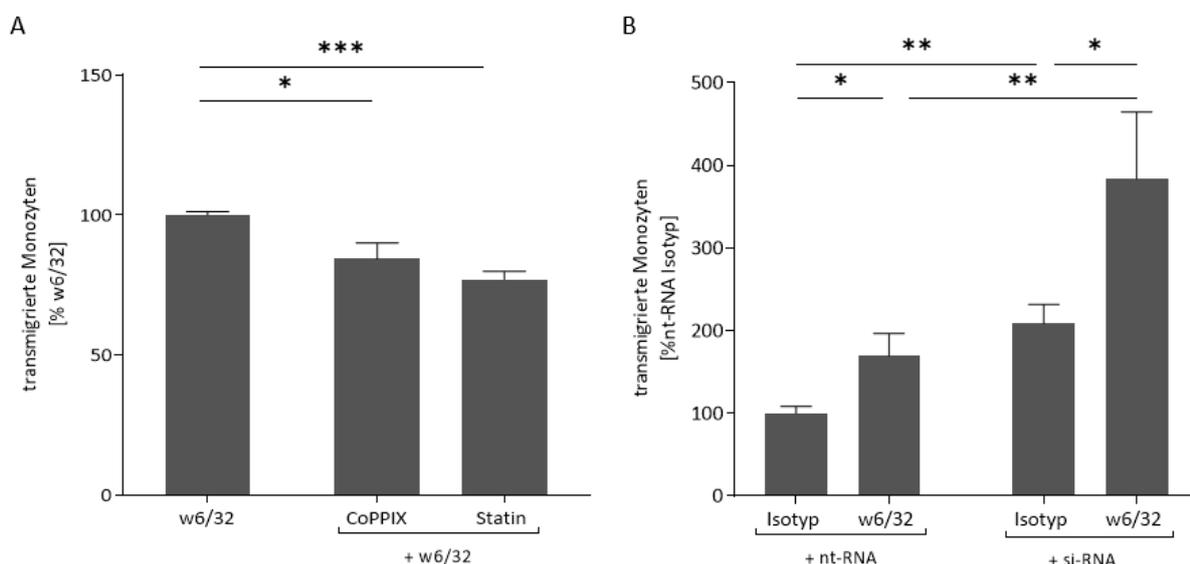


Abbildung 27: Auswirkung der HO-1-Aktivität auf die w6/32-induzierte Transmigration

(A) HCAEC wurden 24 h mit den HO-Modulatoren inkubiert, gefolgt von weiteren 24 h mit den Modulatoren und 1 µg/ml des w6/32-Antikörpers. (B) 24 h nach dem HO-1-Knockdown wurden die HCAEC mit 1 µg/ml w6/32 für 24 h stimuliert mit anschließendem Transmigrations-Assay.

Werte sind dargestellt als MW ± SEM normalisiert auf die w6/32-Stimulation bzw. auf die nt-RNA Transfektion mit Isotypstimulierung. Signifikante Unterschiede wurden mit einer One-Way ANOVA Varianzanalyse für parametrische Daten bzw. einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (B) untersucht und mittels Šidák's Testen korrigiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); $n = 9$.

In Einklang mit den Ergebnissen der Adhäsions-Assays zeigte sich auch hier, dass eine verstärkte HO-1-Aktivität die w6/32-induzierten Effekte signifikant abmildert. Eine si-RNA-induzierte Reduktion der HO-1 in HCAEC geht mit einer signifikanten Steigerung der w6/32-abhängigen Transmigrationsrate der THP-1 einher.

4.4 Stimulation mit dem w6/32-Antikörper induziert CD62E-Expression in HCAEC

Sowohl die Adhäsion als auch die Transmigration von Monozyten an beziehungsweise über einen endothelialen Monolayer werden durch die Bindung von Adhäsions- und Transmigrationsmolekülen auf der Oberfläche der EC vermittelt. Diese Rezeptoren binden an ihre spezifischen Liganden, die auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert werden. Um festzustellen, welche Rezeptoren auf Seiten der EC die w6/32-induzierten beobachteten Effekte vermitteln, wurde das Transkriptom der EC analysiert.

4.4.1 Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene

Die HCAEC wurden mit 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml des w6/32-Antikörpers stimuliert und das Transkriptom der HCAEC nach 6, 12, 18 und 24 Stunden extrahiert. Anschließend wurden RT-qPCR-Analysen für Adhäsions- und Transmigrationsrezeptoren durchgeführt, für die eine w6/32-vermittelte Expressionsänderung wahrscheinlich erschien.

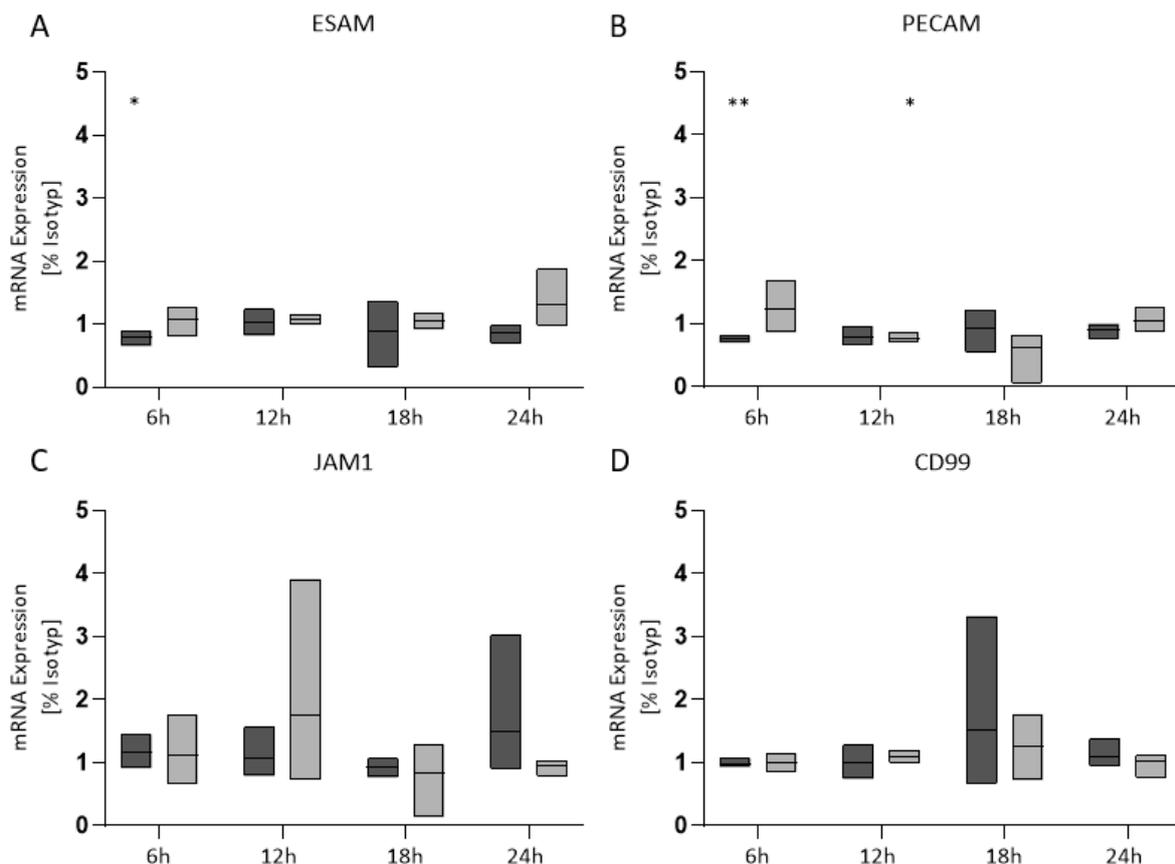
Für den endothelzellenselektiven Adhäsionsrezeptor (Endothelial Cell Selective Adhesion Molecule, ESAM) zeigte sich nach sechs Stunden Stimulation mit 0,1 µg/ml w6/32 eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression im Vergleich zu isotypbehandelten Zellen, jedoch nicht für die Stimulation mit 1 µg/ml w6/32 (6 h: 1 µg/ml Isotyp [1] vs. 0,1 µg/ml w6/32 [0,78]; $p = 0,03$ beziehungsweise. 1 µg/ml w6/32 [1,06]; $p = 0,8$) (Abb.28, A). Ähnlich verhielt es sich mit dem Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM). Auch hier kam es nach sechs Stunden Stimulation nur bei der niedrigeren Antikörperkonzentration zu einer Reduktion der mRNA (6 h: 1 µg/ml Isotyp [1] vs. 0,1 µg/ml w6/32 [0,77]; $p = 0,006$) (Abb.28, B). Die Stimulation mit 1 µg/ml w6/32 zeigte erst nach zwölf Stunden einen Effekt auf die PECAM-Expression. Interessanterweise kam es auch hier zu einer signifikanten Reduktion der mRNA in HCAEC (12 h: 1 µg/ml Isotyp [1] vs. 1 µg/ml w6/32 [0,77]; $p = 0,015$). Für die restlichen, häufig in der Literatur beschriebenen Oberflächenrezeptoren wie CD99, dem junctionale Adhäsionsmolekül (Junctional Adhesion Molekule, JAM) 1 und 3 sowie ICAM-2 und P-Selektin konnte kein signifikanter Einfluss der w6/32-Stimulation auf das Expressionsspektrum nachgewiesen werden (Abb.28, C-G).

Im Unterschied dazu wies die mRNA-Konzentration des Oberflächenrezeptors CD62E eine zeitliche Abhängigkeit ihrer Expressionsstärke nach Stimulation mit dem w6/32-Antikörper auf. Bereits nach sechs Stunden kam es in HCAEC, die mit 1 µg/ml w6/32 stimuliert wurden, zu einer signifikanten Zunahme der CD62E-Expression (6 h: 1 µg/ml Isotyp [1] vs. 1 µg/ml w6/32 [1,99]; $p = 0,014$) (Abb.28, H). Diese induzierte Expression setzte sich in den folgenden Stunden weiter fort und nach zwölf Stunden stieg

die CD62E-mRNA in 1 µg/ml w6/32-stimulierten HCAEC auf das 2,7-fache im Vergleich zu den Kontrollzellen (12 h: 1 µg/ml Isotyp [1] vs. 1 µg/ml w6/32 [2,71]; $p < 0,0001$) und blieb bis 18 Stunden bestehen (18 h: 1 µg/ml Isotyp [1] vs. 1 µg/ml w6/32 [2,66]; $p = 0,0001$). Der Effekt der w6/32-induzierten CD62E-Expression war nach 24 Stunden vollständig verschwunden und die mRNA-Konzentration wieder auf den Wert der Kontrolle gesunken (24 h: 1 mg/ml Isotyp [1] vs. 1 µg/ml w6/32 [1,09]; $p = 0,99$).

Auch für die mit 0,1 µg/ml w6/32-stimulierten HCAEC zeigte sich eine zeitliche Abhängigkeit der CD62E-mRNA-Expression, erreichte aber zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (6 h: 1 µg/ml Isotyp [1] vs. 0,1 µg/ml w6/32 [1,06]; $p = 0,99$; 12 h: 1 µg/ml Isotyp [1] vs. 0,1 µg/ml w6/32 [1,84]; $p = 0,176$; 18 h: 1 µg/ml Isotyp [1] vs. 0,1 µg/ml w6/32 [1,89]; $p = 0,14$; 24 h: 1 µg/ml Isotyp [1] vs. 0,1 µg/ml w6/32 [0,81]; $p = 0,982$).

Das Screening verschiedener prominenter Oberflächenproteine auf HCAEC zeigte, dass deren mRNA-Konzentrationen sensitiv auf die Stimulation mit dem anti-HLA-I-Antikörper w6/32 reagieren. Lediglich für den Adhäsions-Rezeptor CD62E konnte eine w6/32-abhängige signifikante Steigerung beobachtet werden, die die Resultate der Adhäsions- und Transmigrations-Assays erklären könnte.



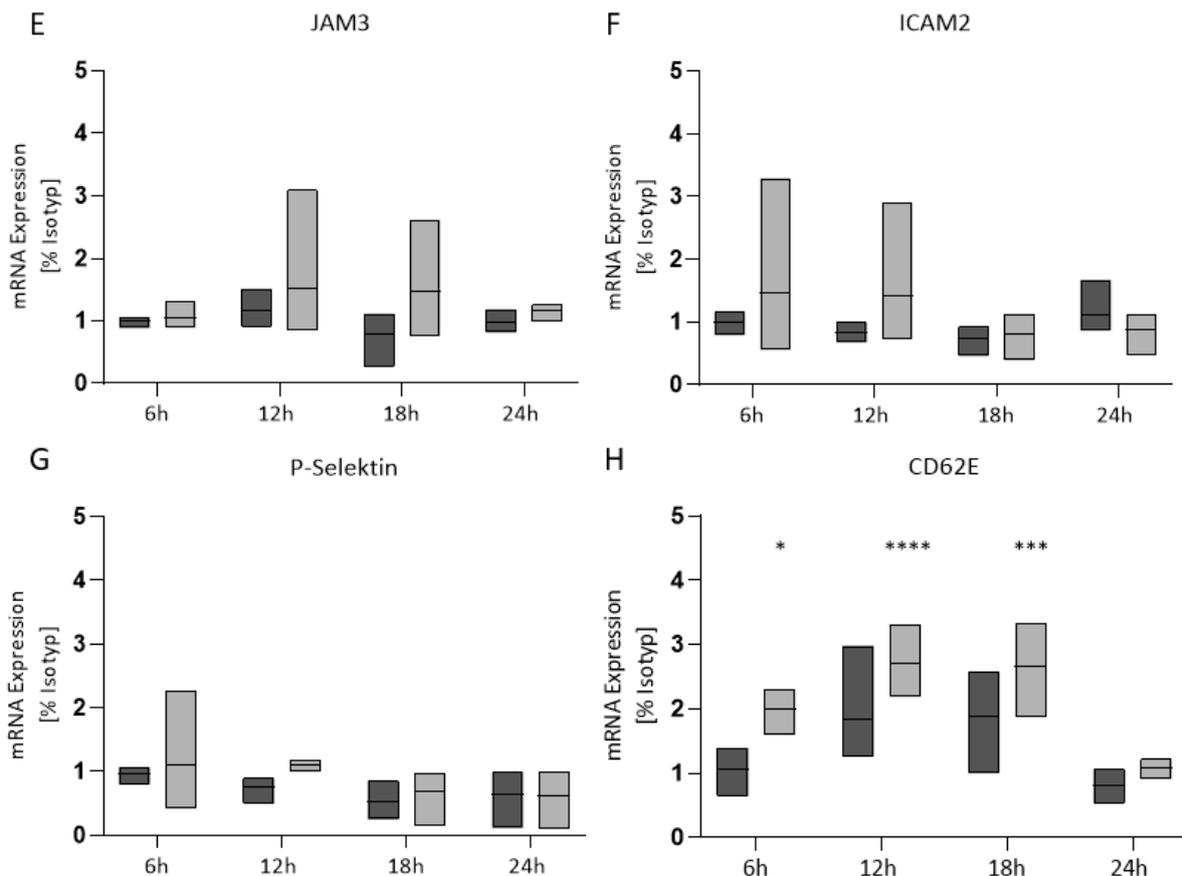


Abbildung 28: mRNA-Expressionsanalysen in Abhängigkeit der w6/32-Stimulation

HCAEC wurden mit 0,1 µg/ml (dunkel) bzw. 1 µg/ml (hell) w6/32 oder der Isotypkontrolle stimuliert und zu den indizierten Zeitpunkten das Transkriptom isoliert. Nach mRNA-Extraktion erfolgten RT-qPCR-Analysen mit TaqMan-Assays spezifisch für die angegebenen Adhäsionsmoleküle (A-H). Werte sind dargestellt als Durchschnitt von 3 unabhängigen Experimenten relativ zur Isotypkontrolle, auf deren Darstellung aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet wurde. Die Daten wurden mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede untersucht und für multiples Testen korrigiert (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$); $n = 3$.

4.4.2 Expressionsnachweis auf Proteinebene

In den vorangegangenen Experimenten hatte sich gezeigt, dass die Stimulation von HCAEC mit dem w6/32-Antikörper eine signifikante Steigerung der CD62E-mRNA-Expression induziert. Um zu überprüfen, ob die gesteigerte mRNA-Konzentration auch Auswirkungen auf den CD62E-Proteingehalt hat, wurde dies mit einem Western Blot und durchflusszytometrischen Analysen untersucht.

Die HCAEC wurden dazu 24 Stunden mit den unterschiedlichen w6/32-Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml oder mit der Isotypkontrolle (1 µg/ml) stimuliert. Danach erfolgte die Entnahme des Proteoms und die molekularbiologischen Analysen.

Nach der gelelektrophoretischen Separierung erfolgte der Western Blot und die Detektion von CD62E bei 66 kDa mit einem anti-CD62E-Antikörper (Abb.29, A). Um etwaige Ungenauigkeiten beim Auftragen der Proben ausgleichen zu können, wurde ebenfalls die Konzentration des β -Aktins bei 45 kDa (Ladekontrolle) bestimmt und in Relation zu der CD62E-Konzentration gesetzt.

Die statistische Auswertung der Western Blots ergab eine signifikante Zunahme der CD62E-Proteinkonzentration in HCAEC, die im Vergleich zur Isotypkontrolle mit 0,1 µg/ml w6/32-Antikörper stimuliert wurden (1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 0,1 µg/ml w6/32 [241,7 %]; $p = 0,046$). Nach Stimulation der HCAEC mit 1 µg/ml w6/32 stieg die CD62E-Expression nahezu auf das 3-Fache der Kontrolle (1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [299,9 %]; $p = 0,009$). Zwischen den Stimulationen mit den zwei unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen kam es hingegen zu keiner signifikanten Zunahme der CD62E-Proteinmenge (0,1 µg/ml [241,7 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [299,9 %]; $p = 0,52$) (Abb.29, B).

Mit dem Western Blot konnte lediglich die gesamte CD62E-Proteinkonzentration in HCAEC quantifiziert. Für die Verifikation einer geänderten CD62E-Expression auf der Oberfläche der HCAEC wurde dies mit einer durchflusszytometrischen Analyse untersucht. Die HCAEC wurden erneut mit dem Antikörper oder der Isotypkontrolle 24 Stunden stimuliert und nachfolgend mit einem anti-CD62E-Antikörper, der zusätzlich mit dem Fluorophor PE gekoppelt war, gefärbt. Mit dem Durchflusszytometer erfolgte die Quantifizierung der mittleren PE-Intensität (Mean Fluorescence Intensity, MFI) der einzelnen Zellen in Abhängigkeit der Stimulation (Abb.29, C).

Die statistische Auswertung zeigte, dass die PE-MFI der 0,1 µg/ml w6/32-stimulierten HCAEC nach 24 Stunden signifikant höher ist als die der isotypstimulierten Zellen (1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 0,1 µg/ml w6/32 [225 %]; $p < 0,0001$) (Abb.29, D). Die Stimulation mit 1 µg/ml w6/32 erhöhte die PE-MFI um das 3-Fache gegenüber der Isotypkontrolle (1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [305 %]; $p < 0,0001$). Auch zwischen beiden w6/32-stimulierten Ansätzen kam es zu einer signifikanten Steigerung der PE-MFI (0,1 µg/ml w6/32 [225 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [305 %]; $p = 0,002$) und somit offenbarten die durchflusszytometrischen Daten einen w6/32-konzentrationsabhängigen Effekt auf die CD62E-Expression auf der Oberfläche der HCAEC.

In diesem Versuchsteil zeigte sich, dass sowohl die Menge an intrazellulär translatiertem CD62E als auch die Expression auf der Oberfläche humaner EC durch eine Stimulation mit dem w6/32-Antikörper, in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration, induziert werden konnte.

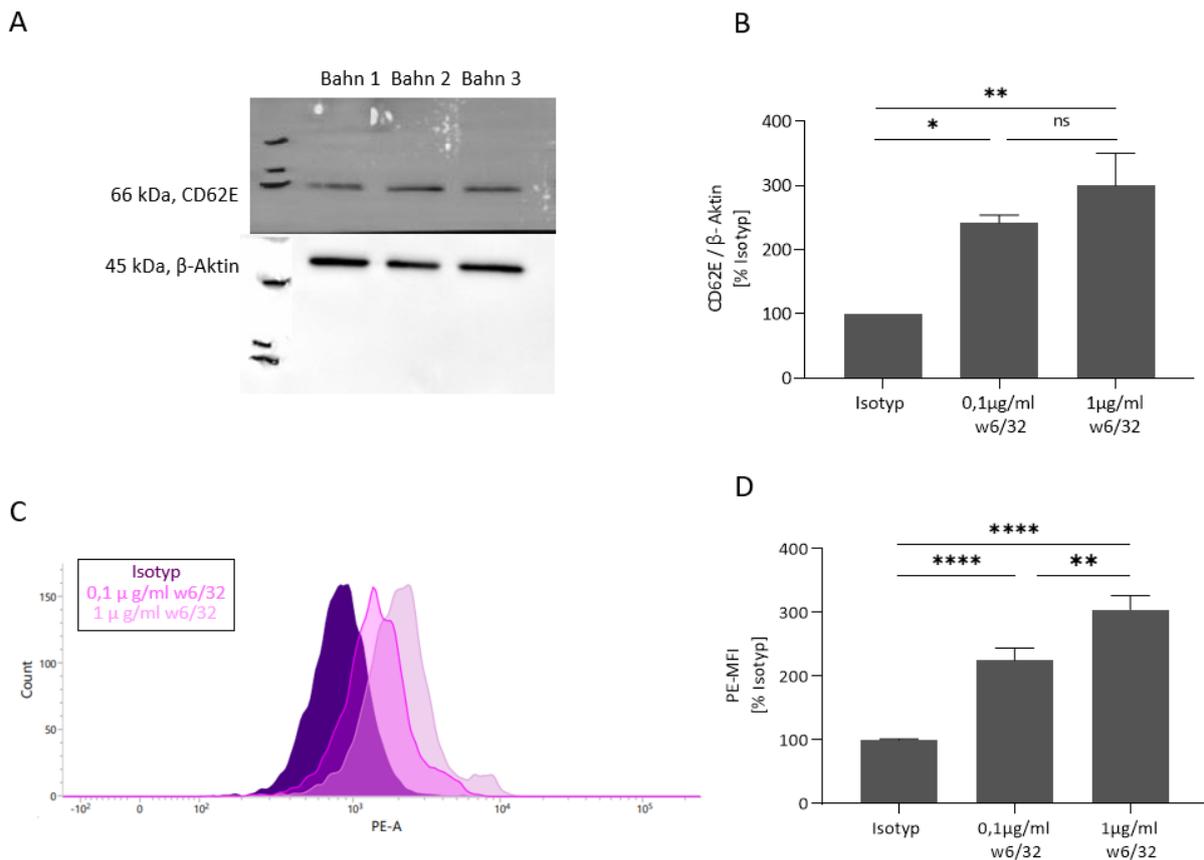


Abbildung 29: CD62E-Proteinexpressionsanalysen in HCAEC nach w6/32-Stimulation

Repräsentativer Western Blot für CD62E und β -Aktin (Ladeg Kontrolle). Das Proteom der HCAEC wurde nach 24 h Stimulation mit der Isotypkontrolle (Bahn 1), 0,1 μ g/ml (Bahn 2) bzw. 1 μ g/ml (Bahn 3) w6/32 extrahiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Western Blot ausgewertet. (B) Statistische Auswertung der Western Blots; n = 3. (C) Repräsentatives durchflusszytometrisches Schaubild für die Analyse der CD62E-Oberflächenexpression. (D) Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen; n = 9. Die parametrischen Daten wurden mit einer One-Way ANOVA Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede untersucht und mit einem Šidák's Test für multiples Testen korrigiert. (ns: nicht signifikant; *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001).

4.4.3 HO-1-Aktivität reduziert w6/32-induzierte CD62E-Expression

4.4.3.1 Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene

Die HCAEC wurden für 24 Stunden mit dem HO-1-Aktivator CoPPIX oder mit dem Statin inkubiert, um festzustellen, ob die w6/32-induzierte CD62E-mRNA-Expression sensitiv gegenüber der HO-1-Modulation ist. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 1 μ g/ml w6/32-Antikörper in Anwesenheit von CoPPIX oder des Statins. Zu den indizierten Zeitpunkten wurde das Transkriptom isoliert und die CD62E-mRNA-Expression mittels RT-qPCR quantifiziert.

Nach einer Stimulation der HCAEC mit 1 μ g/ml w6/32 kam es zu einer signifikanten Induktion der CD62E-Expression im Vergleich zu isotypbehandelten Zellen (Abschnitt 4.4.1, Abb.8, H). Bereits sechs Stunden nach der Stimulation zeigte sich eine signifikante Zunahme, die sich im weiteren Verlauf verstärkte und nach 24 Stunden wieder auf das Niveau der Kontrolle abgefallen war (Abb. 30, A).

Eine vorausgehende 24-stündige CoPPIX Stimulation verhinderte die w6/32-vermittelte Zunahme der CD62E-mRNA-Expression nach sechs und zwölf Stunden der w6/32-Stimulation. Nach 18 Stunden zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD62E-mRNA-Expression in CoPPIX behandelten HCAEC im Vergleich zu HCAEC, die ausschließlich mit 1 µg/ml des w6/32-Antikörpers stimuliert wurden (18 h: 1 µg/ml w6/32 [1] vs. CoPPIX + 1 µg/ml w6/32 [0,15]; $p = 0,0005$). Nach 24 Stunden war die mRNA in den CoPPIX behandelten Zellen auf 21,5 % im Vergleich zu der Kontrolle reduziert (24 h: 1 µg/ml w6/32 [1] vs. CoPPIX + 1 µg/ml w6/32 [0,21]; $p = 0,026$) (Abb.30, B).

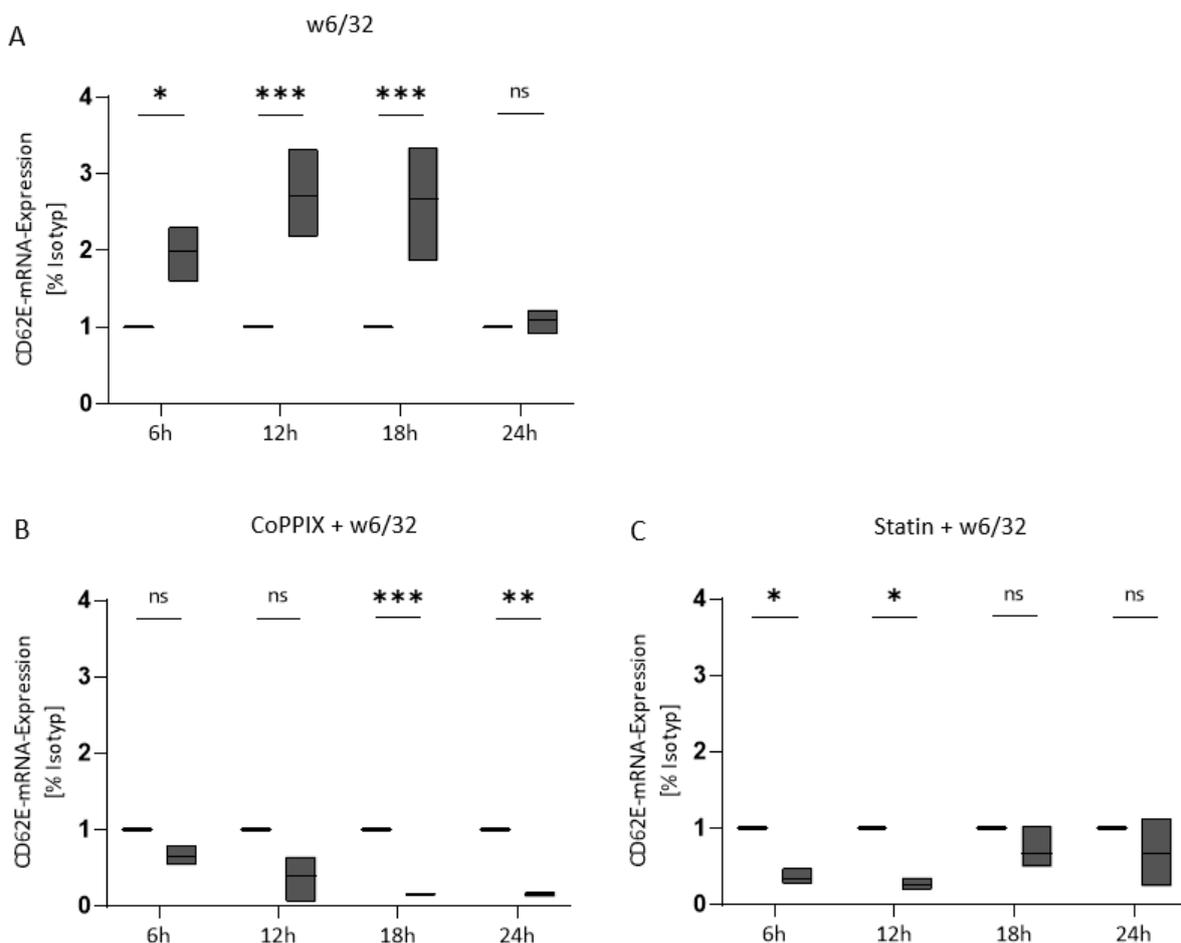


Abbildung 30: Quantifizierung des Effekts der HO-1-Modulation auf die CD62E-mRNA-Expression

(A) HCAEC wurden für 24 h mit 1 µg/ml w6/32 stimuliert und fungierten in diesem Set-up als Kontrolle für Zellen, die für 24 h mit (B) CoPPIX oder (C) Statin inkubiert und anschließend mit dem entsprechenden HO-1-Modulator und 1 µg/ml w6/32 stimuliert wurden. RT-qPCR-Analysen wurden zu den indizierten Zeitpunkten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte relativ zur w6/32-Kontrolle. Signifikante Unterschiede zu jedem Zeitpunkt wurden mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und anschließender Šidák's Korrektur für multiples Testen errechnet. (ns: nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); $n = 3$.

Bei den statinbehandelten Zellen zeigte sich bereits nach sechs Stunden eine signifikante Reduktion der CD62E-mRNA-Expression auf 34,3 %, verglichen mit der Kontrolle (6 h: 1 µg/ml w6/32 [1] vs. Statin + 1 µg/ml w6/32 [0,34]; $p = 0,039$). Nach zwölf Stunden war die Expression auf 25,2 % weiter gesunken (12 h: 1 µg/ml w6/32 [1] vs. Statin + 1 µg/ml w6/32 [0,25]; $p = 0,018$) und erhöhte sich nach 18 Stunden

wieder auf 67,1 % (18 h: 1 µg/ml w6/32 [1] vs. Statin + 1 µg/ml w6/32 [0,67]; $p = 0,6$.) und weiter auf 66,5 % nach 24 Stunden (24 h: 1 µg/ml w6/32 [1] vs. Statin + 1 µg/ml w6/32 [0,66]; $p = 0,79$). Es ergaben sich zu den zwei späteren Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede mehr (Abb.30, C).

Sowohl für den HO-1 Aktivator CoPPIX als auch für die Inkubation mit einem Statin konnte gezeigt werden, dass beide Stimulanzen in der Lage sind, die w6/32-induzierte CD62E-mRNA-Expression zu verringern.

4.4.3.2 Expressionsnachweis auf Proteinebene

Um die bisherigen Ergebnisse der CD62E-mRNA-Expression, die eine Sensitivität gegenüber der HO-1-Modulation gezeigt hatten, auch auf Proteinebene verifizieren zu können, wurde die CD62E-Oberflächenexpression erneut durchflusszytometrisch bestimmt.

Die HCAEC wurden 24 Stunden mit den Modulatoren inkubiert und anschließend mit 1 µg/ml w6/32-Antikörper plus dem Modulator stimuliert. Nach 24 Stunden erfolgte die Färbung mit einem PE-gekoppelten anti-CD62E-Antikörper und mit dem Durchflusszytometer die Quantifizierung der PE-MFI der Zellen (Abb.31). Sowohl bei den mit CoPPIX als auch bei den mit dem Statin behandelten HCAEC kam es zu einer signifikanten Reduktion der PE-MFI im Vergleich zur Kontrolle (1 µg/ml w6/32 [100 %] vs. CoPPIX + 1 µg/ml w6/32 [42,5 %]; $p < 0,0001$ beziehungsweise Statin + 1 µg/ml w6/32 [49,4 %]; $p < 0,0001$) (Abb.31).

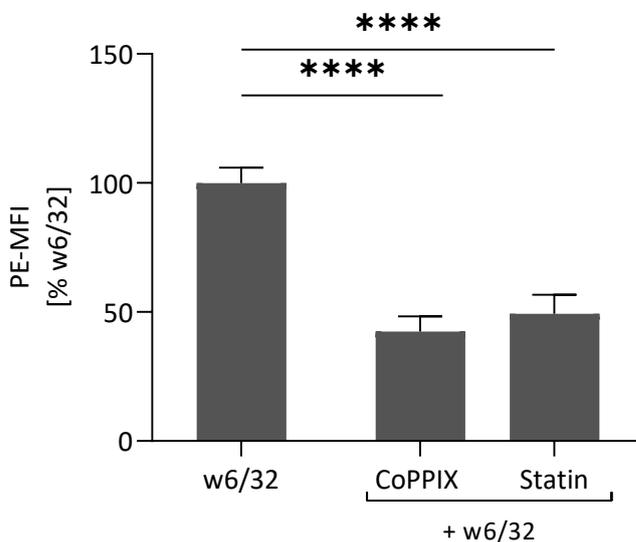


Abbildung 31: CD62E-Oberflächenexpression in Abhängigkeit der HO-1-Aktivität

HCAEC wurden 24 h nach der Inkubation mit den entsprechenden HO-1-Modulatoren für weitere 24 h zusätzlich mit 1 µg/ml des w6/32-Antikörper stimuliert. Anschließend erfolgte die Färbung der HCAEC mit einem PE-gekoppelten anti-CD62E-Antikörper und eine Analyse der PE-MFI. Dargestellt sind die MW ± SEM. Die Datensätze wurden mit einer parametrischen One-Way ANOVA Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede untersucht. Die Korrektur für multiples Testen erfolgte mit einem Šidák's Test. (ns: nicht signifikant; **** $p < 0,0001$); $n = 9$.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass es durch die gezielte Induktion der HO-1-Expression und Aktivität zu einer Reduktion der w6/32-induzierten CD62E-Proteinexpression auf der Oberfläche der HCAEC kommt.

4.5 CD62E-Blockade reduziert w6/32-induzierte Adhäsion und Transmigration

In den vorangegangenen Experimenten konnte beobachtet werden, dass die Stimulation von HCAEC mit dem w6/32-Antikörper zu einer signifikanten Steigerung der Adhäsion und Transmigration von THP-1 führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Antikörper die Expression von CD62E sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene induziert. Das legt die Vermutung nahe, dass die gemessenen Effekte teilweise durch die CD62E-Expression auf der Oberfläche der HCAEC vermittelt werden. Aus diesem Grund wurden die Effekte eines CD62E-blockierenden Antikörpers auf die w6/32-induzierte Adhäsion und Transmigration untersucht.

Die HCAEC wurden 24 Stunden mit dem w6/32-Antikörper oder der Isotypkontrolle stimuliert. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem CD62E-blockierenden Antikörper oder der entsprechenden Isotypkontrolle (Blockkontrolle). Im Anschluss daran wurden die Adhäsions- und Transmigrations-Assays durchgeführt.

Ein Vergleich der w6/32-stimulierten HCAEC offenbarte, dass die Inkubation mit dem CD62E-blockierenden Antikörper eine signifikante Reduktion der adhärenzten Monozyten im Vergleich zu der Blockkontrolle verursacht (Blockkontrolle: 1 µg/ml w6/32 [340,5 %] vs. CD62E-Block: 1 µg/ml w6/32 [198,6 %]; $p < 0,0001$) (Abb.32, A). Die Inkubation mit der Blockkontrolle wirkte sich hingegen nicht auf die w6/32-induzierte Adhäsion der THP-1 aus (Blockkontrolle: 1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [340,5 %]; $p < 0,0001$). Jedoch konnte der Einsatz des CD62E-blockierenden Antikörpers die w6/32-induzierte Adhäsion nicht vollständig unterbinden, da es in Gegenwart des blockierenden Antikörpers immer noch zu einer signifikanten Zunahme der Adhäsion zwischen isotyp- und w6/32-behandelten HCAEC kam (CD62E-Block: 1 µg/ml Isotyp [106,5 %] vs. w6/32 [198,6 %]; $p < 0,0001$).

Auch in den Transmigrations-Assays führte die Inkubation der HCAEC mit dem CD62E-blockierenden Antikörper dazu, dass die w6/32-induzierte signifikante Zunahme der Transmigration nicht mehr zu beobachten war (CD62E-Block: 1 µg/ml Isotyp [151,9 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [138,5 %]; $p = 0,96$). Bei den mit der Blockkontrolle inkubierten HCAEC blieb die w6/32-induzierte signifikante Steigerung der Transmigration im Vergleich zum Isotyp bestehen (Blockkontrolle: 1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 1 µg/ml w6/32 [226,3 %]; $p < 0,0001$). Durch den Einsatz des CD62E-blockierenden Antikörpers kam es zu einer signifikanten Reduktion der w6/32-induzierten Transmigration, verglichen mit der Blockkontrolle (Blockkontrolle: 1 µg/ml w6/32 [226,3 %] vs. CD62E-Block: 1 µg/ml w6/32 [138,5 %]; $p = 0,0018$).

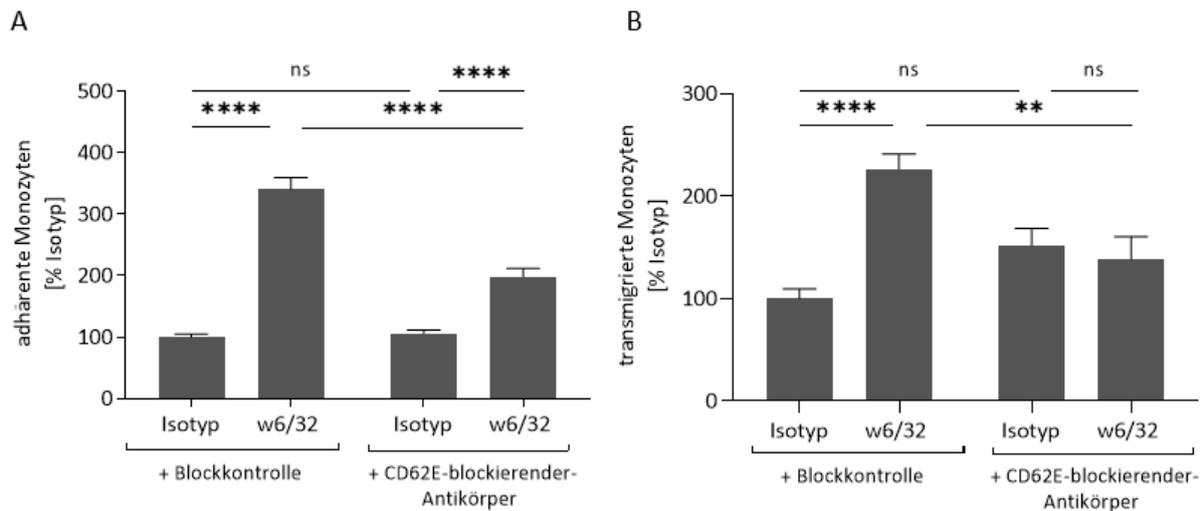


Abbildung 32: Effekte der CD62E-Blockade auf die w6/32-induzierte Adhäsion und Transmigration

HCAEC wurden 24 h mit dem w6/32-Antikörper stimuliert und anschließend mit einem CD62E-blockierenden Antikörper bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle für 1 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein (A) Adhäsions- bzw. (B) Transmigrations-Assay. Dargestellt sind die MW \pm SEM relativ zu HCAEC, die mit der Isotypkontrolle stimuliert und mit der Blockkontrolle inkubiert wurden. Das Vorhandensein signifikanter Unterschiede wurde mit einer One-Way ANOVA analysiert und mit einem Šidák's Test für multiples Testen korrigiert (ns: nicht signifikant; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$); $n = 9$.

Die Stimulation der HCAEC mit dem anti-HLA-I-Antikörper w6/32 führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Adhäsion und Transmigration von THP-1 an beziehungsweise über einen endothelialen Monolayer. Diese Effekte ließen sich durch die Inkubation der HCAEC mit einem CD62E-blockierenden Antikörper vor den Adhäsions- und Transmigrations-Assays reduzieren. Dieser Befund legt nahe, dass die w6/32-induzierten Effekte teilweise durch die Bindung des Adhäsionsrezeptors CD62E auf der Oberfläche der HCAEC vermittelt werden.

4.6 SF1-1.1-Antikörper induziert Adhäsion und Transmigration im murinen System

Der Haupteffekt des anti-HLA-I-Antikörpers w6/32 auf HCAEC ist eine konzentrationsabhängige Steigerung sowohl von Adhäsion als auch von Transmigration der THP-1. Diese im humanen System beobachteten Effekte wurden ebenfalls im murinen System *in vitro* untersucht. Hierfür wurden Endothelzellen aus einer Balb/s-Maus 24 Stunden mit dem anti-MHC-I-Antikörper SF1-1.1 stimuliert und anschließend die Adhäsions- und Transmigrations-Assays mit murinen Monozyten (RAW 264.7) durchgeführt. Simultan zu den humanen Assays wurden bei den murinen Adhäsions-Assays die Anzahl der CTG gefärbten Monozyten an der Gesamtzellzahl mit einem Durchflusszytometer quantifiziert (Abb.33, A). Hierbei zeigte sich, dass es durch Stimulation mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ SF1-1.1 zu einer signifikanten Zunahme der adhärenen RAW 264.7 kommt (1 $\mu\text{g/ml}$ Isotyp [100 %] vs. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ SF1-1.1 [183,58 %]; $p = 0,0008$). Auch die Stimulation mit der 10-fachen Konzentration des SF1-1.1-Antikörpers führte zu einer signifikant höheren Adhäsion der RAW 264.7 an den endothelialen Monolayer verglichen mit der Kontrolle (1 $\mu\text{g/ml}$ Isotyp [100 %] vs. 1 $\mu\text{g/ml}$ SF1-1.1 [161,27 %]; $p = 0,004$). Im Unterschied zu den humanen

Adhäsions-Assays kam es im murinen System zu keiner konzentrationsabhängigen Steigerung der Adhäsion (0,1 µg/ml SF1-1.1 [183,58 %] vs. 1 µg/ml SF1-1.1 [161,27 %]; n.s.) (Abb.33, B).

Die SF1-1.1-induzierte Transmigration wurde über die Impedanzmessung des xCELLigence-Systems quantifiziert (Abb.33, C). Die murinen Endothelzellen wurden 24 Stunden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen des SF1-1.1-Antikörpers stimuliert und anschließend das Transmigrations-Assay gestartet. Die Rate der transmigrierten RAW 264.7 war nach einer Stimulation der Endothelzellen mit 0,1 µg/ml SF1-1.1 im Vergleich zur Isotypkontrolle signifikant höher (1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 0,1 µg/ml SF1-1.1 [181,73 %]; $p = 0,008$). Auch die Stimulation mit 1 µg/ml SF1-1.1 induzierte eine signifikante Zunahme der transmigrierten Monozyten relativ zu den isotypbehandelten Zellen (1 µg/ml Isotyp [100 %] vs. 1 µg/ml SF1-1.1 [196,28 %]; $p < 0,011$) (Abb.33, D).

Damit lässt sich feststellen, dass ein anti-MHC-I-Antikörper auch im murinen System Einfluss auf die Interaktionen zwischen Monozyten und Endothelzellen ausübt. Die Stimulation der EC resultiert in einer gesteigerten Adhäsion und Transmigration der Monozyten.

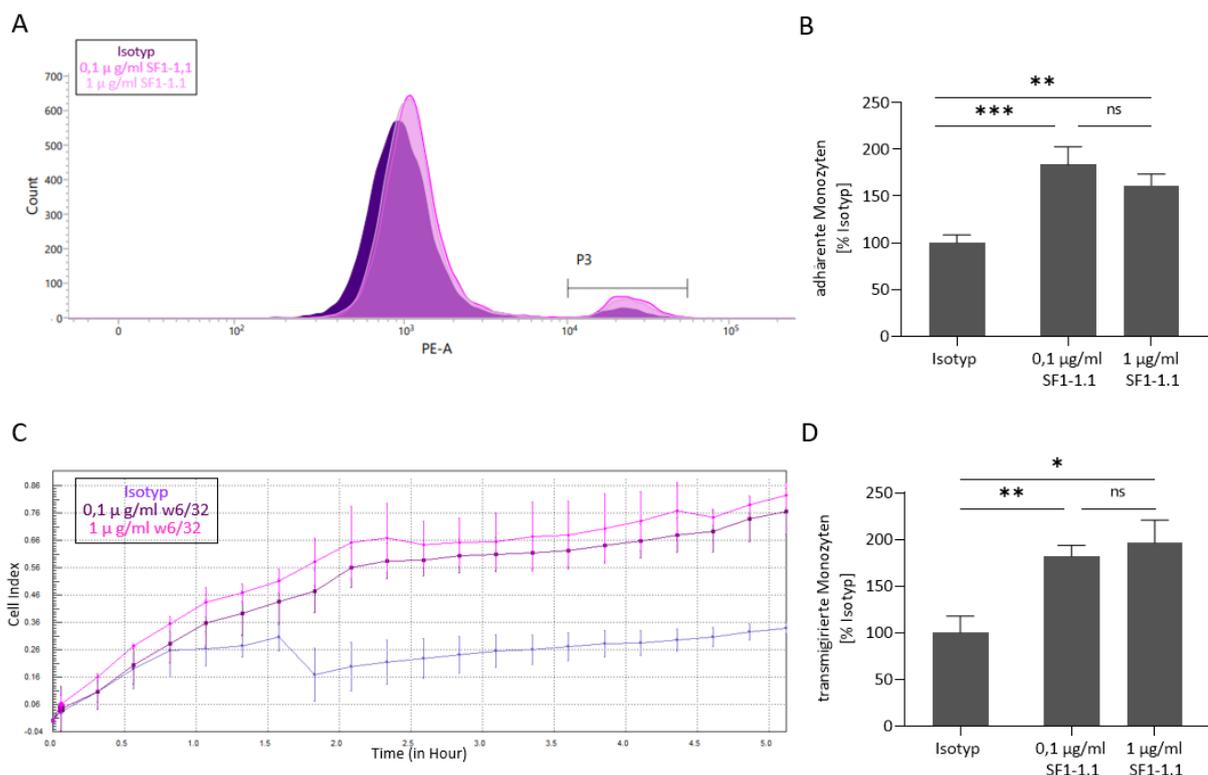


Abbildung 33: Quantifizierung der SF1-1.1-Antikörper-induzierten Adhäsion und Transmigration

Die murinen Endothelzellen aus Balb/c Mäusen wurden 24 h mit 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml des SF1-1.1-Antikörpers bzw. der Isotypkontrolle inkubiert. (A) Das repräsentative durchflusszytometrische Schaubild zeigt eine Zunahme der adhärenz Monozyten im Gate P3 nach Antikörperstimulation. (B) Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten normalisiert auf die Isotypkontrolle; $n = 12$. (C) Das repräsentative xCELLigence Schaubild zeigt die Zunahme der Transmigration der Monozyten abhängig von der gewählten Intervention. (D) Statistische Auswertung der AUC, normalisiert auf die Isotypkontrolle; $n = 9$.

Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM und wurden mit dem nicht parametrischen Kruskal-Wallis Test auf signifikante Unterschiede untersucht, Korrektur für multiples Testen erfolgte mit der Dunn's Methode. (ns: nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

4.7 SF1-1.1-Antikörper verursacht eine Transplantatvaskulopathie *in vivo*

4.7.1 SF1-1.1-Antikörper induziert neointimale Hyperplasie

Für die vorliegende Arbeit wurde ein anerkanntes Mausmodell der allogenen Aorten-Transplantation etabliert und zunächst dessen Effekte überprüft (Koulack, McAlister et al. 1995). Die wöchentliche Applikation des SF1-1.1-Antikörpers in Rag2-KO Mäusen, denen eine Segment der thorakalen Aorta von Balb/c Mäusen transplantiert wurde, führt zu einer Hyperplasie der Intima und damit zu der Bildung einer Neointima, ein Merkmal der TV (Abb.34, A + B). Für die Quantifizierung der Neointima und den Vergleich der TV-Ausprägung zwischen den Gruppen wurde der Neointima-Index für den gesamten Gefäßquerschnitt berechnet (Abschnitt 3.34.2). Hierbei wird der prozentuale Anteil der Neointima an der von der *Membrana elastica interna* umschlossenen Fläche (Neointima + Lumen) berechnet.

Die kollagenhaltigen Bindegewebsschichten in der Gefäßwand können in der histochemischen Abbildungen gut identifiziert werden (Abb.34, B, Pfeile). Diese definieren den Bereich der Media, die überwiegend aus glatten Muskelzellen bestehen. Die Transplantate der SF1-1.1-behandelten Mäuse zeigten eine signifikante Zunahme des Neointima-Indexes und somit eine Reduktion des Gefäßlumens im Vergleich zu den Mäusen der Kontrollgruppe, welche nur mit dem Isotyp behandelt wurden (Isotyp [20.23] vs. SF1-1.1 [51.27]; $p = 0,0013$) (Abb.34 C).

Da Rag2-KO Mäuse aufgrund der Nullmutation des Rekombinase-aktivierenden Gens-2 keine funktionalen T- und B-Zellen bilden können und daher keinen immunkompetenten Mausstamm darstellen, wurde das Gewicht der Mäuse wöchentlich überprüft (Abb.34, D), um Infektionen oder andere Komplikationen auszuschließen, die sich in einem rapiden Gewichtsverlust äußern würden. Die Gewichtsbestimmung diente des Weiteren dem Zweck, die zu applizierende Antikörperdosis an das aktuelle Gewicht anzupassen. Die Entwicklung der Gewichtszunahme zwischen Mäusen, die mit dem Isotyp behandelt wurden, zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Mäusen, die mit dem SF1-1.1-Antikörper behandelt wurden. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass sich durch die Applikation des Antikörpers eine systemische Inflammation entwickelt hat, die zu einer Formation der Neointima beiträgt.

Für den Nachweis des SF1-1.1-Antikörpers im Plasma der Mäuse wurde eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Das Plasma der Mäuse wurde mit CD3⁺ Balb/c Splenozyten inkubiert, die das MHC-Molekül H-2K^d exprimieren. Der Nachweis der gebundenen SF1-1.1-Antikörper auf den Splenozyten erfolgte mit einem PE-gekoppelten anti-IgG-Antikörper. Splenozyten, die mit dem Plasma der SF1-1.1-behandelten Mäuse inkubiert wurden, zeigten eine signifikant höhere PE Fluoreszenzintensität im Vergleich zu dem Plasma der isotypbehandelten Mäuse (Isotyp [100 %] vs. 1 µg/ml SF1-1.1 [379,2 %]; $p = 0,0001$) (Abb.34, E).

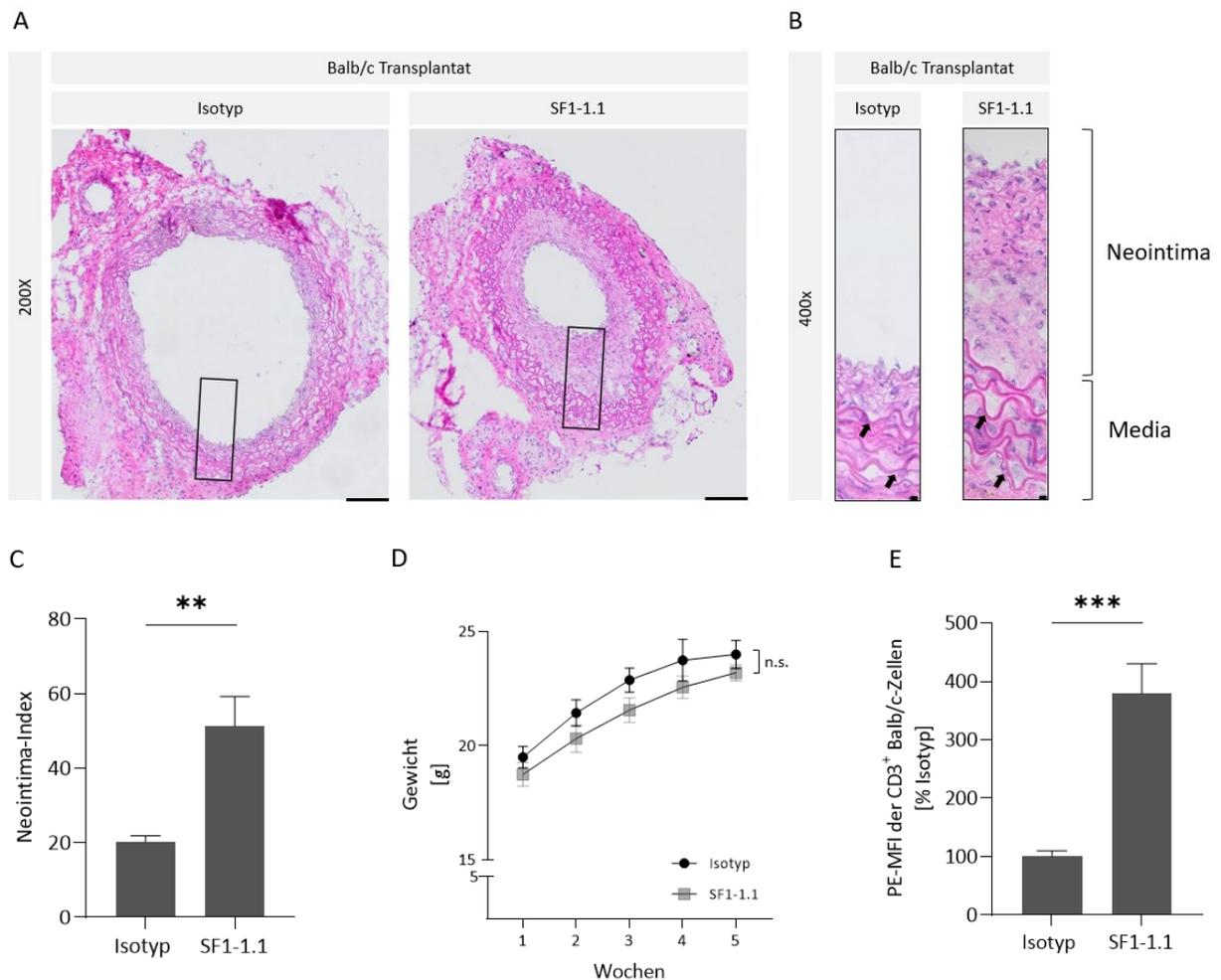


Abbildung 34: Quantifizierung der SF1-1.1-induzierten neointimalen Hyperplasie *in vivo*

Lichtmikroskopische Aufnahme der chromogenen HE Färbung der Kryoschnitte von transplantierten Balb/c Aorten bei (A) 200-facher (Messbalken = 100 μ m) und (B) 400-facher Vergrößerung (Messbalken = 5 μ m). Schnitt durch das Transplantat einer Isotyp (links; n = 8) - bzw. SF1-1.1 (rechts; n = 7) - behandelten Maus. (C) Quantifizierung des Neointimal Indexes der Transplantate, berechnet anhand der HE Bilder. Die Daten sind dargestellt als MW \pm SEM und wurden mit einem parametrischen Student's t-Test auf signifikante Unterschiede überprüft (** $p < 0,01$). (D) Der Verlauf der Gewichtsentwicklung (MW \pm SEM) zwischen der Isotyp (schwarz)- und der SF1-1.1 (grau)- behandelten Gruppe wurde mit einer Two-Way ANOVA Varianzanalyse bewertet; (n.s.: nicht signifikant). (E) Statistische Auswertung der Durchflusszytometeranalysen für den Nachweis des SF1-1.1-Antikörpers im Plasma der Mäuse. Gemessen wurde die MFI (MW \pm SEM) des PE-gekoppelten anti-IgG-Antikörpers auf CD3⁺ Balb/c Splenozyten. Die parametrischen Daten wurden mit einem Student's t-Test auf signifikante Unterschiede untersucht (** $p < 0,001$).

Mit den morphometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die wöchentliche Gabe eines anti-MHC-I-Antikörpers ausreichend ist, um in dem Transplantat eine spezifische TV auszulösen. Die TV manifestiert sich in der Ausbildung einer Neointima und einem damit einhergehenden reduzierten Gefäßlumen.

4.7.2 SF1-1.1-Antikörper vermittelt keine Effekte in den nativen Gefäßen

Bei der Entnahme der Transplantate am Ende des Versuchs wurde auch ein kurzes Segment der nativen *Aorta abdominalis* der Rag2-KO Mäuse entnommen und immunhistochemisch aufbereitet. Für die HE-Färbungen in Abbildung 35 wurden native Aorten von Mäusen verwendet, die entweder mit dem SF1-

1.1-Antikörper oder mit der Isotypkontrolle behandelt wurden. Dies diente dem Nachweis, dass die Entwicklung der TV durch spezifische Wechselwirkungen zwischen dem SF1-1.1-Antikörper und den H-2K^d Molekülen auf der Oberfläche der EC im Transplantat zustande kommen. Die HE-Bilder der nativen Rag2-KO Aorta zeigten, dass es zu keiner neointimale Hyperplasie gekommen ist und keine Neointima gebildet wurde (Abb.35). Die Media wird zum Lumen hin von der *Membrana elastica interna* (Abb.35, B, Pfeil) abgegrenzt und es zeigte sich keine Reduktion des Gefäßlumens.

Hiermit konnte bestätigt werden, dass der SF1-1.1-Antikörpers spezifisch an die EC des Transplantats bindet und sich auch nur im Transplantat eine TV entwickelte. Der Antikörper verursachte keine systemische Reaktion, die auch die restlichen Gefäße außerhalb des Transplantats betroffen hätten.

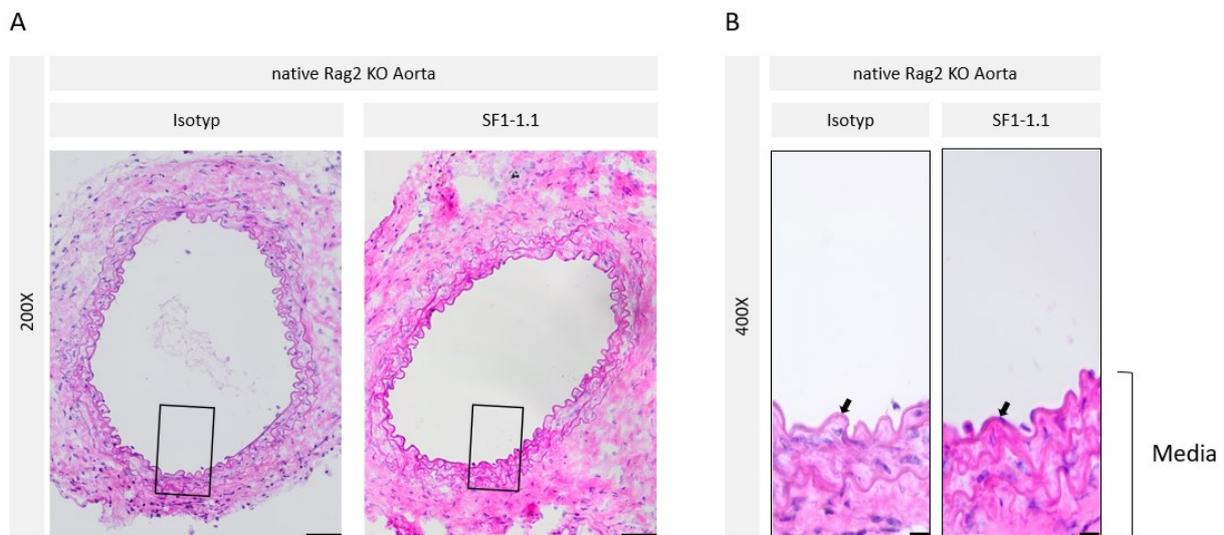


Abbildung 35: HE-Bilder der Kryoschnitte von Segmenten der nativen Rag2-KO Aorta

Der Aufbau der Gefäßwand ist regelrecht und lässt keine Formation einer Neointima erkennen. Lichtmikroskopische Aufnahme der chromogenen HE Färbung der Kryoschnitte von nativen Rag2-KO Aorten bei (A) 200-facher (Messbalken = 50 μ m) und (B) 400-facher Vergrößerung (Messbalken = 10 μ m). Schnitt durch die Aorta einer isotyp- bzw. SF1-1.1-behandelten Maus.

4.7.3 SF1-1.1-Antikörper induziert ein monozytären Infiltrates und CD62E-Expression

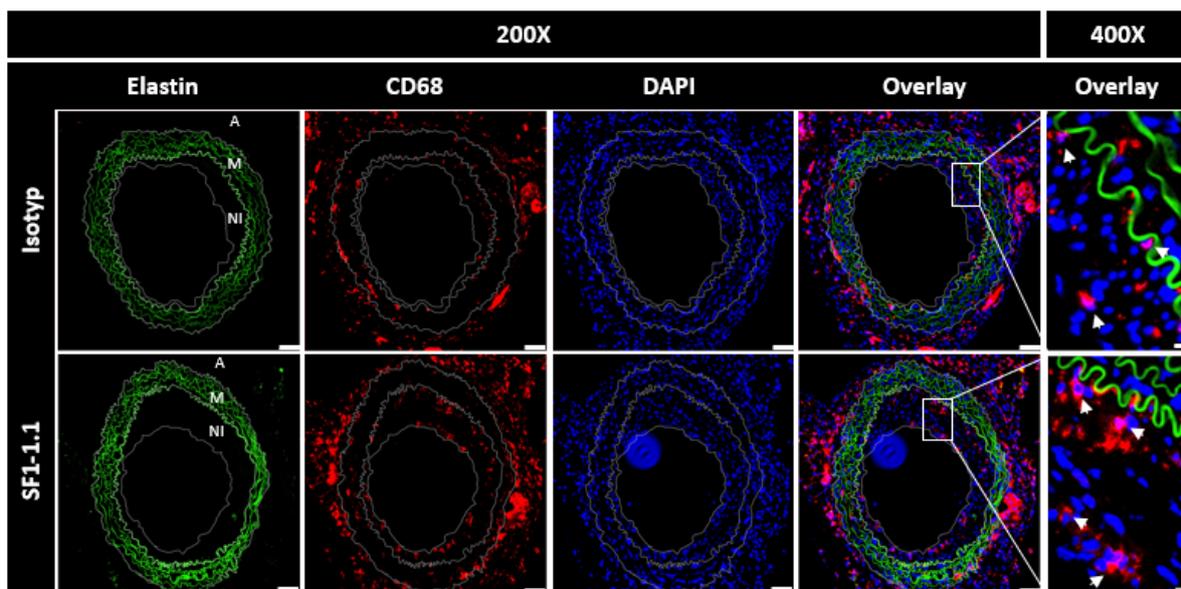
In den *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem w6/32- oder SF1-1.1-Antikörper zu einer verstärkten Adhäsion und Transmigration der Monozyten an beziehungsweise über einen endothelialen Monolayer führt. Neben der Bildung einer Neointima und einer damit verbundenen Reduktion des Lumens ist ein weiteres Kennzeichen der Pathophysiologie der TV ein monozytäres Infiltrat, das sich in der Gefäßwand bildet. Um die Auswirkungen des SF1-1.1-Antikörpers in dem Mausmodell auf die Interaktionen zwischen Monozyten und EC zu quantifizieren, wurden an den Gefrierschnittpräparaten der transplantierten Aorten eine Monozytenfärbung durchgeführt.

4.7.3.1 Quantifizierung des monozytären Infiltrats

Die Monozyten konnten durch eine CD68-Färbung visualisiert werden. In den immunhistochemischen Abbildungen war die Formierung eines monozytären Infiltrates in der Gefäßwand der SF1-1.1-

behandelten Mäuse deutlich zu erkennen (Abb.36, A.). Für eine bessere Übersicht der Gefäßstrukturen ist die Autofluoreszenz des Elastins der *Tunica media* in grün dargestellt und die einzelnen Schichten der Gefäßwand sind kenntlich gemacht (NI = Neointima, M = Media, A = Adventitia). Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Die statistische Auswertung zeigte eine signifikante Steigerung der Anzahl der Monozyten in der Gefäßwand in Abhängigkeit der SF1-1.1-Antikörperapplikation im Vergleich zu den Mäusen, die mit dem Isotyp behandelt wurden (Isotyp [4,28] vs. SF1-1.1 [10,03]; $p = 0,002$) (Abb.36, B.).

A



B

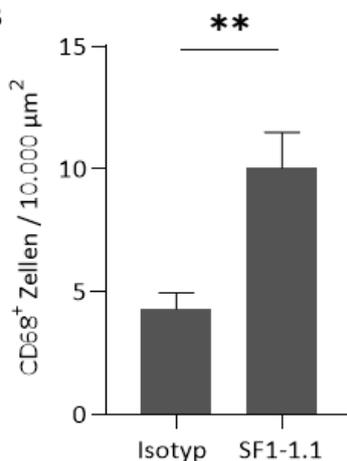


Abbildung 36: Quantifizierung des SF1-1.1 induzierten monozytären Infiltrats

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200-facher Vergrößerung der immunhistochemischen Färbungen für Elastin (grün, Autofluoreszenz), CD68⁺ Monozyten (rot), Zellkerne (DAPI), und Overlay; Messbalken = 50 μm. A = Adventitia, M = Media, NI = Neointima. Gekennzeichnete Ausschnitte wurden bei 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Pfeile indizieren Monozyten; Messbalken = 5 μm. (B) Statistische Auswertung der Monozytenzahl; (MW ± SEM). Daten wurden mittels parametrischen Student's t-Test auf signifikante Unterschiede getestet (** $p < 0,01$).

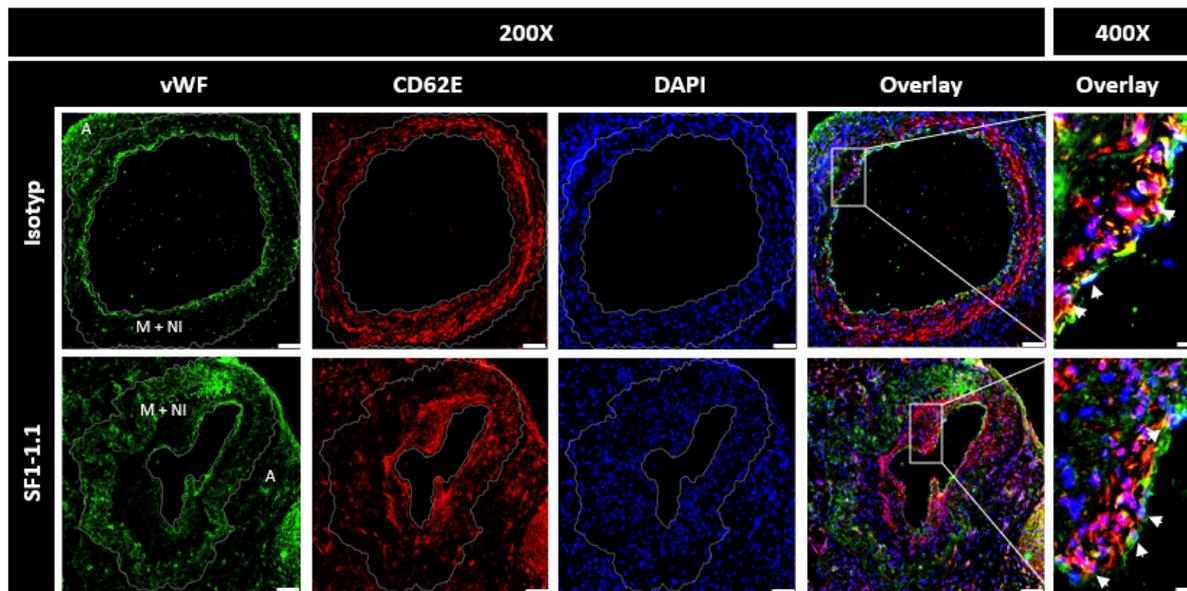
Es konnte belegt werden, dass der SF1-1.1-Antikörper neben einer neointimalen Hyperplasie auch die Formierung einer monozytären Infiltrats in der Gefäßwand induziert. Die Transmigration von Leukozyten in die Gefäßwand von Transplantaten ist ein weiteres Merkmal einer sich ausbildenden TV.

4.7.3.2 Quantifizierung der CD62E-Expression auf Endothelzellen

In den *in vitro* Experimenten führte die Stimulation mit dem w6/32-Antikörper zu einer gesteigerten Expression des Adhäsionsrezeptors CD62E auf der Oberfläche der EC. Der Einsatz eines CD62E-blockierenden Antikörpers reduzierte die w6/32-induzierten Adhäsion und Transmigration von Monozyten. In dem Mausmodell resultierte die Applikation des SF1-1.1-Antikörpers in einer TV in dem transplantierten Gefäß und in der Bildung eines monozytären Infiltrats in der Gefäßwand. Um zu überprüfen, ob die Expression von CD62E auf EC durch den Antikörper auch *in vivo* induziert wird und dies die vermehrte Transmigration von Monozyten bewirkt, erfolgte an den Gefrierschnitten der Transplantate eine CD62E/EC-Doppelfärbung. Als EC-Marker wurde der von-Willebrand-Faktor (vWF) verwendet (Abb.37).

In den immunhistologischen Aufnahmen zeigte sich, dass vor allem diejenigen Zellen viel vWF exprimieren, die die Neointima zur Zirkulation abgrenzen. Diese Zellen können daher dem EC-Kompartiment zugerechnet werden. Die vaskulären Strukturen sind in den Fluoreszenzaufnahmen des vWF-Faktors gekennzeichnet (NI + M = Neointima + Media, A = Adventitia). Das starke Signal in der Media geht teilweise auf die Autofluoreszenz von Elastin zurück. Elastin emittiert Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda \approx 490$ nm (Li, Yan et al. 2020) und wird damit mit dem gleichen Detektor wie das für den vWF-Nachweis verwendete AF488 gemessen. In den Aufnahmen, die mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen wurden, zeigt sich eine deutliche Abgrenzung der Neointima durch EC. Die relative Anzahl der CD62⁺/vWF⁺ doppelpositiven Zellen an vWF⁺ positiven Zellen unterschied sich nicht zwischen den Transplantaten aus der SF1-1.1- und isotypbehandelten Mäusen. Die Anzahl der doppelpositiven Zellen in der antikörperbehandelten Gruppe lag bei 56,18 % und bei der Kontrollgruppe bei 53,28 % (Abb.37, B).

A



B

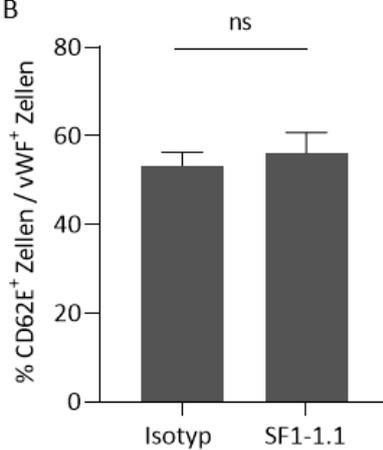


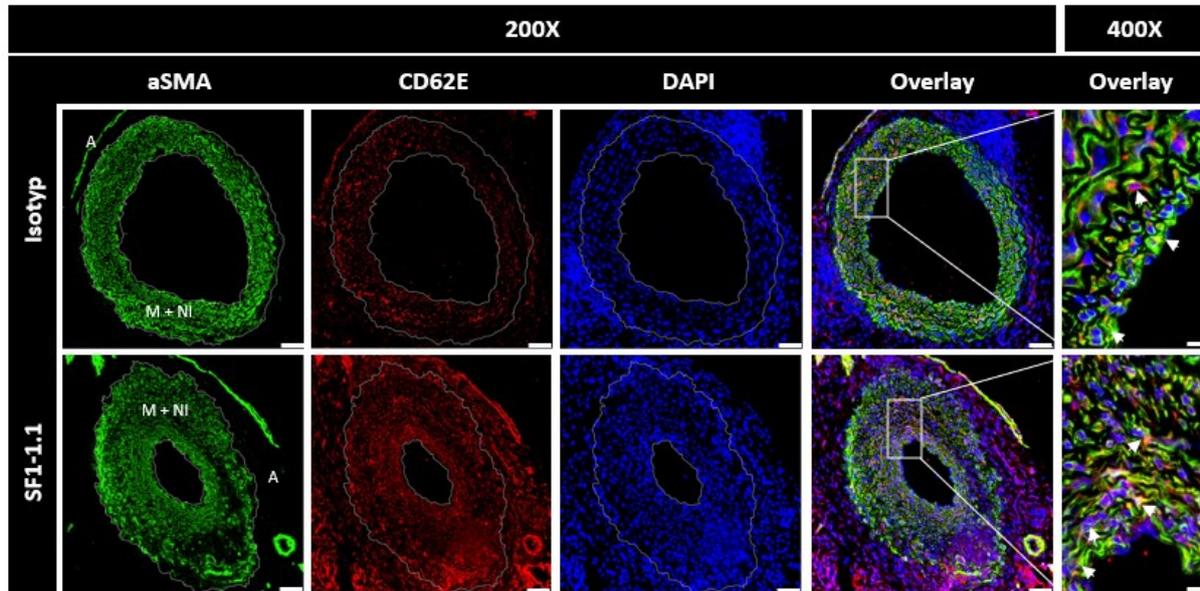
Abbildung 37: Quantifizierung der CD62E-Expression auf EC in Transplantaten

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen für CD62E (rot), EC (vWF, grün), Zellkerne (DAPI) und Overlay bei 200-facher Vergrößerung (Messbalken = 50 μ m). Gekennzeichnete Ausschnitte wurden bei 400-facher Vergrößerung (Messbalken = 5 μ m) aufgenommen; Pfeile indizieren CD62E-exprimierende EC. (B) Statistische Auswertung der relativen Anzahl der CD62E-exprimierenden EC. Die parametrischen Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler und wurden mit einem Student's t-Test auf signifikante Unterschiede getestet, (n.s.: nicht signifikant)

4.7.3.3 Quantifizierung der CD62E-Expression auf glatten Muskelzellen

Die Reduktion des Gefäßlumens während einer TV ist auf die Migration und Proliferation von VSMC aus der Media in die Intima zurückzuführen. Die Proliferation der Zellen verursacht eine Neointima und bildet den dominanten Zelltyp dieser Struktur. Die Gefrierschnittpräparate wurden mit einem anti- α SMA-Antikörper behandelt, um die VSMC sichtbar zu machen (Abb. 38, A). Die VSMC erstrecken sich über den kompletten Bereich von Neointima und Media (NI+ M), sind aber nicht in der Adventitia zu finden (A).

A



B

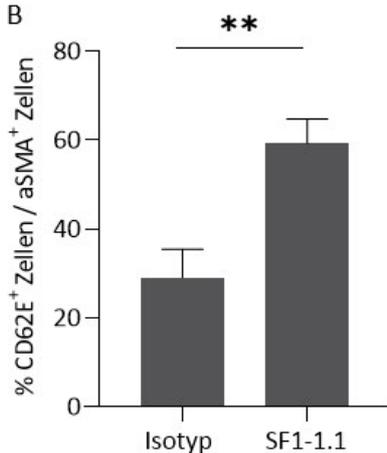


Abbildung 38: Quantifizierung der CD62E-Expression auf VSMC in Transplantaten

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen für CD62E (rot), VSMC (grün), Zellkerne (DAPI) und Overlay bei 200-facher Vergrößerung (Messbalken = 50 μ m). Gekennzeichnete Ausschnitte wurden bei 400-facher Vergrößerung (Messbalken = 5 μ m) aufgenommen; Pfeile indizieren CD62E-exprimierende VSMC. (B) Statistische Auswertung der relativen Anzahl der CD62E-exprimierenden VSMC. Die parametrischen Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler und wurden mit einem Student's t-Test auf signifikante Unterschiede getestet (** $p < 0,01$).

Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind die Neointima-bildenden VSMC zu erkennen. Darüber hinaus ist bei den Transplantaten der SF1-1.1-behandelten Mäusen auch die Struktur der Neointima deutlich zu erkennen. Diese ist nicht kompakt und maximal geordnet wie bei der Media, sondern zeigt stellenweise eine ungeordnete Zusammensetzung. Verursacht wird dies durch die Produktion und Akkumulation von ECM.

Um zu überprüfen, ob es während der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie zu einer gesteigerten CD62E-Expression auf den VSMC kommt, wurde eine CD62E/VSMC Doppelfärbung durchgeführt. Die immunhistologischen Abbildungen zeigten das Vorhandensein von CD62E⁺/aSMA⁺ doppelpositiven Zellen. Durch die statistische Auswertung konnte eine signifikant höhere Anzahl an CD62E-

exprimierenden VSMC in Relation zu der Gesamtzahl an VSMC festgestellt werden. In den Transplantaten der mit dem SF1-1.1-Antikörper behandelten Mäusen zeigten 59 % der VSMC eine CD62E-Expression auf ihrer Oberfläche. Bei den Transplantaten der Kontrollmäuse waren es lediglich 29 % der VSMC, die dieses Oberflächenmolekül exprimierten (Isotyp [29,05 %] vs. SF1-1.1 [59,22 %]; $p = 0,003$) (Abb.38, B.).

Somit lässt sich festhalten, dass es durch die Gabe des Antikörpers zu keiner verstärkten CD62E-Expression der EC in der Gefäßwand gekommen ist. Allerdings führte die SF1-1.1-Applikation zu einer verstärkten CD62E-Expression auf den VSMC.

4.8 HO-1 Aktivität moduliert die Ausprägung der Transplantatvaskulopathie *in vivo*

4.8.1 Aktivierte HO-1 reduziert die neointimale Hyperplasie

In den zellkultur- und molekularbiologischen Experimenten wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit CoPPiX oder dem Statin die antikörperinduzierten Effekte verringert. Dementsprechend wurden diese Substanzen im Mausmodell auf ihre protektiven Eigenschaften getestet. Bei der Verstoffwechslung von Häm durch HO-1 wird gasförmiges CO freigesetzt, das viele der antiinflammatorischen Eigenschaften der HO-1 vermittelt. Um den Effekt des HO-1-Metaboliten CO auf die Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie zu untersuchen, wurde einer weiteren Versuchsgruppe CORM-401 (CO-freisetzendes Molekül) appliziert.

Die immunhistologischen Färbungen der Gefrierschnittpräparate zeigten eine deutliche Reduktion der Neointima in den Transplantaten dieser Gruppen (Abb.39, A). Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Verringerung des Neointima Indexes bei Mäusen, die zusätzliche zur SF1-1.1-Applikation auch mit dem HO-1-Aktivator CoPPiX behandelt wurden (SF1-1.1 [51,27] vs. CoPPiX + SF1-1.1 [28,18]; $p = 0,026$) (Abb.39, B). Die tägliche Aufnahme von Statinen über das Trinkwasser führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Neointima im Vergleich zu den Kontrollmäusen, die nur mit dem SF1-1.1-Antikörper behandelt wurden (SF1-1.1 [51,27] vs. Statin + SF1-1.1 [29,97]; $p = 0,028$).

Durch die Applikation von CORM-401 dreimal die Woche über eine Schlundsonde konnten die SF1-1.1-induzierten Effekte auf die neointimale Hyperplasie ebenso signifikant verringert werden (SF1-1.1 [51,27] vs. CORM + SF1-1.1 [23,55]; $p = 0,004$).

In der Gewichtsentwicklung der vier unterschiedlichen Interventionsgruppen kam es zu keinem signifikanten Unterschied während des 30-tägigen Experiments (Abb.39, C). In allen Versuchsgruppen konnte der SF1-1.1-Antikörper im Plasma der Mäuse nachgewiesen werden (Abb.39, D). In der CoPPiX-behandelten Gruppe, als auch in der Statin- und CORM-401-behandelten Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied der PE-MFI der CD3⁺ Splenozyten im Vergleich zu der Kontrollgruppe (SF1-1.1 [100 %] vs. CoPPiX + SF1-1.1 [89,84 %]; $p = 0,886$ vs. Statin + SF1-1.1 [123,1 %]; $p = 0,372$ vs. CORM + SF1-1.1 [130,7 %]; $p = 0,18$)

Dieser Versuchsteil zeigte, dass die HO-1 auch in dem hier gezeigten *in vivo* Mausmodell protektive Effekte gegenüber der SF1-1.1-induzierten Neointima und einer Gefäßokklusion hat.

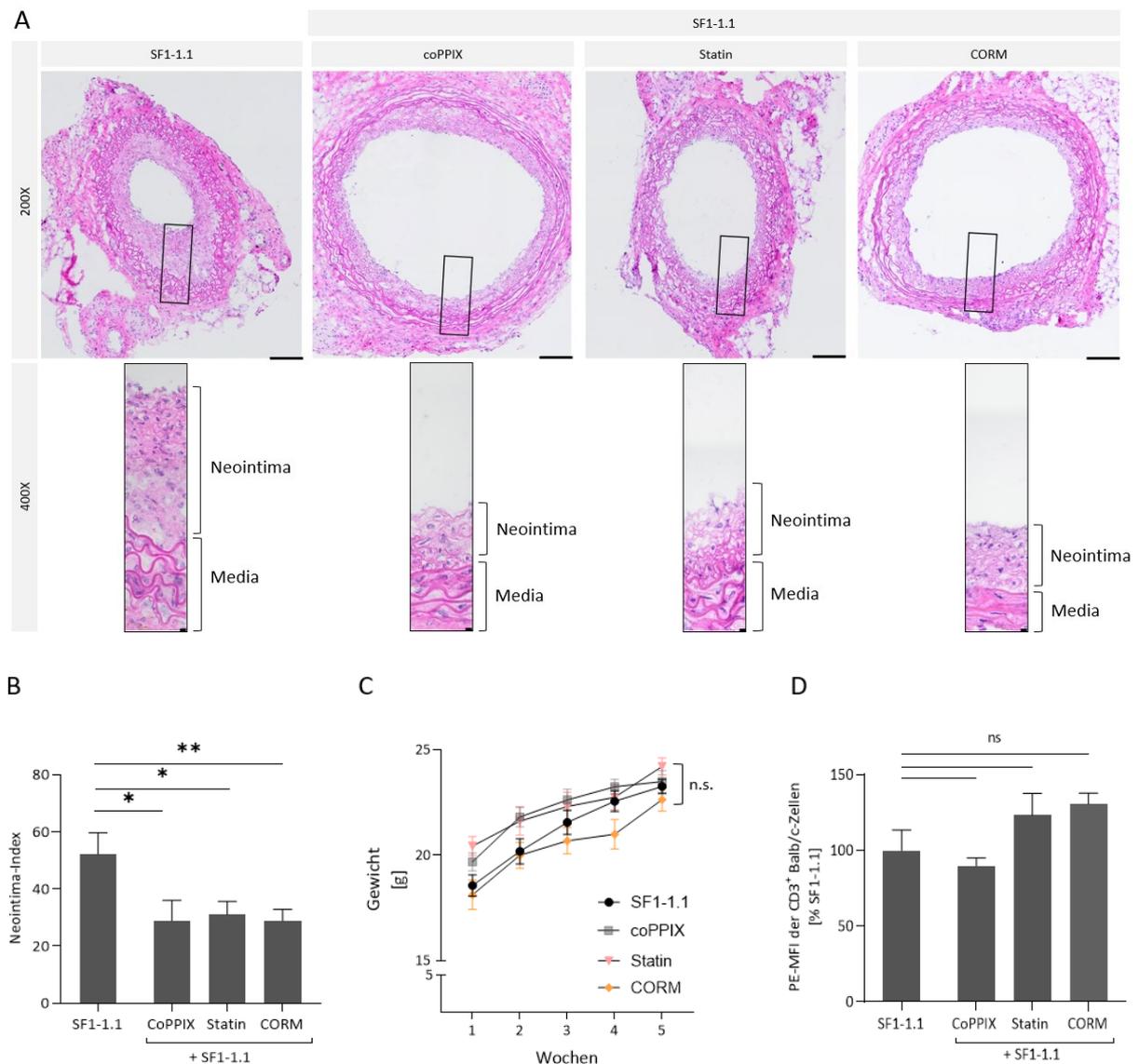


Abbildung 39: Quantifizierung des Effekts der HO-1-Modulation auf die neointimalen Hyperplasie

(A) Lichtmikroskopische Aufnahme der chromogenen HE Färbung der Transplantate bei 200-facher (oben, Messbalken = 100 μ m) und 400-facher (unten, Messbalken = 5 μ m) Vergrößerung. Links: SF1-1.1-behandelte Maus, rechts: Mäuse, die zusätzlich zu der SF1-1.1-Applikation einer HO-1-Modulation unterzogen wurden (links: CoPPIX (n = 6), mittig: Statin (n = 8), rechts: CORM (n = 7)). (B) Statistische Auswertung des neointimalen Indexes (MW \pm SEM). (C) Gewichtsentwicklung (MW \pm SEM) über den Zeitraum des Experiments. Die Gewichtsentwicklung zeigt keinen statistisch relevanten Unterschied zwischen den 4 Gruppen. Auswertung erfolgte mit einer Two-Way ANOVA Varianzanalyse (ns: nicht signifikant). (D) Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen für den Nachweis des SF1-1.1-Antikörpers im Plasma der Mäuse. Gemessen wurde die MFI (MW \pm SEM) des PE-gekoppelten anti-IgG-Antikörpers auf CD3⁺ Balb/c Splenozyten.

Die parametrischen Daten (B + D) wurden mit einer One-Way Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede untersucht. Korrektur für multiples Testen erfolgte mit einer Šidák's Korrektur (ns: nicht signifikant; *p < 0,05; **p < 0,01).

4.8.2 Aktivierte HO-1 verringert das monozytäre Infiltrat in der Gefäßwand

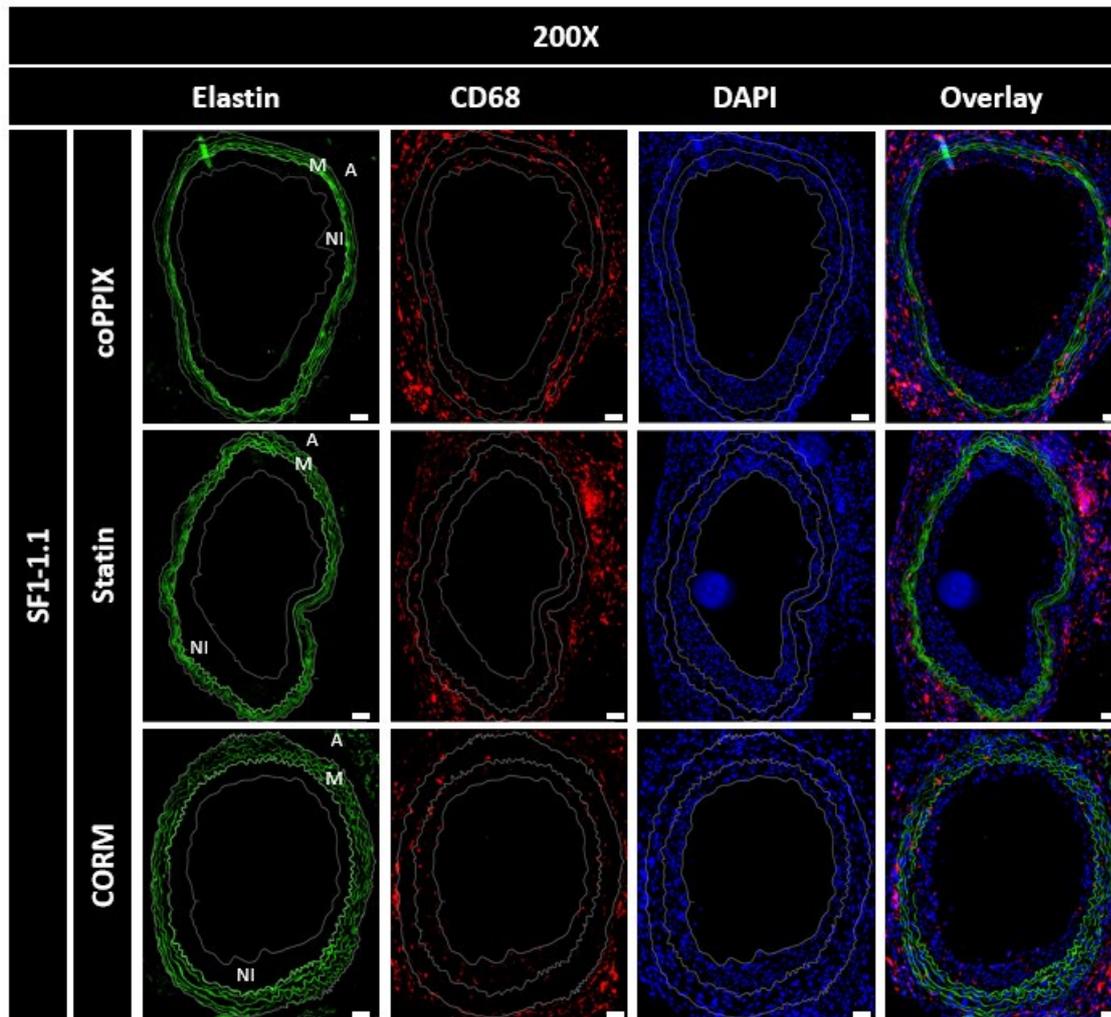
Die Auswirkungen der HO-1-Aktivierung auf die Ausprägung des monozytären Infiltrats wurde in diesem Versuchsteil analysiert. Wie bereits gezeigt, führt die gezielte Aktivierung beziehungsweise eine gesteigerte Expression der HO-1 zu einer verringerten SF1-1.1-Antikörper-induzierten Neointima und somit zu einem reduzierten neointimalen Index. Auch für die Ausprägung des monozytären Infiltrates konnte ein Einfluss der HO-1-Aktivität in immunhistochemischen Untersuchungen nachgewiesen werden (Abb.40, A). Die unterschiedlichen Strukturen der Gefäßwand sind gekennzeichnet durch Neointima (NI), Media (M) und Adventitia (A).

Die wöchentliche Applikation des HO-1-Aktivators CoPPIX zusätzlich zu der SF1-1.1-Applikation verursachte eine signifikante Reduktion transmigrierter Monozyten in der Gefäßwand des Transplantats (SF1-1.1 [10,03] vs. CoPPIX + SF1-1.1 [5,45]; $p = 0,012$) (Abb.40, B). Die kontinuierliche Gabe von Statinen über das Trinkwasser der Mäuse führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Monozyten in der Gefäßwand (SF1-1.1 [10,03] vs. Statin + SF1-1.1 [6,62]; $p = 0,048$).

Durch die Applikation des CO-freisetzende Molekül (CORM) CORM-401 über eine Schlundsonde konnte ebenso eine Verringerung des SF1-1.1-induzierten monozytären Infiltrates erreicht werden (SF1-1.1 [10,03] vs. CORM + SF1-1.1 [6,08]; $p = 0,025$).

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die HO-1 neben der Reduktion der Intima-Hyperplasie auch einen protektiven Einfluss gegenüber der Bildung eines monozytäre Infiltrats in die Gefäßwand der Transplantate aufweist.

A



B

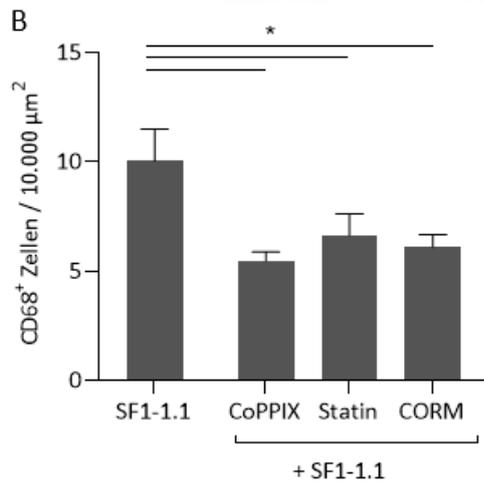


Abbildung 40: Quantifizierung des Effekts der HO-1-Modulation auf das monozytären Infiltrates

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 200-facher Vergrößerung der immunhistochemischen Färbungen für Elastin (grün, Autofluoreszenz), CD68⁺ Monozyten (rot), Zellkerne (DAPI), und Overlay; Messbalken = 50 μm. A = Adventitia, M = Media, NI = Neointima. (B) Statistische Auswertung der Monozytenzahl; (MW ± SEM). Daten wurden mittels parametrischer One-Way ANOVA auf signifikante Unterschiede getestet und für multiples Testen korrigiert (*p < 0,05).

4.8.3 CORM-401 vermittelte Effekte sind unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel

Das CORM-401-Pulver wurde für die Applikation in DMSO gelöst und den Mäusen dreimal pro Woche über eine Schlundsonde verabreicht. Da DMSO in geringen Konzentrationen antiinflammatorische Effekte vermittelt (de Abreu Costa, Henrique Fernandes Ottoni et al. 2017), wurde mit einer iCORM-401 (inaktives CORM)-Kontrolle untersucht, ob die beobachtete Reduktion der Neointima bei CORM-401-behandelten Mäusen auf den HO-1 Metaboliten CO zurückzuführen ist oder durch das Lösungsmittel DMSO verursacht wird. Dementsprechend wurde der neointimale Index zwischen SF1-1.1- und iCORM-401-behandelten Mäusen verglichen (Abb.41, A+ B). Die statistische Auswertung des Neointima-Indexes (Abb.41, C) zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der Neointima zwischen Mäusen, die mit dem SF1-1.1-Antikörper behandelt wurden und denen, die zusätzlich iCORM verabreicht bekamen (SF1-1.1 [51,27] vs. SF1-1.1 + iCORM [49,97]; $p = 0,917$). Auch die Gewichtsentwicklung in beiden Gruppen offenbarte keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abb.41, D). Lediglich die Menge des detektierten SF1-1.1-Antikörpers im Plasma der Mäuse war in der iCORM-401-Gruppe numerisch erhöht gegenüber der SF1-1.1-Gruppe, erreichte aber keine signifikanten Unterschiede (SF1-1.1 [100] vs. SF1-1.1 + iCORM [144,6]; $p = 0,13$) Gruppen (Abb.41, E).

In keinem der hier gemessenen Parameter war eine signifikante Differenz zwischen beiden Versuchsgruppen zu beobachten. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass das Lösungsmittel DMSO einen Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung der Neointima in Mäusen hat. Die unter Abschnitt 4.8.1 beschriebene Reduktion der Neointima in der CORM-401-Gruppe ist somit auf die Behandlung mit dem HO-1-Metaboliten CO zurückzuführen.

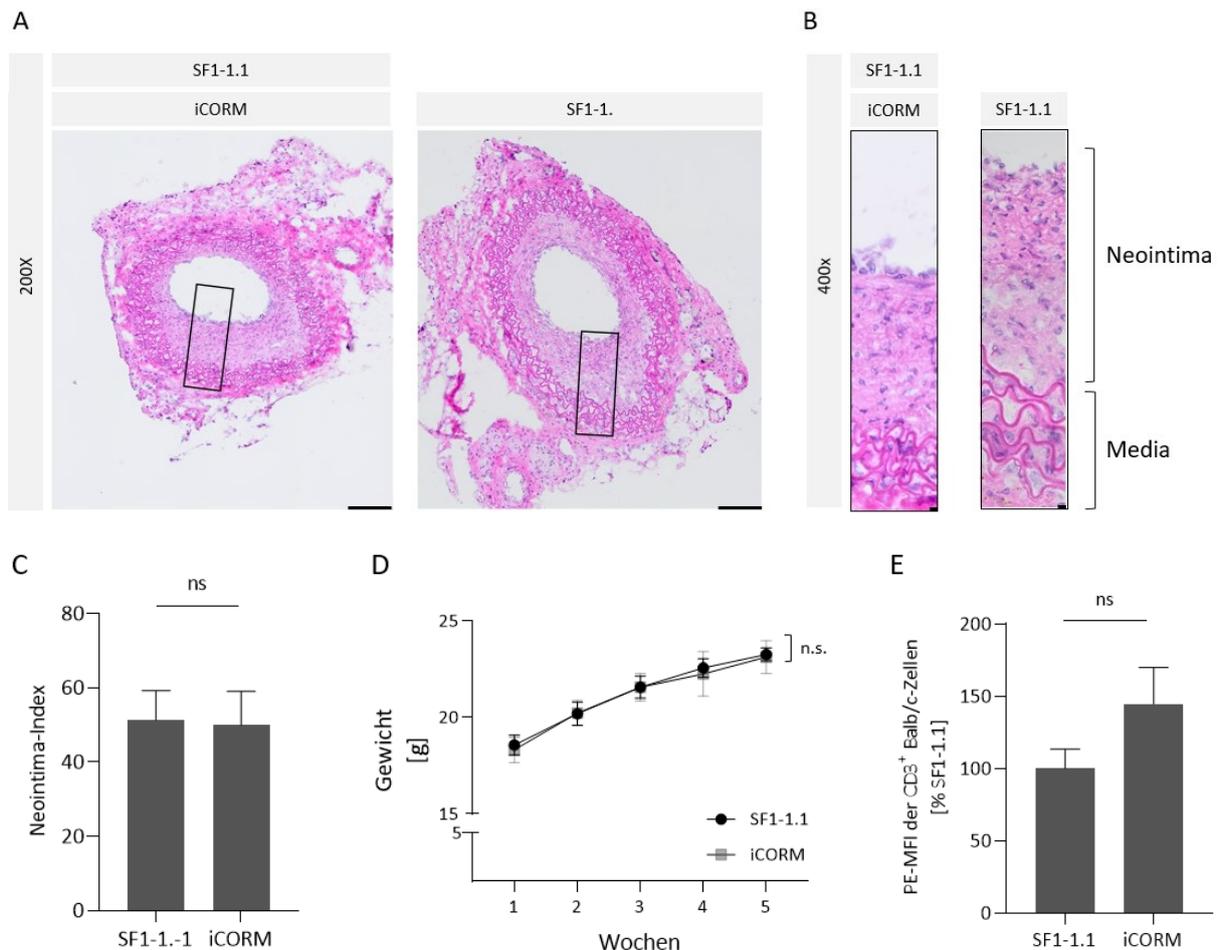


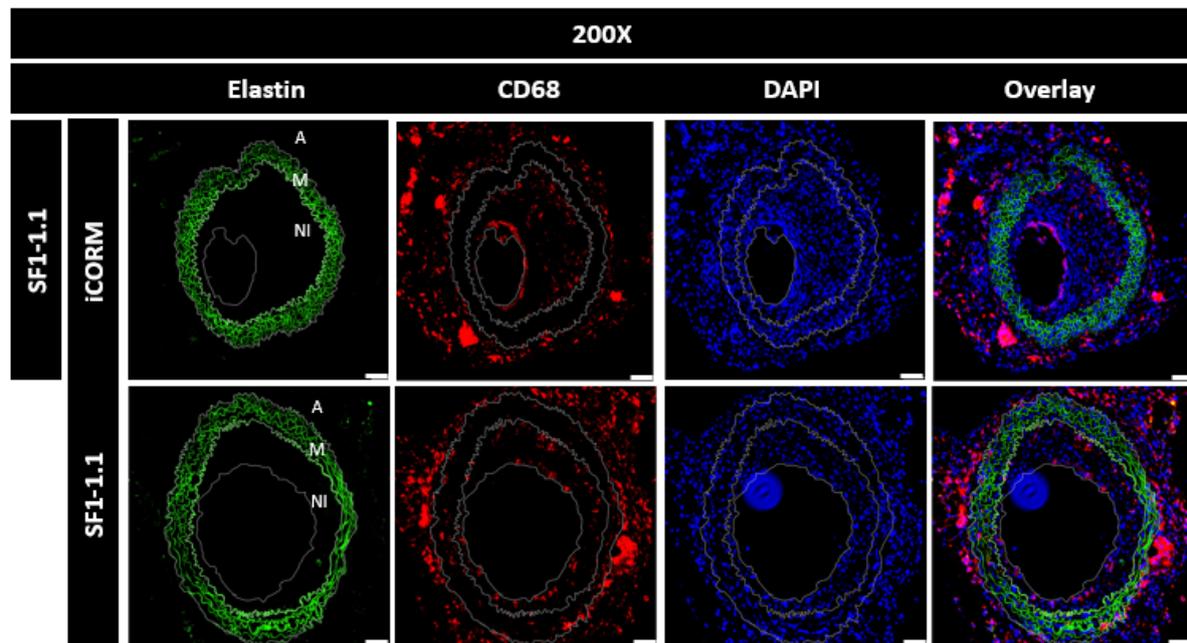
Abbildung 41: Quantifizierung des Effekts von DMSO auf die neointimale Hyperplasie

Lichtmikroskopische Aufnahme der chromogenen HE Färbung der Transplantate von Mäusen, die zusätzlich zu dem SF1-1.1-Antikörper (links, n = 7) mit iCORM (rechts, n = 8) behandelt wurden bei (A) 200-facher (Messbalken = 100 µm) und (B) 400-facher Vergrößerung (Messbalken = 5 µm). (C) Statistische Auswertung des neointimalen Indexes. (D) Gewichtsentwicklung (MW ± SEM) über den Zeitraum des Experiments zeigt keinen statistisch relevanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Werte wurden mit einem Mixed-Effects Model statistisch ausgewertet. (E) Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen für den Nachweis des SF1-1.1-Antikörpers im Plasma der Mäuse. Gemessen wurde die MFI (MW ± SEM) des PE-gekoppelten anti-IgG-Antikörpers auf CD3⁺ Balb/c Splenozyten. Daten (C + E) sind dargestellt als MW ± SEM und wurden mit dem parametrischen Student's t-Test auf signifikante Unterschiede untersucht; (ns: nicht signifikant).

Die Quantifizierung des monozytären Infiltrates in der Gefäßwand der iCORM-behandelten Mäusen stützt dieses Ergebnis. (Abb.42, A). Es konnte auch hier kein signifikanter Unterschied in der Größe des monozytären Infiltrats zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. (SF1-1.1 [10,03] vs. SF1-1.1 + iCORM [11,31]; p = 0,574) (Abb.42, B).

Damit konnte gezeigt werden, dass es durch die Anwendung von DMSO zu keiner Reduzierung des monozytären Infiltrates gekommen ist. Die in der CORM-Gruppe beobachteten protektiven Effekte auf die Größe des monozytären Infiltrates lassen sich daher ebenso dem CO zuschreiben.

A



B

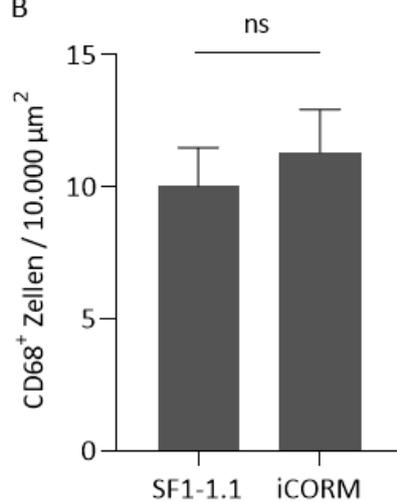


Abbildung 42: Quantifizierung des Effekts von DMSO auf das monozytäre Infiltrat

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transplantate der CORM (n = 7) und iCORM (n = 8) behandelten Gruppen bei 200-facher Vergrößerung. für Elastin (grün, Autofluoreszenz), CD68⁺ Monozyten (rot), Zellkerne (DAPI), und Overlay; Messbalken = 50 μm. A = Adventitia, M = Media, NI = Neointima. (B) Statistische Auswertung der Monozytenzahl zwischen beiden Gruppen. Parametrische Daten (MW ± SEM) wurden mit einem Student's t-Test auf signifikante Unterschiede hin untersucht (*p < 0,05).

4.9 CD62E-blockierender Antikörper reduziert Transplantatvaskulopathie

4.9.1 CD62E-Blockade verringert SF1-1.1-induzierte Neointima

Der Einsatz eines CD62E-blockierenden Antikörpers konnte in den *in vitro* Versuchen die antikörperinduzierte Adhäsion und Transmigration der Monozyten signifikant reduzieren. Der Effekt eines CD62E-blockierenden Antikörpers auf die Interaktionen zwischen Monozyten und EC wurde auch in dem *in vivo* Mausmodell untersucht.

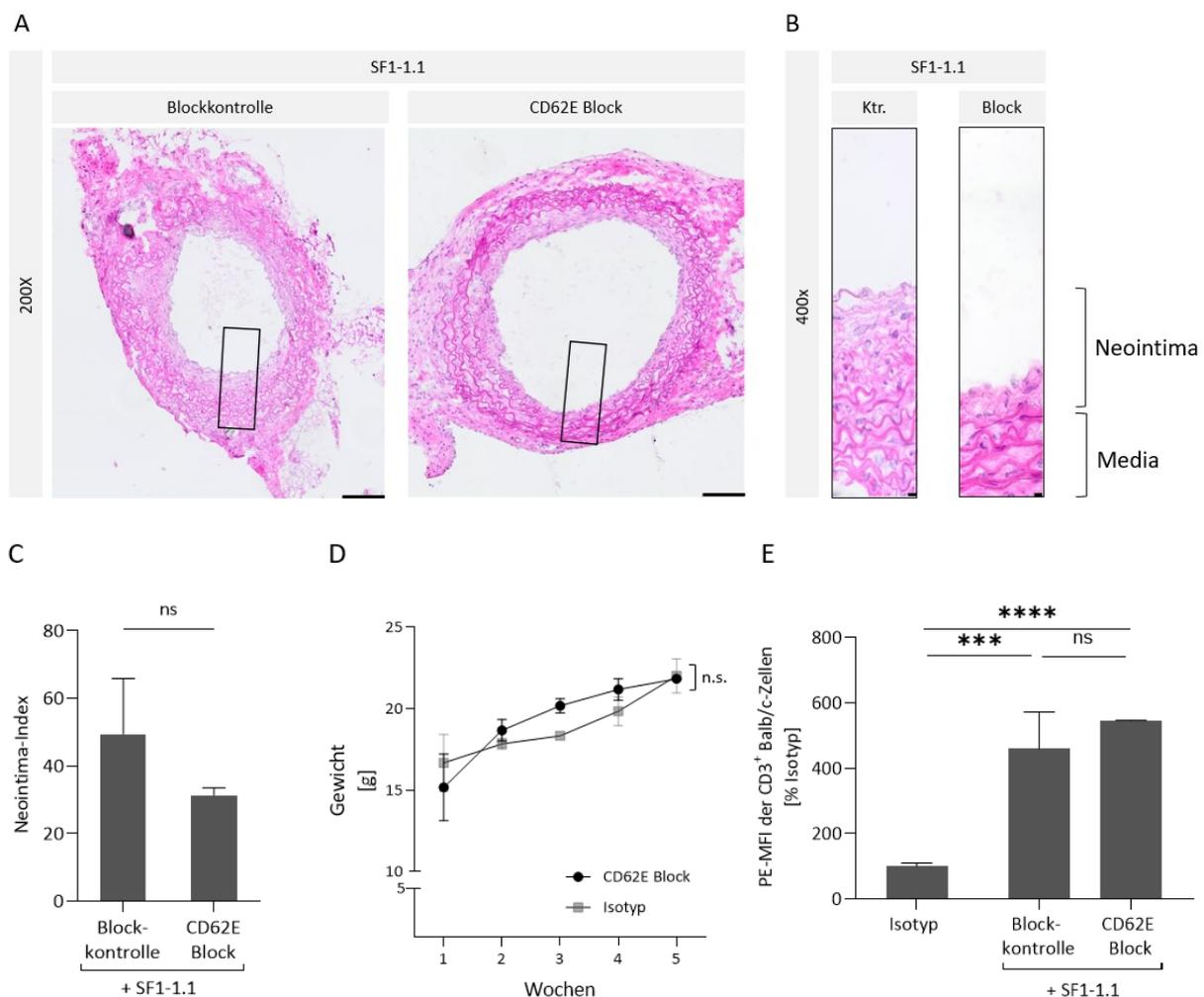


Abbildung 43: Effekte der CD62E-Blockade auf die neointimale Hyperplasie

Lichtmikroskopische Aufnahme bei (A) 200-facher (Messbalken = 100 μ m) und (B) 400-facher Vergrößerung (Messbalken = 5 μ m) der HE-Färbungen der Transplantate von Mäusen, die zusätzlich zu SF1-1.1-Antikörper mit dem CD62E-blockierenden Antikörper (links, n = 3) oder der Blockkontrolle (rechts, n = 3) behandelt wurden (Ktr. = Blockkontrolle). (C) Statistische Auswertung des Neointima-Indexes (MW \pm SEM), Daten wurden mit einem Student's t-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. (D) Die Gewichtsentwicklung zeigt keinen statistisch relevanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Werte wurden mit einer Two-Way ANOVA Varianzanalyse ausgewertet. (E) Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen für den Nachweis des SF1-1.1-Antikörpers im Plasma der Mäuse. Gemessen wurde die MFI (MW \pm SEM) des PE-gekoppelten anti-IgG-Antikörpers auf CD3⁺ Balb/c Splenozyten. Dargestellt sind MW \pm SEM, Werte wurden mit einer One-Way ANOVA auf signifikante Unterschiede getestet und für multiples Testen korrigiert; (ns: nicht signifikant; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).

Zusätzlich zu der wöchentlichen Applikation des SF1-1.1-Antikörpers wurde den Mäusen zweimal in der Woche der CD62E-blockierenden Antikörper oder die korrespondierende Isotypkontrolle (Blockkontrolle) appliziert.

Die immunhistochemischen Auswertungen zeigten eine geringere Neointima bei Mäusen, die den CD62E-blockierenden Antikörper erhalten hatten (Abb.43, A + B). Allerdings konnte die statistische Auswertung der HE-Färbungen keine signifikanten Unterschiede bestätigen (SF1-1.1 + Blockkontrolle [31,30] vs. SF1-1.1 + CD62E-Block [49,46]; $p = 0,334$) (Abb.43, C). Die Gewichtsentwicklung beider Gruppen zeigte über die Dauer des Experiments keine Unterschiede auf (Abb.43, D). Sowohl in der CD62E-Block-Gruppe als auch in der Isotypgruppe konnte der SF1-1.1-Antikörper im Plasma der Mäuse nachgewiesen werden. Beide Gruppen wiesen einen signifikanten Unterschied der PE-MFI im Vergleich zu SF1-1.1-Isotypkontrolle auf (Isotyp [100 %] vs. SF1-1.1 + CD62E-Block [545 %]; $p < 0,0001$ bzw. SF1-1.1 + Blockkontrolle [460 %]; $p = 0,0002$) (Abb.43, E).

4.9.2 CD62E-Blockade verringert SF1-1.1-induziertes monozytäres Infiltrat

Die Effekte des CD62E-blockierenden Antikörpers wurden ebenfalls auf die Ausprägung des monozytären Infiltrats untersucht. Hierzu erfolgte an den Gefrierschnitten der Transplantate erneut eine CD68-Färbung zur Visualisierung der Monozyten (Abb.44, A). Es wurden die Gruppen verglichen die zusätzliche zu dem SF1-1.1-Antikörper entweder mit dem CD62E-blockierenden Antikörper oder der entsprechenden Isotypkontrolle (Blockkontrolle) behandelt wurden. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde in den Elastin-Aufnahmen die Neointima (NI), die Media (M) und die Adventitia (A) eingezeichnet.

Neben den CD68⁺ Monozyten wurden auch die Zellkerne mit DAPI gefärbt und die Autofluoreszenz von Elastin aufgenommen. In der statistischen Auswertung zeigte sich, dass der CD62E-blockierende Antikörper eine signifikante Reduktion der der Monozyten in der Gefäßwand der Transplantate verursacht (SF1-1.1 + Blockkontrolle [15,27] vs. SF1-1.1 + CD62E-Block [6,4]; $p = 0,011$) (Abb.44, B).

Die Quantifizierung des Neointima-Indexes lassen einen Einfluss der CD62E-Blockade auf deren Ausprägung vermuten. Diese Vermutung wird aufgrund des signifikanten Unterschieds in der Größe des monozytären Infiltrates gestützt.

A

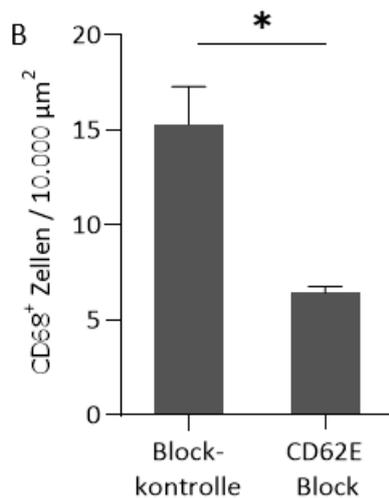
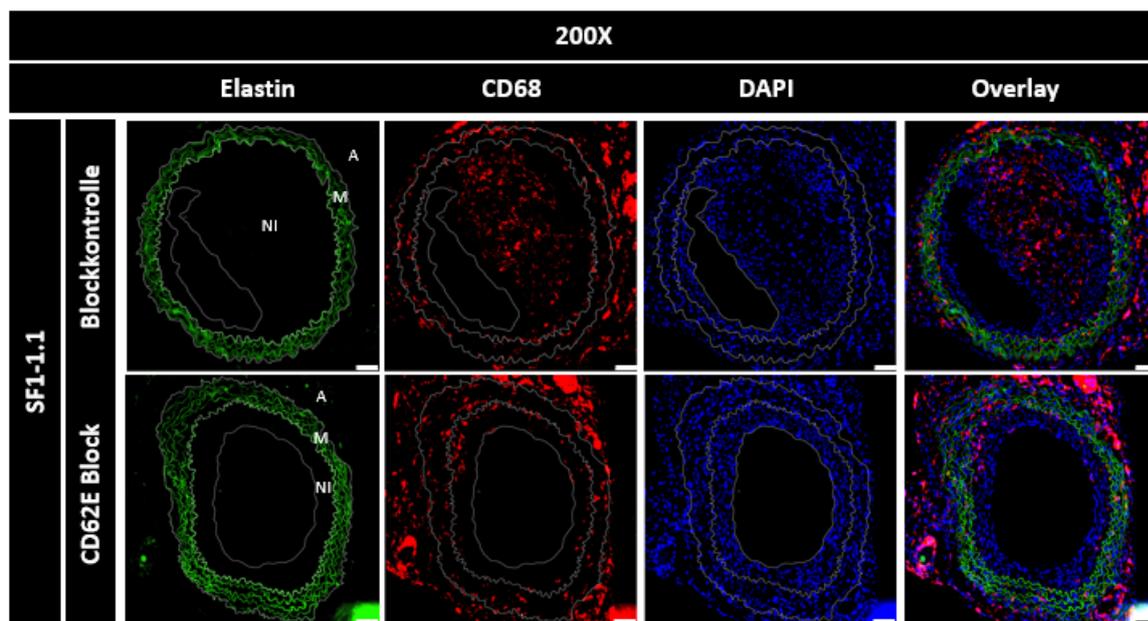


Abbildung 44: Quantifizierung des Effekts der CH62E-Blockade auf das monozytären Infiltrat

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transplantate von Mäusen, die zusätzlich zu dem SF1-1.1-Antikörper mit einem CD62E-blockierenden Antikörper bzw. der Blockkontrolle behandelt wurden bei 200-facher Vergrößerung. Elastin (grün, Autofluoreszenz), CD68⁺ Monozyten (rot), Zellkerne (DAPI), und Overlay; Messbalken = 50 μm. A = Adventitia, M = Media, NI = Neointima. (B) Statistische Auswertung der Monozytenzahl zwischen beiden Gruppen. Parametrische Daten (MW ± SEM) wurden mit einem Student's t-Test auf signifikante Unterschiede hin untersucht (*p < 0,05).

5. Diskussion

Die Transplantation solider Organe stellt heutzutage häufig die beste Möglichkeit für die Behandlung von Patienten mit einem terminalen Organversagen dar. Die kontinuierliche Verbesserung der chirurgischen Techniken und des perioperativen Managements sowie immer bessere immunsupprimierende Therapieoptionen konnten die Rate der Patienten, die das erste Jahr nach der Transplantation überleben, auf über 90 % steigern (Lund, Khush et al. 2017, Rana, Ackah et al. 2019). Demgegenüber steht in jüngerer Zeit jedoch ein lediglich moderater Anstieg des Langzeitüberlebens nach einer soliden Organtransplantation (Wilhelm 2015, Jadlowiec and Taner 2016).

Die Hauptursache für das begrenzte Langzeitüberleben ist das Ausbilden einer chronischen Abstoßungsreaktion, der Transplantatvaskulopathie (TV). Bedingt durch immunologische Unterschiede zwischen dem transplantierten Organ und dem Empfänger wird die Synthese von DSA induziert, die an EC der Gefäßwand binden und eine Aktivierung dieser Zellpopulation hervorrufen (Haas and Mirocha 2011, Walsh, Brailey et al. 2011). Dies führt zu einer chronischen Inflammation der Gefäßwand und im weiteren Verlauf zur Ausbildung einer Neointima sowie der Rekrutierung von Monozyten aus der Zirkulation in die Gefäßwand hinein, welche dort ein monozytäres Infiltrat bilden (Colvin and Smith 2005, Vestweber 2015). Die kontinuierliche Transmigration von Monozyten in die Gefäßwand ist dabei eine der Ursachen für die beobachtete Ausprägung der TV (Oberbarnscheidt, Zeng et al. 2014). Die Größe des monozytären Infiltrates korreliert mit dem Schweregrad der sich entwickelnden TV und kann als prognostischer Marker für das Organüberleben herangezogen werden (Girlanda, Kleiner et al. 2008). Der Transmigration von Monozyten gehen ein Rollen und eine Adhäsion dieser Zellen am endothelialen Monolayer voraus. Die ersten temporären Bindungen zwischen beiden Zellpopulationen werden hierbei über Selektine vermittelt. Diese Adhäsionsmoleküle werden sowohl auf der Oberfläche von Monozyten als auch von Endothelzellen exprimiert. Durch das Ausbilden und Lösen dieser lockeren Selektin-Bindungen werden die Monozyten zunächst aus der Zirkulation abgebremst. Im Anschluss beginnen sie über integrinvermittelten Interaktionen langsam über das Endothel zu rollen, bis sie schließlich fest adhärieren (Zarbock, Ley et al. 2011) und im Anschluss in die Gefäßwand transmigrieren. Das Binden von DSA an EC muss nicht zwangsläufig eine Endothelaktivierung und -schädigung und ein damit vergesellschaftetes Organversagen verursachen. Bei einigen Patienten wird ein Zustand beobachtet, in dem sich die immunologisch vermittelte Schädigung des Transplantats verlangsamt oder teilweise unterbunden werden kann. Dies wird als Akkommodation bezeichnet. Sie ist gekennzeichnet durch die Aktivierung und Hochregulierung verschiedener antiinflammatorischer Signalwege (Kenta and Takaaki 2020). Einige dieser protektiven Effekte, die im Zuge der Akkommodation auftreten, werden durch den HO-1-Signalweg angestoßen. Die HO-1 vermittelt die enzymatische Umwandlung von Häm zu Biliverdin und Bilirubin unter der Freisetzung von CO (Fukami, Ramachandran et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von humane EC mit einem anti-HLA-I-Antikörper zu einer verstärkten Expression des Adhäsionsrezeptors CD62E auf der Oberfläche der EC führt. In der Folge verursachte die Antikörperstimulation eine Zunahme der Adhäsion und Transmigration von Monozyten an beziehungsweise über den aktivierten endothelialen Monolayer. Diese Effekte konnten durch den Einsatz einer CD62E-Blockade wieder verringert werden.

Durch die Induktion der HO-1 Aktivität in EC wurde belegt, dass diese eine protektive Rolle gegenüber den antikörperinduzierten Effekten spielt. Die Aktivierung der HO-1 war nicht nur für eine Reduktion der CD62E-Expression auf EC verantwortlich, sondern hemmte auch die antikörperverursachte Adhäsion und Transmigration der Monozyten.

Für die Verifizierung der zell- und molekularbiologischen Ergebnisse konnte ein allogenes Aortentransplantationsmodell von *Koulack et al* adaptiert und erfolgreich etabliert werden (Koulack, McAlister et al. 1995). In dem Mausmodell ist es gelungen durch die Applikation eines anti-MHC-I-Antikörpers eine TV in dem Transplantat zu induzieren. Auch in diesen *in vivo* Versuchen kam es zu einer Zunahme der CD62E-Expression und der Bildung eines monozytären Infiltrates in der Gefäßwand. Sowohl mit der pharmakologischen Aktivierung der HO-1 als auch mit der Behandlung des HO-1-Metaboliten CO konnte eine Reduktion der Neointima und der Anzahl der transmigrierten Monozyten erreicht werden.

5.1 HO-1 schützt vor antikörperinduzierter Monozyten-Endothelinteraktion *in vitro*

Geringe Konzentration eines anti-HLA-I-Antikörpers verursachen die Aktivierung von EC

Die Stimulation humaner EC mit dem anti-HLA-I-Antikörper w6/32 zeigte, dass bereits die Konzentrationen von 1 µg/ml und 0,1 µg/ml des Antikörpers die Aktivierung der EC induziert. Die Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des w6/32-Antikörpers resultierte in einer verstärkten Expression des Adhäsionsrezeptors CD62E. Diese intensivierte Genexpression konnte auf transkriptioneller Ebene über mRNA-Quantifizierungen nachgewiesen werden und manifestierte sich in einer Zunahme des korrespondierenden Proteins. Auf der Ebene der mRNA-Expression konnte eine signifikante Zunahme nur in EC nachgewiesen werden, die mit 1 µg/ml w6/32 stimuliert worden waren. Bei den mit der geringeren Konzentration stimulierten EC konnte ein Zuwachs der CD62E-mRNA-Expression zwar beobachtet werden, dieser erreichte jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Demgegenüber induzierten beide Antikörperkonzentrationen in den Proteinexpressionsanalysen eine signifikante Zunahme der CD62E-Konzentration. Dies liegt mutmaßlich daran, dass die Halbwertszeit der HO-1-mRNA bei ungefähr 2 Stunden liegt und eine sehr hohe Umsatzrate aufweist (Leautaud and Demple 2007). Die Modulation der CD62E-mRNA-Expression erfolgt, auch in der persistierenden Gegenwart eines Stimulus, transient (Bevilacqua, Stengelin et al. 1989). Dies führt dazu, dass die mRNA relativ schnell abgebaut wird, das Protein allerdings in der Zelle akkumuliert, was auch bei einer Stimulation mit 0,1 µg/ml w6/32 zu einer signifikanten Zunahme der Proteinkonzentration führt.

Die verstärkte CD62E-Proteinexpression konnte sowohl im Gesamtproteom als auch auf der endothelialen Oberfläche nachgewiesen werden. Bei den sensitiven durchflusszytometrischen Analysen wies die Menge an CD62E auf der Oberfläche eine Konzentrationsabhängigkeit des Antikörpers auf.

Dies steht in Einklang mit anderen Studien, die eine gezielte CD62E-Expression durch proinflammatorische Stimuli zeigten (Weishaupt, Steinert et al. 2019, Yao, Jia et al. 2019). Die w6/32-induziert Expression von Adhäsionsrezeptoren wie CD62E, P-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 wurde in bisherige Experimente mit Antikörperkonzentrationen von zehn bis 50 µg/ml nachgewiesen (Bochner, Luscinikas et al. 1991, Naemi, Carter et al. 2013, Valenzuela, Mulder et al. 2013).

Aktivierung der EC resultiert in der Adhäsion und Transmigration von Monozyten

Die w6/32-induzierte Aktivierung von EC führt neben einer Expression von Adhäsionsrezeptoren auch zu einer verstärkten Interaktion zwischen EC und Leukozyten, ein Befund der auch für andere proinflammatorische Stimuli, wie bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) oder TNF- α , nachgewiesen werden konnte (Lee, Lee et al. 2017, Li, van Esch et al. 2018, Murphy, Jeong et al. 2019).

Es zeigte sich, dass die in diesen Experimenten verwendeten Antikörperkonzentrationen nicht nur eine EC-Aktivierung verursachten, sondern ebenso ausreichend waren die Adhäsion von Monozyten zu bewirken. Die Stimulation der EC ergab eine signifikante Zunahme der Adhäsion von Monozyten an den endothelialen Monolayer. Durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörperkonzentrationen für die Stimulation konnte hierbei ein konzentrationsabhängiger Effekt des Antikörpers nachgewiesen werden.

Derlei Resultate konnten auch für die Transmigration von Monozyten über einen endothelialen Monolayer erzielt werden. Auch hier führte die Stimulation der EC mit den gleichen Antikörperkonzentrationen wie bei der Adhäsion zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Transmigration.

Diese Ergebnisse ließen sich im murinen System bestätigen. Hier führte die Inkubation von murinen EC mit dem anti-MHC-I-Antikörper SF1-1.1 ebenso zu einer deutlichen Zunahme der Adhäsion und Transmigration der Monozyten. Sowohl die Stimulation mit der geringeren Antikörperkonzentration als auch mit der 10-fach höheren SF1-1.1 Konzentration verursachten in den Adhäsions- und Transmigrations-Assays eine signifikante Zunahme der Monozyten-EC-Interaktionen. Im Gegensatz zum humanen System konnte hier allerdings keine konzentrationsabhängige Steigerung dieser Einflüsse nachgewiesen werden.

CD62E-Blockade reduziert anti-HLA-I-antikörperinduzierte Adhäsion und Transmigration

Für den Nachweis, dass sich die beobachteten Resultate der Adhäsions- und Transmigrations-Assays teilweise durch die Bindung der Monozyten an den CD62E-Rezeptor auf der Oberfläche der EC erklären lassen, wurde eine CD62E-Blockade getestet. Vor der Adhäsion beziehungsweise Transmigration wurden die EC mit einem CD62E-blockierenden Antikörper inkubiert. Dies führte dazu, dass sich die w6/32-induzierte Adhäsion und Transmigration der Monozyten wieder abschwächte.

Jedoch konnte die gesteigerte Adhäsion nach einer Antikörperstimulation nicht vollständig durch die CD62E-Blockade inhibiert werden. Dies liegt vermutlich zum einen an dem statischen und zweidimensionalen Aufbau des durchgeführten Adhäsions-Assays. Hierbei tritt keine physiologische Perfusion der EC auf und dadurch werden keine Scherkräfte und Strömungsmuster verursacht, wie sie normalerweise durch den Blutfluss zustande kommen (Peelen, Hoogduijn et al. 2021). Im Organismus verursacht die Blutströmung eine kontinuierliche Schubspannung an den EC, die wichtig für den Erhalt der endothelialen Homöostase ist. Aufgrund der laminaren Strömung werden Adhäsionsrezeptoren auf den EC herunterreguliert und die Exozytose von Chemokinen reduziert. Kommt es zu einem Strömungsabbruch, resultiert dies in der verstärkten Freisetzung proinflammatorischer Chemokine und einer Adhäsion von Monozyten ohne weitere Stimuli (Babendreyer, Molls et al. 2017).

Zum anderen ist die Komplexität der rezeptorvermittelten Adhäsion für die fehlgeschlagene vollständige Reversion der Adhäsion in Gegenwart CD62E-Blockade verantwortlich. Es wird eine Vielzahl unterschiedlicher Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche von EC und Monozyten exprimiert, die die Bindung beider Zellpopulationen vermittelt (Vestweber 2015). Die Stimulation humaner EC mit anti-HLA-I-Antikörpern führt ebenso zu einer verstärkten Expression von P-Selektin auf der Oberfläche und resultiert somit in einer Zunahme der adhärenen Monozyten (Valenzuela, Hong et al. 2013). Dabei spielt allerdings nicht nur das Expressionsspektrum der EC eine Rolle, sondern auch die Antikörperrezeptoren (Fcγ-Rezeptor) der Monozyten. Über diese Fcγ-Rezeptoren auf der Oberfläche binden Monozyten an die konstante Domäne eines Antikörpers, während dieser über seine variable Domäne an die EC gebunden hat. Dementsprechend hat auch die Subklasse des verwendeten Antikörpers über seine Bindungsaffinität zum Fcγ-Rezeptor einen Einfluss auf die Adhäsion der Monozyten (Valenzuela, Trinh et al. 2015).

Aktivität der HO-1 reduziert anti-HLA-I-verursachte EC-Aktivierung

In den hier durchgeführten *in vitro* Experimenten konnte durch die Stimulation von EC mit dem w6/32-Antikörper eine Aktivierung der Endothelzellen induziert werden. Die immunmodulierenden Effekte der HO-1 auf die w6/32-induzierte EC-Aktivierung wurden mit den pharmakologischen Substanzen CoPPIX und Pravastatin untersucht.

Durch die Stimulation der HO-1-Aktivität mit CoPPIX oder einem Statin in EC ist es gelungen die w6/32-induzierte CD62E-Expression gegenüber der Kontrolle zu reduzieren.

Die Quantifizierung des Transkriptoms der EC erfolgte nach einer 24-stündigen Inkubation mit CoPPIX oder Pravastatin, gefolgt von der w6/32-Stimulation. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD62E-mRNA in CoPPIX-behandelten Zellen nach 18 und 24 Stunden Antikörperstimulation. Bei den statinbehandelten Zellen konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Hier kam es bereits nach sechs und 12 Stunden Antikörperstimulation zu einer signifikanten Reduktion der CD62E-Transkription.

Die Aktivierung der HO-1 durch CoPPIX oder das Statin zeigte ihre vorteilhaften Auswirkungen auch auf Proteinebene. Die Quantifizierung der Oberflächenabundanz von CD62E offenbarte eine Reduktion in beiden Experimentalansätzen um die Hälfte.

Von anderen Arbeitsgruppen konnte die Aktivierung von EC ebenfalls durch eine Behandlung mit Statinen verhindert und eine geringere CD62E- und ICAM-1-Expression beobachtet werden (Meroni, Raschi et al. 2001). Die gezielte Induktion der HO-1 wurde bereits in Zellkulturexperimenten untersucht. Hier resultierte die Stimulation mit dem Häm-Analogon CoPPIX in einer HO-1 Aktivierung. Ähnliche Einflüsse auf die HO-1 konnten auch für Statine nachgewiesen werden, da deren antiinflammatorischen Eigenschaften durch eine induzierte HO-1 Expression vermittelt werden (Grosser, Hemmerle et al. 2004, Loboda, Jazwa et al. 2005). Statine vermitteln eine Vielzahl pleiotroper Effekte, die sich teilweise durch die HO-1-vermittelten Beobachtungen erklären lassen.

Demgegenüber stehen Studien, die eine Intensivierung der TNF α -induzierten-Expression von CD62E, VCAM-1 und ICAM-1 nach Statinstimulation zeigten (Schmidt, Goepfert et al. 2002). Diese teils widersprüchlichen Ergebnisse werden möglicherweise durch die unterschiedlichen Zelltypen, die verwendeten Stimuli und Statine erklärt.

Es wurden bereits weitere Signalwege im Zusammenhang mit der HO-1 und einer EC-Aktivierung beschreiben, die unabhängig von einer Antikörperstimulation sind. Beispielsweise ist bekannt, dass der Eisenmetabolismus der EC Auswirkungen auf die Expression von Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche hat. Die HO-1 stellt das zentrale Enzym des Eisenmetabolismus dar und deren experimenteller Knockdown resultiert neben einer Amplifizierung der CD62E-Expression auch in einer vermehrten VCAM-1- und ICAM-1-Expression der EC (Seldon, Silva et al. 2007).

Die Auswirkungen der HO-1-Expression auf die Homöostase der EC wurden in der vorliegenden Arbeit mit einem si-RNA-induzierten Knockdown untersucht. Der erfolgreiche HO-1-Knockdown wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene verifiziert. Die Reduktion der HO-1-mRNA war bereits nach 24 Stunden zu beobachten, während die Proteinexpression erst nach 36 Stunden eine signifikante Abnahme erreichte, jedoch hielten beide Effekte für mindestens 48 Stunden an.

Dementsprechend wurden die Effekte des HO-1-Knockdowns auf die Adhäsion und Transmigration der Monozyten 24 Stunde nach dem Knockdown untersucht. Hierbei zeigte sich interessanterweise, dass der HO-1-Knockdown in EC bereits in Abwesenheit der w6/32 Stimulation eine Zunahme der Adhäsion und Transmigration von Monozyten induzierte. Dies zeigt, dass eine suffiziente HO-1 Expression

obligatorisch für die Aufrechterhaltung der endothelialen Homöostase ist und einen proinflammatorischen Status der EC verhindert.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die HO-1 im Zusammenhang mit anderen proinflammatorischen Stimuli erzielt werden. Es wurden bereits Resultate erzielt, die zeigen, dass ein si-RNA-induzierter HO-1-Knockdown ebenfalls zu einer Verstärkung der LPS-induzierten proinflammatorischen Effekte führt (Lee, Park et al. 2019). Im Gegensatz dazu inhibiert die gezielte Überexpression der HO-1 in EC die TNF- α -induzierte-Expression von CD62E und VCAM-1 (Soares, Seldon et al. 2004).

Gestützt werden diese Beobachtungen durch die Auswirkungen einer HO-1-Defizienz im lebenden Organismus. Homozygote HO-1-Knockout Mäuse unterscheiden sich bis zu einem Alter von ungefähr zehn Wochen nicht von Wildtyp-Mäusen, entwickeln danach allerdings eine ausgeprägte Anämie, was auf ihren gestörten Eisenmetabolismus zurückzuführen ist. HO-1-Knockout Mäuse sind im Erwachsenenalter deutlich kleiner, leiden unter chronischen Entzündungen und haben eine deutlich geringere Lebenserwartung als gesunde Mäuse (Poss and Tonegawa 1997). Bei Menschen ist eine HO-1-Defizienz nur sehr selten beschrieben, da es sich hierbei um schwerstkranke Patienten handelt, die meist nicht älter als zwei Jahre werden. Diese Kinder leiden neben einer Anämie unter eine Leukozytose, Thrombozytose und einer persistierenden Endothelschädigung (Yachie, Niida et al. 1999).

Die w6/32-induzierte Adhäsion und Transmigration von Monozyten konnten durch den HO-1-Knockdown weiter verstärkt werden. Hierbei zeigte sich, dass die Reduktion der HO-1 in EC und eine anschließende w6/32-Antikörperstimulation zu einer signifikanten Zunahme der adhären und transmigrierten Monozyten führte. Diese Effekte konnten der dezimierten HO-1-Konzentration zugewiesen werden, da die Adhäsion und Transmigration der Monozyten bei antikörperstimulierten EC ohne HO-1 Knockdown geringer waren.

Die Relevanz der HO-1 im Zusammenhang mit einer w6/32-induzierten EC-Aktivierung konnte durch die Experimente mit dem HO-1-Aktivatoren CoPPIX und Pravastatin bestätigt werden. Die Stimulation mit CoPPIX verursachte eine Reduktion der antikörperinduzierten Adhäsion und Transmigration. Konkordant dazu machten sich die Statinbehandlung durch eine verminderte Anzahl an adhären und transmigrierten Monozyten bemerkbar.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Arbeit von *Prasad et al*, die zeigen konnten, dass Lovastatin die TNF- α -induzierte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen verringert. Lovastatin inhibiert die Aktivierung der Phosphoinositol-3 Kinase in EC, was zu einer reduzierten Phosphorylierung der Akt-Kinase führt. Die Suppression dieses Signalweges führt zu einer geringeren Expression der Adhäsionsrezeptoren VCAM-1 und CD62E nach einer Stimulation der EC mit TNF- α und erklärt die beobachteten Effekte der Adhäsions-Assays. Darüber hinaus wird durch die Statinbehandlung auch der NF- κ B-Signalweg herunter reguliert (Prasad, Giri et al. 2005). Dieser Signalweg ist in die DSA-induzierte Aktivierung

von EC involviert und vermittelt teilweise die anti-HLA-I-Antikörper Effekte (Thomas, Valenzuela et al. 2015).

5.2 HO-1 reduziert Ausprägung der Transplantatvaskulopathie *in vivo*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modell der allogenen Aortentransplantation in Mäusen in der Arbeitsgruppe etabliert, um den Einfluss der HO-1 auf die anti-MHC-I-antikörpervermittelte TV *in vivo* zu untersuchen. Bei diesem Modell erfolgte die Transplantation eines Teils der thorakalen Aorta einer Balb/c Maus in die *Aorta abdominalis* einer Rag2-KO Maus. Rag2-KO Mäuse tragen einen Gendefekt für das Rag2-Gen und können somit keine funktionalen T- und B-Zellen bilden (Shinkai, Rathbun et al. 1992). Aufgrund dieser Immundefizienz kommt es zu keiner akuten Abstoßungsreaktion gegen das transplantierte Aortensegment. Durch die wöchentliche Applikation des anti-MHC-I-Antikörpers SF1-1.1 konnte in dem Transplantat eine TV induziert werden.

Die Kombination beider Mausstämme stellt einen MHC-I-Mismatch dar und wird häufig für Tiermodelle zur Untersuchung von chronischen Abstoßungsreaktionen verwendet (Chhabra, Alsughayir et al. 2018, Lin, Gill et al. 2021).

Applikation eines anti-MHC-I-Antikörpers induzierte TV *in vivo*

Immunhistochemische Analysen der Transplantate von SF1-1.1-behandelten Mäuse zeigten eine deutlich ausgeprägte Hyperplasie der Neointima und dadurch ein verringertes Gefäßlumen. Die Neointima bestand vornehmlich aus VSMC und es war deutlich die ungeordnete Struktur der Neointima zu erkennen. Diese Ergebnisse bestätigen die erfolgreiche Etablierung des allogenen Transplantationsmodell mit einer experimentell induzierten TV, da DSA als Ursache einer initialen Schädigung des EC nach einer Transplantation bereits identifiziert werden konnten (Rahmani, Cruz Rani et al. 2006). Im weiteren Verlauf der Antikörperstimulation kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion, resultierend in einer Freilegung und einer Diskontinuität des endothelialen Monolayers mit dem Verlust der Barrierefunktion des Endothels. Die Migration der VSMC in die Neointima und deren dortige Proliferation fördern die Ausprägung der Neointima und die Reduktion des Gefäßlumens. Der Verlust der endothelialen Integrität, die Produktion von ECM und die Proliferation der VSMC führen zu einer weniger kompakten und inhomogenen Struktur der Neointima (Drachenberg and Papadimitriou 2013).

Zu bemerken ist, dass sich auch in den Transplantaten der Mäuse in der Kontrollgruppe eine Neointima gebildet hatte. Diese war jedoch signifikant geringer als in den antikörperbehandelten Mäusen. Ursächlich hierfür ist eine Aktivierung der Endothelzellen, wie sie durch die Kaltischämiezeit und die Ischämie-Reperfusionsschädigung während der Ex- und Implantationsphase verursacht werden. Diese nicht-immunologischen Faktoren der EC-Aktivierung führen ebenfalls zu einer Expression von Adhäsionsrezeptoren auf EC und einer Rekrutierung von Leukozyten (Kayler, Srinivas et al. 2011, Bharat and Kreisel 2018).

Zusätzlich zu den Transplantaten wurden auch kurze Segmente der nativen Rag2-KO Aorten entnommen und morphometrisch begutachtet. Weder bei den SF1-1.1-behandelten noch bei den isotypbehandelten Mäusen ließen sich strukturelle Veränderungen der nativen Gefäßwand beziehungsweise des Endothels erkennen. Es wurde keine Ausbildung einer Neointima und somit auch keine Reduktion des Gefäßlumens beobachtet.

Dies spricht dafür, dass der SF1-1.1-Antikörper spezifisch an die MHC-I-Molekül H-2k^d auf der Oberfläche der EC, die das Transplantat auskleiden, gebunden hat. Die EC der Rag2-KO Mäuse exprimieren den MHC-I-Haplotyp H-2k^b und wurden daher nicht durch den SF1-1.1-Antikörper gebunden und aktiviert. Der regelrechte Aufbau der Gefäßwand der nativen Rag2-KO Aorta belegte darüber hinaus, dass es durch die Antikörperapplikation zu keiner systemischen Reaktion kam, die Auswirkungen auf das gesamte Gefäßsystem der Mäuse gehabt hätte.

Dies konnte auch durch das Monitoring der Gewichtsentwicklung der Mäuse während des 30-tägigen Experiments bestätigt werden. Beide Behandlungsgruppen wiesen eine kontinuierliche Zunahme ohne gruppenspezifische Unterschiede auf. Dies deutete ebenfalls darauf hin, dass es zu keiner systemischen Inflammation in den Mäusen im Zuge der Antikörperbehandlung gekommen ist.

Ein weiteres Kennzeichen der TV ist neben der *de novo* Synthese von DSA und einer Neointima auch die Ausbildung eines monozytären Infiltrates in der Gefäßwand des Transplantats (Grandaliano, Gesualdo et al. 1997, Smith, Banner et al. 2011).

Für die Quantifizierung des monozytären Infiltrats wurden die transmigrierten und zu Makrophagen ausdifferenzierten Monozyten immunhistologisch gefärbt. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit dem SF1-1.1-Antikörper zu einer signifikanten Akkumulation von Makrophagen in der Gefäßwand der Transplantate führte. Während eine akute Abstoßungsreaktion hauptsächlich durch T-Zellen vermittelt wird, sind Makrophagen die vorherrschende Zellpopulation in der Gefäßwand bei einer chronischen TV (Bergler, Jung et al. 2016). Getriggert durch die Transplantation werden Monozyten aus dem Knochenmark und der Milz in die Blutzirkulation rekrutiert (Hsiao, Fernandez et al. 2018). Über verschiedene Zytokin- und Chemokingradienten werden diese in das Transplantat gelockt und transmigrieren in die Gefäßwand. Dort differenzieren sie zu proinflammatorischen Makrophagen oder DC aus und intensivieren die Abstoßungsreaktion (Zhuang, Liu et al. 2016).

Die Größe dieses monozytären Infiltrates korreliert mit dem serologischen Nachweis der DSA und kann daher als diagnostischer Marker für die Ausprägung der TV in der klinischen Routine angewendet werden (Xu, Collins et al. 2014).

HO-1 vermittelt protektive Effekte gegenüber der antikörperinduzierten TV

Die *in vitro* Versuche haben erstmals gezeigt, dass die antikörpervermittelten Effekte auf die Interaktionen zwischen EC und Monozyten sensitiv gegenüber einer HO-1-Aktivierung sind. Sowohl Adhäsion als auch Transmigration der Monozyten konnten durch die Behandlung der EC mit dem HO-1-Aktivator CoPPIX oder einem Statin reduziert werden. Dementsprechend wurden diese Substanzen auch in dem Mausmodell auf die Entwicklung einer TV untersucht. Additiv zu der SF1-1.1-Antikörperapplikation wurden den Mäusen ein Statin kontinuierlich über das Trinkwasser zugeführt. In dieser Versuchsgruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der Neointima und eine geringere Anzahl an Makrophagen in der Gefäßwand im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Guidelines der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation empfehlen eine niedrig dosierte Statintherapie nach einer Transplantation (Costanzo, Dipchand et al. 2010). Aufgrund von befürchteten Wechselwirkungen mit einer immunsupprimierenden Therapie, liegt die empfohlene Statindosis hierbei deutlich unter der, die bei der Behandlung einer Hyperlipidämie eingesetzt wird (Wiggins, Saseen et al. 2016). Eine monozentrische, retrospektive Studie belegt, dass die Gabe einer höheren Statindosis nach einer Herztransplantation mit einem verringerten Aufkommen von schweren kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist (Golbus, Adie et al. 2020). Die Studie macht allerdings keine Aussage dazu, ob die beobachteten Effekte der Statine aufgrund der reduzierten Cholesterolverwerte oder der immunmodulatorischen Mechanismen zu Stande kamen. Darüber hinaus wurden die Statindosis und der LDL-Cholesterinwert als Konfounder identifiziert.

Ob die protektiven Effekte des Statins in der vorliegenden Arbeit den HO-1- oder andere antiinflammatorische Signalweg involviert, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht abschließend klären. Um diese Frage zu beantworten, müssen mRNA-Analysen oder einer direkten Messung der enzymatischen HO-1-Aktivität in dem entsprechenden Gewebe dies verifizieren (Konrad, Knausberg et al. 2016).

Ein Hinweis auf die kausalen Effekte der HO-1 auf die Reduktion der TV lieferte die Gruppe der CoPPIX-behandelten Mäusen. Die gezielte Aktivierung der HO-1 führte bei diesen Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Belastung durch eine TV.

Einen weiteren neuen Beleg für den protektiven Einfluss des HO-1-Signalwegs auf die Ausprägung der TV stellen die Ergebnisse der CORM-Gruppe dar. Das hier verwendete CORM-401 ist ein über einen längeren Zeitraum kontinuierlich CO-freisetzendes Molekül, das in DMSO gelöst den Mäusen verabreicht wurde. CO ist ein Metabolit der HO-1-Stoffwechsels und vermittelt durch die Integration in andere Signalkaskaden antiinflammatorischen Eigenschaften und inhibiert die Aktivierung der EC (Otterbein, Bach et al. 2000, Keshavan, Deem et al. 2005). Als Gas kann CO frei durch Membranen diffundieren und schnelle Effekte auch intrazellulär vermitteln (Matterlini and Otterbein 2010).

Das über CORM-401 freigesetzte CO führte in den Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der experimentell induzierten Neointima und gleichzeitig zu einem kleineren monozytären Infiltrat. Über die

Exozytose proinflammatorischer Zytokine, beispielsweise PDGF, TGF- β und IL-1 sind Makrophagen für die Migration der VSMC mit verantwortlich (Hutchinson 2000). Dadurch verstärkt das monozytäre Infiltrat die neointimale Hyperplasie und treibt die Verringerung des Gefäßlumens und damit die Ausprägung der TV voran. Effekte, die durch die antiinflammatorischen Eigenschaften des CO unterbunden werden.

Ein weiterer postulierter Mechanismus für die protektiven Effekte des CO im Zusammenhang mit einer TV betrifft die Homöostase der VSMC. Im Zuge einer Transplantation kommt es zu Mobilisierung verschiedener Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die in das Transplantat einwandern. Dazu gehören auch Vorläuferzellen der VSMC. In einem allogenen Transplantationsmodell in Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Applikation von CO die Differenzierung der Vorläuferzellen zu VSMC inhibiert und somit zu einer Reduktion der Neointima führt (Sakihama, Lee et al. 2021).

Anti-MHC-I-Antikörper induziert CD62E-Expression der VSMC

In den Zellkulturexperimenten zeigte sich, dass es durch die Stimulation der EC mit dem Antikörper zu einer gesteigerten CD62E-Expression der EC kommt. Sowohl die antikörperinduzierte Adhäsion als auch Transmigration der Monozyten konnte durch den Einsatz eines CD62E-blockierenden Antikörpers verringert werden. Um festzustellen, ob die Applikation des anti-MHC-I-Antikörpers *in vivo* eine CD62E-Expression der EC induziert, wurde an den Gefrierschnittpräparaten der antikörper- und isotypbehandelten Mäusen eine CD62E/EC-Doppelfärbung angefertigt. Die EC wurden anhand des von-Willebrand-Faktors (vWF) visualisiert. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der CD62E⁺/vWF⁺ doppelpositiven Zellen in der SF1-1.1-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle. In beiden Gruppen war lediglich der innerste Bereich, der die Neointima zur Zirkulation hinabgrenzt, vWF⁺ positiv und wurde damit als EC klassifiziert. Diese liegt möglicherweise daran, dass die antikörperinduzierte Proliferation der EC deutlich geringer ausfällt als erwartet. Die Immunfluoreszenzaufnahmen der Transplantate zeigten, dass es auch bei einer Neointima zu der Bildung eines EC-Kompartments kommt, dass das Gefäß zur Zirkulation abtrennt, sich aber nicht über die komplette Neointima erstreckt.

Die Neointima, die im Zuge einer TV entsteht, wird vornehmlich durch VSMC gebildet. Die VSMC migrieren aus der Media, beginnen zu proliferieren und produzieren große Mengen an ECM, wodurch sich die Neointima bildet (Wadey, Lopes et al. 2018). Dies würde erklären, warum nur wenige CD62E⁺/vWF⁺ doppelpositiven Zellen in diesem Bereich zu finden waren.

Auffällig war, dass dennoch ein flächiger CD62E⁺-positiver Bereich auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern zu sehen war. Dieser Bereich erstreckte sich auf die Neointima und die Media der Gefäße. Dementsprechend wurde eine CD62E/VSMC-Doppelfärbung durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Zunahme der CD62E-Expression der VSMC in der Gefäßwand von SF1-1.1-behandelten Mäusen.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen könnten die unterschiedlichen Zeitpunkte der CD62E-Quantifizierung gewesen sein. Die Antikörperstimulation der EC, wie sie in den *in vitro* Experimenten erfolgte, stellt den initialen Schritt der EC-Aktivierung dar. Dieser steht am Beginn einer TV. Die Quantifizierung der CD62E-Expression in den Mäusen fand hingegen zu einem Zeitpunkt einer fortgeschrittenen TV statt. Sicherlich wäre es interessant zunächst *in vitro* nachzuweisen, ob eine anti-MHC-Antikörperstimulation die CD62E-Expression auch in VSMC induzieren kann.

In einem murinen Transplantationsmodell konnte die Ausprägung der experimentell induzierten TV durch Applikation von Triptolid reduziert werden. Das antiinflammatorische Medikament verhinderte die Migration und Proliferation von VSMC. Gleichzeitig wurde allerdings auch die Anzahl der transmigrierten Leukozyten und die Expression proinflammatorischer Zytokine unterbunden (Luo, Liao et al. 2020). Ob die schwächere Ausprägung der TV der verminderte Neointima aufgrund der Hemmung der VSMC zu zuschreiben ist oder durch die Vielzahl der weiteren antiinflammatorischen Effekte von Triptolid verursacht wurde, lässt sich hier nicht sagen.

CD62E-Blockade reduziert Ausprägung der anti-MHC-I-Effekte

Sowohl die Zellkulturexperimente als auch das Mausmodell legten die Vermutung nahe, dass die CD62E-Expression einen Einfluss auf die antikörperinduzierten Interaktionen zwischen den Monozyten und den Zellen der Neointima hat. Daher wurde simultan zu den Zellkulturexperimenten eine CD62E-Blockade auch *in vivo* durchgeführt und deren Auswirkungen auf die Ausprägung der Neointima und des monozytären Infiltrats untersucht. In den immunhistologischen Analysen konnte erstmals gezeigt werden, dass die CD62E-Blockade eine signifikante Reduktion der Transplantat-infiltrierenden Makrophagen verursachte. Dies resultierte auch in einer verringerten Neointima, wobei der Unterschied keine Signifikanz erreichte. Dies ist ein möglicher Hinweis, dass Makrophagen ein Treiber der TV sein könnten.

Durch die pharmakologische Depletion von Makrophagen ließ sich in einem Mausmodell die Ausprägung der TV bereits um 70 % reduzieren (Kitchens, Chase et al. 2007). Dies war nicht auf die fehlende Phagozytose der Makrophagen zurückzuführen, da die alleinige Hemmung der Phagozytoseaktivität keine Auswirkungen auf die Ausprägung der TV hatte. Des Weiteren hatte die Depletion der Makrophagen lediglich zu Beginn der TV-Entwicklung positive Effekte. Erfolgte die Depletion zu einem späteren Zeitpunkt der TV, hatte dies keine Auswirkungen mehr auf deren Ausprägung. Dies spricht dafür, dass Makrophagen vor allem zu Beginn einen starken Einfluss auf die Entwicklung der Erkrankung haben. Ob in dieser Arbeit ein kausaler Zusammenhang zwischen der Größe des monozytären Infiltrats und der Ausprägung der Neointima oder lediglich eine Korrelation besteht, und in wieweit die HO-1 darin involviert ist, muss mit weiteren Experimenten untersucht werden. Möglicherweise verhindert eine HO-1-Aktivierung nicht nur die Transmigration in das Gewebe, sondern hemmt auch die

Proliferation und Aktivität der Leukozyten vor Ort. Dies ließe sich mit einer Induktion der HO-1 zu einem späteren Zeitpunkt der TV ermitteln. Mit der induzierten Depletion von Monozyten zu einem Zeitpunkt einer erst mild ausgeprägten TV kann geklärt werden, ob diese Zellpopulation ein Treiber oder nur ein Nebeneffekt der TV ist. Ob die Zunahme des Makrophagengehalts allerdings durch eine gesteigerte Transmigrationskapazität der Monozyten aus dem Blut oder durch die Proliferation von gewebsresidenten Makrophagen zustande kam, lässt sich hierbei nicht differenzieren.

Anzumerken ist, dass Monozyten beziehungsweise Makrophagen, nicht die einzige Leukozytenpopulation ist, die im Zusammenhang mit einer TV eine tragende Rolle spielt. Durch das Binden der DSA an EC werden Zellpopulationen angelockt, die auf ihrer Oberfläche Fcγ-Rezeptoren exprimieren. Dazu zählen neben Monozyten auch NK-Zellen. Unabhängig von einem funktionierenden Komplementsystem vermindert ebenso die Depletion der NK-Zellen die Ausbildung einer Neointima bei einer experimentellen antikörperinduzierten TV (Hirohashi, Chase et al. 2012). Ähnlich wie bei den Makrophagen korrelierte auch hier in einer klinischen Studie die Anzahl der in das Transplantat transmigrierten NK-Zellen mit einem schlechteren Organüberleben (Yazdani, Callemeyn et al. 2019).

Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum die CD62E-Blockade, zwar das monozytäre Infiltrat reduzierte die Neointima aber nicht auf die Größe der Kontrollgruppe verringerte.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Bereits heute übersteigt die Zahl der für eine Transplantation benötigten Organe die der zur Verfügung stehenden Organe. Der Fokus der wissenschaftlichen Forschung muss daher auf einer Verlängerung der Überlebenszeit eines transplantierten Organs liegen. Um in diesem Bereich weiter Fortschritte zu machen, müssen die zugrunde liegenden Mechanismen, die zu einem Funktionsverlust des Transplantats führen, besser verstanden werden. Dazu gehört es auch, die Entstehung und Entwicklung der TV weiter zu untersuchen, um mögliche therapeutische Interventionen zu testen und in der klinischen Routine zu implementieren. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das antiinflammatorische Enzym HO-1 eine Rolle bei der Behandlung einer TV spielen kann. Durch den Einsatz pharmakologischer Substanzen, die erwiesenermaßen die Aktivität und Expression der HO-1 induzieren, konnten die Kennzeichen einer TV reduziert und die inflammatorischen Prozesse verlangsamt werden. Die Frage, ob dies tatsächlich auf die HO-1 direkt zurück zu führen ist, bleibt dabei offen.

Die Behandlungen mit CoPPIX oder dem Statin erfolgte in diesem Modell systemisch. Für eine Überexpression der HO-1 exklusiv in dem Gewebe des Transplantats bietet sich der Einsatz von Alginat-Hydrogel-Polymeren an. Diese Polymere werden bereits eingesetzt, um zielgerichtet AAV-Vektoren zu transfizieren und eine Überexpression spezifischer Gene zu ermöglichen (Remes, Basha et al. 2021). Auch konnten für den HO-1 Metaboliten CO in dieser Arbeit protektive Effekte gegenüber einer TV

nachgewiesen werden. Um dieses Gas als eine therapeutische Intervention im klinischen Alltag zu implementieren, sind weitere Studien zu dessen Konzentration und Sicherheit erforderlich.

Darüber hinaus gilt es auch den Beitrag der verschiedenen Zellpopulationen auf die Entwicklung einer TV weiter zu untersuchen und die gegenseitige Beeinflussung durch die Produktion löslicher Signale zu verstehen. Mittlerweile wurde im Zusammenhang mit Nierentransplantationen nachgewiesen, dass DSA nicht nur an die EC des Transplantats binden und dort proinflammatorische Signalwege initiieren. Patienten, die nach einer Nierentransplantation DSA und eine Abstoßungsreaktion entwickelten, hatten ein 2,5-fach erhöhtes Risiko kardiovaskuläre Komplikation, wie Schlaganfall, oder Herzinfarkt, zu erleiden (Loupy, Vernerey et al. 2015). Die pathophysiologische Veränderung der vaskulären Strukturen von Transplantaten sind somit nicht der einzige Effekt, der durch DSA verursacht wird, viel mehr scheinen sie auch systemische Auswirkungen zu haben. Vermutlich werden diese Effekte durch proinflammatorische Zytokine vermittelt, die lokal im transplantierten Gewebe exozytiert werden und zu einer Inflammation des gesamten Gefäßsystems führen.

Die Ursache der meisten kardiovaskulären Ereignisse ist eine bestehende Atherosklerose, eine chronische Entzündung der Gefäßwand (Libby and Hansson 2015). Auch hier kommt es durch eine initiale lokale Schädigung des Endothels zur Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand (Hansson 2005). Durch die Kombination des Mausmodells einer chronischen Abstoßung mit einem atherosklerotischen Mausmodell ist es möglich, den Zusammenhang zwischen lokal aktiven DSA und der systemischen Erkrankung Atherosklerose *in vivo* zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

- Adach, W. and B. Olas (2019). "Carbon monoxide and its donors - their implications for medicine." Future Med Chem **11**(1): 61-73.
- Afzali, B., G. Lombardi and R. I. Lechler (2008). "Pathways of major histocompatibility complex allorecognition." Curr Opin Organ Transplant **13**(4): 438-444.
- Alhabbab, R. Y., E. Nova-Lamperti, O. Aravena, H. M. Burton, R. I. Lechler, A. Dorling and G. Lombardi (2019). "Regulatory B cells: Development, phenotypes, functions, and role in transplantation." Immunol Rev **292**(1): 164-179.
- Amashukeli, X., N. E. Gruhn, D. L. Lichtenberger, J. R. Winkler and H. B. Gray (2004). "Inner-sphere electron-transfer reorganization energies of zinc porphyrins." J Am Chem Soc **126**(47): 15566-15571.
- Ancuta, P., R. Rao, A. Moses, A. Mehle, S. K. Shaw, F. W. Luscinskas and D. Gabuzda (2003). "Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes." J Exp Med **197**(12): 1701-1707.
- Anwar, S., R. Delos Santos, T. Horwedel, D. Brennan and C. Klein (2014). "Rituximab Does Not Prevent Graft Loss in Renal Transplant Recipients With Chronic Antibody Mediated Rejection With Significant Renal Impairment and Nephrotic Range Proteinuria.: Abstract# A273." **98**: 477.
- Appleton, S. D., M. L. Chretien, B. E. McLaughlin, H. J. Vreman, D. K. Stevenson, J. F. Brien, K. Nakatsu, D. H. Maurice and G. S. Marks (1999). "Selective inhibition of heme oxygenase, without inhibition of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by metalloporphyrins at low concentrations." Drug Metab Dispos **27**(10): 1214-1219.
- Armstrong, A. T., A. R. Strauch, R. C. Starling, D. D. Sedmak and C. G. Orosz (1997). "Morphometric analysis of neointimal formation in murine cardiac grafts: III. Dissociation of interstitial fibrosis from neointimal formation." Transplantation **64**(8): 1198-1202.
- Assuncao-Miranda, I., C. Cruz-Oliveira, R. L. Neris, C. M. Figueiredo, L. P. Pereira, D. Rodrigues, D. F. Araujo, A. T. Da Poian and M. T. Bozza (2016). "Inactivation of Dengue and Yellow Fever viruses by heme, cobalt-protoporphyrin IX and tin-protoporphyrin IX." J Appl Microbiol **120**(3): 790-804.
- Atkinson, C., J. Horsley, S. Rhind-Tutt, S. Charman, C. J. Phillpotts, J. Wallwork and M. J. Goddard (2004). "Neointimal smooth muscle cells in human cardiac allograft coronary artery vasculopathy are of donor origin." J Heart Lung Transplant **23**(4): 427-435.
- Autieri, M. V. (2003). "Allograft-induced proliferation of vascular smooth muscle cells: potential targets for treating transplant vasculopathy." Curr Vasc Pharmacol **1**(1): 1-9.
- Babendreyer, A., L. Molls, D. Dreymueller, S. Uhlig and A. Ludwig (2017). "Shear Stress Counteracts Endothelial CX3CL1 Induction and Monocytic Cell Adhesion." Mediators Inflamm **2017**: 1515389.
- Bach, F. H., C. Ferran, P. Hechenleitner, W. Mark, N. Koyamada, T. Miyatake, H. Winkler, A. Badrichani, D. Candinas and W. W. Hancock (1997). "Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment." Nat Med **3**(2): 196-204.

- Bach, F. H., M. A. Turman, G. M. Vercellotti, J. L. Platt and A. P. Dalmaso (1991). "Accommodation: a working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting." Transplant Proc **23**(1 Pt 1): 205-207.
- Bachelet, T., C. Nodimar, J. L. Taupin, S. Lepreux, K. Moreau, D. Morel, G. Guidicelli, L. Couzi and P. Merville (2015). "Intravenous immunoglobulins and rituximab therapy for severe transplant glomerulopathy in chronic antibody-mediated rejection: a pilot study." Clin Transplant **29**(5): 439-446.
- Back, M., A. Yurdagul, Jr., I. Tabas, K. Oorni and P. T. Kovanen (2019). "Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities." Nat Rev Cardiol **16**(7): 389-406.
- Bell, C. W., W. Jiang, I. Charles F. Reich and D. S. Pisetsky (2006). "The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death." American Journal of Physiology-Cell Physiology **291**(6): C1318-C1325.
- Belperio, J. A. and A. Ardehali (2008). "Chemokines and Transplant Vasculopathy." Circulation Research **103**(5): 454-466.
- Berberat, P. O., A. R. Yi, K. Yamashita, M. M. Warny, E. Csizmadia, S. C. Robson and F. H. Bach (2005). "Heme oxygenase-1-generated biliverdin ameliorates experimental murine colitis." Inflamm Bowel Dis **11**(4): 350-359.
- Bergler, T., B. Jung, F. Bourier, L. Kuhne, M. C. Banas, P. Rummele, S. Wurm and B. Banas (2016). "Infiltration of Macrophages Correlates with Severity of Allograft Rejection and Outcome in Human Kidney Transplantation." PLoS One **11**(6): e0156900.
- Bevilacqua, M. P., S. Stengelin, M. A. Gimbrone, Jr. and B. Seed (1989). "Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins." Science **243**(4895): 1160-1165.
- Bharat, A. and D. Kreisel (2018). "Immunopathogenesis of Primary Graft Dysfunction After Lung Transplantation." Ann Thorac Surg **105**(3): 671-674.
- Bian, H. and E. F. Reed (2001). "Anti-HLA class I antibodies transduce signals in endothelial cells resulting in FGF receptor translocation, down-regulation of ICAM-1 and cell proliferation." Transplant Proc **33**(1-2): 311.
- Bochner, B. S., F. W. Luscinskas, M. A. Gimbrone, Jr., W. Newman, S. A. Sterbinsky, C. P. Derse-Anthony, D. Klunk and R. P. Schleimer (1991). "Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules." J Exp Med **173**(6): 1553-1557.
- Bongoni, A. K., B. Lu, E. J. Salvaris, V. Roberts, D. Fang, J. L. McRae, N. Fisicaro, K. M. Dwyer and P. J. Cowan (2017). "Overexpression of Human CD55 and CD59 or Treatment with Human CD55 Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice." J Immunol **198**(12): 4837-4845.
- Boyette, L. B., C. Macedo, K. Hadi, B. D. Elinoff, J. T. Walters, B. Ramaswami, G. Chalasani, J. M. Taboas, F. G. Lakkis and D. M. Metes (2017). "Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets." PLoS One **12**(4): e0176460.
- Braun, M. Y., A. McCormack, G. Webb and J. R. Batchelor (1993). "Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization." Transplantation **55**(1): 177-182.

- Briston, D. and C. Daniels (2019). Critical Care Management of the ACHD Patient with Aortopathies. Intensive Care of the Adult with Congenital Heart Disease. Congenital Heart Disease in Adolescents and Adults., Springer, Cham.
- Brouard, S., L. E. Otterbein, J. Anrather, E. Tobiasch, F. H. Bach, A. M. Choi and M. P. Soares (2000). "Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis." J Exp Med **192**(7): 1015-1026.
- Cardinal, H., M. Dieude and M. J. Hebert (2017). "The Emerging Importance of Non-HLA Autoantibodies in Kidney Transplant Complications." J Am Soc Nephrol **28**(2): 400-406.
- Carlin, L. M., E. G. Stamatiades, C. Auffray, R. N. Hanna, L. Glover, G. Vizcay-Barrena, C. C. Hedrick, H. T. Cook, S. Diebold and F. Geissmann (2013). "Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal." Cell **153**(2): 362-375.
- Cernoch, M., P. Hrubá, M. Kollar, P. Mrazová, L. Stranavová, A. Lodererová, E. Honsová and O. Viklický (2018). "Intrarenal Complement System Transcripts in Chronic Antibody-Mediated Rejection and Recurrent IgA Nephropathy in Kidney Transplantation." Front Immunol **9**: 2310.
- Chen, C. C., E. Pouliquen, A. Broisat, F. Andreatta, M. Racape, P. Bruneval, L. Kessler, M. Ahmadi, S. Bacot, C. Saison-Delaplace, M. Marcaud, J. D. Van Huyen, A. Loupy, J. Villard, S. Demuylder-Mischler, T. Berney, E. Morelon, M. K. Tsai, M. N. Kolopp-Sarda, A. Koenig, V. Mathias, S. Ducreux, C. Ghezzi, V. Dubois, A. Nicoletti, T. Defrance and O. Thaunat (2018). "Endothelial chimerism and vascular sequestration protect pancreatic islet grafts from antibody-mediated rejection." J Clin Invest **128**(1): 219-232.
- Chen, J., B. Fabry, E. L. Schiffrin and N. Wang (2001). "Twisting integrin receptors increases endothelin-1 gene expression in endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **280**(6): C1475-1484.
- Chen, J. L., R. John, J. A. Richardson, J. M. Shelton, X. J. Zhou, Y. X. Wang, Q. Q. Wu, J. R. Hartono, P. D. Winterberg and C. Y. Lu (2011). "Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury." Kidney International **79**(3): 288-299.
- Chenzbraun, A., F. J. Pinto, E. L. Alderman, J. Botas, S. N. Oesterle, J. S. Schroeder, H. Valentine and R. L. Popp (1995). "Distribution and morphologic features of coronary artery disease in cardiac allografts: an intracoronary ultrasound study." J Am Soc Echocardiogr **8**(1): 1-8.
- Chhabra, M., J. Alsughayyir, M. S. Qureshi, M. Mallik, J. M. Ali, I. Gamper, E. L. Moseley, S. Peacock, V. Kosmoliaptsis, M. J. Goddard, M. A. Linterman, R. Motallebzadeh and G. J. Pettigrew (2018). "Germinal Center Alloantibody Responses Mediate Progression of Chronic Allograft Injury." Front Immunol **9**: 3038.
- Chih, S., A. Y. Chong, L. M. Mielniczuk, D. L. Bhatt and R. S. Beanlands (2016). "Allograft Vasculopathy: The Achilles' Heel of Heart Transplantation." J Am Coll Cardiol **68**(1): 80-91.
- Chung, B. H., Y. Kim, H. S. Jeong, Y. A. Hong, B. S. Choi, C. W. Park, Y. J. Choi, Y. S. Kim and C. W. Yang (2014). "Clinical outcome in patients with chronic antibody-mediated rejection treated with and without rituximab and intravenous immunoglobulin combination therapy." Transpl Immunol **31**(3): 140-144.
- Colvin, R. B. and R. N. Smith (2005). "Antibody-mediated organ-allograft rejection." Nat Rev Immunol **5**(10): 807-817.

Cornwell, W. D., V. Kim, X. Fan, M. E. Vega, F. V. Ramsey, G. J. Criner and T. J. Rogers (2018). "Activation and polarization of circulating monocytes in severe chronic obstructive pulmonary disease." BMC Pulm Med **18**(1): 101.

Costanzo, M. R., A. Dipchand, R. Starling, A. Anderson, M. Chan, S. Desai, S. Fedson, P. Fisher, G. Gonzales-Stawinski, L. Martinelli, D. McGiffin, J. Smith, D. Taylor, B. Meiser, S. Webber, D. Baran, M. Carboni, T. Dengler, D. Feldman, M. Frigerio, A. Kfoury, D. Kim, J. Kobashigawa, M. Shullo, J. Stehlik, J. Teuteberg, P. Uber, A. Zuckermann, S. Hunt, M. Burch, G. Bhat, C. Canter, R. Chinnock, M. Crespo-Leiro, R. Delgado, F. Dobbels, K. Grady, W. Kao, J. Lamour, G. Parry, J. Patel, D. Pini, J. Towbin, G. Wolfel, D. Delgado, H. Eisen, L. Goldberg, J. Hosenpud, M. Johnson, A. Keogh, C. Lewis, J. O'Connell, J. Rogers, H. Ross, S. Russell, J. Vanhaecke, H. International Society of and G. Lung Transplantation (2010). "The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients." J Heart Lung Transplant **29**(8): 914-956.

Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S. Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J. P. Jais, D. D'Cruz, J. L. Casanova, C. Trouillet and F. Geissmann (2010). "Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors." Immunity **33**(3): 375-386.

Davies, L. C. and P. R. Taylor (2015). "Tissue-resident macrophages: then and now." Immunology **144**(4): 541-548.

de Abreu Costa, L., M. Henrique Fernandes Ottoni, M. G. Dos Santos, A. B. Meireles, V. Gomes de Almeida, W. de Fatima Pereira, B. Alves de Avelar-Freitas and G. Eustaquio Alvim Brito-Melo (2017). "Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes." Molecules **22**(11).

Delville, M., B. Lamarthee, S. Pagie, S. B. See, M. Rabant, C. Burger, P. Gatault, M. Giral, O. Thaunat, N. Arzouk, A. Hertig, M. Hazzan, M. Matignon, C. Mariat, S. Caillard, N. Kamar, J. Sayegh, P. F. Westeel, C. Garrouste, M. Ladriere, V. Vuiblet, J. Rivalan, P. Merville, D. Bertrand, A. Le Moine, J. P. Duong Van Huyen, A. Cesbron, N. Cagnard, O. Alibeu, S. C. Satchell, C. Legendre, E. Zorn, J. L. Taupin, B. Charreau and D. Anglicheau (2019). "Early Acute Microvascular Kidney Transplant Rejection in the Absence of Anti-HLA Antibodies Is Associated with Preformed IgG Antibodies against Diverse Glomerular Endothelial Cell Antigens." J Am Soc Nephrol **30**(4): 692-709.

Devitt, J. J., A. Rice, D. McLean, S. K. Murray, G. M. Hirsch and T. D. Lee (2013). "Impact of donor benign intimal thickening on cardiac allograft vasculopathy." J Heart Lung Transplant **32**(4): 454-460.

Doty, K. R., M. V. Guillot-Sestier and T. Town (2015). "The role of the immune system in neurodegenerative disorders: Adaptive or maladaptive?" Brain Res **1617**: 155-173.

Drachenberg, C. B. and J. C. Papadimitriou (2013). "Endothelial injury in renal antibody-mediated allograft rejection: a schematic view based on pathogenesis." Transplantation **95**(9): 1073-1083.

Dragun, D., R. Catar and A. Philippe (2016). "Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity." Kidney Int **90**(2): 280-288.

- Eskandary, F., H. Regele, L. Baumann, G. Bond, N. Kozakowski, M. Wahrmann, L. G. Hidalgo, H. Haslacher, C. C. Kaltenecker, M. B. Aretin, R. Oberbauer, M. Posch, A. Staudenherz, A. Handisurya, J. Reeve, P. F. Halloran and G. A. Bohmig (2018). "A Randomized Trial of Bortezomib in Late Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection." J Am Soc Nephrol **29**(2): 591-605.
- Eurotransplant. (2021). "Eurotransplant." Retrieved 19. March, 2021, from <https://www.eurotransplant.org/statistics/statistics-library/>.
- Fayad-Kobeissi, S., J. Ratovonantenaina, H. Dabire, J. L. Wilson, A. M. Rodriguez, A. Berdeaux, J. L. Dubois-Rande, B. E. Mann, R. Motterlini and R. Foresti (2016). "Vascular and angiogenic activities of CORM-401, an oxidant-sensitive CO-releasing molecule." Biochem Pharmacol **102**: 64-77.
- Feng, G., S. N. Nadig, L. Backdahl, S. Beck, R. S. Francis, A. Schiopu, A. Whatcott, K. J. Wood and A. Bushell (2011). "Functional regulatory T cells produced by inhibiting cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 prevent allograft rejection." Sci Transl Med **3**(83): 83ra40.
- Fenton, M., J. Simmonds, V. Shah, P. Brogan, N. Klein, J. Deanfield and M. Burch (2016). "Inflammatory Cytokines, Endothelial Function, and Chronic Allograft Vasculopathy in Children: An Investigation of the Donor and Recipient Vasculature After Heart Transplantation." Am J Transplant **16**(5): 1559-1568.
- Floerchinger, B., R. Oberhuber and S. G. Tullius (2012). "Effects of brain death on organ quality and transplant outcome." Transplant Rev (Orlando) **26**(2): 54-59.
- Francis, A. and R. Baynosa (2017). "Ischaemia-reperfusion injury and hyperbaric oxygen pathways: a review of cellular mechanisms." Diving Hyperb Med **47**(2): 110-117.
- Frenette, P. S. and D. D. Wagner (1996). "Adhesion molecules--Part 1." N Engl J Med **334**(23): 1526-1529.
- Frost, A. E., C. T. Jammal and P. T. Cagle (1996). "Hyperacute rejection following lung transplantation." Chest **110**(2): 559-562.
- Fukami, N., S. Ramachandran, K. Narayanan, W. Liu, D. S. Nath, M. Jendrisak, W. Chapman and T. Mohanakumar (2012). "Mechanism of accommodation in a sensitized human leukocyte antigen transgenic murine cardiac transplant model." Transplantation **93**(4): 364-372.
- Gao, W., P. S. Topham, J. A. King, S. T. Smiley, V. Csizmadia, B. Lu, C. J. Gerard and W. W. Hancock (2000). "Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection." J Clin Invest **105**(1): 35-44.
- Gavlovsky, P. J., P. Tonnerre, C. Guitton and B. Charreau (2016). "Expression of MHC class I-related molecules MICA, HLA-E and EPCR shape endothelial cells with unique functions in innate and adaptive immunity." Hum Immunol **77**(11): 1084-1091.
- Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.
- Gheith, O., T. Al-Otaibi, M. A. Halim, T. Mahmoud, P. Nair, M. A. Monem, S. Al-Waheeb, R. Hassan and N. Nampoory (2017). "Early Versus Late Acute Antibody-Mediated Rejection Among Renal Transplant Recipients in Terms of Response to Rituximab Therapy: A Single Center Experience." Exp Clin Transplant **15**(Suppl 1): 150-155.

- Ghouti-Terki L, S. B., Barbet C, Halimi J, Lebranchu Y, Magdelaine C, Baron C, Büchler M, Gatault P. (2013). "Treatment of Chronic Antibody-Mediated Rejection after Kidney Transplantation: Does Rituximab and Intravenous Globulins Improve Graft Survival? ." Am J Transplant **13**.
- Girlanda, R., D. E. Kleiner, Z. Duan, E. A. Ford, E. C. Wright, R. B. Mannon and A. D. Kirk (2008). "Monocyte infiltration and kidney allograft dysfunction during acute rejection." Am J Transplant **8**(3): 600-607.
- Glitz, D., N. Lucchiari, B. Pegaz-Fiornet and C. Suberbielle-Boissel (2006). "Endothelial cells as targets of allograft rejection." Transplantation **82**(1 Suppl): S19-21.
- Golbus, J. R., S. Adie, M. Yosef, V. L. Murthy, K. D. Aaronson and M. C. Konerman (2020). "Statin intensity and risk for cardiovascular events after heart transplantation." ESC Heart Fail **7**(5): 2074-2081.
- Gonzalez-Molina, M., D. Burgos, M. Cabello, P. Ruiz-Esteban, M. A. Rodriguez, C. Gutierrez, V. Lopez, V. Baena and D. Hernandez (2014). "Impact of immunosuppression treatment on the improvement in graft survival after deceased donor renal transplantation: a long-term cohort study." Nefrologia **34**(5): 570-578.
- Gotsch, U., E. Borges, R. Bosse, E. Boggemeyer, M. Simon, H. Mossmann and D. Vestweber (1997). "VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo." J Cell Sci **110** (Pt 5): 583-588.
- Grage-Griebenow, E., R. Zawatzky, H. Kahlert, L. Brade, H. Flad and M. Ernst (2001). "Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+)/ CD16(+) blood monocytes." Eur J Immunol **31**(1): 48-56.
- Grandaliano, G., L. Gesualdo, E. Ranieri, R. Monno, G. Stallone and F. P. Schena (1997). "Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection." Transplantation **63**(3): 414-420.
- Grosser, N., A. Hemmerle, G. Berndt, K. Erdmann, U. Hinkelmann, S. Schurger, N. Wijayanti, S. Immenschuh and H. Schroder (2004). "The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells." Free Radic Biol Med **37**(12): 2064-2071.
- Gulleroglu, K., E. Baskin, U. S. Bayrakci, M. Turan, B. H. Ozdemir, G. Moray, H. Karakayali and M. Haberal (2013). "Antibody-mediated rejection and treatment in pediatric patients: one center's experience." Exp Clin Transplant **11**(5): 404-407.
- Haas, M. and J. Mirocha (2011). "Early ultrastructural changes in renal allografts: correlation with antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy." Am J Transplant **11**(10): 2123-2131.
- Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-1695.
- Hayashi, S., R. Takamiya, T. Yamaguchi, K. Matsumoto, S. J. Tojo, T. Tamatani, M. Kitajima, N. Makino, Y. Ishimura and M. Suematsu (1999). "Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme." Circ Res **85**(8): 663-671.

- Heidt, S., J. Hester, S. Shankar, P. J. Friend and K. J. Wood (2012). "B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells." Am J Transplant **12**(7): 1784-1792.
- Herrera, O. B., D. Golshayan, R. Tibbott, F. Salcido Ochoa, M. J. James, F. M. Marelli-Berg and R. I. Lechler (2004). "A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells." J Immunol **173**(8): 4828-4837.
- Herzog, C., A. Lorenz, H. J. Gillmann, A. Chowdhury, J. Larmann, T. Harendza, F. Echtermeyer, M. Muller, M. Schmitz, J. Stypmann, D. G. Seidler, M. Damm, S. N. Stehr, T. Koch, K. C. Wollert, E. M. Conway and G. Theilmeier (2014). "Thrombomodulin's lectin-like domain reduces myocardial damage by interfering with HMGB1-mediated TLR2 signalling." Cardiovasc Res **101**(3): 400-410.
- Hidalgo, L. G., B. Sis, J. Sellares, P. M. Campbell, M. Mengel, G. Einecke, J. Chang and P. F. Halloran (2010). "NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection." Am J Transplant **10**(8): 1812-1822.
- Hirai, K., T. Sasahira, H. Ohmori, K. Fujii and H. Kuniyasu (2007). "Inhibition of heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin IX reduces tumor growth of LL/2 lung cancer in C57BL mice." Int J Cancer **120**(3): 500-505.
- Hirohashi, T., C. M. Chase, P. Della Pelle, D. Sebastian, A. Alessandrini, J. C. Madsen, P. S. Russell and R. B. Colvin (2012). "A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody." Am J Transplant **12**(2): 313-321.
- Hirohashi, T., S. Uehara, C. M. Chase, P. DellaPelle, J. C. Madsen, P. S. Russell and R. B. Colvin (2010). "Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice." Am J Transplant **10**(3): 510-517.
- Hollenberg, S. M., L. W. Klein, J. E. Parrillo, M. Scherer, D. Burns, P. Tamburro, D. Bromet, A. Satran and M. R. Costanzo (2004). "Changes in coronary endothelial function predict progression of allograft vasculopathy after heart transplantation." J Heart Lung Transplant **23**(3): 265-271.
- Horuk, R., C. Clayberger, A. M. Krensky, Z. Wang, H. J. Grone, C. Weber, K. S. Weber, P. J. Nelson, K. May, M. Rosser, L. Dunning, M. Liang, B. Buckman, A. Ghannam, H. P. Ng, I. Islam, J. G. Bauman, G. P. Wei, S. Monahan, W. Xu, R. M. Snider, M. M. Morrissey, J. Hesselgesser and H. D. Perez (2001). "A non-peptide functional antagonist of the CCR1 chemokine receptor is effective in rat heart transplant rejection." J Biol Chem **276**(6): 4199-4204.
- Hsiao, H. M., R. Fernandez, S. Tanaka, W. Li, J. H. Spahn, S. Chiu, M. Akbarpour, D. Ruiz-Perez, Q. Wu, C. Turam, D. Scozzi, T. Takahashi, H. P. Luehmann, V. Puri, G. R. S. Budinger, A. S. Krupnick, A. V. Misharin, K. J. Lavine, Y. Liu, A. E. Gelman, A. Bharat and D. Kreisel (2018). "Spleen-derived classical monocytes mediate lung ischemia-reperfusion injury through IL-1beta." J Clin Invest **128**(7): 2833-2847.
- Huibers, M. M., A. Vink, J. Kaldeway, A. Huisman, K. Timmermans, M. Leenders, M. E. Schipper, J. R. Lahpor, H. J. Kirkels, C. Klopping, N. de Jonge and R. A. de Weger (2014). "Distinct phenotypes of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: a histopathological study." Atherosclerosis **236**(2): 353-359.
- Hutchinson, I. V. (2000). "Cardiac allograft vasculopathy--the cellular attack." Z Kardiol **89 Suppl 9**: IX/16-20.

Ikeda, A., S. Ueki, A. Nakao, K. Tomiyama, M. A. Ross, D. B. Stolz, D. A. Geller and N. Murase (2009). "Liver graft exposure to carbon monoxide during cold storage protects sinusoidal endothelial cells and ameliorates reperfusion injury in rats." Liver Transpl **15**(11): 1458-1468.

Immenschuh, S. and G. Ramadori (2000). "Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target." Biochem Pharmacol **60**(8): 1121-1128.

Iwasaki, K., Y. Miwa, H. Ogawa, S. Yazaki, M. Iwamoto, T. Furusawa, A. Onishi, T. Kuzuya, M. Haneda, Y. Watarai, K. Uchida and T. Kobayashi (2012). "Comparative study on signal transduction in endothelial cells after anti-a/b and human leukocyte antigen antibody reaction: implication of accommodation." Transplantation **93**(4): 390-397.

Jadlowiec, C. C. and T. Taner (2016). "Liver transplantation: Current status and challenges." World J Gastroenterol **22**(18): 4438-4445.

Jin, Y.-P., Y. Korin, X. Zhang, P. T. Jindra, E. Rozengurt and E. F. Reed (2007). "RNA Interference Elucidates the Role of Focal Adhesion Kinase in HLA Class I-Mediated Focal Adhesion Complex Formation and Proliferation in Human Endothelial Cells." The Journal of Immunology **178**(12): 7911-7922.

Jin, Y. P., N. M. Valenzuela, X. Zhang, E. Rozengurt and E. F. Reed (2018). "HLA Class II-Triggered Signaling Cascades Cause Endothelial Cell Proliferation and Migration: Relevance to Antibody-Mediated Transplant Rejection." J Immunol **200**(7): 2372-2390.

Jin, Y. P., N. M. Valenzuela, M. E. Ziegler, E. Rozengurt and E. F. Reed (2014). "Everolimus inhibits anti-HLA I antibody-mediated endothelial cell signaling, migration and proliferation more potently than sirolimus." Am J Transplant **14**(4): 806-819.

Joubert-Huebner, E. (2009). "Arterien, Venen und Kapillarnetz. Anatomie und Pathophysiologie." Retrieved 11. April, 2021,, from <http://www.kardiotechnik.org/Blutgefasssystem.pdf>.

Kanaji, S., S. A. Fahs, Q. Shi, S. L. Haberichter and R. R. Montgomery (2012). "Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis." J Thromb Haemost **10**(8): 1646-1652.

Kao, J., J. Kobashigawa, M. C. Fishbein, W. R. MacLellan, M. D. Burdick, J. A. Belperio and R. M. Strieter (2003). "Elevated serum levels of the CXCR3 chemokine ITAC are associated with the development of transplant coronary artery disease." Circulation **107**(15): 1958-1961.

Kaposztas, Z., H. Podder, S. Mauiyyedi, O. Illoh, R. Kerman, M. Reyes, V. Pollard and B. D. Kahan (2009). "Impact of rituximab therapy for treatment of acute humoral rejection." Clin Transplant **23**(1): 63-73.

Kawamura, K., K. Ishikawa, Y. Wada, S. Kimura, H. Matsumoto, T. Kohro, H. Itabe, T. Kodama and Y. Maruyama (2005). "Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(1): 155-160.

Kayler, L. K., T. R. Srinivas and J. D. Schold (2011). "Influence of CIT-induced DGF on kidney transplant outcomes." Am J Transplant **11**(12): 2657-2664.

Kenta, I. and K. Takaaki (2020). "Molecular Mechanisms of Antibody-Mediated Rejection and Accommodation in Organ Transplantation." Nephron **144 Suppl 1**: 2-6.

- Keshavan, P., T. L. Deem, S. J. Schwemberger, G. F. Babcock, J. M. Cook-Mills and S. D. Zucker (2005). "Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration." J Immunol **174**(6): 3709-3718.
- Keyse, S. M., L. A. Applegate, Y. Tromvoukis and R. M. Tyrrell (1990). "Oxidant stress leads to transcriptional activation of the human heme oxygenase gene in cultured skin fibroblasts." Mol Cell Biol **10**(9): 4967-4969.
- Kirk, A. D., D. A. Hale, R. B. Mannon, D. E. Kleiner, S. C. Hoffmann, R. L. Kampen, L. K. Cendales, D. K. Tadaki, D. M. Harlan and S. J. Swanson (2003). "Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H)." Transplantation **76**(1): 120-129.
- Kitchens, W. H., C. M. Chase, S. Uehara, L. D. Cornell, R. B. Colvin, P. S. Russell and J. C. Madsen (2007). "Macrophage depletion suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice." Am J Transplant **7**(12): 2675-2682.
- Kobashigawa, J. A., S. Katznelson, H. Laks, J. A. Johnson, L. Yeatman, X. M. Wang, D. Chia, P. I. Terasaki, A. Sabad, G. A. Cogert and et al. (1995). "Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation." N Engl J Med **333**(10): 621-627.
- Konrad, F. M., U. Knausberg, R. Hone, K. C. Ngamsri and J. Reutershan (2016). "Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation." Mucosal Immunol **9**(1): 98-111.
- Koulack, J., V. C. McAlister, C. A. Giacomantonio, H. Bitter-Suermann, A. S. MacDonald and T. D. Lee (1995). "Development of a mouse aortic transplant model of chronic rejection." Microsurgery **16**(2): 110-113.
- Kummer, L., M. Zaradzki, V. Vijayan, R. Arif, M. A. Weigand, S. Immenschuh, A. H. Wagner and J. Larmann (2020). "Vascular Signaling in Allogenic Solid Organ Transplantation - The Role of Endothelial Cells." Front Physiol **11**: 443.
- Land, W. G. (2012). "Emerging role of innate immunity in organ transplantation: part I: evolution of innate immunity and oxidative allograft injury." Transplant Rev (Orlando) **26**(2): 60-72.
- Le Bas-Bernardet, S., S. Coupel, A. Chauveau, J. P. Soullillou and B. Charreau (2004). "Vascular endothelial cells evade apoptosis triggered by human leukocyte antigen-DR ligation mediated by allospecific antibodies." Transplantation **78**(12): 1729-1739.
- Leautaud, V. and B. Demple (2007). "Regulation of heme oxygenase-1 mRNA deadenylation and turnover in NIH3T3 cells by nitrosative or alkylation stress." BMC Mol Biol **8**: 116.
- Lee, B. K., W. J. Lee and Y. S. Jung (2017). "Chrysin Attenuates VCAM-1 Expression and Monocyte Adhesion in Lipopolysaccharide-Stimulated Brain Endothelial Cells by Preventing NF-kappaB Signaling." Int J Mol Sci **18**(7).
- Lee, T., H. S. Park, J. H. Jeong and T. W. Jung (2019). "Kynurenic acid attenuates pro-inflammatory reactions in lipopolysaccharide-stimulated endothelial cells through the PPARdelta/HO-1-dependent pathway." Mol Cell Endocrinol **495**: 110510.
- Lefaucheur, C., D. Nochy, J. Andrade, J. Verine, C. Gautreau, D. Charron, G. S. Hill, D. Glotz and C. Suberbielle-Boissel (2009). "Comparison of combination Plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection." Am J Transplant **9**(5): 1099-1107.

- Lefaucheur, C., D. Viglietti, Y. Bouatou, A. Philippe, D. Pievani, O. Aubert, J. P. Duong Van Huyen, J. L. Taupin, D. Glotz, C. Legendre, A. Loupy, P. F. Halloran and D. Dragun (2019). "Non-HLA agonistic anti-angiotensin II type 1 receptor antibodies induce a distinctive phenotype of antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients." *Kidney Int* **96**(1): 189-201.
- Li, H., M. Yan, J. Yu, Q. Xu, X. Xia, J. Liao and W. Zheng (2020). "In vivo identification of arteries and veins using two-photon excitation elastin autofluorescence." *J Anat* **236**(1): 171-179.
- Li, M., B. van Esch, P. A. J. Henricks, G. Folkerts and J. Garssen (2018). "The Anti-inflammatory Effects of Short Chain Fatty Acids on Lipopolysaccharide- or Tumor Necrosis Factor alpha-Stimulated Endothelial Cells via Activation of GPR41/43 and Inhibition of HDACs." *Front Pharmacol* **9**: 533.
- Li, W., G. Feng, J. M. Gauthier, I. Lokshina, R. Higashikubo, S. Evans, X. Liu, A. Hassan, S. Tanaka, M. Cicka, H. M. Hsiao, D. Ruiz-Perez, A. Bredemeyer, R. W. Gross, D. L. Mann, Y. Y. Tyurina, A. E. Gelman, V. E. Kagan, A. Linkermann, K. J. Lavine and D. Kreisel (2019). "Ferroptotic cell death and TLR4/Trif signaling initiate neutrophil recruitment after heart transplantation." *J Clin Invest* **129**(6): 2293-2304.
- Libby, P. (1987). "The active roles of cells of the blood vessel wall in health and disease." *Mol Aspects Med* **9**(6): 499-567.
- Libby, P. and G. K. Hansson (2015). "Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers." *Circ Res* **116**(2): 307-311.
- Lin, C. M., R. G. Gill and B. Mehrad (2021). "The natural killer cell activating receptor, NKG2D, is critical to antibody-dependent chronic rejection in heart transplantation." *Am J Transplant*.
- Lin, H., J. E. Wilson, C. R. Roberts, K. J. Horley, G. L. Winters, M. R. Costanzo and B. M. McManus (1996). "Biglycan, decorin, and versican protein expression patterns in coronary arteriopathy of human cardiac allograft: distinctness as compared to native atherosclerosis." *J Heart Lung Transplant* **15**(12): 1233-1247.
- Lion, J., C. Taflin, A. R. Cross, M. Robledo-Sarmiento, E. Mariotto, A. Savenay, M. Carmagnat, C. Suberbielle, D. Charron, A. Haziot, D. Glotz and N. Mooney (2016). "HLA Class II Antibody Activation of Endothelial Cells Promotes Th17 and Disrupts Regulatory T Lymphocyte Expansion." *Am J Transplant* **16**(5): 1408-1420.
- Loboda, A., A. Jazwa, B. Wegiel, A. Jozkowicz and J. Dulak (2005). "Heme oxygenase-1-dependent and -independent regulation of angiogenic genes expression: effect of cobalt protoporphyrin and cobalt chloride on VEGF and IL-8 synthesis in human microvascular endothelial cells." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **51**(4): 347-355.
- Loupy, A., M. Haas, C. Roufosse, M. Naesens, B. Adam, M. Afrouzian, E. Akalin, N. Alachkar, S. Bagnasco, J. U. Becker, L. D. Cornell, M. C. Clahsen-van Groningen, A. J. Demetris, D. Dragun, J. P. Duong van Huyen, A. B. Farris, A. B. Fogo, I. W. Gibson, D. Glotz, J. Gueguen, Z. Kikic, N. Kozakowski, E. Kraus, C. Lefaucheur, H. Liapis, R. B. Mannon, R. A. Montgomery, B. J. Nankivell, V. Nickeleit, P. Nickerson, M. Rabant, L. Racusen, P. Randhawa, B. Robin, I. A. Rosales, R. Sapir-Pichhadze, C. A. Schinstock, D. Seron, H. K. Singh, R. N. Smith, M. D. Stegall, A. Zeevi, K. Solez, R. B. Colvin and M. Mengel (2020). "The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection." *Am J Transplant* **20**(9): 2318-2331.

- Loupy, A., D. Vernerey, D. Viglietti, O. Aubert, J. P. Duong Van Huyen, J. P. Empana, P. Bruneval, D. Glotz, C. Legendre, X. Jouven and C. Lefaucheur (2015). "Determinants and Outcomes of Accelerated Arteriosclerosis: Major Impact of Circulating Antibodies." Circ Res **117**(5): 470-482.
- Lu, W. H., K. Palatnik, G. A. Fishbein, C. Lai, D. S. Levi, G. Perens, J. Alejos, J. Kobashigawa and M. C. Fishbein (2011). "Diverse morphologic manifestations of cardiac allograft vasculopathy: a pathologic study of 64 allograft hearts." J Heart Lung Transplant **30**(9): 1044-1050.
- Lund, L. H., K. K. Khush, W. S. Cherikh, S. Goldfarb, A. Y. Kucheryavaya, B. J. Levvey, B. Meiser, J. W. Rossano, D. C. Chambers, R. D. Yusen, J. Stehlik, H. International Society for and T. Lung (2017). "The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time." J Heart Lung Transplant **36**(10): 1037-1046.
- Luo, Z., T. Liao, Y. Zhang, H. Zheng, Q. Sun, F. Han, Z. Yang and Q. Sun (2020). "Triptolide Attenuates Transplant Vasculopathy Through Multiple Pathways." Front Immunol **11**: 612.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.
- Maines, M. D. (1997). "The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 517-554.
- Mamdouh, Z., A. Mikhailov and W. A. Muller (2009). "Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment." J Exp Med **206**(12): 2795-2808.
- Mao, Q., P. I. Terasaki, J. Cai, K. Briley, P. Catrou, C. Haisch and L. Rebellato (2007). "Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study." Am J Transplant **7**(4): 864-871.
- McLaughlin, P., A. J. Grillo-Lopez, B. K. Link, R. Levy, M. S. Czuczman, M. E. Williams, M. R. Heyman, I. Bence-Bruckler, C. A. White, F. Cabanillas, V. Jain, A. D. Ho, J. Lister, K. Wey, D. Shen and B. K. Dallaire (1998). "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program." J Clin Oncol **16**(8): 2825-2833.
- Mehra, M. R., P. A. Uber, H. O. Ventura, R. L. Scott and M. H. Park (2004). "The impact of mode of donor brain death on cardiac allograft vasculopathy: an intravascular ultrasound study." J Am Coll Cardiol **43**(5): 806-810.
- Mengel, M., B. Sis, M. Haas, R. B. Colvin, P. F. Halloran, L. C. Racusen, K. Solez, L. Cendales, A. J. Demetris, C. B. Drachenberg, C. F. Farver, E. R. Rodriguez, W. D. Wallace, D. Glotz and c. Banff meeting report writing (2012). "Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection." Am J Transplant **12**(3): 563-570.
- Meroni, P. L., E. Raschi, C. Testoni, A. Tincani, G. Balestrieri, R. Molteni, M. A. Khamashta, E. Tremoli and M. Camera (2001). "Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype." Arthritis Rheum **44**(12): 2870-2878.
- Millington, T. M. and J. C. Madsen (2010). "Innate immunity and cardiac allograft rejection." Kidney Int Suppl(119): S18-21.

- Mitchell, R. N. and P. Libby (2007). "Vascular remodeling in transplant vasculopathy." Circ Res **100**(7): 967-978.
- Montellano, P. R. (2000). "The mechanism of heme oxygenase." Curr Opin Chem Biol **4**(2): 221-227.
- Monteverde, M., A. Chaparro, Z. Balbarrey, Y. Marcos, K. Padros, J. Goldberg, L. Briones and D. Rush (2014). "Prevalence of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and C4 d Deposits in Pediatric Renal Transplant Recipients: Serological /histological Correlations and Impact On Graft Function and Survival.: Abstract# A355." Transplantation **98**: 435.
- Moreau, A., E. Varey, I. Anegon and M. C. Cuturi (2013). "Effector mechanisms of rejection." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(11).
- Motterlini, R. and L. E. Otterbein (2010). "The therapeutic potential of carbon monoxide." Nat Rev Drug Discov **9**(9): 728-743.
- Muller, W. A. (2003). "Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response." Trends Immunol **24**(6): 327-334.
- Murphy, J. M., K. Jeong, Y. A. R. Rodriguez, J. H. Kim, E. E. Ahn and S. S. Lim (2019). "FAK and Pyk2 activity promote TNF-alpha and IL-1beta-mediated pro-inflammatory gene expression and vascular inflammation." Sci Rep **9**(1): 7617.
- Naemi, F. M., V. Carter, J. A. Kirby and S. Ali (2013). "Anti-donor HLA class I antibodies: pathways to endothelial cell activation and cell-mediated allograft rejection." Transplantation **96**(3): 258-266.
- Najarian, J. S., D. S. Fryd, M. Strand, D. M. Canafax, N. L. Ascher, W. D. Payne, R. L. Simmons and D. E. Sutherland (1985). "A single institution, randomized, prospective trial of cyclosporin versus azathioprine-antilymphocyte globulin for immunosuppression in renal allograft recipients." Ann Surg **201**(2): 142-157.
- Nankivell, B. J. and D. R. Kuypers (2011). "Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss." Lancet **378**(9800): 1428-1437.
- Neefjes, J., M. L. Jongsma, P. Paul and O. Bakke (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." Nat Rev Immunol **11**(12): 823-836.
- Nordling, S., J. Brannstrom, F. Carlsson, B. Lu, E. Salvaris, A. Wanders, J. Buijs, S. Estrada, V. Tolmachev, P. J. Cowan, T. Lorant and P. U. Magnusson (2018). "Enhanced protection of the renal vascular endothelium improves early outcome in kidney transplantation: Preclinical investigations in pig and mouse." Sci Rep **8**(1): 5220.
- Oberbarnscheidt, M. H., Q. Zeng, Q. Li, H. Dai, A. L. Williams, W. D. Shlomchik, D. M. Rothstein and F. G. Lakkis (2014). "Non-self recognition by monocytes initiates allograft rejection." J Clin Invest **124**(8): 3579-3589.
- Ochando, J. C., N. R. Krieger and J. S. Bromberg (2006). "Direct versus indirect allorecognition: Visualization of dendritic cell distribution and interactions during rejection and tolerization." Am J Transplant **6**(10): 2488-2496.
- Otterbein, L. E., F. H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. Tao Lu, M. Wysk, R. J. Davis, R. A. Flavell and A. M. Choi (2000). "Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway." Nat Med **6**(4): 422-428.

- Pae, H. O., G. S. Oh, B. M. Choi, S. C. Chae, Y. M. Kim, K. R. Chung and H. T. Chung (2004). "Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production." J Immunol **172**(8): 4744-4751.
- Parikh, R. V., K. Khush, V. S. Pargaonkar, H. Luikart, D. Grimm, M. Yu, K. Okada, Y. Honda, A. C. Yeung, H. Valantine and W. F. Fearon (2019). "Association of Endothelin-1 With Accelerated Cardiac Allograft Vasculopathy and Late Mortality Following Heart Transplantation." Journal of Cardiac Failure **25**(2): 97-104.
- Park, J. S., D. Svetkauskaite, Q. B. He, J. Y. Kim, D. Strassheim, A. Ishizaka and E. Abraham (2004). "Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein." Journal of Biological Chemistry **279**(9): 7370-7377.
- Passlick, B., D. Flieger and H. W. Ziegler-Heitbrock (1989). "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood." Blood **74**(7): 2527-2534.
- Pazdernik, M., H. Bedanova, Z. Chen, J. Kautzner, V. Melenovsky, I. Malek, A. Slavcev, M. Bartonova, V. Karmazin, T. Eckhardt, A. Tomasek, E. Ozabalova, T. Kovarnik, P. Wohlfahrt and M. Sonka (2021). "Donor specific anti-HLA antibodies and cardiac allograft vasculopathy: A prospective study using highly automated 3-D optical coherence tomography analysis." Transpl Immunol **65**: 101340.
- Pedagogos, E., T. D. Hewitson, R. G. Walker, K. M. Nicholis and G. J. Becker (1997). "Myofibroblast involvement in chronic transplant rejection." Transplantation **64**(8): 1192-1197.
- Peelen, D. M., M. J. Hoogduijn, D. A. Hesselink and C. C. Baan (2021). "Advanced in vitro Research Models to Study the Role of Endothelial Cells in Solid Organ Transplantation." Front Immunol **12**: 607953.
- Piechota-Polanczyk, A., A. Kopacz, D. Kloska, B. Zagrapan, C. Neumayer, A. Grochot-Przeczek, I. Huk, C. Brostjan, J. Dulak and A. Jozkowicz (2018). "Simvastatin Treatment Upregulates HO-1 in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm but Independently of Nrf2." Oxid Med Cell Longev **2018**: 2028936.
- Pilmore, H. L., D. M. Painter, G. A. Bishop, G. W. McCaughan and J. M. Eris (2000). "Early up-regulation of macrophages and myofibroblasts: a new marker for development of chronic renal allograft rejection." Transplantation **69**(12): 2658-2662.
- Piotti, G., A. Palmisano, U. Maggiore and C. Buzio (2014). "Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection." Front Immunol **5**: 505.
- Pober, J. S., T. Collins, M. A. Gimbrone, Jr., P. Libby and C. S. Reiss (1986). "Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the immunogenicity of vascular endothelium." Transplantation **41**(2): 141-146.
- Pober, J. S. and R. S. Cotran (1990). "The role of endothelial cells in inflammation." Transplantation **50**(4): 537-544.
- Poss, K. D. and S. Tonegawa (1997). "Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10919-10924.
- Poss, K. D. and S. Tonegawa (1997). "Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10925-10930.

- Prasad, R., S. Giri, N. Nath, I. Singh and A. K. Singh (2005). "Inhibition of phosphoinositide 3 kinase-Akt (protein kinase B)-nuclear factor-kappa B pathway by lovastatin limits endothelial-monocyte cell interaction." J Neurochem **94**(1): 204-214.
- Rahmani, M., P. Cruz Rani, J. Granville David and M. McManus Bruce (2006). "Allograft Vasculopathy Versus Atherosclerosis." Circulation Research **99**(8): 801-815.
- Rana, A., R. L. Ackah, G. J. Webb, K. J. Halazun, J. M. Vierling, H. Liu, M.-F. Wu, D. Yoeli, M. Kueht, A. L. Mindikoglu, N. L. Sussman, N. T. Galván, R. T. Cotton, C. A. O'Mahony and J. A. Goss (2019). "No Gains in Long-term Survival After Liver Transplantation Over the Past Three Decades." **269**(1): 20-27.
- Redfield, R. R., T. M. Ellis, W. Zhong, J. R. Scalea, T. J. Zens, D. Mandelbrot, B. L. Muth, S. Panzer, M. Samaniego, D. B. Kaufman, B. C. Astor and A. Djamali (2016). "Current outcomes of chronic active antibody mediated rejection - A large single center retrospective review using the updated BANFF 2013 criteria." Hum Immunol **77**(4): 346-352.
- Reed, E. F. (2015). "Technical and conceptual advances in histocompatibility and immunogenetics inform on mechanisms of transplant rejection and pave the way to development of novel therapies." Curr Opin Organ Transplant **20**(4): 444-445.
- Remes, A., D. I. Basha, T. Puehler, C. Borowski, S. Hille, L. Kummer, A. H. Wagner, M. Hecker, J. Soethoff, G. Lutter, D. Frank, R. Arif, N. Frey, M. Zaradzki and O. J. Muller (2021). "Alginate hydrogel polymers enable efficient delivery of a vascular-targeted AAV vector into aortic tissue." Mol Ther Methods Clin Dev **21**: 83-93.
- Richters, C. D., E. van Gelderop, J. S. du Pont, M. J. Hoekstra, R. W. Kreis and E. W. Kamperdijk (1999). "Migration of dendritic cells to the draining lymph node after allogeneic or congenic rat skin transplantation." Transplantation **67**(6): 828-832.
- Rintala, J. M., J. Savikko, N. Palin, S. E. Rintala, P. K. Koskinen and E. von Willebrand (2016). "Oral Platelet-Derived Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Inhibitor Sunitinib Prevents Chronic Allograft Injury in Experimental Kidney Transplantation Model." **100**(1): 103-110.
- Riquelme, P., J. Haarer, A. Kammler, L. Walter, S. Tomiuk, N. Ahrens, A. K. Wege, I. Goetze, D. Zecher, B. Banas, R. Spang, F. Fandrich, M. B. Lutz, B. Sawitzki, H. J. Schlitt, J. Ochando, E. K. Geissler and J. A. Hutchinson (2018). "TIGIT(+) iTregs elicited by human regulatory macrophages control T cell immunity." Nat Commun **9**(1): 2858.
- Rossini, M., B. Cheunsuchon, E. Donnert, L. J. Ma, J. W. Thomas, E. G. Neilson and A. B. Fogo (2005). "Immunolocalization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), its receptor (FGFR-1), and fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) in inflammatory renal disease." Kidney Int **68**(6): 2621-2628.
- Rothermel, A. L., Y. Wang, J. Schechner, B. Mook-Kanamori, W. C. Aird, J. S. Pober, G. Tellides and D. R. Johnson (2004). "Endothelial cells present antigens in vivo." BMC Immunol **5**: 5.
- Rovere-Querini, P., A. Capobianco, P. Scaffidi, B. Valentini, F. Catalanotti, M. Giazson, I. E. Dumitriu, S. Müller, M. Iannacone, C. Traversari, M. E. Bianchi and A. A. Manfredi (2004). "HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells." EMBO reports **5**(8): 825-830.

Royer, P. J., G. Olivera-Botello, A. Koutsokera, J. D. Aubert, E. Bernasconi, A. Tissot, C. Pison, L. Nicod, J. P. Boissel, A. Magnan and C. c. Sys (2016). "Chronic Lung Allograft Dysfunction: A Systematic Review of Mechanisms." Transplantation **100**(9): 1803-1814.

Safinia, N., N. Grageda, C. Scotta, S. Thirkell, L. J. Fry, T. Vaikunthanathan, R. I. Lechler and G. Lombardi (2018). "Cell Therapy in Organ Transplantation: Our Experience on the Clinical Translation of Regulatory T Cells." Front Immunol **9**: 354.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (2011). "Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. 1995." J Immunol **186**(7): 3808-3821.

Sakihama, H., G. R. Lee, B. Y. Chin, E. Csizmadia, D. Gallo, Y. Qi, N. Gagliani, H. Wang, F. H. Bach and L. E. Otterbein (2021). "Carbon Monoxide Suppresses Neointima Formation in Transplant Arteriosclerosis by Inhibiting Vascular Progenitor Cell Differentiation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **41**(6): 1915-1927.

Salama, A. D., A. Delikouras, C. D. Pusey, H. T. Cook, G. Bhargal, R. I. Lechler and A. Dorling (2001). "Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody." Am J Transplant **1**(3): 260-269.

Salehi, S., R. A. Sosa, Y.-P. Jin, S. Kageyama, M. C. Fishbein, E. Rozengurt, J. W. Kupiec-Weglinski and E. F. Reed (2018). "Outside-in HLA class I signaling regulates ICAM-1 clustering and endothelial cell-monocyte interactions via mTOR in transplant antibody-mediated rejection." American Journal of Transplantation **18**(5): 1096-1109.

Salom, R. N., J. A. Maguire and W. W. Hancock (1998). "Endothelial activation and cytokine expression in human acute cardiac allograft rejection." Pathology **30**(1): 24-29.

Sammut, I. A., R. Foresti, J. E. Clark, D. J. Exon, M. J. Vesely, P. Sarathchandra, C. J. Green and R. Motterlini (1998). "Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1." Br J Pharmacol **125**(7): 1437-1444.

Sandner, S. E., A. D. Salama, S. L. Houser, E. Palmer, L. A. Turka and M. H. Sayegh (2003). "New TCR transgenic model for tracking allospecific CD4 T-cell activation and tolerance in vivo." Am J Transplant **3**(10): 1242-1250.

Sarbassov, D. D., S. M. Ali, D. H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2004). "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton." Curr Biol **14**(14): 1296-1302.

Savage, C. O., C. J. Brooks, G. C. Harcourt, J. K. Picard, W. King, D. M. Sansom and N. Willcox (1995). "Human vascular endothelial cells process and present autoantigen to human T cell lines." Int Immunol **7**(3): 471-479.

Scherer, L. J. and J. J. Rossi (2003). "Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA." Nat Biotechnol **21**(12): 1457-1465.

Schmidl, C., K. Renner, K. Peter, R. Eder, T. Lassmann, P. J. Balwierz, M. Itoh, S. Nagao-Sato, H. Kawaji, P. Carninci, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, R. Andreesen, D. A. Hume, P. Hoffmann, A. R. Forrest, M. P. Kreuz, M. Edinger, M. Rehli and F. consortium (2014). "Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets." Blood **123**(17): e90-99.

- Schmidt, A., C. Goepfert, K. Feitsma and E. Buddecke (2002). "Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF-alpha activated human vascular endothelial cells." Atherosclerosis **164**(1): 57-64.
- Schmidt, A., X. M. Zhang, R. N. Joshi, S. Iqbal, C. Wahlund, S. Gabrielsson, R. A. Harris and J. Tegner (2016). "Human macrophages induce CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells via binding and re-release of TGF-beta." Immunol Cell Biol **94**(8): 747-762.
- Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira and R. Medzhitov (2001). "Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses." Nat Immunol **2**(10): 947-950.
- Seino, K. I., K. Fukao, K. Muramoto, K. Yanagisawa, Y. Takada, S. Kakuta, Y. Iwakura, L. Van Kaer, K. Takeda, T. Nakayama, M. Taniguchi, H. Bashuda, H. Yagita and K. Okumura (2001). "Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2577-2581.
- Seldon, M. P., G. Silva, N. Pejanovic, R. Larsen, I. P. Gregoire, J. Filipe, J. Anrather and M. P. Soares (2007). "Heme oxygenase-1 inhibits the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation via inhibition of NF-kappaB RelA phosphorylation at serine 276." J Immunol **179**(11): 7840-7851.
- Shi, N. and S. Y. Chen (2014). "Mechanisms simultaneously regulate smooth muscle proliferation and differentiation." J Biomed Res **28**(1): 40-46.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall and et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." Cell **68**(5): 855-867.
- Shino, M. Y., S. S. Weigt, N. Li, V. Palchevskiy, A. Derhovanessian, R. Saggar, D. M. Sayah, R. H. Huynh, A. L. Gregson, M. C. Fishbein, A. Ardehali, D. J. Ross, J. P. Lynch, 3rd, R. M. Elashoff and J. A. Belperio (2017). "The prognostic importance of CXCR3 chemokine during organizing pneumonia on the risk of chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation." PLoS One **12**(7): e0180281.
- Sis, B., G. S. Jhangri, J. Riopel, J. Chang, D. G. de Freitas, L. Hidalgo, M. Mengel, A. Matas and P. F. Halloran (2012). "A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants." Am J Transplant **12**(5): 1168-1179.
- Sixt, M., B. Engelhardt, F. Pausch, R. Hallmann, O. Wendler and L. M. Sorokin (2001). "Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Cell Biol **153**(5): 933-946.
- Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky and M. S. Jordan (2009). "T cell activation." Annu Rev Immunol **27**: 591-619.
- Smith, J. D., N. R. Banner, I. M. Hamour, M. Ozawa, A. Goh, D. Robinson, P. I. Terasaki and M. L. Rose (2011). "De novo donor HLA-specific antibodies after heart transplantation are an independent predictor of poor patient survival." Am J Transplant **11**(2): 312-319.
- Smith, M. (2004). "Physiologic changes during brain stem death--lessons for management of the organ donor." J Heart Lung Transplant **23**(9 Suppl): S217-222.
- Smith, R. N. and R. B. Colvin (2012). "Chronic alloantibody mediated rejection." Semin Immunol **24**(2): 115-121.

- Smith, R. N., F. Malik, N. Goes, A. B. Farris, E. Zorn, S. Saidman, N. Tolkoff-Rubin, S. Puri and W. Wong (2012). "Partial therapeutic response to Rituximab for the treatment of chronic alloantibody mediated rejection of kidney allografts." Transpl Immunol **27**(2-3): 107-113.
- Soares, M. P., Y. Lin, J. Anrather, E. Csizmadia, K. Takigami, K. Sato, S. T. Grey, R. B. Colvin, A. M. Choi, K. D. Poss and F. H. Bach (1998). "Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival." Nat Med **4**(9): 1073-1077.
- Soares, M. P., I. Marguti, A. Cunha and R. Larsen (2009). "Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work?" Curr Opin Pharmacol **9**(4): 482-489.
- Soares, M. P., M. P. Seldon, I. P. Gregoire, T. Vassilevskaia, P. O. Berberat, J. Yu, T. Y. Tsui and F. H. Bach (2004). "Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation." J Immunol **172**(6): 3553-3563.
- Song, J., X. Zhang, K. Buscher, Y. Wang, H. Wang, J. Di Russo, L. Li, S. Lutke-Enking, A. Zarbock, A. Stadtmann, P. Striewski, B. Wirth, I. Kuzmanov, H. Wiendl, D. Schulte, D. Vestweber and L. Sorokin (2017). "Endothelial Basement Membrane Laminin 511 Contributes to Endothelial Junctional Tightness and Thereby Inhibits Leukocyte Transmigration." Cell Rep **18**(5): 1256-1269.
- Szabo, G., V. Buhmann, S. Bahrle, C. F. Vahl and S. Hagl (2002). "Brain death impairs coronary endothelial function." Transplantation **73**(11): 1846-1848.
- Takemoto, M. and J. K. Liao (2001). "Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(11): 1712-1719.
- Taylor, A. L., S. L. Negus, M. Negus, E. M. Bolton, J. A. Bradley and G. J. Pettigrew (2007). "Pathways of helper CD4 T cell allorecognition in generating alloantibody and CD8 T cell alloimmunity." Transplantation **83**(7): 931-937.
- Thomas, G., R. Tacke, C. C. Hedrick and R. N. Hanna (2015). "Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature." Arterioscler Thromb Vasc Biol **35**(6): 1306-1316.
- Thomas, K. A., N. M. Valenzuela and E. F. Reed (2015). "The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγRs, and endothelium in transplant rejection." Trends Mol Med **21**(5): 319-329.
- Tikkanen, J. M., L. G. Singer, S. J. Kim, Y. Li, M. Binnie, C. Chaparro, C. W. Chow, T. Martinu, S. Azad, S. Keshavjee and K. Tinckam (2016). "De Novo DQ Donor-Specific Antibodies Are Associated with Chronic Lung Allograft Dysfunction after Lung Transplantation." Am J Respir Crit Care Med **194**(5): 596-606.
- Toki, D., W. Zhang, K. L. Hor, D. Liuwantara, S. I. Alexander, Z. Yi, R. Sharma, J. R. Chapman, B. J. Nankivell, B. Murphy and P. J. O'Connell (2014). "The role of macrophages in the development of human renal allograft fibrosis in the first year after transplantation." Am J Transplant **14**(9): 2126-2136.
- Trakshel, G. M., R. K. Kutty and M. D. Maines (1986). "Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform." J Biol Chem **261**(24): 11131-11137.
- Tsukimori, K., A. Tsushima, K. Fukushima, H. Nakano and N. Wake (2008). "Neutrophil-derived reactive oxygen species can modulate neutrophil adhesion to endothelial cells in preeclampsia." Am J Hypertens **21**(5): 587-591.

- Tsutsui, H., K. M. Ziada, P. Schoenhagen, A. Iyisoy, W. A. Magyar, T. D. Crowe, J. D. Klingensmith, D. G. Vince, G. Rincon, R. E. Hobbs, M. Yamagishi, S. E. Nissen and E. M. Tuzcu (2001). "Lumen loss in transplant coronary artery disease is a biphasic process involving early intimal thickening and late constrictive remodeling: results from a 5-year serial intravascular ultrasound study." Circulation **104**(6): 653-657.
- Uehara, S., C. M. Chase, L. D. Cornell, J. C. Madsen, P. S. Russell and R. B. Colvin (2007). "Chronic cardiac transplant arteriopathy in mice: relationship of alloantibody, C4d deposition and neointimal fibrosis." Am J Transplant **7**(1): 57-65.
- Unanue, E. R., V. Turk and J. Neefjes (2016). "Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease." Annu Rev Immunol **34**: 265-297.
- Valenzuela, N. M., L. Hong, X. D. Shen, F. Gao, S. H. Young, E. Rozenfurt, J. W. Kupiec-Weglinski, M. C. Fishbein and E. F. Reed (2013). "Blockade of p-selectin is sufficient to reduce MHC I antibody-elicited monocyte recruitment in vitro and in vivo." Am J Transplant **13**(2): 299-311.
- Valenzuela, N. M., A. Mulder and E. F. Reed (2013). "HLA class I antibodies trigger increased adherence of monocytes to endothelial cells by eliciting an increase in endothelial P-selectin and, depending on subclass, by engaging FcγR1." J Immunol **190**(12): 6635-6650.
- Valenzuela, N. M., K. R. Trinh, A. Mulder, S. L. Morrison and E. F. Reed (2015). "Monocyte recruitment by HLA IgG-activated endothelium: the relationship between IgG subclass and FcγR1 polymorphisms." Am J Transplant **15**(6): 1502-1518.
- van Loosdregt, J., M. F. van Oosterhout, A. H. Bruggink, D. F. van Wichen, J. van Kuik, E. de Koning, C. C. Baan, N. de Jonge, F. H. Gmelig-Meyling and R. A. de Weger (2006). "The chemokine and chemokine receptor profile of infiltrating cells in the wall of arteries with cardiac allograft vasculopathy is indicative of a memory T-helper 1 response." Circulation **114**(15): 1599-1607.
- Van Raemdonck, K., P. E. Van den Steen, S. Liekens, J. Van Damme and S. Struyf (2015). "CXCR3 ligands in disease and therapy." Cytokine & Growth Factor Reviews **26**(3): 311-327.
- Vestweber, D. (2015). "How leukocytes cross the vascular endothelium." Nat Rev Immunol **15**(11): 692-704.
- Vile, G. F., S. Basu-Modak, C. Waltner and R. M. Tyrrell (1994). "Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2607-2610.
- Wadey, K., J. Lopes, M. Bendeck and S. George (2018). "Role of smooth muscle cells in coronary artery bypass grafting failure." Cardiovasc Res **114**(4): 601-610.
- Walsh, R. C., P. Brailey, A. Girnita, R. R. Alloway, A. R. Shields, G. E. Wall, B. H. Sadaka, M. Cardi, A. Tevar, A. Govil, G. Mogilishetty, P. Roy-Chaudhury and E. S. Woodle (2011). "Early and late acute antibody-mediated rejection differ immunologically and in response to proteasome inhibition." Transplantation **91**(11): 1218-1226.
- Wang, Q. and C. M. Doerschuk (2000). "Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: roles of ICAM-1 and reactive oxygen species." J Immunol **164**(12): 6487-6494.

- Wang, Y. Y., H. Jiang, J. Pan, X. R. Huang, Y. C. Wang, H. F. Huang, K. F. To, D. J. Nikolic-Paterson, H. Y. Lan and J. H. Chen (2017). "Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury." J Am Soc Nephrol **28**(7): 2053-2067.
- Wehner, J., C. N. Morrell, T. Reynolds, E. R. Rodriguez and W. M. Baldwin, 3rd (2007). "Antibody and complement in transplant vasculopathy." Circ Res **100**(2): 191-203.
- Weishaupt, C., M. Steinert, G. Brunner, H. J. Schulze, R. C. Fuhlbrigge, T. Goerge and K. Loser (2019). "Activation of human vascular endothelium in melanoma metastases induces ICAM-1 and E-selectin expression and results in increased infiltration with effector lymphocytes." Exp Dermatol **28**(11): 1258-1269.
- Wenke, K., B. Meiser, J. Thiery, D. Nagel, W. von Scheidt, G. Steinbeck, D. Seidel and B. Reichart (1997). "Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation: a four-year randomized trial." Circulation **96**(5): 1398-1402.
- Wierzbicki, A. S., R. Poston and A. Ferro (2003). "The lipid and non-lipid effects of statins." Pharmacol Ther **99**(1): 95-112.
- Wiggins, B. S., J. J. Saseen, R. L. Page, 2nd, B. N. Reed, K. Sneed, J. B. Kostis, D. Lanfear, S. Virani, P. B. Morris, C. American Heart Association Clinical Pharmacology Committee of the Council on Clinical, H. Council on, C. Council on Quality of, R. Outcomes, G. Council on Functional and B. Translational (2016). "Recommendations for Management of Clinically Significant Drug-Drug Interactions With Statins and Select Agents Used in Patients With Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association." Circulation **134**(21): e468-e495.
- Wilhelm, M. J. (2015). "Long-term outcome following heart transplantation: current perspective." J Thorac Dis **7**(3): 549-551.
- Willis, D., A. R. Moore, R. Frederick and D. A. Willoughby (1996). "Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response." Nat Med **2**(1): 87-90.
- Wolfe, R. A., E. C. Roys and R. M. Merion (2010). "Trends in organ donation and transplantation in the United States, 1999-2008." Am J Transplant **10**(4 Pt 2): 961-972.
- Wong, K. L., J. J. Tai, W. C. Wong, H. Han, X. Sem, W. H. Yeap, P. Kourilsky and S. C. Wong (2011). "Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets." Blood **118**(5): e16-31.
- Wu, C., Y. Zhao, X. Xiao, Y. Fan, M. Kloc, W. Liu, R. M. Ghobrial, P. Lan, X. He and X. C. Li (2016). "Graft-Infiltrating Macrophages Adopt an M2 Phenotype and Are Inhibited by Purinergic Receptor P2X7 Antagonist in Chronic Rejection." Am J Transplant **16**(9): 2563-2573.
- Wu, H., J. Ma, P. Wang, T. M. Corpuz, U. Panchapakesan, K. R. Wyburn and S. J. Chadban (2010). "HMGB1 Contributes to Kidney Ischemia Reperfusion Injury." Journal of the American Society of Nephrology **21**(11): 1878-1890.
- Wu, W., W. Zhang, M. Choi, J. Zhao, P. Gao, M. Xue, H. A. Singer, D. Jourd'heuil and X. Long (2019). "Vascular smooth muscle-MAPK14 is required for neointimal hyperplasia by suppressing VSMC differentiation and inducing proliferation and inflammation." Redox Biol **22**: 101137.
- Wynn, T. A., A. Chawla and J. W. Pollard (2013). "Macrophage biology in development, homeostasis and disease." Nature **496**(7446): 445-455.

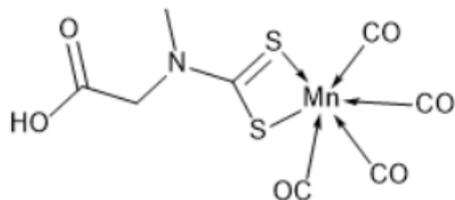
- Xu, L., J. Collins, C. Drachenberg, D. Kukuruga and A. Burke (2014). "Increased macrophage density of cardiac allograft biopsies is associated with antibody-mediated rejection and alloantibodies to HLA antigens." Clin Transplant **28**(5): 554-560.
- Yachie, A., Y. Niida, T. Wada, N. Igarashi, H. Kaneda, T. Toma, K. Ohta, Y. Kasahara and S. Koizumi (1999). "Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency." J Clin Invest **103**(1): 129-135.
- Yan, D., X. Liu, L. Hua, K. Wu, X. Sha, J. Zhao, C. Yang, C. Zhang, J. Shi and X. Wu (2016). "MMP-14 promotes VSMC migration via up-regulating CD44 expression in cardiac allograft vasculopathy." Pathol Res Pract **212**(12): 1119-1125.
- Yao, Y., H. Jia, G. Wang, Y. Ma, W. Sun and P. Li (2019). "miR-297 Protects Human Umbilical Vein Endothelial Cells against LPS-Induced Inflammatory Response and Apoptosis." Cell Physiol Biochem **52**(4): 696-707.
- Yazdani, S., J. Callemeyn, S. Gazut, E. Lerut, H. de Loor, M. Wevers, L. Heylen, C. Saison, A. Koenig, O. Thauinat, L. Thorrez, D. Kuypers, B. Sprangers, L. H. Noel, L. Van Lommel, F. Schuit, M. Essig, W. Gwinner, D. Anglicheau, P. Marquet and M. Naesens (2019). "Natural killer cell infiltration is discriminative for antibody-mediated rejection and predicts outcome after kidney transplantation." Kidney Int **95**(1): 188-198.
- Yeh, Y. T., R. Serrano, J. Francois, J. J. Chiu, Y. J. Li, J. C. Del Alamo, S. Chien and J. C. Lasheras (2018). "Three-dimensional forces exerted by leukocytes and vascular endothelial cells dynamically facilitate diapedesis." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(1): 133-138.
- Yu, G., X. Xu, M. D. Vu, E. D. Kilpatrick and X. C. Li (2006). "NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells." J Exp Med **203**(8): 1851-1858.
- Zarbock, A., K. Ley, R. P. McEver and A. Hidalgo (2011). "Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow." Blood **118**(26): 6743-6751.
- Zhang, F., J. Zhang, P. Cao, Z. Sun and W. Wang (2021). "The characteristics of regulatory macrophages and their roles in transplantation." Int Immunopharmacol **91**: 107322.
- Zhang, X. and E. F. Reed (2009). "Effect of antibodies on endothelium." Am J Transplant **9**(11): 2459-2465.
- Zhao, Y., S. Chen, P. Lan, C. Wu, Y. Dou, X. Xiao, Z. Zhang, L. Minze, X. He, W. Chen and X. C. Li (2018). "Macrophage subpopulations and their impact on chronic allograft rejection versus graft acceptance in a mouse heart transplant model." Am J Transplant **18**(3): 604-616.
- Zhuang, Q., Q. Liu, S. J. Divito, Q. Zeng, K. M. Yatim, A. D. Hughes, D. M. Rojas-Canales, A. Nakao, W. J. Shufesky, A. L. Williams, R. Humar, R. A. Hoffman, W. D. Shlomchik, M. H. Oberbarnscheidt, F. G. Lakkis and A. E. Morelli (2016). "Graft-infiltrating host dendritic cells play a key role in organ transplant rejection." Nat Commun **7**: 12623.
- Zilian, E., H. Saragih, V. Vijayan, O. Hiller, C. Figueiredo, A. Aljabri, R. Blasczyk, G. Theilmeier, J. U. Becker, J. Larmann and S. Immenschuh (2015). "Heme Oxygenase-1 Inhibits HLA Class I Antibody-Dependent Endothelial Cell Activation." PLoS One **10**(12): e0145306.
- Zindel, J. and P. Kubers (2020). "DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation." Annu Rev Pathol **15**: 493-518.

Zou, Y. and P. Stastny (2009). "The role of major histocompatibility complex class I chain-related gene A antibodies in organ transplantation." Curr Opin Organ Transplant **14**(4): 414-418.

Anhang

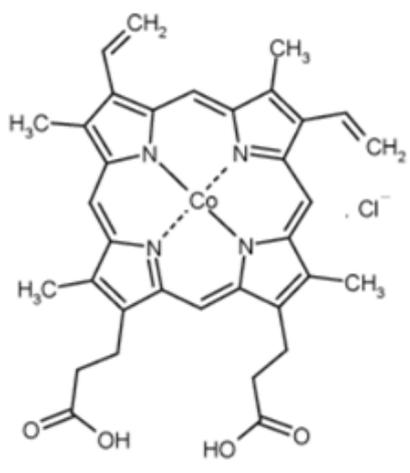
Strukturformeln

CORM-401



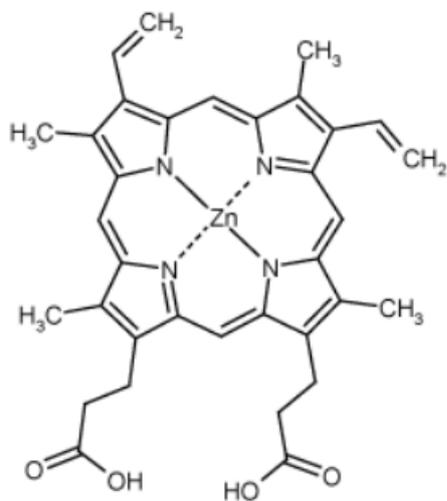
(Fayad-Kobeissi, Ratovonantenaina et al. 2016)

CoPPIX



(Assuncao-Miranda, Cruz-Oliveira et al. 2016)

ZnPPIX



(Amashukeli, Gruhn et al. 2004)

Vorträge & Poster

Laura Kummer¹, Ilka Materzok², Dominik Schaack¹, Markus Weigand¹, Stephan Immenschuh³, Jan Larmann¹. (2018). A key role for heme oxygenase-1 in anti-HLA antibody triggered monocyte adhesion and transmigration. ESC Congress of the European Society of Cardiology, August 2018, München, Deutschland (**Gewinner Best moderated poster presentation**)

Laura Kummer¹, Ilka Materzok², Dominik Schaack¹, Markus Weigand¹, Stephan Immenschuh³, Jan Larmann¹. (2018). Häm Oxygenase-1 reduziert anti-HLA-1 Antikörper vermittelte Leukozyten-Endothel Interaktionen. Deutscher Anästhesie Congress für Ärzte und Pflegekräfte, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesie und Intensivmedizin (DGAI); April 2018, Nürnberg, Deutschland (**Vortragswettbewerb**)

Laura Kummer¹, Stephan Immenschuh², Jan Larmann¹. (2017). A key role for Heme oxygenase-1 in transplant vasculopathy triggered by anti-HLA 1 antibody. 13. Spring School on Immunology of the German Society of Immunology; März 2017, Ettal, Deutschland

Publikation

Kummer, L., Zaradzki, M., Vijayan, V., Arif, R., Weigand, M.A., Immenschuh, S., et al. (2020). Vascular Signaling in Allogenic Solid Organ Transplantation - The Role of Endothelial Cells. *Front Physiol* 11, 443. doi: 10.3389/fphys.2020.00443. Review

Danksagung

Das Erstellen der vorliegenden Arbeit wäre sicherlich nicht ohne die fortwährende Unterstützung meiner Vorgesetzten, KollegInnen, MTAs, Tierärztinnen und TierpflegerInnen, Freunden und Familie möglich gewesen.

Zu allererst gebührt mein Dank meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Jan Larmann. Danke, dass du mir dein Vertrauen entgegengebracht und mir dein DFG-Projekt zur Promotion überlassen hast. Auf dem Boden unserer vertrauensvollen Zusammenarbeit habe ich gelernt kritisch und selbstständig zu arbeiten. Ich durfte mit deiner Unterstützung zahlreiche nationale und internationale Kongresse besuchen und konnte mein eigenes wissenschaftliches Profil entwickeln.

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Hofmann für die Betreuung meiner Doktorarbeit und für Ihre Unterstützung, die sie mir in zahlreichen TAK-Meetings zu teil werden ließ. In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei meinem Chef Herrn Prof. Dr. Markus A. Weigand für seine Gutachtertätigkeiten und die optimalen Rahmenbedingungen, die er in der experimentellen Anästhesie zur Verfügung stellt, bedanken. Des Weiteren möchte ich mich auch bei Frau Dr. Chourbaji und Herrn Prof. Dr. Haefeli für die Komplettierung meiner Prüfungskommission bedanken.

Das allogene Transplantationsmodell wäre ohne die bedingungslose Unterstützung von Dr. Marcin Zaradzki nicht zustande gekommen. Deine Zuversicht, mir die notwendigen mikrochirurgischen Techniken beibringen zu können, hat auch mich an den Erfolg unseres Unterfangens glauben lassen.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der AG *Translational Peroperative Vasculäre Biologie*, allen voran Melanie Wickert und Dr. Henrike Janssen, bedanken. Henrike, danke, dass du mir den Einstieg in die Wissenschaft erleichtert hast und mich zu Beginn die eine oder andere Klippe hast umschiffen lassen. Melanie, ich freue mich die meisten Arbeitstage gemeinsam mit dir beginnen zu können. Ich bin dir unglaublich dankbar dafür, dass du etwas mehr Struktur in meinen Arbeitstag gebracht und so vieles leichter gemacht hast. Ich bin euch beiden sowie Dr. Sarah Dehne und Dr. Frederike Lund dankbar für die stets konstruktive Kritik, für jedes liebe Wort und jedes gemeinsame Lachen.

Ich bedanke mich herzlichst bei allen TierpflegerInnen und Tierärztinnen in der IBF, die dafür Sorge getragen haben, dass alle Mäuse zu jeder Tages- und Nachtzeit so fürsorglich gepflegt wurden.

Ich bedanke mich bei allen KollegInnen der experimentellen Anästhesie, ganz besonders bei Nadia Galenstein, Ute Krauser und Klaus Stefan. Danke, dass ihr mich jederzeit ungefragt unterstützt habt und immer so unglaublich problemlos eingesprungen seid, wenn es nötig war.

Mein tiefster Dank geht an meine Familie und meine Freunde. Danke Felix, dass du immer hinter mir stehst, mir den Rücken freigehalten hast und maßgeblich an dem Projekt „Promotion“ beteiligt warst. Ohne meine Eltern und meinen Bruder wäre ich heute nicht der Mensch, der ich bin. Danke, dass ihr mir immer ein vertrauensvolles Umfeld geboten habt, in dem ich mich ausprobieren und ausleben durfte.

Ein besonderer Dank geht an meine Freunde, die mich schon so lange durch mein Leben begleiten. Ich bin euch, Franziska und Florian, Caro, Max, Uwe und Jenny für jeden gemeinsamen Urlaub, jede Runde TAC und jede launige Stunde dankbar. Zuletzt möchte ich mich noch bei meinen beiden Personaltrainern, Nele und Peter, dafür bedanken, dass sie mich auch während der Corona-Pandemie zu physischen Höchstleistungen angespornt haben und mir auf diesem Weg geholfen haben den Kopf frei zu bekommen.