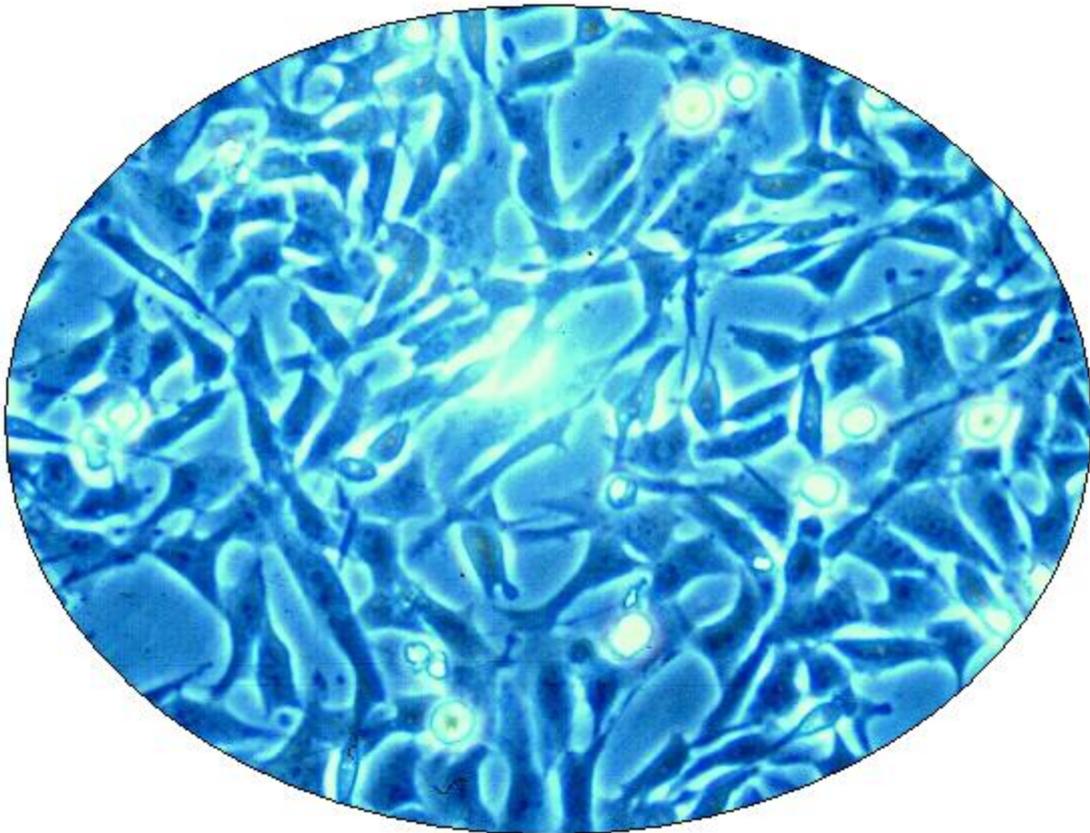


Einfluss von Immunsuppressiva auf das biologisch-immunologische Verhalten von Stammzellen in vitro



Uwe Sassen



Fakultät für Medizin

Einfluss von Immunsuppressiva auf das biologisch-immunologische Verhalten von Stammzellen in vitro

Uwe Andreas Sassen

Vollständiger Abdruck der von der
Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Manfred Stangl
2. Prof. Dr. Bernhard Holzmann

Die Dissertation wurde am 02.11.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 03.01.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite:
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung und Zielsetzung	7
1.1 Einführung	7
1.2 Stammzellen	7
1.2.1 Hämatopoetische Stammzellen	8
1.2.2 Quellen hämatopoetischer Stammzellen	10
1.2.3 In vitro Anreicherung von Stammzellen	11
1.2.4 CD34- Stammzellen und ihre Biologie	12
1.2.5 Der „Stammzell Zyklus“	14
1.2.6 Isolation von CD34- Stammzellen	16
1.2.7 Mesenchymale Stammzellen	17
1.3 Charakterisierung bestimmter Zelllinien	19
1.3.1 RM26	19
1.3.2 L87/4	20
1.4 Einsatz verschiedener Immunsuppressiva	21
1.4.1 ATG	21
1.4.2 Thymoglobulin und Lymphoglobulin	21
1.4.2.1 Lymphoglobulin	21
1.4.2.2 Thymoglobulin	22
1.4.3 Basiliximab	22
1.4.4 Ciclosporin A	23
1.4.5 Tacrolimus	23
1.5 Transplantation und Immunmechanismen	24
1.5.1 Transplantatabstoßung	25
1.5.2 Mechanismen der Transplantatabstoßung	26
1.5.3 T-Zellaktivierung	26

1.6 Die Kostimulatoren B7H1 und B7.1 und ihre Rolle bei der Immunantwort	27
1.6.1 B7H1	27
1.6.2 B7.1	28
1.7 Apoptose	29
1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	30
2. Material und Methode	32
2.1 Bezugsquellennachweis	32
2.1.1 Stammzellen	32
2.1.2 Cell-Counting-Kit-8®	32
2.1.3 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)®	32
2.1.4 Cell Death Detection ELISApus®	32
2.1.5 RNeasy Mini Kit 50®	33
2.1.6 DNA-free Kit	33
2.1.7 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	33
2.1.8 Geräte	36
2.1.9 Medikamente	37
2.1.10 Primer	39
2.2 Stammlösungen und Puffer	39
2.3 Untersuchungsverfahren und Arbeiten mit den Zellen	40
2.3.1 Splitting und Kultivierung der Zellen	40
2.3.2 Zellkonzentrationsbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	41
2.3.3 ELISA – <u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay	42
2.3.4 CCK8 - Cell Counting Kit-8	43
2.3.4.1 Allgemeine Information zu CCK8	
2.3.4.2 Lagerung des CCK8	44
2.3.4.3 Arbeitsprotokoll für den CCK8	44
2.3.4.4 Kontrollen	45

2.3.4.5	Probleme bei der quantitativen Auswertung der Zellzahlen	45
2.3.4.6	Festlegen einer geeigneten Zellzahl für die Untersuchung der Auswirkungen der Immunsuppressiva auf die verschiedenen Zelllinien	45
2.3.5	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	45
2.3.5.1	Allgemeine Information zum BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine)-Test	45
2.3.5.2	Vorbereiten der Arbeitslösungen	46
2.3.5.3	Kontrollen	47
2.3.5.4	Arbeitsprotokoll für den Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	48
2.3.5.5	Arbeitsprotokoll für DMSO-Hemmversuch	49
2.3.6	Auswirkungen der Immunsuppressiva auf das Apoptoseverhalten der Zellen mit Hilfe des Cell death Detection ELISA plus	50
2.3.6.1	Allgemeine Informationen zum Cell death Detection ELISA plus	50
2.3.6.2	Vorbereiten der Arbeitslösungen	51
2.3.6.3	Kontrollen	52
2.3.6.4	Arbeitsprotokoll zum Cell death Detection ELISA plus	52
2.4 Semiquantitative Untersuchung der Auswirkung von Immunsuppressiva auf das Expressionsgleichgewicht der kostimulatorischen Proteine B71 und B7H1		
2.4.1	Inkubation der Zellen und Zusetzen der Immunsuppressiva	54
2.4.2	RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit 50 von Quiagen und dem DNA-free Kit	55
2.4.3	cDNA-Synthese	56
2.4.4	Amplifikation der cDNA durch PCR	57
2.4.5	Gelelektrophorese und Darstellung der DNA-Fragmente	58
2.5 Festlegen der therapeutischen Konzentration der Immunsuppressiva		
		59

3. Ergebnisse	61
3.1 Etablierung geeigneter Ausgangsbedingungen der Experimente	61
3.2 Apoptoseverhalten bei verschiedenen Konzentrationen an Immunsuppressiva	75
3.3 Proliferationsverhalten bei verschiedenen Konzentrationen an Immunsuppressiva	94
3.4 Exprimierung von B7.1 und B7H1	105
4. Diskussion	114
4.1 Etablierung der Ausgangsbedingungen	114
4.2 Auswirkungen der Immunsuppressiva auf das Apoptoseverhalten der Stammzellen	115
4.3 Auswirkungen der Immunsuppressiva auf das Proliferationsverhalten der Stammzellen	118
4.4 Auswirkungen der Immunsuppressiva auf die Exprimierung von B7.1 und B7H1	120
5. Zusammenfassung	121
6. Literaturverzeichnis	122

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonicacid)
APC	antigen presenting cell
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BRDU	5-bromo-2'-deoxyuridine
CASPASE 3	cysteine-aspartic acid protease 3
CCK8	Cell Counting Kit-8
CD	Cluster of differentiation
CDNA	komplementäre DNA (DNA-Kopie der RNA)
CFU	colony forming units
CFU-GM	colony-forming units granulocyte macrophage
CYC	Cyclophilin
DMSO	Dimethylsulphoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FKBP	FK506-binding protein
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GVHD	graft-versus-host-disease
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPP-CFC	high proliferative potential colony-forming cells
HSC	hematopoietic stem cells
IL-6	Interleukin 6
KDR	kinase insert domain-containing receptor (auch bekannt als „vascular endothelial growth factor receptor 2“, VEGFR2)

M	Mol
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
MP	Mikrotiterplatte
MNC	mononuclear cells
MPTP	mitochondrial permeability transition pores
MRNA	messenger Ribonucleic acid
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NOD/SCID	nonobese-diabetic severe combined immunodeficiency
PBS	Phosphat gepuffertes Salz
PBMNC	peripheral blood mononuclear cells
PBSC	Peripheral blood stem cells
PD1	programmed death 1
PDL1	programmed death ligand 1
PMS	phenazinium methylsulfate
POD	Peroxidase
RNA	Ribonucleic acid
RPM	Rounds per minute
SCA-1	Stammzellantigen-1
SCF	stem cell factor
SCID	severe combined immunodeficiency
SRC	severe combined immunodeficiency repopulating cells
TAQ	Thermus aquaticus DNA-Polymerase
THY-1	Thymocyte differentiation antigen-1
TMB	Tetramethyl-Benzidin
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4- nitrophenyl)-5-(2,4-disulfohenyl)-2H- tetrazolium, monosodium salt

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einführung

Die Stammzellforschung ist ein breites und kontrovers diskutiertes Forschungsgebiet, das in vielen Bereichen noch in den Kinderschuhen steckt. Um das Potential der Stammzellen sinnvoll nutzen zu können, ist es wichtig, ihr Verhalten auf bestimmte Umwelteinflüsse zu kennen bzw. zu studieren.

1.2 Stammzellen

Bis heute ist der Begriff der „Stammzelle“ nicht klar und allgemein anerkannt definiert. Es gibt viele Auffassungen und Sichtweisen über Natur und Eigenschaften, die eine Stammzelle ausmachen. Nach Definition des National Institutes of Health „unterscheiden sich Stammzellen von anderen Zellen im Körper. Alle Stammzellen, unabhängig von ihrer Herkunft, haben drei generelle Eigenschaften:

- I) Sie sind fähig, sich über einen langen Zeitraum zu teilen und sich selbst zu erneuern.
- II) Sie sind nicht spezialisiert.
- III) Sie können zu spezialisierten Zellarten führen [109].

Asymmetrische Teilung

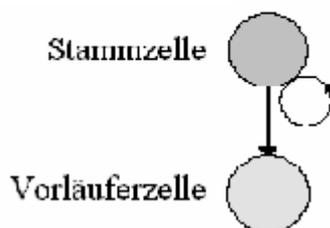


Abbildung 1.1:

Selbsterneuerung durch asymmetrische Teilung: Eine Tochterzelle ist eine Kopie des Originals, die andere eine bereits differenziertere Zelle, die oft als Vorläuferzelle bezeichnet wird (nach [119]).

Vor allem die ersten beiden Punkte werden von führenden Wissenschaftlern sehr kontrovers diskutiert [119, 120]. Bedingt durch unterschiedliche Definitionen lassen sich Stammzellen schwer einteilen. Zwei Hauptgruppen stellen die adulten Stammzellen und

die embryonalen Stammzellen dar. Adulte Stammzellen, wozu auch die hämatopoetischen und die mesenchymalen Stammzellen gehören, lassen sich während des gesamten Lebens in mehrzelligen Organismen nachweisen und isolieren. Dagegen sind embryonale Stammzellen nur während der Blastomeren- und Blastozystenphase isolierbar.

1.2.1 Hämatopoetische Stammzellen

Bereits 1961 fanden Till und McCulloch heraus, dass in der Milz jede Milzkolonie von einer einzelnen klonogenen Vorläuferzelle abgeleitet ist, die dazu befähigt ist Zellen aller Zelllinien zu bilden. Diese aus der Milz gewonnenen, hämatopoetischen Stammzellen (HSC) konnten dazu benutzt werden, bestrahlungsbedingte, hämatopoetische Schäden bei Mäusen zu beheben [168]. Dies führte dazu, dass HSC zu dieser Zeit definiert waren als A) zur Radioprotektion befähigt, B) fähig, Zellen aller hämatopoetischen Zelllinien zu entwickeln und C) fähig zur Selbsterneuerung. Bald wurde klar, dass nur ein kleiner Teil, der aus dem Knochenmark und der Milz gewonnenen Zellen, HSC sind [10,144]. Man fing daher an, hämatopoetische Zellen anhand ihrer Größe, Dichte und der Expression zellulärer Oberflächenmarker zu differenzieren [148, 151, 150, 175, 176]. So wurden HSC zuerst bei der Maus definiert. Neben der geforderten Expression bestimmter Oberflächenmarker (z.B. des Thy-1 Markers (Thy-1^{low})), durfte kein Marker einer bestimmten hämatopoetischen Zelllinie exprimiert werden (lin-) [150, 108, 160]. Diese Definition wurde später auf den menschlichen Organismus übertragen, in dem die HSC gegenwärtig als CD34+DR-lin- definiert ist [129]. DR gehört zu den Klasse II-Antigenen der Human Leucocyte Antigenes, kurz HLA. CD34 ist ein transmembranöses Zelloberflächen-Sialomucin, das auf hämatopoetischen Vorläuferzellen [30, 79, 5, 159] und auf Gefäßendothelzellen exprimiert wird [40, 9]. Das CD34 Antigen ist weitgehend auf den pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert, nicht aber auf den neoplastischen Zellen von Patienten mit NHL, Myelom und den meisten soliden Tumoren. Es ist allerdings immer noch unklar, ob die frühest zu identifizierende HSC DR- oder DR+ ist [152]. *Huang und Terstappen* berichteten, dass eine CD34+DR- pluripotente Stammzelle sowohl zu einer CD34+DR+lin- HSC führen kann als auch zu einer gemischten Population, die CD34+DR+lin- HSC und DR- Elemente im Stroma enthält [59]. Trotzdem scheint die Expression von DR auf einer HSC einer der ersten Schritte der hämatopoetischen Differenzierung zu sein [60, 127]. Eine DR+ HSC ist immer noch dazu

im Stande, Zellen aller Zelllinien zu entwickeln und daher immer noch als echte Stammzelle anzunehmen [61]. Dies wurde bestätigt durch *Srouf et al.*, die berichteten, dass CD34+DR+ Knochenmarkzellen zu weiter differenzierten Vorläuferzellen führen, obwohl hauptsächlich potentiell hochproliferative, koloniebildende Zellen (high proliferative potential colony-forming cells (HPP-CFC)) in den CD34+DR+ Vorläuferzellen enthalten sind [153]. Die HPP-CFC konnten durch Selektion von c-Kit+ Zellen, die den Rezeptor für Stammzellfaktor exprimieren (SCF), weiter angereichert werden [19]. Obwohl gezeigt wurde, dass hämatopoetische Vorläuferzellen klonalen Ursprungs sind, bleibt es immer noch kontrovers, ob es eine absolute Stammzelle gibt, die mit jedem Zellzyklus („Spermatozytenmodell“) eine Selbsterneuerung durchmacht, oder ob die Zahl der HSC limitiert ist und daraufhin die Reifung zur hämatopoetischen Vorläuferzelle folgt („Oozytenmodell“).

Die Definition von HSC wurde ausgeweitet auf in vivo Modelle, bei denen verschiedene Knochenmarkzellen zuvor myeloablativ bestrahlten Mäusen transplantiert wurden, um das Knochenmark zu rekonstituieren. Eine Knochenmarktransplantation von zuvor erfolgreich transplantierten Mäusen, die nun als Spender dienten, sollte eine zweite Generation von Mäusen rekonstituieren. Die Zellen, die für eine dauerhafte Knochenmarkrestitution verantwortlich sind, wurden als „severe combined immunodeficiency (SCID)-repopulating cells“ (SRC) bezeichnet und auch in vitro als „long-term culture-initiating cells“ definiert [58, 85]. Die Differenzierungsstufe und Reifungsstufe einer HSC und der hämatopoetischen Vorläuferzelle definiert auch deren Reaktion auf Wachstumsfaktoren. Dies ist wichtig für die in vivo und ex vivo Anreicherung von HSC (siehe unten). Die Differenzierung einer pluripotenten Stammzelle zu einer sich differenzierenden oder sogar reifen Blutzelle unterliegt der Antwort auf eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren [56, 107], von denen SCF (c-Kit Ligand) eine außerordentliche Rolle spielt [178, 183]. SCF wird hauptsächlich von Stromazellen des Knochenmarks produziert [27, 65] und HSC exprimieren den SCF-Rezeptor [70, 114], eine Tyrosinkinase, die c-Kit genannt wird [24, 180]. SCF selbst spielt eine wichtige Rolle beim Überleben der HSC in Bezug auf die Selbsterneuerung und als ein Komitogen bei der Bewegung der HSC aus dem HSC-Pool in den Vorläuferzellpool [4, 41]. HSC zeigen für gewöhnlich kaum eine Antwort auf einzeln gegebene Zytokine (sogar SCF alleine scheint dauerhaftes Überleben nur bei HSC zu gewährleisten, die nicht vom Zellverbund getrennt sind) [102]. Allerdings führt der Zusatz von anderen Wachstumsfaktoren in einer zweifachen, dreifachen oder multiplen Kombination zu determinierten Vorläuferzellen [110]. Die Verabreichung von SCF in

Kombination mit Interleukin 1 (IL-1), IL-3 oder IL-6 verursacht einen signifikant erhöhten Anteil von HSC, der in Richtung der myeloiden oder hämatoiden Zelllinien proliferiert; der Zusatz von G-CSF, GM-CSF oder macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) führt hauptsächlich zu HSC, die sich zu myeloiden Vorläuferzellen differenzieren [12]. Eine der effektivsten Kombinationen in vitro war die Behandlung von CD34+ Zellen mit sechs Wachstumsfaktoren (IL-1, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF, und SCF) [99].

1.2.2 Quellen hämatopoetischer Stammzellen

Die Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen ist prinzipiell aus verschiedenen Quellen des Organismus möglich. Traditionell werden Stammzelltransplantationen durchgeführt, indem man eine nicht manipulierte, komplette Mischung von Knochenmarkzellen infundiert [166, 165, 32]. Die Knochenmarksuspension enthält ein komplexes, heterogenes Zellgemisch, einschließlich der Haupt-Population der HSC. Mit sinkender Übereinstimmung von Spender und Empfänger bei einer allogenen Transplantation zeigen sich verschiedene Nebenwirkungen, wie die einer graft-versus-host-disease (GVHD). Aus diesem Grund wurden und werden verschiedene Methoden entwickelt, um das Zellgemisch von störenden Elementen zu reinigen [82, 136, 3, 43] bzw. um eine positive Selektion von Zellen mit der dauerhaften Fähigkeit zur Repopulation [8] zu erreichen. Bei Menschen sind diese Zellen immer noch als CD34+lin- definiert und haben eine hohe Wahrscheinlichkeit, frei von maligner Kontamination bei Autotransplantaten zu sein.

Eine andere Methode stellt die Anreicherung von Stammzellen aus dem peripheren Blut (Peripheral blood stem cells (PBSC)) dar. Obwohl Knochenmark den höchsten Anteil an CD34+ mononuclear cells (MNC) pro ml hat, kann man durch Mobilisation mit Chemotherapie und Wachstumsfaktoren eine noch größere Menge an CD34+ Zellen im peripheren Blut anreichern. Die große Menge an peripherem Blut, die während der Apherese verarbeitet werden kann, führt zu diesem guten Ergebnis [11]. Dass peripheres Blut dazu benutzt werden kann, myeloablativ bestrahlte Lebewesen zu rekonstituieren, wurde ursprünglich an der Ratte und später am Hund gezeigt [17, 155]. Nicht mobilisiertes Blut enthält einen sehr geringen Prozentsatz an CD34+ MNC (annähernd 0,15%). Die Mobilisation mit einer kurzen Chemotherapie und zusätzlicher Wachstumsfaktorbehandlung steigert jedoch den Prozentsatz an CD34+ Zellen [11, 77,

94, 22, 143]. Ein weiterer Vorteil der Verwendung peripheren Blutes besteht darin, dass es weniger wahrscheinlich maligne kontaminierte Zellen beinhaltet als Knochenmark [86, 141]. Bei der Isolation von PBSC wird angenommen, dass MNC aus peripherem Blut HSC enthalten. Es wurde gezeigt, dass während der Leukopherese gesammelte MNC colony-forming units granulocyte macrophage (CFU-GM) und CD34+ Zellen enthalten [100, 133].

Auch fetale Leber und Nabelschnurblut kann als Quelle für Stammzellen genutzt werden. Während der fetalen Entwicklung ist die Leber physiologischerweise Teil des hämatopoetischen Gewebes. Vom zweiten bis siebten Monat der Schwangerschaft und idealerweise vor Beginn der Lymphopoese kann die fetale Leber zur Transplantation genutzt werden. Wie klinisch bei Kindern mit angeborener Immundefizienz gezeigt, können die Zellen der fetalen Leber erfolgreich sowohl das hämatopoetische als auch das lymphatische System wiederherstellen [113, 171]. Während hämatopoetischer Ontogenese und perinatalem Wechsel der Lokalisation der Hämatopoese erreichen die HSC das Blut und zirkulieren. Der Vorteil des Nabelschnurblutes besteht darin, dass es zum Zeitpunkt der Geburt ohne Beeinträchtigung des Fetus oder der Mutter gesammelt und konserviert werden kann. Es wurde gezeigt, dass mit verbesserter Technik bis zu 200 ml Nabelschnurblut gewonnen werden kann, das bis zu 4×10^6 myeloide Vorläuferzellen enthält [54].

1.2.3 In vitro Anreicherung von Stammzellen

Die Anreicherung von hämatopoetischen Vorläuferzellen wird benutzt, um ein Standard-Autotransplantat zu ergänzen. Durch diese Technik stellt man mehr reife und funktionelle neutrophile Zellen zu Verfügung, was den Zeitraum der Neutropenie und die in vivo Verabreichung von Wachstumsfaktoren senken soll [20]. Kombinationen von Wachstumsfaktoren können in 7 Tagen die CFU-GM Produktion in vitro auf das 20- bis 200-fache steigern [139]. Die Induktion von Differenzierung ist auch in Verbindung mit Gentransfer-Experimenten von Interesse. Dies könnte nicht nur die Transduktionseffektivität steigern, sondern auch anhaltende Serumlevels an genetisch transferierten Konstrukten bereitstellen. Auf der anderen Seite kann Differenzierung auch ein Problem darstellen, da echte Stammzellen in vitro aufwendig gepflegt werden müssen.

Dies könnte durch den Gebrauch von vorübergehend immortalisierten CD34- HSC gelöst werden (siehe Abschnitt 1.2.4).

1.2.4 CD34- Stammzellen und ihre Biologie (in den folgenden Abschnitten 1.2.4 bis 1.2.7 werden die Ergebnisse aus [129] verwendet und zusammengefasst)

Während der Ontogenese beginnt die Hämatopoese im Dottersack, wechselt dann zur Milz und Leber und schließlich zur Knochenmarkshöhle. Im Knochenmark hängt die Differenzierung und Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen (HSC) generell von einem intakten „Mikromilieu“ ab. Die Richtung der Differenzierung ist durch verschiedene Parameter wie Konzentration und Zusammensetzung der interagierenden Wachstumsfaktoren festgelegt [162, 91]. Man nimmt an, dass Stromazellen die Hauptquelle dieser Wachstumsfaktoren sind und auch mit HSC auf einem interzellulären Level interagieren [37]. Sowohl HSC als auch Stromazellen leiten sich aus dem Mesoderm ab und werden als zwei verschiedene Zellarten betrachtet. Nichts desto trotz beschreiben *Singer et al.* adhärente, gemeinsame Vorläufer für stromale und hämatopoetische Zellen [146, 147]. *Huang und Terstappen* schlugen vor, dass eine einzelne fetale CD34+DR-CD38- Stammzelle sich zu stromalen Elementen und zu Zellen mit hämatopoetischen Eigenschaften differenziert [59, 60]. Die Trennung zwischen „Stromazelle“ und „Stammzelle“ ließ zum ersten Mal die Diskussion über den Phänotyp der frühesten HSC-Population aufkommen. Über viele Jahre dachte man, dass Stromazellen CD34- sind, während sogar in der Ruhephase befindliche Stammzellen zumindest niedrige Level an CD34 Antigen exprimieren. Inzwischen zeigten verschiedene Forschungsgruppen in Tiermodellen, bei denen aus Knochenmark gewonnene HSC benutzt wurden, unabhängig voneinander, dass hämatopoetische Rekonstitution mit CD34- Zellen möglich ist [181, 13, 140, 115, 104]. Trotzdem bleibt dieses Thema kontrovers. Andere Forschungsgruppen fanden heraus, dass hämatopoetische Rekonstitution immer noch CD34+ Zellen benötigt, während CD34- Zellen die Repopulation im Rahmen der nonobese-diabetic severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) erleichtern [84]. Trotzdem können aus Knochenmark-Stroma gewonnene, fibroblastenartige, CD34- Zellen zu CD34+ Zellen mit hämatopoetischen Eigenschaften in Bezug auf Koloniebildung und Einleitung einer Langzeitkultur [66] führen. Diese HSC können durch verschiedene Wachstumsfaktoren oder Kulturbedingungen sowohl in

Richtung Differenzierung als auch in Richtung Proliferation geleitet werden: Während der Ligand für den Tyrosinkinase-Rezeptor c-Kit, der stem cell factor (SCF), eine Differenzierung in Richtung einer determinierten hämatopoetischen Vorläuferzelle induziert [62], begünstigt IL-6 eher die Proliferation von CD34-, adhärent wachsenden HSC. IL-6 ist auch fähig, den Übergang von fibroblastenartigen, adhärent wachsenden CD34- HSC zu mehr determinierten CD34- HSC umzukehren. Dadurch findet sich eine Möglichkeit, aus menschlichen peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) CD34-, adhärent wachsende Zellen [64] zu generieren. Diese fibroblastenartigen Zellen können spontan wieder zu CD34+, nicht adhären Zellen differenzieren, was allerdings von der autokrinen und parakrinen Produktion von SCF abhängig ist [68]. CD34- HSC wurden auch aus kleinen Mengen peripherer Blutzellen von Mäusen isoliert und nach der Immortalisierung, bei der ein retroviraler Vektor benutzt wurde, der ein SV-40 large T-Antigen enthält, geklont. Empfängermause wurden nach myeloablativer Bestrahlung mit einem einzigen Stammzellklon erfolgreich transplantiert [87]. Dieser CD34-Stammzellklon zeigte eine fibroblastenartige Morphologie und der Phänotyp enthüllte eine Koexpression von Stammzellantigen-1 (Sca-1) und c-Kit (CD117). Auch Thymocyte differentiation antigen-1 (Thy-1 bzw. CD90) wurde auf einem niedrigen Level exprimiert. All diese Oberflächenproteine gelten als Stammzellmarker. Diese Experimente zeigten, dass CD34- HSC zwar die Morphologie von stromaartigen Zellen zeigen, dieser Phänotyp aber eine echte HSC darstellt. Beim Gebrauch von CD34- HSC-Klonen zur hämatopoetischen Rekonstitution, stellte man fest, dass die zusätzliche Behandlung mit Wachstumsfaktoren die hämatopoetische Erholung nicht beschleunigt. Man nimmt an, dass die notwendigen Faktoren dieser Zellen in autokriner und parakriner Weise produziert werden [163]. Die Analyse von Knochenmarkbiopsien von Empfängermausen zeigte, dass transplantierte Zellen mit dem bekannten Phänotyp und der fibroblastenartigen Morphologie als knochenumkleidende Zellen entlang der Knochenpikula im Knochenmark lokalisiert waren. Dies wird gewöhnlich als die Nische für osteoblastische Zellen betrachtet. Es wurden auch menschliche, aus dem Knochenmarkstroma gewonnene, CD34-, fibroblastenartige Zellen auf ihr Potential hin analysiert, sich zu hämatopoetischen Vorläufern zu differenzieren. Diese Zellen produzierten colony forming units (CFU) und wurden NOD/SCID Mäusen transplantiert. Die Zellen produzierten auch c-Kit (CD117) und mesenchymale Marker wie Osteocalcin. Abbildung 1 zeigt den möglichen horizontalen Wandel zwischen einer gemeinhin bekannten „Stromazelle“, einer in Ruhephase befindlichen Stammzelle und einer aktiven

Stammzelle. Aus dem Stroma gewonnene Wachstumsfaktoren beeinflussen die aktive Stammzelle ebenso wie die mehr determinierte HSC und die mesenchymale Stammzelle.

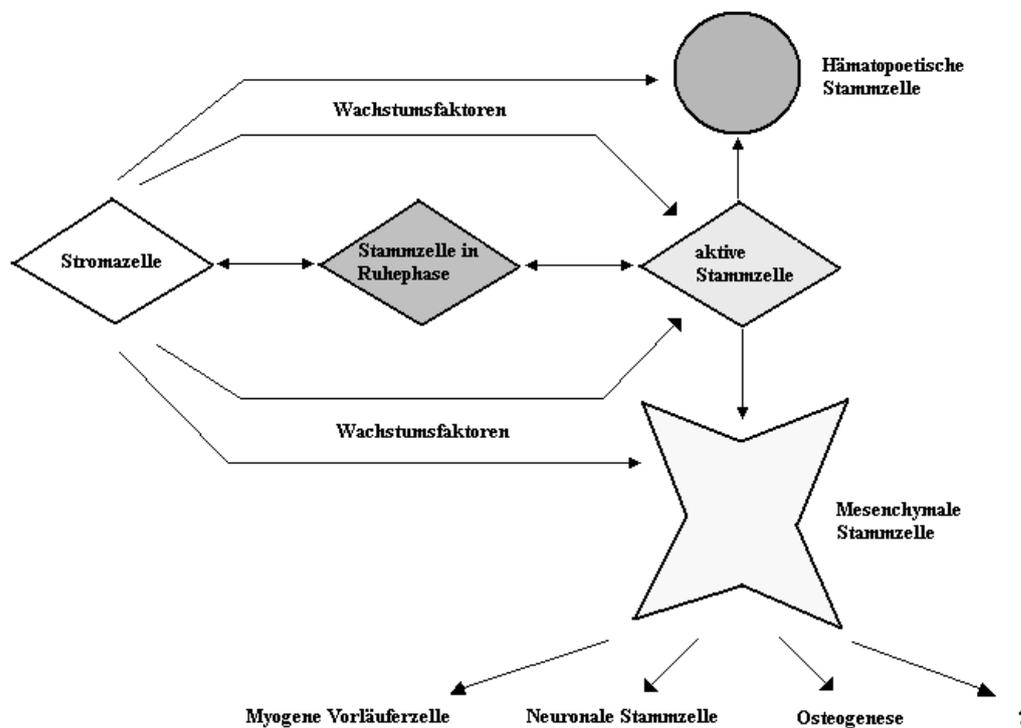


Abbildung 1.2 (nach[129]):

Verschiedene funktionelle Stadien von fibroblastenartigen, CD34- Stammzellen im Knochenmark "Mikromilieu". Die stromalen Knochenmarkelemente bestehen aus "Stromazellen", die notwendige Wachstumsfaktoren produzieren, um die Aktivierung, die Proliferation und die Differenzierung von ansprechenden Stammzellen zu fördern. Die Mehrheit der Stammzellen befindet sich in einer Ruhephase und spricht nicht auf die externen Signale an [63]. Eine kleine Zahl von Stammzellen ist aktiv und kann auf die parakrin produzierten Wachstumsfaktoren ansprechen. Diese aktive Stammzelle kann in eine mehr determinierte CD34+ HSC oder sogar in eine mesenchymale Stammzelle, die spezifischeres Gewebe generiert, differenzieren.

1.2.5 Der „Stammzell Zyklus“

Monoklonale CD34- Stammzelllinien sind dazu fähig, alle hämatopoetischen Zelllinien zu rekonstituieren [87]. Bei intravenösen Transfusionen mit CD34-, fibroblastenartigen Stammzellen war die hämatopoetische Erholung der Empfängermäuse nach myeloablativer, totaler Körperbestrahlung in keinsten Weise verzögert. Dies lässt vermuten, dass zirkulierende Stammzellen sogar anfangs zu ihrem Platz im Knochenmark „Mikromilieu“ zurückkehren, bevor sie zu determinierten hämatopoetischen Vorläuferzellen differenzieren. *Huss et al.* konnten zeigen, dass CD34-, fibroblastenartige HSC eine hämatopoetische Pluripotenz beinhalten und eine gewisse Menge dieser Zellen im peripheren Blut zirkuliert. Sie können stets zu ihrer Ansiedlungsumgebung im

Knochenmarkstroma zurückkehren. *Huss et al.* nennen das den „Stammzellzyklus“ [69]. Der „Stammzellzyklus“ definiert die Zirkulation von CD34- Stammzellen, die im Knochenmarkmikromilieu verharren, bis sie sich eventuell differenzieren und im peripheren Blut zirkulieren. Dennoch können zirkulierende CD34+ Zellen zum Knochenmark zurückkehren und die CD34-Expression einstellen, während sie als fibroblastenartige Zellen wachsen. Wenn man immortalisierte CD34- Stammzellen nutzt, können die Klone dazu verwendet werden, am „Stammzellzyklus“ teilzunehmen und eine komplette hämatopoetische Rekonstitution mit genetisch modifizierten Stammzellen zu erreichen (Abbildung 1.3).

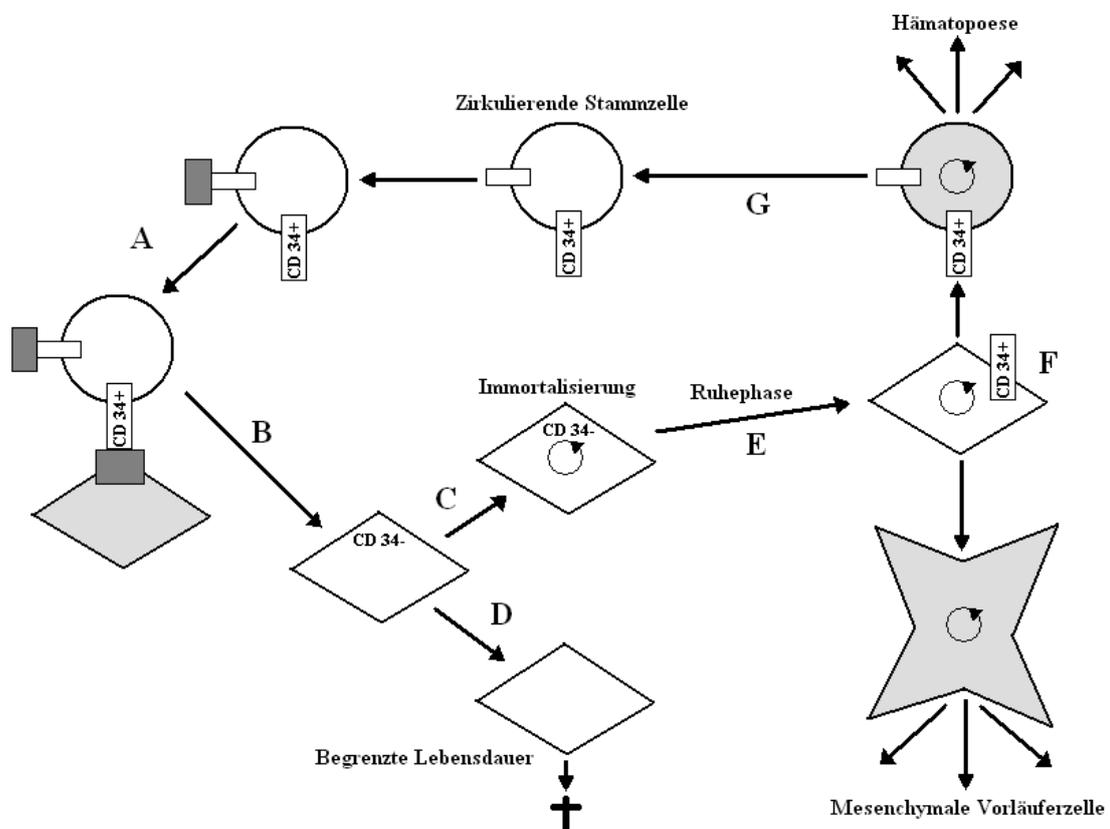


Abbildung 1.3 (nach[129]):

„Stammzellzyklus“ von genetisch modifizierten (immortalisierten) Stammzellen: zirkulierende Stammzellen exprimieren charakteristische Oberflächenantigene und -Rezeptoren, die wahrscheinlich lösliche Zytokine binden. Diese Zytokine initiieren das „homing“ der CD34- Stammzellen. A) Zirkulierende CD34+ Stammzellen „homen“ zur Knochenmarkhöhle und interagieren mit Zellen des Knochenmarkmikromilieus. B) „homende“ Stammzellen nehmen wieder ein Ruhestadium und eine fibroblastenartige Morphologie im Knochenmarkmikromilieu auf. Die fibroblastenartigen Zellen exprimieren kein CD34 Antigen. C) Die ruhenden Stammzellen können mit Hilfe von geeigneten Vektorsystemen immortalisiert werden [87, 131]. D) Während der Ruhephase sind sogar immortalisierte Zellen refraktär gegenüber externen Signalen wie Wachstumsfaktoren oder parakrin produzierter Zytokine. Nicht immortalisierte Stammzellen haben in vitro eine begrenzte Lebensdauer, vermutlich auf Grund eines nicht geeigneten Milieus. E) Nachdem die Stammzellen durch die Ruhephase gegangen sind, können sie auf Differenzierungssignale ansprechen. Immortalisierte und angereicherte Stammzellen können zur Differenzierung in hämatopoetische Vorläuferzellen oder mesenchymalen Vorläuferzellen gebracht werden. F) Aktive Stammzelle. G) zirkulierende Stammzelle im peripheren Blut.

Allerdings tritt hämatopoetische Rekonstitution nicht in linearer Art und Weise in Erscheinung. Wie in Rekonstitutionsexperimenten am Tier gezeigt wurde, erscheint die Folgegeneration der transplantierten Zellen in der Peripherie nur zeitweise. Manchmal sind die transplantierten Zellen in der Peripherie präsent und verschwinden dann wieder, bevor sie etwas später wieder auftauchen. *Morely et al.* bezeichneten das als „oscillatory nature of hematopoiesis“ [105] und postulierten eine „Knochenmarktransitzeit“ für Stammzellen im Stammzellzyklus. Die „Knochenmarktransitzeit“ ist abhängig von einer Ruhephase in der CD34- Stammzellpopulation. Der weitaus größte Anteil der CD34- Stammzellen ist in der Ruhephase während sie im Knochenmarkmikromilieu verweilen. Diese Ruhephase wird durch Zellzyklus assoziierte Regulationsmechanismen und die fehlende Aktivierung von Signaltransduktionswegen vermittelt [63]. Andere Möglichkeiten, um einen Ruhestatus aufrecht zu erhalten, beinhalten verminderte Exprimierung von Wachstumsfaktorrezeptoren. Der Mechanismus der Ruhephase der Mehrheit der HSC im Knochenmarkpool ist ein effizienter Mechanismus, um einen lebenslangen Pool an hämatopoetischen Vorläuferzellen bereitzustellen.

1.2.6 Isolation von CD34- Stammzellen [129]

Wenn man den Vorteil des geforderten Stammzellzyklus und die „homing“-Fähigkeiten der zirkulierenden Stammzellen ausnutzt, können CD34-, fibroblastenartige Vorläuferzellen aus peripherem Blut durch Zytokin vermittelte Adhäsion an die Plastikoberfläche von Zellkulturflaschen isoliert werden. Ein Wachstumsfaktor, der das adhärente Wachstum vereinfacht und die fibroblastenartige Morphologie bewahrt, ist IL-6. Dieser Faktor ist ein starker Induktor der Proliferation CD34- Stammzellen und verhindert darüber hinaus eine Differenzierung in mehr determinierte hämatopoetische Vorläuferzellen [66, 67]. Obwohl es möglich ist, fibroblastenartige Zellen aus kleinen Mengen von PBMNC *in vitro* zu etablieren [64], gibt es eine kritische Zelldichte pro well oder Flasche, die vorhanden sein muss, um die notwendige Zell-Zell-Interaktion und eine ausreichende Konzentration an parakrinen Wachstumsfaktoren bereit zu stellen. Die fibroblastenartigen Zellen produzieren ein breites Spektrum an Wachstumsfaktoren, was für Knochenmarkstromazellen gezeigt wurde [163]. Die Lebensdauer von CD34-, fibroblastenartigen Zellen *in vitro* ist begrenzt. Allerdings können diese Zellen auf

verschiedene Art und Weise immortalisiert [146] und Zellklone etabliert werden [87]. Man kann diese Klone in Bezug auf funktionelle Eigenschaften und ihre Fähigkeiten, eine langzeitliche hämatopoetische Rekonstitution zu erreichen, untersuchen. Der Gebrauch von einzelnen Klonen zur Transplantation behindert bei Tieren offensichtlich nicht eine komplette hämatopoetische Rekonstitution [87]. Fibroblastenartige, CD34- Stammzellen können fast unbegrenzt angereichert werden, wobei zuerst ein unreifes Level der Differenzierung aufrechterhalten wird. CD34-, fibroblastenartige Vorläuferzellen können sowohl aus Knochenmark als auch aus peripherem Blut [64, 87] isoliert werden.

1.2.7 Mesenchymale Stammzellen [129]

Gegenstand aktueller Forschungen sind gemeinsame Vorläuferzellen des Knochenmarkmikromilieus und der Hämatopoese [81, 145]. Es gibt zunehmend Beweise, dass es ruhende oder in der Ruhephase befindliche CD34- HSC zwischen anderen fibroblastenartigen Zellen gibt, die als Hilfszellen dienen und notwendige Wachstumsfaktoren und sogar Zell-Zell-Kontakte liefern, um das empfindliche Gleichgewicht von Differenzierung und Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen in Balance zu halten [69]. Zusätzlich zeigt sich, dass so genannte „mesenchymale Stammzellen“ eigentlich das Knochenmarkstroma rekonstituieren und determinierte Vorläuferzellen in die Zirkulation entlassen [137], um im Wesentlichen am „Stammzellzyklus“ teilzunehmen. Allerdings sind mesenchymale Stammzellen Vorläuferzellen von anderen mesenchymalen Organsystemen, wie Chondrozyten, Osteoblasten und Myeloblasten [124]. CD34-, mesenchymale Stammzellen sind offensichtlich in der Lage, spezifisches Gewebe wie Endothelzellen und sogar Kardiomyozyten zu erzeugen [97]. Da frühe hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen das CD34 Antigen nicht exprimieren, wurden große Bemühungen unternommen, neue Marker für diesen Zelltyp zu identifizieren. *Ziegler et. al.* entdeckten den „kinase insert domain-containing receptor“, kurz KDR-Rezeptor auf CD34- HSC [182], da sie bei diesen auch das Potential zur Neoangiogenese vermuteten. Offensichtlich gibt es eine gemeinsame Vorläuferzelle von CD34- hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen. Dieser Zelltyp kann zur Bildung verschiedener spezifischer Gewebe führen (Abbildung 1.4), abhängig von Wachstumsfaktor vermittelten Signalen und einer internen Signalkontrolle.

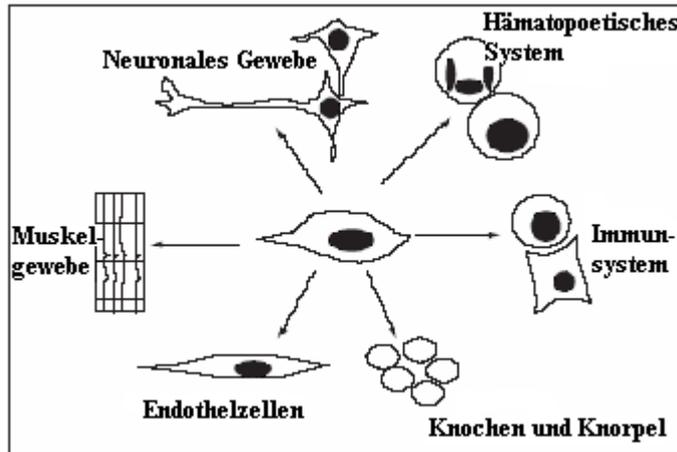


Abbildung 1.4 (nach[129]):

Verwendung von omnipotenten Stammzellen zur Erzeugung von individuell gestalteten Autotransplantaten. CD34-, fibroblastenartige Zellen können die Quelle für verschiedenste, spezifische Gewebe und sogar Organsysteme sein. CD34- Stammzellen können aus kleinen Mengen von PBMNC gewonnen werden.

Wenn man auch die neuen Vektorsysteme für in der Ruhephase befindliche Zellen nutzt [131], können CD34-, hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen sehr effizient für Zell- und Gentherapie mit einem breiten Verwendungsspektrum eingesetzt werden.

1.3 Charakterisierung bestimmter Zelllinien

1.3.1 RM26

Die verwendeten Zellen RM26 entsprechen Zellklonen, die von *Huss et. al.* aus dem peripheren Blut von Mäusen isoliert, geklont und charakterisiert wurden [128]. Auf Grund ihres mesenchymalen Ko-Phänotyps gehören sie zu den sog. „adulten Stammzellen“ [164], was durch das Erreichen einer hämatopoetischen Rekonstitution bei syngenen Mäusen bewiesen werden konnte [87]. Die Zellklone sind CD34- und exprimieren keinerlei zelllinienspezifische Marker *in vitro* (lin-), jedoch das Sca-1 Antigen (Sca-1+), das bei gewissen Mäusestämmen Stammzellen identifiziert. Weiter wurden sie mit Hilfe des SV40 large-T antigen immortalisiert, was keinerlei Auswirkung hatte auf ihre Pluripotenz und ihre Fähigkeit, sich in viele Zelllinienarten zu differenzieren. Werden die aus mononukleären Zellen des Blutes gewonnenen Zellen kultiviert, zeigen sie eine fibroblastenartige Morphologie, was Abbildung 1.5 deutlich macht.

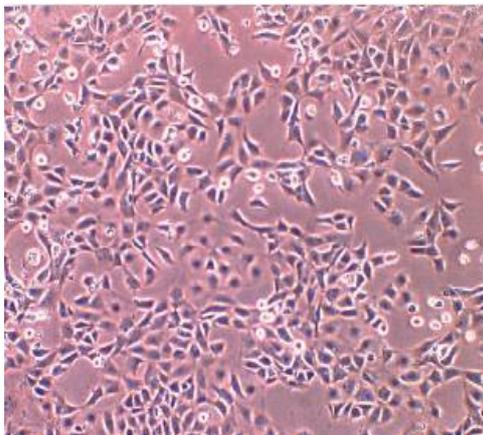


Abbildung 1.5:
RM26 Zellen in Zellkultur unter Standardwachstumsbedingungen ohne Matrix, die eine Differenzierung induziert (100-fache Vergrößerung).

1.3.2 L87/4

Die Zellen der Zelllinie L87/4 stammen aus dem menschlichen Knochenmark. Sie wurden isoliert, mit Hilfe des SV40 large-T antigen immortalisiert, klonal angereichert und charakterisiert [163, 164]. In einer Zellkultur zeigen sie, wie die RM26 Zelllinie, eine fibroblastenartige Morphologie (siehe Abbildung 1.6). Sie gehören zu den CD34-, adulten Stammzellen und wurden durch die Immortalisierung in ihrem biologischen Verhalten nicht verändert [134].

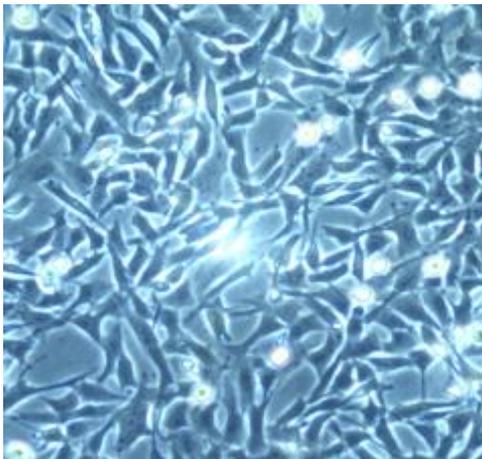


Abbildung 1.6:

L87/4 in Zellkultur unter Standardwachstumsbedingungen ohne eine Matrix, die eine Differenzierung induziert (100-fache Vergrößerung).

1.4 Einsatz verschiedener Immunsuppressiva

1.4.1 ATG

ATG ist ein Anti-Human-T-Lymphozyten-Immuneserum vom Kaninchen mit immunsuppressiver Wirkung. Es wird aus dem Serum immunisierter Kaninchen mit humanen T-Lymphozyten der Jurkat Zelllinie gewonnen. Die in ATG enthaltenen polyklonalen Antikörper binden an Oberflächenantigene humaner T-Lymphozyten und führen zu einer Depletion dieser Zellen. Die T-Zell-Depletion erfolgt vor allem durch Opsonisierung und Lyse der T-Zellen durch Komplementaktivierung. Veröffentlichte in vivo und in vitro Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Effekt von ATG-Fresenius S durch Bindung unter anderem an CD2+, CD3+, CD4+, CD4+/CD28+, CD5+, CD7+, LFA-1+, und ICAM-1+ Lymphozyten zustande kommt. Durch diese Rezeptoren sind vor allem T-Lymphozyten charakterisiert. CD5 kommt auch auf proliferierenden B-Lymphozyten vor [47].

1.4.2 Thymoglobulin und Lymphoglobulin

Wie bei ATG handelt es sich bei Thymoglobulin und Lymphoglobulin jeweils um polyklonale Antikörper, die entweder vom Pferd (Lymphoglobulin) oder vom Kaninchen (Thymoglobulin) isoliert wurden [167].

1.4.2.1 Lymphoglobulin

Lymphoglobulin ist ein selektives Immunsuppressivum, das hauptsächlich auf die T-Lymphozyten wirkt. Lymphoglobulin erkennt die meisten Moleküle, die an der T-Zell-Aktivierungskaskade während der Abstoßungsreaktion beteiligt sind, wie z.B. den T-Zell-Rezeptor (TCR) und CD3, HLA-Klasse I Moleküle, CD4 und CD8 Korezeptoren, koaktivierende Moleküle oder die Adhäsionsmoleküle CD2, CD5, CD11a und CD18. Die immunsuppressive Wirkung beruht wahrscheinlich auf der erheblichen Lyse der T-Lymphozyten in Blut- und Lymphkreislauf. Die T-Lymphozyten werden durch

Komplement-abhängige Lyse und andere Mechanismen eliminiert, wie in vitro und bei Tieren in vivo nachgewiesen wurde [71].

1.4.2.2 Thymoglobulin

Thymoglobulin enthält Antikörper gegen die meisten Oberflächenantigene, die bei der Transplantatabstoßung an der T-Zell-Aktivierungskaskade beteiligt sind, wie z. B. CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, HLA-DR und HLA-Klasse I. Das wichtigste Wirkprinzip der Immunsuppression durch die Behandlung mit Thymoglobulin ist wahrscheinlich die Depletion der T-Lymphozyten. Der Mechanismus der T-Zell-Depletion betrifft die Fc-Fragment-abhängige Opsonisierung durch das Makrophagen-Monozyten-System. Die Komplement-abhängige Opsonisierung und Lyse sowie Apoptose-Mechanismen sind an der Wirkung beteiligt [72].

1.4.3 Basiliximab

Basiliximab ist ein monoklonaler, chimärer Mensch-Maus Antikörper. Dadurch, dass es sich um einen monoklonalen Antikörper handelt, ist dieses Medikament hochspezifisch für ein bestimmtes Epitop auf dem Zielantigen, den IL-2 Rezeptor auf T-Zellen. Chimär bedeutet bei diesem Antikörper, dass er sich aus den variablen Regionen eines monoklonalen, murinen Anti-CD25-Antikörpers (RFT5) und den konstanten Regionen eines menschlichen Antikörpers (schwere Ketten vom Typ IgG1, leichte Ketten vom Typ Kappa) zusammensetzt [2]. RFT5 bindet spezifisch und mit hoher Affinität an die α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors (CD25), die nur von aktivierten, nicht aber von ruhenden T-Zellen exprimiert wird. Dies führt dazu, dass die ruhenden T-Zellen nicht beeinflusst werden. Zur Signalübertragung des IL-2 Rezeptors ist der komplette Rezeptor mit α -, β -, und γ -Untereinheit von Nöten, was bedeutet, dass durch die Blockierung der α -Untereinheit das aktivierende Signal für die T-Zelle nicht übertragen werden kann. Der Antikörper ist somit ein potenter Inhibitor der IL-2 vermittelten T-Zell-Proliferation [112].

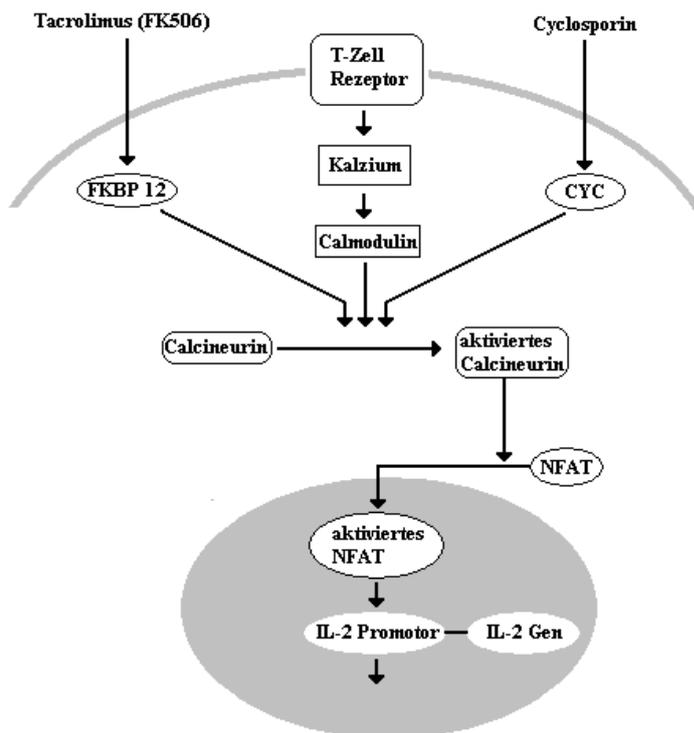
1.4.4 Ciclosporin A

Zur Regulation und Aktivierung von T-Lymphozyten sind bestimmte Zytokine notwendig. Ciclosporin, ein zyklisches Polypeptid, das von dem Pilz *Tolypocladium inflatum* gams produziert wird [167], hemmt die Neusynthese von Interleukin-2 (IL-2), wodurch nachfolgend die Proliferation und die Neuentstehung zytotoxischer T-Zellen supprimiert wird. Diese sind maßgeblich an Transplantatabstoßungen beteiligt [179, 21, 106]. Ciclosporin gehört zu den Calcineurininhibitoren (siehe Abbildung 1.7), was bedeutet, dass Ciclosporin in die Zellen eindringt und an so genannte Cyclophiline oder Immunophiline bindet. Es bildet sich ein Cyclophilin-Ciclosporin-Komplex, der dann die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin inhibiert [92]. Daraufhin wird wiederum die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren wie NF-KappaB oder NFATp/c (nuclear factor of activated T cells) negativ beeinflusst, die für die Aktivierung der Zytokin-Gene wichtig sind [75, 170]. Es kommt zu einem Stop des Zellzyklus der immunkompetenten Lymphozyten in der G0- oder G1-Phase, da die Zellteilung ohne gewisse Proteine wie IL-2 nicht möglich ist. Hauptangriffspunkt sind T-Helferzellen, die die Aktivität der für die Abstoßung eines Transplantates verantwortlichen zytotoxischen T-Zellen steigern [111]. Weiter hemmt Ciclosporin die Produktion und Freisetzung weiterer Lymphokine, die für die Proliferation reifer zytotoxischer T-Lymphozyten sowie für weitere Funktionen der Lymphozyten verantwortlich sind [78, 57].

1.4.5 Tacrolimus

Tacrolimus, auch FK506 genannt, ist ein aus *Streptomyces tsukubaensis* isoliertes Makrolid. Wie Ciclosporin gehört es zu den Calcineurininhibitoren [167]. Obwohl beide die Signaltransduktion durch die Verhinderung der Calcineurinaktivierung unterdrücken, schafft Tacrolimus dies über ein anderes Bindungsprotein. Es bildet mit dem FK506 binding protein 12 (FKBP12) einen Komplex und führt über diesen zur Calcineurininhibition (siehe Abbildung 1.7). Desweiteren gibt es in vivo und in vitro Studien, die zeigen, dass Tacrolimus eine 10-100-fach höhere immunsuppressive Potenz als Ciclosporin besitzt [90].

Abbildung 1.7 (nach [90]):



Immuno-philin-vermittelte Inhibition der T-Zellaktivierung:

Die Stimulation des T-Zell-Rezeptorkomplexes führt zu einem Inositol 1, 4, 5-Triphosphat vermitteltem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels. Dies führt zu einer Transkription des Interleukin 2 Gens. Tacrolimus (FK506) und Cyclosporin A verhindern diesen Prozess, indem sie an ihre spezifischen Immuno-philine, das FKBP 12 (FK506-binding protein) und das CYC (Cyclophilin), binden. Dadurch inhibieren sie die Kalzium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin.

1.5 Transplantation und Immunmechanismen

Die Transplantation von Organen ist heute ein etabliertes und regelmäßig klinisch angewandtes Verfahren. Leider ist bei allogenen Transplantationen heute immer noch eine lebenslange Immunsuppression nötig, da es sonst zur Abstoßung des Transplantats kommen würde. Die Immunsuppression stellt den Patienten jedoch vor ein neues Problem, da Langzeit-Immunsupprimierte anfälliger für Infektionen und die Entwicklung von Malignomen sind [130] und gleichzeitig mit anderen Nebenwirkungen der Immunsuppressiva wie Nephrotoxizität, Blutdruckerhöhung und ZNS-Störungen zu kämpfen haben. Um diese Folgen der Immunsuppression zu vermeiden gibt es verschiedene Ansätze, die Immunsuppression zu verringern oder gar ohne Immunsuppression auszukommen. Eine Überlegung ist, durch zusätzliche, perioperative Stammzellgabe einen Chimärismus zwischen Empfänger und dem Spenderorgan aufzubauen [52]. Gemäß der in der heutigen Medizin noch gültigen Definition nach Winkler (1907) ist eine Chimäre ein Individuum, das aus genetisch verschiedenen Geweben zusammengesetzt ist. Ziel der zusätzlichen Stammzelltransplantation ist, einen immuntoleranten, chimären Zustand zwischen graft und host zu erreichen.

1.5.1 Transplantatabstoßung

Bei den Abstoßungsreaktionen werden drei Formen der Abstoßung unterschieden, die hyperakute, die akute und die chronische Abstoßung eines Transplantates. Unterschieden werden diese Formen nicht nur anhand ihres zeitlichen Auftretens, sondern vor allem anhand der histologischen Merkmale. Dies wird dadurch deutlich, dass eine akute und eine chronische Abstoßung parallel ablaufen können.

Die hyperakute Abstoßung tritt innerhalb von Minuten oder Stunden nach der Transplantation auf. Bei ihr sorgen vorbestehende Antikörper für eine Reaktion gegen das Gefäßsystem des Spenderorgans [44]. Allerdings ist sie heute selten, da routinemäßig ein Cross-matching bzw. Kreuzproben zwischen Spenderlymphozyten und Empfängerserum durchgeführt werden.

Die akute Abstoßung ist der vorherrschende Grund für Abstoßungsreaktionen zwischen dem 5. und 15. postoperativen Tag [125]. Während bei der hyperakuten Abstoßung die humorale Immunantwort auf das Transplantat im Vordergrund steht, spielt bei der akuten Abstoßung auch die zelluläre Immunantwort eine wichtige Rolle. Die antigenen Strukturen auf den Transplantatzellen führen über verschiedene Signalkaskaden zur Aktivierung von Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen oder natürlichen Killerzellen, die ihre Zielzellen dann lysieren [118, 38, 53].

Die chronische Transplantatabstoßung ist heute die Hauptursache für den späten Transplantatverlust [169]. Nach der „Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs“ wird die Diagnose der „chronischen Abstoßung“ basierend auf histomorphologischen Charakteristika des Biopsats und den klinischen Beobachtungen einer allmählich abnehmenden Transplantatfunktion gestellt [121, 174, 172]. Immunologisch werden diese Vorgänge v.a. durch T-Zellen, infiltrierende Monozyten und Makrophagen sowie durch deren Zyto- und Chemokine bedingt. Für das Verständnis der Wirkungsweise der in dieser Arbeit verwendeten Immunsuppressiva wird im Folgenden kurz auf grundlegende Immunmechanismen der Transplantatabstoßung eingegangen.

1.5.2 Mechanismen der Transplantatabstoßung

Das Immunsystem hat sowohl das humorale als auch das zelluläre Immunsystem zur Verfügung, um Fremdgewebe anzugreifen. Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Zellen und weniger spezifisch durch Makrophagen und natürliche Killerzellen vermittelt. Die humorale Immunantwort geschieht durch Antikörper, Opsonisierung und Aktivierung des Komplementsystems. Die entscheidende Rolle spielt die zelluläre Immunantwort [14, 169]. Vor allem die Rolle von CD4- und CD8-T-Zellen wurde häufig untersucht [53, 154]. Demnach scheint die Abstoßung hauptsächlich durch CD4-T-Lymphozyten vermittelt zu sein, obgleich bei alleiniger Disparität von Klasse I-MHC Antigenen CD8-T-Zellen als potenter Mediator der Abstoßung fungieren können [154, 15, 95].

T-Zellen können allgemein nicht auf lösliche Strukturen reagieren. Sie benötigen Strukturen, die an der Zelloberfläche akzessorischer Zellen gebunden sind bzw. von diesen präsentiert oder exprimiert werden. Weiter erkennen CD4-T-Helferzellen ihre Antigene nur, wenn diese mit Hilfe von MHC-(major histocompatibility complex)-Klasse-II-Komplexen präsentiert werden. Die Helferzellen werden in Th1- und Th2-Zellen unterteilt, deren Immunantwort entweder zellvermittelt (Th1) oder humoral vermittelt (Th2) abläuft. CD8-zytotoxische-T-Zellen sind gegen Zellen gerichtet, die das Antigen mit Hilfe des MHC-Klasse-I-Komplexes präsentieren bzw. an ihrer Oberfläche tragen [123, 96].

Kommt es zu Abstoßungsreaktionen, so werden diese meist von CD4-T-Zellen initiiert. Diese erkennen Antigene, die entweder als intakte Moleküle von Spender-Antigen-präsentierenden-Zellen (direkte Erkennung) [16, 55] oder als Peptidfragmente von körpereigenen Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) (indirekte Erkennung) [49, 142] präsentiert werden.

1.5.3 T-Zellaktivierung

Die spezifische MHC-restringierte Antigenerkennung durch T-Lymphozyten erfolgt über den T-Zell-Rezeptor (TCR). Der Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Kette. Die variablen Regionen des TCR machen seine Spezifität aus. Diese binden die prozessierten Peptidantigene, die auf der Oberfläche von APC an die MHC-Moleküle gebunden sind, sowie polymorphe Strukturen des MHC-Komplexes selbst [101]. Diese

Bindung zwischen dem Antigen, dem MHC-Komplex und dem TCR induziert dann die komplexe T-Zellaktivierung. Es werden noch einige andere Membranproteine auf der Oberfläche der T-Zelle exprimiert, die als akzessorische Moleküle bei Bindung an ihre entsprechenden Liganden die Interaktion des Antigen-MHC-Komplexes mit dem TCR verstärken. Dies macht es möglich, dass genug Zeit für weitere Kostimulatoren wie B7.1 oder B7H1 (siehe unten) ist, die Effektorfunktionen und die Aktivierung der T-Zelle zu beeinflussen. Korrelat einer erfolgten T-Zellaktivierung ist unter anderem die Synthese von IL-2, das die T-Zelle zur Proliferation und Differenzierung in die Effektorzelle anregt [103, 33, 23].

1.6 Die Kostimulatoren B7H1 und B7.1 und ihre Rolle bei der Immunantwort

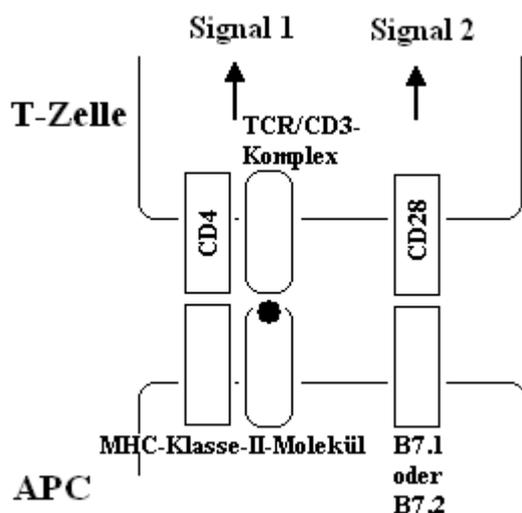
1.6.1 B7H1

B7H1 oder auch programmed death ligand 1 (PDL1) ist ein kostimulierendes Molekül, das auf Zellen des Knochenmarks aber auch auf Parenchymzellen anderer Gewebe exprimiert wird [46, 88, 122, 34]. Es fungiert als Ligand am inhibitorisch wirkenden, kostimulierenden Molekül programmed death 1 (PD1) auf T-Zellen und vermutlich noch an anderen Rezeptoren. B7H1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Immunantwort in vivo [132, 83] wie z.B. bei der Toleranz gegenüber Transplantaten [36, 116, 48, 138, 74]. Obwohl es Arbeiten gibt, die eine positive Stimulation der T-Zellen beschreiben [161, 177, 156], gibt es klare Hinweise darauf, dass B7H1, bezogen auf allogene Transplantate, vor allem inhibierend auf die Aktivierung von T-Zellen wirkt [51]. Dies geschieht durch Begrenzung der Anreicherung von alloreaktiven T-Zellen [138, 135], möglicherweise durch Anhalten des Zellzyklus [26], durch gesteigerte Apoptose der T-Zellen [138, 35, 73] oder durch aktive Regulation der allorenen Immunantwort durch eine Subpopulation von CD4+, CD25+ T-Zellen [138, 7].

1.6.2 B7.1

B7.1 oder auch CD80 ist ein kostimulierender Ligand, der vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert wird. Er bindet an die kostimulierenden Rezeptoren CD28 und CTLA-4 der T-Zellen und ist dadurch essentiell an der Aktivierung und der Regulation der T-Zellen und ihrer Immunantwort beteiligt [158]. Für eine optimale T-Zellaktivierung ist somit sowohl die Interaktion zwischen dem T-Zellrezeptor (TCR) und dem Peptid: MHC-Klasse-II-Komplex [18] als auch die Interaktion zwischen den kostimulierenden Rezeptoren der T-Zelle (z.B. CD28) mit ihren Liganden (z.B. B7.1) auf den antigenpräsentierenden Zellen nötig [31, 25]. Während diese Rezeptor-Ligandenpaare also verstärkend auf die T-Zellaktivierung wirken, können die oben genannten PD1 und B7H1 Rezeptor-Ligandenpaare zur Abschwächung der T-Zellaktivierung und damit der Immunantwort führen.

Abbildung 1.8 [130]:

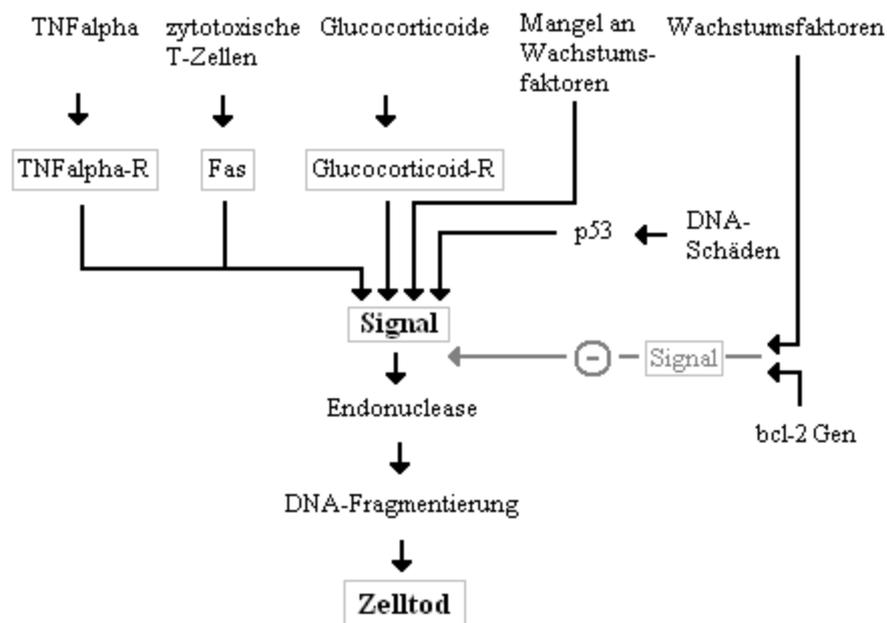


Auf antigenpräsentierenden Zellen werden als kostimulierende Signale vor allem B7-Moleküle exprimiert, die an das T-Zell-Protein CD28 binden. Die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) und seines Korezeptors CD4 an den Peptid: MHC-Klasse-II-Komplex auf der antigenpräsentierenden Zelle (APC) setzt ein Signal frei (Signal 1), das nur dann für eine klonale Vermehrung der T-Zellen sorgt, wenn aufgrund der Bindung von CD28 an B7-Moleküle ein kostimulierendes Signal (Signal 2) erzeugt wurde. CD28 und B7.1 (CD80) gehören beide zur Immunglobulin-Superfamilie.

1.7 Apoptose:

Die Apoptose beschreibt einen Prozess, der in vielen unterschiedlichen Zellen individuell ausgelöst werden kann. Man bezeichnet die Apoptose auch als programmierten Zelltod, da sie, einmal in Gang gesetzt, wie ein Programm abläuft und schließlich im Zelltod gipfelt. Nach Freisetzung von molekularen Signalen kommt es durch Kaskadenreaktionen zur Zellkernschrumpfung mit anschließendem Plasmamembranzerfall in viele Vesikel und somit zur Auflösung der Zelle. Die DNA der Zelle wird schnell abgebaut und bildet dabei Bruchstücke, die den Nucleosomen-assoziierten DNA-Teilen entsprechen. Es kommt bei der Apoptose zu keiner Entzündungsreaktion oder Antikörperbildung. Biochemisch ist die Apoptose ein induzierbarer, energieabhängiger Vorgang mit gesteigerter RNA- und Proteinbiosynthese. Dies unterscheidet die Apoptose klar von der Zellnekrose, die häufig mehrere Zellen eines geschädigten Organs betrifft, bei der es zur Zellschwellung und zum Verlust der Membranintegrität, aber erst relativ spät zum DNA-Abbau kommt und bei der regelmäßig eine entzündliche und immunologische Reaktion zu beobachten ist [93, 29, 1]. Eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielt die Aktivierung einer spezifischen Endonuclease, die das Chromatin fragmentiert und so den Zelltod auslöst. In Abbildung 1.9 sind einige Auslöser der Apoptose dargestellt. Verdeutlicht wird vor allem die Tatsache, dass der programmierte Zelltod auf verschiedene Art und Weise auslösbar ist.

Abbildung 1.9: Einige Mechanismen, die eine Apoptose auslösen können (nach [93])



1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Bei Transplantationen ist die Langzeit-Immunsuppression ein Problem, dem eventuell damit begegnet werden kann, dass man perioperativ Stammzellen einsetzt, um einen immuntoleranten Chinärismus zwischen Empfänger und Spenderorgan zu erreichen [52]. Dies ist die Grundlage dieser Arbeit. Sie geht von einem Therapieansatz aus, bei dem perioperativ sowohl Stammzellen als auch Immunsuppressiva zum Einsatz kommen. Da Immunsuppressiva in die Signalkaskade und in die Aktivität des Immunsystems eingreifen, die auch bei der Bildung einer Toleranz sehr bedeutsam sind, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob und in welcher Weise auch die Stammzellen von den Immunsuppressiva beeinflusst werden.

Um dies zu untersuchen wurden eine menschliche (L87/4) und eine murine (RM26) Stammzelllinie verwendet. Die Zellen wurden mit Immunsuppressiva inkubiert, um deren Einfluss auf das Proliferationsverhalten zu untersuchen und um festzustellen, ob die Zellen dadurch vermehrt Apoptose begehen. Es wurden dabei sechs verschiedene Immunsuppressiva in unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

Weiter wurde untersucht ob die Stammzellen die Kostimulatoren B7H1 und B7.1 exprimieren und wie diese Expression auf verschiedene Konzentrationen der Immunsuppressiva reagiert. Grundlegend war die Frage, ob durch die Immunsuppressiva das Gleichgewicht der gegensätzlich wirkenden Kostimulatoren bezüglich Toleranz und Abstoßung des Transplantates in eine bestimmte Richtung beeinflusst wird.

Die konkrete Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautet:

- a) Verändern die einzelnen Immunsuppressiva in verschiedenen Konzentrationen das Proliferationsverhalten der Zellen?
- b) Wie sieht der Vergleich zwischen den einzelnen Immunsuppressiva bezüglich ihrer Wirkung auf das Proliferationsverhalten der Zellen aus?

- c) Verändern die einzelnen Immunsuppressiva in verschiedenen Konzentrationen das Apoptoseverhalten der Zellen?
- d) Wie sieht der Vergleich zwischen den einzelnen Immunsuppressiva bezüglich ihrer Wirkung auf das Apoptoseverhalten der Zellen aus?
- e) Werden auf den Stammzelllinien die Kostimulatoren B7H1 und B7.1 exprimiert?
- f) Wie verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen den beiden Kostimulatoren bei Behandlung der Stammzellen mit verschiedenen Konzentrationen der Immunsuppressiva?

2 Material und Methode

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Stammzellen

L87-4

Bezugsquelle: PD Dr. med R. Huss, Pathologie der LMU München, Deutschland

RM26 2-1

Bezugsquelle: PD Dr. med R. Huss, Pathologie der LMU München, Deutschland

2.1.2 Cell-Counting-Kit-8®

5 mM WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt), 0,2mM 1-Methoxy PMS (phenazinium methylsulfate)
150 mM NaCl

Bezugsquelle: Probior GmbH, München, Deutschland

2.1.3 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)®

BrdU labeling reagent (10 mM 5-bromo-2'-deoxyuridine in PBS, pH 7,4)
Fix Denat (70% Ethanol)
Anti-BrdU-POD (monoclonal antibody from mouse-mouse hybrid cells (clone BMG 6H8, Fab fragments) conjugated with peroxidase (POD))
Antibody dilution solution
Washing buffer (PBS)
Substrate solution (TMB (tetramethyl-benzidine))

Bezugsquelle: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

2.1.4 Cell Death Detection ELISApplus®

Anti-histone-biotin (monoclonal antibody from mouse (clone H11-4), Biotin labeled, lyophilized, stabilized, for the binding of the histone component of the nucleosomes and capturing of the immunocomplex via biotin to the coated MP)
Anti-DNA-POD (Monoclonal antibody from mouse (clone MCA-33), Peroxidase conjugated, lyophilized, stabilized, for the binding of the DNA components of the nucleosomes and the color reaction with ABTS®)
Positive Control (DNA-histone-complex, lyophilized, stabilized)
Incubation buffer
Lysis buffer
Substrate buffer (for dissolving the ABTS® tablets)
ABTS® substrate tablet
Microplate (Streptavidin-coated)

Bezugsquelle: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

2.1.5 RNeasy Mini Kit 50

Preparations per kit	50
RNeasy Mini spin columns (pink)	50
Collection tubes (1,5 ml)	50
Collection tubes (2 ml)	50
Buffer RLT	45 ml
Buffer RW1	45 ml
Buffer RPE	11 ml
RNase-free water	10 ml

Bezugsquelle: Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.6 DNA-free Kit

rDNase I (2 Units/µl)	120 µl
10x DNase I Buffer (10x: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM MgCl ₂ , 5 mM CaCl ₂)	600 µl
DNase Inactivation Buffer	600 µl
Nuclease-free Water	1,75 ml

Bezugsquelle: Ambion Inc., Austin, USA

2.1.7 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

96 well Mikrotiterplatten:

Flachbodenplatten und Rundbodenplatten, 0,31 cm²
Wachstumsfläche, zellkulturbehandelt, pyrogenfrei,
gammasterilisiert
Bezugsquelle: TPP, Trasadingen, Schweiz

Pipetten:

Stripette®	disposable serological pipette 2, 5, 10, 25ml Bezugsquelle: Costar Corning, Corning, USA
Pipetboy acu®	Bezugsquelle: IBS-Integra Bioscience GmbH, Fernwald, Deutschland
Multipipette plus®	Bezugsquelle: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transferpipette®-8	Bezugsquelle: Brand GmbH + Co, Wertheim, Deutschland
Mikroliterpipetten	0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl labmate Bezugsquelle: Abimed Analysen-Technik, Langenfeld, Deutschland

Pipettenzubehör:

Combitips plus®	Aufsätze für digitale Pipette, 0,5; 2,5; 5; 25ml Bezugsquelle: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
-----------------	--

Ep T.I.P.S standard	Pipettenspitzen 0,1-10 µl, 2-200 µl, 10-1000µl
	Bezugsquelle: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ep T.I.P.S Box	Bezugsquelle: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plastikgefäße:	
Plastiktubes	Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml Bezugsquelle: TPP, Trasadingen, Schweiz
Safe-lock tubes	Eppendorfgefäß 1,5 ml Bezugsquelle: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
4-Seiten Flipperrack	Bezugsquelle: neolab Migge Laborbedarfvertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zellflaschen	Cell culture flask, angled neck, tissue culture treated, 25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ² Bezugsquelle: Costar Corning, Corning, USA
Labor-Glasflaschen:	
	50ml, 100ml, 1000ml Bezugsquelle: Schott Duran, Mainz, Deutschland
Handschuhe:	
	powder-free latex examgloves Safeskin PFE® Bezugsquelle: Kimberly Clark N.V., Zaventem, Belgien
Alkohol zum Reinigen:	
	70% Ethanol Bezugsquelle: Apotheke Innenstadt, LMU München, Deutschland
Trypanblaulösung:	
	Trypanblaulösung 0,4% in 0,8% NaCl, 0,06% Kaliumphosphat, dibasisch Bezugsquelle: Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Deckgläser:	
	Bezugsquelle: Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland
Reinigungstücher:	
	Präzisionswischtücher Kinwipes Lite® Bezugsquelle: Kimberly Clark N.V., Zaventem, Belgien
Spritzen:	
	Einmalspritzen 5 ml, 10 ml, 20 ml Bezugsquelle: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kanülen:	
	Einmal-Injektions-Kanülen Größe 1 100 Sterican® Bezugsquelle: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Aqua ad iniectabilia:

1000 ml

Bezugsquelle: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Laborflaschenverschlußband:

Laboratory Film-Parafilm

Bezugsquelle: Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA

Labor-Alu-Folie:

Bezugsquelle: Carl-Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland

dNTPs

PCR Nucleotide Mix

Bezugsquelle: Promega, Madison, USA

RNasin 2500U RNasin®

Ribonuclease Inhibitor

Bezugsquelle: Promega, Madison, USA

M-MuLV Enzym

(Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase

Bezugsquelle: Promega, Madison, USA

dNTPs

PCR Nucleotide Mix

Bezugsquelle: Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan

TaKaRa Taq 5U

Thermostabile DNA-Polymerase

Bezugsquelle: Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan

Trypsin/EDTA-Lösung

0,05%/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺

Bezugsquelle: Biochrom AG, Berlin, Deutschland

DMSO

(Dimethylsulphoxide Hybri-Max ®)

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland

H₂SO₄ – Titrisol®

Schwefelsäure für 1000ml c(H₂SO₄) = 0,5 mol/l (1N)

Titrisol

Bezugsquelle: VWR International, Ismaning, Deutschland

Staurosporin	(Antibiotic AM-2282) from Streptomyces sp. Minimum 95% (HPLC) Konz 1mM in DMSO gelöst FN 466,5 S4400 0,1mg Lot113K4097 Bezugsquelle: Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
H ₂ O	Bezugsquelle: Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Bezugsquelle: Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Bezugsquelle: Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ethidiumbromid	Bezugsquelle: Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
QIA-shredder	Bezugsquelle: Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.8 Geräte

Autoklavierungsgerät:	Heraeus Bezugsquelle: Harald Iglar, physik. chem. Geräte für Labor und Betrieb, München, Deutschland
Brutschrank:	Modell 3111, Seriennummer 95956-2546, CO ² water jacketed incubator Bezugsquelle: Forma scientific, Marietta, USA
Mikroskop:	Axiovert 200 Bezugsquelle: Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kühlschrank -20C:	Computer control freezer Bezugsquelle: Robert-Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland
Sterilbank:	Heraeus Herasafe HS12, Seriennummer 40088346

Bezugsquelle: Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland

Zählkammer:

Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm²
Bezugsquelle: Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland

Zentrifuge:

Centra CL3R
Bezugsquelle: IEC – International-Equipment-Company,
Massachusetts, USA

ELISA-Reader:

Type OEM Spectra II, Seriennummer 226181,
Messfilter 450nm, Messfilter 620nm, Messfilter 690nm
Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland

Drucker für ELISA-Reader:

Laser Jet 4
Hewlett Packard, Böblingen, Deutschland

Wasserbad:

Bezugsquelle: Köttermann, Häningsen, Deutschland

Rüttler für Mikrotiterplatten:

Celoshaker Variospeed
Bezugsquelle: Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland

Vortex-Genie 2

Bezugsquelle: Scientific Industries, Bohemia, USA

Biometra personal Cycler

Bezugsquelle: Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Biozym Cycler

Bezugsquelle: Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf,
Deutschland

Mikrowelle

Bezugsquelle: Siemens-Electrogeräte GmbH, München,
Deutschland

Image Master VDS

Bezugsquelle: Pharmacia Biotech, San Francisco, USA

2.1.9 Medikamente

Sandimmun®:

Ciclosporin, Ampullen zu je 1 ml Infusionslösungskonzentrat,
Zusammensetzung von 1ml Lösung:
50 mg Ciclosporin,
96% Ethanol,

Poly(oxyethylen)-40-Rizinusöl
Bezugsquelle: Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland

Prograf®:

Tacrolimus Ampullen zu je 1 ml Infusionslösungskonzentrat,
Zusammensetzung von 1ml Lösung:
5 mg Tacrolimus
Poly(oxyethylen)-60-Rizinusöl
80% Ethanol
Bezugsquelle: Fujisawa (jetzt Astellas Pharma GmbH),
München, Deutschland

ATG-Fresenius S®:

Anti-Human-T-Lymphozyten-Immuneserum vom Kaninchen,
Zulassungsnummer: 452a/87
Zusammensetzung von 1ml Lösung:
20 mg Immunglobulin
Natriumdihydrogenphosphat
Phosphorsäure
Wasser für Injektionszwecke
Bezugsquelle: Fresenius HemoCare Immune Therapy GmbH,
Gräfelfing, Deutschland

Simulect®:

Basiliximab (monoklonaler, chimärer Mensch-Maus-Anti-
CD25-Antikörper)
Zusammensetzung von 1ml Lösung:
4 mg Basiliximab,
Kaliumdihydrogenphosphat,
wasserfreies Natriummonohydrogenphosphat,
Natriumchlorid
Saccharose
Mannitol
Glycin
Wasser für Injektionszwecke
Bezugsquelle: Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland

Thymoglobulin®:

Anti-Human-T-Zell-Immuneserum vom Kaninchen,
Zulassungsnummer: 191a/92
Zusammensetzung von 1 ml Lösung:
5 mg Antihuman-T-Zell-Immuneserum,
vom Kaninchen
10 mg Aminoessigsäure,
10 mg Mannitol,
2 mg Natriumchlorid
Bezugsquelle: IMTIX-SangStat, Lyon, Frankreich

Lymphoglobulin®:

Anti-Human-T-Zell-Immuneserum vom Pferd,
Zulassungsnummer: 1a/80

Zusammensetzung von 1 ml Lösung:

20 mg Antihuman- T-Zell-Immuneserum vom Pferd,
 20 mg Aminoessigsäure,
 1 mg Natriumchlorid,
 Wasser für Injektionszwecke

Bezugsquelle: IMTIX-SangStat, Lyon, Frankreich

2.1.10 Primer

Oligo p(dt)15

Primer für cDNA Synthese

Bezugsquelle: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,
 Deutschland

Name:

Sequenz:

B71 fwd

5'-CAAAGCTGACTTCCCTACACC-3'

B71 rev

5'-CTCCATTTTCCAACCAGGAGAG-3'

B7H1 fwd

5'-GAACGCATTTACTGTCACGGT-3'

B7H1 rev

5'-TCCCAATAGACAATTAGTGCAGC-3'

Actin hum fwd

5'-CCTTCC TGG GCA TGG AGT CCT G-3'

Actin hum rev

5'-GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC-3'

Bezugsquelle: invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe,
 Karlsruhe, Deutschland

2.2 Stammlösungen und Puffer

PBS:

NaCl-Lösung 0,81% in Phosphatpuffer 0,0067 mol/l,
 pH 7,2 isotonisch

Zusammensetzung: 1000 ml

NaCl 8,1 g

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 0,862 g

Kaliumdihydrogenphosphat 0,248 g

Aqua ad iniectabilia zu 1000 ml

Bezugsquelle: Apotheke Innenstadt, LMU München,
 Deutschland

Medium:

RPMI 1640:

W 2.0 g/l NaHCO₃ w/o L-Glutamine

Bezugsquelle: Biochrom AG, Berlin, Deutschland

10% FCS:

Fetal bovine serum, 0,2µm steril filtered,

mycoplasma screened, origin: South America, gamma irradiated

Bezugsquelle: Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

1% L-Glutamin:

200 nM

Bezugsquelle: Biochrom AG, Berlin, Deutschland

1% Gentamycin:

10 mg/ml

Bezugsquelle: Biochrom AG, Berlin, Deutschland

cDNA-Synthese Puffer

Bezugsquelle: Promega, Madison, USA

TBE-Puffer

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland

PCR-Puffer

Bezugsquelle: Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan

EDTA-Puffer

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.3 Untersuchungsverfahren und Arbeiten mit den Zellen

2.3.1 Splitting und Kultivierung der Zellen

1. Ausgangspunkt ist eine Zellkulturflasche in variabler Größe mit einer adhären, konfluenten Zellschicht, die als Ausgangspunkt für eine neue Passage der Zelllinie genommen wird.
2. Das verbrauchte Medium in der Zellkulturflasche wird mittels einer sterilen Einmalpipette abpipettiert und verworfen.
3. Die in der Zellkulturflasche verbleibende Zellschicht wird mit PBS, gemäß Tabelle 2.1, gewaschen, welches daraufhin ebenfalls mittels einer sterilen Einmalpipette abpipettiert und verworfen wird.
4. Die Zellschicht wird mit einer gemäß Tabelle 2.1 großen Menge Trypsin versetzt und damit für ca. 5 Minuten inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche lösen. Während der Inkubationszeit kann die Zellkulturflasche zur Beschleunigung vorsichtig geschwenkt oder die Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert werden.
5. Um das für die Zellen auf Dauer toxisch wirkende Trypsin zu inaktivieren, wird das Zell-Trypsin-Gemisch mit der im Vergleich zum Trypsin doppelten Menge an Medium versetzt und das Gemisch in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert.
6. Abzentrifugieren der Zellen bei 1400 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten.

7. Verwerfen des Überstandes und leichtes Anlösen des Zellpellets durch Schreddern des Zentrifugenröhrchens über ein Gitter. Anschließend lösen des Zellpellets in ca. 3 ml Medium, je nach Zellpellet und gewünschter Zellkonzentration.
8. Bestimmung der Zellkonzentration mittels Neubauer-Zählkammer (siehe 2.3.2)
9. Aussaat der errechneten Menge an Zellen in eine neue Zellkulturflasche, in die man eine gemäß Tabelle 2.1 entsprechende Menge Medium vorgelegt hat.

Zellkulturfläschengröße	Mediummenge pro Flasche	Trypsinmenge pro Flasche	PBS-Menge pro Flasche
T25 (25cm ² Oberfläche)	8 - 10 ml	1 ml	1 ml
T75 (75 cm ² Oberfläche)	15 -18 ml	2 ml	2 ml
T150 (150 cm ² Oberfläche)	20 - 25 ml	3 ml	3 ml

2.3.2 Zellkonzentrationsbestimmung mittels Neubauerzählkammer

1. Pipettieren von 45 µl einer 0,4%igen Trypanblaulösung in ein well einer 96-well Rundboden-Mikrotiterplatte.
2. Zupipettieren von 5 µl des zu bestimmenden Zell-Mediumgemisches (es resultiert eine 1:10 Verdünnung)
3. Mischen der Lösung durch zu- und abpipettieren der Lösung.
4. Füllen der Neubauerzählkammer mit der Lösung.
5. Zählung der Zellen in den vier Quadranten der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop und Bildung eines Mittelwertes.
6. Errechnung der Zellkonzentration pro µl anhand folgender Formel:

Zellzahl pro ml:	$z = 10 \text{ (1:10 Verdünnung)} \times 10^4 \text{ (Faktor der Neubauerzählkammer)} \times m$
	$z = \text{Zellzahl pro ml}$
	$m = \text{ermittelte mittlere Zellzahl pro Neubauer-Zählkammer-Quadrant}$
Volumen des Zellgemisches um die gewünschte Zellmenge für die Kultivierung zu erhalten:	$1 / z = V_1 / g \text{ daraus folgt: } V_1 = g / z$
	$V_2 = V_1 \times 1000$
	$g = \text{gewünschte Zellmenge für die Kultivierung}$
	$V_1 = \text{zu berechnendes Volumen in ml}$
	$V_2 = \text{zu berechnendes Volumen in } \mu\text{l}$

7. V2 stellt das Volumen des untersuchten Zell-Mediumgemisches in μl dar, das die gewünschte Menge Zellen für die Kultivierung einer neuen Zellpassage enthält.

2.3.3 ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

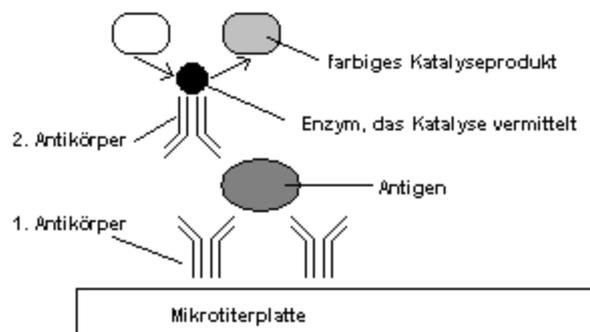
Das Prinzip des ELISA ist ein Antikörper, an den ein Enzym gebunden ist. Dieses Enzym katalysiert eine chemische Reaktion, deren farbiges Produkt im Zellmedium löslich und photometrisch auch in sehr geringen Mengen messbar ist.

Es gibt verschiedene Arten von ELISAs:

1. Sandwich-ELISA:

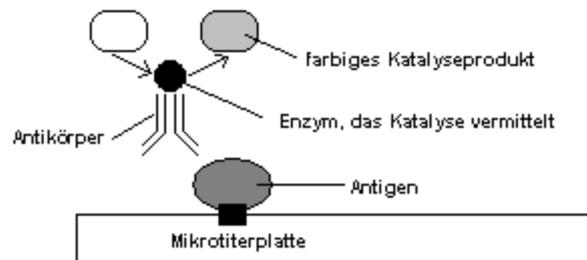
Hier wird das zu untersuchende Antigen durch einen immobilisierten Antikörper am Boden der Mikrotiterplatte gehalten. Ein zweiter Antikörper bindet nun an einem freien Epitop des Antigens und vermittelt die Katalyse der Nachweisreaktion. Das Enzym ist dabei an den zweiten Antikörper gebunden.

Abbildung 2.1: Sandwich ELISA

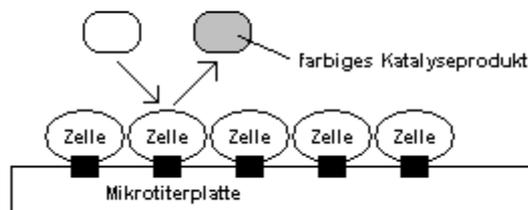


2. Kompetitiver ELISA:

Beim kompetitiven oder indirekten ELISA ist das Antigen am Boden der Mikrotiterplatte fixiert. Der Antikörper bindet an das Antigen und vermittelt wieder die Katalyse über das an ihn gebundene Enzym.

Abbildung 2.2: Kompetitiver ELISA

3. ELISA bei dem die Zelle als Ort der enzymatischen Umwandlung fungiert:
Hier katalysieren zelleigene Enzyme wie z.B. Dehydrogenasen die Reaktion, bei der ein farbiges, photometrisch messbares Produkt entsteht.

Abbildung 2.3: Zellenzyme als Katalysator

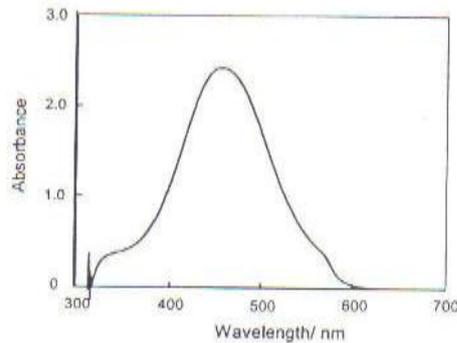
2.3.4 CCK8 - Cell Counting Kit-8

2.3.4.1 Allgemeine Information zu CCK8

Der CCK8 ist ein ELISA-Kit, bei dem das wasserlösliche Tetrazoliumsalz WST-8 enzymatisch in das ebenfalls wasserlösliche Formazan überführt wird. WST-8 wird von den Dehydrogenasen in den Zellen zu einem gelben Produkt (Formazan) reduziert, das im Kulturmedium löslich ist. Die Menge an Formazanfarbstoff, die durch die Dehydrogenasenaktivität entsteht, ist direkt proportional zur Zahl der lebenden Zellen in dem gemessenen well.

Abbildung 2.4 zeigt das Extinktionsspektrum von WST-8 Formazan. Da die Extinktion bei 460 nm proportional zur Zahl der lebensfähigen Zellen in dem Medium ist, kann diese Zellzahl theoretisch durch Erstellen einer Eichkurve ermittelt werden.

Abbildung 2.4: Extinktionsspektrum von WST-8 Formazan



(entnommen aus
Technical Manual,
Cell Counting Kit-8,
probiol GmbH, München,
Deutschland)

2.3.4.2 Lagerung des CCK8

Zur längeren Lagerung des CCK8 werden die 10 ml der CCK8-Lösung in Aliquots in 1,5 ml Eppendorfgefäße zu je 500 µl aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.

2.3.4.3 Arbeitsprotokoll für den CCK8

- 1) Beimpfen einer 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte mit 100 µl Zellsuspension in der gewünschten Konzentration an Zellen pro 100 µl.
- 2) Beim Erstellen einer Eichkurve folgt sofort der nächste Schritt, ansonsten Inkubation der beimpften Mikrotiterplatte für die gewünschte Zeit im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂.
- 3) Auftauen eines eingefrorenen Aliquots CCK8 im Wasserbad bei 37°C für 3 Minuten.
- 4) Hinzufügen von 10 µl CCK8-Lösung zu jedem well der Mikrotiterplatte. Bei Blasenbildung werden diese unter Verwendung einer sterilen Einmalkanüle vorsichtig zerstochen, da sonst die Messung verfälscht werden könnte.
- 5) Inkubation der Mikrotiterplatte für 90 Minuten im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂.
- 6) Messung der Extinktion im ELISA-Reader mit folgenden Messbedingungen:

450 nm Messfilter
620 nm Referenzfilter
Schüttelzeit: 5 Sekunden
Schüttelmodus: normal
Schüttelposition: innen
Testname: CCK8

2.3.4.4 Kontrollen

Backgroundkontrolle:

Es tritt eine leichte spontane Extinktion bei 460 nm beim mit CCK8 inkubierten Zellkulturmedium auf. Dieser Extinktionswert ist abhängig vom Zellkulturmedium, pH-Wert, Inkubationszeit und der Zeit der Lichtexposition. Die typische Extinktion beträgt 0,1 – 0,2.

Für die Backgroundkontrolle werden wells mit Zellkulturmedium ohne Zellen untersucht.

2.3.4.5 Probleme bei der quantitativen Auswertung der Zellzahlen

Da das verwendete Zellmedium in Abhängigkeit zur Inkubationszeit und Zellzahl ebenfalls einer gewissen Farbänderung unterworfen ist, wird darauf verzichtet, die absolute Zellzahl im jeweiligen well zu bestimmen. Die Messergebnisse werden nur innerhalb einer Platte mit Hilfe der Extinktion und der Inkubationszeit gegeneinander verglichen.

2.3.4.6 Festlegen einer geeigneten Zellzahl für die Untersuchung der Auswirkungen der Immunsuppressiva auf die verschiedenen Zelllinien

Sinn und Zweck der Messungen mit dem CCK8 besteht darin, eine geeignete Zellzahl für die einzelnen Zelllinien zu finden, die nach Inkubation und während der Zeit des Experimentes in die Phase des exponentiellen Wachstums der Zelllinie fällt. Dies soll eine hohe Reproduzierbarkeit und ein gleichmäßiges Wachstum der Zellen bewirken.

2.3.5 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)

2.3.5.1 Allgemeine Information zum BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine)-Test

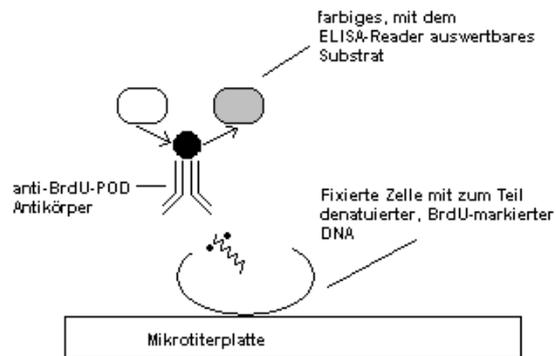
Der BrdU-Test ist ein Immunoassay zur Quantifizierung von Zellproliferation, basierend auf der Messung der BrdU-Aufnahme während der DNA-Synthese proliferierender Zellen.

Hierbei wird das Pyrimidin-Analogon BrdU anstatt Thymidin bei der DNA-Synthese in die DNA eingebaut und anschließend die BrdU-Aufnahme mit Hilfe eines ELISA quantifiziert. Dies macht es möglich, auch inhibitorische Effekte auf Zellen und deren Proliferation festzustellen.

Spezifität:

Das Antikörperkonjugat reagiert mit dem BrdU im Zellkulturmedium und dem BrdU, das in die DNA eingebaut wurde. Um an das, in die DNA eingebaute, BrdU binden zu können, muss die BrdU-markierte DNA denaturiert werden. Der Antikörper zeigt dabei keinerlei Kreuzreaktionen mit endogenen Zellkomponenten wie Thymidin, Uridin oder DNA.

Abbildung 2.4: Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)



2.3.5.2 Vorbereiten der Arbeitslösungen

BrdU labeling solution:

Lösen der BrdU labeling Reagenz 1:100 mit sterilem Zellkulturmedium (mit resultierender Konzentration: 100 μ M BrdU). Für eine 96-well-Flachbodenmikrotiterplatte benötigt man, bei 100 μ l pro well, ca. 1 ml BrdU labeling solution.

Die gelöste BrdU labeling solution ist bei 2-8°C und vor Licht geschützt mehrere Wochen haltbar. Zur längeren Verwendbarkeit wird die BrdU labeling solution in Aliquots zu je 1200 μ l bei -20°C eingefroren.

Die BrdU labeling solution dient zum Markieren der proliferierenden Zellen.

Anti-BrdU-POD-stock-solution:

Auflösen der Anti-BrdU-POD-Reagenz in 1,1 ml doppelt destilliertem Wasser und dabei für 10 Minuten mit Hilfe des Vortex mischen. Die gelöste Anti-BrdU-POD-stock-solution ist bei 2-8°C für mehrere Monate haltbar. Bei Bedarf kann auch diese in Aliquots bei -20°C eingefroren werden.

Die Anti-BrdU-POD-stock-solution dient als Vorrat für die Vorbereitung der Anti-BrdU-working-solution.

Anti-BrdU-working-solution:

Lösen von Anti-BrdU-stock-solution 1:100 mit antibody dilution solution. Für eine 96-well-Flachbodenmikrotiterplatte löst man 100 µl Anti-BrdU-stock-solution in 10 ml antibody dilution solution. Diese Lösung ist nicht haltbar und muß daher immer kurz vor Gebrauch hergestellt werden.

Die Anti-BrdU-working-solution dient der Bindung des POD-markierten Anti-BrdU-Antikörpers.

Washing solution:

Lösen von Washing buffer concentrate 1:10 mit doppelt destilliertem Wasser. Für eine 96-well-Flachbodenmikrotiterplatte benötigt man 10 ml Washing buffer concentrate mit 90 ml doppelt destilliertem Wasser. Diese Washing solution ist bei 2-8°C für mehrere Wochen haltbar.

Die Washing solution dient dem Abwaschen der ungebundenen Antikörper.

2.3.5.3 Kontrollen

Blank:

Die Blank-Stellen dienen zur Information über das unspezifische Binden des BrdU- und anti-BrdU-POD-Konjugats an die Mikrotiterplatte. Der Extinktionswert dieser Kontrollen sollte 0,1 nicht übersteigen.

Backgroundkontrolle:

Die Backgroundkontrolle gibt Informationen über das unspezifische Bindungsverhalten von anti-BrdU-POD zu den Zellen in Abwesenheit von

BrdU. Die Extinktion sollte hierbei 0,1 nicht übersteigen. Diese Kontrolle kann bei manchen Zelllinien signifikant ansteigen, bei denen hohe Zellkonzentrationen (mehr als 2×10^4 Zellen/100 μ l) verwendet werden.

Übersicht der Kontrollen:

Tabelle 2.2:

Well-Inhalt	Blank	Backgroundkontrolle
Kulturmedium	100 μ l	-
Zellen	-	100 μ l
BrdU	10 μ l	-
Anti-BrdU-POD	100 μ l	100 μ l

2.3.5.4 Arbeitsprotokoll für den Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)

1. Anlegen von Zellkulturen in einer 96-well-Flachbodenmikrotiterplatte mit je 100 μ l Zellkulturmedium pro well und Inkubation der Zelllinien im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ für ca. 48 Stunden.
 - L87/4: 7500 Zellen/well
 - RM26/2-1: 2500 Zellen/well
2. Abnehmen des Zellkulturmediums und Inkubation mit je 100 μ l/well mit den entsprechenden Konzentrationslösungen der zu untersuchenden Immunsuppressiva. Die Inkubation erfolgt ebenfalls für ca. 48 Stunden im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂.
3. Auftauen eines BrdU labeling solution Aliquots bei 37°C für 3 Minuten im Wasserbad.
4. Hinzufügen von 10 μ l/well BrdU labeling solution und erneute Inkubation der Mikrotiterplatte für ca. 12 Stunden im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂.
5. Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf Cellophan, Hinzufügen von 200 μ l/well FixDenat zu den Zellen und Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten.

6. Herstellen der Anti-BrdU-working-solution.
7. Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf Cellophan, Pipettieren von 100 µl/well Anti-BrdU-working-solution zu den Zellen und Inkubation bei Raumtemperatur für 90 Minuten.
8. Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf Cellophan, dreimaliges Ausklopfen und Waschen der Zellen mit je 200 µl/well washing solution.
9. Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf Cellophan, Pipettieren von 100 µl/well substrate solution zu den Zellen und Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
10. Hinzufügen von je 25 µl/well 1 M H₂SO₄, um die Reaktion zu stoppen, Inkubation für eine Minute auf dem Rüttler für Mikrotiterplatten bei 300 rpm und Messung der Extinktion im ELISA-Reader mit folgenden Messbedingungen:

450 nm Messfilter
690 nm Referenzfilter
Schüttelzeit: 20 Sekunden
Schüttelmodus: normal
Schüttelposition: innen

Die Messung muss innerhalb von 5 Minuten nach Hinzufügen der Schwefelsäure erfolgen.

2.3.5.5 Arbeitsprotokoll für DMSO-Hemmversuch

1. Anlegen von Zellkulturen in einer 96-well-Flachbodenmikrotiterplatte mit je 100 µl/well der zu untersuchenden DMSO- und Zellkonzentrationen und Inkubation der Zelllinien im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ für ca. 48 Stunden.

L87/4: 7500 Zellen/well
RM26/2-1: 2500 Zellen/well

2. Auftauen eines BrdU labeling solution Aliquots bei 37°C für 3 Minuten im Wasserbad.
3. Hinzufügen von 10 µl/well BrdU labeling solution 5, 4, 3, 2, 0 Stunden vor der Denaturierung der Zellen und erneute Inkubation der Mikrotiterplatte für die jeweilige Zeit im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Weiteres Verfahren nach 2.3.5.4 Arbeitsprotokoll für den Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Punkt 5.

2.3.6 Auswirkungen der Immunsuppressiva auf das Apoptoseverhalten der Zellen mit Hilfe des Cell death Detection ELISA plus

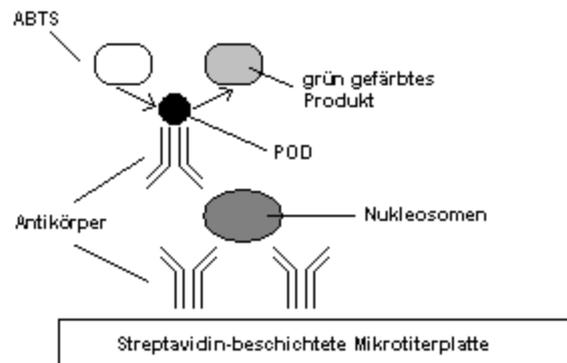
2.3.6.1 Allgemeine Informationen zum Cell death Detection ELISA plus

Der Kit basiert auf dem Prinzip eines Sandwich ELISAs. Er verwendet dazu monoklonale Mausantikörper gegen DNA und Histone. Dies erlaubt die spezifische Bestimmung von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten.

1. Das Zelllysate wird in eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert.
2. Eine Mischung aus Antikörpern gegen Histone und Biotin und Antikörper gegen DNA, gekoppelt mit POD, werden hinzugefügt und inkubiert. Während der Inkubationsphase bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Histon-Komponente der Nukleosomen und verankert gleichzeitig, über den anti-Biotin-Anteil, den Immunkomplex an der Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte. Zusätzlich reagiert der Anti-DNA-POD-Antikörper mit der DNA-Komponente der Nukleosomen.
3. Durch einen Waschvorgang werden ungebundene Komponenten (Antikörper) entfernt.

4. Quantitative Bestimmung der Menge an Nukleosomen durch die PODs, die in den Immunkomplexen verblieben sind. Die Peroxidase verwendet ABTS als Substrat, wodurch ein wasserlösliches, grün gefärbtes Produkt entsteht, das photometrisch messbar ist.

Abbildung 2.5: Cell death Detection ELISA plus



2.3.6.2 Vorbereiten der Arbeitslösungen

Rekonstitution der Lyophilisate für:

- Anti-Histon-Biotin-Lösung
- Anti-DNA-POD-Lösung
- Positivkontrolle

Die Rekonstitution erfolgt jeweils in 450 µl doppelt destilliertem Wasser für 10 Minuten unter Mixen mit Hilfe des Vortex.

Die Lösungen sind bei Lagerung bei 2-8°C ca. zwei Monate verwendbar.

ABTS-Substratlösung:

Lösen der ABTS-Tabletten in 5 ml Substratpuffer pro Tablette. Die Lösung muß vor Licht geschützt werden und kann ca. 1 Monat verwendet werden.

Immunoreagenz-Lösung:

Anti-DNA-POD-Lösung	1/20 des benötigten Volumens
Anti-Histon-Biotin-Lösung	1/20 des benötigten Volumens
Inkubationspuffer	18/20 des benötigten Volumens

Die Immunoreagenz-Lösung kann nicht gelagert werden und sollte stets kurz vor Gebrauch hergestellt werden.

2.3.6.3 Kontrollen

Backgroundkontrolle (Inkubationspuffer):

Der Extinktionswert der Backgroundkontrolle (Inkubationspuffer anstatt Zellysat) ist abhängig von den individuellen Versuchsbedingungen und kann daher variieren. Unter normalen Bedingungen zeigt sich ein Extinktionswert von <100 15 Minuten nach Start der Substratreaktion

Negativkontrolle (nur Zellen mit Medium ohne Medikament):

Abhängig von den Zellkulturbedingungen enthält jede exponentiell wachsende Zellkultur einen gewissen Anteil an toten Zellen (normalerweise annähernd 3-8%). In dem ELISA werden diese toten Zellen in dem unbehandelten Zellysat (ohne Behandlung eines potentiellen Apoptose verursachenden Stoffes) einen gewissen Extinktionswert verursachen. Abhängig von der Menge an toten Zellen kann dieser Extinktionswert den der Backgroundkontrolle übersteigen.

Positivkontrolle (DNA-Histon-Komplex):

Die Positivkontrolle (DNA-Histon-Komplex) sollte, nach Subtraktion der Extinktion der Backgroundkontrolle, eine Extinktion von >600 innerhalb von 15 Minuten nach Start der Substratreaktion zeigen.

Blank (ABTS-Lösung):

Die Blanks dienen zur Messung der Grundextinktion des Substrates, das in diesem Fall das ABTS darstellt.

2.3.6.4 Arbeitsprotokoll zum Cell death Detection ELISA plus

1. Anlegen von Zellkulturen in einer 96-well-Flachbodenmikrotiterplatte mit je 100 μ l Zellkulturmedium pro well und Inkubation der Zelllinien im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ für ca. 48 Stunden.

L87/4: 7500 Zellen/well

RM26/2-1: 2500 Zellen/well

2. Abnehmen des Zellkulturmediums und Inkubation mit je 100 μ l/well mit den entsprechenden Konzentrationslösungen der zu untersuchenden Immunsuppressiva. Die Inkubation erfolgt für ca. 24 Stunden im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂.
3. Zentrifugieren der Mikrotiterplatte mit 1350 rpm für zehn Minuten.
4. Abnehmen und Verwerfung des Überstandes. Der Überstand enthält die DNA, die während der Inkubation aus nekrotischen Zellen ausgetreten ist. Anmerkung: wollte man die Zellen auf Nekrose untersuchen müsste man diesen Überstand für die weitere Untersuchung verwenden.
5. Versetzen der Zellen in der Mikrotiterplatte mit je 200 μ l Lysepuffer.
6. Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur.
7. Zentrifugieren der Mikrotiterplatte mit 1.350 rpm für 10 Minuten. Die intakten Zellkerne verbleiben im Pellet.
8. Vorsichtiges abpipettieren und übertragen von 20 μ l des Überstandes in eine Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte. Weiterhin werden je 20 μ l der Positiv-, der Negativ- und der Backgroundkontrolle in die Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert.
9. Hinzufügen von 80 μ l Immunoreagenz-Lösung pro well
10. Bedecken der Mikrotiterplatte mit einer Klebeschutzfolie und Inkubation auf einem Mikrotiterplattenshaker mit 300 rpm und bei Raumtemperatur für zwei Stunden.
11. Vorsichtiges Ausklopfen der Mikrotiterplatte

12. Dreimaliges Waschen bzw. Ausspülen der Mikrotiterplatte mit 250 μ l Inkubationspuffer pro well.
13. Sorgfältiges und Vorsichtiges Ausklopfen der Mikrotiterplatte.
14. 100 μ l ABTS pro well und zusätzlich pipettieren von Blanks zur Kontrolle.
15. Inkubation auf einem Mikrotiterplattenshaker mit 250 rpm für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
16. Messung der Extinktion im ELISA-Reader mit folgenden Messbedingungen:

450 nm Messfilter
492 nm Referenzfilter
Schüttelzeit: 9 Sekunden
Schüttelmodus: normal
Schüttelposition: innen

2.4 Semiquantitative Untersuchung der Auswirkung von Immunsuppressiva auf das Expressionsgleichgewicht der kostimulatorischen Proteine B7.1 und B7H1

2.4.1 Inkubation der Zellen und Zusetzen der Immunsuppressiva

1. Aussaat der Zellen in T25 Zellkulturflaschen in 8ml Medium:
RM26/2-1: 3,91 x 10⁵ Zellen
L87/4: 11,72 x 10⁵ Zellen
2. Inkubation für ca. 48 Stunden im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂.
3. Zusatz der Immunsuppressiva und weitere Inkubation für ca. 48 Stunden im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂.
4. Medium abpipettieren
5. RNA-Isolierung

2.4.2 RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit 50 von Quiagen und dem DNA-free Kit von Ambion

Zur Bestimmung der Expression der kostimulatorischen Proteine B71 und B7H1 werden die Zellen zunächst einer RNA-Isolierung unterzogen. Dazu werden der RNeasy Mini Kit 50 von Quiagen und der DNA-free Kit von Ambion verwendet. Die Kits ermöglichen die Isolation von RNA ausgehend von wenig Zellmaterial.

Arbeitsprotokoll:

- Zellen 2x mit PBS waschen
- abtrypsinieren
- in PBS aufnehmen
- abzentrifugieren
- Überstand verwerfen
- gut aufschütteln!
- Probenpuffer entsprechende Menge β -Mercaptoethanol. Zusetzen (Bsp: 6 μ L β -M./600 μ L Puffer)
- Puffer- β -Mercaptoethanol -Gemisch auf Zellen geben und vortexen
- über Quiagen Shredder Säulen homogenisieren
- Säulen verwerfen
- Zentrifugat und äquivalente Menge EtOH 70%, mit Pipette mischen
- max. 700 μ L davon auf Säule geben, für 15 Sec. 10.000 rpm (bei größerem Volumen Vorgang wiederholen)
- Zentrifugat verwerfen
- 700 μ L RW1-Puffer zugeben, 15 Sec. 10.000 rpm
- neues 2mL Cup verwenden
- 500 μ L RPE-Puffer zugeben, 15 Sec. 10.000 rpm
- Zentrifugat verwerfen
- erneut 500 μ L RPE-Puffer zugeben, 2 Min. 14.000 rpm
- Zentrifugat verwerfen und 1 Min. 14.000 rpm
- neues 1,5 mL Cup verwenden, 30 μ L H₂O auf Säule geben, 1 Min. stehen lassen, 10.000 rpm
- bei erwartet hoher Ausbeute an RNA, nochmals 30 μ L H₂O zugeben, 1 Min. stehen lassen, 10.000 rpm

- Hinzugeben von 1/10 des Volumens 10x DNase I Puffer und 1 μ l DNase I (2 Units)
- 30 Min. Inkubation bei 37°C
- Hinzugeben von 1/10 des Volumens 10x DNase Inaktivierungs-Puffer, vortexen
- 2 Min. Inkubation bei Raumtemperatur
- 1 Min., 10.000 x g
- Überstand abziehen, Rest verwerfen
- Messung der optischen Dichte (Wellenlänge: 260 nm bzw. 280 nm)

2.4.3 cDNA-Synthese

Die relative Menge an RNA kann nach Umschreiben der RNA in die komplementäre DNA (cDNA) durch die Polymerasekettenreaktion ermittelt werden. Dieser Prozess geschieht mit Hilfe des retroviralen Enzyms reverse Transkriptase. Die reverse Transkription der RNA wird durch den Einsatz von Oligo p(dt) Primern gewährleistet, da diese an den der RNA eigenen Poly-A-Schwanz binden. Es wird dabei nach folgendem Protokoll verfahren:

Reaktionsansatz:

1) Reverse-Transkriptasemix:

dNTPs	2 μ l
Oligo p(dt)	2 μ l
RNasin	0,5 μ l
5x konz. Puffer	4 μ l
MMLV	1 μ l

2) 11 μ l Reverse-Transkriptasemix + 9 μ l (=2 μ g) RNA (in H₂O)

Durchführung: 1 Stunde bei 42°C im Cycler

2.4.4 Amplifikation der cDNA durch PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) stellt eine einfache und schnelle Methode dar, zahlreiche Kopien spezifischer DNA-Sequenzen zu erhalten. Die Methode beruht auf der wiederholten Hitzedenaturierung der als Ausgangsmaterial vorliegenden doppelsträngigen DNA mit anschließender Wiederherstellung der Einzelstränge unter Abkühlung. Hierbei hybridisiert jeweils ein in großem Überschuss vorhandener Primer („annealing“) mit dem 5'-Ende bzw. dem 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz. Der Zusatz einer thermostabilen DNA-Polymerase und allen vier Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (A, C, T, G) bewirkt die Synthese des neuen Komplementärstranges. In zahlreichen Zyklen erhält man nach wiederholter DNA-Fragmentierung, Primerhybridisierung und DNA-Synthese große Mengen der gewünschten DNA-Sequenz.

Als Kontrolle wird von jeder cDNA zusätzlich eine Aktin PCR durchgeführt. Bei Aktin handelt es sich um eine ubiquitär in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimierte mRNA (sog. „housekeeping gene“). Durch die Aktin PCR kann die Menge an cDNA der verschiedenen Proben sowie deren Qualität überprüft werden.

Reaktionsansatz:

1) PCR-Mastermix:

Puffer	1,25 µl
dNTPs	0,1 µl
Primer (100pmol) fwd + rev	0,05 µl
H ₂ O	8,5 µl
Taq	0,05 µl
cDNA	2,5 µl (0,25µg)

2) Aufteilung in die Gruppen A, B, C, D

3) PCR Bedingungen für die Gruppen:

A:	60°C	21 Zyklen
B:	60°C	24 Zyklen
C:	60°C	27 Zyklen
D:	60°C	30 Zyklen

Durchführung:

Cycler-Temperatur-Programmierung:

1) initiale Denaturierung	2 Minuten	98°C
2) Denaturierung	30 Minuten	98°C
3) Primer-Hybridisierung	30 Minuten	60°C
4) Elongation	45 Sekunden	72°C
5) Abschluss	7 Minuten	72°C

Die Punkte 2)-4) werden je nach gewünschter Zyklenzahl wiederholt.

2.4.5 Gelelektrophorese und Darstellung der DNA-Fragmente

Mit Hilfe der Agarose Gelelektrophorese können DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld zur Auftrennung gebracht werden. Die Nukleinsäuren wandern auf Grund ihrer negativen Ladung dabei zur Anode. Die einzelnen Fragmente werden ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei die Migrationsgeschwindigkeit zum inversen Logarithmus des Molekulargewichtes direkt proportional ist. Dem Agarosegel wird Ethidiumbromid zugefügt, das sich in die doppelsträngige DNA-Fragmente einlagern und durch UV-Licht bei einer Wellenlänge von 266 nm fluoreszieren kann.

Durchführung:

- 1) Gelherstellung:
 - 1,8% Agarose in 50 ml EDTA-Puffer geben
 - 1 Minute bei 750 Watt in die Mikrowelle
 - abkühlen lassen
 - 1 µl Ethidiumbromid zugeben
- 2) Elektrophorese mit TBE-Ladepuffer bei 100 Volt
- 3) Darstellung und Dokumentation der DNA-Fragmente mit Hilfe des Image Master VDS

2.5 Festlegen der therapeutischen Konzentration der Immunsuppressiva

Immunsuppressiva, deren Wirkung auf Antikörpern beruhen, werden im klinischen Alltag oft in mg/kg Körpergewicht dosiert. Bezogen auf die Zellkultur ist diese Dosierung nicht möglich und bedarf bei fehlender Angabe einer therapeutischen Medikamentenserumkonzentration einer Annäherung:

Es wird angenommen, dass ein durchschnittlicher Mensch etwa 75 kg wiegt und 6 l zirkulierendes Blut besitzt. Man könnte nun annehmen, dass sich der Antikörper nur in diesen 6 l verteilt und berechnet damit die Medikamentenkonzentration pro Volumen (wohlwissentlich, dass Verteilungsvolumina von Medikamenten sehr stark variieren können).

Daraus ergibt sich folgende Rechnung, die anhand des Immunsuppressivums Thymoglobulin erläutert werden soll:

Zur Abstoßungsprophylaxe nach einer Organtransplantation werden laut Beipackzettel 1,25 - 2,5 mg Thymoglobulin pro kg Körpergewicht verwendet.

Dies ergibt eine mittlere Konzentration von 1,875 mg Thymoglobulin pro kg Körpergewicht.

Bei Annahme, dass der menschliche Körper 75 kg wiegt und dabei 6 l Blut enthält, ergibt sich:

$$\begin{array}{rclclcl}
 75 \times 1,875 \text{ mg Thymoglobulin} & & X \text{ ml Thymoglobulin} & & & \\
 \text{-----} & = & \text{-----} & \Rightarrow & X & = 0,0023437 \text{ mg Thymoglobulin} \\
 6000 \text{ ml Blut} & & 0,1 \text{ ml Medium} & & & = 2,3437 \mu\text{g Thymoglobulin}
 \end{array}$$

Dies würde eine Konzentration von 2,3437 μg Thymoglobulin/100 μl bzw. 23,437 μg Thymoglobulin/ml bedeuten.

Kawano et al. beschreiben in ihrem Artikel „Cytotoxic and stimulatory effects of antilymphocyte globulin (ALG) on hematopoiesis“ [80] eine komplette Lymphozytentoxizität bei einer Konzentration von 6,3 bis 25 μg ALG/ml Medium.

Der oben berechnete Wert liegt im Bereich der Kawano-Studie und erscheint somit realistisch und als therapeutische Ausgangskonzentration in der Zellkultur einsetzbar.

Medikamente, deren therapeutische Konzentration in der Zellkultur auf diese Art berechnet wurden:

Medikament:	Konzentration/100 μ l Medium:
Thymoglobulin	2,343 μ g
Lymphoglobulin	12,5 μ g
Simulect	25 μ g
ATG	4,375 μ g

Bei Medikamenten, deren Dosierung in Form einer Serum- oder Vollblutkonzentration angegeben wird, wurde diese für die Konzentration im Zellkulturmedium übernommen:

Medikament:	Konzentration/100 μ l Medium:
Ciclosporin A	25 ng
Tacrolimus	1,5 ng

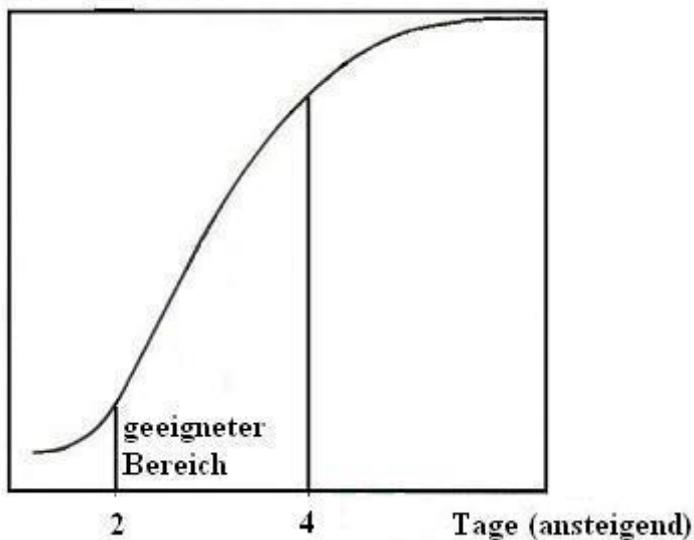
3 Ergebnisse

3.1 Etablierung geeigneter Ausgangsbedingungen der Experimente

Ziel war es geeignete Ausgangsbedingungen für die Experimente zu erstellen, bei denen die verwendeten Zellen sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Diese sollte zu Beginn des Experimentes einsetzen und möglichst bis Ende des Experimentes andauern, um gleichbleibende, reproduzierbare Bedingungen zu schaffen. Gesucht wurde deshalb eine definierte Zellmenge die nach zwei Tagen Kultivierung ihre exponentielle Wachstumsphase erreicht und diese über einen Zeitraum von zwei bis vier Tagen beibehält, um in dieser Zeit die Experimente durchführen zu können. Abb. 3.1 stellt den geeigneten Zeitraum für die Experimente in einer Zellwachstumskurve schematisch dar.

Abb 3.1:

Zellzahl (ansteigend)



Es wurde eine bestimmte Zellzahl pro 100 μ l Medium kultiviert und mit Hilfe des Cell Counting Kit 8 eine Zellwachstumskurve über den angestrebten Zeitraum erstellt. Dies wurde sowohl für die menschliche Zelllinie L87/4 als auch für die murine Zelllinie RM26 mit verschiedenen Zellzahlen durchgeführt.

Die Abbildungen 3.2 bis 3.8 zeigen die Wachstumskurven der humanen Zelllinie, die Abbildungen 3.9 bis 3.14 die der murinen Zelllinie. Die Ordinate zeigt hierbei die Extinktion, die der relativen Zellzahl entspricht, und die Abszisse die Anzahl an Tagen nach Beginn der Kultivierung bzw. nach Aussaat der Zellen. Zur Darstellung wurden Box-Plots gewählt, die den Median, den Bereich zwischen der 25. und der 75. Quartile sowie Maximum und Minimum darstellen. Im Einzelnen zeigen die Abbildungen:

Abb. 3.2:
500 humane Zellen / 100 μ l
n = 2

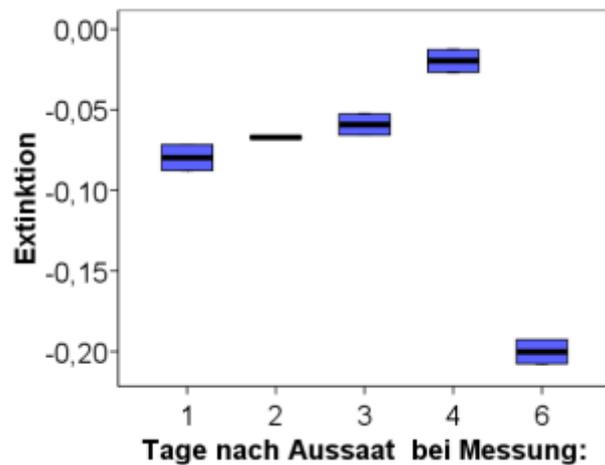


Abb. 3.2: Es wurden je 500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 μ l Medium kultiviert und dann jeweils an den Tagen eins, zwei, drei, vier und sechs nach Aussaat der Zellen die relative Zellzahl bestimmt. Diese spiegelt sich direkt im Maß der dargestellten Extinktion wider (je höher die Extinktion, desto höher die relative Zellzahl).

Es zeigen sich während der gesamten sechs Tage nur negative Extinktionswerte. Dies bedeutet, dass sich keine relevante Zellvermehrung abgespielt hat, keine exponentielle Wachstumsphase aufgetreten ist und sogar ein Absterben der Zellen zum sechsten Tag hin stattgefunden hat.

Abb. 3.3:
1.000 humane Zellen / 100 μ l
n = 2

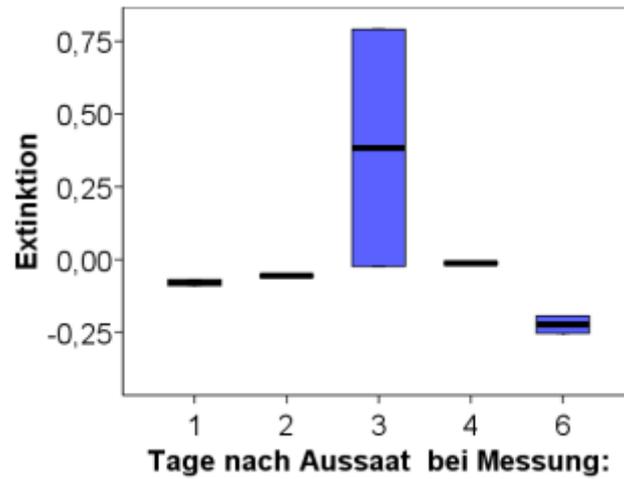


Abb. 3.3: Es wurden je 1.000 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 μ l Medium kultiviert und danach wie in Abb. 3.2 verfahren. Vernachlässigt man die Messung an Tag drei traten auch hier keine Zellvermehrung oder exponentielle Wachstumsphase auf.

Abb. 3.4:
2.500 humane Zellen / 100 μ l
n = 6

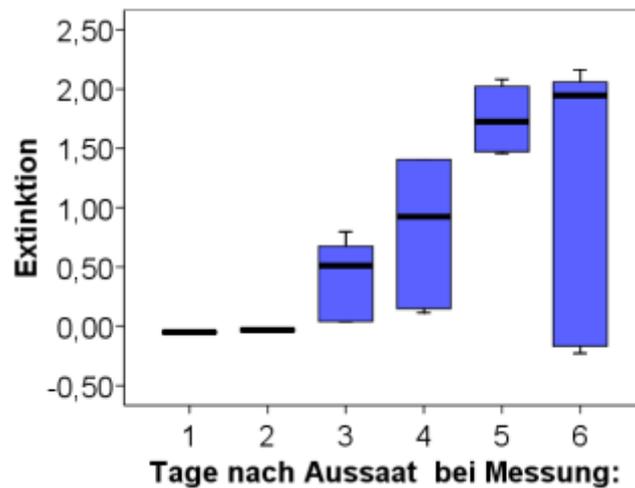


Abb. 3.4: Es wurden je 2.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 μ l Medium kultiviert und dann jeweils an den Tagen eins bis sechs nach Aussaat der Zellen die relative Zellzahl bestimmt. Diese spiegelt sich direkt im Maß der dargestellten Extinktion wider (je höher die Extinktion, desto höher die relative Zellzahl).

Wie an der Extinktion deutlich zu sehen, kommt es zu einer Zellvermehrung ab Tag zwei, die zwischen dem dritten und dem fünften Tag eine exponentielle Wachstumsphase zeigt.

Abb. 3.5:
5.000 humane Zellen / 100 μ l
n = 6

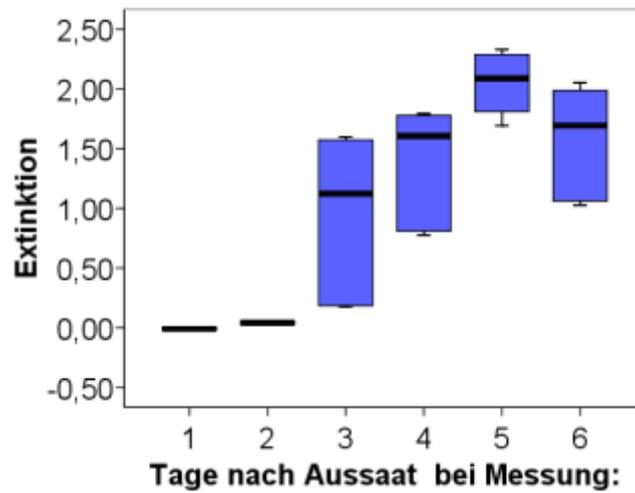


Abb. 3.5: Es wurden je 5.000 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 μ l Medium kultiviert und danach wie in Abb. 3.4 verfahren.

Hier beginnt die exponentielle Wachstumsphase nach dem zweiten Tag und endet zwischen dem vierten und fünften Tag nach Aussaat der Zellen.

Abb. 3.6:
7.500 humane Zellen / 100 μ l
n = 6

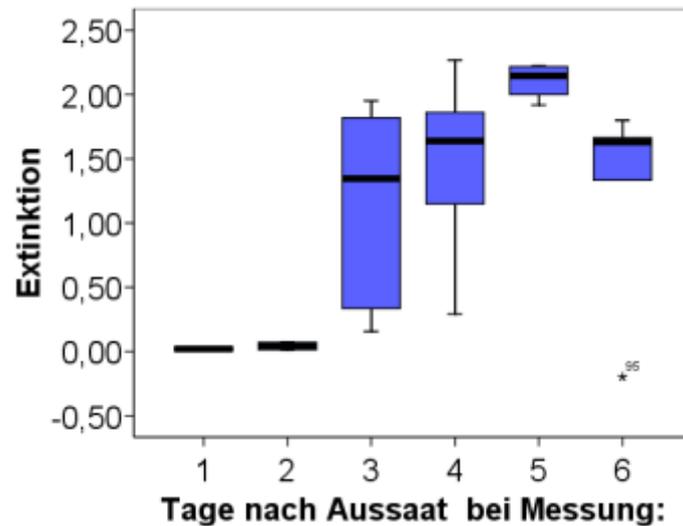


Abb. 3.6: Es wurden je 7.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 μ l Medium kultiviert und dann jeweils an den Tagen eins bis sechs nach Aussaat der Zellen die relative Zellzahl bestimmt. Diese spiegelt sich direkt im Maß der dargestellten Extinktion wider (je höher die Extinktion, desto höher die relative Zellzahl).

Die Extinktion zeigt eine exponentielle Wachstumsphase, die zwei Tage nach Aussaat der Zellen beginnt und ungefähr am vierten Tag endet.

Abb. 3.7:
10.000 humane Zellen / 100 μ l
n = 5

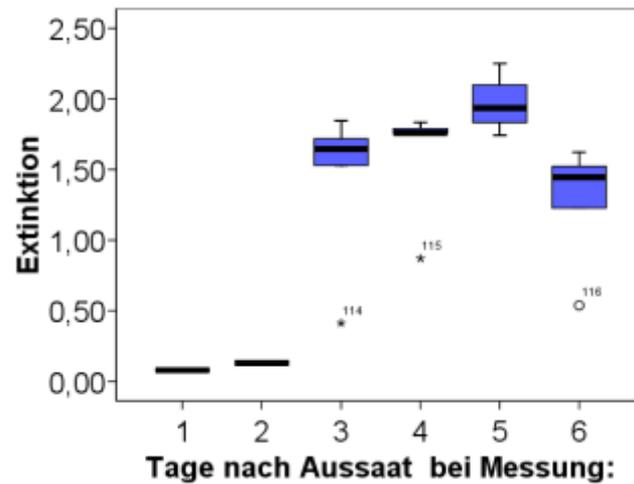


Abb. 3.7: Es wurden je 10.000 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 μ l Medium kultiviert und im Anschluss wie in Abb. 3.6 verfahren.
Hier endet die exponentielle Wachstumsphase bereits am dritten Tag

Abb. 3.8:
12.500 humane Zellen / 100 µl
n = 4

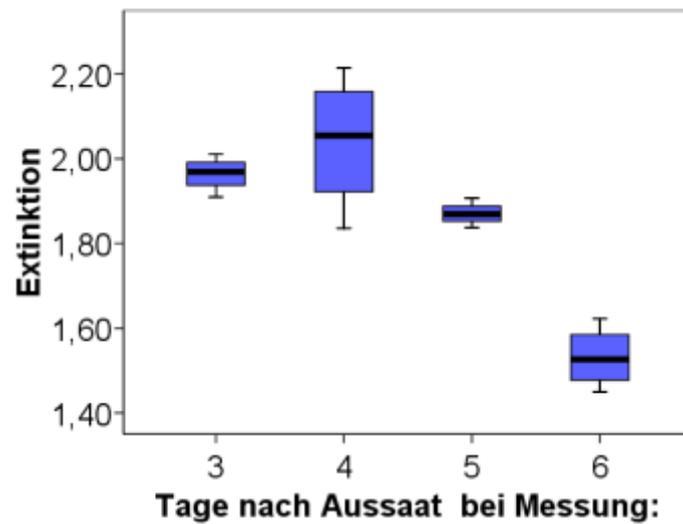


Abb. 3.8: Es wurden je 12.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 µl Medium kultiviert und dann jeweils an den Tagen drei bis sechs nach Aussaat der Zellen die relative Zellzahl bestimmt. Diese spiegelt sich direkt im Maß der dargestellten Extinktion wider (je höher die Extinktion, desto höher die relative Zellzahl).

Hier verdeutlicht die Extinktion, dass die exponentielle Wachstumsphase nach drei Tagen bereits stattgefunden hat und sich an die Phase der Zellvermehrung ein Rückgang der Zellen anschließt, sei es aus Platzmangel oder sei es aus Mangel an Nährstoffen.

Abb. 3.9:
1.000 murine Zellen / 100 μ l
n = 8

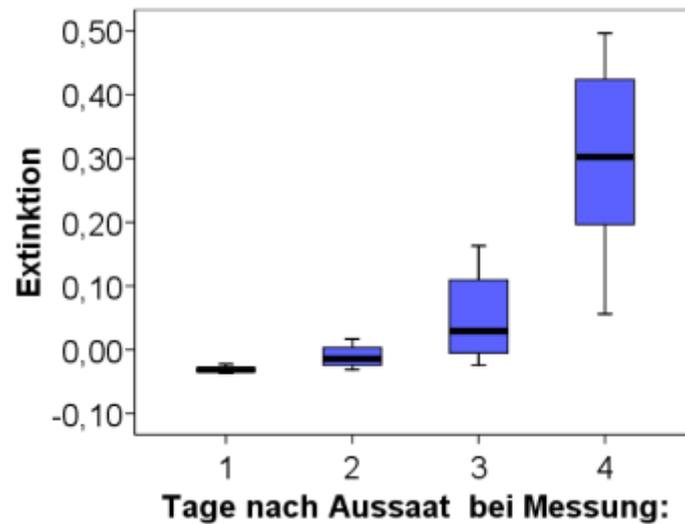


Abb. 3.9: Es wurden je 1.000 Zellen der murinen Zelllinie RM26 in 100 μ l Medium kultiviert und dann jeweils an den Tagen eins, zwei, drei und vier nach Aussaat der Zellen die relative Zellzahl bestimmt. Diese spiegelt sich direkt im Maß der dargestellten Extinktion wider (je höher die Extinktion, desto höher die relative Zellzahl).

Aus den Extinktionswerten lässt sich schließen, dass bei dieser Anfangszellzahl drei Tage nach Aussaat die exponentielle Wachstumsphase der Zellen beginnt.

Abb. 3.10:
2.500 murine Zellen / 100 μ l
n = 12

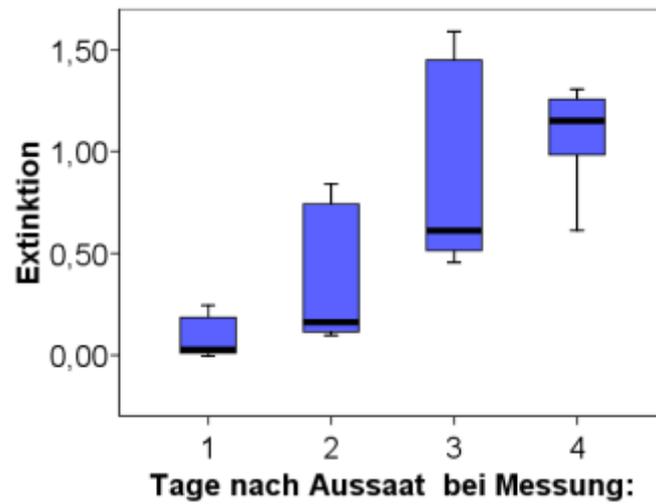


Abb. 3.10: Es wurden je 2.500 Zellen der murinen Zelllinie RM26 in 100 μ l Medium kultiviert und danach wie in Abb. 3.9 verfahren.
Es zeigt sich ein Beginn der exponentiellen Wachstumsphase nach dem zweiten Tag, die bis zum vierten Tag anhält.

Abb. 3.11:
5.000 murine Zellen / 100 μ l
n = 12

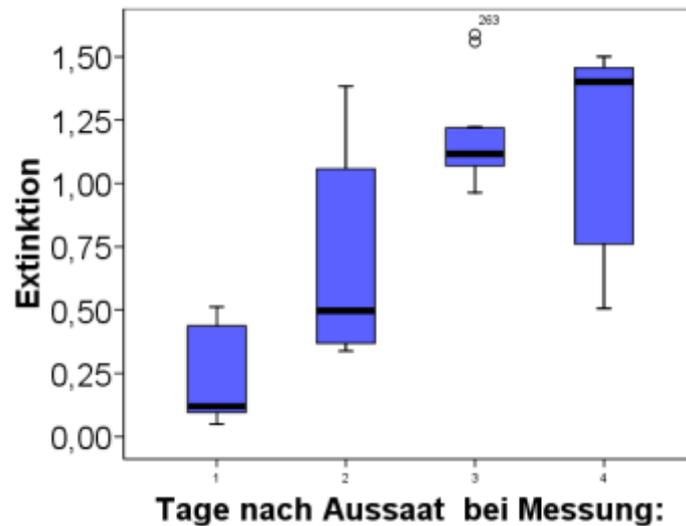


Abb. 3.11: Es wurden je 5.000 Zellen der murinen Zelllinie RM26 in 100 μ l Medium kultiviert und dann jeweils an den Tagen eins, zwei, drei und vier nach Aussaat der Zellen die relative Zellzahl bestimmt. Diese spiegelt sich direkt im Maß der dargestellten Extinktion wider (je höher die Extinktion, desto höher die relative Zellzahl).

Zwei Messwerte die an Tag drei sehr abweichend von den übrigen Messwerten waren, wurden außerhalb des Boxplots als Einzelwerte dargestellt.

Die Messungen ergeben eine exponentielle Wachstumsphase, die bis Tag drei nach Aussaat der Zellen anhält.

Abb. 3.12:
7.500 murine Zellen / 100 μ l
n = 12

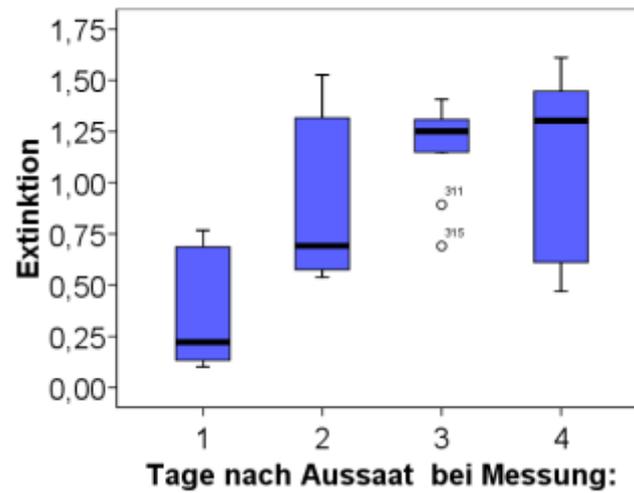


Abb. 3.12: Es wurden je 7.500 Zellen der murinen Zelllinie RM26 in 100 μ l Medium kultiviert und danach wurde wie in Abb 3.11 verfahren. Ähnlich wie in Abb. 3.11 zeigt sich die exponentielle Wachstumsphase nach drei Tagen als beendet.

Abb. 3.13:
10.000 Zellen / 100 μ l
n = 12

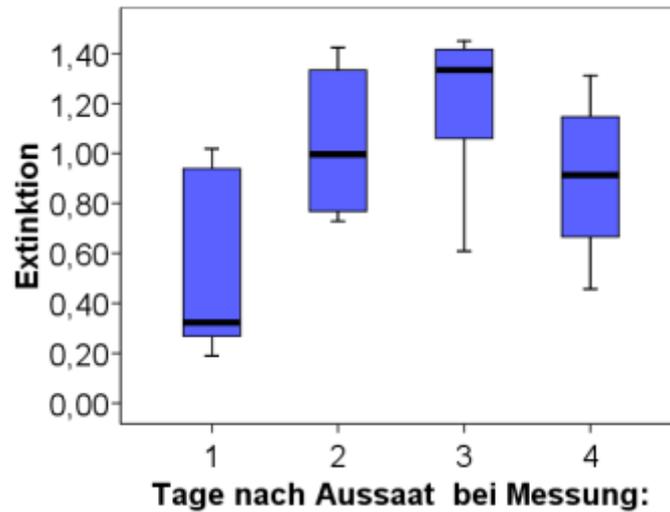


Abb. 3.13: Es wurden je 10.000 Zellen der murinen Zelllinie RM26 in 100 μ l Medium kultiviert und dann jeweils an den Tagen eins, zwei, drei und vier nach Aussaat der Zellen die relative Zellzahl bestimmt. Diese spiegelt sich direkt im Maß der dargestellten Extinktion wider (je höher die Extinktion, desto höher die relative Zellzahl).

Vier Tage nach Aussaat der Zellen zeigt sich ein Populationsrückgang.

Abb. 3.14:
12.500 murine Zellen / 100 μ l
n = 4

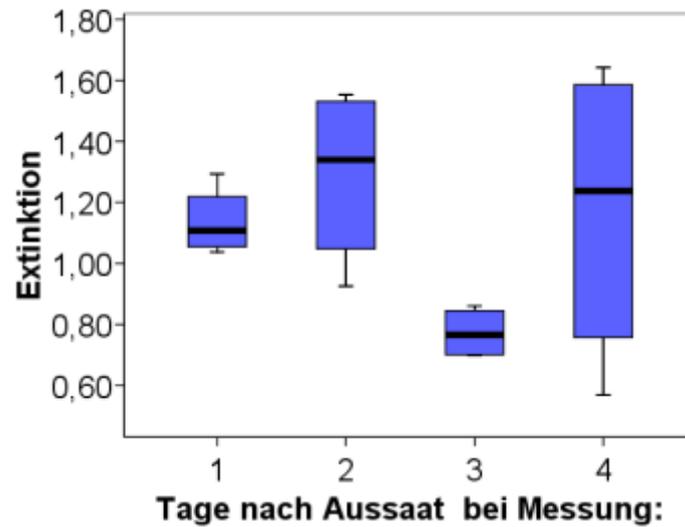


Abb. 3.14: Es wurden je 12.500 Zellen der murinen Zelllinie RM26 in 100 μ l Medium kultiviert und danach wie in Abb. 3.13 verfahren.

Die Extinktion zeigt Schwankungen einer ungefähr gleich bleibenden Zellpopulation, jedoch kein Wachstum.

3.2 Apoptoseverhalten bei verschiedenen Konzentrationen an Immunsuppressiva

Um das Apoptoseverhalten der Stammzellen in Gegenwart der Immunsuppressiva zu beurteilen wurden die murine und die humane Zelllinie mit je drei verschiedenen Konzentrationen an Immunsuppressiva inkubiert. Ausgegangen wurde hierbei von der im klinischen Alltag verwendeten therapeutischen Blut-Serum-Konzentration des Medikamentes, der so genannten therapeutischen Konzentration. Zusätzlich wurden je zwei weitere Konzentrationen untersucht. Mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA plus wurde das relative Ausmaß der Apoptose bestimmt, das während der Inkubationszeit auftrat. Dieses entspricht der in der Ordinate dargestellten Extinktion. Je höher die gemessene Extinktion, desto höher die Zahl der Zellen, die eine Apoptose eingegangen sind. Die Abszisse zeigt die Konzentration des Medikamentes.

Um das Ausmaß der induzierten Apoptose einschätzen zu können, wurde eine weitere Testreihe mit Staurosporin unternommen. Dabei handelt es sich um einen Stoff, der bei Zellen nachweislich eine Apoptose induziert [89] und hier als Positivkontrolle dienen soll.

Bei DMSO handelt es sich um einen Stoff, der in höheren Konzentrationen zum Tod der Zellen führt, ohne dabei eine Apoptose zu induzieren. Hiermit soll gezeigt werden, dass die Messungen nicht durch zugrunde gegangene Zellen beeinflusst wird, die keine Apoptose eingegangen sind.

Es wurden jeweils 4-fach-Bestimmungen durchgeführt ($N = 4$) und die Messwerte mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Die Ergebnisse wurden anhand von Kontrollen nivelliert und sind somit direkt vergleichbar.

Der Extinktionswert 0 entspricht der Negativkontrolle.

Abb. 3.15:
Simulect bei humanen Zellen

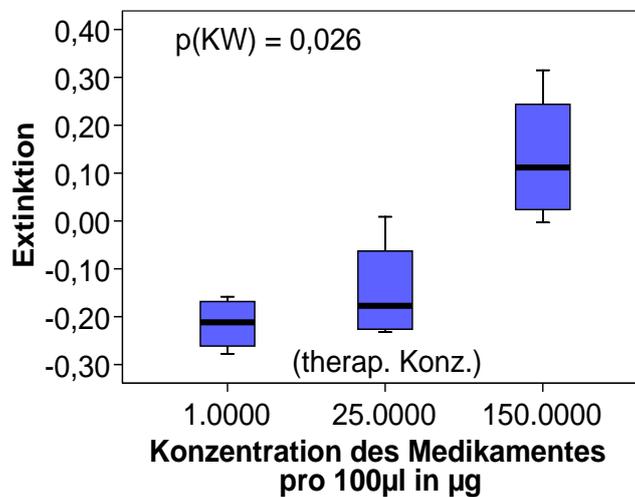


Abb. 3.15: Es wurden 7.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 µl Medium für 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen des Immunsuppressivums Simulect (Basiliximab, monoklonaler, chimärer Mensch-Maus-Anti-CD25-Antikörper) für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss die Messung der Apoptoseaktivität durchgeführt. Die Abszisse zeigt die Medikamentenkonzentration (darunter die therapeutische Konzentration), die Ordinate zeigt die Extinktion, die ein semiquantitatives Maß für die Apoptose darstellt. Des Weiteren wird der p-Wert der Auswertung angegeben.

Die Grafik zeigt, dass bei einer sehr niedrigen Konzentration des Medikamentes und der therapeutischen Konzentration keine vermehrte Apoptose auftritt. Wird die therapeutische Konzentration von Simulect jedoch um den Faktor 6 erhöht, zeigt sich eine signifikant erhöhte Apoptoseaktivität der Zellpopulation.

Abb. 3.16:
Thymoglobulin bei humanen Zellen

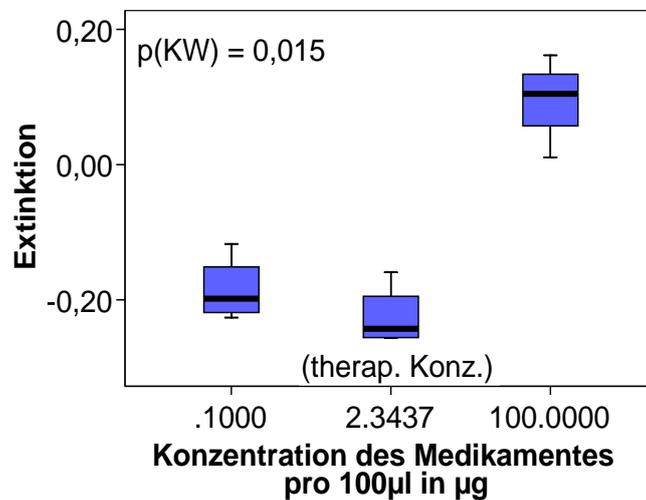


Abb. 3.16: Es wurden 7.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 µl Medium 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen des Immunsuppressivums Thymoglobulin (polyklonaler Antikörper vom Kaninchen) 24 Stunden inkubiert und im Anschluss wie in Abb. 3.15 verfahren.

Auch bei Thymoglobulin kommt es bei Erhöhung der therapeutischen Konzentration um den Faktor 43 zu einer signifikant höheren Apoptoserate der Zellen.

Abb. 3.17:
ATG bei humanen Zellen

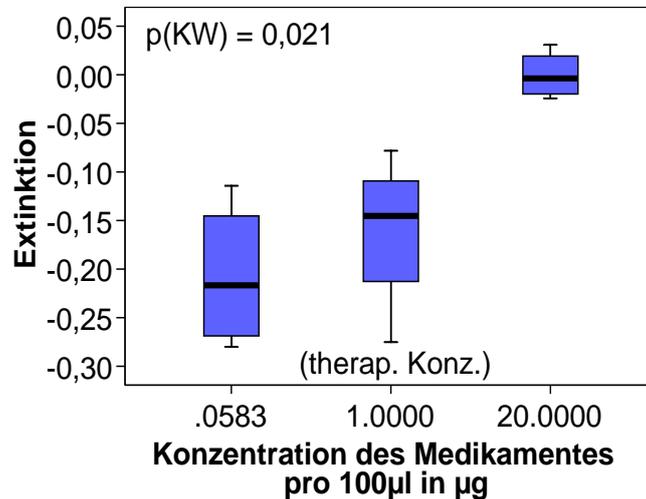


Abb. 3.17: Es wurden 7.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 µl Medium für 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen des Immunsuppressivums ATG (Anti-Human-T-Lymphozyten-Immuneserum vom Kaninchen) 24 Stunden inkubiert und im Anschluss die Messung der Apoptoseaktivität durchgeführt. Die Abszisse zeigt die Medikamentenkonzentration (darunter die therapeutische Konzentration), die Ordinate zeigt die Extinktion, die ein semiquantitatives Maß für die Apoptose darstellt. Des Weiteren wird der p-Wert der Auswertung angegeben.

Auch bei ATG resultiert eine signifikant erhöhte Apoptose bei Erhöhung der therapeutischen Konzentration um den Faktor 20.

Abb. 3.18:
Tacrolimus bei humanen Zellen

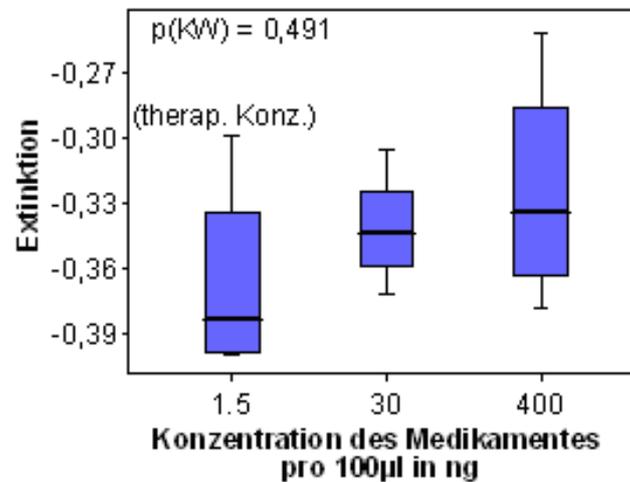


Abb. 3.18: Es wurden 7.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 µl Medium für 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen des Immunsuppressivums Tacrolimus (Calcineurininhibitor) 24 Stunden inkubiert und im Anschluss wie in Abb. 3.17 verfahren.

Im Gegensatz zu Simulect, Thymoglobulin und ATG zeigt sich bei Erhöhung der therapeutischen Konzentration bei Tacrolimus um den Faktor 20 keine signifikant vermehrte Apoptose.

Abb. 3.19:
Ciclosporin bei humanen Zellen

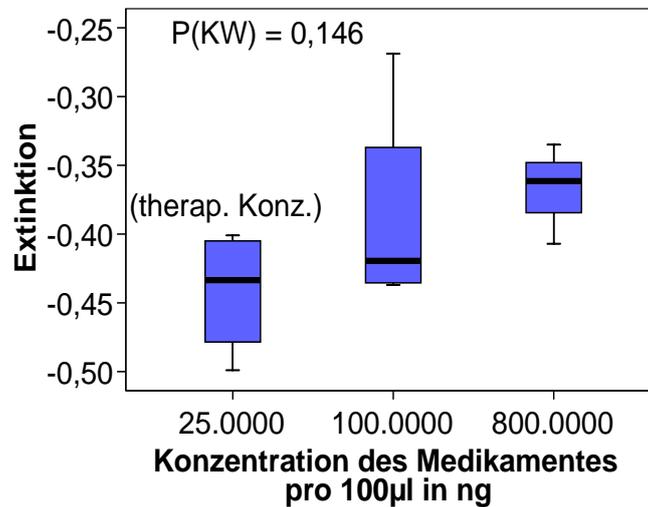


Abb. 3.19: Es wurden 7.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 µl Medium 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen des Immunsuppressivums Ciclosporin (Calcineurininhibitor) 24 Stunden inkubiert und im Anschluss die Messung der Apoptoseaktivität durchgeführt. Die Abszisse zeigt die Medikamentenkonzentration (darunter die therapeutische Konzentration), die Ordinate zeigt die Extinktion, die ein semiquantitatives Maß für die Apoptose darstellt. Des Weiteren wird der p-Wert der Auswertung angegeben.

Wie bei dem Calcineurininhibitor Tacrolimus zeigt sich auch unter Ciclosporin keine signifikant erhöhte Apoptose bei Erhöhung der therapeutischen Konzentration um den Faktor 32.

Abb 3.20:
Lymphoglobulin bei humanen Zellen

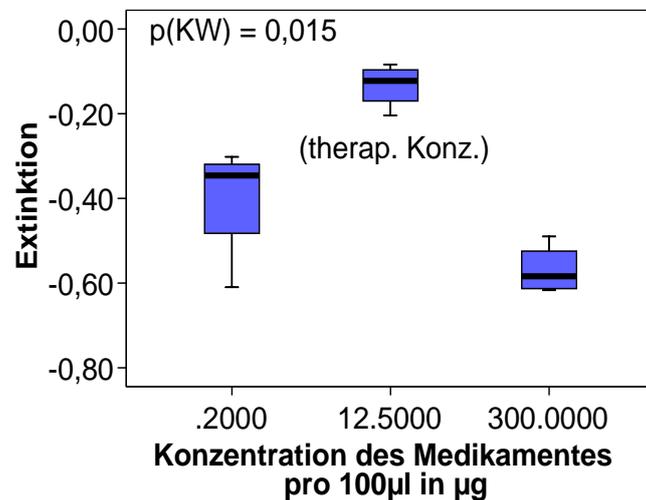


Abb. 3.20: Es wurden 7.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 µl Medium 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen des Immunsuppressivums Lymphoglobulin (polyklonaler Antikörper vom Pferd) 24 Stunden inkubiert und im Anschluss wie in Abb. 3.19 verfahren.

Die Grafik zeigt eine signifikant erhöhte Apoptose bei der therapeutischen Konzentration im Gegensatz zur niedrigeren und zur höheren Konzentration. Die Extinktionswerte sind jedoch alle negativ. Dies zeigt, dass die Apoptoseaktivität der humanen Stammzellen bei allen untersuchten Medikamentenkonzentrationen unter der Apoptoseaktivität der Negativkontrolle liegt.

Abb. 3.21:
Tacrolimus bei murinen Zellen

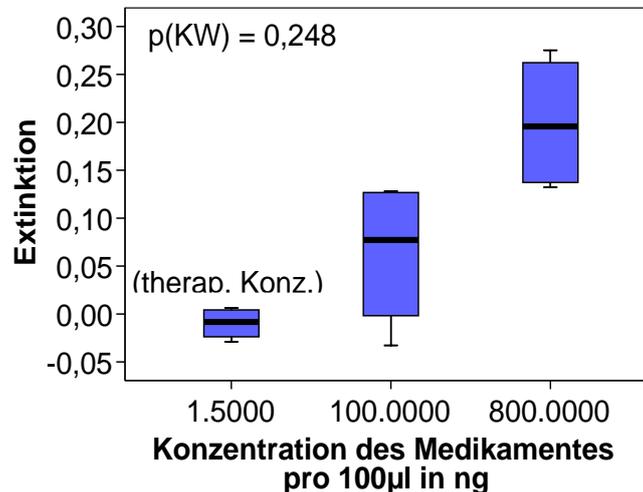


Abb. 3.21: Es wurden 2.500 Zellen der murinen Zelllinie RM26 in 100 µl Medium 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen des Immunsuppressivums Tacrolimus (Calcineurininhibitor) für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss die Messung der Apoptoseaktivität durchgeführt. Die Abszisse zeigt die Medikamentenkonzentration (darunter die therapeutische Konzentration), die Ordinate zeigt die Extinktion, die ein semiquantitatives Maß für die Apoptose darstellt. Des Weiteren wird der p-Wert der Auswertung angegeben.

Es zeigt sich eine deutlich vermehrte Apoptose bei Erhöhung der therapeutischen Konzentration um den Faktor 67, die jedoch nicht signifikant ist. Erst bei sehr hohen Konzentrationen (Faktor 533) zeigt sich die Apoptoserate signifikant erhöht im Vergleich zur therapeutischen Konzentration.

Abb. 3.22:
Ciclosporin bei murinen Zellen

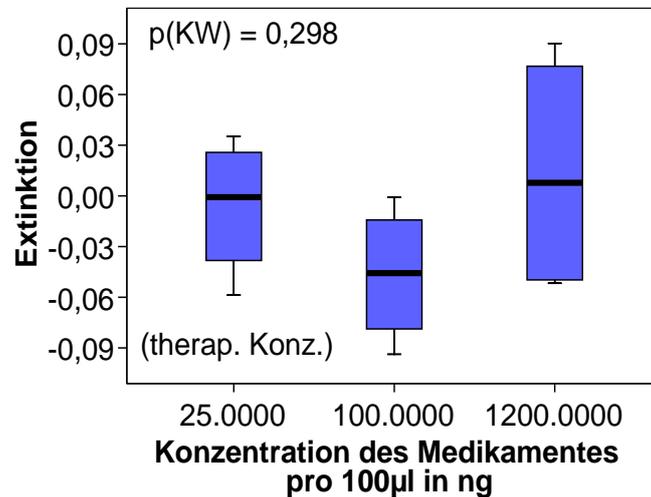


Abb. 3.22: Es wurden 2.500 Zellen der murinen Zelllinie RM26 in 100 µl Medium 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen des Immunsuppressivums Ciclosporin (Calcineurininhibitor) 24 Stunden inkubiert und im Anschluss wie in Abb. 3.21 verfahren.

Es kommt zu keinem signifikanten Anstieg der Apoptose durch höhere Medikamentenkonzentrationen.

Abb. 3.23:
DMSO bei humanen Zellen

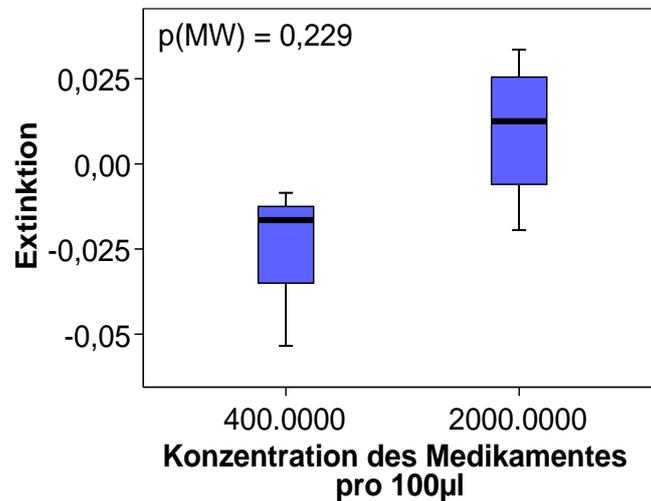


Abb. 3.23: Es wurden 7.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 µl Medium 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit zwei verschiedenen Konzentrationen DMSO 24 Stunden inkubiert und im Anschluss die Messung der Apoptoseaktivität durchgeführt. Die Abszisse zeigt die Medikamentenkonzentration, die Ordinate zeigt die Extinktion, die ein semiquantitatives Maß für die Apoptose darstellt. Des Weiteren wird der p-Wert der Auswertung angegeben. Wie gefordert kommt es unter DMSO zu keiner signifikanten Erhöhung der Apoptose in Bezug zur Negativkontrolle bzw. zum Extinktionswert 0.

Abb. 3.24:
DMSO bei murinen Zellen

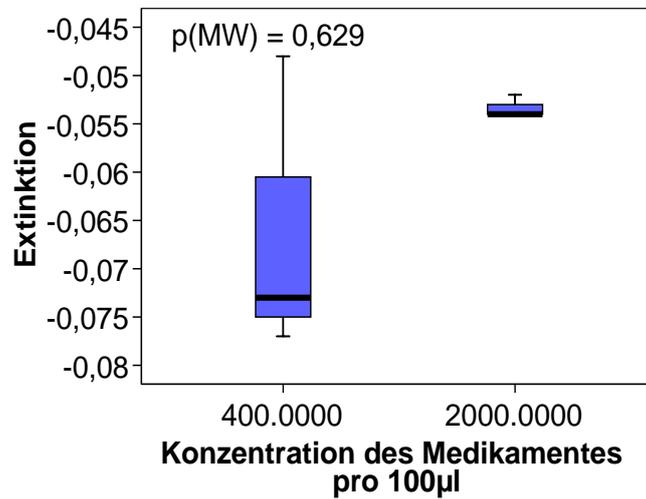


Abb. 3.24: Es wurden 2.500 Zellen der murinen Zelllinie RM26 in 100 µl Medium 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit zwei verschiedenen Konzentrationen DMSO 24 Stunden inkubiert und im Anschluss wie Abb. 3.23 verfahren. Auch hier kommt es zu keiner signifikant erhöhten Apoptose der Zellen.

Abb. 3.25:
Staurosporin bei humanen Zellen

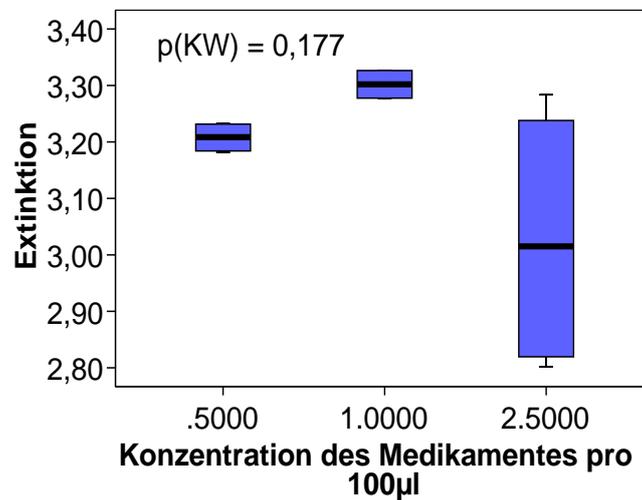


Abb. 3.25: Es wurden 7.500 Zellen der humanen Zelllinie L87 in 100 µl Medium 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen Staurosporin 24 Stunden inkubiert und im Anschluss die Messung der Apoptoseaktivität durchgeführt. Die Abszisse zeigt die Medikamentenkonzentration, die Ordinate zeigt die Extinktion, die ein semiquantitatives Maß für die Apoptose darstellt. Des Weiteren wird der p-Wert der Auswertung angegeben.

Zu zeigen war eine vermehrte Apoptose der Zellen unter Staurosporin.

Die Grafik zeigt bei allen Konzentrationen Extinktionswerte größer 3, was einer signifikant erhöhten Apoptoserate in Bezug auf die Negativkontrolle entspricht. Untereinander zeigen die verschiedenen Staurosporinkonzentrationen keinen signifikanten Unterschied.

Abb. 3.26:
Staurosporin bei murinen Zellen

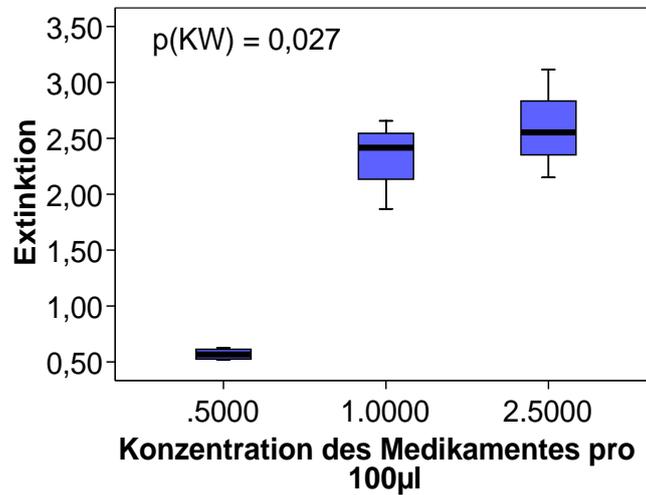


Abb. 3.26: Es wurden 2.500 Zellen der murinen Zelllinie RM26 in 100 µl Medium 48 Stunden kultiviert. Danach wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen Staurosporin 24 Stunden inkubiert und im Anschluss wie in Abb 3.25 verfahren

Auch bei den murinen Zellen kommt es, v.a. bei höheren Konzentrationen, unter Staurosporin zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptose.

Abb. 3.27:

Direkter Vergleich der therapeutischen Konzentrationen von Tacrolimus und Ciclosporin, getestet an der murinen Zelllinie:

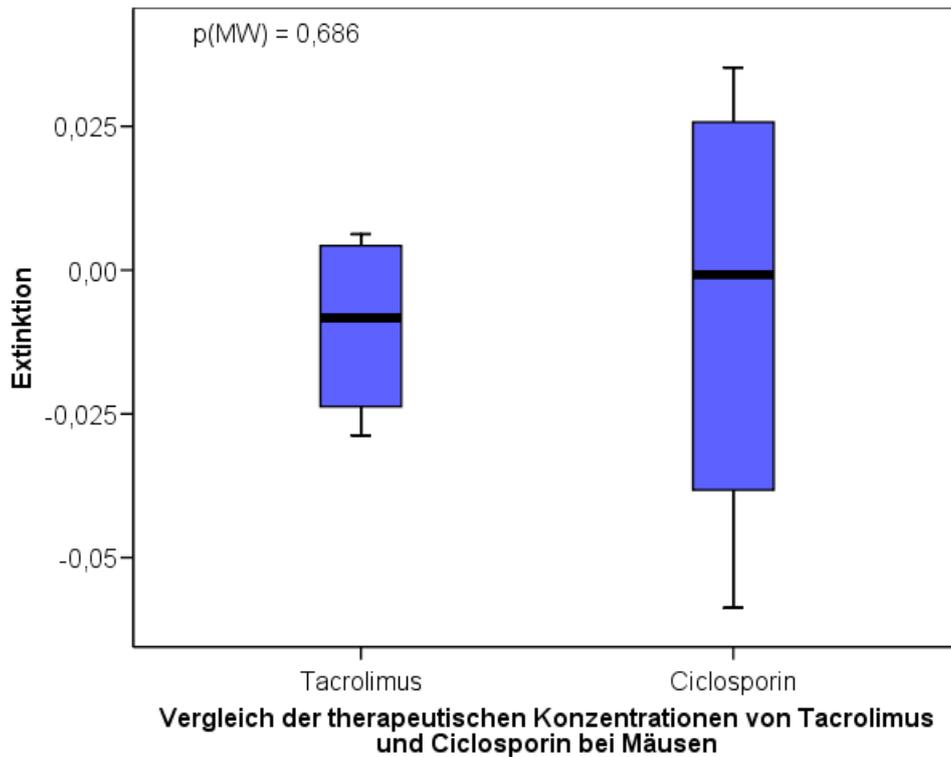


Abb. 3.27: Direkter Vergleich der therapeutischen Konzentrationen von Tacrolimus und Ciclosporin, getestet an der murinen Zelllinie RM26. Die Abszisse zeigt die beiden Medikamente in therapeutischer Konzentration, die Ordinate zeigt die Extinktion, die ein semiquantitatives Maß für die Apoptose darstellt. Des Weiteren wird der p-Wert der Auswertung angegeben.

Die Grafik zeigt, dass es unter der therapeutischen Konzentration von Tacrolimus und Ciclosporin weder untereinander noch in Bezug zur Negativkontrolle zu einer signifikant vermehrten Apoptose der murinen Zellen kommt.

Abb. 3.28:

Direkter Vergleich der therapeutischen Konzentrationen der Immunsuppressiva Simulect, Thymoglobulin, ATG, Tacrolimus, Ciclosporin und Lymphoglobulin, getestet an der humanen Zelllinie:

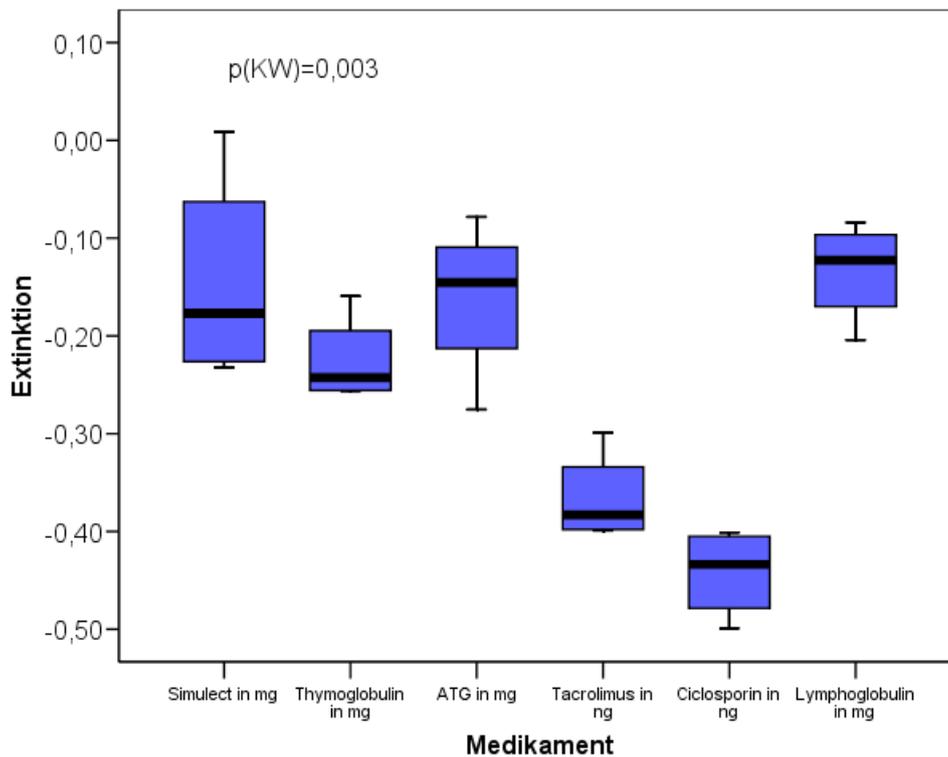


Abb. 3.28: Direkter Vergleich des Apoptoseverhaltens unter den therapeutischen Konzentrationen der Immunsuppressiva Simulect, Thymoglobulin, ATG, Tacrolimus, Ciclosporin und Lymphoglobulin, getestet an der humanen Zelllinie L87. Die Abszisse zeigt die Medikamente in therapeutischer Konzentration, die Ordinate zeigt die Extinktion, die ein semiquantitatives Maß für die Apoptose darstellt. Des Weiteren wird der p-Wert der Auswertung angegeben.

Bei allen Immunsuppressiva zeigen sich negative Extinktionswerte. Unter Tacrolimus und Ciclosporin sind die Extinktionswerte sogar signifikant niedriger als bei den übrigen Immunsuppressiva. Dies entspricht einer verminderten Apoptoserate im Vergleich zur Negativkontrolle und zu den anderen Immunsuppressiva.

Abb. 3.29:

Therapeutische Konzentrationen der Immunsuppressiva Simulect, Thymoglobulin, ATG, Tacrolimus, Ciclosporin, Lymphoglobulin und dem Apoptose induzierenden Medikament Staurosporin, getestet an der humanen Zellreihe.

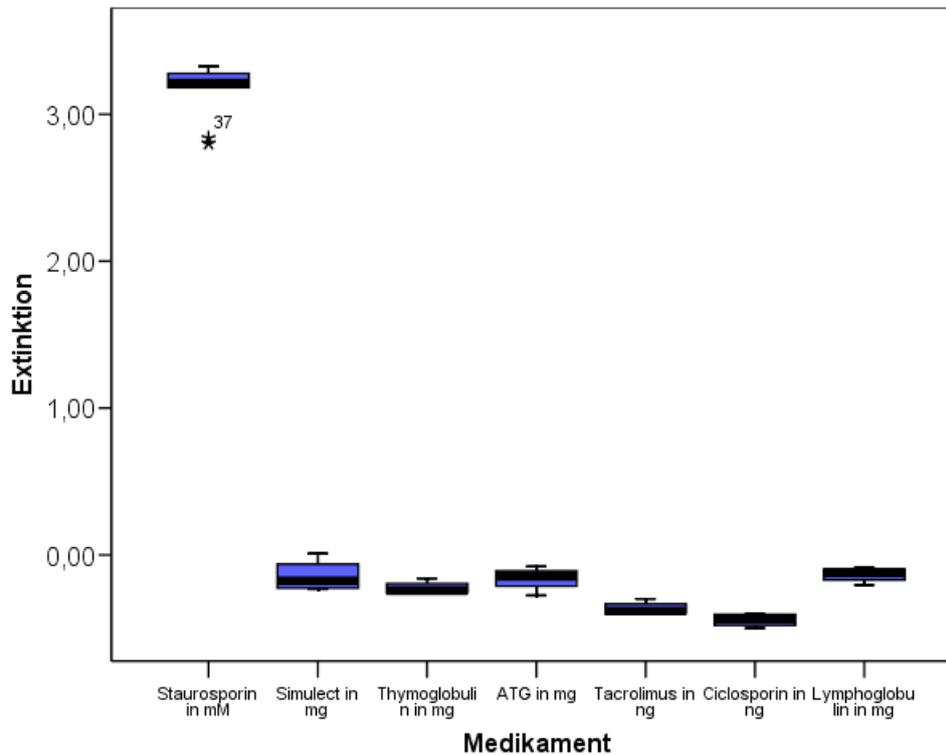


Abb. 3.29: Direkter Vergleich des Apoptoseverhaltens zwischen den therapeutischen Konzentrationen der Immunsuppressiva Simulect, Thymoglobulin, ATG, Tacrolimus, Ciclosporin, Lymphoglobulin und dem Apoptose induzierenden Medikament Staurosporin, getestet an der humanen Zelllinie L87. Die Abszisse zeigt die Medikamente in therapeutischer Konzentration, die Ordinate zeigt die Extinktion, die ein semiquantitatives Maß für die Apoptose darstellt. Die Grafik zeigt deutlich, dass es unter Staurosporin zu einem hochsignifikanten Apoptoseanstieg im Vergleich zu den Immunsuppressiva kommt.

Abb. 3.30:

Schematische Ergebniszusammenfassung des Apoptoseverhaltens der humanen Zelllinie L87 unter den verschiedenen Medikamenten:

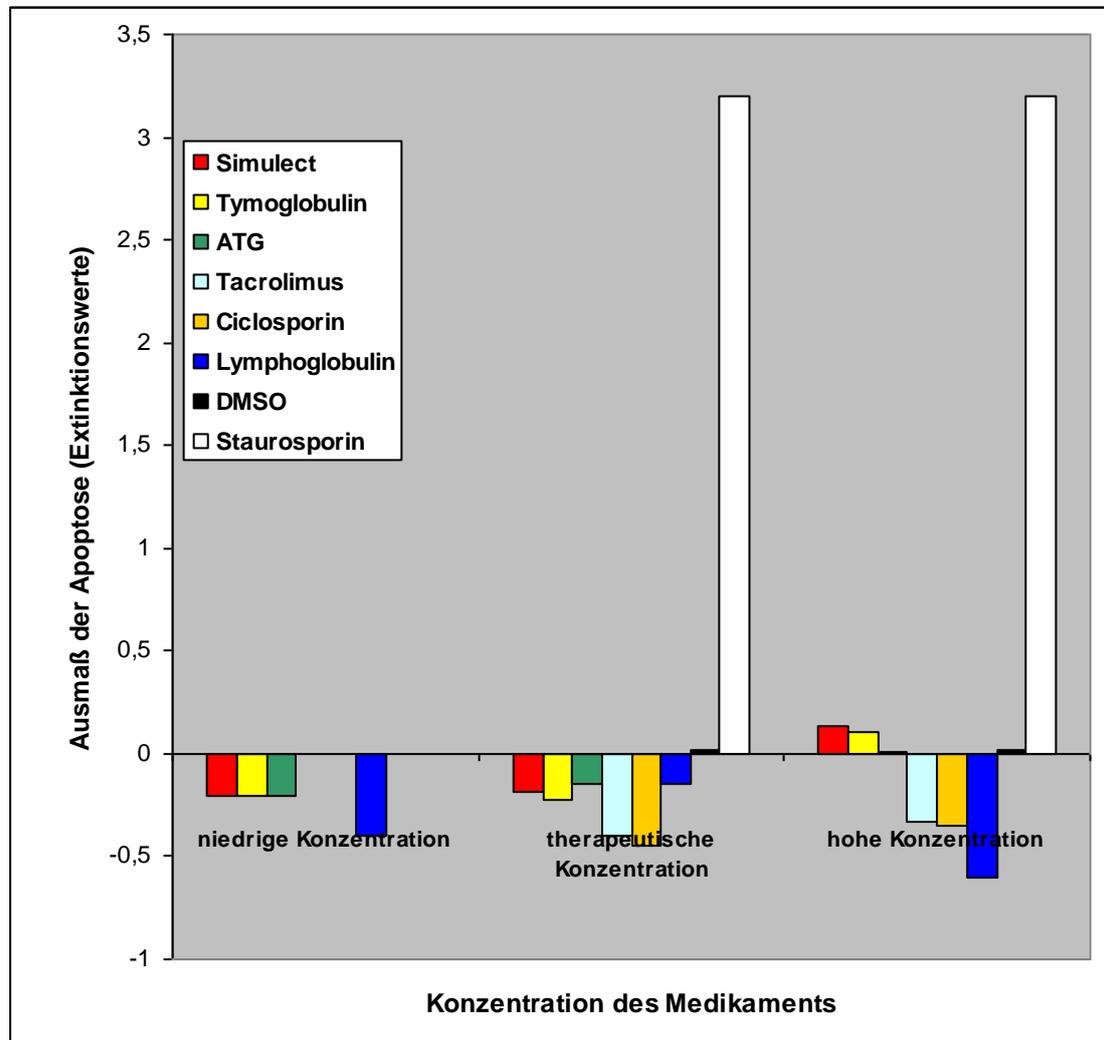


Abb. 3.30: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung des Apoptoseverhaltens der humanen Zelllinie L87 unter den verschiedenen Immunsuppressiva sowie des Apoptose induzierenden Staurosporins. Hier zeigt sich noch einmal deutlich, dass keines der Immunsuppressiva in therapeutischer Konzentration eine vermehrte Apoptose der Zellen induziert. Bei hohen Konzentrationen steigt die Apoptoserate unter Thymoglobulin, Simulect und ATG zwar signifikant an, der Vergleich mit Staurosporin zeigt jedoch, dass dieser Anstieg eher gering ist. Tacrolimus, Ciclosporin und Lymphoglobulin weisen auch bei hohen Medikamentenkonzentrationen erniedrigte Apoptoseraten auf.

Abb. 3.31:

Therapeutische Konzentrationen der Immunsuppressiva Tacrolimus und Ciclosporin, getestet an der murinen Zellreihe im Vergleich zur Positivkontrolle mit Staurosporin:

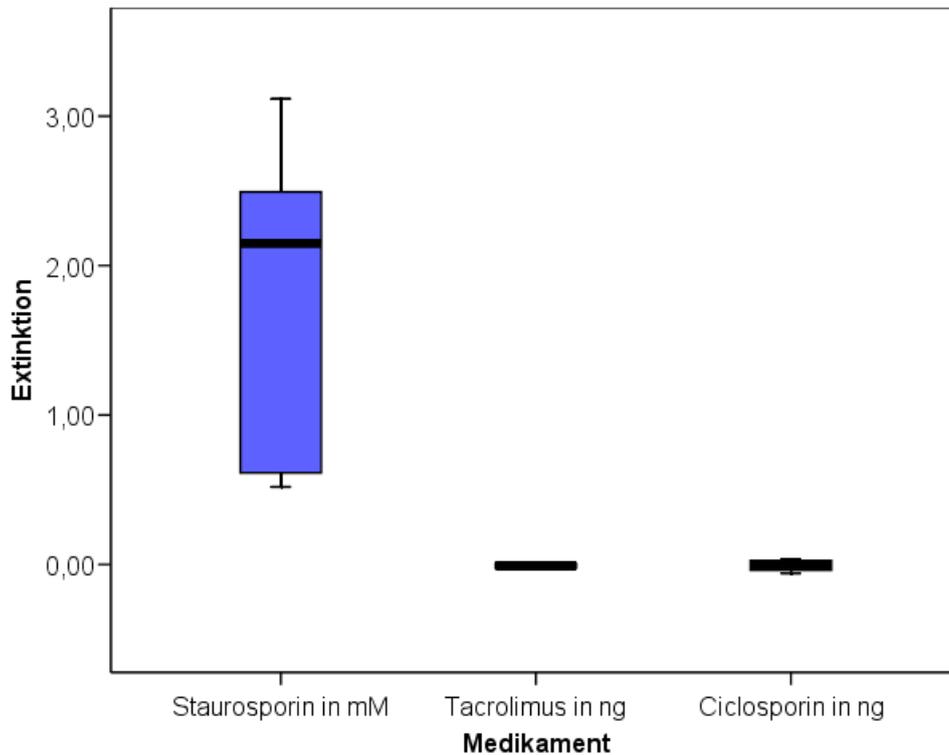


Abb. 3.31: Direkter Vergleich des Apoptoseverhaltens zwischen den therapeutischen Konzentrationen der Immunsuppressiva Tacrolimus und Ciclosporin und dem Apoptose induzierenden Medikament Staurosporin, getestet an der murinen Zelllinie RM26. Die Abszisse zeigt die Medikamente in therapeutischer Konzentration, die Ordinate zeigt die Extinktion, die ein semiquantitatives Maß für die Apoptose darstellt.

Wie bei der humanen Zelllinie zeigt sich auch hier eine signifikant vermehrte Apoptose unter Staurosporin.

Abb. 3.32:

Schematische Ergebniszusammenfassung des Apoptoseverhaltens der murinen Zelllinie RM26 unter den verschiedenen Medikamenten:

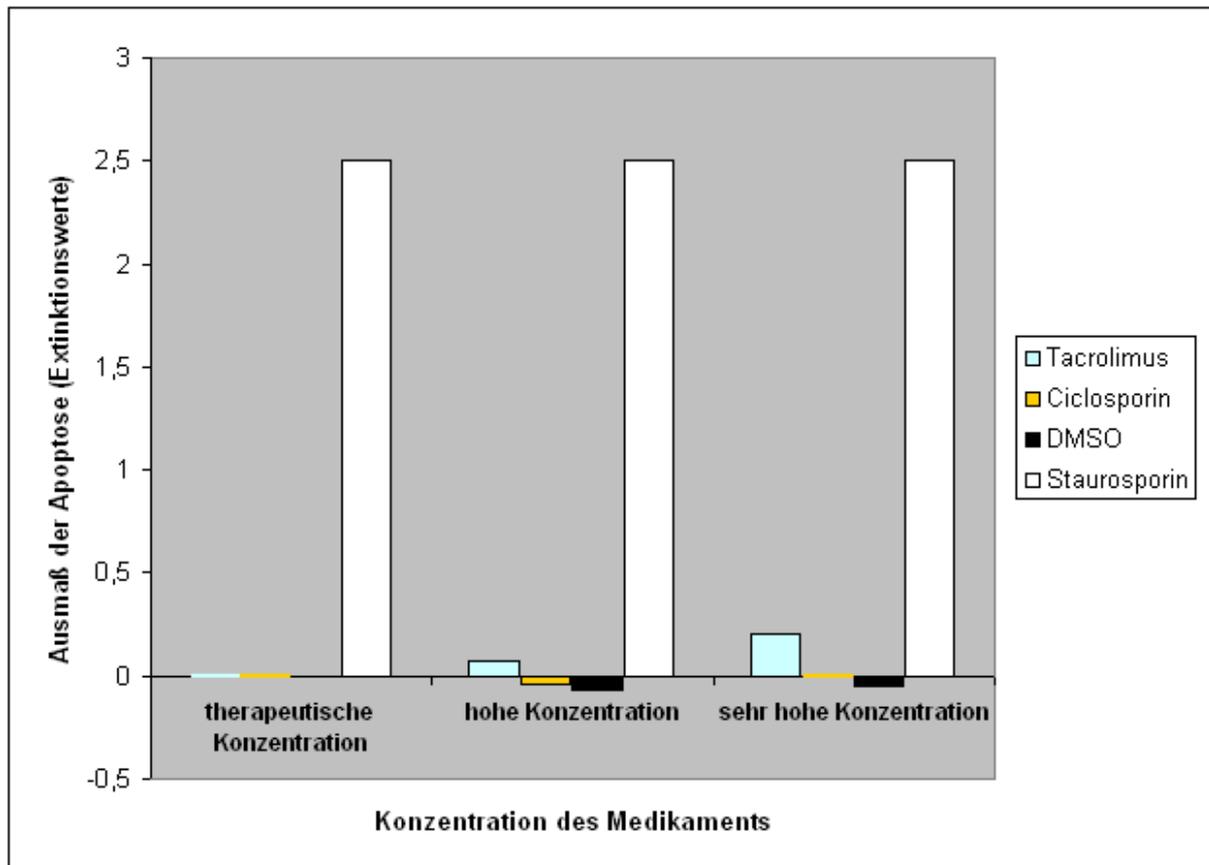


Abb. 3.32: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung des Apoptoseverhaltens der murinen Zelllinie RM26 unter den verschiedenen Immunsuppressiva sowie des Apoptose induzierenden Staurosporins. Wie bei der humanen Zelllinie zeigt sich deutlich, dass es unter der therapeutischen Konzentration zu keinem signifikanten Anstieg der Apoptoserate der Zellen kommt. Erst bei sehr hohen Konzentrationen kommt es unter Tacrolimus zu einem signifikanten Apoptoseanstieg, der jedoch im Vergleich zu Staurosporin zu vernachlässigen ist.

3.3 Proliferationsverhalten bei verschiedenen Konzentrationen an Immunsuppressiva

Werden Stammzellen bei einer Therapie gleichzeitig mit Immunsuppressiva verwendet, ist es wichtig zu wissen, inwiefern die Immunsuppressiva das Proliferationsverhalten der Zellen beeinflussen. Um hierüber eine Aussage zu treffen, wurden hier die humane und die murine Zelllinie, wieder ausgehend von der therapeutischen Konzentration, mit den verschiedenen Immunsuppressiva inkubiert und mit Hilfe des Cell Proliferation ELISA auf ihr Proliferationsverhalten hin getestet. Die getesteten Medikamentenkonzentrationen wurden zum leichteren Verständnis als Vielfaches der jeweils zugrunde liegenden therapeutischen Konzentration dargestellt. Die Ordinate zeigt die Extinktion, die der Proliferationsaktivität entspricht. Eine abnehmende Extinktion zeigt somit eine abnehmende Proliferationsrate. Die Abszisse zeigt hierbei das Vielfache der therapeutischen Konzentration (diese entspricht dem Wert 1).

Jedem dargestellten Wert liegt mindestens eine 8-fach-Bestimmung zugrunde (N=8 bzw. N>8).

Für die Auswertung der einzelnen Immunsuppressiva wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Dem direkten Vergleich zwischen Ciclosporin und Tacrolimus bei der murinen Zelllinie liegt der Mann-Whitney Test zugrunde. Der p-Wert ist jeweils in der Grafik dargestellt.

Die Ergebnisse der einzelnen Immunsuppressiva wurden anhand von Kontrollen nivelliert und sind somit direkt vergleichbar.

Ein Extinktionswert von 0 entspricht der Proliferationsrate der Negativkontrollen.

Abb. 3.33:
Proliferationsverhalten der humanen Zelllinie L87 mit dem Immunsuppressivum ATG

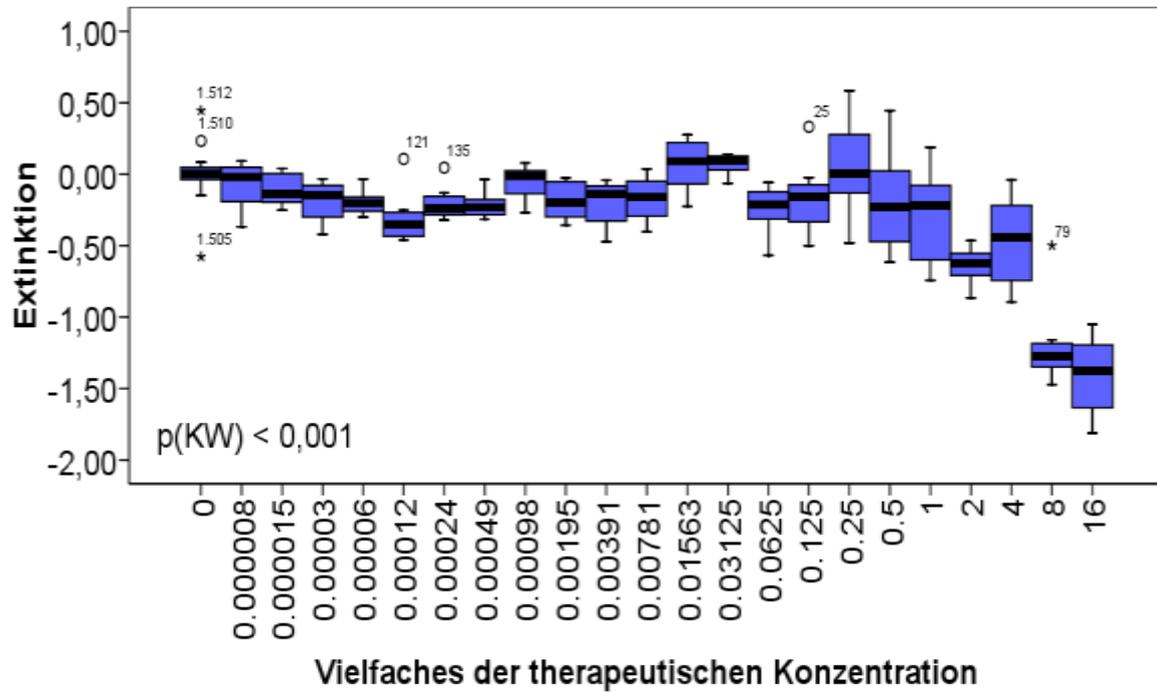


Abb. 3.33: Bereits bei der 8-fachen therapeutischen Konzentration kommt es bei ATG zu einer signifikant geringeren Proliferationsrate der humanen Stammzellen.

Abb. 3.34:
Proliferationsverhalten der humanen Zelllinie L87 mit dem Immunsuppressivum Ciclosporin

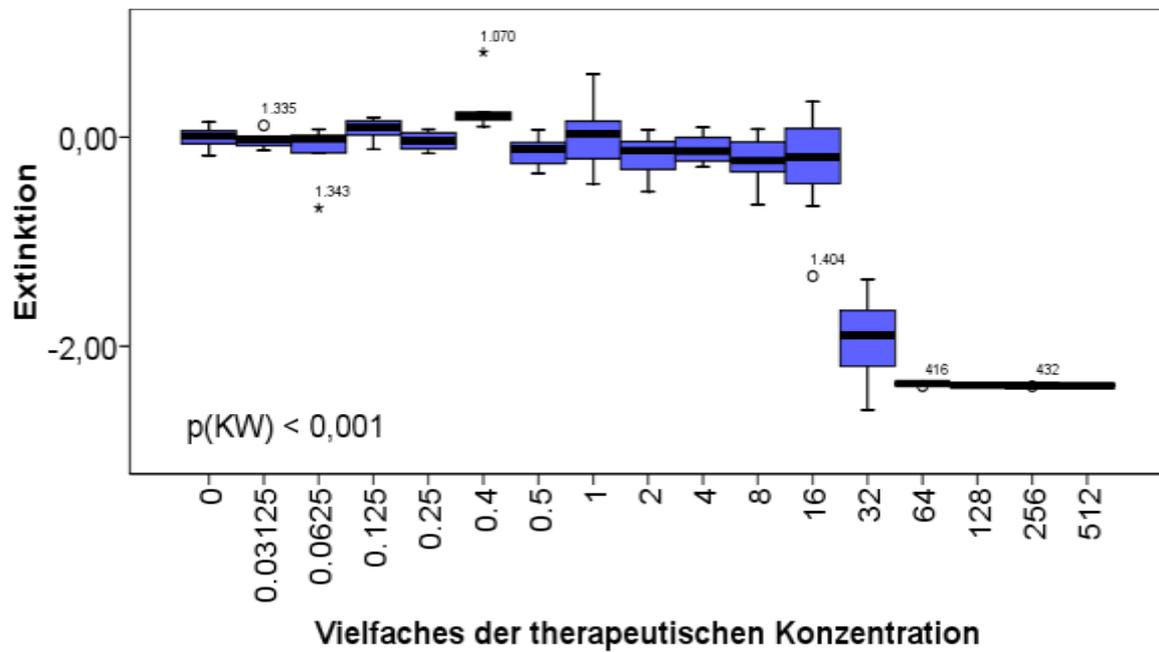


Abb. 3.34: Auch bei Ciclosporin kommt es bei dem 32-fachen der therapeutischen Konzentration zu einem signifikanten Abfall der Proliferationsrate. Im Bereich der subtherapeutischen Konzentrationen bleibt die Proliferationsrate annähernd konstant im Vergleich zur Negativkontrolle (Extinktionswert 0).

Abb. 3.35:
Proliferationsverhalten der humanen Zelllinie L87 mit dem Immunsuppressivum Lymphoglobulin

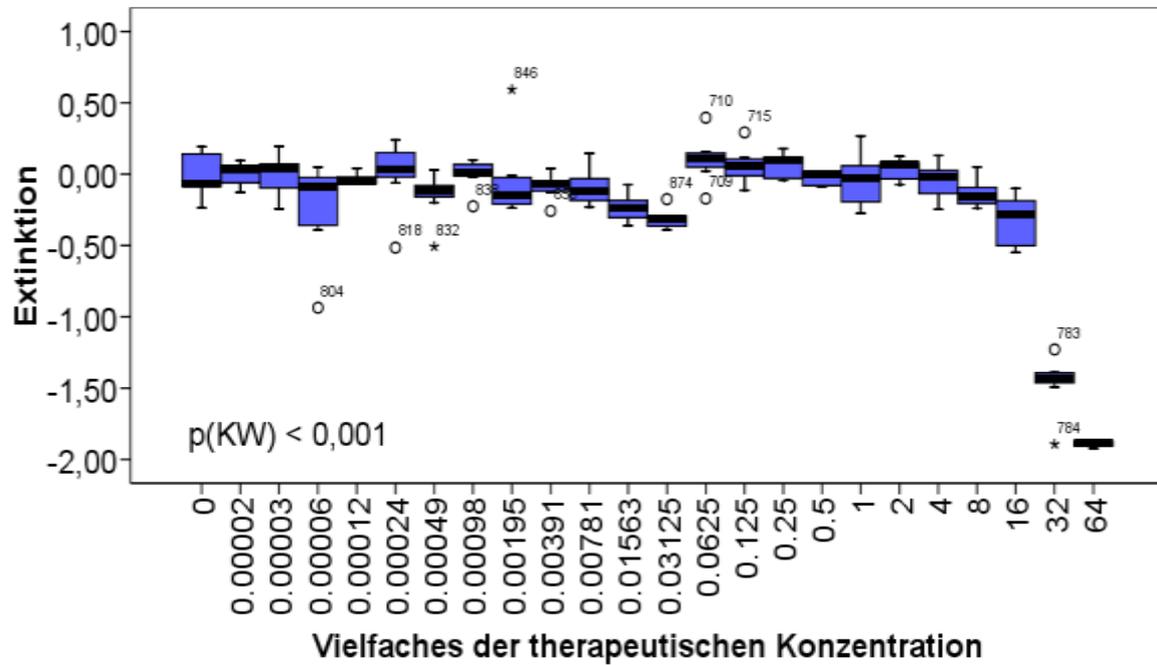


Abb.: 3.35: Ähnlich wie unter Ciclosporin zeigt die Auswertung eine signifikante Proliferationsabnahme ab einer Erhöhung der therapeutischen Konzentration um den Faktor 32. Einzelne Werte die stark vom Mittelwert abweichen wurden als Kreise bzw. Sternchen abgebildet.

Abb. 3.36:
Proliferationsverhalten der humanen Zelllinie L87 mit dem Immunsuppressivum Simulect

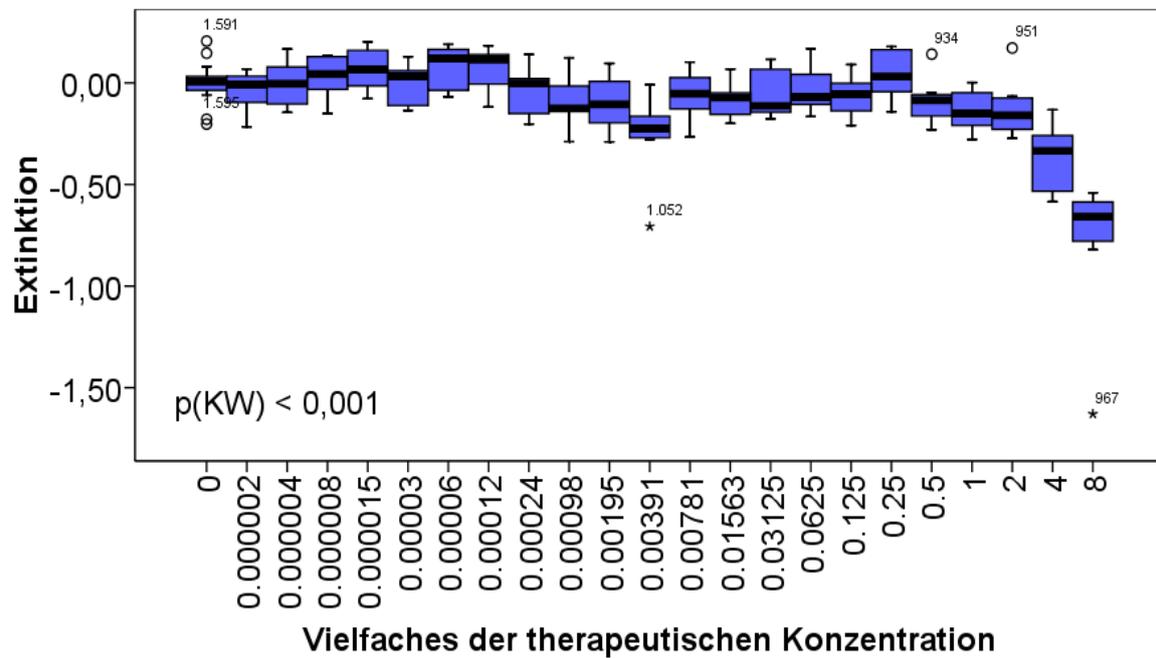


Abb. 3.36: Die Auswertung zeigt ab einer Erhöhung der therapeutischen Konzentration um den Faktor 4 eine deutliche Abnahme der Proliferationsrate, die ab dem Faktor 8 signifikant ist.

Abb. 3.37:
Proliferationsverhalten der humanen Zelllinie L87 mit dem Immunsuppressivum Tacrolimus

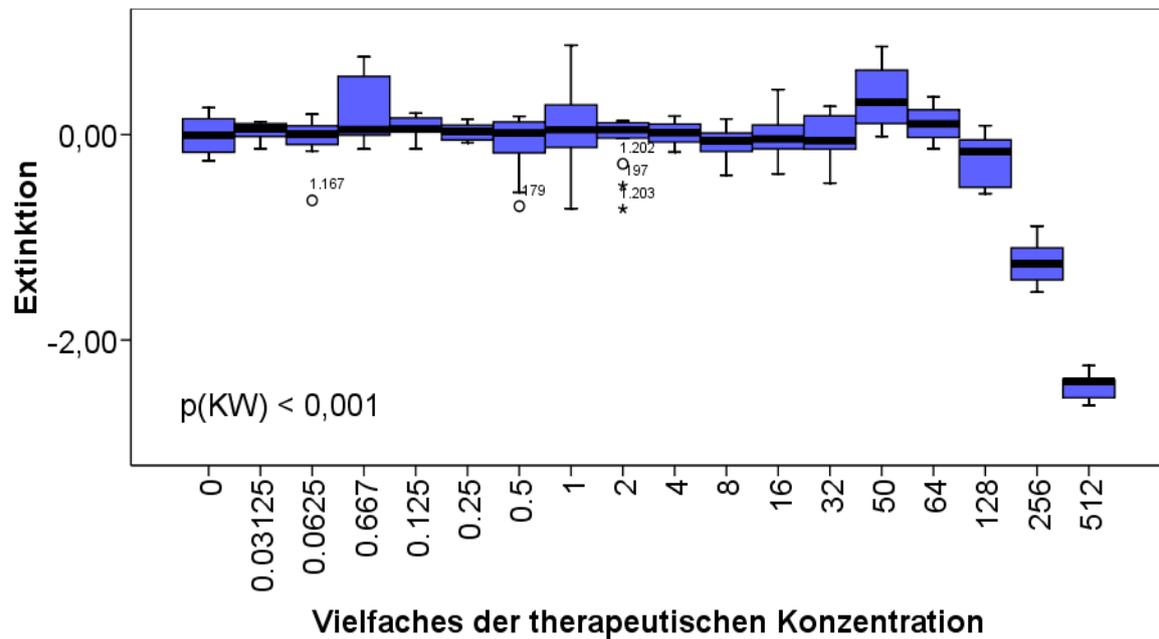


Abb. 3.37: Erst wenn man die therapeutische Konzentration von Tacrolimus um den Faktor 256 erhöht, kommt es zu einer signifikant verminderten Proliferation bis dahin bleibt die Proliferationsrate nahezu gleich wie bei der Negativkontrolle.

Abb. 3.38: Proliferationsverhalten der humanen Zelllinie L87 mit dem Immunsuppressivum Thymoglobulin

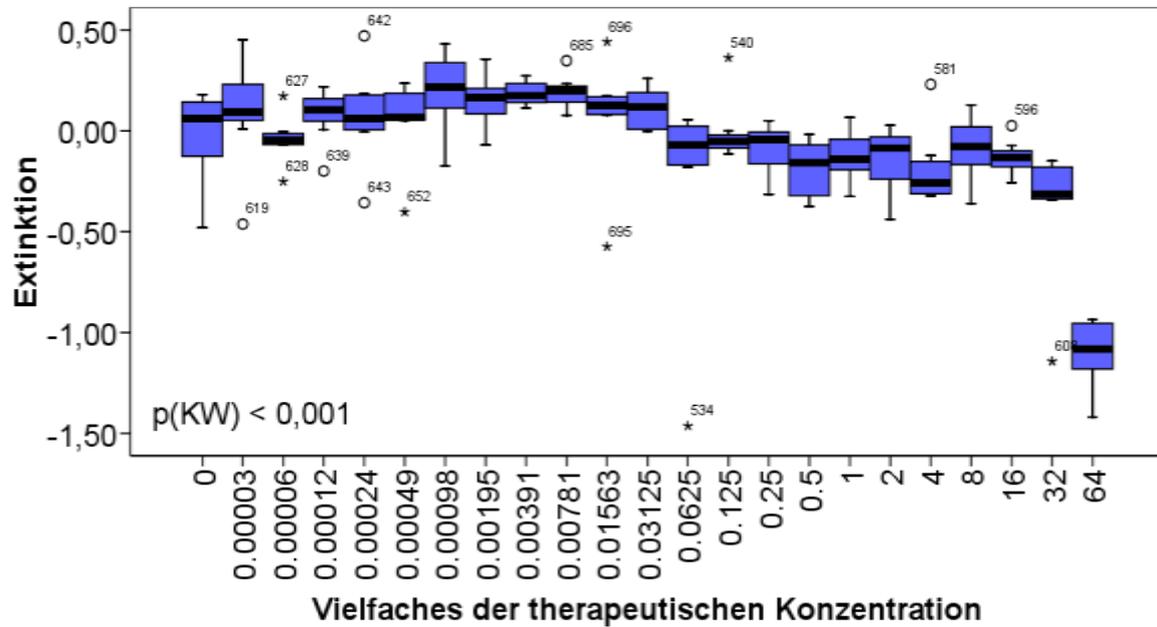


Abb. 3.38: Unter Thymoglobulin kommt es ab einer 64-fachen Dosierung zu einer signifikanten Proliferationsabnahme

Abb. 3.39:

Direkter Vergleich des Proliferationsverhaltens der humanen Zelllinie L87 mit den verschiedenen Immunsuppressiva

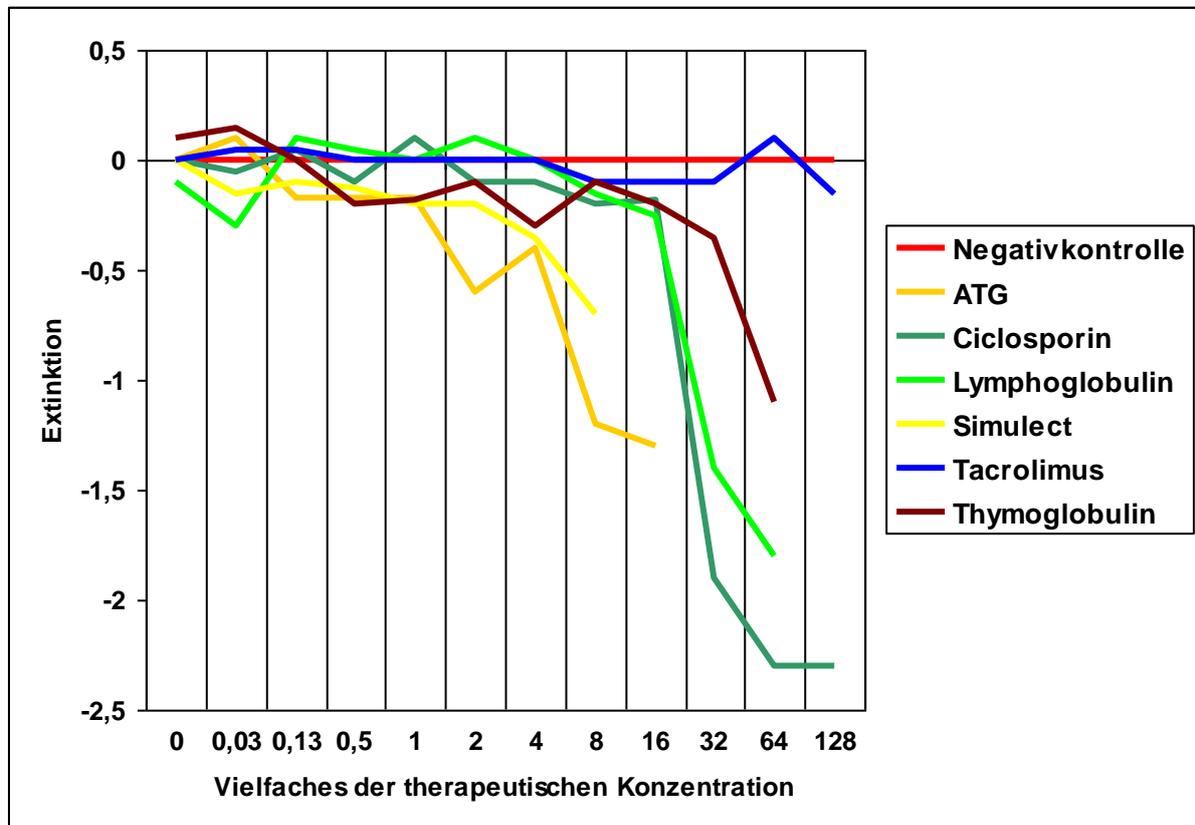


Abb. 3.39: Unter der therapeutischen Konzentration kommt es bei keinem der Immunsuppressiva zu einem signifikanten Abfall der Proliferation der humanen Zellen. Bei hohen Konzentrationen der Medikamente zeigt sich jedoch, dass nur Tacrolimus bis zum 128-fachen der therapeutischen Konzentration keine signifikante Änderung des Proliferationsverhaltens bewirkt.

Abb. 3.40:
Proliferationsverhalten der murinen Zelllinie RM26 mit dem Immunsuppressivum Ciclosporin

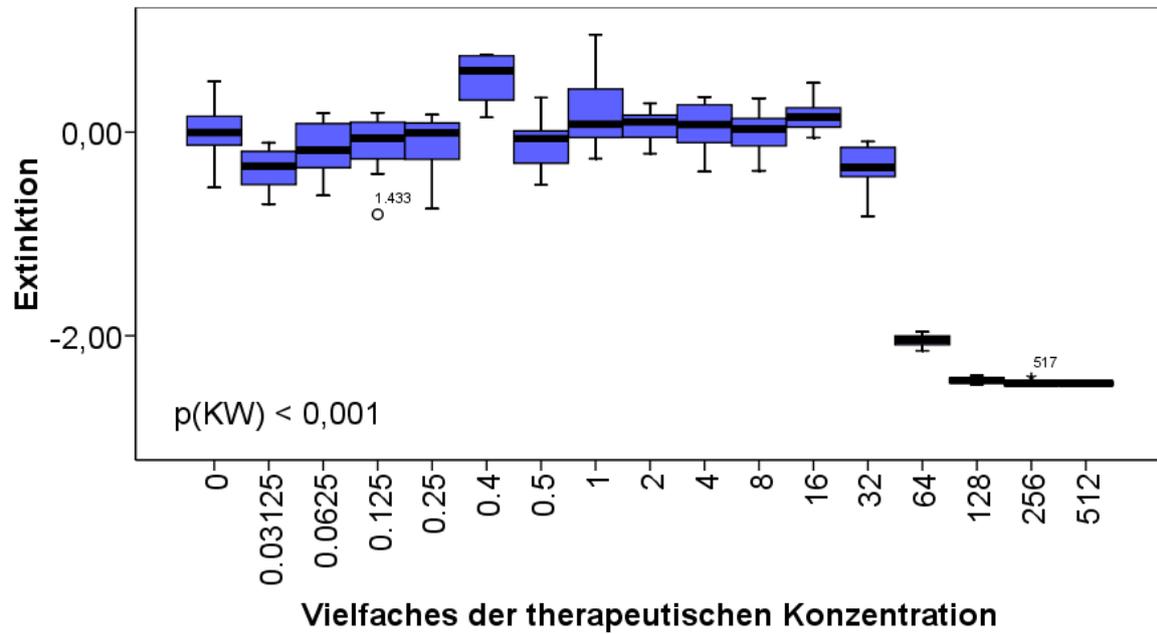


Abb. 3.40: Ähnlich wie bei der humanen Zelllinie kommt es bei einer Erhöhung der therapeutischen Konzentration um den Faktor 64 zu einem signifikanten Abfall der Proliferation.

Abb. 3.41:
Proliferationsverhalten der murinen Zelllinie RM26 mit dem Immunsuppressivum Tacrolimus

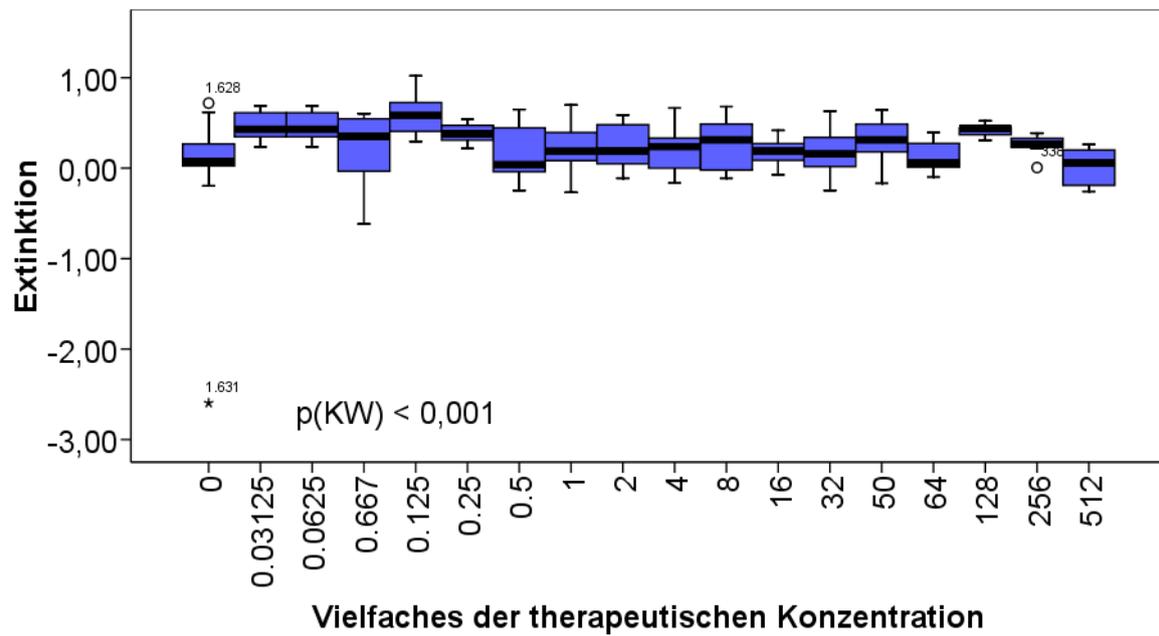


Abb. 3.41: Auch wenn die therapeutische Konzentration um den Faktor 512 erhöht wird kommt es nicht zu einer verminderten Proliferation der Zellen. Die Proliferationsrate bleibt auch unter dieser Extremdosierung im Niveau der Negativkontrolle.

Abb. 3.42:

Direkter Vergleich des Proliferationsverhaltens der murinen Zelllinie RM26 mit den Immunsuppressiva Tacrolimus und Ciclosporin

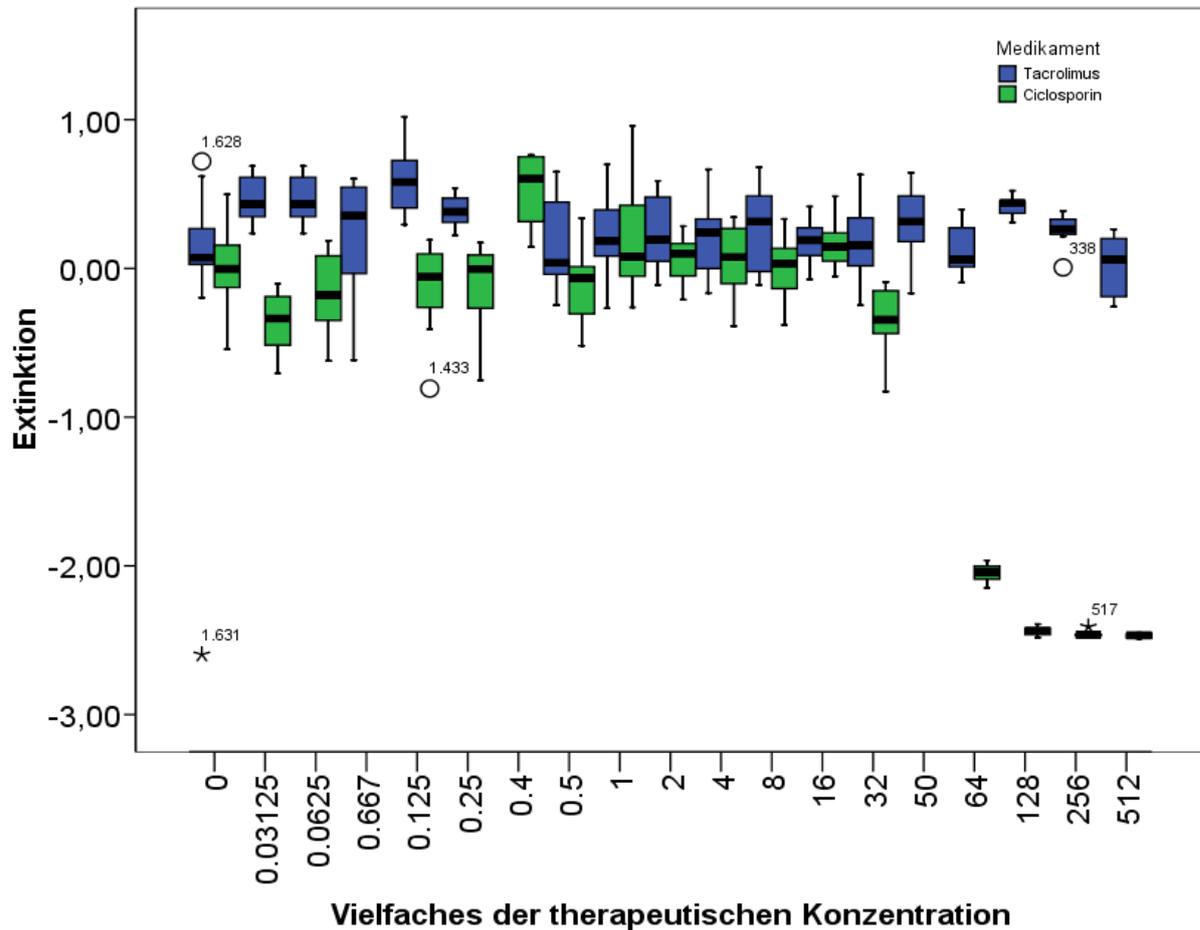


Abb. 3.42: Hier zeigt sich der signifikante Unterschied sehr deutlich. Die Proliferation unter Tacrolimus bleibt konstant während eine Überdosierung von Ciclosporin zur Abnahme der Proliferation der Stammzellen führt.

3.4 Exprimierung von B7.1 und B7H1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einer semiquantitativen PCR auch untersucht inwieweit die Immunsuppressiva die Exprimierung der kostimulierenden Liganden B7.1 und B7H1 beeinflussen. Es wurden, neben einer Kontrolle, wie bei der Apoptoseuntersuchung die therapeutische und zwei weitere Medikamentenkonzentrationen gewählt und die humanen bzw. die murinen Zellen damit inkubiert.

Die Ordinate zeigt die Anzahl der PCR-Zyklen nach denen eine Bande für den jeweiligen Liganden eindeutig nachweisbar war und gibt damit ein relatives Maß für die Exprimierung des Liganden. Dementsprechend spricht eine höhere Zyklanzahl für eine geringere Exprimierung. Die Abszisse zeigt die jeweilige Medikamentenkonzentration.

Es wurden jeweils Einzelmessungen durchgeführt ($N = 1$) und die therapeutischen Konzentrationen rot hervorgehoben.

Abb. 3.43:
Exprimierung von B7.1 und B7H1 der humanen Zellreihe L87 unter dem Immunsuppressivum Tacrolimus

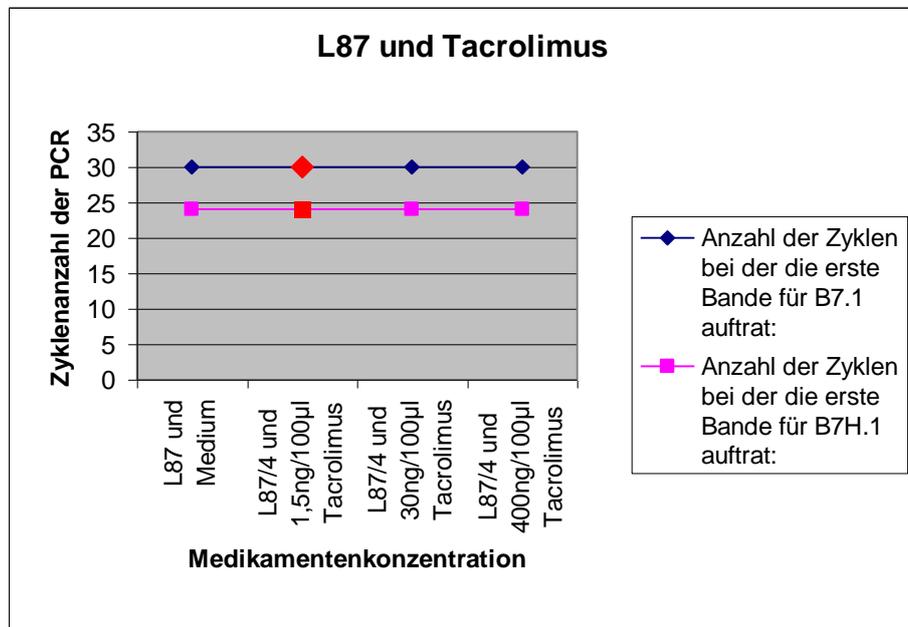


Abb. 3.43: Unter Tacrolimus blieb die Exprimierung der beiden Liganden auch bei hohen Medikamentendosierungen stets konstant.

Abb. 3.44:
Exprimierung von B7.1 und B7H1 der humanen Zellreihe L87 unter dem Immunsuppressivum Ciclosporin

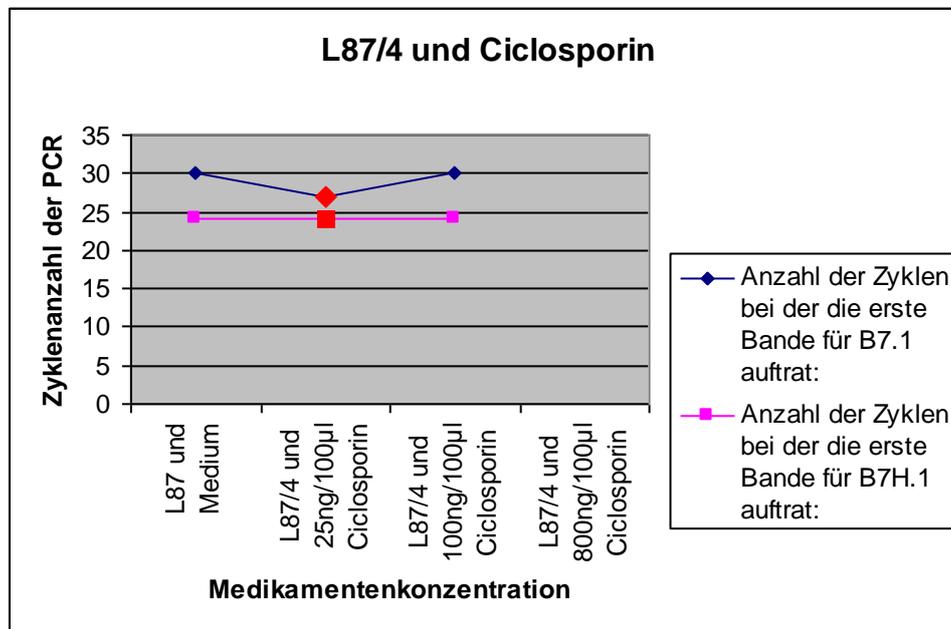


Abb. 3.44: Hier zeigt sich eine relativ konstante Exprimierung der Liganden, wobei unter der therapeutischen Dosis der Ligand B7.1 vermehrt exprimiert wird.

Abb. 3.45:
Exprimierung von B7.1 und B7H1 der humanen Zellreihe L87 unter dem Immunsuppressivum Lymphoglobulin:

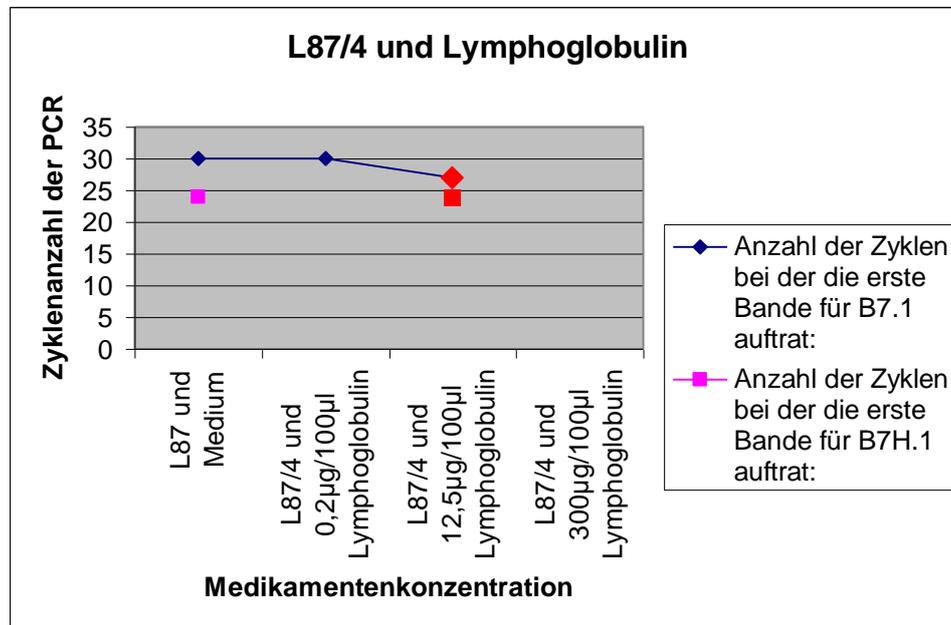


Abb. 3.45: Bei Inkubation der Zellen mit der therapeutischen Dosis von Lymphoglobulin zeigt sich eine vermehrte Exprimierung des B7.1 Liganden während B7H1 gleich bleibend exprimiert wird.

Abb. 3.46:
Exprimierung von B7.1 und B7H1 der humanen Zellreihe L87 unter dem Immunsuppressivum Thymoglobulin

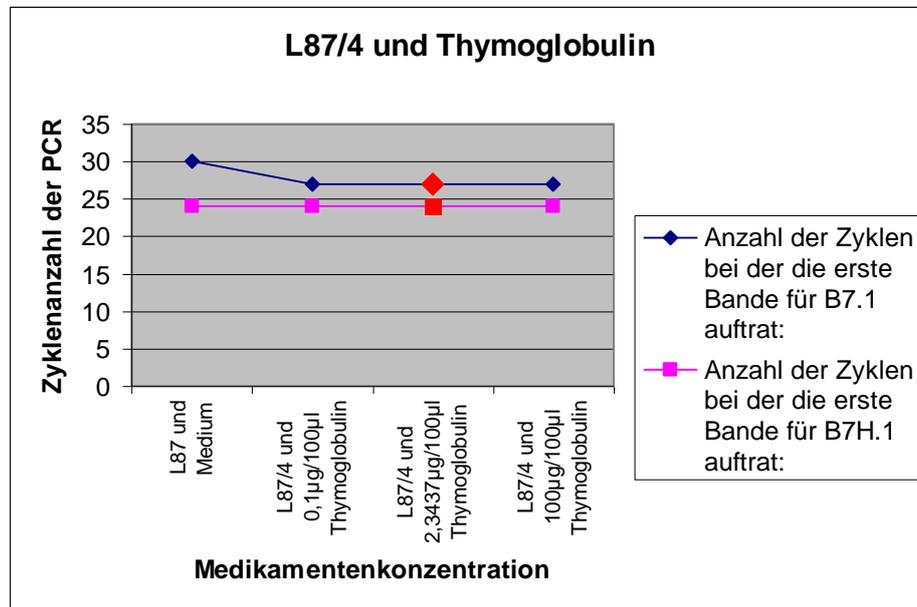


Abb. 3.46: Auch unter Thymoglobulin führt die Inkubation mit dem Medikament zu einer höheren Exprimierung von B7.1.

Abb. 3.47:
Exprimierung von B7.1 und B7H1 der humanen Zellreihe L87 unter dem Immunsuppressivum Simulect:

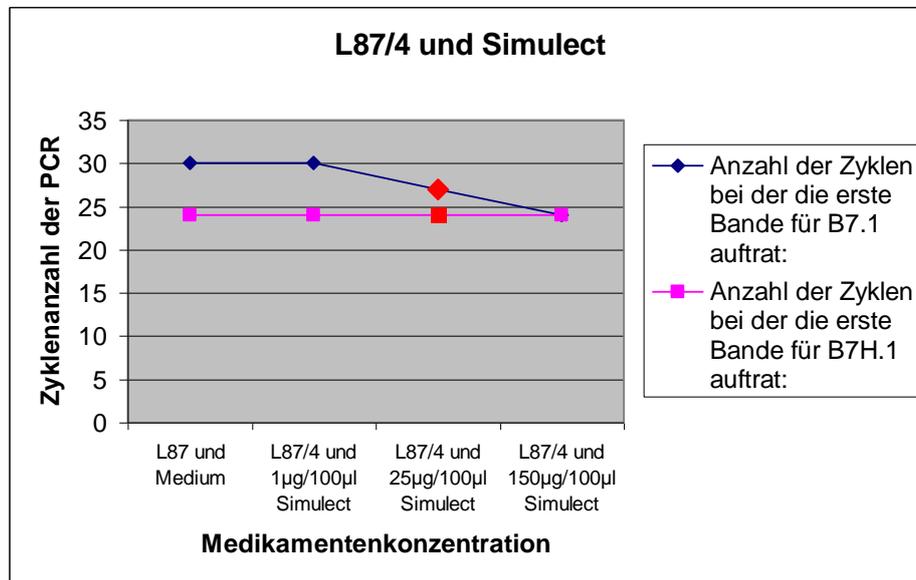


Abb. 3.47: Wieder führt die Inkubation mit dem Medikament zu einer vermehrten Exprimierung von B7.1.

Abb. 3.48:
Exprimierung von B7.1 und B7H1 der humanen Zellreihe L87 unter dem Immunsuppressivum ATG:

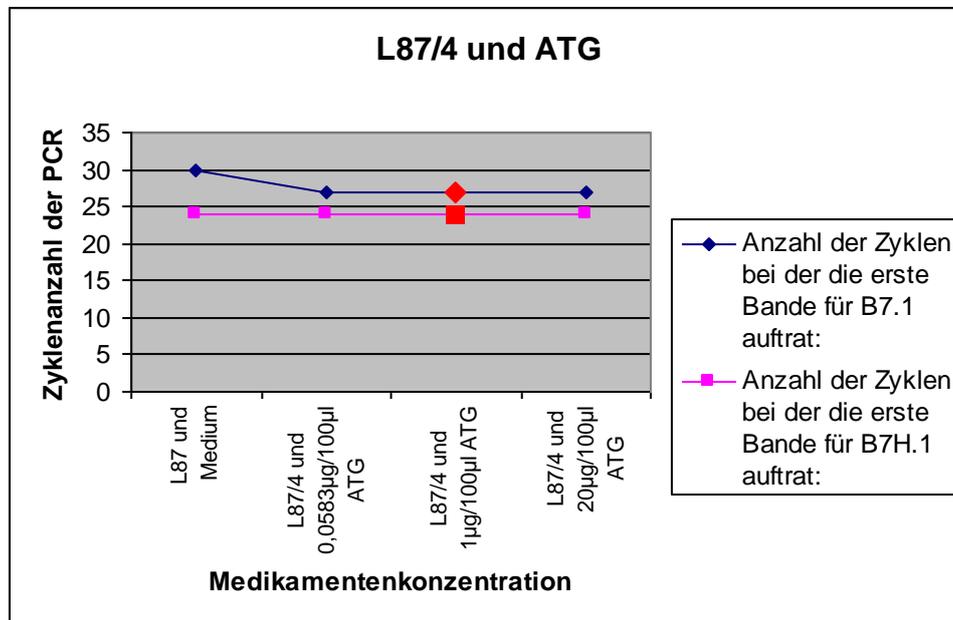


Abb. 3.48: Auch ATG führt zu einer höheren Exprimierung von B7.1.

Abb. 3.49:
 Exprimierung von B7.1 und B7H1 der murinen Zellreihe RM26 unter dem Immunsuppressivum Tacrolimus:

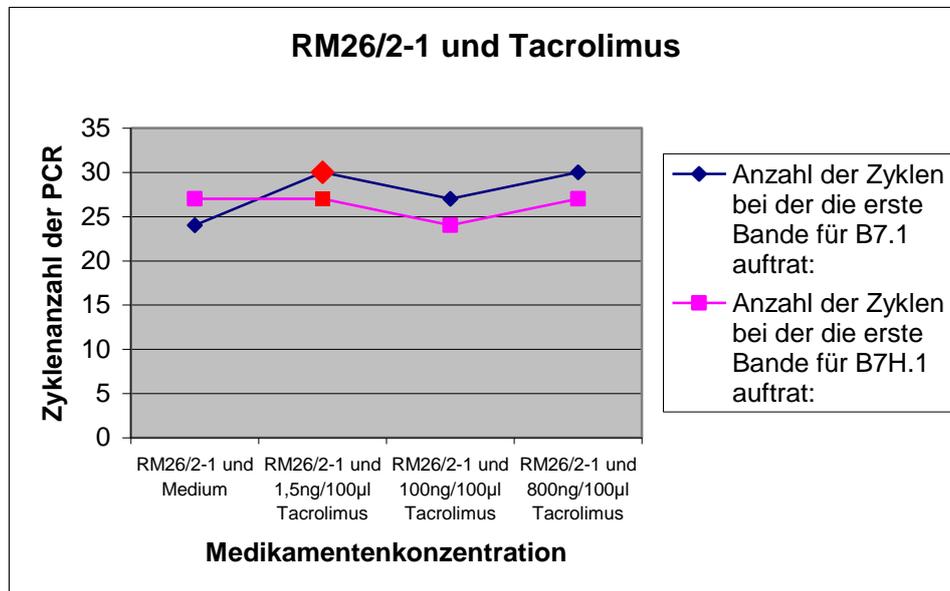


Abb. 3.49: Die Inkubation mit Tacrolimus scheint bei der murinen Zelllinie im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer verminderten Exprimierung des Liganden B7.1 zu führen. Die Exprimierung des Liganden B7H1 bleibt unter der therapeutischen Konzentration konstant.

Abb. 3.50:
Exprimierung von B7.1 und B7H1 der murinen Zellreihe RM26 unter dem Immunsuppressivum Ciclosporin:

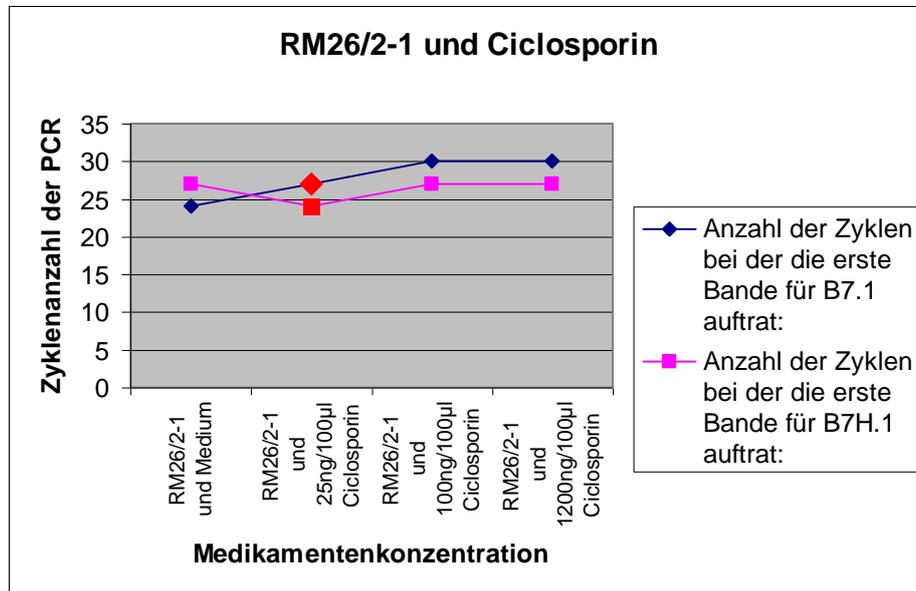


Abb. 3.50: Auch hier zeigt sich unter dem Medikament eine Abnahme bei der Exprimierung von B7.1.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit geht von dem therapeutischen Ansatz aus, bei einer Transplantation perioperativ Stammzellen einzusetzen. Hierdurch soll ein immuntoleranter Chimärismus zwischen Empfänger und Spenderorgan erreicht werden.

Ausgehend von diesem Ansatz bearbeitet die Arbeit die Frage, ob Stammzellen durch die verschiedenen, getesteten Immunsuppressiva in ihrem Proliferations- und Apoptoseverhalten beeinflusst werden und welche Schlüsse sich daraus ziehen lassen.

Anhand der konkreten Fragestellungen der Arbeit sollen hier die Ergebnisse erörtert werden.

4.1 Etablierung der Ausgangsbedingungen

Grundlegend für verwertbare Ergebnisse der Arbeit war das Schaffen gleich bleibender, reproduzierbarer Bedingungen für die Experimente. Hierzu wurden verschiedene Ausgangsmengen an Stammzellen inkubiert und deren Wachstumverhalten beobachtet. Gleichzeitig wurde ein zeitlicher Ablaufplan für die einzelnen Experimente erstellt. Die Ergebnisse erbrachten im Zusammenschluss mit der zeitlichen Planung der Experimente folgendes:

- L87 Wachstumskurven:

Bei dem Proliferationsversuch wurden die Zellen nach 48-stündigem Wachstum weitere 48 Stunden mit den verschiedenen Immunsuppressiva inkubiert. Das ideale Setting bzgl. der anfangs inkubierten Zellzahl hätte eine exponentielle Wachstumsphase vom zweiten bis zum vierten Tag.

Bei dem Apoptoseversuch wurden die Zellen nach 48-stündigem Wachstum weitere 24 Stunden mit den Immunsuppressiva inkubiert. Das ideale Setting hätte hier eine exponentielle Wachstumsphase vom zweiten bis zum dritten Tag.

Folglich liegt die exponentielle Wachstumsphase idealerweise zwischen dem zweiten und dem dritten bis vierten Tag.

Die Ergebnisse zeigen, dass dies, im Falle der humanen Zelllinie L87, am besten auf 7.500 Zellen pro 100 Mikroliter als Anfangszellzahl zutrifft.

Als Konsequenz wurde für die humane Zelllinie L87 die Ausgangszellzahl bei den Experimenten auf 7500 Zellen pro 100 Mykroliter festgelegt.

- RM26 Wachstumskurven:

Da der zeitliche Ablauf der Experimente für humane und murine Zellen gleich sein sollte, ergaben sich für das ideale Setting der murinen RM26 Zelllinie dieselben Bedingungen, wie für die humane L87 Zelllinie.

Die exponentielle Wachstumsphase liegt idealerweise zwischen dem zweiten und dem dritten bis vierten Tag.

Für die murine Zelllinie RM26 zeigen die Ergebnisse hierzu 2500 Zellen pro 100 Mykroliter als ideale Anfangszellzahl, was demzufolge als Ausgangszellzahl für die Experimente festgelegt wurde.

4.2 Auswirkungen der Immunsuppressiva auf das Apoptoseverhalten der Stammzellen

Der Therapieansatz der Arbeit beruht auf einer erworbenen Immuntoleranz durch eine perioperative Stammzellgabe. Der Erfolg dieser Therapie setzt voraus, dass die verabreichten Stammzellen nicht negativ durch die immunsuppressive Therapie beeinflusst werden. Eine mögliche Form der negativen Beeinflussung der Stammzellen wäre die Auslösung der Apoptose durch verabreichte Immunsuppressiva.

Die Apoptose ist ein sehr komplexer Prozess, der über diverse Wege initiiert werden kann und über verschiedene Signalkaskaden zum programmierten Zelltod führt [6].

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit sieht hierzu die Beantwortung folgender Fragen vor:

- a) Verändern die einzelnen Immunsuppressiva in verschiedenen Konzentrationen das Apoptoseverhalten der Zellen?
- b) Wie sieht der Vergleich zwischen den einzelnen Immunsuppressiva bezüglich ihrer Auswirkung auf das Apoptoseverhalten der Zellen aus?

Um die Verlässlichkeit der Testergebnisse zu gewährleisten, wurden neben den Immunsuppressiva auch die Stoffe Staurosporin und DMSO getestet.

DMSO ist ein Stoff, der in höheren Konzentrationen zum Tod der Zellen führt, ohne dabei eine Apoptose zu induzieren. Wie gefordert zeigen die Ergebnisse keine signifikante Erhöhung der Apoptoserate. Dies beweist, dass der Test durch zugrunde gegangene Zellen, die keine Apoptose eingegangen sind, nicht beeinflusst wird.

Staurosporin hingegen ist ein Stoff der die Apoptose bei Zellen induziert. Auch dies konnte wie gefordert durch die Testergebnisse eindeutig bewiesen werden, unter Staurosporin treten extrem hohe Apoptoseraten auf.

Alle getesteten Immunsuppressiva zeigen im therapeutischen Bereich keine erhöhten Apoptoseraten. Hingegen zeigt sich bei der humanen Zelllinie, dass alle Immunsuppressiva im therapeutischen Bereich zu einer Verringerung der Apoptoserate der Stammzellen im Vergleich zur Negativkontrolle führen. Unter Tacrolimus und Ciclosporin fällt dieser Unterschied zur Negativkontrolle und zu den anderen getesteten Immunsuppressiva sogar signifikant aus. Für Zellen verschiedener differenzierter Gewebe konnte dieser Effekt für Ciclosporin bereits gezeigt werden [157, 39, 126], nicht aber für mesenchymale Stammzellen. Su Ma et al. untersuchten an Ratten die Ciclosporin-Nebenwirkung der Zahnfleischhyperplasie. Sie fanden dabei eine verminderte Apoptose der Zahnfleischepithelzellen bei Ratten, die mit Ciclosporin behandelt wurden. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass das Protein Bcl-2 bei den mit Ciclosporin behandelten Ratten vermehrt exprimiert wird [157]. Bcl-2 sorgt hierbei durch eine verminderte Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien für eine verminderte Apoptose [50]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass bei den mit Ciclosporin behandelten Ratten das Caspase-3 Protein weniger exprimiert wird. Caspase-3 ist ein Protein, das wesentlich an der Apoptose von Zellen beteiligt ist [28]. Qiaoxiang Yin et al. führten eine Studie an Schweinen durch, bei der diese nach einem Myokardinfarkt aus Fettgewebe stammende mesenchymale Stammzellen und eine Ciclosporin-Nanopartikel-Emulsion verabreicht bekamen. Dies resultierte in einer Verringerung der Apoptoserate bei den Kardiomyozyten [126]. Sie führten dies darauf zurück, dass Ciclosporin die Öffnung der mitochondrial permeability transition pores (mPTPs) verhindert, indem es an Cyclophilin D in der mitochondrialen Matrix bindet [98]. Die Auswirkungen auf die Apoptoserate der verwendeten mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe wurden nicht untersucht. Ob diese Mechanismen auch für mesenchymale Stammzellen gelten, bleibt daher zu untersuchen. Auch für Tacrolimus wurden bereits Auswirkungen auf das Apoptoseverhalten differenzierter Zellen beobachtet [76, 117]. Que et al. untersuchten das Apoptoseverhalten von Rattenhaut-Fibroblasten, die mit Tacrolimus

inkubiert wurden. Sie stellten dabei eine gesteigerte Apoptoserate durch die vermehrte Freisetzung von Cytochrom C und Caspase-3 fest [76]. Konträr hierzu zeigten Feng et al. bei ihren Experimenten eine verminderte Apoptose von neuronalen Zellen bei Ratten, die mit Tacrolimus behandelt wurden, nachdem sie einer Ischämie des Rückenmarkes ausgesetzt waren im Vergleich zur nichtbehandelten Gruppe [117]. Sie führten dies auf eine verminderte Caspase-3 Expression zurück. Foeldes et al. zeigten sowohl für Tacrolimus als auch für Ciclosporin einen Rückgang der Apoptose bei ihren Untersuchungen an Endothelzellen und Myokardzellen [42]. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen klar eine signifikante Erniedrigung der Apoptoserate durch die Behandlung der humanen mesenchymalen Stammzellen mit Ciclosporin und Tacrolimus. Dies lässt einen positiven Effekt beim perioperativen Einsatz der Zellen erhoffen. Würde man dieses Ergebnis in eine Studie in vivo übertragen, könnte sich hieraus ein Vorteil gegenüber anderen Immunsuppressiva ergeben, indem dem Körper quantitativ mehr Stammzellen zur Verfügung stehen.

Erhöht man die Dosis der Immunsuppressiva über die therapeutische Konzentration hinaus, lassen sich für Simulect, ATG und Thymoglobulin signifikant erhöhte Apoptoseraten bei der humanen Zelllinie L87 nachweisen. Stattdessen führen Dosiserhöhungen von Tacrolimus und Ciclosporin weder bei den murinen noch bei den humanen Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate.

Anders ausgedrückt, kommt es bei hohen Dosen an Immunsuppressiva, die auf einem Antikörper beruhen zur vermehrten Apoptose der Stammzellen, während Calcineurininhibitoren auch in hohen Dosen keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate der Stammzellen zu haben scheinen.

Auf den Menschen übertragen könnte dies bei einer Akkumulation von ATG, Simulect oder Thymoglobulin dazu führen, dass die therapeutischen Stammzellen vermehrt Apoptose eingehen und der Benefit der Stammzellgabe verloren geht. Auch hier zeigt sich ein Vorteil von Ciclosporin und Tacrolimus gegenüber den Antikörper-vermittelten Immunsuppressiva.

4.3 Auswirkungen der Immunsuppressiva auf das Proliferationsverhalten der Stammzellen

Für jede Art der Stammzelltherapie ist auch die Proliferation der Stammzellen ein notwendiger und wichtiger Prozess. Umso wichtiger ist demnach zu wissen, ob und inwiefern die Stammzellen durch zusätzliche Immunsuppressiva in ihrer Proliferation gehemmt werden.

Die vorliegende Arbeit möchte hierzu folgende Fragen beantwortet wissen:

- a) Verändern die einzelnen Immunsuppressiva in verschiedenen Konzentrationen das Proliferationsverhalten der Zellen?
- b) Wie sieht der Vergleich zwischen den einzelnen Immunsuppressiva bezüglich ihrer Auswirkung auf das Proliferationsverhalten der Zellen aus?

Für einige der Immunsuppressiva, die in dieser Arbeit untersucht wurden, konnten bereits Effekte auf das Proliferationsverhalten differenzierter Zellen nachgewiesen werden. Für Tacrolimus konnte man bei Fibroblasten, Myokardzellen sowie Endothelzellen einen Proliferationsrückgang nachweisen [76, 42]. Ebenso konnten Foeldes et al. bei ihren in vitro Experimenten für Ciclosporin einen Rückgang der Proliferation bei Myokard- und Endothelzellen zeigen [42]. Sontag et al. untersuchten die Auswirkung von Tacrolimus und Ciclosporin auf die Proliferation bei menschlichen Stammzellen, die aus dem Zentralnervensystem abgeleitet wurden. Sie führten sowohl in vitro als auch in vivo Untersuchungen durch. Bei den in vitro Experimenten zeigte sich für Ciclosporin ein signifikanter Rückgang der Proliferation, Tacrolimus führte zu keiner Änderung der Proliferationsrate bei den Zellen. In vitro verwendeten sie immundefiziente NOD-scid-Mäuse denen eine Rückenmarksverletzung beigebracht wurde und denen hiernach oben genannte Stammzellen transplantiert wurden. Zusätzlich wurden sie u.a. mit Tacrolimus und Ciclosporin behandelt. 14 Wochen nach der Transplantation wurden die Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten der Stammzellen getestet. Hierbei zeigte sich keinerlei Effekt auf die Proliferation durch Tacrolimus oder Ciclosporin [149]. Die Autoren führen dies darauf zurück, dass die Effekte der Immunsuppressiva in einer so komplexen Mikroumwelt wie einer Rückenmarksverletzung weniger potent sind als in einer kontrollierten in vivo Studie ohne viele äußere Einflüsse. Für Thymoglobulin konnten Franquesa et al. zeigen, dass mesenchymale Stammzellen direkt in ihren Eigenschaften beeinflusst werden. Sie zeigten an mesenchymalen Stammzellen, die aus Nierenfettgewebe gewonnen wurden, dass

Thymoglobulin an die Oberfläche dieser Zellen bindet und dass sie anfälliger für eine Lyse durch natürliche Killer-T-Zellen werden [45]. Des Weiteren konnte ein Rückgang der Überlebensrate der mesenchymalen Stammzellen nach Inkubation mit Thymoglobulin gezeigt werden. Für die Auswirkung der getesteten Immunsuppressiva auf das Proliferationsverhalten mesenchymaler Stammzellen gibt es bisher keine Daten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es im Bereich der therapeutischen Konzentration bei keinem der getesteten Immunsuppressiva zu einem signifikanten Anstieg oder einer signifikanten Abnahme der Proliferation der mesenchymalen Stammzellen kommt. Dies ließ sich sowohl für die humane als auch für die murine Zelllinie beweisen.

Auch in sehr niedrigen Dosierungen zeigen die Tests keine signifikanten Unterschiede der Proliferationsrate im Vergleich zur Negativkontrolle und zum therapeutischen Bereich der Immunsuppressiva. Zusammengefasst legt dies nahe, dass auch bei einer perioperativen Stammzellgabe, die Immunsuppressiva in therapeutischer Konzentration keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der mesenchymalen Stammzellen besitzen.

Anders verhält es sich bei höheren Dosierungen der Immunsuppressiva. Simulect und ATG zeigen bereits bei einer Dosiserhöhung um den Faktor acht eine signifikante Abnahme der Proliferation der humanen Stammzellen L87. Vervierfacht man diese Dosis noch einmal, zeigen sich auch bei Thymoglobulin, Lymphoglobulin und Ciclosporin signifikante Proliferationsabnahmen bei den humanen Zellen.

Tacrolimus hingegen zeigt erst bei dem 256-fachen der therapeutischen Dosierung eine signifikante Verminderung der Proliferation der Zelllinie L87.

Bei der murinen Zellreihe RM26 bestätigt sich dieses Ergebnis. Unter Ciclosporin kommt es ab einer Dosierung, die dem 64-fachen der therapeutischen Dosis entspricht zu einem signifikanten Abfall der Proliferation.

Die Dosierung von Tacrolimus wurde bis auf das 512-fache der therapeutischen Dosis erhöht und selbst unter dieser extremen Dosierung kam es zu keinem Abfall der Proliferationsrate der murinen Zellen.

Auch wenn in der heutigen Zeit die Akkumulation von Immunsuppressiva im Körper eines Patienten durch diverse Kontrollmechanismen sehr unwahrscheinlich ist, sollte man diese Ergebnisse mit in das therapeutische Kalkül ziehen und überlegen, ob bei einer gleichzeitigen Therapie mit Immunsuppressiva und mesenchymalen Stammzellen die Gabe von Tacrolimus der Gabe von Simulect und ATG vorzuziehen ist.

4.4 Auswirkungen der Immunsuppressiva auf die Exprimierung von B7.1 und B7H1

Die kostimulierenden Liganden B7.1 und B7H1 spielen eine wichtige Funktion bei der Immunmodulation.

B7H1 wirkt, bezogen auf allogene Transplantate, vor allem inhibierend auf die Aktivierung von T-Zellen [51,158].

B7.1 hingegen ist essentiell an der Aktivierung und der Regulation der T-Zellen und ihrer Immunantwort beteiligt [158].

Die vorliegende Arbeit befasst sich an der Stelle mit folgenden Fragen:

- a) Werden auf den Stammzelllinien die Kostimulatoren B7H1 und B7.1 exprimiert?
- b) Wie verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen den beiden Kostimulatoren bei Behandlung der Stammzellen mit verschiedenen Konzentrationen der Immunsuppressiva?

Da es sich bei diesen Experimenten um Einfachbestimmungen handelt, weisen die Ergebnisse hierzu keine Signifikanz auf.

Zunächst ist festzustellen, dass sowohl auf der murinen Zelllinie RM26 als auch auf der humanen Zelllinie L87 beide Liganden nachweisbar sind.

Bei der Exprimierung des Liganden B7.1 zeigt sich, bezogen auf die humane Zelllinie L87, dass alle getesteten Immunsuppressiva, außer Tacrolimus, in der therapeutischen Dosis zu einer vermehrten Expression von B7.1 führen. Dies würde eine vermehrte Aktivierung der T-Zellen bedeuten, was wiederum eine größere Gefahr für die Stammzellen und das Transplantat zur Folge hätte.

Unter der therapeutischen Dosis von Tacrolimus bleibt die Exprimierung von B7.1 konstant, was somit keinen Einfluss auf die T-Zellaktivierung hat.

Bezogen auf die murine Zelllinie RM26 lassen sich unter den therapeutischen Konzentrationen von Tacrolimus und Ciclosporin eine verminderte Exprimierung des Liganden B7.1 und konstante Werte für die Exprimierung von B7H1 nachweisen.

Die verminderte Exprimierung des Liganden B7.1 macht somit eine vermehrte T-Zellaktivierung des Transplantatempfängers durch die gleichzeitige Therapie mit Stammzellen und Immunsuppressiva sehr unwahrscheinlich. Ob es hingegen einen sogar protektiven Effekt auf die Therapie hat, bleibt zu klären.

5. Zusammenfassung

Im therapeutischen Bereich besitzen die getesteten Immunsuppressiva keinerlei Einfluss auf das Proliferationsverhalten der murinen und humanen, mesenchymalen Stammzellen. Weiter konnte gezeigt werden, dass es im therapeutischen Bereich unter Ciclosporin und Tacrolimus zu einer verminderten Apoptoserate der menschlichen Stammzellen kommt. Inwieweit dadurch Tacrolimus und Ciclosporin einen Vorteil in vivo gegenüber den anderen Immunsuppressiva bieten, bleibt zu klären.

6. Literaturverzeichnis

fortlaufende Nummer	Literaturstelle alphabetisch
1	Abdul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober: Immunologie. <i>Hans Huber Verlag 1996</i>
2	Amlot PL, Rawlings E, Fernando ON, Griffin PJ, Heinrich G, Schreier MH, Castaigne JP, Moore R, Sweny P: Prolonged action of chimeric interleukin-2 receptor (CD25) monoclonal antibody used in cadaveric renal transplantation. <i>Transplantation. 1995; 60: 748-756</i>
3	KC Anderson, BA Barut, J Ritz, AS Freedman, T Takvorian, SN Rabinowe, R Soiffer, L Heflin, F Coral and K Dear: Monoclonal antibody-purged autologous bone marrow transplantation therapy for multiple myeloma. <i>Blood 1991;77:712-720.</i>
4	Andrews RG, Bartelmez SH, Knitter GH, Myerson D, Bernstein ID, Appelbaum FR, Zsebo KM: A c-kit ligand, recombinant human stem cell factor, mediates reversible expansion of multiple CD34+ colony-forming cell types in blood and marrow of baboons. <i>Blood 1992;80:920-927.</i>
5	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. <i>Blood 1986;67:842-858.</i>
6	Ashe P, Berry M: Apoptotic signaling cascades. <i>Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 2003;27: 199– 214</i>
7	Baecher-Allan, C., J.A. Brown, G.J. Freeman, and D.A. Hafler: Cd4(+)cd25(high) regulatory cells in human peripheral blood. <i>J. Immunol. 2001, 167:1245–1253.</i>
8	Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B: Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. <i>Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:2804-2809.</i>
9	Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA: Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. <i>Blood 1994;84:2554-2561.</i>
10	Becker AJ, McCulloch EA, Till JE.: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. <i>Nature 1963;197:452-454.</i>
11	Bender JG, Unverzagt K, Walker DE, Lee W, Smith S, Williams S, Van Epps DE: Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. <i>Clin Immunol Immunopathol 1994;70:10-18.</i>

12	Bernstein ID, Andrews RG, Zsebo KM: Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34+ and CD34+lin- cells, and the generation of colonyforming cell progeny from CD34+lin- cells cultured with interleukin-3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), or granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). <i>Blood</i> 1991;77:2316-2321.
13	Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE: A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. <i>Nat Med</i> 1998;9:1038-1045.
14	Bijur, S.: Current concepts in the immunology of allograft rejection, <i>Indian J Med Sci</i> , 50, 1996, 13-19.
15	Bradley, J.A., Mason, D.W. and Morris, P.J: Evidence that rat renal allografts are rejected by cytotoxic T cells and not by nonspecific effectors, <i>Transplantation</i> , 39, 1985, 169-175.
16	Bradley, J.A., Mowat, A.M. and Bolton, E.M: Processed MHC class I alloantigen as the stimulus for CD4+ T-cell dependent antibody-mediated graft rejection, <i>Immunol Today</i> , 13, 1992, 434-438.
17	Brecher G, Cronkite EP: Post-radiation parabiosis and survival in rats. <i>Proc Soc Exp Biol Med</i> 1951;77:292-294.
18	Brecher G, Cronkite EP: Post-radiation parabiosis and survival in rats. <i>Proc Soc Exp Biol Med</i> 1951;77:292-294.
19	Broudy VC, Lin N, Zsebo KM, Birkett NC, Smith KA, Bernstein ID, Papayannopoulou T: Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. <i>Blood</i> 1992;79:338-346.
20	Brugger W, Möcklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L: Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon- gamma, and erythropoietin. <i>Blood</i> 1993;81:2579-2584.
21	Buurman WA, Ruers TJ, Daemen IA, van der Linden CJ, Groenewegen G: Cyclosporin A inhibits IL2-driven proliferation of human alloactivated T cells. <i>J Immunol</i> 1986; 136: 4035-9.

22	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. <i>Leukemia</i> 1993;7:1409-1415.
23	Cantrell, D.A. and Smith, K.A: Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth, <i>J Exp Med</i> , 158, 1983, 1895-1911.
24	Capel B, Hawley RG, Mintz B: Long- and short-lived murine hematopoietic stem cell clones individually identified with retroviral integration markers. <i>Blood</i> 1990;75:2267-2270.
25	Carreno BM, Collins M: The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. <i>Annu Rev Immunol</i> 2002;20:29–53.
26	Carter, L., L.A. Fouser, J. Jussif, L. Fitz, B. Deng, C.R. Wood, M. Collins, T. Honjo, G.J. Freeman, and B.M. Carreno: PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. <i>Eur. J. Immunol.</i> 2002, 32:634–643.
27	Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A: The protooncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. <i>Nature</i> 1988;335:88-89.
28	Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. <i>Microbiol Mol Biol Rev</i> 2000;64:821-846.
29	Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik: Immunologie, 5. Auflage, Spektrum akademischer Verlag. 2002
30	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. <i>J Immunol</i> 1984;133:157-163.
31	Collins M, Ling V, Carreno BM: The B7 family of immune regulatory ligands. <i>Genome Biol</i> 2005;6:223.
32	Deeg HJ, Klingemann HG, Phillips GL: A guide to bone marrow transplantation. Berlin, New York: Springer Verlag, 1988.

33	Dmoszynska, A. and Rolinski, J: [Interleukin 2 receptor (Il-2): structure and function], <i>Acta Haematol Pol</i> , 26, 1995, 257-262.
34	Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen: B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T cell proliferation and interleukin-10 secretion. <i>Nat. Med.</i> 1999, 5:1365–1369.
35	Dong, H., S.E. Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L: Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. <i>Nat. Med.</i> 2002, 8:793–800.
36	Dong, V.M., K.L. Womer, and M.H. Sayegh: Transplantation tolerance: the concept and its applicability. <i>Pediatr. Transplant.</i> 1999, 3:181–192.
37	Dorshkind K: Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. <i>Ann Rev Immunol</i> 1990;8:111-137.
38	Dresske, B., Zhu, X., Herwartz, C., Brotzmann, K. and 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, <i>Transplant Proc</i> , 29, 1997, 1715-1716.
39	Du Q, Bian XL, Xu XL, Zhu B, Yu B, Zhai Q: Role of mitochondrial permeability transition in human hepatocellular carcinoma Hep-G2 cell death induced by rhein., <i>Fitoterapia</i> . 2013 Dec; 91:68-73
40	Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF: Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. <i>Blood</i> 1990;75:2417-2423.
41	Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Weissman IL: Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1993;90:3760-3764.
42	Foeldes G, Mioulane M, Kodagoda T, Lendvai Z, Iqbal A, Ali NN, Schneider MD, Harding SE: Immunosuppressive Agents Modulate Function, Growth, and Survival of Cardiomyocytes and Endothelial Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. <i>Stem Cells Dev.</i> 2013 Dec 24.
43	Foon KA, Tood RF III.: Immunologic classification of leukemia and lymphoma. <i>Blood</i> 1986;68:1-31.

44	Forbes, R.D. and Guttman, R.D.: Pathogenetic studies of cardiac allograft rejection using inbred rat models, <i>Immunol Rev</i> , 77, 1984, 5-29.
45	Franquesa M, Baan CC, Korevaar SS, Engela AU, Roemeling-van Rhijn M, Weimar W, Betjes MG, Grinyo JM, Hoogduijn MJ: The effect of rabbit antithymocyte globulin on human mesenchymal stem cells. <i>Transpl. Int.</i> 2013 Jun;26(6):651-8.
46	Freeman, G., A. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. Byrne, H. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. Bowman, B. Carreno, M. Collins, C. Wood, and T. Honjo: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. <i>J. Exp. Med.</i> 2000, 192:1-9.
47	Fresenius HemoCare Immune Therapy GmbH: Gebrauchsinformation und Fachinformation für ATG-Fresenius S. <i>Fresenius HemoCare Immune Therapy GmbH</i> , 2000
48	Gao, W., G. Demirci, T.B. Strom, and X.C. Li: Stimulating PD-1-negative signals concurrent with blocking CD154 co-stimulation induces long-term islet allograft survival. <i>Transplantation.</i> 2003, 76:994-999.
49	Gould, D.S. and Auchincloss, H., Jr: Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection, <i>Immunol Today</i> , 20, 1999, 77-82.
50	Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. <i>Science</i> 1998;281:1309-1312
51	Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, Habicht A, Azuma M, Yagita H, Noelle RJ, Coyle A, Mellor AL, Khoury SJ, Sayegh MH: A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. <i>J Exp Med.</i> 2005 Jul 18;202(2):231-7.
52	H.L. Trivedi, A.V. Vanikar, P.R. Modi, V.R. Shah, J.M. Vakil, V.B. Trivedi, and S.I. Khemchandani: Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation, Mixed Chimerism, and Tolerance in Living Related Donor Renal Allograft Recipients. <i>Transplantation Proceedings</i> 2005: 37, 737-742
53	Hall, B.M: Cells mediating allograft rejection, <i>Transplantation</i> , 51, 1991, 1141-1151.

54	Harris DT, Schumacher MJ, Rychlik S, Booth A, Acevedo A, Rubinstein P, Bard J, Boyse EA: Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. <i>Bone Marrow Transplant</i> 1994;13:135-143.
55	Heath, W.R., Hurd, M.E., Carbone, F.R. and Sherman, L.A: Peptide-dependent recognition of H-2Kb by alloreactive cytotoxic T lymphocytes, <i>Nature</i> , 341, 1989, 749-752.
56	Heimfeld S, Hudak S, Weissman I, Rennick D: The in vitro response of phenotypically defined mouse stem cells and myeloerythroid progenitors to single or multiple growth factors. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1991;88:9902-9906.
57	Hess AD, Esa AH, Colombani PM: Mechanisms of action of cyclosporine: effect on cells of the immune system and on subcellular events in T-cell activation. <i>Transplant Pro</i> 1988; 20(suppl2): 29-40
58	Hogge DE, Sutherland HJ, Lansdorp PM, Phillips GL, Eaves CJ: The elusive peripheral blood hemopoietic stem cell. <i>Semin Hematol</i> 1993;30:82-89.
59	Huang S, Terstappen LWMM: Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. <i>Nature</i> 1992;365:367-369.
60	Huang S, Terstappen LWMM: Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. <i>Nature</i> 1994;368:664 (correction).
61	Huang S, Terstappen LWMM.: Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells. <i>Blood</i> 1994;83:1515-1526.
62	Huss R, Deeg HJ.: Stem cell factor induced expression of p27 kip-1 during hematopoietic differentiation. <i>Exp Mol Pathol</i> 1995;63:129-134.
63	Huss R, Gatsios P, Graeve L, Lange C, Eissner G, Kolb HJ, Thalmeier K, Heinrich PC: Quiescence of CD34-negative haematopoietic stem cells is mediated by downregulation of Cyclin B and no stat activation. <i>Cytokine</i> . 2000 Aug;12(8):1195-204.
64	Huss R, Günther W, Schumm M, Ottinger H, Grosse-Wilde H, Kolb H: CD34-negative hematopoietic stem cells isolated from human peripheral blood cells as ultimate precursors of hematopoietic progenitors. <i>Infusionsther Transfusionsmed</i> 1997;24:404-409.

65	Huss R, Hong DS, Beckham C, Kimball L, Myerson DH, Storb R, Deeg HJ: Ultrastructural localization of stem cell factor in canine marrow-derived stromal cells. <i>Exp Hematol</i> 1995;23:33-40.
66	Huss R, Hong DS, McSweeney PA, Hoy CA, Deeg HJ: Differentiation of canine marrow cells with hematopoietic characteristics from an adherent stromal cell precursor. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1995;92:748-752.
67	Huss R, Hoy CA, Deeg HJ: Contact and growth factor involved in proliferation and differentiation in a canine marrow derived stromal cell line. <i>Blood</i> 1995;85:2414-2421.
68	Huss R, Hoy CA, Deeg HJ: Stroma derived hematopoietic progenitors: cell cycle dependent proliferation and differentiation. In: <i>Gluckman E, Coulombel E, eds. Ontogeny of Hematopoiesis: Aplastic Anemia. Colloque Inserm. Paris: Libbey Eurotext</i> 1995;235:209-213.
69	Huss R: CD34-negative stem cells as the earliest precursors of hematopoietic progeny. <i>Exp Hematol</i> 1998;26:1022-1023.
70	Ikuta K, Weissman IL: Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1992;89:1502-1506.
71	IMTIX SangStat S.A.S: Fachinformation zu Lymphoglobulin. <i>IMTIX SangStat S.A.S</i> 2001
72	IMTIX SangStat S.A.S: Fachinformation zu Thymoglobulin. <i>IMTIX SangStat S.A.S</i> 2002
73	Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo: Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. <i>EMBO J.</i> 1992, 11:3887-3895.
74	Ito, T., T. Ueno, M.R. Clarkson, X. Yuan, M.M. Jurewicz, H. Yagita, M. Azuma, A.H. Sharpe, H. Auchincloss Jr., M. Sayegh, and N. Najafian: Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo. <i>J. Immunol.</i> 2005, 174:6648-6656.
75	Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, Rao A: The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. <i>Nature</i> 1993; 365: 352-5.

76	J Que, Cao Q, Sui T, Du S, Kong D, Cao X: Effect of FK506 in reducing scar formation by inducing fibroblast apoptosis after sciatic nerve injury in rats, <i>Cell Death and Disease</i> (2013) 4, e526
77	Juttner CA, To LB, Haylock DN, Branford A, Kimber RJ: Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. <i>Br J Haematol</i> 1985;61:739-745.
78	Kalman VK, Klimpel GR: Cyclosporin A inhibits the production of gamma interferon, but does not inhibit production of virus-induced gamma interferon. <i>Cell Immunol</i> 1983; 78: 122-9
79	Katz FE, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF: Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. <i>Leuk Res</i> 1985;67:842-847.
80	Kawano Y, Nissen C, Gratwohl A, Wursch A, Speck B.: Cytotoxic and stimulatory effects of antilymphocyte globulin (ALG) on hematopoiesis, <i>Blood</i> , 1990; 60(5):297-300
81	Keating A, Singer JW, Killen PD, Striker GE, Salo AC, Sanders J, Thomas ED, Thorning D, Fialkow PJ: Donor origin of the in vitro haematopoietic microenvironment after marrow transplantation in man. <i>Nature</i> 1982;298:280-283.
82	Kernan NA, Flomenberg N, Dupont B, O'Reilly RJ: Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. <i>Transplantation</i> 1987;43:842-847.
83	Khoury, S.J., and M.H. Sayegh: The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. <i>Immunity</i> . 2004, 20: 529–538.
84	Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T, Ema H, Shibuya A, Nakauchi H: Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. <i>Stem Cells</i> 1999;17:286-294.
85	Kinniburgh D, Russell NH: Comparative study of CD34- positive cells and subpopulations in human and umbilical cord blood and bone marrow. <i>Bone Marrow Transplant</i> 1993;12:489-494.
86	Körbling M, Burke P, Braine H, Elfenbein G, Santos G, Kaizer H: Successful engraftment of blood-derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. <i>Exp Hematol</i> 1981;9:684-690.

87	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. <i>J Hematother</i> 1999;8:335-342.
88	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. <i>Nat. Immunol.</i> 2001, 2:261–268.
89	Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S: Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. <i>Cell, Vol. 113, 717-730, June 13, 2003</i>
90	Lesley J. Scott, Kate McKeage, Susan J. Keam, Greg L. Plosker: Tacrolimus: A further update of its use in the management of organ transplantation. <i>ADIS Drug Evaluation: Drugs</i> 2003; 63 (12): 1247 1297
91	Linenberger M, Abkovitz JL: Studies in feline long-term marrow culture: hematopoiesis on normal and feline leukemia virus infected stromal cells. <i>Blood</i> 1992;80:651-662.
92	Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, Cohen P, MacKintosh C, Klee CB, Schreiber SL: Inhibition of T-cell signalling by Immunophilin-Ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. <i>Biochemistry</i> 1992; 31: 3896-901
93	Löffler, Petrides: Biochemie und Patobiochemie, 6. Auflage, Springerverlag 1997, 209-210
94	Lopez M, Mortel O, Pouillart P, Zucker JM, Fechtenbaum J, Douay L, Palangie T, Michon J, Salmon D: Infusion of autologous peripheral blood nucleated cells hastens haematological recovery after high dose chemotherapy and autologous transplantation of bone marrow. <i>Bone Marrow Transplant</i> 1990;5:44-45.
95	Lowry, R.P., Forbes, R.D., Blackburn, J.H. and Marghesco, D.M: Immune mechanisms in organ allograft rejection. V. Pivotal role of the cytotoxic-suppressor T cell subset in the rejection of heart grafts bearing isolated class I disparities in the inbred rat, <i>Transplantation</i> , 40, 1985, 545-550.
96	Macatonia, S.E., Taylor, P.M., Knight, S.C. and Askonas, B.A: Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro, <i>J Exp Med</i> , 169, 1989, 1255 1264.
97	Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. <i>J Clin Invest</i> 1999;103:697-705.

98	Malouitre S, Dube H, Selwood D, Crompton M. Mitochondrial targeting of cyclosporin A enables selective inhibition of cyclophilin-D and enhanced cytoprotection after glucose and oxygen deprivation. <i>Biochem J.</i> 2010;425(1):137–148.
99	McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM: Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. <i>Exp Hematol</i> 1991;19:226-231.
100	McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM, Clark SC, Quesenberry PJ: Detection of a human CFC with a high proliferative potential. <i>Blood</i> 1989;74:609-612.
101	Meuer, S.C., Cooper, D.A., Hodgdon, J.C., Hussey, R.E., Fitzgerald, K.A., Schlossman, S.F. and Reinherz, E.L: Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes, <i>Science</i> , 222, 1983, 1239 1242.
102	Migliaccio G, Migliaccio AR, Druzin ML, Giardina PJ, Zsebo KM, Adamson JW: Effects of recombinant human stem cell factor (SCF) on the growth of human progenitor cells in vitro. <i>J Cell Physiol</i> 1991;148:503-509.
103	Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T. and Taniguchi, T: The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes, <i>Annu Rev Immunol</i> , 11, 1993, 245-268.
104	Morel F, Galy A, Chen B, Szilvassy SJ: Equal distribution of competitive long-term repopulating stem cells in the CD34+ and CD34– fractions of Thy-1low Lin–/low Sca-1+ bone marrow cells. <i>Exp Hematol</i> 1998;26:440-448.
105	Morley A, King-Smith EA, Stohlman F Jr: The oscillatory nature of hemopoiesis. In: <i>Stohlman F Jr, ed. Hematopoietic Cellular Proliferation.</i> New York and London: Grune & Stratton, 1970;3-14.
106	Morris PJ: Cyclosporine. In: <i>Kidney Transplantation: Principles and Practice.</i> 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 1988: 285-317
107	Müller-Sieburg CE, Townsend K, Weissman IL, Rennick D: Proliferation and differentiation of highly enriched mouse hematopoietic stem cells and progenitor cells in response to defined growth factors. <i>J Exp Med</i> 1988;167:1825-1840.
108	Müller-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-low hematopoietic stem cell. <i>Cell</i> 1986;44:653-662.

109	<u>NIH Stem Cell Information (official National Institutes of Health resource for stem-cell research): http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics2.asp</u>
110	Novak U, Harris EA, Forrester W, Groudine M, Gelinis R: High-level b-globin expression after retroviral transfer of locus activation region-containing human b-globin gene derivatives into murine erythroleukemia cells. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1990;87:3386-3390.
111	Novartis Pharma GmbH: Sandimmun Optoral: Produktmonographie, Transplantation. <i>Novartis Pharma GmbH</i> 2001
112	Novartis Pharma GmbH: Simulect (basiliximab) Monographie. <i>Transplantation & Immunology</i> . Novartis Pharma GmbH 2002
113	O'Reilly RJ, Pollack MS, Kapoor N, Kirkpatrick D, Dupont B: Fetal liver transplantation in man and animals. In: <i>Gale RP, ed. Recent Advances in Bone Marrow Transplantation</i> . New York: Alan R. Liss, 1983;799-830.
114	Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Nishikawa S, Miura Y, Suda T: Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. <i>Blood</i> 1991;78:1706-1712.
115	Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H: Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34 ⁻ low/negative hematopoietic stem cell. <i>Science</i> 1996;273:242-245.
116	Ozkaynak, E., L. 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. <i>J. Immunol.</i> 2002, 169:6546–6553.
117	Pan F, Cheng YX, Zhu CL, Tao FH, Li ZH, Tao HY, He B, Yu L, Ji P, Tang H: Tacrolimus postconditioning alleviates apoptotic cell death in rats after spinal cord ischemia-reperfusion injury via up-regulating protein-serine-threonine kinases phosphorylation. <i>J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.</i> 2013 Dec;33(6):852-6.
118	Parfrey, P.S., Kuo, Y.L., Hanley, J.A., Knaack, J., Xue, Z., Lisbona, R. and Guttman, R.D: The diagnostic and prognostic value of renal allograft biopsy, <i>Transplantation</i> , 38, 1984, 586-590.
119	Parker GC, Anastassova-Kristeva M, Broxmeyer HE, Dodge WH, Eisenberg LM, Gehling UM, Guenin LM, Huss R, Moldovan NI, Rao M, Srour EF, Yoder MC: Stem cells: shibboleths of development. <i>Stem Cells Dev.</i> 2004 Dec;13(6):579-84.

120	Parker GC, Anastassova-Kristeva M, Eisenberg LM, Rao MS, Williams MA, Sanberg PR, English D; Editorial Board of Stem Cells and Development: Stem cells: shibboleths of development, part II: Toward a functional definition. <i>Stem Cells Dev.</i> 2005 Oct;14(5):463-9.
121	Paul, L.C., Hayry, P., Foegh, M., Dennis, M.J., Mihatsch, M.J., Larsson, E. and Fellstrom: Diagnostic criteria for chronic rejection/accelerated graft atherosclerosis in heart and kidney transplants: joint proposal from the Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs, <i>Transplant Proc</i> , 25, 1993, 2022-2023.
122	Petroff, M.G., L. Chen, T.A. Phillips, D. Azzola, P. Sedlmayr, and J.S. Hunt: B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. <i>Biol. Reprod.</i> 2003, 68:1496–1504.
123	Pichler, W.J: Regulation of the immune response: the TH1/TH2 concept, <i>Schweiz MedWochenschr</i> , 127, 1997, 341-348.
124	Pittinger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. <i>Science</i> 1999;284:318-321.
125	Portmann, B., Slapak, G.I., Gane, E. and Williams, R: Pathology and biopsy diagnosis of the transplanted liver, <i>Verh Dtsch Ges Pathol</i> , 79, 1995, 277-290.
126	Qiaoxiang Yin, Zhiyong Pei, Heng Wang, , Yusheng Zhao: Cyclosporine A-nanoparticles enhance the therapeutic benefit of adipose tissue-derived stem cell transplantation in a swine myocardial infarction model, <i>International Journal of Nanomedicine</i> 2014;9 17 26
127	Radka SF, Charron DJ, Brodsky FM.: Review. Class II molecules of the major histocompatibility complex considered as differentiation markers. <i>Hum Immunol</i> 1986;16:390-400.
128	Ralf Huss, Matthias Heil, Sabine Moosmann, Tibor Ziegelhoeffer, Sabine Sagebiel, Christian Seliger, Sarah Kinston, Berthold Gottgens: Improved arteriogenesis with simultaneous skeletal muscle repair in ischemic tissue by SCL + multipotent adult progenitor cell clones from peripheral blood, <i>Journal of Vascular Research</i> ; 41: 422 431
129	Ralf Huss: Isolation of primary and immortalized CD34- hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources, <i>Stem Cells</i> 2000;18:1-9

130	Reding R: Long-term complications of immunosuppression in pediatric liver recipients. <i>Acta Gastroenterol Belg.</i> 2005 Oct Dec;68(4):453-6.
131	Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S, Schubert M: Transduction on nondividing cells using pseudotyped defective hightiter HIV type 1 particles. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1996;93:15266-15271.
132	Rothstein, D.M., and M.H. Sayegh.: T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. <i>Immunol. Rev.</i> 2003, 196:85–108.
133	Russell NH, Hunter A, Rogers S, Hanley J, Anderson D: Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. <i>Lancet</i> 1993;341:1482.
134	Sabine Moosmann, Jörg Hutter, Christian Moser, Fritz Krombach, Ralf Huss: Milieu-adopted in vitro and in vivo differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones, <i>Cells Tissues Organs</i> 2005; 179: 91-101
135	Salama, A.D., T. Chitnis, J. Imitola, M.J. Ansari, H. Akiba, F. Tushima, M. Azuma, H. Yagita, M.H. Sayegh, and S.J. Khoury: Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. <i>J. Exp. Med.</i> 2003, 198:71–78.
136	Sandell L, Johnson. G, Przepiorka. D, Torok-Storb. B: Phenotype and function of T-cells associated with marrow graft failure and rejection. In: Martelli MF, Grignani F, Reisner Y, eds. TCell Depletion in Allogeneic Bone-Marrow Transplantation. <i>Serono Symposia Review No. 13.</i> New York: Raven Press, 1988;49-56.
137	Sandmaier BM, Storb R, Kinley J: Evidence of allogeneic stromal engraftment in the bone marrow using canine mesenchymal stem cells. <i>Blood</i> 1998;92:116a.
138	Sandner, S. M.R. Clarkson, A.D. Salama, A. Sanchez-Fueyo, C. Doonmenig, A. Habicht, N. Najafian, H. Yagita, H. M. Azuma, L.A. Turka, M.H. Sayegh: Role of programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune response in vivo. <i>J. Immunol.</i> 2005, 174:3408–3415.
139	Sato N, Sawada K, Koizumi K, Tarumi T, Ieko M, Yasukouchi T, Yamaguchi M, Takahashi TA, Sekiguchi S, Koike T: In vitro expansion of human peripheral blood CD34+ cells. <i>Blood</i> 1993;82:3600- 3609.
140	Sato T, Laver JH, Ogawa M: Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. <i>Blood</i> 1999;94:2548-2554.

141	Sharp JG, Armitage J, Crouse D: Are occult tumor cells present in peripheral stem cell harvests of candidates for autologous transplantation? <i>In: Dicke KA, Spitzer G, Jagannath S et al., eds. Autologous Bone Marrow Transplantation: Proceedings of the Fourth International Symposium, 1989;693-696.</i>
142	Shirwan, H., Leamer, M., Wang, H.K., Makowka, L. and Cramer, D.V: Peptides derived from alpha-helices of allogeneic class I major histocompatibility complex antigens are potent inducers of CD4+ and CD8+ T cell and B cell responses after cardiac allograft rejection, <i>Transplantation, 59, 1995, 401-410.</i>
143	Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM: Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of highdose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. <i>Blood 1989;74:1905-1914.</i>
144	Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE: The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. <i>J Cell Comp Physiol 1963;62:327-336.</i>
145	Simmons PJ, Torok-Storb B: CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. <i>Blood 1991;78:2848-2853.</i>
146	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 cultures: cloned cell lines produce cells with stromal and adherent hematopoietic characteristics. <i>Blood 1987;70:464-471.</i>
147	Singer JW, Keating A, Cuttner J, Gown AM, Jacobson R, Killen PD, Moohr JW, Najfeld V, Powell J, Sanders J: Evidence for a stem cell common to hematopoiesis and its in vitro microenvironment: studies of patients with clonal hematopoietic neoplasia. <i>Leuk Res 1984;8:535-539.</i>
148	Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S: Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. <i>Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:2788-2792.</i>
149	Sontag CJ, Nguyen HX, Kamei N, Uchida N, Anderson AJ, Cummings BJ: Immunosuppressants affect human neural stem cells in vitro but not in an in vivo model of spinal cord injury. <i>Stem Cells Transl. Med. 2013 Oct;2(10):731-44.</i>
150	Spangrude GJ, Müller-Sieburg CE, Heimfeld S, Weissman IL: Two rare populations of mouse Thy-1lo bone marrow cells repopulate the thymus. <i>J Exp Med 1988;167:1671-1683.</i>

151	Spangrude GJ: Hematopoietic stem-cell differentiation. <i>Curr Opin Immunol</i> 1991;3:171-178.
152	Srouf EF, Brandt JE, Briddell RA, Leemhuis T, van Besien K, Hoffman R. A: Human CD34+ DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of selfrenewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis. <i>Blood Cells</i> 1991;17:287-292.
153	Srouf EF, Brandt JE, Briddell RA, Grigsby S, Leemhuis T, Hoffman R. RA: Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells in vitro. <i>Blood</i> 1993;81:661-669.
154	Steinmuller, D: Which T cells mediate allograft rejection?, <i>Transplantation</i> , 40, 1985, 229-233.
155	Storb R, Epstein RB, Thomas ED: Marrow repopulating ability of peripheral blood cells compared to thoracic duct cells. <i>Blood</i> 1968;32:662-667.
156	Subudhi, S.K., P. Zhou, L.M. Yerian, R.K. Chin, J.C. Lo, R.A. Anders, Y. Sun, L. Chen, Y. Wang, M.L. Alegre, and Y.X. Fu: Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection. <i>J. Clin. Invest.</i> 2004, 113:694-700.
157	Su Ma, Peihong Liu , Yanwu Li , Lin Hou , Li Chen, Chunlin Qin: Cyclosporine A Inhibits Apoptosis of Rat Gingival Epithelium, <i>Journal of Periodontology</i> , posted online on November 21, 2013
158	Sumeena Bhatia, Michael Edidin, Steven C. Almob, Stanley G. Nathenson: B7-1 and B7-2 Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. <i>Immunol Lett.</i> 2005 Dec 13; [Epub ahead of print]
159	Sutherland DR, Watt SM, Dowden G, Karhi K, Baker MA, Greaves MF, Smart JE: Structural and partial amino acid sequence analysis of the human hemopoietic progenitor cell antigen CD34. <i>Leukemia</i> 1988 Dec;2(12):793-803
160	Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM: Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. <i>Blood</i> 1989;74:1563-1570.
161	Tamura, H., H. Dong, G. Zhu, G.L. Sica, D.B. Flies, K. Tamada, and L. Chen: B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28- independent T-helper cell function. <i>Blood.</i> 2001, 97:1809-1816.

162	Tavassoli M, Friedenstein A.: Hemopoietic stromal microenvironment, <i>Am J Hematol</i> 1983;15:195-203.
163	Thalmeier K, Meissner P, Reisbach G, Hültner L, Mortensen BT, Brechtel A, Oostendorp RA, Dörmer P: Constitutive and modulated cytokine expression in two permanent human bone marrow stromal cell lines. <i>Exp Hematol</i> 1996;24:1-9.
164	Thalmeier K, Meissner P, Moosmann S, Sagebiel S, Wiest I, Huss R: Mesenchymal differentiation and organ distribution of established human stromal cell lines in NOD/SCID mice. <i>Acta Haematol</i> 2001;105:150-165.
165	Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD: Bone-marrow transplantation. <i>N Engl J Med</i> 1975;292:832-843.
166	Thomas ED, Storb R: Technique for human marrow grafting. <i>Blood</i> 1970;36:507-515.
167	Thomas Karow, Ruth Lang-Roth: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. <i>Thomas Karow</i> 2004
168	Till JE, McCulloch EA.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. <i>Radiat Res</i> 1961;14:213-222.
169	Tilney, N.L. and Kupiec-Weglinski, J.W: The biology of acute transplant rejection, <i>Ann Surg</i> , 214, 1991, 98-106.
170	Todd MD, Grusby MJ, Lederer JA, Lacy E, Lichtman AH, Glimcher LH: Transcription of the Interleukin 4 gene is regulated by multiple promotor elements. <i>J Exp Med</i> 1993; 177: 1663-8.
171	Touraine JL: Transplantation of both fetal liver and thymus in severe combined immunodeficiencies: interaction between donor's and recipient's cells. In: <i>Lucarelli G, Fliedner TM, Gale RP, eds. Fetal Liver Transplantation. Amsterdam: Excerpta Medica, 1980;276-283.</i>
172	Tullius, S.G., Heemann, U., Hancock, W.W., Azuma, H. and Tilney, N.L: Long-term kidney isografts develop functional and morphologic changes that mimic those of chronic allograft rejection, <i>Ann Surg</i> , 220, 1994, 425-432; <i>discussion</i> 432-425.

173	Uchida N, Weissman IL: Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1low Lin–Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. <i>J Exp Med</i> 1992;175:175-184.
174	Uretsky, B.F., Murali, S., Reddy, P.S., Rabin, B., Lee, A., Griffith, B.P., Hardesty, R.L., Trento, A. and Bahnson, H.T: Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone, <i>Circulation</i> , 76, 1987, 827-834.
175	Visser JW, Bauman JG, Mulder AH, Eliason JF, de Leeuw AM: Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. <i>J Exp Med</i> 1984;159:1576-1590.
176	Visser JWM, van Bekkum DW: Purification of pluripotent hemopoietic stem cells: past and present. <i>Exp Hematol</i> 1990;18:248-256.
177	Wang, S., J. Bajorath, D.B. Flies, H. Dong, T. Honjo, and L. Chen: Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7- DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. <i>J. Exp. Med.</i> 2003, 197:1083–1091.
178	Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Van Ness K, March CJ, Park LS, Martin U, Mochizuki DY, Boswell HS: Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. <i>Cell</i> 1990;63:167-174.
179	Wish JB: Immunologic effects of cyclosporine. <i>Transplant Proc</i> 1986; 18(suppl2):15-18
180	Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A: Human protooncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. <i>Embo J</i> 1987;6:3341-3351.
181	Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M: Human bone marrow CD34– cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. <i>Exp Hematol</i> 1998;26:353-358.
182	Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C: KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. <i>Science</i> 1999;285:1553-1558.
183	Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, Hsu RY, Birkett NC, Okino KH, Murdock DC: Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. <i>Cell</i> 1990;63:213-224.