

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. W. Jauch

Einfluss von Herztransplantation und Stammzelltransplantation auf den Interleukin-2 Spiegel im Mausmodell

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jürgen Knuth

aus
Regensburg

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Manfred Stangl

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Ingo Kaczmarek

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2011

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1. Vorteile der Organtransplantation.....	7
1.2. Arten von derzeit durchgeführten Organtransplantationen.....	7
1.3. Probleme bei der Organtransplantation.....	8
1.3.1. Faktoren der Transplantatabstoßung und Komplikationen der Transplantation.....	8
1.3.1.1. Chirurgische Komplikationen.....	8
1.3.1.2. Spenderalter.....	8
1.3.1.3. Ischämiezeit.....	9
1.3.1.4. Abstoßungsepisoden.....	9
1.3.1.5. Weitere Faktoren.....	9
1.4. Komplikationen der Immunsuppression.....	9
1.4.1. Infektionen.....	10
1.4.1.1. Bakterielle Infektionen.....	10
1.4.1.2. Pilzinfektionen.....	10
1.4.1.3. Virusinfektionen.....	10
1.4.2. Neoplasien.....	10
1.4.3. Metabolische Störungen.....	11
1.4.3.1. Hyperlipidämie.....	11
1.4.3.2. Diabetes Mellitus.....	11
2. Theoretische Grundlagen	12
2.1. Generelle Erläuterungen zum Immunsystem.....	12
2.1.1. Die zelluläre Immunantwort.....	12
2.1.2. Oberflächenmoleküle und Rezeptoren.....	13
2.1.3. Zytokinprofile Th1 und Th2.....	13
2.2. Der Major Histocompatibility Complex (MHC).....	13
2.2.1. MHC I.....	15
2.2.2. MHC II.....	15
2.3. T- Zellaktivierung.....	16
2.3.1. Fortbewegung der T- Zellen.....	17
2.3.2. Direkter Signalweg.....	19
2.3.3. Indirekter Signalweg.....	19
2.4. Vorgänge bei der Abstoßung.....	19
2.5. Formen der Abstoßung.....	21
2.5.1. Hyperakute Abstoßung.....	21
2.5.2. Akute Abstoßung.....	22
2.5.3. Chronische Abstoßung.....	22
2.6. Bedeutung der Immunabwehr in der Transplantation.....	23
2.7. Stammzellen.....	24
2.7.1. Definition und Eigenschaften von Stammzellen.....	24
2.7.2. Periphere Stammzellen.....	25
2.7.3. CD 34 negative (CD34neg) mesenchymale Stammzellen.....	25
2.7.4. Immortalisierung der Zellen.....	26
2.7.5. Dosis für die Stammzelltransplantation.....	26
2.7.6. Chimerismus.....	26
2.7.7. Zentrale und periphere Toleranz.....	27
2.7.8. Konditionierung.....	27
2.7.9. Toleranzinduktion durch Transplantation von Stammzellen.....	28
2.8. Der B7-H1 (PD-L1) und PD-1- Komplex.....	28
2.8.1. Vorkommen von B7-H1 (PD-L1) und PD-1.....	29
2.8.2. Toleranzinduktion durch den B7-H1/ PD-1- Komplex.....	30
2.8.3. B7-H1: Vergleich Maus/ Mensch.....	31

2.8.4. Gegenteilig gedeutete Funktionen von B7-H1.....	31
2.9. Interleukin 2 (IL- 2).....	33
2.9.1. Struktur.....	33
2.9.2. IL-2 Rezeptor.....	33
2.9.3. Funktion von IL-2.....	33
2.10. Übertragung auf die durchgeführten Versuche.....	34
3. Zielsetzung.....	35
4. Fragestellung.....	36
5. Material und Methoden.....	37
5.1. Versuchsaufbau.....	37
5.1.1. Aufteilung der Versuchsgruppen.....	37
5.1.2. Verwendete Stammzellen.....	37
5.1.2.1. Klassifizierung der verwendeten Stammzellen.....	37
5.1.2.2. Immortalisierung der Stammzellen.....	38
5.1.2.3. Lagerung der Stammzellen.....	39
5.1.2.4. Zellvermehrung.....	39
5.1.2.5. Zellernte zur Transplantation.....	39
5.2. Genehmigung der Tierversuche.....	39
5.3. Tierspezies und Tierhaltung.....	40
5.3.1. Versuchstiere vom Typ Balb/cOlaHsd.....	40
5.3.2. Versuchstiere vom Typ CBA/JOlaHsd.....	40
5.4. Heterotope Herztransplantation in der Maus.....	41
5.4.1. Anästhesie.....	41
5.4.2. Spenderoperation.....	42
5.4.3. Empfängeroperation.....	42
5.4.4. Stammzelltransplantation.....	43
5.5. Blutentnahme zur IL-2 Bestimmung.....	44
5.5.1. Bestimmung des IL-2 Spiegels.....	44
5.6. Chemikalien/ Reagenzien.....	44
5.7. Geräte.....	45
5.8. Operationsinstrumentarium und -material.....	45
6. Ergebnisse.....	47
6.1. Messwerte.....	47
6.2. Statistische Auswertung.....	49
6.2.1. Paarweiser Vergleich der Gruppen untereinander.....	49
7. Diskussion.....	51
7.1. Einordnung der Ergebnisse.....	51
7.2. Hohes IL-2 verhindert HSC- vermittelte Toleranz.....	51
7.3. Möglichkeiten der Toleranzinduktion trotz hohem IL-2.....	52
7.4. Transplantationszeitpunkt.....	52
7.5. Dosis der SCX.....	52
7.6. Ausblick.....	53
8. Zusammenfassung.....	54
9. Anhang.....	55
10. Danksagung.....	57
11. Literaturverzeichnis.....	58

Abkürzungsverzeichnis

A

APC Antigen- Präsentierende- Zellen

C

CCR CC-Chemokin Rezeptor
CD Cluster of Differentiation
CMV Cytomegalievirus
CO₂ Kohlendioxid
CTLA Cytotoxic T- Lymphocyte Associated protein

D

DC Dendritische Zelle
DMSO Dimethyl sulfoxide

E

EDTA Ethylen Diamin Tetra Acetat
ELISA Enzyme Linked Immunosorbance Assay

F

FACS Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS Fetales Kälberserum

G

g Gramm
GvHD Graft versus Host Disease

H

HLA Human Leukocyte Antigen
HSC Hämatopoetische Stammzellen
HTX Herztransplantation

I

IFN Interferon
Ig Immunglobulin
IL Interleukin
IL-2R IL-2 Rezeptor

K

Kg Kilogramm

M

mAb Monoklonaler Antikörper
MCX Mesenchymale Stammzelltransplantation
MHC Major Histocompatibility Complex
min Minute

ml	Milliliter
MSC	Mesenchymale Stammzelle
N	
NK- Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
O	
OP	Operation
P	
PBS	Phosphat Buffered Saline
PBSC	Periphere Blutstammzellen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed Death Receptor
PD-L1	Programmed Death Ligand
PTDM	Posttransplant new- onset diabetes mellitus
S	
SC	Stammzellen
SCX	Stammzelltransplantation
SV40	Simian Virus 40
T	
TCR	T-Zell Rezeptor
TX	Transplantation
U	
μl	Mikroliter
U/min	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

Verschiedene, früher terminale Krankheiten werden heute mittels einer Organtransplantation therapiert. Zwar konnten große Fortschritte bezüglich der benötigten immunsuppressiven Therapie verzeichnet werden, es bestehen aber die lebenslangen Risiken der Abstoßung, Neoplasien und Infektionen. Das große Ziel der Forschung im Gebiet der Transplantation (TX), dem auch diese Arbeit dient, ist daher das Erreichen einer spenderspezifischen Toleranz unter Erhalt eines ansonsten intakten Immunsystems.

1.1. Vorteile der Organtransplantation

Es können nicht nur die Lebenserwartung und Lebensqualität eines vorher herzinsuffizienten, leberinsuffizienten oder von der Dialyse abhängigen Patienten verbessert, sondern auch die damit verbundenen hohen Kosten gesenkt werden^{40 78 122 242}.

1.2. Arten von derzeit durchgeführten Organtransplantationen

Folgende Gewebe werden derzeit routinemäßig als allogenes Material transplantiert:

Herz, Niere, Lunge, Leber, Pankreas, Darm, Cornea, Knochen und Knochenmark bzw. Stammzellen.

Gelegentlich finden sich auch einzelne Transplantationen anderer Organe, z.B. des Larynx²¹² oder der Hand¹⁹¹, die, da v.a. nicht lebensnotwendig oder lebensverlängernd, jedoch selten durchgeführt werden und eher experimentellen Charakter haben.

Auch die Xenotransplantation, d.h. die Transplantation von Organen einer anderen Spezies, könnte in der Zukunft eine Rolle spielen, die immunologische Barriere ist aber hierbei deutlich höher¹³. Siehe auch Tabelle 1.

Die folgenden Ausführungen beziehen sich fast ausschließlich auf die Nierentransplantation, die zahlenmäßig wichtigste Art der Transplantation⁴³. Abgesehen davon ist sie relativ problemlos als Lebendspende möglich und stellt daher auch die Transplantation mit den meisten klinischen und wissenschaftlichen Erfahrungen dar.

Tabelle 1: Verschiedene Bezeichnungen von Transplantationstypen

	<u>Autolog</u>	<u>Syngen</u>	<u>Allogen</u>	<u>Xenogen</u>
<u>Gewebeursprung</u>	körpereigenes Gewebe	Nicht körpereigen, aber genetisch identisch	Nicht körpereigen, nicht genetisch identisch	Von einer anderen Spezies stammend
<u>Verwendung</u>	z.B. bei Hauttransplantation körpereigener Haut zur Defektdeckung an anderer Stelle	z.B. eineiige Zwillinge, syngen gezüchtete Versuchstiere	Normalfall bei einer Organtransplantation	Vorteil wäre die Züchtbarkeit von für den Menschen benötigten Organen

1.3. Probleme bei der Organtransplantation

In der Transplantationsmedizin sind seit ihrem Beginn deutliche Fortschritte gemacht worden ⁸⁶, die Transplantatfunktion bleibt im Regelfall aber nur über einen begrenzten Zeitraum erhalten.

Zahlreiche Einflussfaktoren existieren und konnten in den letzten Jahren und Jahrzehnten dank einer großen Zahl durchgeführter Transplantationen erkannt und besser kontrolliert werden.

1.3.1. Faktoren der Transplantatabstoßung und Komplikationen der Transplantation

1.3.1.1. Chirurgische Komplikationen

Chirurgisch- technische Komplikationen spielen zwar eine Rolle, sind in den letzten Jahrzehnten aber deutlich in den Hintergrund gerückt ^{23 152}.

1.3.1.2. Spenderalter

Hohes Alter der Organspender beeinflusst die Langzeitergebnisse der Transplantation negativ ^{52 73}. Dass die Organe relativ alter, und dadurch nicht idealer Spender Verwendung finden, liegt v.a. an einem Mangel an Organspendern. Zum Jahresende 2008 warteten im von der multinationalen Koordinationsstelle „Eurotransplant“ betreuten Gebiet über 14.000 ⁴⁴ Patienten auf ein oder mehrere Organe. Es wurden aber nur 6124 Transplantationen durchgeführt und 1253 Wartende verstarben im gleichen Jahr, noch bevor ein Organ zur Verfügung stand ⁴⁵.

1.3.1.3. Ischämiezeit

Die Ischämiezeit, also die Zeit von Entnahme des Organs aus dem Spender bis zur Reperfusion nach Implantation in den Empfänger, ist ein wesentlicher Faktor für eine gute Transplantatfunktion^{106 195}. Mittels moderner logistischer Methoden, z.B. Einsatz von Hubschraubern und ständiger Einsatzbereitschaft von Transplantationsteams, wird die Ischämiezeit möglichst kurz gehalten. Dies gelingt problemlos bei der planbaren Nierenlebendspende, die im Falle der Nierentransplantation routinemäßig durchgeführt wird.

Ein weiterer Vorteil der Nierenlebendspende ist, dass ein gesundes Transplantat²²⁰ mit einem im Allgemeinen besseren Match zu Verfügung steht¹⁸¹.

1.3.1.4. Abstoßungsepisoden

Das Auftreten von akuten Abstoßungsepisoden wirkt sich negativ auf das Langzeitergebnis des Transplantats aus und ist der wichtigste Risikofaktor für die chronische Abstoßung^{92 131 199}.

1.3.1.5. Weitere Faktoren

Ab einem bestimmten Zeitpunkt spielt nicht mehr vorwiegend die Immunologie die größte Rolle beim Verlust der Transplantatfunktion. Wie es auch im normalen Organ des nicht transplantierten der Fall ist, kommen dann vermehrt andere Faktoren, die eine chronische Transplantatdysfunktion begünstigen, ins Spiel. Meist sind dies Stoffwechselstörungen u.ä. Abgesehen von einer primären Schädigung des Organs können sie aber auch die Immunantwort augmentieren. Dazu zählen z.B. arterielle Hypertonie¹³⁶, Proteinurie²³¹, Hyperlipidämie^{29 180} und Rauchen²¹⁴.

1.4. Komplikationen der Immunsuppression

Die Immunsuppression, die zur Verhinderung einer Organabstoßung notwendig ist, bringt zahlreiche Nachteile mit sich.

Zum einen ist das Risiko einer Infektion bedeutend größer, als im immunologisch gesunden Patienten. Hinzu kommt auch das vermehrte Auftreten von malignen Prozessen und metabolischen Störungen.

1.4.1. Infektionen

Infektionen sind eine häufige und schwerwiegende Komplikation der immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantation ¹¹.

1.4.1.1. Bakterielle Infektionen

Bakterielle Infektionen, wie etwa die Tuberkulose ⁴, können im immunsupprimierten Patienten ein gravierendes Krankheitsgeschehen auslösen.

1.4.1.2. Pilzinfektionen

Pilzinfektionen betreffen bis zu 20% der Empfänger eines soliden Organtransplantats ⁵⁴. Aspergillus, Cryptococcus und Candida gehören zu den wichtigsten Vertretern ¹⁸³. Die Therapie ¹⁶⁹ stellt hohe Anforderungen an Behandlung, Patient und Forschung.

1.4.1.3. Virusinfektionen

Die häufigste Virusinfektion geht vom Cytomegalievirus (CMV) aus, das in ca. 80% der Bevölkerung ²⁵ nach der Infektion lebenslang latent vorhanden ist- also auch häufig in Organspendern und –empfängern. 25- 33% der transplantierten Patienten entwickeln CMV-bedingte Komplikationen ⁴⁹ ¹⁴⁸. Auch andere Viren können z.B. Ursache für einen Transplantatverlust sein, wie in den 80er Jahren gehäuft bei Polyomavirusinfektion beobachtet wurde ⁹⁰.

1.4.2. Neoplasien

In engem Zusammenhang mit latent vorhandenen Viren, z.B. dem Epstein Barr Virus ⁷⁹ ¹⁶⁵, steht auch das vermehrte Auftreten von malignen Prozessen ¹⁶⁸, wie lymphoproliferativen Erkrankungen. Außer den viralen Faktoren werden dabei auch andere Faktoren postuliert, z.B. die durch die Immunsuppression bedingte Toleranz von Tumorzellen ³³. Maligne Neoplasien treten im Gegensatz zur Normalbevölkerung gehäuft bei nierentransplantierten Patienten auf ¹¹ und reduzieren auch die Langzeitüberlebensrate nach Herztransplantation (HTX) ⁵⁰ ⁶¹ und Lebertransplantation ⁴⁰.

1.4.3. Metabolische Störungen

Ein weiterer beachtenswerter Nachteil der immunsuppressiven Therapie ist das gehäufte bzw. verstärkte Auftreten von metabolischen Störungen, deren wichtigstes Resultat ein arterieller Hypertonus ist. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind nach dem ersten Jahr in 30% der primär nierentransplantierten eine bedeutende Todesursache ¹⁴¹.

1.4.3.1. Hyperlipidämie

Eine große Rolle spielt hierbei die Hyperlipidämie in Form der Hypertriglyceridämie und der Hypercholesterinämie ¹², die unter verschiedener immunsuppressiver Medikation auftreten kann ²⁴⁸.

1.4.3.2. Diabetes Mellitus

Der so genannte Posttransplant new onset diabetes mellitus (PTDM), der erstmals nach einer Transplantation auftritt, ist eine häufige Komplikation der Immunsuppressiva ⁸¹ und führt in bis zu 24% der Nierentransplantierten nach drei Jahren zu einem Diabetes, der dann wiederum zu kardiovaskulären Komplikationen führt ^{91 109}. Glucocorticoide erhöhen die periphere Insulinresistenz, während Calcineurininhibitoren, also Cyclosporin und Tacrolimus, sowohl die Insulinresistenz erhöhen, als auch die Synthese und Sekretion von Insulin im Pankreas vermindern ¹⁰⁵.

Es ist also im Rahmen einer Organtransplantation eine Reduktion der benötigten Medikamente, im Idealfall gar der völlige Verzicht, wünschenswert.

2. Theoretische Grundlagen

Mit dem Beherrschen grundlegender immunologischer Vorgänge steht und fällt die Akzeptanz des transplantierten Organs. Die zugrunde liegenden Mechanismen sollen daher im Folgenden erläutert werden.

2.1. Generelle Erläuterungen zum Immunsystem

Das Immunsystem der Säugetiere und insbesondere das des Menschen kann in zwei Komponenten aufgeteilt werden: die angeborene Immunität und die adaptive Immunität.

Die angeborene Immunität ist ein nicht spezifisches Immunsystem, das unter Beteiligung von Makrophagen, Neutrophilen, Natürlichen Killer Zellen (NK- Zellen), Zytokinen und zellulären Rezeptoren sowie Komponenten des Komplementsystems abläuft. Physischer Schaden oder ein fremdes bzw. infektiöses Agens bewirken eine Vielzahl verschiedener entzündlicher Reaktionen. Auch ohne ein Antigen ergibt sich durch bestimmte Eigenschaften, wie etwa das Fehlen von komplement- inhibitorischen Rezeptoren auf den meisten Mikroorganismen, eine deutliche inflammatorische Antwort. Weitere Mechanismen dieses komplizierten und noch nicht zur Gänze verstandenen Teils des Immunsystems, wie etwa die Rolle des Toll like Receptor, werden untersucht ⁸.

Die adaptive Immunantwort setzt das Erkennen eines spezifischen Antigens voraus und beinhaltet sowohl Spezifität als auch eine „Gedächtnisfunktion“ seitens der T- und B- Lymphozyten.

Eine andere Art der Einteilung richtet sich danach, ob die Immunantwort auf zellulärer, oder humoraler Ebene erfolgt. Dabei haben beide jeweils spezifische und unspezifische Komponenten. Die für die Transplantationsimmunologie bedeutende ist die zelluläre Immunantwort. Sie soll ausführlich erläutert werden.

2.1.1. Die zelluläre Immunantwort

T- Zellen regulieren die Aktivität von anderen T- Zellen bzw. die eigene Aktivität, aber auch die Aktivität von B- Zellen und anderen an der Immunantwort beteiligten Zellen. Sie unterstützen die B- Zellen bei der Produktion spezifischer Antikörper und sind die Effektorzellen der antigenspezifischen, zellvermittelten Immunität.

2.1.2. Oberflächenmoleküle und Rezeptoren

Es gibt auf T- Zellen zahlreiche Oberflächenmoleküle, die bei der Interaktion der T- Zelle mit einer anderen Zelle eine Rolle spielen, sei es bei der T- Zellaktivierung durch Antigen- Präsentierende- Zellen (APC), bei der T- Zellregulation durch andere T- oder B- Zellen oder bei der T- zellvermittelten Zytotoxizität. Diese Oberflächenmoleküle dienen z.B. der Adhäsion oder der Weiterleitung aktivierender bzw. regulierender Signale. Einige wichtige dieser Oberflächenmoleküle sind in der Tabelle im Anhang aufgelistet. Bei der Entwicklung und auch für die Aktivierung der T- Zelle sind zwei Moleküle von großer Bedeutung: CD (Cluster of Differentiation) 4, das auf sog. T- Helferzellen (Th) exprimiert wird und mit dem sog. Major Histocompatibility Complex (MHC) Typ II (s.u.) interagiert, bzw. CD8, das auf sog. T- Killerzellen exprimiert wird und mit MHC Typ I interagiert. In beiden Fällen spielt der T- Zellrezeptor (TCR) die tragende Rolle der Erkennung von Antigen durch die T- Zelle. Eine weitere Einteilung der CD4 T- Zelle geschieht gemäß ihres Zytokin- Sekretionsprofils. Am wichtigsten sind hier die Profile Th1 und Th2 ^{39 179}.

2.1.3. Zytokinprofile Th1 und Th2

Th1- Zellen produzieren vor allem IL (Interleukin) -2 sowie Interferon (IFN) - γ und aktivieren Makrophagen. Es kommt zu einer Immunreaktion vom verzögerten Typ. Auch die akute Transplantatabstoßung wird durch eine Immunantwort vom Typ Th1 induziert.

Th2- Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-10 sowie IL-13 und unterstützen hauptsächlich die Funktion von B- Zellen ⁸⁵. Dabei ist IL-4 ein Wachstumsfaktor für B- Zellen und inhibiert gleichzeitig die Ausdifferenzierung von Th1- Zellen. Der Th2- Zytokintyp findet sich z.B. bei parasitären Infektionen, wobei ein Wechsel von Th1 zu Th2 mit einer Toleranzinduktion assoziiert wird, kausale Zusammenhänge dabei aber nicht geklärt sind ¹⁸⁷.

2.2. Der Major Histocompatibility Complex (MHC)

Das wichtigste Ziel der Immunantwort nach der TX solider Organe sind die auf der Oberfläche der Transplantatzellen exprimierten Moleküle des MHC. Es findet eine Reaktion im Sinne der adaptiven Immunantwort auf Allo- MHC statt. MHC- kompatible Transplantate zeigen ein deutlich besseres Outcome als nicht kompatible ¹⁵⁶, wobei Unterschiede im MHC I Locus besser zu tolerieren sind als im MHC II Genlokus ¹⁷⁰. Die Schlüsselrolle spielen dabei T- Zellen, die Antigen erkennen, das in Form von Peptiden an MHC gebunden präsentiert wird ¹¹⁷. Der MHC wird von einer Region

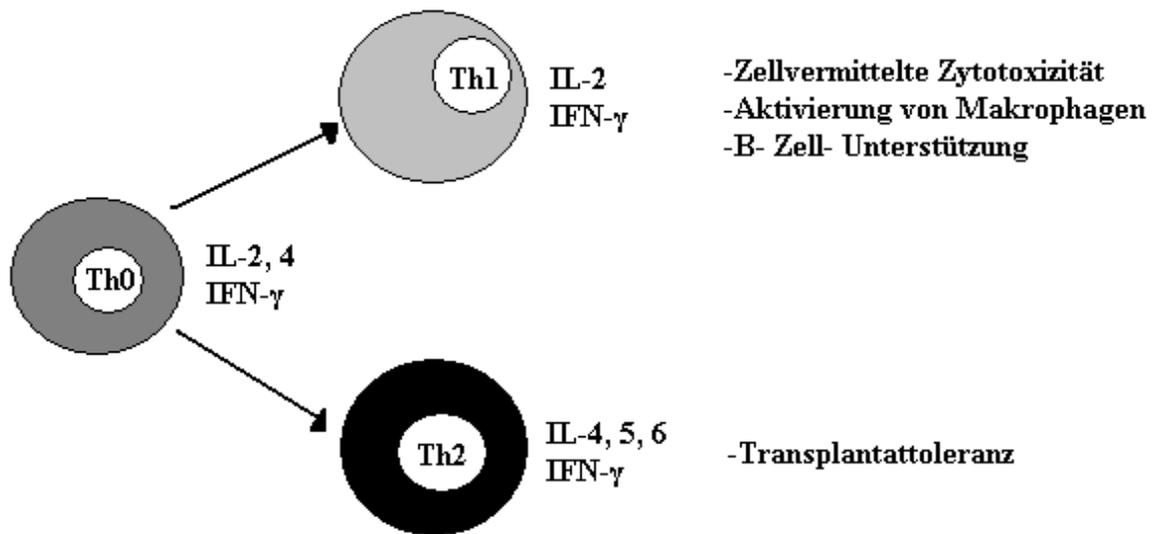


Abbildung 1: Die Zytokinprofile Th1 und Th2

hochpolymorpher Gene kodiert.

Das menschliche MHC- System heißt „Human Leukocyte Antigen“ (HLA), das der Maus H-2. Siehe auch Tabelle 2 für die Nomenklatur.

Die kodierten MHC- Proteine werden auf der Oberfläche zahlreicher Zellarten exprimiert und sind die maßgebenden antigenen Determinanten der Transplantatabstoßung. Daher kommt es bei einer Transplantation zwischen HLA identischen Individuen, also bei einer syngenen TX wie beispielsweise zwischen eineiigen Zwillingen, nicht zu einer Abstoßungsreaktion. Im Normalfall aber ist der Transplantatspender nicht HLA- identisch mit dem Empfänger und es kommt ohne Einsatz von Immunsuppressiva unvermeidlich zu einer immunologischen Abstoßungsreaktion.

Die von den MHC- Genen kodierten Proteine werden in zwei Kategorien eingeteilt, MHC I und MHC II. Sie sind sich in ihrer Struktur ähnlich und erfüllen prinzipiell auch die gleiche Aufgabe. In einer Vertiefung des aus mehreren Komponenten bestehenden MHC- Proteins, in der so genannten „peptide binding groove“, werden Peptide präsentiert. Welche Peptid- Motive hier gebunden werden, wird durch den großen Polymorphismus der kodierenden Gene beider MHC- Klassen bestimmt.

Die Unterschiede der beiden MHC- Klassen bestehen in ihrer Struktur und Expression sowie der Quelle der präsentierten Peptide.

2.2.1. MHC I

Über MHC I werden Peptide zelleigenen, zytoplasmatischen Ursprungs präsentiert. Dies sind sowohl Teile der Proteine des normalen Zellstoffwechsels, als auch die immunologisch auffälligen Peptidprodukte intrazellulärer Parasiten bzw. Viren oder Peptide von Tumorzellen. Hierzu werden intrazelluläre Proteine im Proteasom gespalten, im Endoplasmatischen Retikulum an MHC gekoppelt und im Verbund schließlich in die Zelloberfläche integriert. Hier kann das immunogene Peptid nun einer zirkulierenden CD8 positiven T- Killerzelle präsentiert werden. Außer auf den Erythrozyten findet MHC I sich auf allen Körperzellen. Eine besonders hohe Dichte an MHC I findet sich auf der Oberfläche von APCs, also Dendritischen Zellen (DC), B- Zellen, Makrophagen und außerdem Endothelzellen.

2.2.2. MHC II

MHC II Moleküle binden Peptide, die aus Proteinen des extrazellulären bzw. exogenen Raums prozessiert werden. MHC II findet sich in relevanter, dauerhafter Expression nur auf Dendritischen Zellen, B- Zellen und Makrophagen¹⁸, allerdings wird auch auf der Oberfläche von Epithel- und Endothelzellen die MHC II- Expression nach Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL-2 oder IFN- γ stark hochreguliert. Dendritische Zellen, die auch als „professionelle“ APCs bezeichnet werden, da ihre Hauptaufgabe eben aus der Präsentation von Antigen besteht, können durch Endozytose aufgenommene Proteine fragmentieren, diese dann intrazellulär mit den MHC II- Molekülen verbinden und das entstandene Peptid- MHC II- Konglomerat auf der Zelloberfläche präsentieren¹⁹.

Unter dem Einfluss von Chemokinen und Zytokinen reifen Dendritische Zellen und wandern ins sekundär lymphatische Gewebe, wo sie mit T- und B- Zellen interagieren. Hier kann dann eine CD4 positive T Zelle über den T- Zell Rezeptor (TCR) mit dem MHC II- Peptid Komplex eine Verbindung eingehen³⁰.

Das adaptive Immunsystem bedient sich der somatischen Umgruppierung von Teilen des Genoms, und generiert so die klonale Vielfalt der immunologischen Rezeptoren, also der TCR von T- Zellen, und der Antigenrezeptoren der B- Zellen. Da dieses System der Vielfalt von Rezeptorvariationen unvermeidbar auch Klone mit Rezeptoren für das immunologische „Selbst“ produziert, hat das Immunsystem Wege entwickelt, autoreaktive Lymphozytenklone an ihrer fehlgeleiteten Funktion zu hindern. Diese immunologische „Selbsttoleranz“ beinhaltet einen zentralen und einen peripheren Zweig. Dazu mehr im Kapitel über die Stammzelltransplantation.

Tabelle 2: Nomenklatur der MHC-Komplexe

	Mensch	Maus
MHC I	HLA-A, HLA-B, HLA-C	H-2 K, H-2 D, H-2 L
MHC II	HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR	I-A, I-E
MHC III	Auch hierfür existiert ein Genlocus, seine Genprodukte sind Zytokine, Komplement und Hitzeschockproteine.	

2.3. T- Zellaktivierung

Die Aktivierung der T- Zelle ist die Grundlage für das Einleiten einer Immunantwort ¹¹⁷. Hierzu sind zwei Signale notwendig ¹²³:

- Signal 1: Interaktion des TCR mit dem von einer Antigen präsentierende Zelle (z.B. APC oder Parenchymzelle) über MHC in Form eines Peptids präsentiertem Alloantigen. Die Signaltransduktion ins Zellinnere der T- Zelle erfolgt dabei über mit dem TCR assoziierte CD3- Moleküle.
- Signal 2: Kostimulation durch eine Rezeptor- Ligand Interaktion von T- Zelle und APC oder Parenchymzelle, z.B. CD28 auf der T- Zelloberfläche mit CD80 (B7-1) auf der APC ^{74 188}.

CD28- Kostimulation ist für die meisten T- Zellantworten notwendig.

Das Cytotoxic T- Lymphocyte Associated Protein (CTLA) 4 wird auf aktivierten T- Zellen exprimiert und liefert mit B7 ein negatives Signal an die T- Zellen. Es werden damit die TCR und CD28 vermittelten positiven Signale unterdrückt ^{80 182}.

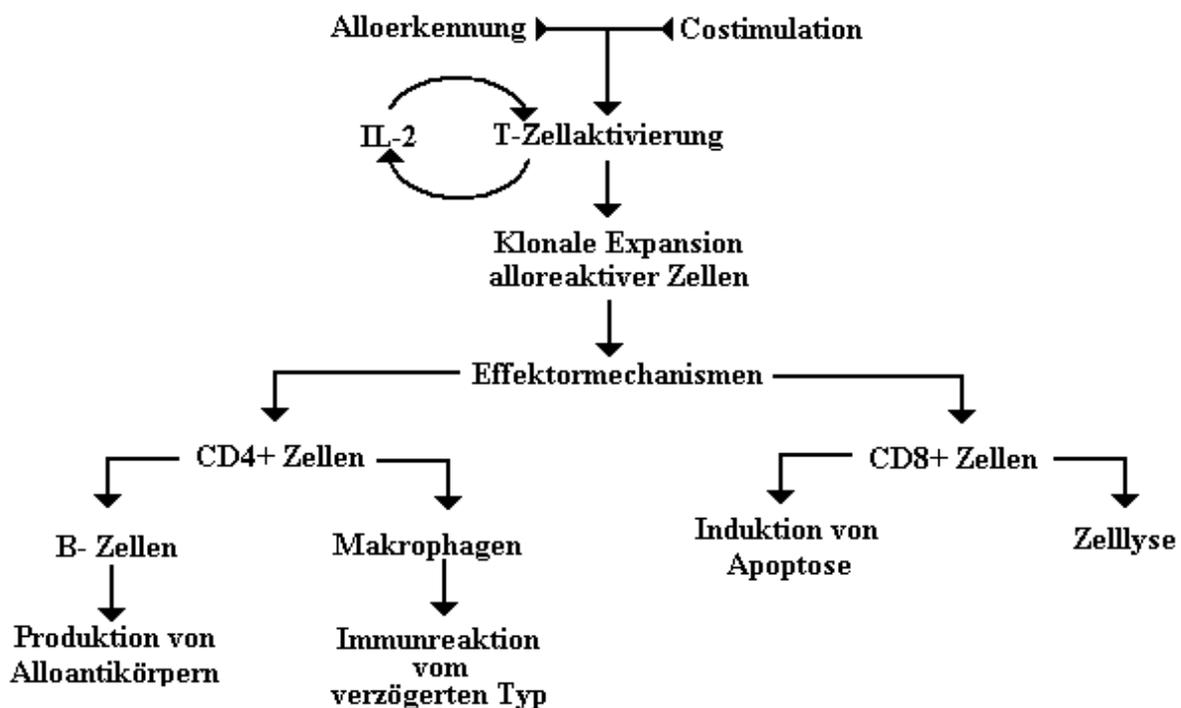
Durch Stimulation von Zytokinen kommt es zur klonalen Expansion: IL-2 wird von der aktivierten T- Zelle sezerniert und sie stimuliert sich selbst. Je nach Zytokinsekretion (z.B. Th1, Th2) und Ko-rezeptor- Expression (CD4- MHC II oder CD8- MHC I) der beteiligten Zellen kommt es dann im Falle von CD8- MHC I außerdem auch zur Lyse der Zielzelle, in diesem Fall einer Transplantatzelle, oder zur Induktion der Apoptose der Transplantatzelle. Die CD4- MHC II Interaktion führt auch zur Aktivierung einer Subpopulation von T- Effektorzellen, die entweder durch Blut und Gewebe zirkulieren und so den Ort des Geschehens, also das Transplantat, erreichen ¹⁸⁵, oder innerhalb des

lymphatischen Gewebes in die B-Zellreichen Regionen wandern und dort B- Zellen zur Antikörperproduktion anregen. Dies geschieht durch Expression von Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen für den Kontakt mit anderen Zellen, z.B. Endothelzellen, oder Matrixproteinen, sowie Produktion von Chemokinen.

Durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen können diese autoaktivierten T-Zellklone im Rahmen der lokalen Entzündungsreaktion also (siehe auch Abbildung 2)

- Stimulation der Antikörperproduktion durch B- Zellen vermitteln.
- die durch CD8 positive T- Zellen vermittelte Zytotoxizität induzieren.
- Makrophagen zur Migration und Induktion einer zellvermittelten Immunreaktion vom Spättyp stimulieren.

Abbildung 2: T- Zellaktivierung bei der Immunantwort



2.3.1. Fortbewegung der T- Zellen

Naive T- Zellen zirkulieren ständig über das Blut durch sekundäre lymphatische und andere Gewebe ¹³⁰. Die Migration der im Blut zirkulierenden Leukozyten in das entzündliche Gewebe geschieht in folgenden Schritten:

- Rollen: Die Leukozyten haften durch den Kontakt mit Endothelzellen über Selektine und deren Rezeptoren an den Endothelzellen ^{31 238}. Diese Bindung ist nicht von hoher Affinität, die Leukozyten „rollen“ gewissermaßen an der Gefäßwand entlang.
- Aktivierung der Lymphozyten durch Chemokine, produziert von Endothelzellen oder anderen Lymphozyten.
- Adhäsion: Im Gegensatz zum Rollen kommt der Leukozyt nun am Endothel fest haftend zum Stillstand. Dies geschieht mit Hilfe von sog. Integrienen und ihren Rezeptoren ²³⁸.
- Es folgt die Transmigration. Die Leukozyten durchdringen die Endothelbarriere und die extrazelluläre Matrix ⁶⁹, um in das Parenchym des Spenderorgans zu gelangen.

Leukozyteninfiltration ist essentiell für die Induktion einer akuten, inflammatorischen Antwort am Ort einer Infektion, nach einer Verletzung oder eben im Allotransplantat. Chemotaktische Zytokine (Chemokine) und deren Rezeptoren sind dabei die Mediatoren für die Migration der Leukozyten. Sie haben ein niedriges molekulares Gewicht, es wurden bereits über 40 verschiedene Chemokine nachgewiesen ¹³⁴. Die lokale Chemokinproduktion sorgt einerseits für ein Anlocken der Leukozyten an den Ort der Entzündung, andererseits für die Expression der Adhäsine, um den Schritt vom Rollen zum Anhaften der Leukozyten zu vollziehen. Ein Chemokinrezeptor der Leukozyten ist z.B. CCR4, dem bei der Leukozytenaktivität im Allotransplantat eine große Bedeutung zugesprochen wird ⁹³.

Das Erkennen von Alloantigen durch T- Zellen ist das zentrale, eine Kaskade von Reaktionen auslösende Ereignis, das schließlich in der Transplantatabstoßung gipfelt. Jede einzelne T- Zelle, bzw. ein T- Zellklon, sind monospezifisch, d.h. sie können nur ein einziges bestimmtes Peptid, das im Kontext von MHC präsentiert wird, erkennen. Man unterscheidet hierbei zwei verschiedene, sich aber nicht ausschließende Signalwege, und zwar den direkten und den indirekten Signalweg. Jeder einzelne führt zur Entstehung eines unterschiedlichen, allospezifischen T- Zellklons. Siehe auch Abbildung 3.

2.3.2. Direkter Signalweg

Die T- Zellaktivierung erfolgt über den direkten Weg, wenn eine T- Zelle des Empfängers auf eine Spender- APC trifft, die über ihr MHC endogene Spenderpeptide präsentiert. Spender- APCs finden sich in soliden Transplantaten quasi als blinde Passagiere und gelangen mit dem Organ in den Empfängerorganismus. Sie sind dank der bereits erwähnten hohen Oberflächendichte von MHC und des, im Gegensatz zur gewöhnlichen Parenchymzelle, Vorhandenseins der notwendigen Kostimulationsfaktoren, zur T- Zellstimulation prädestiniert. Die entscheidende Rolle spielt hierbei die Struktur des Spender MHC- Moleküls, das als Alloantigen wirkt, nicht die des präsentierten Peptids. Das Peptid ist allerdings insofern von Bedeutung, als dass nur MHC, das ein Peptid gebunden hat, auch stabil ist und somit von der T- Zelle erkannt werden kann ¹⁹⁶.

Diese Form der Immunerkennung ist ein Charakteristikum, das im Unterschied zur gewöhnlichen Immunerkennung von Mikroorganismen nur bei der Alloimmunerkennung von Transplantaten vorkommt. Da die Zahl der proliferierenden T- Zellen nach Kontakt mit allogenen Spender- APCs bedeutend höher ist als nach dem Kontakt mit Eigen- APCs (siehe indirekter Signalweg), scheint der direkte Weg der vorherrschende Auslöser einer frühen Allo- Immunantwort zu sein ¹³⁸. Bei der akuten Abstoßung ist daher die direkte Erkennung von großer Bedeutung. Im Laufe der Zeit verliert dieser Mechanismus jedoch an Bedeutung, da die Zahl der Spender- APCs mit der Zeit abnimmt.

2.3.3. Indirekter Signalweg

Der indirekte Signalweg beschreibt die Aktivierung von T- Zellen durch Alloantigen, also Spendermaterial, das zuvor von Empfänger- APCs zu Peptiden prozessiert und über MHC präsentiert wurde ²³³. Grundlegende Voraussetzung für diese indirekte Erkennung von allogenem Material ist also, dass Spender- MHC vom Transplantat abgesondert und durch Empfänger- APCs prozessiert und präsentiert wird. Im Prinzip entspricht der indirekte Weg dem normalen System der Antigenerkennung, wie es bei Invasion durch Mikroorganismen vorkommt und mit der chronischen Form der Abstoßung assoziiert wird ²⁴³.

2.4. Vorgänge bei der Abstoßung

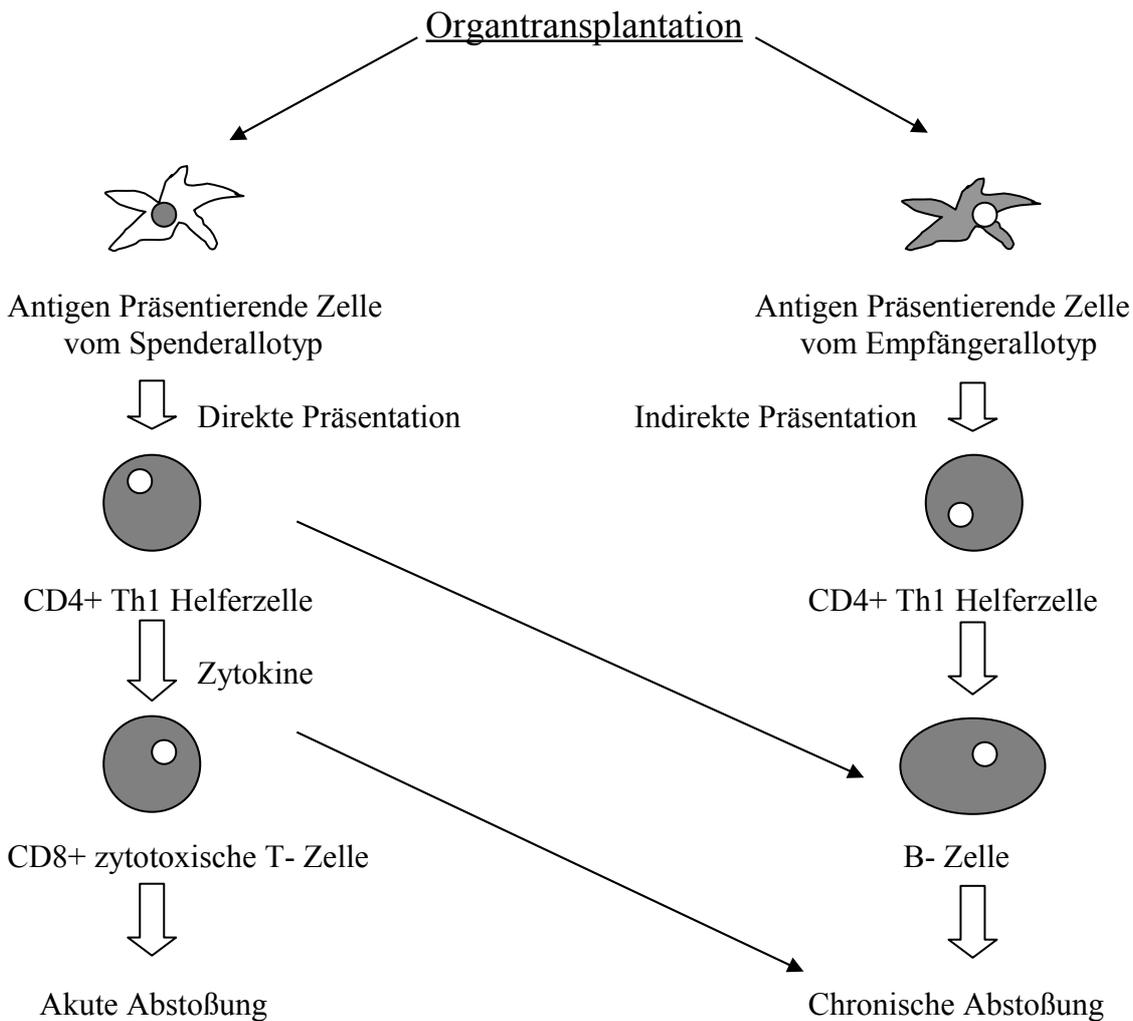
Obwohl die primäre Immunantwort charakterisiert wird von T- Zellproliferation, die sich auf eine geringe Anzahl von MCH- Allopeptiden beschränkt, gehen sekundäre Antworten wie bei der chronischen Abstoßung mit einem größeren Repertoire an T- Zellklonen einher ¹¹⁵. Es werden dann auch

vorher immunologisch unauffällige Peptide mit einer Immunantwort bedacht. Diesen Mechanismus bezeichnet man als „Epitope Switching“.

Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen MHC- Allopeptid reaktiven T- Zellen und der Entwicklung einer akuten vaskulären Abstoßung mit beschleunigter Antikörperbildung gezeigt werden

234

Abbildung 3: Direkter und Indirekter Signalweg der Transplantatabstoßung



Die Immunantwort, die als Reaktion auf Spendergewebe entsteht, ist also vorwiegend gegen die MHC Proteine gerichtet. In der Literatur werden aber auch so genannte „Minor Transplantation Antigenen“ beschrieben. Dies sind erstmals in der Maus gefundene, nicht MHC kodierte Histokompatibilitätsunterschiede, die zur Transplantatabstoßung führen.

Solche Minor Antigene werden beispielsweise vom Y- Chromosom kodiert und können so eine Ab-

stoßungsreaktion hervorrufen, wenn männliches Gewebe in einen weiblichen Empfänger transplantiert wird ¹⁹³.

Neben den beschriebenen, alloantigenabhängigen, tragen zur Abstoßung auch allogenenunabhängige Mechanismen bei ^{84 128}.

Nichtimmunologische Antworten, wie z.B. nach ischämischem Schaden des Transplantats, induzieren zunächst eine nicht spezifische, inflammatorische Antwort. Durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, MHC II, Chemokinen und Zytokinen werden den T- Zellen dann vermehrt Antigene präsentiert. Eine unspezifische Entzündung bewirkt einen Zellschaden im Transplantat und damit auch verstärktes Ablösen von Allo- MHC, das daraufhin in den Kreislauf gelangt, und den indirekten Weg in Gang setzen kann. Aktivierte CD4 Zellen stimulieren dann einerseits Makrophagen zur Immunreaktion vom verzögerten Typ, andererseits B- Zellen zur Produktion von spezifischen Antikörpern. Auch CD8 Zellen werden aktiviert. Diese CD8 vermittelten Abwehrmechanismen spielen in der akuten Abstoßung eine entscheidende Rolle ⁶⁵. Im Verlauf können Endothelzellen, die von durch T- Zellen ausgeschütteten Zytokinen aktiviert werden, Adhäsionsmoleküle, Kostimulatorische Moleküle sowie MHC II exprimieren und dadurch weitere T- Zellen in den Abstoßungsprozess involvieren.

2.5. Formen der Abstoßung

Verschiedene Mechanismen bewirken eine Abstoßung zu verschiedenen Zeitpunkten bzw. mit unterschiedlichen histopathologischen Bildern. Dabei geschieht das Auftreten einzelner Formen der Abstoßung nicht notwendigerweise in einer bestimmten Reihenfolge. Vielmehr wird versucht, am klinischen Erscheinungsbild und z.B. durch Ultraschalluntersuchungen und Labortests frühzeitig auf Veränderungen des Transplantats aufmerksam zu werden.

2.5.1. Hyperakute Abstoßung

Die Hyperakute Abstoßung tritt innerhalb von Minuten bis Stunden nach Reperfusion des Transplantats ein. Präformierte, kreuzreagierende Antikörper im Empfängerserum binden hierbei an Endothelzellstrukturen des Transplantats und führen über Komplementaktivierung zur Mediatorenfreisetzung. Es kommt zur Thrombosierung und damit zum ischämischen Vitalitätsverlust des Transplantats ⁶⁴. In den Anfängen der Organtransplantation war dies eine gefürchtete Komplikation, die aber durch das tiefere Verständnis der zugrunde liegenden Prozesse ⁵¹ beherrschbar wurde.

Heutzutage werden daher vor der Transplantation routinemäßig Kreuzproben von Spenderlymphozyten und Empfängerserum durchgeführt, um ein eventuelles reagieren präformierter Antikörper des Empfängers mit den HLA Antigenen des Transplantats vorherzusehen ¹⁶². Das Vorhandensein vorbestehender Antikörper beruht auf dem vorherigen Kontakt des Immunsystems beispielsweise mit dem ABO- System. Ähnliche Antigene werden auch auf den Endothelzellen des Transplantats exprimiert. Die Gabe von Erythropoetin, das die Notwendigkeit von Bluttransfusionen für Nierenkranke vermindert hat, hat das Problem der Hyperakuten Abstoßung in den Hintergrund gedrängt ⁸⁶.

2.5.2. Akute Abstoßung

Häufigste Ursache für einen Transplantatverlust zwischen dem 5. und 15. Tag nach der Operation ist die akute Abstoßung ¹⁷¹. Im Gegensatz zur Hyperakuten Abstoßung finden sich hier verschiedene Einflussgrößen wie Infektionen, individuelle Reaktion des Empfängers auf die immunsuppressive Medikation und unterschiedlicher Grad des Matching (Übereinstimmung) zwischen Spender und Empfänger ²⁰⁶.

NK- Zellen können ohne vorherigen Antigenkontakt über eine limitierte Auswahl an MHC I Rezeptoren ihre Zielzelle attackieren ²²⁸ und infiltrieren bereits in den ersten drei Tagen post TX das myokardiale Interstitium und die Endothelzellwand allogene transplantierte Rattenherzen. Dann erst kommt es zur Infiltration durch B- und T- Zellen ⁶⁰. Zelluläre Faktoren - z.B. CD8- Lymphozyten mit folgender Zellyse- und humorale Faktoren - z.B. Ig (Immunglobulin) G Antikörper gegen Alloantigene des Transplantatendothels- können zu gefäßschädigenden Endothelzellnekrosen des Transplantats führen. Histologisch zeigt sich eine Vaskulitis ¹⁷⁴.

Zu Zellnekrosen des Transplantats kommt es auch durch lympho- und monozytäre Infiltrate. CD8 Zellen, von ihnen aktivierte Makrophagen oder auch NK- Zellen, lysieren ihre Zielzellen ^{60 82}. Im Nierentransplantat werden zunächst die Epithelzellen der Tubuli angegriffen ¹⁷⁵. Das Portalfeld und mit ihm die Gallengänge und das venöse Epithel, sind Ziel der mononukleären und lymphozytären Infiltrate in der transplantierten Leber ¹²⁷. Im Falle der akuten Abstoßung eines Herztransplantats finden sich perivaskuläre und endotheliale Infiltrate mit Myozytenschaden durch Lymphozyten und Makrophagen bis zur hämorrhagischen Vaskulopathie.

2.5.3. Chronische Abstoßung

Da gerade die chronische Abstoßung als Hauptgrund des späten Transplantatversagens ^{146 163} von vielen Variablen beeinflusst wird, geht der Trend von der Definition der chronischen Abstoßung per

se weg zu umschreibenden Kriterien⁸³. Zunächst erfolgt die Diagnose anhand klinischer Hinweise auf den langsamen Rückgang der Transplantatfunktion. Durch eine Biopsie kann sie histologisch charakterisiert und gesichert werden.

Bei der chronischen Rejektion des Herztransplantats zeigt sich ein der Herzinsuffizienz ähnliches Bild. Verlust von Leistungsfähigkeit mit Rhythmusstörungen und subfebrilen Temperaturen belegen klinisch die Dysfunktion des Transplantats²⁴⁹. Der Patient mit chronisch abgestoßenem Lebertransplantat zeigt sich entsprechend des histologischen Bildes ikterisch und mit pathologischen Leberfunktionswerten. Klinische Parameter des chronischen Nierenversagens sind wie bei der nicht transplantierten Niere erhöhte Kreatininwerte, renal bedingter Bluthochdruck und progrediente Proteinurie^{108 164}.

Mikroskopische zeigt sich eine Obliteration der Lumina des Transplantats. Nicht nur Gefäßstrukturen, sondern auch der Verschluss von Bronchiolen in Lungentransplantaten und des Gallengangsystems der Leber^{20 53} zeigen sich im histopathologischen Bild. Im Fall der Niere zeigen sich Glomerulosklerose, tubuläre Atrophie und arterielle Intimaverdickung^{68 175 207}.

Diesen Veränderungen folgt ein fibrotischer Umbauprozess, der schließlich zum Erliegen der Transplantatfunktion führt.

Andere Gründe des späten Transplantatverlustes sind postoperative Infektionen und mangelnde Compliance des Patienten gegenüber den Therapieschemata. Die größte Gruppe an Transplantatversagern stellt jedoch die chronische Abstoßung dar.

2.6. Bedeutung der Immunabwehr in der Transplantation

Es wird also eine immunsuppressive Therapie benötigt, um eine Abstoßung zu verhindern und so Transplantatüberleben und -funktion überhaupt erst zu ermöglichen. Dies gelingt nur über einen begrenzten Zeitraum und ist vor allem in Anbetracht der Häufigkeit, mit der Organtransplantationen inzwischen durchgeführt werden können, ein verbesserungswürdiger Punkt.

Die medikamentenfreie Toleranzentwicklung, oder wenigstens die Reduktion der benötigten Medikamente, ist also Kernpunkt für das Erreichen einer Verlängerung der postoperativen Transplantatfunktion und könnte durch mehrere Mechanismen gleichzeitig das Outcome nach TX verbessern. Durch Einsparen immunsuppressiver Medikamente könnten auch durch deren Nebenwirkungen bedingte Transplantatverluste vermindert werden. Gleichzeitig würde sich ein verbessertes Nebenwirkungsprofil positiv auf die Compliance des Patienten auswirken.

2.7. Stammzellen

Ein viel versprechender Ansatz, um eine Toleranzinduktion zu erwirken, ist die der eigentlichen Organtransplantation zeitlich nahe Transplantation von allogenen hämatopoetischen bzw. mesenchymalen Stammzellen (SCX/ MCX) des Spenders des soliden Transplantats. Die genaue Abgrenzung zwischen mesenchymal/ hämatopoetisch gelingt zwar teils durch Rezeptorklassifizierung, allerdings sind die Grenzen fließend- auch die in diesen Versuchen betrachteten CD34neg, strenggenommen mesenchymalen, Stammzellen können wiederum hämatopoetische Zellen hervorbringen. Eine gewisse Synonymität ist in diesem Fall sicher angebracht. Ziel ist es, im Empfänger einen gemischten Chimerismus zu etablieren, bei dem zwei immunologische Systeme nebeneinander im Empfänger existieren und sich gegenseitig tolerieren. Insbesondere bietet sich diese Methode bei einer Nierenlebenspende an, da jederzeit auf das Blut und damit auf die Stammzellen (SC) des Spenders zurückgegriffen werden kann.

2.7.1. Definition und Eigenschaften von Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) werden traditionsgemäß definiert als

-radioprotektiv, d.h. nach einer eigentlich letalen, myeloablativen Bestrahlungsdosis kann durch Einbringen der Stammzellen das hämatopoetische System wiederhergestellt werden.

-fähig zur Ausdifferenzierung in alle hämatopoetischen Linien, also die myeloide, lymphoide und erythroide Zelllinie.

-fähig zur Selbsterneuerung ^{66 133 144 223 224 244 245}.

Mit diesen Versuchen wurde am Tiermodell die Grundlage für die Knochenmarkstransplantation sowie die SCX beim Menschen gelegt und es wurde begonnen, verschiedene maligne und benigne Krankheiten mit einer SCX zu behandeln ¹².

Genau genommen muss zwischen Knochenmarks- und reiner Stammzelltransplantation unterschieden werden. Knochenmark enthält eine Vielzahl von Zellen, eine SCX dagegen kann mit gereinigten, ja gar nur aus einem Klon bestehenden, klassifizierten/ typisierten Zellen durchgeführt werden. Immunologische Vorgänge, die durch die transfundierten Zellen entstehen, sind dann nur den HSC oder deren de novo entstandenen Zellen zuzuschreiben und nicht etwa im immunologischen Sinne kontaminierenden, ausdifferenzierten Zellen, wie sie im Knochenmark reichlich zu finden sind.

Der Begriff des „Homing“ beschreibt das sich „Einnisten“ der Zelle im Gewebe, v.a. im Knochenmark und lymphatischen Gewebe ^{119 160 167}.

2.7.2. Periphere Stammzellen

HSC machen bis zu 0.05% der Zellen des Knochenmarks aus, das als blutbildendes Organ gewissermaßen als „Heimatort“ der HSC angesehen werden kann¹⁴⁴. Früher erfolgte die Gewinnung von HSC immer durch Entnahme von Knochenmark, etwa aus dem Beckenkamm, des Spenders. In geringer Zahl finden sich HSC aber auch im peripheren Blut¹⁴⁰. Seit Einführung suffizienter Apheresetechniken²³⁹ werden HSC auch zunehmend aus peripherem Blut des Spenders gewonnen^{103 110 178 190}. Dies ist prinzipiell auch für mesenchymale Zellen möglich. Vor Entnahme ist es jedoch von Nutzen, im Spender eine chemotherapeutische Mobilisation der HSC mit Wachstumsfaktoren durchzuführen, um deren ausreichende Auswanderung aus dem Knochenmark ins periphere Blut zu gewährleisten^{35 202}. Periphere Blutstammzellen (PBSC) haben sich gegenüber HSC aus dem Knochenmark auch als potenter im Erreichen der Remission erwiesen, d.h. der letal bestrahlte Organismus wird schneller und effektiver von den neuen Stammzellen besiedelt²².

Monoklonale Antikörper (mAbs) können benutzt werden, um die Oberflächenmoleküle der gewonnenen Zellen zu markieren und so Zellen (aus)zu sortieren um letztlich die erwünschten SC zu erhalten²⁰⁸. Problem der Definition der SC ist die positive Selektion. HSC sind insbesondere negativ für Marker der reifen Myelo- Erythro- und Lymphoiden Zelllinien (lin-)¹⁴⁵.

2.7.3. CD 34 negative (CD34neg) mesenchymale Stammzellen

Bisher gingen die Klassifizierungen der pluripotenten HSC auch immer davon aus, dass die HSC positiv für CD34^{9 41 114} (CD34+) ist, welches dann bei der Entwicklung zur differenzierteren Zelle verloren geht. Es konnten inzwischen aber auch mesenchymale Stammzellen (MSC) isoliert werden, die negativ bezüglich des Markers CD34 (CD34neg) sind^{76 95 147 157}. Es handelt sich gewissermaßen um hämatopoetische Stammzellklone mit mesenchymalen Eigenschaften¹¹⁶. Sie scheinen ein Vorläufer der CD34+ Zellen zu sein^{24 95 166 250}, und, was die Repopulationsfähigkeit betrifft, auch potenter als diese¹⁶¹ bzw. als einzige fähig zur langfristigen Repopularisierung^{76 157}, ein Faktor der im Zusammenhang mit der Induktion und Erhaltung von Transplantattoleranz von großer Bedeutung ist. Die Meinungen bezüglich des Markers CD34 sind noch divergent, wie Dooley et al. ausführlich diskutieren⁵⁸ und werden kompliziert durch Resultate, die einen Zusammenhang zwischen dem Alter der Maus und der CD34 Expression ihrer Stammzellen finden¹⁵³. Der Unterschied zwischen humaner und muriner CD34neg SC wird zurzeit erforscht¹⁵⁵.

Die SC braucht für ihre aktive Funktion im Knochenmark bestimmte Arten und Konzentrationen von Wachstumsfaktoren^{96 217 219}, die, neben interzellulären Kontakten, von Stromazellen bereitgestellt werden^{59 96 135}.

Versuche mit CD34neg SC konnten deren Fähigkeit zur Repopulation von mit tödlicher Dosis bestrahlten Mäusen ¹¹⁸ und wahrscheinlich autokriner Stimulation mit den zur Ausdifferenzierung und Proliferation nötigen Wachstumsfaktoren ²²¹ zeigen. Mathew et al. gehen von spezifischen und unspezifischen immunregulatorischen Einflüssen von „primitiven“ Stammzellvorläufern aus ¹³⁷.

2.7.4. Immortalisierung der Zellen

Die in vitro mit einer begrenzten Lebenszeit behafteten CD34neg SC können immortalisiert werden ²⁰³, infolge als Zellklon weiterbestehen ¹¹⁸ und schließlich zur Therapie eingesetzt werden. So auch geschehen mit den bei den vorliegenden Versuchen benutzten MSC ¹²⁴, siehe Methodenteil.

2.7.5. Dosis für die Stammzelltransplantation

Als für die CD34+ SCX benötigte Dosis beim Menschen hat sich eine Zellzahl $\geq(3.0 \times 10^6)/\text{kg}$ als günstig erwiesen ^{17 27}.

Van Pel et al. injizierten in die Schwanzvene bestrahlter Mäuse je 15×10^6 Zellen mit Knochenmarkursprung, die jedoch nicht weiter klassifiziert oder purifiziert waren ²³². Gandy und Weissman benutzten nach Konditionierung des Empfängers klonale HSC und waren mit nur 3×10^3 retroorbital verabreichten Zellen erfolgreich ⁷⁰.

2.7.6. Chimerismus

Der Begriff des Chimerismus wurde geprägt von Anderson et. al ⁷ sowie Owen ¹⁵⁸ und ist aus dem Griechischen abgeleitet von „Chimera“, einem Wesen das aus verschiedenen anderen Lebewesen zusammengesetzt ist.

Ziel der SCX im Rahmen dieser Arbeit ist das Erreichen eines sog. gemischten Chimerismus, wobei die immunkompetenten Zellen zweier Allotypen, und zwar der empfängereigene, sowie der Allotyp der transplantierten Stammzellen, in einem Organismus den jeweils anderen Allotyp tolerieren. Andernfalls kommt es entweder zu einem Graft versus Host Disease (GvHD), wobei die Spenderleukozyten gegen Empfängerzellen immunologisch aktiv werden oder zu Abstoßung der transplantierten Zellen, wenn die Empfängerlymphozyten gegen diese aktiv werden.

Bereits im Rahmen standardmäßiger Transplantationen ohne SCX konnten Formen von gemischtem Chimerismus beobachtet werden, und zwar durch „Passagierzellen“ des Immunsystems des

Spenders, die mit dem Organ transplantiert wurden ²¹¹, wobei allerdings nicht immer ein Zusammenhang mit klinischer Toleranz oder Abstoßung gefunden werden konnte ^{189 215}.

2.7.7. Zentrale und periphere Toleranz

Die immunologische „Selbst- Toleranz“ ist in der Physiologie des Immunsystems von großer Bedeutung. Zwei Mechanismen sind hierfür, wie auch für die Toleranzinduktion bei der allogenen Spender SCX, verantwortlich. Man unterscheidet zentrale von peripherer Toleranz.

Die zentrale Toleranz bezeichnet im Thymus induzierte T-Zelltoleranz. Prinzipiell geschieht folgendes: die Spender- SC oder deren differenzierte Abkömmlinge wandern in den Thymus ein ⁵ und können dort, wie es im Rahmen der physiologischen T- Zellreifung durch Dendritische Zellen geschieht, die Deletion von Thymozytenklonen erwirken, also von Vorläufern derjenigen T- Zellen, deren T- Zellrezeptor die von den SC exprimierten Antigene erkennt ^{209 210}. Dies entspricht dem normalen Selektionsprozess im Thymus, der auch die Eigentoleranz sicherstellt ²³⁷. Es resultieren T- Zellen, die Spender wie Empfänger tolerieren und voll immunkompetent für dritte, von Empfänger- APCs präsentierte Antigene sind ¹⁸⁴.

Von peripherer Toleranz spricht man, wenn Spender- SC in bereits existierenden reifen T- Zellen im peripheren Lymphsystem Toleranz induzieren. Dies kann durch Präsentation von Antigen erfolgen oder durch Unterbindung der zur T-Zellaktivierung notwendigen Kostimulation ^{38 173}, insbesondere durch die unten erwähnten Eigenschaften der CD34neg SC.

2.7.8. Konditionierung

Bereits 1984 konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass in Kombination mit einer SCX bzw. mit Hilfe einer Knochenmarkstransplantation, Toleranz für ein allogenes, solides Transplantat, z.B. ein Herz in der Maus, erwirkt werden kann- allerdings nur mit vorheriger Konditionierung durch Bestrahlung ^{46 70 98 99 201 216 232}. Inzwischen konnten viele Gruppen im Tierversuch eine Toleranzinduktion auch ohne Bestrahlung für ein allogenes ⁴⁷ oder xenogenes ^{111 154}, solides Organtransplantat erreichen.

Eine Immunsuppression irgendeiner Art war jedoch immer notwendig, da T- Zellen des Empfängers im Rahmen einer Host versus Graft- Reaktion die transplantierten Zellen eliminieren ^{197 229}. NK- Zellen spielen dabei keine tragende Rolle ¹²⁶.

Neben immunologischen Barrieren gibt es auch physiologische. Es muss im Empfänger „Platz geschaffen“ werden für die Zellen der SCX²²⁵ - diese Hürde konnte allerdings bereits durch eine hohe Dosis von transplantierten Zellen¹⁷⁶ und/ oder eine hohe Reinheit an HSC innerhalb des Transfundats¹⁵ überwunden werden.

Die genannten Versuche benutzten alle entweder nicht näher klassifiziertes Knochenmark, das letztlich CD34+ HSC enthält oder verabreichen diese in Reinform. Gelegentlich werden dabei auch CD34neg Zellen erwähnt, gemeint sind hier aber die bereits differenzierteren Nachfolger der CD34+ HSC¹³⁷.

2.7.9. Toleranzinduktion durch Transplantation von Stammzellen

Klinische Erfolge mit Toleranzinduktion am Menschen ließen sich bereits ab 1976 verzeichnen¹⁴². Dabei wurden jeweils CD34+ Zellen, sowie ein immunsuppressives Schema benutzt^{72 75}, oder zusätzlich ein Konditionierungsschema mit Cyclophosphamid u.a. durchgeführt⁵⁶, oder gar zusätzlich zur Chemotherapie bestrahlt^{34 226}.

Eine Chimerismusrate von 1%- d.h. 1% des chimerischen Pools der HSC im Empfänger sind Zellen mit Spenderursprung- scheint zur Induktion einer Toleranz im Menschen ausreichend^{34 226}.

Ein Problem der SCX stellt das GvHD dar. Dies bezeichnet die immunologische Aktivität von Spenderzellen gegen Empfängergewebe.

Durch Verwendung reiner, klonaler SC kann ein GvHD vermieden werden, da die verursachenden, differenzierten Zellen, im Gegensatz zum „unsortierten“ Blut, hier nicht enthalten sind²⁰⁰.

Die gleichzeitige Transplantation von SC und Herz mit Toleranzinduktion in der- allerdings bestrahlten- Maus gelang Gandy und Weissman⁷⁰.

Ohne eine Immunsuppression der Empfängermäuse kann es kein GvHD geben.

2.8. Der B7-H1 (PD-L1) und PD-1- Komplex

Viele Studien zeigen Erfolg versprechende Ansätze zur Toleranzinduktion im Sinne eines peripheren Mechanismus, der seinen Ansatzpunkt im Rahmen der zur T- Zellaktivierung notwendigen Kostimulation findet.

Ein kostimulierendes Rezeptor- Ligand- Paar sind PD-1 (Programmed Death Receptor) und sein Ligand B7-H1 (PD-L1).

Der PD-1/ B7-H1 Komplex kann die Immunantwort unabhängig vom CD28/ CTLA4- B7 Komplex

runterregulieren¹⁰¹.

B7-H1 wurde in der Literatur anfangs auch als PD-L1 (Programmed Death Ligand) bezeichnet, da Anfangs nicht klar war, dass es sich bei B7-H1 und PD-L1 um ein und dieselbe Struktur handelt. Es handelt sich um ein Oberflächenmolekül verschiedener Zellsysteme, das als Ligand des PD-1 Oberflächenmoleküls von T-, B- und monozytären Zellen fungiert.

Alle folgenden Literaturverweise beziehen sich, wenn nicht anders erwähnt, auf die Maus.

2.8.1. Vorkommen von B7-H1 (PD-L1) und PD-1

PD-1 ist ein auf TCR- vermittelt aktivierten^{3 21 100 107 125 149} und proliferierenden¹²⁵ T-, B- und monozytären Zellen exprimierter, immuninhibitorischer Rezeptor¹⁵⁹. Stimulation des PD-1 Rezeptors einer Zelle bewirkt deren Apoptose^{3 100} bzw. verhindert deren CD3/ TCR vermittelte Aktivierung⁶⁷. Dies gilt auch für alloreaktive Zellen¹⁰¹.

PD-1 wird insbesondere nicht auf DCs oder Makrophagen exprimiert²⁴⁶.

Die extrazelluläre Region von PD-1 besteht aus einer einzelnen, Ig- artigen, variablen Domäne¹⁹⁸, die zytoplasmatische Region enthält ein Tyrosin basiertes inhibitorisches Motiv²³⁶.

Bisher wurden zwei Liganden für PD-1 gefunden, B7-H1^{57 67 121} und B7-DC (PD-L2)^{121 227}.

Verschiedene Autoren finden B7-DC auf verschiedenen Zelltypen. Ito et al. beispielsweise finden B7-DC praktisch nur auf DCs exprimiert, daher der Name, und als nicht beitragend zum Transplantatüberleben¹⁰¹. Andere zeigen aber, dass B7-DC auf vielen Geweben, auch Leukozyten und T-Zellen, allerdings nicht B- Zellen, vorkommt und zur T- Zellinhibition beiträgt^{121 186}.

Humane und murine B7-H1 Moleküle sind sich strukturell sehr ähnlich (70%) und gehören, wie auch B7.1 und B7.2, die Liganden von CTLA4 und CD 28, der B7 Genfamilie an⁶⁷.

Immunkompetente Zellen, die B7-H1 exprimieren, sind T- Zellen, B- Zellen, DCs und Makrophagen^{121 194 246}. B7-H1 ist auch Oberflächenmolekül verschiedener Zellsysteme wie Herz, Lunge, Skelettmuskel, Niere, Leber, Endothelzellen, Tumorzellen und Tubulusepithelzellen^{55 62 102 139 218 240}.

B7-H1 wird auf den in dieser Arbeit zur Transplantation verwendeten Stammzellen exprimiert¹²⁴.

Die genannte Untersuchungen räumen nicht die letzten Zweifel bezüglich der genauen Rezeptor-Ligand- Verhältnisse zwischen verschiedenen Zellsystemen aus. B7-H1, wie auch im folgenden zu sehen, ist demnach aber für die Toleranzinduktion der wichtigere Ligand von PD-1 und zweifelsfrei

regulierend an der peripheren Toleranz beteiligt.

2.8.2. Toleranzinduktion durch den B7-H1/ PD-1- Komplex

Viele Ergebnisse belegen die toleranzinduzierende Wirkung des B7-H1/ PD-1- Komplexes.

PD-1 Knockout- Mäuse entwickeln durch Verlust der peripheren Toleranz Krankheitsbilder mit überschießender Immunaktivität, wie Glomerulonephritis ¹⁵¹, lupusartige Arthritis ¹⁵¹ oder eine Autoimmunkardiomyopathie ¹⁵⁰. Die T- Zellantwort im Rahmen experimenteller Autoimmunencephalitis in der Maus kann durch B7-H1 positive DC gebremst werden ⁸⁹. Allogene Nagetier- Herztransplantate werden bei der Abstoßungsreaktion von PD-1 positiven Leukozyten infiltriert ^{62 159}.

Dabei wird nicht nur die Eigentoleranz, sondern auch die Fremdtoleranz durch PD-1 induziert ¹⁵¹.

Blockierende B7-H1 mAbs können im Rahmen einer Abstoßungsreaktion allogener muriner Herztransplantate die auftretende entzündliche Gefäßinfiltration, und damit die Abstoßung, beschleunigen ^{101 112}, sowie die Toleranz nach einer murinen allogenen Transplantation durchbrechen ¹⁰. Auch führen sie zur Abstoßung von Inselzelltransplantaten, die unter einem Regime ohne den neutralisierenden mAb toleriert werden ¹²⁵.

PD-1/ B7-H1- Interaktion ist für die Induktion immunregulierender Zellen essentiell ¹⁰, des weiteren erhöht die Blockade von PD-1 mittels mAbs die für die Unterdrückung einer immunproliferativen Antwort benötigte Zahl an regulatorischen CD4+ CD25+ T- Zellen ¹⁶. Administration von B7-H1- Rezeptor stimulierenden mAbs ist bei Inselzellallotransplantaten in der Maus an der Verminderung einer Abstoßungsreaktion beteiligt ⁷¹ und inhibiert in vitro die Proliferation von T- Zellen ^{67 240}. Auch die Aktivierung und Reifung antigenpräsentierender Zellen konnte auf diese Weise verhindert werden.

Mit Hilfe von menschlichen, unreifen DC konnte eine B7-H1 abhängige, unter Hilfe von CD4+ CD25+ regulatorischen T-Zellen vermittelte Immunsuppression an Patienten mit Multipler Sklerose erreicht werden ¹⁹².

Cao et al. konnten zeigen, dass autologe Keratinozyten in gemischt allo- autogenen Hauttransplantaten in der Maus nach Expression von B7-H1 Toleranz induzieren ³⁶.

Der Hintergrund dieser immunmodulierenden Wirkung von PD-L/ B7-H1 ist, dass die im Rahmen immunologischer Aktivierung notwendige Zytokinsynthese unterdrückt wird. Die Produktion von IL-2 und IFN- γ durch die T- Zelle wird beispielsweise durch stimulierende B7-H1 mAbs bzw. auf Zellen exprimiertes B7-H1 im Menschen ¹³⁹ und der Maus ^{62 159 194} vermindert, und so die Immun-

antwort runterreguliert.

Dabei ist die Einleitung sowie die Aufrechterhaltung einer T- Zell- Inhibition nur möglich, wenn der IL-2 Spiegel nicht zu hoch ist ^{21 37}.

Weitere Details beeinflussen diese periphere Immunregulation. B7-H1 hemmt nach Binden an seinen Rezeptor die TCR- vermittelte Proliferation und Zytokinproduktion. Dies kann aber durch erhöhte TCR- oder CD28- Stimulation umgangen werden. Andersherum ist der Schwellenwert des benötigten TCR- Stimulus zur T- Zellaktivierung ohne PD-1/ PD-L2 Interaktion niedriger ⁶⁷.

Es gibt allerdings Hinweise, dass B7-H1 in kleinen Mengen IL-2 zur Costimulation braucht ⁵⁷.

In vitro wurde die Suppression immunkompetenter T- und B- Lymphozyten über eine B7-H1/ PD-1 Interaktion durch mesenchymale Stammzellen, zu denen auch die CD 34- HSC gehören, gezeigt ¹⁴. Potian et al. schreiben HSC eine die Immunantwort betreffende, periphere Veto- Funktion zu ¹⁷².

Die Toleranzinduktion durch den B7-H1/ PD-1- Komplex wird in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

2.8.3. B7-H1: Vergleich Maus/ Mensch

Im Vergleich Maus/ Mensch zeigt sich B7-H1 als ca. 70% homolog. Es ist auf zahlreichen Geweben (u.a. Herz, Lunge, Skelettmuskel, Niere, Leber) in unterschiedlicher Ausprägung vorhanden ²¹⁸. Im Menschen konnten die in der Maus gefundenen Eigenschaften von PD-1 bestätigt werden ²³⁵.

2.8.4. Gegenteilig gedeutete Funktionen von B7-H1

Es gibt auch wenige Hinweise auf Gegenteiliges, immunstimulatives Verhalten von B7-H1 ^{107 213 247}.

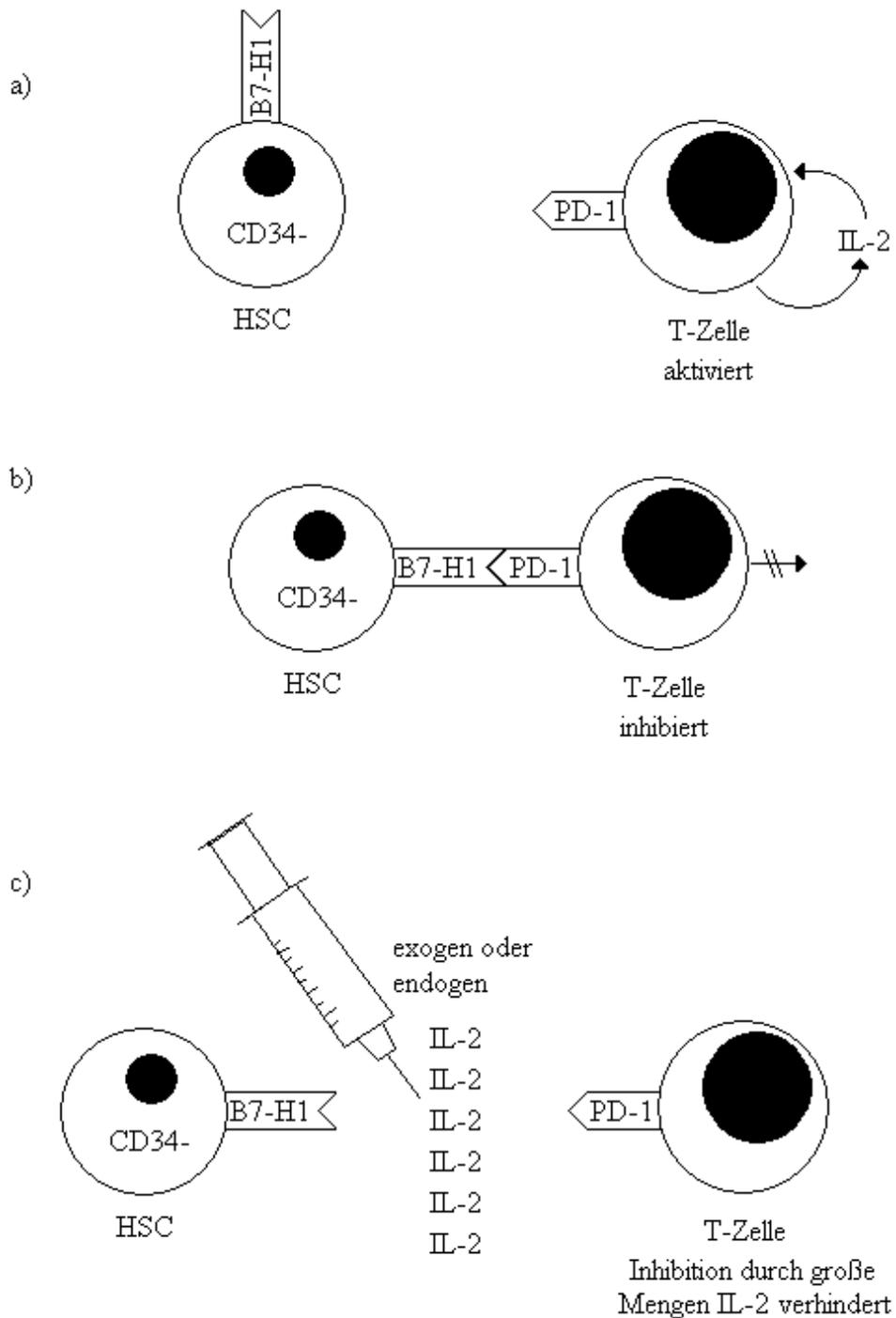
Manzanet und Hughes bringen eine plausible, in experimentellen Details liegende Erklärung ¹³⁹ für vermeintlich gegenteilige Ergebnisse, die eine Induktion anstatt einer Hemmung der Immunantwort durch B7-H1 zeigen.

Abbildung 4: Toleranzinduktion durch den B7-H1/ PD-1- Komplex

a) T- Zelle ohne B7-H1/ PD-1- Kontakt zu einer CD34neg Stammzelle resultiert in regelhafter Immunantwort durch die T- Zelle

b) T- Zelle mit B7-H1/ PD-1- Kontakt zu einer CD34neg Stammzelle resultiert in Inhibition der IL-2 Ausschüttung und bewirkt dadurch, dass die T- Zelle sich immunologisch anerg verhält

c) B7-H1/ PD-1- vermittelte T- Zellinhibition wird durch hohe Mengen von IL-2 gebrochen



2.9. Interleukin 2 (IL- 2)

Zytokine, zu denen auch IL-2 gehört, sind Botenstoffe, die Informationen zwischen Zellen vermitteln. IL-2 ist Faktor für T- Zellwachstum und Differentiation.

Wie oben erwähnt, ist die Einleitung sowie die Aufrechterhaltung einer T- Zell- Inhibition durch den B7-H1/ PD-1- Komplex nur möglich, wenn der IL-2 Spiegel nicht zu hoch ist.

2.9.1. Struktur

Das Zytokin IL-2, erstmals 1976 von Morgan identifiziert ¹⁴³, wird ausschließlich von aktivierten T- Zellen produziert und sezerniert ²⁰⁴. IL-2 ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 15.5 kDa, das, zu 2 Alphaelices geformt, aus 133 Aminosäuren besteht ³². Die schematische Darstellung von IL-2 und seinem Rezeptor zeigt Abbildung 5.

2.9.2. IL-2 Rezeptor

Synchron zur Produktion von IL-2 erfolgt in der T- Zelle auch die Produktion des auch als CD25 bekannten IL-2 Oberflächenrezeptors (IL-2R) ^{28 120 129 205}.

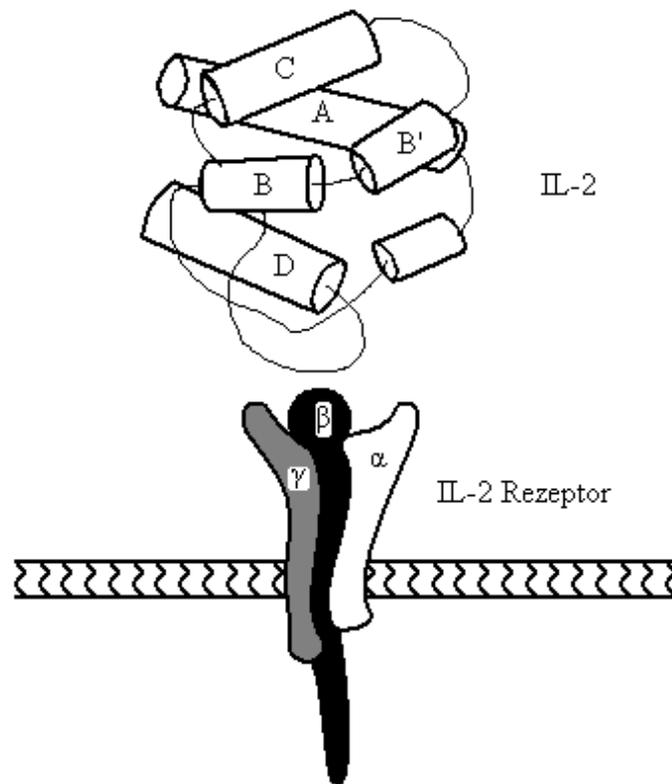
Allogen- stimulierte T- Zellen haben, im Gegensatz zu ruhenden T- Zellen, eine große Oberflächendichte von hochaffinem IL-2R ^{48 241}.

2.9.3. Funktion von IL-2

Die IL-2/ IL-2R Interaktion ist für die klonale Expansion aktivierter T- Zellen zwingend erforderlich ^{63 222}.

Verdeutlicht wird dies dadurch, dass zytotoxische IL-2- Antikörper ein Transplantatüberleben verlängern können ¹³², große Mengen von IL-2 die durch regulatorische T- Zellen aufrecht erhaltene Toleranz brechen, bzw. verhindern, dass eine Toleranz überhaupt eintritt ¹⁶ und allogene Herztransplantate in der Maus nach IL-2 Gabe vermehrt durch Lymphozyten infiltriert werden ²⁶.

Abbildung 5: Struktur von Interleukin-2 und seinem Rezeptor



2.10. Übertragung auf die durchgeführten Versuche

Abgesehen von der weiter oben beschriebenen Möglichkeit, letal bestrahlte Mäuse mit CD34neg HSC zu repopulieren, ohne ein GvHD zu erwirken, konnten Huss und Stangl⁹⁷ an der Maus zeigen, dass CD34neg SC allogene in native Mäuse transplantiert werden können und sich in Form eines gemischten Chimerismus tolerieren, ohne zuvor ein myeloablatives oder myelosuppressives Regime anzuwenden. Dass es dabei kein GvHD geben kann, erklärt sich durch die fehlende Immunsuppression der Empfängermause.

Allerdings wurde eine Toleranz in Kombination mit einer Organtransplantation nicht erreicht und transplantierte Herzen regelhaft abgestoßen, wobei sieben Tage nach HTX der Abstoßungsprozess am ausgeprägtesten war⁹⁴.

Ziel dieser Arbeit ist es aufzudecken, ob im Rahmen der ohne Immunsuppression durchgeführten Herz- Allotransplantation eventuell ein erhöhter IL-2 Spiegel beteiligt ist, der dann das Erreichen einer Toleranz, die theoretisch durch die SCX vermittelt werden könnte, verhindert. All dies mit dem bisher wenig untersuchten CD 34- Stammzell- Typ als Vermittler der B7-H1/ PD-1 Komplex-Interaktion.

3. Zielsetzung

Entscheidende Ursache des Funktionsverlustes des Transplantates ist die Abstoßungsreaktion des Empfängerorganismus gegen das Transplantat.

Das Erreichen einer Transplantattoleranz, oder wenigstens die Reduktion der hierfür benötigten Medikamente zur Induktion einer zumindest partiellen Toleranz, ist Kernpunkt für die erfolgreiche Verlängerung der postoperativen Transplantatfunktion und könnte durch mehrere Mechanismen gleichzeitig das Outcome nach Transplantation verbessern. Zum einen könnten durch Einsparen immunsuppressiver Medikamente deren Nebenwirkungen, z.B. Infektionen, vermindert werden. Gleichzeitig würde sich ein verbessertes Nebenwirkungsprofil positiv auf die Compliance des Patienten auswirken. Schließlich wäre durch eine Toleranzinduktion auch die schwer beherrschbare chronische Abstoßung des Transplantats eingedämmt.

4. Fragestellung

Die nach einer Organtransplantation durch die immunsuppressive Funktion selbst oder auch als unerwünschte Arzneimittelwirkungen der verwendeten Medikamente entstehenden Komplikationen, versucht man im Experiment durch eine zusätzlich zur eigentlichen Organtransplantation durchgeführten Stammzelltransplantation längerfristig zu vermeiden. Dabei werden periphere mesenchymale Stammzellen (MSC) des Organspenders zeitnah zur Transplantation des soliden Transplantats in den Empfänger transplantiert. Ziel der Stammzelltransplantation ist nicht eine wie bisher standardmäßig verwendete, generalisierte Immunsuppression. Vielmehr wird den MSC des Spenders eine immunomodulatorische Wirkungsweise zugeschrieben, die im Empfänger eine für das Transplantat spezifische Toleranz erwirkt, ohne das Immunsystem im Hinblick auf seine sonstige Funktion gegenüber drittem allogenen Material, d.h. Infektionserregern, zu kompromittieren. Es würde also gewissermaßen die Toleranzbibliothek des Empfängers um einen Band erweitert. Das Transplantat wäre aus immunologischer Sicht ein Teil des Körpers, eine weitere immunsuppressive Therapie im Idealfall hinfällig. Aber bereits die Möglichkeit einer Dosisreduktion der herkömmlichen Immunsuppressiva wäre hierbei ein beachtlicher Teilerfolg. Zu diesem Zweck werden in der vorliegenden Arbeit Stammzellen und Herz einer Spendermaus in eine hierzu voll allogene Empfängermaus transplantiert. Im Rahmen der akuten Abstoßung, sieben Tage nach TX, werden im Empfängertier die Serumspiegel von Interleukin- 2 (IL-2) als Marker der Immunreaktion bestimmt. Die hierbei zum Einsatz kommenden Stammzellen weisen immunomodulatorische Eigenschaften auf, die den in diesem Zusammenhang meist untersuchten Zellen nicht zu eigen sind.

Diese Untersuchung soll einen Beitrag zum Verständnis der komplexen immunologischen Vorgänge im Rahmen dieser Doppeltransplantation leisten kann. Rückschlüsse auf den Effekt dieser Transplantationsvorgänge auf das Immunsystem des Empfängers ziehen zu können und eventuell nötige begleitende Therapieansätze zu finden, ist dabei das Forschungsziel.

Konkret wird die Frage untersucht, ob nach HTX ein im Vergleich zur Nativmaus erhöhter IL-2 Spiegel, der die Immunaktivität widerspiegelt, im Empfängertier durch zusätzliche SCX supprimiert werden kann und somit einen Hinweis auf einen immunomodulatorischen Mechanismus liefert.

5. Material und Methoden

5.1. Versuchsaufbau

Es erfolgte die Transplantation von zwei syngen BALB/C Spendergeweben, nämlich Stammzellen und Herz, in einen hierzu voll allogenen Empfänger (CBA- Mäuse). In der Phase der größten immunologischen Aktivität im Rahmen der akuten Abstoßung, werden die Serumspiegel von IL-2 bestimmt. Eine durchschnittliche Überlebenszeit von 7,4 Tagen der transplantierten Herzen im vollallogenen Mausmodell wurde als Grundlage für den Bestimmungszeitpunkt des IL-2 Spiegels genommen, eigene Daten,⁹⁴. In eigenen Routinekontrollen sowie anderen syngen HTX- Kontrollen kann indefinitives Transplantatüberleben erzielt werden ^{94 97}. Alle transplantierten Herzen der jeweiligen Gruppen haben am Blutentnahmetag noch geschlagen, waren also nicht Opfer (post)operativer Komplikationen.

5.1.1. Aufteilung der Versuchsgruppen

Es wurden vier Gruppen mit je acht Versuchstieren gewählt. Am Tag sieben nach SCX, am Tag sieben nach einer HTX, am Tag 14 nach einer SCX, der am Tag sieben eine HTX gefolgt war, und zu Kontrollzwecken in der nativen, unbehandelten Maus wurden jeweils die Serumkonzentrationen von IL-2 mittels ELISA- Test ermittelt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 6 dargestellt.

5.1.2. Verwendete Stammzellen

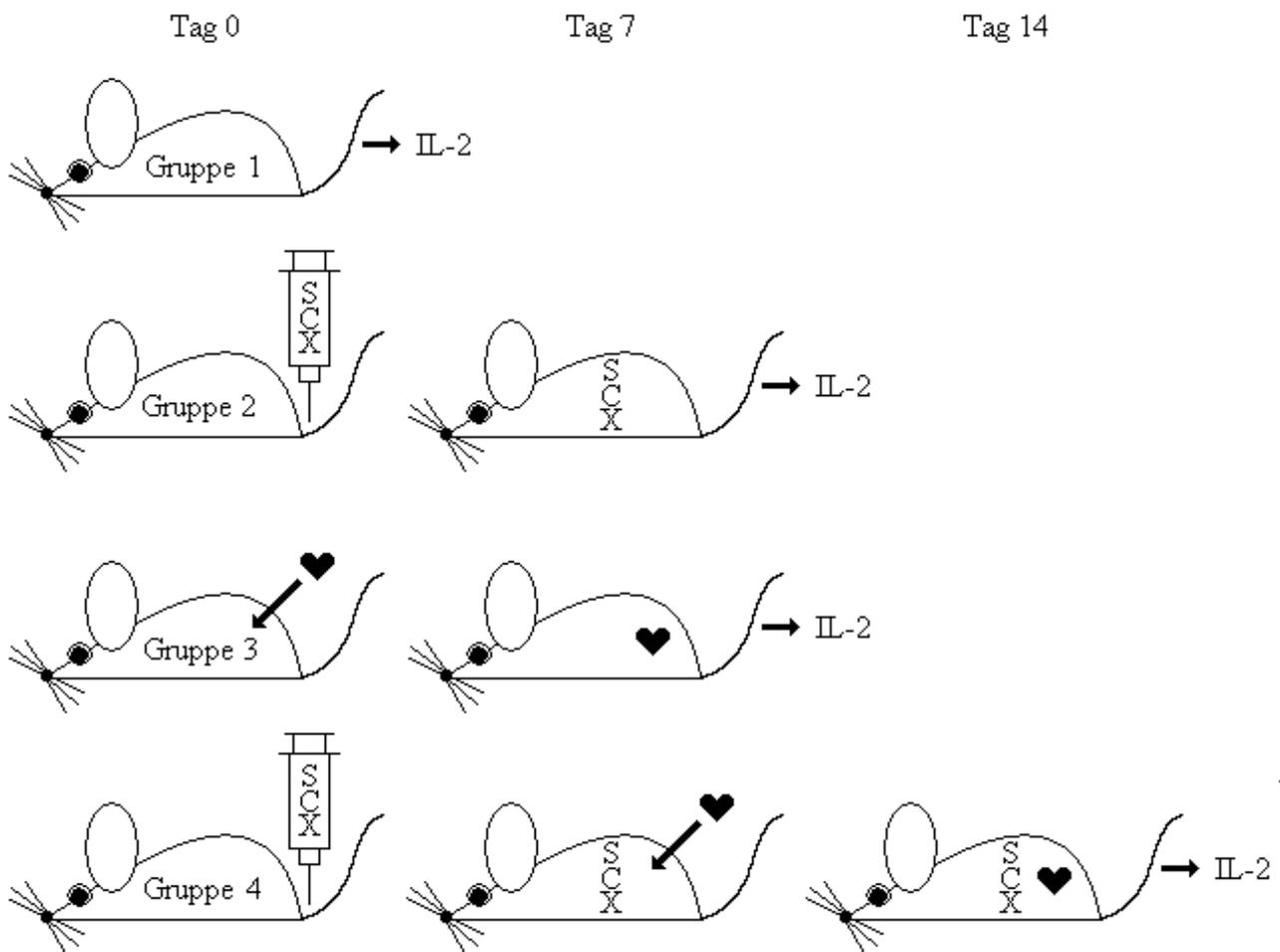
Die verwendeten Zellen stammen aus eigener Züchtung.

5.1.2.1. Klassifizierung der verwendeten Stammzellen

Der verwendete Zelltyp BALB C Einzelklon (EK) 8 ist ein adhärent wachsender, immortalisierter Einzelklon aus dem Knochenmark von BALB C- Mäusen. Die CD- Klassifizierung wurde per FACS ermittelt und ist folgende ¹²⁴: CD 29 positiv, CD 31 negativ ohne Stimulation, CD 34 negativ, CD 44 positiv, CD 45 negativ, CD 73 positiv, CD 90 positiv. Er kann nach Stimulation osteogen differenzieren. In der rT- PCR zeigt er Positivität für HPRT, GATA- 1 bis 4 und GATA- 6, c- kit, Flk 1, Pecam 1, VE- cadherin, vWF und Negativität für SCL, GATA- 5, PU 1, LMO 2, CD 34, beta major globulin und Tie 2 .

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung:

- Gruppe 1: dient der Bestimmung der IL-2- Werte in der Nativmaus
- Gruppe 2: der IL-2- Spiegel von stammzelltransplantierten Mäusen wird nach sieben Tagen bestimmt
- Gruppe 3: der IL-2- Spiegel wird sieben Tage nach einer allogenen Herztransplantation bestimmt
- Gruppe 4: Sieben Tage nach einer Stammzelltransplantation werden Mäuse allogenen herztransplantiert, nach weiteren sieben Tagen wird der IL-2- Spiegel bestimmt



5.1.2.2. Immortalisierung der Stammzellen

Die Zelllinie wurde, wie seit längerem etabliert ^{6 118 230}, mit Simian Virus 40 (SV40) immortalisiert. Das Zielgen, das sog. SV40 large T- Antigen, wurde dazu mittels Doppelverdau durch EcoR1 und pst in den retroviralen Vektor pUC 2668 eingebracht. Nach Amplifizierung wurde das Konstrukt

isoliert und purifiziert. Mittels PCR erfolgte die eigentliche Sequenzierung und dann die Verifizierung der Zielzelle BALB/C Ek8 auf Vorhandensein von SV40 large T- Antigenen.

5.1.2.3. Lagerung der Stammzellen

Einfrieren schützt die Zellen vor genetischer Alteration und minimiert das Risiko einer Kontamination. Die immortalisierten Zellen werden in einem Einfriermedium aus 90% FCS und 10% kryoprotektivem DMSO in flüssigem Stickstoff bei -195°C konserviert.

5.1.2.4. Zellvermehrung

Zum Auftauen wird die Ampulle mit gefrorenem Zellmaterial zunächst in Wassereis zwischengelagert, dann bei 37°C im Wasserbad für drei Minuten aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen in der Suspension schwimmt. Nun wird die schließlich endgültig aufgetaute Zellsuspension in Kulturmedium (RPMI) gegeben und bei 1200 U/min. für 5 min. abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wird daraufhin in frisches Medium gegeben: bei 37°C und 5% CO_2 in RPMI 1640 mit 10% FCS, 1% L- Glutamin und 1% Gentamycin erfolgt in Kulturflaschen das Wachstum und die Vermehrung der Zellen.

5.1.2.5. Zellernte zur Transplantation

Die adhärent wachsenden Zellen werden je nach benötigter Menge für fünf bis zehn Tage kultiviert. Dann erfolgt das Abpipetieren des Mediums und die Zellen werden zunächst einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Ablösung der Zellen durch Trypsin- EDTA, Aufnahme in Kompletmedium RPMI 1640 und fünf- minütiges Abzentrifugieren bei 1200 U/min. Nach Aufnahme in Ringerlösung wird in der Neubauer-Kammer die Zahl der nun zur Verifizierung der Vitalität trypanblaugefärbten Zellen bestimmt und diese dann mittels Pipette zur Transplantation auf $5,0 \times 10^6$ Zellen je $200\mu\text{l}$ Ringerlösung für jedes Reaktionsgefäß eingestellt. Dies entspricht bei einem Mausgewicht von ca. 20-25 g einer Dosis von mindestens $2,0 \times 10^8$ Zellen je kg Körpergewicht.

5.2. Genehmigung der Tierversuche

Gemäß Tierschutzgesetz wurden alle Tierversuche von der Regierung von Oberbayern als zuständi-

ge Behörde genehmigt und unter Einhaltung der deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt. Sämtliche Vorgänge, die Eingriffe an den Versuchstieren beinhalteten, wurden unter Aufsicht durch einen anwesenden, tierversuchsberechtigten Arzt, Dr. Norbert Hüser oder Dr. Volker Abfalg, Klinikum Rechts der Isar, durchgeführt.

5.3. Tierspezies und Tierhaltung

Alle Tierversuche wurden an ingezüchteten, acht bis zwölf Wochen alten, 20- 25 g schweren, weiblichen Mäusen des jeweiligen Stammes durchgeführt.

Als Transplantatempfänger bzw. unbehandelte Kontrollgruppe dienten CBA/JOlaHsd- Mäuse, die Spenderherzen wurden aus Mäusen vom Typ Balb/cOlaHsd entnommen. Diese beiden Wildtyp-Mäusestämme wurden von der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon, bezogen, im Tierstall des Pathologischen Instituts der LMU München in Käfigen zu maximal vier Mäusen gezüchtet und auf Einstreu bei Pressfutter und Wasser ad libitum gehalten.

5.3.1. Versuchstiere vom Typ Balb/cOlaHsd

Seit den 20er Jahren kommt dieser Maustyp in einer Vielzahl von Forschungsgebieten zur Anwendung. Neben anderen Forschungsgebieten eignen sich diese Mäuse erfahrungsgemäß und aufgrund ihrer genetischen Konstellation auch sehr gut für Studien mit immunologischer Fragestellung⁸⁷.

5.3.2. Versuchstiere vom Typ CBA/JOlaHsd

Seit den 30er Jahren kommt auch dieser Maustyp in einer Vielzahl von Forschungsgebieten zur Anwendung. Neben anderen eignet sich dieser Maustyp erfahrungsgemäß und aufgrund seiner genetischen Konstellation auch sehr gut für Studien mit immunologischer Fragestellung⁸⁸.

Beide Mäusestämme haben eine ähnliche Lebenserwartung bei gleichem Verhältnis von Gewicht zu Lebensalter. Dies gewährt eine geeignete Größe des Transplantatherzens, und die untersuchten Mäuse sind somit nicht nur von genetischer Seite, sondern auch in operationstechnischer Hinsicht für die vorliegende Fragestellung geeignet^{87 88}.

5.4. Heterotope Herztransplantation in der Maus

Ein vollallogenes Transplantationsmodell in der Maus dient der Bearbeitung der vorliegenden Fragestellung. Dabei werden die Spenderherzen jeweils an den infrarenalen Anteil der großen Bauchgefäße der Empfängermaus anastomosiert. Dies geschieht jeweils mit einer End- zu Seit- Anastomose der Aorta ascendens des Spenderherzens mit der Aorta abdominalis des Empfängers und des Truncus pulmonalis des Spenderherzens mit der Vena cava abdominalis des Empfängers. Es ergibt sich ein retrograder Blutfluss aus der Bauchaorta über den pars ascendens aortae in die Koronararterien des transplantierten Herzens. Der linke Ventrikel wird hierbei umgangen. Nach Passage des Koronargefäßsystems ergießt sich das Blut in den rechten Vorhof und wird von hier über den rechten Ventrikel und den Truncus pulmonalis wieder zurück in die Vena cava abdominalis der Empfängermaus gepumpt.

Da das transplantierte Herz für die Empfängermaus keine physiologische Funktion hat, bringt diese heterotope Transplantation den Vorteil mit sich, dass die Empfängermaus durch Beibehalten des eigenen Herzens nicht auf das Funktionieren des Transplantats angewiesen ist und dadurch auch in kardiovaskulärer Hinsicht primär nicht durch eine Transplantatabstoßung beeinträchtigt wird.

5.4.1. Anästhesie

Eine geeignete Anästhesieform für die heterotope HTX der Maus ist die Äthernarkose. Sowohl Spender- als auch Empfängermaus können so bewusstlos, schmerzfrei und muskelrelaxiert operiert werden. Zur Einleitung der Narkose wird die Maus in ein mit Äther getränkten Kompressen ausgelegtes und durch einem Deckel verschließbares Glasgefäß gesetzt. Nach etwa zehn bis 15 Sekunden ist die Maus in bewusstlosem, operablem Zustand. Während der anschließenden Operation wird die Narkose aufrechterhalten, indem der Maus über ein 15 ml fassendes, in Äther getränkte Kompressen enthaltendes Falconröhrchen stetig Ätherdampf zur Inhalation zugeführt wird. Indem die Distanz zwischen Röhrchen und Atemwegen der Maus reguliert wird, kann die Narkosetiefe über das Verhältnis der von der Maus eingeatmeten Luft zu Äther stufenlos und direkt gesteuert und so auch verschiedenen Operationsstadien angepasst werden. Die Narkosetiefe lässt sich mit ein wenig Erfahrung leicht erkennen, indem die Bewegung der Schnurrhaare und vor allem das Atemverhalten der Maus durch den Operateur registriert werden. Letzteres kann problemlos auch intraoperativ während des Blicks auf den Situs durch das Mikroskop mitbeobachtet werden.

5.4.2. Spenderoperation

Zunächst wird, wie oben beschrieben, die Spendermaus in Narkose versetzt. Mittels vorbereiteter Pflasterstreifen wird die narkotisierte Maus in Rückenlage an ihren gespreizten Extremitäten auf einer Korkplatte fixiert, auf der bereits ein die weitere Narkose gewährleistendes Falconröhrchen mit Äther bereit liegt. So kann ein zwischenzeitliches Aufwachen der Maus vermieden werden.

Die eigentliche Operation beginnt sodann mit einer medianen Laparotomie. Dabei wird die Bauchhöhle links und rechts mit je einer Kanüle offen gehalten, in dem das Peritoneum am Korkbrett fixiert wird. Es erfolgt die Verlagerung des Darmes in eine links der Maus platzierte Kompresse derart, dass freie Sicht für die anschließende stumpfe Präparation der großen infrarenalen Abdominalgefäße mittels Wattestäbchen besteht. Mittels einer 1ml Spritze wird nun die Aorta punktiert und die Maus weitestgehend entblutet. Der anfänglich bis zum Unterrand des linken Leberlappens reichende Schnitt wird nun bis zum Sternum erweitert. Zwei weitere Schnitte entlang des Rippenbogens ermöglichen das Ablösen des Diaphragmas von dessen Rippen- bzw. Sternalpartie. Nun folgt die Thoraxeröffnung durch Schnitte beidseits entlang der mittleren Axillarlinie bis hin zur oberen Thoraxapertur. Um einen freien Einblick in die eröffnete Brusthöhle zu erlangen, kann das Sternum mittels eines Nadelhalters über dem Kopf der Maus fixiert werden. Die Vena cava inferior kann jetzt punktiert und mit kardiopleger Lösung gespült werden, um einen Herzstillstand zu erreichen.

An stumpfe Präparation und Entnahme des Thymus schließen sich fünf Ligaturen mit 6/0 Seidenfäden an: hilusnahe Unterbindung des linken und rechten Lungenpaketes, vorhofnahes Ligieren der Vena cava inferior und superior, sowie der Vena hemiazygos. Durchtrennen der unterbundenen Strukturen distal der Ligatur und die folgende scharfe Präparation des Herzens entlang des Ösophagus ermöglichen die Entnahme des Spenderherzens.

Truncus pulmonalis und Pars ascendens aortae werden nun ex situ mit einer gebogenen Pinzette unterfahren und herzfern mit einer mikrochirurgischen Schere durchtrennt. Man erhält so zwei homogene, parallele Gefäßstümpfe, die die Anastomosierung in das Empfängertier ermöglichen. Bis zu diesem Zeitpunkt wird das Herz bei vier Grad Celsius in kardiopleger Lösung nach Brettschneider konserviert, nachdem es zuvor von Tracheal-, Fettgewebs- sowie etwaigen Fadenresten gesäubert wurde.

Die Spenderoperation dauert ca. 13 Minuten.

5.4.3. Empfängeroperation

Narkoseeinleitung, Laparotomie von der Symphyse bis zum Unterrand des linken Leberlappens und Fixierung des Peritoneums finden analog zur Vorgehensweise beim Spendertier statt. Der Darm

wird in eine feuchte Kompresse rechts der Maus locker eingeschlagen. Drehbewegungen und leichter Druck mit Wattestäbchen eröffnen das Retroperitoneum im Bereich der infrarenalen Aorta und Vena cava. Diese werden von anliegendem Fettgewebe und Lymphknoten befreit und etwaige Lumbalabgänge der Gefäße mit dem Kauter ligiert und durchtrennt. Die Gefäße liegen nun von den Abgängen der Nierengefäße bis zur Bifurkation frei, und ein für das bewerkstelligen der Anastomosennähte ausreichender Bereich kann mit zwei Biemerklemmen abgeklemmt werden. Als erstes wird die Aorta mit der Vanasschere längsinzidiert und das so eröffnete Lumen gespült. Anschließend folgt die End- zu- Seit- Anastomose der Pars ascendens aortae des Spenderherzens mit der Empfängeraorta mittels zweier Eckstiche und darauffolgender fortlaufender Naht (jeweils vier bis fünf Stiche, 10/0 monofiler Faden) zur Adaption von Vorder- und Rückwand beider Gefäße. In gleicher Weise verfährt man bei der Anastomose von Truncus pulmonalis und Vena cava abdominalis. Nach etwa 30 minütiger Ischämiezeit wird das Herz durch Entfernung der Klemmen reperfundiert. Eine hellrote Färbung des Herzens, sichtbare Füllung der Koronargefäße und schließlich meist innerhalb weniger Sekunden das Einsetzen der Herzkontraktion belegen eine erfolgreiche Operation. Nun wird der Darm in die Bauchhöhle zurückverlagert, das Abdomen wird durch fortlaufende Naht der Muskulatur bzw. des Peritoneums und anschließende Einzelknopfnähte der Haut, jeweils mit 5/0 Faden, verschlossen. Bereits während des letzten Stichs kann das Ätherröhrchen entfernt werden. Die nun erwachende Maus wird noch für etwa 10 Minuten im Käfig unter einer Wärmelampe positioniert. Zur Schmerztherapie werden Tramaltropfen verabreicht.

Die Empfängeroperation dauert ca. 35 Minuten.

5.4.4. Stammzelltransplantation

Die in Ringerlösung suspendierten Stammzellen werden innerhalb von fünf Minuten nach Fertigstellung der Suspension aus dem Reaktionsgefäß in eine 1ml Spritze aufgezogen und verabreicht.

Der Käfig der Maus, die Stammzellen gespritzt erhalten soll, wurde zuvor bereits einige Minuten unter eine Wärmelampe gestellt. Hiermit erreicht man eine Dilatation der venösen Gefäße des Schwanzes, was die Punktion erleichtert. Nun wird die Maus derart unter ein umgedrehtes Dekantiergefäß gesetzt, dass ihr Schwanz durch die Ausgußöffnung heraus reicht. Der Schwanz wird unter leichtem Zug auf der Tischoberfläche um ca. 90 Grad zu einer Seite gedreht. Es erfolgt die Punktion einer der beiden seitlichen Schwanzvenen mit einer die Stammzelllösung enthaltenden 1ml Spritze, woraufhin die Lösung langsam und gleichmäßig infundiert wird. Anschließend wird eine eventuelle Blutung im Bereich der Punktionsstelle durch Druck mit einem Tupfer zum Sistieren gebracht. Die Maus wird dann in ihren Käfig zurückgesetzt und noch über 1 Stunde auf Reak-

tionen überwacht.

Die Stammzelltransplantation dauert ca. eine Minute.

5.5. Blutentnahme zur IL-2 Bestimmung

Man geht zunächst analog zur oben genannten Vorgehensweise beim Spendertier vor. Bei der Punktion der freigelegten Vena cava abdominalis wird aber dann das Blut des Tieres in eine mit ca. 100 IE heparinisierte 1 ml Spritze entnommen. Ziel ist es, die Spritze weitest möglich, d.h. mit nahezu dem gesamten Blut des Tieres, zu füllen.

Der gesamte Vorgang der Blutentnahme dauert ca. fünf Minuten.

5.5.1. Bestimmung des IL-2 Spiegels

Die Bestimmung des IL-2 Spiegels erfolgte mittels Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) für Maus IL-2 gemäß Herstellerprotokoll ¹⁹⁸. Die Extinktionsmessung wurde bei 450 nm durchgeführt.

5.6. Chemikalien/ Reagenzien

Interleukin- 2 ELISA „ELM-IL2-001“ von RayBiotech Inc., Norcross, USA

Heparin- Natrium 10.000 IE/ml von Braun, Melsungen

Hautdesinfiziens Cutasept® von Bode Chemie, Hamburg

Custodiol® HTK- Lösung nach Brettschneider von Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein

Diethylether von Merck KGaA, Darmstadt

Isotonische (0,9%) Natriumchlorid- Lösung von DeltaSelect, Dreieich

Ringerlösung von Braun, Melsungen

RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO₃ Nährmedium von Biochrom, Berlin (#F 1215)

L-Glutamin (200 mM) von Biochrom, Berlin

Gentamycin 10 mg/ml von Biochrom, Berlin

Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% / 0,02%) von Biochrom, Berlin (#L 2143)

FCS (Fötale Kälberserum), PAN Biotech, Aidenbach

PBS (Phosphate Buffered Saline)- Lösung pH 7,2 von Apotheke LMU Innenstadt

DMSO (Dimethyl sulfoxide(#D 2650)) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

EcoRI und pst Enzyme von New England Biolabs, Ipswich, USA

Pressfutter für Mäuse von Altromin, Lage

5.7. Geräte

Neugebauerkammer von Assistent/ Karl Hecht KG, Sondheim

Zentrifuge Centra CL 3R von IEC / Thermo Electron Corporation, Waltham,USA

Kulturflaschen Costa T75, von Corning, USA

5.8. Operationsinstrumentarium und -material

Binoculäres Operationsmikroskop Zeiss Stemi DV4 Spot von Zeiss, Oberkochen

Kaltlichtquelle: Leica KL2500 LCD von Leica, Wetzlar

Mikrochirurgisches Besteck (Nadelhalter, Knüpfpinzette, Uhrmacherpinzetten, Vannasschere, Mikroschere, gebogene Pinzetten) von Plazotta, München

Operationsbesteck (Pinzette, Schere, Nadelhalter) von Plazotta, München

Zwei Biemerklemmen (Biemer- Clip, Art.-Nr. 70562) von Aesculap- Werke AG, Tuttlingen

Mikrochirurgischer, bipolarer Gefäßkauter sowie Kauter- Stromquelle ELEKTROTOM® 505 von Berchtold, Tuttlingen

Ligatur 6/0 (geflochtene Seide, nicht resorbierbar, Art.-Nr. EH 6760H) von Ethicon GmbH, Norderstedt

Monofiler Faden 10/0 (Ethicon blau monofil 10/0, doppelt armiert, BV-4, Best.-Nr. EH 7509) von Ethicon GmbH, Norderstedt

Monofiler Faden 5/0 (Ethicon schwarz monofil 5/0, Best.-Nr. 1666H) von Ethicon GmbH, Norderstedt

Kardioplege Lösung nach Brettschneider (HTK) von Köhler Chemie, Alsbach

Folienüberzogene Korkplatte von Baumarkt, München

Kompressen 10x10cm und 7,5x7,5cm von Lohmann& Rauscher GmbH, Rengsdorf

Wattestäbchen, unsteril von Lohmann& Rauscher GmbH, Rengsdorf

Sterile 1ml Spritzen „Sub-Q“ 26½G von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Reaktionsgefäße (Safe-Lock PCR clean farblos, 1.5ml) von Eppendorf AG, Hamburg

6. Ergebnisse

6.1. Messwerte

Die ermittelten IL-2 Werte der einzelnen Versuchsgruppen, sowie deren statistische und grafische Auswertungen lassen sich den folgenden Tabellen und Abbildungen entnehmen. Für die Angaben der jeweils gemessenen IL-2- Spiegel gilt die Einheit pg/ml.

Tabelle 4 gibt die Messergebnisse der einzelnen Gruppen in der Übersicht wieder. Grafisch veranschaulicht sind diese auch in Abbildung 7 wiedergegeben: Die Häufigkeiten der jeweils in 10er Bereichen eingeteilten IL-2- Messergebnisse sind ersichtlich.

Die statistischen Standardwerte wie Mittelwert, Median, und Varianz können Tabelle 4 entnommen werden. Eine Darstellung der Versuchsergebnisse als Box- Plot- Grafik mit Median, unterem und oberem Quartil sowie Maximal- und Minimalwert zeigt Abbildung 8.

Abbildung 7 und Tabelle 3 lassen gewisse Tendenzen erkennen, bzgl. der Signifikanzen siehe nächster Abschnitt „statistische Auswertung“.

Tabelle 3: Statistische Werte der Versuchsgruppen

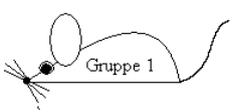
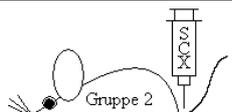
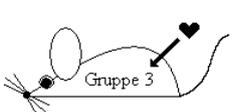
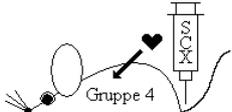
Versuchsgruppe	Mittelwert IL-2	Median IL-2	X min IL-2	X max IL-2	Varianz IL-2
 NATIV	7,8 ± 4,4	5,5	4,5	17,0	19,7
 SCX	8,5 ± 2,1	8,4	4,5	11,0	4,4
 HTX	28,0 ± 7,5	31,5	11,0	33,0	55,7
 HTX + SCX	18,1 ± 4,8	16,5	11,5	26,0	23,0

Tabelle 4: Absolute Messwerte der einzelnen Versuchsgruppen

	IL-2 Wert in pg/ml							
NATIV	4,5	4,8	5,5	5,5	5,5	7,8	12	17
SCX	4,5	7,7	7,8	7,8	9	9	11	11
HTX	11	25	27	31	32	32	33	33
HTX + SCX	11,5	15	16	16	17	19	24	26

Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der Messwerte innerhalb der Gruppen

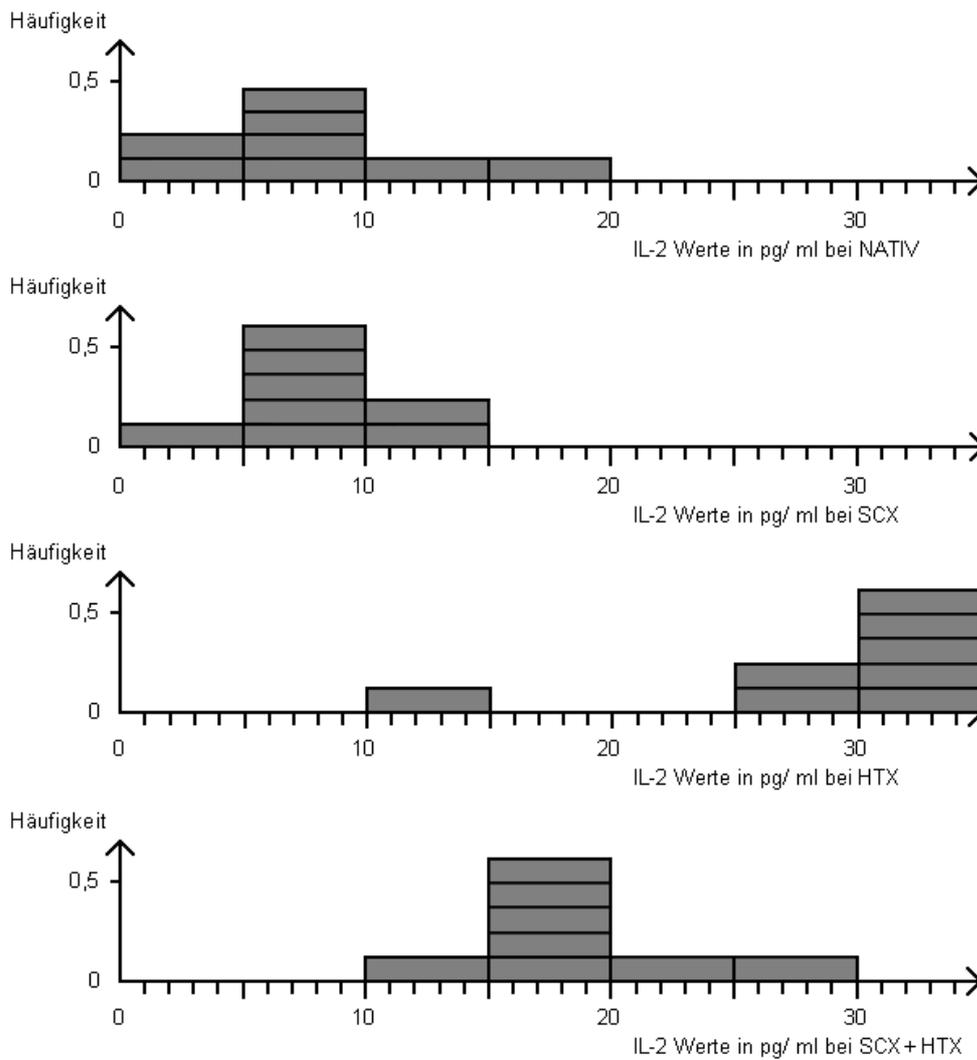
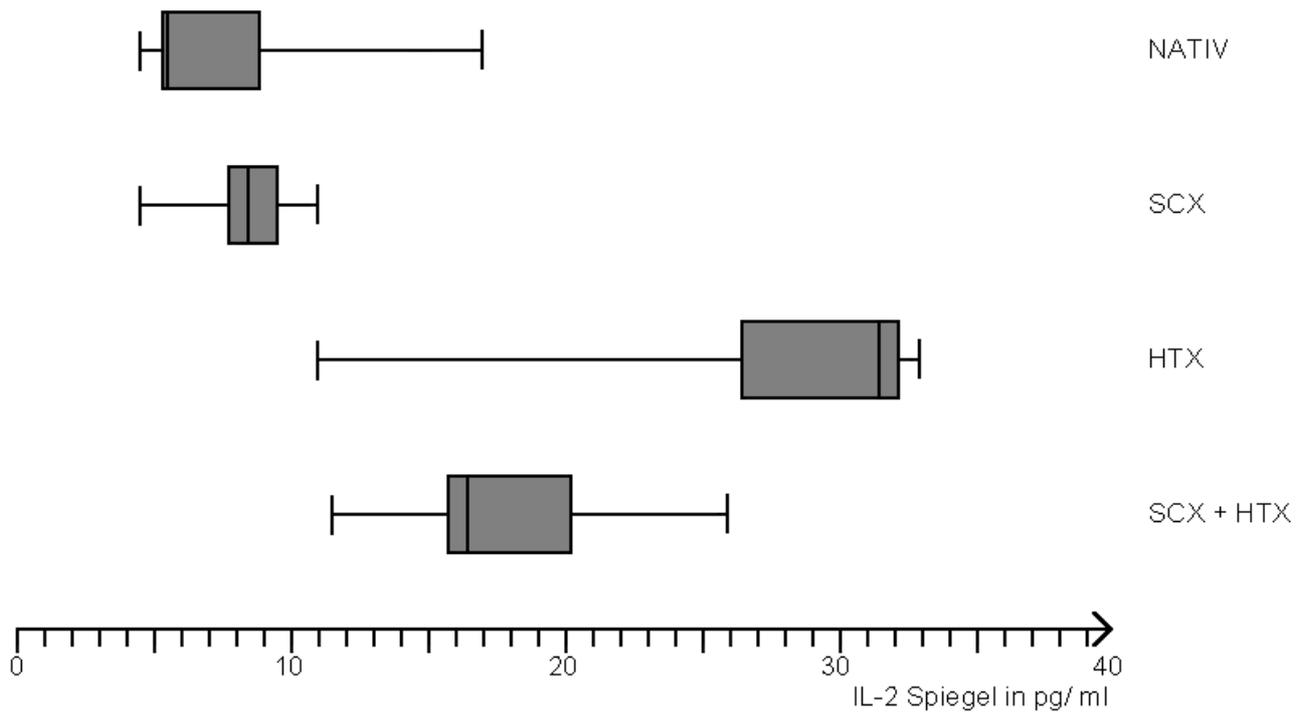


Abbildung 8: Darstellung der Versuchsergebnisse als Box-Plot- Grafik



6.2. Statistische Auswertung

6.2.1. Paarweiser Vergleich der Gruppen untereinander

Paarweise Vergleiche der Gruppen untereinander mittels Mann-Whitney-Test: Da nur mit Einschränkungen eine Normalverteilung vorliegt, sind die mittels Rangzahlen durch Mann-Whitney-Test ermittelten Ergebnisse vorzuziehen. Die P- Werte wurden ermittelt, nachdem mittels Bonferroni- Prozedur die bei multiplem Testen innerhalb der gleichen Grundgesamtheit auftretende α - Fehler- Inflation adjustiert wurde. Es ergaben sich dabei bis auf die Vergleiche der Gruppen HTX vs. HTX/SCX sowie SCX vs. Nativ signifikante Testergebnisse in den paarweisen Gruppenvergleichen. Unter dem Anspruch, dass der Versuch konfirmatorische Ergebnisse liefern soll, ist eine Korrektur des Signifikanzniveaus mittels Bonferroni Adjustierung zwingend erforderlich. Tabelle 5 zeigt die Übersicht der einzelnen Gruppenvergleiche.

Tabelle 5: Statistische Ergebnisse der paarweisen Vergleiche von IL-2- Werten der verschiedenen Versuchsgruppen, signifikante Ergebnisse fett gedruckt.

Vergleich	P-Wert beim Mann-Whitney-Test (ohne Bonferroni Adjustierung)	P-Wert beim Mann-Whitney-Test (nach Bonferroni Adjustierung)
(HTX vs. SCX)	0,000*	0,003*
(HTX vs. HTX/SCX)	0,013*	0,080
(HTX vs. NATIV)	0,001*	0,004*
(SCX vs. HTX/SCX)	0,000*	0,001*
(SCX vs. NATIV)	0,393	1,000
(HTX/SCX vs. NATIV)	0,003*	0,020*

*= signifikant

7. Diskussion

7.1. Einordnung der Ergebnisse

Bisher war eine durch SCX vermittelte Toleranz nicht ohne Konditionierung möglich. Hier können nun mit der Bestimmung des IL-2- Spiegels als Marker für die Aktivität der zellulären Antwort des Immunsystems Rückschlüsse auf zugrunde liegende Mechanismen geschlossen werden.

Es zeigt sich, dass die HTX, egal ob einzeln oder in Kombination mit einer SCX durchgeführt, einen, im Vergleich zu den Gruppen ohne HTX, signifikant erhöhten (p- Werte von 0.001, 0,003, 0,004 und 0,020) IL-2 Spiegel induziert.

Dies weist darauf hin, dass die SCX wirkungslos bleibt- und zwar aufgrund der zellulären Antwort des Empfängers, messbar anhand der erhöhten IL-2 Werte.

7.2. Hohes IL-2 verhindert HSC- vermittelte Toleranz

Eine mögliche Toleranz wird wohl durch das im Rahmen der HTX erhöhte IL-2 gebrochen, obgleich eigentlich durch eine zuvor durchgeführte SCX eine Toleranz vorliegen könnte. Der IL-2 Spiegel ist hoch und damit die zelluläre Antwort auf die HTX groß⁹⁴, wodurch sie sozusagen die periphere Toleranz „überrollt“¹⁶. Möglicherweise ist dies bei einer zusätzlichen SCX genauso der Fall und die SC sind in solch einem Fall praktisch generell wirkungslos, da eine HTX einen zu großen immunologischen Stimulus darstellt, der ohne ein weiteres, beispielsweise medikamentöses Vorgehen, immer eine Abstoßung des soliden Transplantats zur Folge hat. Vorstellbar ist auch, dass die SC lediglich wegen der durch die hohen IL-2- Spiegel verminderten Expression des B7-H1^{21 37} versagen. Die Bindung von B7-H1 an PD-1 auf murinen CD4+ oder CD8+ Zellen führt zur Inhibition von Proliferation und Zytokinproduktion wie IL-2 durch CD4+ T- Zellen¹²⁵, was jedoch durch zu hohe IL-2 Spiegel blockiert werden kann³⁷.

CD 34- Stammzellen supprimieren in vitro immunkompetente T- und B- Lymphozyten über eine B7-H1/ PD-1 Interaktion¹⁴. Da ja PD-1 insbesondere nicht auf DCs oder Makrophagen exprimiert wird²⁴⁶ und dadurch die speziellen Eigenschaften der CD34neg SC gewissermaßen nutzlos werden, ist denkbar. Welcher Vorgang überwiegt, oder ob eine gewisse Synergie vorliegt, kann hier nicht eindeutig beantwortet werden und die Unterscheidung ist auch nur von fraglicher Bedeutung für das Ergebnis. Es wird jedoch zweifelsohne deutlich, dass IL-2 bzw. seine Wirkung einer Toleranzinduktion durch eine SCX im Wege stehen.

7.3. Möglichkeiten der Toleranzinduktion trotz hohem IL-2

Wie bereits in den theoretischen Grundlagen beschrieben, ist eine Einleitung sowie die Aufrechterhaltung einer T- Zell- Inhibition nur möglich, wenn der IL-2 Spiegel nicht zu hoch ist ^{21 37}.

Ein durch die ermittelten Ergebnisse möglicher Ansatzpunkt zur Herstellung einer Toleranz wäre also die peritransplantative medikamentöse Blockade des IL-2 Rezeptors, zytotoxische IL-2- Antikörper ¹³², oder das sich bereits in breiter klinischer Anwendung befindende Tacrolimus, ein Calcineurin- Inhibitor. Entgegen anderen Therapieregimes mit neoadjuvanter Bestrahlung und Repopularisierung durch allogene SC vor HTX ⁷⁰ könnte dann eine belastende Therapie für den Empfänger verhindert werden. Inwieweit hier durch medikamentöse IL- 2 Antagonisten, verabreicht als Supportivum z.B. in der Akutphase temporär zur kurzfristigen Überbrückung, dann eine letztlich dauerhafte Toleranz induzierbar ist oder ob die zelluläre Antwort trotzdem überwiegt, müssen weitere Experimente zeigen.

Auch an anderer Stelle ist eine medikamentöser Eingriff denkbar. Die Gabe von B7-H1- Rezeptor stimulierendem mAb konnte im Experiment die Aktivierung und Reifung antigenpräsentierender Zellen verhindern ⁷¹ und Proliferation von T- Zellen inhibieren ^{67 240}. Somit könnte eventuell die B7-H1/ PD-1 Interaktion simuliert bzw. unterstützt werden um eine größere Rezeptorenzahl zu erreichen, als dies allein durch die Stammzellen möglich ist und die Zellen so in Aktion treten. Im Falle einer der SCX vorausgehenden Immunsuppression muss die Möglichkeit eines GvHD in Betracht gezogen werden. Der zeitliche Ablauf von Stammzel-, Organtransplantation und Immunsuppression müsste ermittelt werden.

7.4. Transplantationszeitpunkt

Möglicherweise spielt aber auch der Zeitpunkt der SCX im Verhältnis zur HTX eine Rolle. Bezüglich des zeitlichen Rahmens der Transplantation des soliden Organs und der SCX müssen sich hier weitere Studien anschließen. Denkbar wäre die Notwendigkeit eines größeren zeitlichen Intervalls zwischen SCX und HTX, um ein Etablieren der transplantierten Stammzellen im Empfänger zu ermöglichen und dann ein potentiell GvHD zu verhindern.

7.5. Dosis der SCX

Im gleichen Zusammenhang wäre auch denkbar, dass eine erhöhte SCX- Dosis Erfolg bringt, wenn gleich Hinweise auf eine angemessene Dosierung vorliegen ^{97 232} und sich mit steigender Dosis

Verträglichkeit und technische Durchführbarkeit der SCX verschlechtern⁹⁷.

Analog zur vorliegenden wäre eine weitere Untersuchung unter gleichen Bedingungen bezüglich des Verhaltens von IFN- γ interessant, da es die Expression des B7-H1/ PD-1- Komplexes ebenfalls beeinflusst^{62 112 121 139 218 240}. Leider ist aufgrund der geringen Serummengen, die aus der Maus gewonnen werden konnten, mit den verfügbaren Tests jeweils nur ein Parameter bestimmbar.

Weiterhin kann die ausbleibende Erhöhung des IL-2 Spiegels der Mäuse aus der SCX- Gruppe im Vergleich mit den Nativmäusen dahingehend interpretiert werden, dass nach stattgefunderer SCX keine signifikante zelluläre Immunaktivität im Empfänger stattfindet und die Stammzellen im Empfängersystem integriert werden. Dies bestätigen bereits durchgeführte Versuche⁹⁷.

7.6. Ausblick

Die Stammzelltransplantation stellt in der Zukunft sicher eine Therapieoption dar. Es müssen sich aber noch viele Versuche anschließen, auch die Übertragung auf den Menschen ist noch mit vielen Hürden verbunden. Aber diese viel versprechende Möglichkeit der Toleranzinduktion im Rahmen einer TX ist Gegenstand intensiver Forschung und ein sich schnell entwickelndes Gebiet, sodass sicher in absehbarer Zeit mit ersten Konzepten zu rechnen sein wird.

8. Zusammenfassung

Die Transplantation solider Organe hat einen festen Platz in der heutigen Medizin. Trotz der bereits erstaunlichen Ergebnisse nach Organtransplantationen bleibt der Wermutstropfen der lebenslangen, nebenwirkungsreichen immunsuppressiven Therapie. Ein Fortschritt kann mittels neuartiger Konzepte verwirklicht werden, die nicht wie bisher eine generelle Immunsuppression zur Folge haben, sondern die gezielte Toleranz des Spendermaterials durch den Empfänger bewirken, ohne ansonsten wesentlich auf die Funktion des Immunsystems einzuwirken.

Ein vielversprechender Ansatz ist die mögliche Induktion einer transplantatspezifischen Toleranz durch zusätzliche Transplantation von mesenchymalen Stammzellen des Organspenders.

Hierbei gilt es noch zahlreiche Probleme zu bewältigen. Beispielsweise werden Transplantate trotz vorheriger Gabe von Stammzellen des Organspenders abgestoßen.

Um eine mögliche Ursache dieser komplexen Vorgänge zu finden, erfolgte in dieser Arbeit die Bestimmung des Interleukin- 2 Spiegels nach Organtransplantation und Stammzelltransplantation im Mausmodell.

Im Rahmen des Nichterreichens einer Toleranzinduktion finden sich hohe Interleukin- 2 Spiegel, die dafür verantwortlich zu machen sind, dass eine Immunantwort des Organempfängers die toleranzinduzierende Wirkung der zuvor durchgeführten Stammzelltransplantation im Keim erstickt.

9. Anhang

Tabelle 6: Wichtige CD- Antigene mit Synonym, Vorkommen und Funktion

CD- Antigen	Auch bezeichnet als	Exprimiert von	Funktion
CD 3		Thymozyten, T-Zellen	Dient der Signaltransduktion durch den TCR
CD 4		Thymozyten, T-Zellen, Monozyten, Makrophagen	Corezeptor für MHC Klasse II Moleküle
CD 8		Thymozyten Subpopulation, CTL, Regulatorische T-Zellen in der Peripherie	Corezeptor für MHC Klasse I Moleküle
CD 25	IL-2R α	Aktivierte T- Zellen, regulatorische T-Zellen, B- Zellen und Monozyten Zellen, B- Zellen, und Monozyten	IL-2 Rezeptor α -Kette
CD 28		T-Zell Subpopulationen, Aktivierte B- Zellen	Aktivierung naiver T- Zellen, Rezeptor für costimulierendes Signal, bindet CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2)
CD 34	Mucin	Hämatopoietische Vorläuferzellen, Kapilläres Endothelium	Ligand für CD62L (L-Selektin), Adhäsion
CD 40	CD154 Ligand	B-Zellen, Makrophagen,	Rezeptor für costimulatorisches Signal (CD154) der B-

		Dendritische Zellen, Basale Epithelzellen	Zellen, Anregung von Wachstum, Differenzierung, Isotypenwechsel von B- Zellen, und Zytokin-Produktion durch Makrophagen und DZ
CD 62L	LAM-1, L-selectin, LECAM-1	B- Zellen, T- Zellen, Monozyten, NK Zellen	Leukozyten Adhäsionsmolekül (LAM), bindet CD34, GlyCAM, vermittelt rollende Interaktionen
CD 80	B7.1	B- Zell Subpopulationen	Costimulator, Ligand für CD28 und CTLA-4 (CD152)
CD 86	B7.2	Monozyten, Aktivierte B- Zellen, Dendritische Zellen	Ligand für CD28 und CTLA4 (CD152), Costimulation, Immunregulation
CD 119	IFN- γ R	Makrophagen, Monozyten, B- Zellen, Endothelium, Epithelium	Interferon- γ Rezeptor
CD 122	IL-2R β	NK Zellen, ruhende T-Zell Subpopulationen, einige B-Zell-Linien	IL-2 Rezeptor β -Kette
CD 152	CTLA-4	Aktivierte T- Zellen	Rezeptor für B7.1 (CD80), B7.2 (CD86); negativer Regulator der T-Zell Aktivierung
CD 154		Aktivierte CD4 T-Zellen	Ligand für CD40, Vermittler von B- Zell Proliferation und Aktivierung; Costimulation

10. Danksagung

Im Jahr 2002 begann ich in der chirurgischen Forschergruppe unter der Leitung von PD Dr. med. Ralf Huss (damals Pathologisches Institut der LMU München, jetzt Roche, Penzberg) und PD Dr. med. Manfred Stangl (damals Leiter der Transplantationschirurgie TU München, jetzt Chirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern der Universität München) die Operationstechnik der heterotopen Herztransplantation bei Mäusen zu erlernen.

Diese Arbeit konnte nur durch die Unterstützung und Hilfe vieler gelingen, denen nun gedankt sei.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater, PD Dr. med. Manfred Stangl, der, herzlich und unkompliziert, hinter dieser Arbeit steht.

Für die Bereitstellung der Mäuse sowie die Möglichkeit der Nutzung von Operationsräumen im Tierstall des Instituts für Pathologie der LMU München und viele prompte Ratschläge, Erklärungen sowie Hilfestellungen möchte ich meinem „zweiten Doktorvater“ PD Dr. med. Ralf Huss vielmals danken.

Ein Dankeschön geht an Herrn Dr. med. Klaus Gerauer, der den ersten Kontakt zur Forschungsgruppe herstellte. Im weiteren Verlauf nahmen Dr. Norbert Hüser und auch Dr. Volker Aßfalg die Betreuung meiner Arbeit in die Hand. Sie hatten stets ein offenes Ohr und haben durch ihre Kompetenz, aber auch auf freundschaftliche Art, mein Vorankommen stets unterstützt. In gleicher Weise bin ich für später auch Alice Schwarzenau zu Dank verpflichtet.

Weiterhin danke ich vielmals Sabine Moosmann und Sabine Sagebiel, die immer fleißig und zuverlässig vom Labor aus zu dieser Arbeit beigesteuert haben. Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Anne-Laure Boulesteix und Petra Heinrich vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU- München, die mir bei den statistischen Berechnungen unter die Arme gegriffen haben.

Großer Dank geht an dieser Stelle auch an Herrn Janusz Minda, der stets interessiert und motiviert für mein Wohlergehen und vor allem auch das der Mäuse gesorgt hat.

Zuletzt geht mein Dank an meine liebe Frau Frederike und unsere Töchter Anna- Lena und Franziska, die oft auf mich verzichtet haben und mich stets motiviert haben. Danke auch an meine Eltern und meine Schwester, die sicher froh sind, wenn diese Arbeit ihren Abschluss findet.

11. Literaturverzeichnis

- 1) Aakhus S, Dahl K, Wideroe TE. Cardiovascular morbidity and risk factors in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Mar;14(3):648-54
- 2) Abou-Jaoude MM, Almawi WY. Single-center experience with tacrolimus-based immunosuppressive regimens in renal transplantation. *Mol Immunol*. 2003 Jul;39(17-18):1067-72
- 3) Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996 May;8(5):765-72
- 4) Aguado JM, Herrero JA, Gavalda J, Torre-Cisneros J, Blanes M, Rufi G, Moreno A, Gurgui M, Hayek M, Lumberras C, Cantarell C. Clinical presentation and outcome of tuberculosis in kidney, liver, and heart transplant recipients in Spain. *Transplantation*. 1997 May 15;63(9):1278-86
- 5) Aguila HL, Akashi K, Domen J, Gandy KL, Lagasse E, Mebius RE, Morrison SJ, Shizuru J, Strober S, Uchida N, Wright DE, Weissman IL. From stem cells to lymphocytes: biology and transplantation. *Immunol Rev*. 1997 Jun;157:13-40. Review
- 6) Aizawa S, Yaguchi M, Nakano M, Inokuchi S, Handa H, Toyama K. Establishment of a variety of human bone marrow stromal cell lines by the recombinant SV40-adenovirus vector. *J Cell Physiol*. 1991 Aug;148(2):245-5
- 7) Anderson D, Billingham RE, Lampkin GH, Medawar PB. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity* 6 (1952), pp. 201–221
- 8) Andrade, CF, Waddell, TK, Keshavjee, S, Liu, M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant* 2005; 5:969
- 9) Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med*. 1989 May 1;169(5):1721-31
- 10) Aramaki O, Shirasugi N, Takayama T, Shimazu M, Kitajima M, Ikeda Y, Azuma M, Okumura K, Yagita H, Niimi M. Programmed death-1-programmed death-L1 interaction is essential for induction of regulatory cells by intratracheal delivery of alloantigen. *Transplantation*. 2004 Jan 15;77(1):6-12
- 11) Arend SM, Mallat MJ, Westendorp RJ, van der Woude FJ, van Es LA. Patient survival after renal transplantation; more than 25 years follow-up. *Nephrol Dial Transplant*. 1997 Aug;12(8):1672-9
- 12) Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1994 Mar 24;330(12):827-38. Review
- 13) Auchincloss HA. Why is cell-mediated xenograft rejection so strong? *Xenotransplantation* 1995;3:19-22
- 14) Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005 May;35(5):1482-90
- 15) Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Giannoni C, Iacucci R, Zei T, Martelli MP, Gambelunghe C, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood*. 1994 Dec 1;84(11):3948-55
- 16) Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1245-53
- 17) Bahceci E, Read EJ, Leitman S, Childs R, Dunbar C, Young NS, Barrett AJ. CD34+ cell dose

- predicts relapse and survival after T-cell-depleted HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for hematological malignancies. *Br J haematol.* 2000 Feb;108(2):408-14
- 18) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767
 - 19) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811. Review
 - 20) Ben-Ari Z, Pappo O, Mor E. Intrahepatic cholestasis after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003 Oct;9(10):1005-18
 - 21) Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D, Khan N, Veldman G, Jacobs KA, Valge-Archer VE, Collins M, Carreno BM. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol.* 2003 Jan 15;170(2):711-8
 - 22) Beyer J, Schwella N, Zingsem J, Strohscheer I, Schwaner I, Oettle H, Serke S, Huhn D, Stieger W. Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison. *J Clin Oncol.* 1995 Jun;13(6):1328-35
 - 23) Beyga ZT, Kahan BD. Surgical complications of kidney transplantation. *J Nephrol.* 1998 May-Jun;11(3):137-45. Review
 - 24) Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med.* 1998 Sep;4(9):1038-45
 - 25) Birk PE, Chavers BM. Does cytomegalovirus cause glomerular injury in renal allograft recipients? *J Am Soc Nephrol.* 1997 Nov;8(11):1801-8. Review
 - 26) Bishop DK, Chan S, Li W, Ensley RD, Xu S, Eichwald EJ. CD4-positive helper T lymphocytes mediate mouse cardiac allograft rejection independent of donor alloantigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Transplantation.* 1993 Oct;56(4):892-7
 - 27) Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, Socie G, Esperou H, Devergie A, Dal Cortivo L, Marolleau JP, Garnier F, Ribaud P, Gluckman E. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 2002 Apr 15;99(8):2726-33
 - 28) Bonnard GD, Yasaka K, Jacobson D. Ligand-activated T cell growth factor-induced proliferation: absorption of T cell growth factor by activated T cells. *J Immunol.* 1979 Dec;123(6):2704-8
 - 29) Bosmans JL, Holvoet P, Dauwe SE, Ysebaert DK, Chapelle T, Jurgens A, Kovacic V, Van Marck EA, De Broe ME, Verpooten GA. Oxidative modification of low-density lipoproteins and the outcome of renal allografts at 1 1/2 years. *Kidney Int.* 2001 Jun;59(6):2346-56
 - 30) Braciale TJ. Antigen form influences induction and frequency of influenza-specific class I and class II MHC-restricted cytolytic T lymphocytes. *J Immunol.* 1988 Jul 15;141(2):363-8
 - 31) Brady, HR. Leukocyte adhesion molecules: Potential targets for therapeutic intervention in kidney diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993; 2:171
 - 32) Brandhuber BJ, Boone T, Kenney WC, McKay DB. Three-dimensional structure of interleukin-2. *Science.* 1987 Dec 18;238(4834):1707-9
 - 33) Buell JF, Gross TG, Woodle ES. Malignancy after transplantation. *Transplantation.* 2005 Oct 15;80(2 Suppl):S254-64
 - 34) Buhler LH, Spitzer TR, Sykes M, Sachs DH, Delmonico FL, Tolkoff-Rubin N, Saidman SL, Sackstein R, McAfee S, Dey B, Colby C, Cosimi AB. Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease; *Transplantation.* 2002 Nov 27;74(10):1405-9
 - 35) Campos L, Bastion Y, Roubi N, Felman P, Espinouse D, Dumontet C, Debost M, Tremisi JP, Coiffier B. Peripheral blood stem cells harvested after chemotherapy and GM-CSF for

- treatment intensification in patients with advanced lymphoproliferative diseases. *Leukemia*. 1993 Sep;7(9):1409-15
- 36) Cao Y, Zhou H, Tao J, Zheng Z, Li N, Shen B, Shih TS, Hong J, Zhang J, Chou KY. Keratinocytes induce local tolerance to skin graft by activating interleukin-10-secreting T cells in the context of costimulation molecule B7-H1. *Transplantation*. 2003 Apr 27;75(8):1390-6
 - 37) Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*. 2002 Mar;32(3):634-43
 - 38) Charlton B, Auchincloss H Jr, Fathman CG. Mechanisms of transplantation tolerance. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:707-34. Review
 - 39) Chtanova, T, Mackay, CR. T cell effector subsets: extending the Th1/Th2 paradigm. *Adv Immunol* 2001; 78:233
 - 40) Ciccarelli O, Kaczmarek B, Roggen F, DeReyck C, Goffette P, Danse E, Verbaandert C, Sempoux C, Wittebole X, Wallemacq P, Lerut J. Long-term medical complications and quality of life in adult recipients surviving 10 years or more after liver transplantation. *Acta Gastroenterol Belg*. 2005 Jul-Sep;68(3):323-30
 - 41) Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984 Jul;133(1):157-65
 - 42) Cohen B, Perijn G. Eurotransplant International Foundation, Annual Report 2008, Eurotransplant International Foundation;
 - 43) Cohen B, Perijn G. Eurotransplant International Foundation, Annual Report 2008, Eurotransplant International Foundation, s. 35
 - 44) Cohen B, Perijn G. Eurotransplant International Foundation, Annual Report 2008, Eurotransplant International Foundation, s. 35
 - 45) Cohen B, Perijn G. Eurotransplant International Foundation, Annual Report 2008, Eurotransplant International Foundation, s. 35
 - 46) Colson YL, Wren SM, Schuchert MJ, Patrene KD, Johnson PC, Boggs SS, Ildstad ST. A nonlethal conditioning approach to achieve durable multilineage mixed chimerism and tolerance across major, minor, and hematopoietic histocompatibility barriers. *J Immunol*. 1995 Nov 1;155(9):4179-88
 - 47) Colson YL, Zadach K, Nalesnik M, Ildstad ST. Mixed allogeneic chimerism in the rat. Donor-specific transplantation tolerance without chronic rejection for primarily vascularized cardiac allografts. *Transplantation*. 1995 Nov 15;60(9):971-80
 - 48) Cotner T, Williams JM, Christenson L, Shapiro HM, Strom TB, Strominger J. Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. *J Exp Med*. 1983 Feb 1;157(2):461-72
 - 49) Couchoud C, Cucherat M, Haugh M, Pouteil-Noble C. Cytomegalovirus prophylaxis with antiviral agents in solid organ transplantation: a meta-analysis. *Transplantation*. 1998 Mar 15;65(5):641-7
 - 50) Couetil JP, McGoldrick JP, Wallwork J, English TA. Malignant tumors after heart transplantation. *J Heart Transplant*. 1990 Nov-Dec;9(6):622-6
 - 51) Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol* 1958; 20: 156-62
 - 52) De Fijter JW. The impact of age on rejection in kidney transplantation. *Drugs & aging*. 2005;22(5):433-49
 - 53) Demetris A, Adams D, Bellamy C, Blakolmer K, Clouston A, Dhillon AP, Fung J, Gouw A, Gustafsson B, Haga H, Harrison D, Hart J, Hubscher S, Jaffe R, Khettry U, Lassman C, Lewin K, Martinez O, Nakazawa Y, Neil D, Pappo O, Parizhskaya M, Randhawa P, Rasoul-Rockenschaub S, Reinholt F, Reynes M, Robert M, Tsamandas A, Wanless I, Wiesner R, Wernerson A, Wrba F, Wyatt J, Yamabe H. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and

- reporting of chronic rejection. An International Panel. *Hepatology*. 2000 Mar;31(3):792-9
- 54) Denning DW, Evans EG, Kibbler CC, Richardson MD, Roberts MM, Rogers TR, Warnock DW, Warren RE. Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in hematological malignancy and solid organ transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:424-436
 - 55) Ding H, Wu X, Gao W. PD-L1 is expressed by human renal tubular epithelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *Clin Immunol*. 2005 May;115(2):184-91
 - 56) Donckier V, Troisi R, Toungouz M, Colle I, Van Vlierberghe H, Jacquy C, Martiat P, Stordeur P, Zhou L, Boon N, Lambermont M, Schandene L, Van Laethem JL, Noens L, Gelin M, de Hemptinne B, Goldman M. Donor stem cell infusion after non-myeloablative conditioning for tolerance induction to HLA mismatched adult living-donor liver graft. *Transpl Immunol*. 2004 Sep-Oct;13(2):139-46
 - 57) Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999 Dec;5(12):1365-9
 - 58) Dooley DC, Oppenlander BK, Xiao M. Analysis of primitive CD34- and CD34+ hematopoietic cells from adults: gain and loss of CD34 antigen by undifferentiated cells are closely linked to proliferative status in culture. *Stem Cells*. 2004;22(4):556-69
 - 59) Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:111-37. Review
 - 60) Dresske B, Zhu X, Herwartz C, Brotzmann K, Fandrich F. The time pattern of organ infiltration and distribution of natural killer cells and macrophages in the course of acute graft rejection after allogeneic heart transplantation in the rat. *Transplant Proc*. 1997 May;29(3):1715-6
 - 61) El-Hamamsy I, Stevens LM, Carrier M, Pelletier G, White M, Tremblay F, Perrault LP. Incidence and prognosis of cancer following heart transplantation using RATG induction therapy. *Transpl Int*. 2005 Nov;18(11):1280-5
 - 62) Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, Greenfield EA, Chernova T, Erickson J, Leonard JP. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation*. 2002 Apr;9(2):133-45
 - 63) Farrar JJ, Benjamin WR, Hilfiker ML, Howard M, Farrar WL, Fuller-Farrar J. The biochemistry, biology, and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol Rev*. 1982;63:129-66
 - 64) Forbes RD, Guttman RD. Pathogenetic studies of cardiac allograft rejection using inbred rat models. *Immunol Rev*. 1984;77:5-29
 - 65) Forbes RD, Zheng SX, Gomersall M, al-Saffar M, Guttman RD. Evidence that recipient CD8+ T cell depletion does not alter development of chronic vascular rejection in a rat heart allograft model. *Transplantation* 1994; 57:1238
 - 66) Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 1956 Mar 10;177(4506):452-4
 - 67) Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1027-34
 - 68) Freese P, Svalander CT, Molne J, Norden G, Nyberg G. Chronic allograft nephropathy-biopsy findings and outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Dec;16(12):2401-6
 - 69) Fuggle SV, Koo DD. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation* 1998; 65:763
 - 70) Gandy KL, Weissman IL. Tolerance of allogeneic heart grafts in mice simultaneously reconstituted with purified allogeneic hematopoietic stem cells. *Transplantation*. 1998 Feb 15;65(3):295-304

- 71) Gao W, Demirci G, Strom TB, Li XC. Stimulating PD-1-negative signals concurrent with blocking CD154 co-stimulation induces long-term islet allograft survival. *Transplantation*. 2003 Sep 27;76(6):994-9
- 72) Garcia-Morales R, Carreno M, Mathew J, Cirocco R, Zucker K, Ciancio G, Burke G, Roth D, Temple D, Fuller L, Esquenazi V, Eskin L, Kenyon NS, Ricordi C, Tzakis A, Miller J. Continuing observations on the regulatory effects of donor-specific bone marrow cell infusions and chimerism in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 1998 Apr 15;65(7):956-65
- 73) Garrity B. Factors predicting 10-year survival after heart transplantation, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2005 Feb;24(2):156-9
- 74) Germain, RN, Stefanova, I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:467
- 75) Ciancio G, Miller J, Garcia-Morales RO, Carreno M, Burke GW 3rd, Roth D, Kupin W, Tzakis AG, Ricordi C, Rosen A, Fuller L, Esquenazi V. Six-year clinical effect of donor bone marrow infusions in renal transplant patients. *Transplantation*. 2001 Apr 15;71(7):827-35
- 76) Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 1997 Dec;3(12):1337-45
- 77) Gourishankar S, McDermid JC, Jhangri GS, Preiksaitis JK. Herpes zoster infection following solid organ transplantation: incidence, risk factors and outcomes in the current immunosuppressive era. *Am J Transplant*. 2004 Jan;4(1):108-15
- 78) Grady KL. Quality of life after heart transplantation: are things really better? *Curr Opin Cardiol*. 2003 Mar;18(2):129-35
- 79) Green M. Management of Epstein-Barr virus-induced post-transplant lymphoproliferative disease in recipients of solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2001 Jul;1(2):103-8. Review
- 80) Greenwald RJ, Boussiotis VA, Lorschach RB, Abbas AK, Sharpe AH. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*. 2001 Feb;14(2):145-55
- 81) Hagen M, Hjelmessaeth J, Jenssen T, Morkrid L, Hartmann A. A 6-year prospective study on new onset diabetes mellitus, insulin release and insulin sensitivity in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Oct;18(10):2154-9
- 82) Hall BM. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation*. 1991 Jun;51(6):1141-51. Review
- 83) Halloran PF. Call for revolution: a new approach to describing allograft deterioration. *Am J Transplant*. 2002 Mar;2(3):195-200. Review
- 84) Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V, Cockfield SM. The "injury response": A concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. *Transplant Proc* 1997; 29:79
- 85) Hancock WW, Sayegh MH, Kwok CA, Weiner HL, Carpenter CB. Oral, but not intravenous, alloantigen prevents accelerated allograft rejection by selective intragraft Th2 cell activation. *Transplantation* 1993; 55:1112
- 86) Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996, *N Engl J Med*. 2000 Mar 2;342(9):605-12
- 87) Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Datenblatt Harlan balb.pdf
- 88) Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Datenblatt Harlan cba.pdf
- 89) Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Uemura Y, Nishimura Y. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with TRAIL or programmed death-1 ligand. *J Immunol*. 2005 Feb 15;174(4):1888-97

- 90) Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nicleleit V, Ramos E, Randhawa P, Shapiro R, Steiger J, Suthanthiran M, Trofe J. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*. 2005 May 27;79(10):1277-86. Review
- 91) Hjelmesaeth J, Hartmann A, Leivestad T, Holdaas H, Sagedal S, Olstad M, Jenssen T. The impact of early-diagnosed new-onset post-transplantation diabetes mellitus on survival and major cardiac events. *Kidney Int*. 2006 Jan 4
- 92) Humar A, Payne WD, Sutherland DE, Matas AJ. Clinical determinants of multiple acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2000 Jun 15;69(11):2357-60
- 93) Hüser N, Tertilt C, Gerauer K, Maier S, Traeger T, Assfalg V, Reiter R, Heidecke CD, Pfeffer K. CCR4-deficient mice show prolonged graft survival in a chronic cardiac transplant rejection model. *Eur J Immunol*. 2005 Jan;35(1):128-38
- 94) Hüser N. Funktionale Bedeutung des Chemokinrezeptors 4 bei der Abstoßung von heterotopen Herztransplantaten in der Maus. Promotionsarbeit, med. Fakultät der TU- München, 2003
- 95) Huss R, Hong DS, McSweeney PA, Hoy CA, Deeg HJ. Differentiation of canine bone marrow cells with hemopoietic characteristics from an adherent stromal cell precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jan 31;92(3):748-52
- 96) Huss R, Hoy CA, Deeg HJ. Contact- and growth factor-dependent survival in a canine marrow-derived stromal cell line. *Blood*. 1995 May 1;85(9):2414-21
- 97) Huss R, Stangl M. unveröffentlichte Daten, Klinikum rechts der Isar, München
- 98) Ildstad ST, Sachs DH. Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature*. 1984 Jan 12-18;307(5947):168-70
- 99) Ildstad ST, Wren SM, Bluestone JA, Barbieri SA, Stephany D, Sachs DH. Effect of selective T cell depletion of host and/or donor bone marrow on lymphopoietic repopulation, tolerance, and graft-vs-host disease in mixed allogeneic chimeras (B10 + B10.D2----B10). *J Immunol*. 1986 Jan;136(1):28-33
- 100) Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992 Nov;11(11):3887-95
- 101) Ito T, Ueno T, Clarkson MR, Yuan X, Jurewicz MM, Yagita H, Azuma M, Sharpe AH, Auchincloss H Jr, Sayegh MH, Najafian N. Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo. *J Immunol*. 2005 Jun 1;174(11):6648-56
- 102) Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 17;99(19):12293-7
- 103) Jansen J, Hanks S, Thompson JM, Dugan MJ, Akard LP. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J Cell Mol Med*. 2005 Jan-Mar;9(1):37-50. Review
- 104) Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:23
- 105) Johnson C, Ahsan N, Gonwa T, Halloran P, Stegall M, Hardy M, Metzger R, Shield C 3rd, Rocher L, Scandling J, Sorensen J, Mulloy L, Light J, Corwin C, Danovitch G, Wachs M, van Veldhuisen P, Salm K, Tolzman D, Fitzsimmons WE. Randomized trial of tacrolimus (Prograf) in combination with azathioprine or mycophenolate mofetil versus cyclosporine (Neoral) with mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation. *Transplantation*. 2000 Mar 15;69(5):834-41
- 106) Johnston TD, Thacker LR, Jeon H, Lucas BA, Ranjan D. Sensitivity of expanded-criteria donor kidneys to cold ischaemia time. *Clin Transplant* 2004; 18 (Suppl 12): 28–32
- 107) Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Akiba

- H, Yagita H, Okumura K, Machida U, Iwai H, Azuma M, Chen L, Watanabe M. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J Immunol*. 2003 Oct 15;171(8):4156-63
- 108) Kasiske BL, Andany MA, Danielson B. A thirty percent chronic decline in inverse serum creatinine is an excellent predictor of late renal allograft failure. *Am J Kidney Dis*. 2002 Apr;39(4):762-8
- 109) Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2003 Feb;3(2):178-85
- 110) Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol*. 1986 Mar;14(3):192-6
- 111) Ko DS, Bartholomew A, Poncelet AJ, Sachs DH, Huang C, LeGuern A, Abraham KI, Colvin RB, Boskovic S, Hong HZ, Wee SL, Winn HJ, Cosimi AB. Demonstration of multilineage chimerism in a nonhuman primate concordant xenograft model. *Xenotransplantation*. 1998 Nov;5(4):298-304
- 112) Koga N, Suzuki J, Kosuge H, Haraguchi G, Onai Y, Futamatsu H, Maejima Y, Gotoh R, Saiki H, Tsushima F, Azuma M, Isobe M. Blockade of the interaction between PD-1 and PD-L1 accelerates graft arterial disease in cardiac allografts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Nov;24(11):2057-62
- 113) Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3722-9
- 114) Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996 Jan 1;87(1):1-13
- 115) Kreisel D, Krupnick AS, Gelman AE, Engels FH, Popma SH, Krasinskas AM, Balsara KR, Szeto WY, Turka LA, Rosengard BR. Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: An alternative mechanism of allorecognition. *Nat Med* 2002; 8:233
- 116) Huss R, Lange C, Weissinger EM, Kolb HJ, Thalmeier K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells*. 2000;18(4):252-60.
- 117) Lakkis, FG, Sayegh, MH. Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2402
- 118) Lange C, Kaltz C, Thalmeier K, Kolb HJ, Huss R. Hematopoietic reconstitution of syngeneic mice with a peripheral blood-derived, monoclonal CD34-, Sca-1+, Thy-1(low), c-kit+ stem cell line. *J Hematother Stem Cell Res*. 1999 Aug;8(4):335-42
- 119) Larsen CP, Austyn JM, Morris PJ. The role of graft-derived dendritic leukocytes in the rejection of vascularized organ allografts. Recent findings on the migration and function of dendritic leukocytes after transplantation. *Ann Surg*. 1990 Sep;212(3):308-15
- 120) Larsson EL. Mechanism of T cell activation. II. Antigen- and lectin-dependent acquisition of responsiveness to TCGF is a nonmitogenic, active response of resting T cells. *J Immunol*. 1981 Apr;126(4):1323-6
- 121) Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):261-8
- 122) Laupacis A, Keown P, Pus N, Krueger H, Ferguson B, Wong C, Muirhead N. A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int* 1996;50:235-42
- 123) Lechler, R, Chai, JG, Marelli-Berg, F, Lombardi, G. The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance. *Immunology* 2001; 103:262
- 124) Lechner S, Huss R. Bone engineering: combining smart biomaterials and the application of

- stem cells. *Artif Organs*. 2006 Oct;30(10):770-4. Bzw. Lechner S. Promotionsarbeit, med. Fakultät der LMU- München, 2006
- 125) Lee I, Wang L, Wells AD, Ye Q, Han R, Dorf ME, Kuziel WA, Rollins BJ, Chen L, Hancock WW. Blocking the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 chemokine pathway induces permanent survival of islet allografts through a programmed death-1 ligand-1-dependent mechanism. *J Immunol*. 2003 Dec 15;171(12):6929-35
 - 126) Lee LA, Sergio JJ, Sykes M. Natural killer cells weakly resist engraftment of allogeneic, long-term, multilineage-repopulating hematopoietic stem cells. *Transplantation*. 1996 Jan 15;61(1):125-32
 - 127) Lefkowitz JH. Diagnostic issues in liver transplantation pathology. *Clin Liver Dis*. 2002 May;6(2):555-70, ix
 - 128) Le Moine, A, Goldman, M, Abramowicz, D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 2002; 73:1373
 - 129) Leonard WJ, Depper JM, Crabtree GR, Rudikoff S, Pumphrey J, Robb RJ, Kronke M, Svetlik PB, Peffer NJ, Waldmann TA, et al. Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature*. 1984 Oct 18-24;311(5987):626-3
 - 130) Ley, K, Kansas, GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:325
 - 131) Lindholm A, Ohlman S, Albrechtsen D, Tufveson G, Persson H, Persson NH. The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. *Transplantation*. 1993 Aug;56(2):307-15
 - 132) Lorberboum-Galski H, Barrett LV, Kirkman RL, Ogata M, Willingham MC, FitzGerald DJ, Pastan I. Cardiac allograft survival in mice treated with IL-2-PE40. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Feb;86(3):1008-12
 - 133) Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*. 1951 Aug;12(1):197-201
 - 134) Luster, AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338:436
 - 135) Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998 Jul;176(1):57-66
 - 136) Mange KC, Cizman B, Joffe M, Feldman HI. Arterial hypertension and renal allograft survival. *JAMA*. 2000 Feb 2;283(5):633-8
 - 137) Mathew JM, Garcia-Morales RO, Carreno M, Jin Y, Fuller L, Blomberg B, Cirocco R, Burke GW, Ciancio G, Ricordi C, Esquenazi V, Tzakis AG, Miller J. Immune responses and their regulation by donor bone marrow cells in clinical organ transplantation. *Transpl Immunol*. 2003 Jul-Sep;11(3-4):307-21. Review
 - 138) Matzinger, P, Bevan, MJ. Hypothesis: Why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?. *Cell Immunol* 1977; 29:1
 - 139) Mazanet MM, Hughes CC. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol*. 2002 Oct 1;169(7):3581-8
 - 140) McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science*. 1971 Jan 22;171(968):293-4
 - 141) Meier-Kriesche HU, Baliga R, Kaplan B. Decreased renal function is a strong risk factor for cardiovascular death after renal transplantation. *Transplantation*. 2003 Apr 27;75(8):1291-5
 - 142) Monaco AP, Clark AW, Wood ML, Sahyoun AI, Codish SD, Brown RW. Possible active enhancement of a human cadaver renal allograft with antilymphocyte serum (ALS) and donor bone marrow: case report of an initial attempt. *Surgery*. 1976 Apr;79(4):384-92
 - 143) Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. 1976 Sep 10;193(4257):1007-8
 - 144) Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev*

- Cell Dev Biol. 1995;11:35-71
- 145) Muller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-lo hematopoietic stem cell. *Cell*. 1986 Feb 28;44(4):653-62
 - 146) Nagano H, Tilney NL. Chronic allograft failure: the clinical problem. *Am J Med Sci*. 1997 May;313(5):305-9. Review
 - 147) Nakauchi H. Hematopoietic stem cells: are they CD34-positive or CD34-negative? *Nat Med*. 1998 Sep;4(9):1009-10
 - 148) Nakayama Y, Abe H, Rapaport FT, Waltzer WC, Kakita A. Influence of donor factors other than serologic status on transmission of cytomegalovirus to renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 1994 Apr;26(2):936-7
 - 149) Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, Sato M, Imamura S, Minato N, Yagita H, Nakano T, Honjo T. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int Immunol*. 1996 May;8(5):773-80
 - 150) Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 2001 Jan 12;291(5502):319-22
 - 151) Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999 Aug;11(2):141-51
 - 152) Odland MD. Surgical technique/post-transplant surgical complications. *Surg Clin North Am*. 1998 Feb;78(1):55-60
 - 153) Ogawa M, Tajima F, Ito T, Sato T, Laver JH, Deguchi T. CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. Developmental changes and kinetic alterations. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Jun;938:139-45
 - 154) Ohdan H, Yang YG, Shimizu A, Swenson KG, Sykes M. Mixed chimerism induced without lethal conditioning prevents T cell- and anti-Gal alpha 1,3Gal-mediated graft rejection. *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(3):281-90
 - 155) Okuno Y, Iwasaki H, Huettner CS, Radoska HS, Gonzalez DA, Tenen DG, Akashi K. Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 30;99(9):6246-51
 - 156) Opelz G. New immunosuppressants and HLA matching. *Transplant Proc*. 2001 Feb-Mar;33(1-2):467-8
 - 157) Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996 Jul 12;273(5272):242-5
 - 158) Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 102 (1945), pp. 400–401
 - 159) Ozkaynak E, Wang L, Goodearl A, McDonald K, Qin S, O'Keefe T, Duong T, Smith T, Gutierrez-Ramos JC, Rottman JB, Coyle AJ, Hancock WW. Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6546-53
 - 160) Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B, Zafiroopoulos V, Scott LM. Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. *Blood*. 2001 Oct 15;98(8):2403-11
 - 161) Parmar K, Sauk-Schubert C, Burdick D, Handley M, Mauch P. Sca+CD34- murine side population cells are highly enriched for primitive stem cells. *Exp Hematol*. 2003 Mar;31(3):244-50
 - 162) Patel R. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969 Apr 3;280(14):735-9
 - 163) Paul LC. Chronic renal transplant loss. *Kidney Int*. 1995 Jun;47(6):1491-9. Review
 - 164) Paul LC. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int*. 1999 Sep;56(3):783-93.

Review

- 165) Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA, Kieff E, Green M, Gores G, Habermann TM, Wiesner PH, Swinnen JL, Woodle ES, Bromberg JS. Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. *Transplantation*. 1999 Nov 27;68(10):1517-25. Review
- 166) Pearce DJ, Ridler CM, Simpson C, Bonnet D. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. *Blood*. 2004 Apr 1;103(7):2541-6
- 167) Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of OD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999 Feb 5;283(5403):845-8
- 168) Penn I. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. *Clin Transpl*. 1998;:147-58
- 169) Perfect JR. New antifungal agents. *Transpl Infect Dis*. 2002;4 Suppl 3:52-61. Review
- 170) Pescovitz MD, Thistlethwaite JR Jr, Auchincloss H Jr, Ildstad ST, Sharp TG, Terrill R, Sachs DH. Effect of class II antigen matching on renal allograft survival in miniature swine. *J Exp Med*. 1984 Nov 1;160(5):1495-508
- 171) Portmann B, Slapak GI, Gane E, Williams R; Pathology and biopsy diagnosis of the transplanted liver. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1995;79:277-90
- 172) Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol*. 2003 Oct 1;171(7):3426-34
- 173) Quill H. Anergy as a mechanism of peripheral T cell tolerance. *J Immunol*. 1996 Feb 15;156(4):1325-7. Review
- 174) Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns JP, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsickern L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nickleleit V, Randhawa P, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant*. 2003 Jun;3(6):708-14
- 175) Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant*. 2004 Oct;4(10):1562-6
- 176) Ramshaw HS, Crittenden RB, Dooner M, Peters SO, Rao SS, Quesenberry PJ. High levels of engraftment with a single infusion of bone marrow cells into normal unprepared mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1995 Dec;1(2):74-80
- 177) Raybiotech, Mouse IL-2 ELISA Kit user manual, www.raybiotech.com/manual/ELISA/ELM-IL2-001.pdf, 2004
- 178) Reiffers J, Bernard P, David B, Vezon G, Sarrat A, Marit G, Moulinier J, Broustet A. Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. *Exp Hematol*. 1986 May;14(4):312-5
- 179) Romagnani, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85:9
- 180) Roodnat JJ, Mulder PG, Zietse R, Rischen-Vos J, van Riemsdijk IC, IJzermans JN, Weimar W. Cholesterol as an independent predictor of outcome after renal transplantation. *Transplantation*. 2000 Apr 27;69(8):1704-10
- 181) Roodnat JJ, Zietse R, Mulder PG, Rischen-Vos J, van Gelder T, IJzermans JN, Weimar W. The vanishing importance of age in renal transplantation. *Transplantation*. 1999 Feb 27;67(4):576-80
- 182) Rothstein DM, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunol Rev*. 2003 Dec;196:85-108
- 183) Rubin RH. Overview: pathogenesis of fungal infections in the organ transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2002; 4 (Suppl 3): 12-17
- 184) Sachs DH. Transplantation tolerance. *Transplant Proc*. 1998 Aug;30(5):1627-9. Review
- 185) Sallusto, F, Langenkamp, A, Geginat, J, Lanzavecchia, A. Functional subsets of memory T

- cells identified by CCR7 expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 251:167
- 186) Sandner SE, Clarkson MR, Salama AD, Sanchez-Fueyo A, Domenig C, Habicht A, Najafian N, Yagita H, Azuma M, Turka LA, Sayegh MH. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. *J Immunol*. 2005 Mar 15;174(6):3408-15
 - 187) Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, Turka LA. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 1995; 181:1869
 - 188) Sayegh, MH, Turka, LA. The role of T cell costimulatory activation in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338:1813
 - 189) Schlitt HJ, Hundrieser J, Hisanaga M, Uthoff K, Karck M, Wahlers T, Wonigeit K, Pichlmayr R. Patterns of donor-type microchimerism after heart transplantation. *Lancet*. 1994 Jun 11;343(8911):1469-71
 - 190) Schmitz N, Dreger P, Suttorp M, Rohwedder EB, Haferlach T, Loffler H, Hunter A, Russell NH. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) *Blood*. 1995 Mar 15;85(6):1666-72
 - 191) Schneeberger S, Ninkovic M, Piza-Katzer H, Gabl M, Hussl H, Rieger M, Loescher W, Zelger B, Brandacher G, Ninkovic M, Bonatti H, Boesmueller C, Mark W, Margreiter R. Status 5 years after bilateral hand transplantation. *Am J Transplant*. 2006 Apr;6(4):834-41
 - 192) Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier BC, Chen L, Hartung HP, Weller M, Wiendl H. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2004 Oct;155(1-2):172-82
 - 193) Scott DM, Ehrmann IE, Ellis PS, Chandler PR, Simpson E. Why do some females reject males? The molecular basis for male-specific graft rejection. *J Mol Med*. 1997 Feb;75(2):103-14. Review
 - 194) Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, Hofler G, Guthann E, Korthauer U, Zlabinger G, Steinberger P, Pickl WF, Stockinger H, Knapp W, Stockl J. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J Immunol*. 2003 Apr 1;170(7):3637-44
 - 195) Seow YY, Alkari B, Dyer P, Riad H. Cold ischemia time, surgeon, time of day, and surgical complications. *Transplantation*. 2004 May 15;77(9):1386-9
 - 196) Sherman, LA, Chattopadhyay, S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:385
 - 197) Sharabi Y, Sachs DH, Sykes MT. Cell subsets resisting induction of mixed chimerism across various histocompatibility barriers. In: J Gergely, M Benczur, A Falus and GY Füst, Editors, *Progress in Immunology*. VIII, Springer-Verlag, Heidelberg (1992), pp. 801–805
 - 198) Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics*. 1994 Oct;23(3):704-6
 - 199) Shishido S, Asanuma H, Nakai H, Mori Y, Satoh H, Kamimaki I, Hataya H, Ikeda M, Honda M, Hasegawa A. The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Apr;14(4):1046-52
 - 200) Shizuru JA, Jerabek L, Edwards CT, Weissman IL. Transplantation of purified hematopoietic stem cells: requirements for overcoming the barriers of allogeneic engraftment. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1996 Feb;2(1):3-14
 - 201) Shizuru JA, Weissman IL, Kernoff R, Masek M, Scheffold YC. Purified hematopoietic stem cell grafts induce tolerance to alloantigens and can mediate positive and negative T cell selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 15;97(17):9555-60
 - 202) Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1989 Nov 1;74(6):1905-14

- 203) Singer JW, Charbord P, Keating A, Nemunaitis J, Raugi G, Wight TN, Lopez JA, Roth GJ, Dow LW, Fialkow PJ. Simian virus 40-transformed adherent cells from human long-term marrow cultures: cloned cell lines produce cells with stromal and hematopoietic characteristics. *Blood*. 1987 Aug;70(2):464-74
- 204) Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*. 1988 May 27;240(4856):1169-76
- 205) Smith KA, Gillis S, Baker PE, McKenzie D, Ruscetti FW. T-cell growth factor-mediated T-cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci*. 1979;332:423-32
- 206) Snover DC. General aspects of the pathology of rejection of kidney and liver in the early posttransplant period. *Transplant Proc*. 1993 Aug;25(4):2649-51
- 207) Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 1993 Aug;44(2):411-22
- 208) Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988 Jul 1;241(4861):58-62
- 209) Sprent J, Kishimoto H. The thymus and negative selection. *Immunol Rev*. 2002 Jul;185:126-35. Review
- 210) Sprent J, Webb SR. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr Opin Immunol*. 1995 Apr;7(2):196-205. Review
- 211) Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Zeevi A, Ramos H, Terasaki P, Rudert WA, Kocova M, Ricordi C, Ildstad S, et al. Chimerism and donor-specific nonreactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation. *Transplantation*. 1993 Jun;55(6):1272-7
- 212) Strome M, Stein J, Esclamado R, Hicks D, Lorenz RR, Braun W, Yetman R, Eliachar I, Mayes J. Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *N Engl J Med*. 2001 May 31;344(22):1676-9
- 213) Subudhi SK, Zhou P, Yerian LM, Chin RK, Lo JC, Anders RA, Sun Y, Chen L, Wang Y, Alegre ML, Fu YX. Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection. *J Clin Invest*. 2004 Mar;113(5):694-700
- 214) Sung RS, Althoen M, Howell TA, Ojo AO, Merion RM. Excess risk of renal allograft loss associated with cigarette smoking. *Transplantation*. 2001 Jun 27;71(12):1752-7
- 215) Suberbielle C, Caillat-Zucman S, Legendre C, Bodemer C, Noel LH, Kreis H, Bach JF. Peripheral microchimerism in long-term cadaveric-kidney allograft recipients. *Lancet*. 1994 Jun 11;343(8911):1468-9
- 216) Sykes M, Szot GL, Swenson KA, Pearson DA. Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):783-7
- 217) Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2631-9. Review
- 218) Tamura H, Dong H, Zhu G, Sica GL, Flies DB, Tamada K, Chen L. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood*. 2001 Mar 15;97(6):1809-16
- 219) Tavassoli M, Friedenstein A. Hemopoietic stromal microenvironment. *Am J Hematol*. 1983 Sep;15(2):195-203
- 220) Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med*. 1995 Aug 10; 333-6
- 221) Thalmeier K, Meissner P, Reisbach G, Hultner L, Mortensen BT, Brechtel A, Oostendorp RA, Dormer P. Constitutive and modulated cytokine expression in two permanent human bone marrow stromal cell lines. *Exp Hematol*. 1996 Jan;24(1):1-10
- 222) Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul

20;188(2):287-96

- 223) Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961 Feb;14:213-22
- 224) Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1964 Jan;51:29-36
- 225) Tomita Y, Sachs DH, Sykes M. Myelosuppressive conditioning is required to achieve engraftment of pluripotent stem cells contained in moderate doses of syngeneic bone marrow. *Blood.* 1994 Feb 15;83(4):939-48
- 226) Trivedi HL, Vanikar AV, Modi PR, Shah VR, Vakil JM, Trivedi VB, Khemchandani SI. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, mixed chimerism, and tolerance in living related donor renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2005 Mar;37(2):737-42
- 227) Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, Shalabi A, Shin T, Pardoll DM, Tsuchiya H. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 2001 Apr 2;193(7):839-46
- 228) Vaage JT, Naper C, Lovik G, Lambracht D, Rehm A, Hedrich HJ, Wonigeit K, Rolstad B. Control of rat natural killer cell-mediated allorecognition by a major histocompatibility complex region encoding nonclassical class I antigens. *J Exp Med.* 1994 Aug 1;180(2):641-51
- 229) Vallera DA, Taylor PA, Sprent J, Blazar BR. The role of host T cell subsets in bone marrow rejection directed to isolated major histocompatibility complex class I versus class II differences of bm1 and bm12 mutant mice. *Transplantation.* 1994 Jan;57(2):249-56
- 230) van Doren K, Gluzman Y. Efficient transformation of human fibroblasts by adenovirus-simian virus 40 recombinants. *Mol Cell Biol.* 1984 Aug;4(8):1653-6
- 231) van Es LA, Sijpkens YW, Paul LC. Surrogate markers of chronic allograft nephropathy. *Ann Transplant.* 2000;5(2):7-11
- 232) van Pel M, Hilbrands L, Smits D, van Breugel DW, van Eck M, Boog CJ. Permanent acceptance of both cardiac and skin allografts using a mild conditioning regimen for the induction of stable mixed chimerism in mice. *Transpl Immunol.* 2003 Jan-Mar;11(1):57-63
- 233) Vella, J, Knoflach, A, Waaga, A, Sayegh, M. T cell mediated immune responses in chronic allograft rejection: Role of indirect allorecognition and costimulatory pathways. *Graft* 1998; 1:S11
- 234) Vella JP, Magee C, Vos L, Womer K, Rennke H, Carpenter CB, Hancock W, Sayegh MH. Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation* 1999; 67:1523
- 235) Vibhakar R, Juan G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Finger LR. Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Exp Cell Res.* 1997 Apr 10;232(1):25-8
- 236) Vivier E, Daeron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today.* 1997 Jun;18(6):286-91
- 237) von Boehmer H. Positive selection of lymphocytes. *Cell.* 1994 Jan 28;76(2):219-28. Review
- 238) Walcheck, B, Moore, KL, McEver, RP, Kishimoto, TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J Clin Invest* 1996; 98:1081
- 239) Weiner RS, Richman CM, Yankee RA. Semicontinuous flow centrifugation for the pheresis of immunocompetent cells and stem cells. *Blood.* 1977 Mar;49(3):391-7
- 240) Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Lochmuller H, Melms A, Weller M. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J.* 2003 Oct;17(13):1892-4
- 241) Williams JM, Loertscher R, Cotner T, Reddish M, Shapiro HM, Carpenter CB, Strominger JL, Strom TB. Dual parameter flow cytometric analysis of DNA content, activation antigen expression, and T cell subset proliferation in the human mixed lymphocyte reaction. *J*

