

Aus der Klinischen Kooperationsgruppe Hämatopoetische Zelltransplantation
der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
und
der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

angefertigt unter der Leitung von
Professor Dr. med. Hans-Jochem Kolb

eingereicht über
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Johannes Hirschberger

Medizinische Kleintierklinik
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Katrin Hartmann)

Charakterisierung von Antikörpern und ihrer immunsuppressiven Wirkung im präklinischen Transplantationsmodell des Hundes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Julia Anna Zorn
aus Amberg

München 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Univ.-Prof. Dr. Hirschberger
Korreferentin:	Priv. Doz. Dr. Rinder

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

Diese Arbeit widme ich den Hunden

*Basti, Bomber, Charly, Chrissy,
Djego, Dora, Dusty, Idefix & Walli*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Das hämatopoetische System	3
2.2	Erkrankungen des hämatopoetischen Systems	4
2.2.1	Klassifikation leukämischer Erkrankungen	5
2.2.2	Leukämische Stammzellen	5
2.2.3	Ätiologie	6
2.2.4	Klinisches Erscheinungsbild	7
2.2.5	Diagnostik	7
2.2.6	Therapie	8
2.3	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	10
2.3.1	Phasen der allogenen Stammzelltransplantation	11
2.3.2	Entstehung einer Graft-versus-Host Disease (GvHD)	12
2.3.3	Prophylaktische Maßnahmen gegen die GvHD	15
	<i>2.3.3.1 T-Zelldepletion</i>	15
	<i>2.3.3.2 Die Rolle des Komplementsystems für die T-Zelldepletion</i>	16
2.4	Der MHC-Komplex	18
2.4.1	Der canine MHC-Komplex	20
2.4.2	DLA-Typisierung	20
2.4.3	Bedeutung des Hundemodells für die Stammzelltransplantation	22

3	Material und Methoden	23
<hr/>		
3.1	Material	23
3.1.1	Versuchstiere	23
3.1.2	Materialien für die Laborarbeit	23
	3.1.2.1 <i>Chemikalien</i>	23
	3.1.2.2 <i>Zellkulturmedien und Reagenzien</i>	24
	3.1.2.3 <i>Lösungen</i>	25
	3.1.2.4 <i>Antikörper</i>	26
	3.1.2.4.1 <i>Monoklonale Antikörper</i>	26
	3.1.2.4.2 <i>Polyklonale Antikörper</i>	26
	3.1.2.5 <i>Magnetische Beads zur Zellseparation</i>	27
	3.1.2.6 <i>Beads zur Kalibration des Durchflusszytometers</i>	27
	3.1.2.7 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	27
3.1.3	Materialien für die Arbeit am Hund	28
	3.1.3.1 <i>Anästhetika</i>	28
	3.1.3.2 <i>Analgetika</i>	28
	3.1.3.3 <i>Antibiotika</i>	28
	3.1.3.4 <i>weitere Medikamente</i>	29
	3.1.3.5 <i>Antikoagulanzen</i>	29
	3.1.3.6 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	30
	3.1.3.7 <i>Desinfektionsmittel</i>	30
3.1.4	Geräte	31
3.2	Methoden	32
3.2.1	Zellkulturmethoden	32
	3.2.1.1 <i>Isolierung mononukleärer Zellen aus Blut und Knochenmark</i>	32
	3.2.1.2 <i>Zellzahlbestimmung</i>	32
	3.2.1.3 <i>Kryokonservierung von Zellen</i>	33
	3.2.1.4 <i>Auftauen von Zellen</i>	33
	3.2.1.5 <i>Herstellung von Hundeserumpool</i>	34

3.2.1.6	<i>Magnetische Zellseparation</i>	34
3.2.1.6.1	Grundprinzip	34
3.2.1.6.2	Separation mit MACS (engl. Magnetic Cell Separation)	35
3.2.1.6.3	Separation mit Dynabeads	36
3.2.1.7	<i>Durchflusszytometrische Zellanalyse</i>	36
3.2.1.7.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	36
3.2.1.7.2	Probenvorbereitung	38
3.2.1.8	<i>Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark</i>	39
3.2.1.9	<i>Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)</i>	40
3.2.1.9.1	Messung der Zellproliferation durch Einbau von ³ H-Thymidin	41
3.2.1.9.2	Messung der Zellproliferation durch CFSE	42
3.2.1.10	<i>Colony Forming Unit (CFU)-Assay</i>	42
3.2.2	Tierexperimentelle Methoden	43
3.2.2.1	<i>DLA-Typisierung</i>	43
3.2.2.2	<i>Entnahme von Knochenmark</i>	43
3.2.2.3	<i>T-Zelldepletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement</i>	45
3.2.2.4	<i>T-Zelldepletion mit Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)</i>	45
3.2.2.5	<i>Kryokonservierung von Knochenmark zur Transplantation</i>	46
3.2.2.6	<i>Auftauen von kryokonserviertem Knochenmark</i>	46
3.2.2.7	<i>Bestimmung der Zellzahl von Knochenmark zur Transplantation</i>	46
3.2.2.8	<i>Ganzkörperbestrahlung von Hunden</i>	47
3.2.2.9	<i>Knochenmarktransplantation</i>	49
3.2.2.10	<i>Behandlungsplan für bestrahlte und transplantierte Hunde</i>	49
3.2.2.11	<i>Herstellung eines Thrombozytenkonzentrats</i>	51
3.2.2.12	<i>Transfusion von Blut bei erniedrigtem Hämatokrit</i>	52
3.2.2.13	<i>Tägliche Blutuntersuchung transplantierter Hunde</i>	52
3.2.2.13.1	Leukozytenwerte	52
3.2.2.13.2	Thrombozytenwerte	52
3.2.2.13.3	Hämatokrit	53
3.2.2.13.4	Differentialblutbild	53
3.2.2.13.5	Retikulozyten	54

3.2.2.14	<i>Chimärismusbestimmung</i>	54
3.2.2.14.1	Chimärismusbestimmung im Knochenmark	54
3.2.2.14.2	Chimärismusbestimmung im Blut	55
3.2.2.15	<i>Leukapherese zur Gewinnung einer DLT</i>	56
3.2.3	Methoden zur Austestung einer neuen ATG-Charge	56
3.2.3.1	<i>Bindungstest</i>	56
3.2.3.2	<i>Zytotoxizitätstest</i>	57
3.2.3.3	<i>ATG-CFU-Assay</i>	57
4	Ergebnisse	59
<hr/>		
4.1	T-Zelldepletion mit Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)	59
4.1.1	In vitro Austestung von ATG 10/05	61
4.1.2	In vivo Austestung von ATG 10/05	63
4.2	Titration des Antikörpers MT-606	66
4.3	T-Zelldepletion mit monoklonalem Antikörper und Kaninchenkomplement	67
4.4	T-Zelldepletion mit monoklonalem Antikörper und Meerschweinchenkomplement	71
4.5	Allogene Knochenmarktransplantation von DLA-homozygoten Spendern und DLA-heterozygoten Empfängern	72
4.5.1	Transplantation Hund 735 → Hund 733	72
4.5.2	Transplantation Hund 736 → Hund 739	77
4.5.3	Transplantation Hund 698 → Hund 701	79
4.6	Allogene Knochenmarktransplantation von DLA-identischen Spendern und Empfängern (Hund 767 → Hund 761 und Hund 772 → Hund 769)	81
4.7	CD6-Depletion mit MACS	83

4.8	Die gemischte Lymphozytenkultur (MLC)	84
4.8.1	Kulturbedingungen	84
4.8.2	MLC-Suppression durch CD6-negative Knochenmarkzellen	87
	<i>4.8.2.1 Messung der Zellproliferation mit ³H-Thymidin</i>	87
	<i>4.8.2.2 Messung der Zellproliferation mit CFSE</i>	91
4.8.3	MLC-Suppression durch mesenchymale Stammzellen	95
4.9	Transfusion von Spenderlymphozyten nach allogener Knochenmarktransplantation von DLA-homozygoten Spendern und DLA-heterozygoten Empfängern zur Induktion einer GvHD	97
4.9.1	Transplantation Hund 698 → Hund 703	98
4.9.2	Transplantation Hund 732 → Hund 734	101
4.9.3	Transplantation Hund 741 → Hund 742	105
4.9.4	Transplantation Hund 782 → Hund 786	108
4.10	Übersicht über alle durchgeführten Transplantationen mit CD6-depletiertem Knochenmark	113
5	Diskussion	114

5.1	T-Zelldepletion mit ATG	114
5.2	T-Zelldepletion mit MT-606	115
5.3	Transplantation von KM nach CD6-Depletion mit MT-606 und rbC	117
5.4	Suppressoraktivität von CD6-depletierten Knochenmarkzellen	119
5.5	Transfusion von Spenderlymphozyten nach allogener KMT zur Induktion einer GvHD	125
5.6	Ausblick: Suizidgenherapie mit HSV-TK	127

Inhaltsverzeichnis

6	Zusammenfassung	129
7	Summary	131
8	Literaturverzeichnis	133
9	Anhang	147
9.1	Danksagung	147
9.2	Lebenslauf	149

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACD-A	Antikoagulanzen
ALL	akute lymphatische Leukämie
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AML	akute myeloische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
BC	Buffy Coat
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythrocyte
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsantigen)
CFDA	Carboxyfluoreszein Succinimidylester Diazetat
CFSE	Carboxyfluoreszein Succinimidylester
CFU	Colony Forming Unit (koloniebildende Einheit)
CFU-E	Colony Forming Unit-Erythrocyte
CFU-G	Colony Forming Unit-Granulocyte
CFU-GEMM	Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte and Macrophage
CFU-GM	Colony Forming Unit-Granulocyte and Monocyte
CFU-M	Colony Forming Unit-Monocyte
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
cpm	Counts per Minute
CSF	Colony Stimulating Factor (koloniestimulierender Faktor)
DLA	Dog Leukocyte Antigen (Leukozytenantigen des Hundes)
DLT	Donor Lymphocyte Transfusion (Transfusion von Spender-Lymphozyten)
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure
FAB	French-American-British (Kooperationsgruppe zur Klassifikation akuter Leukämien)
FACS	Fluorescence Associated Cell Sorter (Durchflusszytometer)
FCS	Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward Scatter (Vorwärts Lichtstreuung)
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GLDH	Glutamat Dehydrogenase
GvHD	Graft versus Host Disease (Spender-gegen-Empfänger-Krankheit)
GvL	Graft versus Leukemia (Spender gegen Leukämie)
Gy	Gray
h	Stunde
³ H	Tritium
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSP	Hundeserumpool
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
k	Kilo
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
l	Liter
μ	Mikro
m	Milli, Meter
MACS	Magnetic Cell Separation (magnetische Zellseparation)
mAK	monoklonaler Antikörper
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor

Abkürzungsverzeichnis

MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MLC	Mixed Lymphocyte Culture (gemischte Lymphozytenkultur)
MNC	Mononukleäre Zellen
mSC	mesenchymale Stammzellen
MsC	Meerschweinchenkomplement
MW	Mittelwert
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
o.g.	oben genannt
p	post
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PJ	Propidiumjodid
rbC	Kaninchenkomplement
RFLP	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus
rpm	rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s.c.	subkutan
SSC	Side Scatter (Seitwärts Lichtstreuung)
SSCP	single stranded conformational polymorphism
SSOP	sequence-specific oligonucleotide probes
Tab	Tabelle
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1 Einleitung

Jährlich erkranken in Deutschland mehrere tausend Menschen an Leukämie. Die Stammzelltransplantation ist eine besonders erfolgreiche Heilungsmethode für diese heterogene Krankheit. Durch intensive Vorbehandlung mit Chemotherapeutika und durch Strahlentherapie werden die erkrankten Zellen des hämatopoetischen Systems zerstört und der Organismus auf die Aufnahme der transplantierten Stammzellen vorbereitet. Diese besiedeln die freigewordenen Räume im Knochenmark und beginnen innerhalb kurzer Zeit mit der Produktion neuer gesunder Blutzellen. Anders als bei der Organtransplantation wird durch die Transplantation von Stammzellen auch das Immunsystem des Spenders auf den Empfänger übertragen. Selbst bei kompatiblen Spendern kann es vorkommen, dass sich immunkompetente Zellen aus dem Spenderknochenmark gegen Wirtszellen richten und damit zu Organschäden, vor allem in Haut, Darm und Leber führen.

Um Wege zu finden, die transplantationsbedingten Nebenwirkungen besser kontrollieren zu können und neue Protokolle für die Leukämietherapie zu erforschen, ist es von enormer Wichtigkeit, ein aussagekräftiges Tiermodell heranzuziehen. Der Hund besitzt entscheidende Kriterien, um als präklinisches Modell für die Stammzelltransplantation zu dienen.

Auf Grund seiner Größe sind alle nötigen Eingriffe wie Knochenmarkentnahme, Transplantation, Transfusion und supportive Therapie am Hund unkompliziert und in Analogie zum Menschen durchführbar. Eine Vielzahl von klinischen und in vitro-Untersuchungen geben genaueste Informationen über den Verlauf der Immunrestitution nach der Transplantation. Der Hund kann zur Langzeitbeobachtung herangezogen werden, um auch Jahre nach der Behandlung auftretende Folgeerscheinungen beurteilen und auswerten zu können. Außerdem besitzt der Hund wie keine andere Spezies neben dem Menschen die nötige genetische Diversität und einen gut vermischten Genpool. Die genaue Kenntnis über den Aufbau des caninen Haupthistokompatibilitätskomplexes und dessen starke Ähnlichkeit zu dem des Menschen machen den Hund zu einem unverzichtbaren Modell für die Stammzelltransplantation. Am Hund gewonnene Erkenntnisse der Spender-gegen-Wirt-Reaktion (engl. Graft-versus-Host (GvH) Reaktion), Immunsuppression und Toleranzinduktion fanden vielfach Eingang in die klinische Transplantation.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Hundemodell verschiedene Antikörper zur T-Zelldepletion von Knochenmark zu charakterisieren, sowie die Wirkung CD6-depletierter Knochenmarkzellen in vitro und in vivo auszutesten. Eine einfache und kostengünstige CD6-Depletionsmethode mit dem monoklonalen CD6-Antikörper MT-606 und Kaninchenkomplement wurde entwickelt und damit ein in vivo-System für die Untersuchung der GvH-Reaktion etabliert.

2 Literaturübersicht

2.1 Das hämatopoetische System

Alle Zellen des Blutes haben ihren Ursprung in einer einzigen Zellart, die als pluripotente Stammzelle bezeichnet wird. Neben deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung können aus der pluripotenten Stammzelle sowohl eine lymphoide als auch eine myeloide Vorläuferzelle entstehen, aus denen dann durch weitere Differenzierungsschritte schließlich die zirkulierenden Blutzellen gebildet werden. Der russische Arzt Maximow hat im Jahr 1909 während einer Vorlesung an der Berliner Charité das erste Mal die Hypothese aufgestellt, dass alle Blutzellen aus einer hämatopoetischen Stammzelle hervorgehen. Nach der Veröffentlichung dieses Schemas in der Folia Haematologica (Maximov A, Folia Haematologica, 1909) dauerte es weitere 60 Jahre, bis man mittels in vitro Methoden diese Annahme bestätigen konnte (Messner et al., Blood 1973 und Blood Cells 1980).

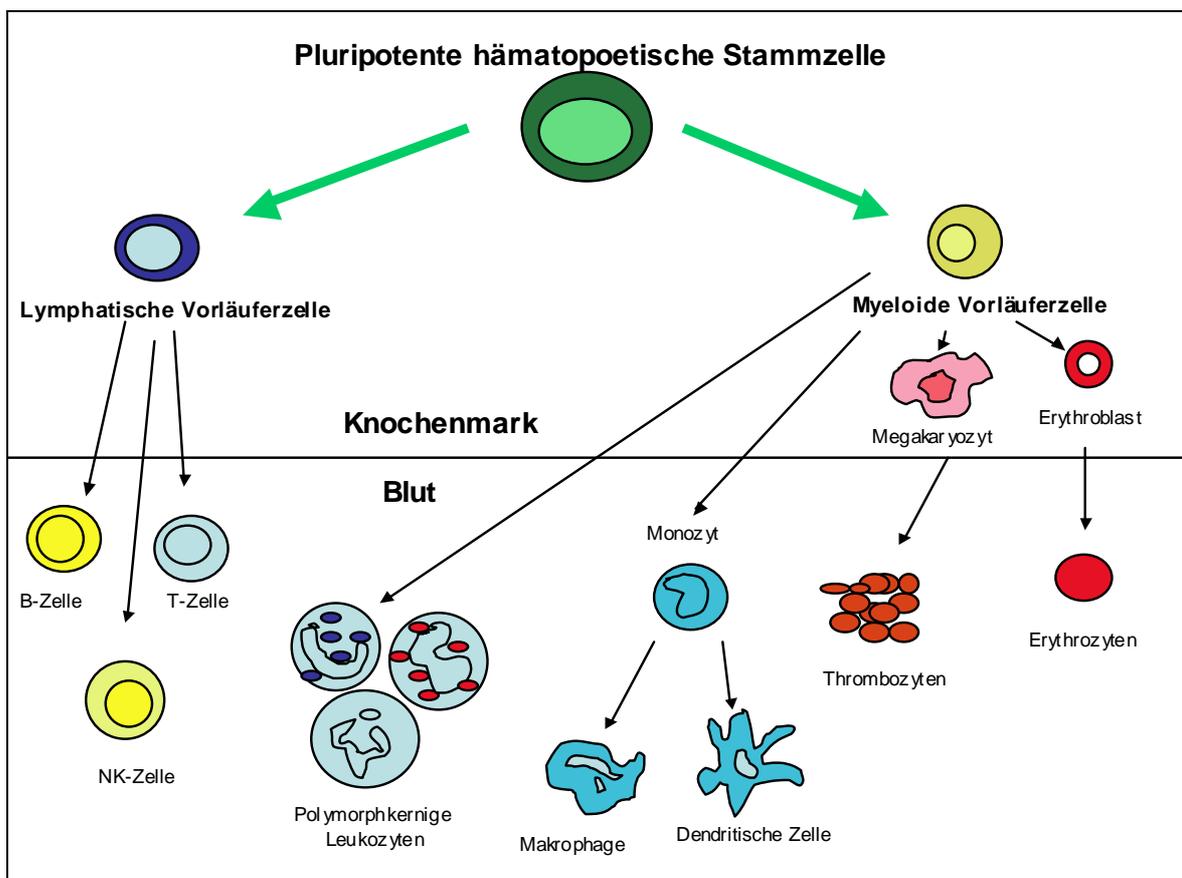


Abbildung 2.1: Übersicht über die Entstehung der einzelnen Blutzellen aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Vereinfacht nach Janeway, Immunologie, 2002.

Etwa 1% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark sind Stammzellen. Durch Selbsterneuerung und Differenzierung können sie die Hämatopoese eines Menschen während der gesamten Lebenszeit aufrechterhalten. Neuere Vermutungen gehen davon aus, dass die Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen in jedem Säugetier gleich ist (Abkowitz et al., Blood 2002) und nur die Potenz zur Selbsterneuerung und Differenzierung je nach Größe und Lebenserwartung des Individuums variiert.

Die Ausreifung der Zellen aus der lymphatischen bzw. der myeloiden Vorläuferzelle wird durch viele verschiedene Faktoren gesteuert. Die in der Reifung befindlichen hämatopoetischen Zellen interagieren dabei mit extrazellulären Matrixmolekülen, mit den verschiedensten Stromazelltypen (Dexter, J Cell Sci 1987) und werden außerdem gesteuert durch Wachstumsfaktoren, den so genannten Zytokinen. Mitte der achtziger Jahre war ein Großteil der an der Hämatopoese beteiligten Zytokine bereits charakterisiert (Metcalf, Ann Intern Med 1977 und Prog Clin Biol Res 1985; Dexter et al., J Cell Physiol Suppl 1982 und Prog Clin Biol Res 1984 und Annu Rev Cell Biol 1987; Spooncer et al., J Cell Biol 1983; Gordon et al., Nature 1987). Darunter fallen das von der Niere gebildete Erythropoetin, das die Ausreifung von Erythrozyten steuert, sowie G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) und M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), die gezielte Wirkung auf die Reifung von Granulozyten und Makrophagen aufweisen. Außerdem existieren unspezifisch wirksame Faktoren wie GM-CSF oder Interleukin-3, die Wachstum und Differenzierung multipotenter Stammzellen und Progenitorzellen der granulozytären, makrophagischen, megakaryozytären, eosinophilen und erythroiden Linien steuern (Hapel et al., J Immunol 1985; Yang et al., Cell 1986; Metcalf, Cell 1985).

2.2 Erkrankungen des hämatopoetischen Systems

Der Begriff Leukämie, der übersetzt „weißes Blut“ bedeutet, wurde von dem deutschen Arzt Rudolf Virchow geprägt. Er beschrieb 1845 erstmals diese Erkrankung des blutbildenden Systems, die sich durch meist klonale Überexpansion von Leukozyten und vor allem deren funktionsuntüchtigen Vorstufen auszeichnet.

Die leukämischen Zellen breiten sich zunächst im Knochenmark aus und unterdrücken dabei die Hämatopoese. Nach Übergreifen auf extramedulläre Organe überschwemmen die leukämischen Zellen das periphere Blut und beeinträchtigen die

Funktion von Leber, Milz, Lymphknoten und anderen Organen. Durch die Ansammlung der leukämischen Blasten im Blut werden die normalen Blutbestandteile zurückgedrängt und büßen ihre Funktionsfähigkeit ein. Klinisch äußert sich dies durch Anämie, Thrombozytopenie, vermehrter Infektionsanfälligkeit und Blutungsneigung, sowie Splenomegalie, Hepatomegalie und Schwellung der Lymphknoten.

2.2.1 Klassifikation von leukämischen Erkrankungen

Die Klassifikation der Leukämien kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen. Der Krankheitsverlauf entscheidet, ob es sich um eine akute Leukämie, die unbehandelt nach wenigen Wochen oder Monaten zum Tod führt, oder eine chronische Leukämie handelt. Letztere verläuft im Anfangsstadium eher symptomarm und entwickelt sich meist über mehrere Jahre. Nach morphologischen und immunologischen Eigenschaften der Leukämiezellen werden die Leukämieerkrankungen zunächst in myeloische und lymphatische Leukämien eingeteilt. Während die myeloischen Leukämien von Vorläuferzellen der Granulozyten und im weiteren Sinne der Erythrozyten und Thrombozyten ausgehen, entwickeln sich lymphatische Leukämien aus Vorläuferzellen der B- und T-Lymphozyten (Camos et al., Clin Transl Oncol 2006; Tefferi et al., Best Pract Res Clin Hematol 2006). Die wichtigsten Leukämieformen sind die akute myeloische Leukämie (AML), die akute lymphatische Leukämie (ALL), die chronische lymphatische Leukämie (CLL), die zu den niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen gehört, sowie die chronische myeloische Leukämie (CML). Während die ALL die häufigste Leukämieform bei Kindern ist, stellt die AML bei Erwachsenen die am häufigsten auftretende Leukämieform dar. Bei älteren Menschen tritt vor allem die CLL auf.

2.2.2 Leukämische Stammzellen

Seit mehreren Jahrzehnten wurde bereits vermutet, dass die myeloiden Leukämien ihren Ursprung in einer leukämischen Stammzelle haben, die klonal expandiert. Erst in letzter Zeit konnte durch die Entwicklung ausgereifter und spezialisierter Untersuchungsmethoden der Nachweis geführt werden, dass sowohl die AML als auch

die CML auf leukämische Stammzellen zurückzuführen sind, welche die für Stammzellen typischen Charakteristika tragen, nämlich die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die Proliferationskapazität und das Potential zur Differenzierung in andere Zelltypen (Bonnet et al., Nat Med 1997; Guzman et al, Cancer Control 2004). Diese leukämischen Stammzellen haben sich die grundlegenden Eigenschaften der hämatopoetischen Stammzellen bewahrt. Neben der Differenzierung zu Blasten, die das hämatopoetische System überschwemmen, bleibt ein Pool aus leukämischen Stammzellen bestehen, die sich immer wieder selbst erneuern und nach Elimination der Blasten durch therapeutische Maßnahmen einen Krankheitsrückfall bedingen können (Guan et al., Blood 2003).

2.2.3 Ätiologie

Die Ätiologie der multifaktoriellen leukämischen Erkrankungen ist noch nicht genau geklärt. Oft kann kein eindeutiger kausaler Zusammenhang mit pathogenen Faktoren hergestellt werden. Als potenziell auslösende Faktoren gelten bestimmte Chemikalien wie beispielsweise Benzol, ionisierende Strahlung, oder die verschiedensten Umweltfaktoren (McNally et al., Leuk Lymphoma 2006; Rushton et al., Occup Environ Med 1997). Bereits in den 50er Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Leukämie und der Exposition gegenüber Benzol beschrieben (Bousser et al., Arch Mal Prof 1951), was in späteren Arbeiten bestätigt werden konnte (Austin et al., Am J Epidem 1988).

Eine vorangegangene Bestrahlung oder Behandlung mit Zytostatika zur Therapie von soliden Tumoren mit alkylierenden Substanzen wie Cyclophosphamid oder Busulfan erhöht ebenfalls das Risiko einer leukämischen Erkrankung. In diesem Fall spricht man von einer sekundären Leukämie.

Auch genetische Dispositionen spielen eine Rolle. Kinder mit Down-Syndrom haben gegenüber der Kontrollgruppe ein 10 bis 20fach höheres Risiko, innerhalb der ersten zehn Lebensjahre an einer AML zu erkranken. Sie weisen jedoch durch das zusätzliche Erbmaterial auf Chromosom 21 eine bessere Ansprechbarkeit auf Chemotherapeutika auf, und ihre Heilungs- und Überlebenschancen sind deutlich besser (Rosner et al., Am J Med 1972) als die der Vergleichsgruppe.

2.2.4 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild einer Leukämie ist geprägt von der hämatopoetischen Insuffizienz in Folge der Blasteninfiltration des Knochenmarks. Neben unspezifischen Symptomen wie allgemeiner Schwäche, Müdigkeit, Blässe, Kopf- und Gliederschmerzen oder Belastungsdyspnoe treten als Folgen der Granulozytopenie erhöhte Infektionsanfälligkeit mit Fieber und andauerndem Schwitzen auf. Die Thrombozytopenie bedingt eine erhöhte Blutungsneigung und die Patienten entwickeln Petechien, Zahnfleisch- und Nasenbluten sowie spontan auftretende blaue Flecken an verschiedenen Körperstellen. In wenigen Fällen treten durch eine Reizung des Periostes, verursacht durch die proliferierenden Blasten, Knochenschmerzen auf. Dies lässt sich klinisch durch eine erhöhte Druckempfindlichkeit von Sternum und anderen Knochen nachweisen. Bei sehr hohen Blastenzahlen im peripheren Blut ist die Versorgung der Organe mit Sauerstoff nicht mehr ausreichend gewährleistet und es kann zu zentralnervösen Störungen kommen. Ebenso bedingen die hohen Blastenzahlen im Blut eine Viskositätssteigerung, woraus Mikrozirkulationsstörungen, Schädigung der Endothelien und Organversagen resultieren (Aul et al., Leuk Res 1997). Dies wird unter dem Begriff Hyperleukozytosesyndrom zusammengefasst und tritt gehäuft bei monoblastärer und myelomonozytärer Differenzierung auf (Creutzig et al., Cancer 1987). Die klinischen Symptome können dabei von komatösen Zuständen bis hin zu plötzlichen Todesfällen durch zerebrale Blutungen reichen (Porcu et al., Leuk Lymphoma 2000). Bei stark erhöhter Blastenzahl im peripheren Blut kann vor Beginn einer Chemotherapie eine Leukapherese durchgeführt werden, um die Blastenzahl im Blut zu senken (Porcu et al., Ther Apher 2002).

2.2.5 Diagnostik

Erster diagnostischer Schritt zur Feststellung einer Leukämie ist ein Blutausstrich. Neben Bestimmung der Leukozytenzahlen wird vor allem der Differenzierungsgrad der einzelnen Zellen begutachtet. Ein Blast ist definiert als eine undifferenzierte Zelle von unterschiedlicher Größe. Er besitzt einen runden, zentral gelegenen Zellkern, dessen Chromatin nicht kondensiert ist, sondern fein und retikulär erscheint. Das Kern-Zytoplasma Verhältnis ist deutlich zu Gunsten des Kerns verschoben. Bei einem

Blastenanteil von über 20% gemäß World Health Organisation (WHO), bzw. von über 30% nach der Kooperationsgruppe French-American-British (FAB) gilt die Diagnose als gesichert. Zur weiteren Absicherung der Diagnose und zur Einordnung der Leukämieform kann ein Knochenmarksbiopat aus dem Becken entnommen werden. Chromosomale Translokationen und Chromosomendeletionen sind für Leukämien typisch und erlauben eine genaue Einteilung der Leukämieform (Scandura et al., Curr Oncol Rep 2005; Staudt, Annu Rev Med 2002). Sie führen zu Funktionsverlust oder ungebremster Aktivität eines für die Differenzierung bzw. Zellteilung wichtigen Genprodukts.

2.2.6 Therapie

Die vielfältigen Erscheinungsbilder der Leukämie und die Tatsache, dass selbst die einzelnen Leukämieformen in sich sehr heterogene Krankheitsbilder darstellen, gestaltet die Therapie dieser Erkrankungen schwierig.

Grundlage der Behandlung von Leukämien ist die Therapie mit Zytostatika. Diese Substanzen hemmen das Zellwachstum bzw. die Zellteilung, indem sie in die dazugehörigen Stoffwechselfvorgänge eingreifen. Klassische Chemotherapeutika sind beispielsweise Busulfan, Cyclophosphamid, Fludarabin, Methotrexat oder Vincristin, die unterschiedliche Wirkmechanismen besitzen und in der Regel in einer Kombination mehrerer Präparate eingesetzt werden. Die erhöhte Zellteilungsrate von Tumorzellen macht diese zwar empfindlicher gegenüber Zytostatika als gesunde Zellen, jedoch werden vor allem sich schnell teilende gesunde Zellen, wie Haarwurzeln und Schleimhautepithelzellen des Gastrointestinaltrakts ebenso geschädigt. Dies führt zu negativen Begleiterscheinungen wie Haarausfall, Übelkeit und Erbrechen.

Neben der klassischen Behandlung mit Chemotherapeutika werden kontinuierlich neue Therapieansätze erforscht, von denen man sich neben einer effektiven Krankheitsbekämpfung die Verminderung der Nebenwirkungen erhofft. In den 90er Jahren begann die Entwicklung therapeutisch einsetzbarer monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene von Tumorzellen. Der Vorteil dieser monoklonalen Antikörper ist ihre spezifische Wirkung gegen die Tumorzellen, wohin gegen gesunde Zellen weitgehend unangetastet bleiben. Rituximab, ein monoklonaler Antikörper, der an das CD20-Antigen bindet, wird inzwischen zur Standardtherapie von B-Zell-

Lymphomen und CLL verwendet (Cerny et al., *Anticancer Drugs* 2002; Byrd et al., *Proc Am Soc Hematol*, 2003). Nebenwirkungen beschränken sich dabei meist auf grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen und Schüttelfrost (Onrust et al., *Drugs* 1999). Ein weiteres Beispiel für klinisch angewendete Antikörper in der Leukämitherapie ist Alemtuzumab (Campath®), ein monoklonaler Antikörper gegen das Leukozyten-Antigen CD52 (Moreton et al., *Semin Oncol* 2003).

Während bis vor 20 Jahren die Patienten vorwiegend palliativ behandelt wurden, entwickelte sich die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen zu einer effektiven Therapiemethode. Die Stammzelltransplantation zielt auf eine vollständige Heilung der Patienten, wie sie bei der Behandlung mit Chemotherapeutika oft nicht erreicht werden kann (Zittoun et al., *N Engl J Med* 1995), allerdings sind auch die Nebenwirkungen, sowie die therapiebedingte Mortalität deutlich höher als bei einer intensiven Chemotherapie.

In den 50er Jahren wurden erste grundlegende Tierversuche zur Transplantation von Knochenmark durchgeführt. Die Arbeitsgruppen um Jacobson und Lorenz konnten dabei zeigen, dass Mäuse und Meerschweinchen vor dem Strahlentod nach Ganzkörperexposition geschützt werden können, wenn ihnen Milzzellen oder Knochenmark von syngenen Tieren verabreicht wurde (Lorenz et al., *J Natl Cancer Inst* 1951; Lorenz et al., *Radiology* 1952; Lorenz et al., *Fortschr Geb Röntgenstr* 1952; Jacobson et al., *J Lab Clin Med* 1950). Bei diesen frühen Experimenten fiel auf, dass Zellen genetisch identischer Tiere vor dem Strahlentod schützten, während Tiere, denen Zellen mit genetisch differentem Material verabreicht wurden, nach vorübergehender Besserung des Strahlensyndroms schließlich trotzdem verstarben. Erst Mitte der 50er Jahre konnte bewiesen werden, dass diese Beobachtungen auf zellulären und nicht auf humoralen Effekten beruhten (Main et al., *J Natl Cancer Inst* 1955). 1957 wurde im Mausmodell erstmals die Behandlung von Leukämie durch die Transplantation von Knochenmark beschrieben (Barnes et al., *Br J Haematol*, 1957). Der Begriff „radiation chimera“ wurde eingeführt, der den Zustand nach Ganzkörperbestrahlung und Gabe von Knochenmark eines Spendertieres beschreiben soll. Im Empfängertier wird dabei die Hämatopoese dauerhaft durch diejenige des Spendertieres ersetzt. Das Nebeneinander von Zellpopulationen verschiedener Individuen innerhalb eines Organismus wird mit dem Begriff Chimarismus bezeichnet.

2.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Zellen für eine Transplantation werden auf verschiedene Weise gewonnen. Als Quelle dient in vielen Fällen Knochenmark, das dem Spender unter Vollnarkose aus dem Becken entnommen wird. In neuerer Zeit besteht zudem die Möglichkeit, die hämatopoetischen Stammzellen mittels verschiedener Wachstumsfaktoren aus dem Knochenmark zu mobilisieren. Dabei werden die Zellen ins periphere Blut ausgeschwemmt und können dort mit geringem Aufwand mittels Leukapherese gesammelt werden (Bensinger et al., Blood 1993). Diese Methode ist vor allem für den Spender mit einem im Vergleich zur Aspiration von Knochenmark minimalem Eingriff verbunden. Der deutlichste Vorteil für den Empfänger besteht bei der Verwendung von mobilisierten Stammzellen in einem rascheren Anwachsen des Transplantats und dadurch in einer schnelleren Erholung der Granulozyten- und Thrombozytenzahlen (Couban et al., Blood 2002; Bensinger et al., N Engl J Med 2001). Außerdem ist auch Nabelschnurblut eine Quelle zur Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen (Gluckman et al., N Engl J Med 1997).

Der Einfachheit halber wird im Folgenden von „Stammzelltransplantation“ gesprochen, unabhängig davon, ob als Quelle der Stammzellen Knochenmark, Nabelschnurblut oder mobilisierte periphere Blutstammzellen dienen.

Vor einer Stammzelltransplantation ist eine Vorbehandlung nötig, die Konditionierung genannt wird. Diese soll im Empfänger den nötigen Platz für das Transplantat schaffen. Außerdem werden durch die Konditionierung nicht nur die leukämischen Zellen abgetötet, sondern der Patient wird auch so stark immunsupprimiert, dass das Transplantat nicht abgestoßen werden kann. Durch kombinierte Gabe von mehreren Zytostatika sollen die leukämischen Zellen aus dem Blut entfernt und der maligne Zellklon bestenfalls endgültig eliminiert werden. Die Konditionierung kann zusätzlich durch eine Ganzkörperbestrahlung des Patienten ergänzt werden, die je nach verabreichter Dosis allerdings nicht nur die leukämischen Zellen zerstört, sondern auch das gesunde Knochenmark sowie andere Organe des Körpers angreift. Ziel der nachfolgenden Stammzelltransplantation ist es, das krankhafte leukämische Knochenmark durch das Knochenmark eines gesunden Spenders vollständig und dauerhaft zu ersetzen, um wieder eine normale Hämatopoese gewährleisten zu können.

Als Stammzellspender für eine Transplantation dient entweder der Patient selbst (autologe Stammzelltransplantation) oder eine zweite Person (allogene Stammzelltransplantation).

Bei letzterer ist es notwendig, die Gewebemerkmale von Spender und Empfänger zu typisieren, um dann einen passenden Spender auszuwählen. Besonders unproblematisch ist die Transplantation eineiiger Zwillinge, da ihre Gewebemerkmale zu 100% übereinstimmen. Unter Geschwisterpaaren besteht eine Wahrscheinlichkeit von 25%, dass sie dieselben Gewebemerkmale besitzen, da diese nach den Mendel'schen Regeln vererbt werden. Eltern und Kinder unterscheiden sich grundsätzlich in einem Haplotyp, weshalb man in diesem Fall von einer haploidentischen Transplantation spricht.

Kann im familiären Umfeld des Patienten kein Stammzellspender gefunden werden, greift man auf unverwandte Spender zurück. Es müssen dazu möglichst viele Gewebemerkmale getestet werden, um eine maximale Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger zu gewährleisten. Limitierender Faktor hierbei ist die Genauigkeit der Typisierung und der Umfang der typisierten Gewebemerkmale.

2.3.1 Phasen der allogenen Stammzelltransplantation

Die allogene Stammzelltransplantation kann viele verschiedene maligne Krankheiten heilen (Thomas et al., N Eng J Med 1975; Armitage et al., N Eng J Med 1994). Sie verläuft in vier Phasen, der Konditionierungsphase, der eigentlichen Transplantation, der Phase des Anwachsens des Transplantats (Engraftment) und der Immunrekonstitution. Die Konditionierungsphase hat zwei Ziele: zum einen soll durch hochdosierte Chemo- und eventuelle Radiotherapie die leukämische Grundkrankheit eliminiert werden, zum anderen soll der Empfängerorganismus durch die resultierende Immunsuppression auf die Transplantation vorbereitet und eine Abstoßungsreaktion dadurch unmöglich gemacht werden. Der Tag der Transplantation wird einheitlich mit Tag 0 bezeichnet. Der eigentliche Vorgang ist eine intravenöse Infusion der gewonnenen Stammzellen durch einen großlumigen venösen Katheter über einen Zeitraum von 1-2 Stunden. Bis zum Anwachsen des Transplantats ist der Patient nicht immunkompetent und daher stark anfällig für Infektionen aller Art. Prophylaktisch werden die Patienten routinemäßig mit antiviralen und antimykotischen Medikamenten behandelt. Außerdem werden die

Patienten während dieser Phase in Einzelzimmern mit hohen hygienischen Standards wie Luftfiltern untergebracht.

In der Phase des Engraftments bilden die Spenderzellen neue Blutbestandteile. Von Engraftment wird in der Regel gesprochen, sobald die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut den Wert von $0,5 \cdot 10^6/\text{ml}$ Blut übersteigt. Dies geschieht in der Regel zwischen Tag 10 und Tag 20 nach der Stammzelltransplantation. Das Engraftment von Thrombozyten und Erythrozyten dauert etwas länger.

Die Phase der Immunrekonstitution erstreckt sich über mehrere Monate oder Jahre bis hin zur vollen Erholung des Immunsystems (Lum et al., Blood 1987).

2.3.2 Entstehung einer Graft-versus-Host Disease (GvHD)

Die Übertragung von Geweben bei genetisch nicht identischen Individuen geht grundsätzlich einher mit einer Histoinkompatibilität. Diese Differenzen von Antigenstrukturen können immunologische Reaktionen auslösen, die in zwei verschiedene Richtungen agieren. Ähnlich wie bei der Transplantation von soliden Organen kann auch das Knochenmark vom Empfängerorganismus abgestoßen werden. Bei der Knochenmarktransplantation können darüber hinaus immunkompetente Zellen des Transplantats die Antigenstrukturen des Empfängers als fremd erkennen und dagegen reagieren. Dies ist die so genannte Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion, im Englischen als Graft-versus-Host (GvH) Reaktion bezeichnet.

Voraussetzung dafür ist die Diversität von Histokompatibilitätsmerkmalen von Knochenmarkspender und -empfänger. Die transplantierten T-Zellen erkennen dann die Empfängerantigene und -zellen als fremd und beginnen mit einer gerichteten Immunantwort, die mit massiven Schäden in den unterschiedlichen Empfängerorganen einhergeht. 1966 wurden von Billingham die drei grundlegenden Voraussetzungen für das Entstehen einer GvHD festgelegt (Billingham, The Harvey Lectures 1966):

1. eine ausreichende Anzahl an immunkompetenten Zellen im Transplantat
2. das Vorhandensein wichtiger Transplantationsantigene im Empfänger, die dem Spender fehlen
3. die Unfähigkeit des Empfängerorganismus, eine effektive Immunantwort gegen das Transplantat im Sinne einer Abstoßungsreaktion aufzubauen

Die klinische Ausprägung einer GvHD hängt wesentlich vom Grad der Histoinkompatibilität von Spender und Empfänger ab, sowie von Alter und Geschlecht des Patienten, der Art der vorangegangenen Konditionierung und der zu Grunde liegenden Krankheit. Auf Grund von Gewebeunverträglichkeit, die außerhalb des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. Major Histocompatibility Complex = MHC) lokalisiert ist, kann es auch bei Patienten, die ein Transplantat eines HLA-identischen (engl. Human Leukocyte Antigen = HLA) Geschwisters erhalten, zur Ausprägung einer GvHD kommen. Verantwortlich dafür sind die so genannten Minor-Histokompatibilitätsantigene. Dies sind Peptide, die von intrazellulären Proteinen abstammen. Sie werden sowohl von HLA-Molekülen der Klasse I, als auch der Klasse II auf der Zelloberfläche präsentiert und können von T-Zellen eines HLA-identischen Individuums als fremd erkannt werden (Simpson et al., *Transpl Immunol* 2002; den Haan, *Science* 1998). Bis zu 30% der Patienten, die ein Transplantat eines HLA-identischen verwandten Spenders erhalten, und die meisten Patienten, deren Transplantate aus anderen Quellen (Fremdspender, HLA-nichtidentische Familienspender, Nabelschnurblut) stammen, entwickeln trotz immunsuppressiver prophylaktischer Behandlung eine akute GvHD (Gajewsky et al., *Curr Opin Oncol* 1996; Basara et al., *Crit Rev Oncol Hematol* 2001). Von akuter GvHD wird gesprochen, wenn sie innerhalb der ersten 100 Tage nach der Transplantation auftritt, danach ist von chronischer GvHD die Rede.

Die Pathogenese einer GvHD ist ein komplexes Zusammenspiel mehrerer pathogen wirkender Faktoren. Durch die intensive Konditionierung vor einer Knochenmarktransplantation treten Schäden in den verschiedensten Geweben auf, was die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1, Interferon- γ oder Tumor-Nekrosefaktor α bedingt (Ferrara et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; Xun et al., *Blood* 1994). Diese Zytokine führen wiederum zu einer Hochregulierung der Expression von MHC-Antigenen, Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Faktoren auf den Empfängerzellen, was die Erkennung dieser durch Spenderlymphozyten verstärkt und eine GvHD begünstigt (Hill et al., *Cytokines Cell Mol Ther* 1997). Zielorgane einer GvHD sind vor allem Haut, Leber und Darm (Ferrara et al., *N Engl J Med* 1991). Die Patienten leiden unter Hautausschlägen, generalisierten Erythemen, Durchfall und Erbrechen sowie Ikterus.

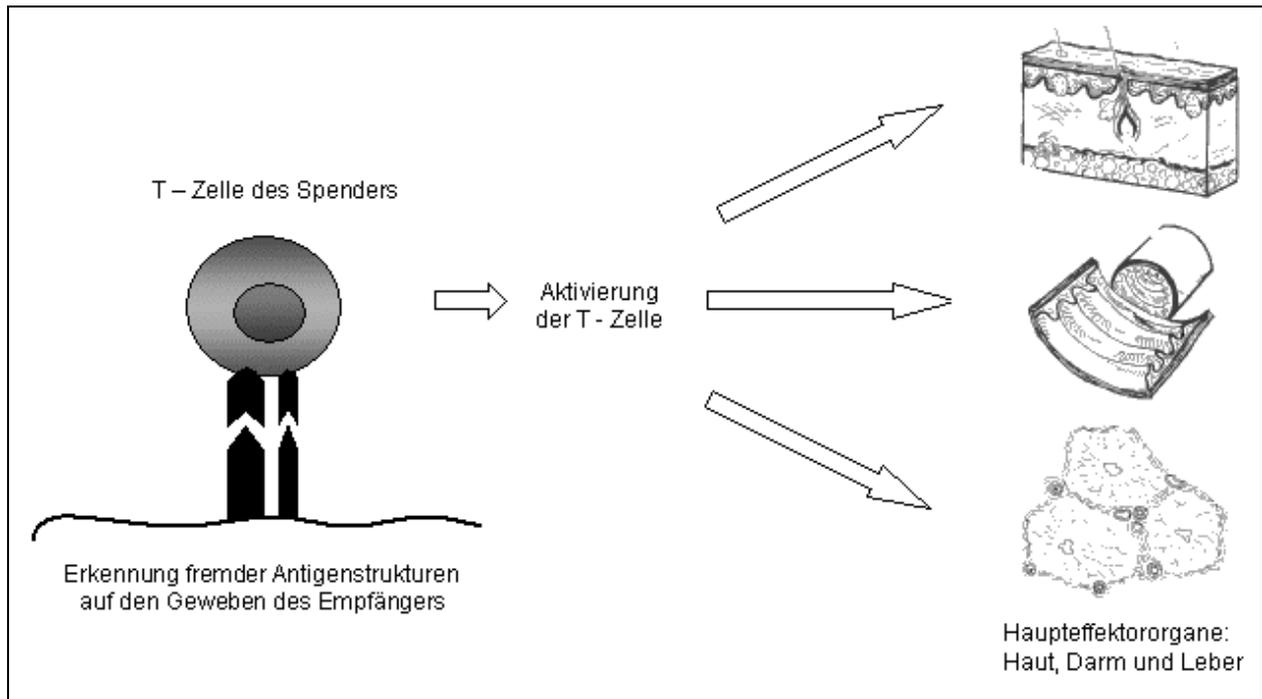


Abbildung 2.3.2: Vereinfachte schematische Darstellung der Entstehung einer GvHD und deren Haupteffektororgane.

Der therapeutische Ansatz zur Kontrolle einer GvHD ist der Einsatz von Immunsuppressiva wie Ciclosporin oder Kortikosteroiden. Der Nachteil einer Therapie mit immunsupprimierenden Medikamenten ist allerdings das erhöhte Risiko eines Krankheitsrezidivs, da die T-Zellen, die für eine GvHD verantwortlich sind, auch den GvL (engl. Graft versus Leukemia) Effekt bedingen und ein Anwachsen des Transplantats unterstützen (Adler et al., Bone Marrow Transplantation 1990). Werden diese durch Immunsuppressiva in ihrer Funktion gehemmt, können sie auch den gewünschten GvL-Effekt, also die Reaktion des Transplantats gegen die erkrankten leukämischen Zellen, nicht mehr fördern. Der Zusammenhang zwischen GvL- und GvH-Effekt konnte erstmals 1981 gezeigt werden. Patienten mit akuter oder chronischer GvHD hatten geringere Rezidivraten als Patienten, bei denen diese transplantationsassoziierte Erkrankung nicht auftrat (Weiden et al., New Engl J Med 1981). Heutzutage wird bei der Stammzelltransplantation vor allem auf eine Prophylaxe der GvHD geachtet.

2.3.3 Prophylaktische Maßnahmen gegen die GvHD

Experimente im Hundemodell zeigten schon sehr früh, dass eine effektive GvHD-Prophylaxe durch die Gabe von Methotrexat (MTX) betrieben werden kann (Thomas et al., N Engl J Med 1975). Heutzutage umfassen Standardprotokolle die Kombination unterschiedlicher Medikamente wie MTX, Ciclosporin, FK 506 und Glucocorticoide, die während der gesamten Phase nach der Transplantation bis Tag 100 verabreicht werden, und dann bis Tag 180 langsam abgesetzt werden. Die effektivste GvHD-Prophylaxe mit nur einem einzigen Medikament ist diejenige mit MTX, das sich auch in Kombination mit Ciclosporin A bewährt hat (Nash et al., Blood 2002; Kolb et al., Transplantation 2003).

2.3.3.1 T-Zelldepletion

Eine viel versprechende Methode zur Verhinderung einer GvHD ist die T-Zelldepletion (Prentice et al, Lancet 1984; Slavin et al., Transplant Proc 1987; Martin et al., Transplant Proc 1985). Da immunkompetente T-Zellen des Transplantats als Auslöser einer GvHD fungieren, werden diese vor der Transplantation aus dem Präparat entfernt. Zwar wurden schon viele T-Zell-Untergruppen als Auslöser einer GvHD identifiziert (Rodt et al., Eur J Immunol 1974; Rodt et al., Transplant Proc 1979; Pynton et al., Bone Marrow Transplantation 1988), jedoch ist das Ziel der meisten klinisch angewendeten Methoden eine komplette T-Zelldepletion (Atkinson et al., Bone Marrow Transplantation 1987). Angewendet werden dabei Methoden wie Dichtezentrifugation (Wagner et al., Blood 1988), die Vorbehandlung mit zytotoxischen Medikamenten (Vallera et al., Science 1983; Kersey et al., Bone Marrow Transplantation 1985) oder die Rosettierung der T-Zellen mit nachfolgender Lektin-mediierter Agglutination (Reisner et al., Blood 1983).

Eine entscheidende Rolle bei der spezifischen T-Zelldepletion spielen heutzutage polyklonale oder monoklonale Antikörper. Eine Vielzahl an Methoden wird eingesetzt, um die durch Antikörper markierten Zielzellen zu depletieren. Unterschieden werden dabei in vitro- und in vivo-Methoden. T-Zellen werden beispielsweise in vitro durch paramagnetische Partikel mit Hilfe eines Magneten vor der Transplantation aus dem Transplantat entfernt. In vivo kommt unter anderem Anti-Thymozyten-Globulin (ATG),

ein aus immunisierten Kaninchen oder Pferden gewonnener polyklonaler T-Zell-Antikörper, als Teil der Konditionierung zum Einsatz.

Neben Antikörpern gegen CD2, CD3, CD4 und CD8 (im Überblick dargestellt in Gee et al., J Immunogenet 1989) gewann ab dem Ende der 80er Jahre vor allem der CD6-Antikörper an Bedeutung bei der T-Zelldepletion. Zunächst in Kombination mit einem CD8-Antikörper eingesetzt, zeigten sich dabei viel versprechende Ergebnisse und das Auftreten einer GvHD konnte deutlich reduziert werden (Gilmore et al., Br J Hematol 1986; Janossy et al., Clin Exp Immunol 1986). Später wurde der CD6-Antikörper alleine zur T-Zelldepletion eingesetzt (Roy et al., Blood 1990; Soiffer et al., Blood 1990; Soiffer et al., Bone Marrow Transplant 1993). Untersuchungen am Hundemodell haben dabei vor allem die haploidentische Transplantation entscheidend vorangebracht (Schumm et al., Tissue Antigens 1994; Kolb et al., Transplantation 2003). CD6-depletiertes Knochenmark konnte in in vitro-Experimenten die Entstehung zytotoxischer T-Zellen unterdrücken (Günther et al., Tissue Antigens 1994). Diesem Mechanismus wird das effektive Verhindern einer GvHD zugesprochen.

Da T-Zellen neben der GvHD auch für den GvL-Effekt und die Kontrolle einer Immunantwort verantwortlich sind, liegt der größte Nachteil einer T-Zelldepletion in der erhöhten Gefahr einer Abstoßung, dem Rückfall in die leukämische Krankheit, der erhöhten Infektionsanfälligkeit und in der Gefahr des Auftretens sekundärer Krankheiten (Goldman et al., Ann Intern Med 1988; Martin et al., Bone Marrow Transplant 1988; Drobyski et al., Blood 1994).

2.3.3.2 Die Rolle des Komplementsystems für die T-Zelldepletion

Um die Einsetzbarkeit von Komplement für die T-Zelldepletion zu verstehen, soll zunächst ein allgemeiner Überblick gegeben werden.

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems, dessen Hauptaufgaben die Erkennung und Elimination von Krankheitserregern durch direkte Zerstörung (Moffitt et al., Springer Semin Immunopathol 1994) oder durch Phagozytose (Browe et al., Curr Opin Immunol 1991) sind. Es besteht aus vielen verschiedenen Plasmaproteinen, die miteinander reagieren und dabei die Opsonisierung von Krankheitserregern verstärken, so dass diese von Antikörpern lysiert werden können. Die Enzyme des Komplementsystems, bei denen es sich vorwiegend um Proteasen handelt, liegen im Serum in Form von inaktiven Vorstufen vor. Erst an den

Infektionsherden werden sie lokal aktiviert und lösen eine Reihe von Entzündungsereignissen aus, die den Kampf gegen eine Infektion unterstützen und deren Ausbreitung verlangsamen (Cooper NR, Clin Lab Med 1986). Die Schutzfunktion von Komplement vor einer Infektion basiert dabei auf drei verschiedenen Mechanismen: Große Mengen an aktivierten Komplementproteinen binden zum einen kovalent an Krankheitserreger und beschleunigen dadurch die Aufnahme der Pathogene durch Phagozyten. Diese werden außerdem chemotaktisch durch die abgespaltenen kleinen Fragmente einiger Komplementkomponenten angezogen, welche die Phagozyten zusätzlich noch aktivieren. Die Hauptwirkung des Komplementsystems basiert jedoch auf der Entstehung des Membranangriffskomplexes, der am Ende der Komplementkaskade steht und Poren in der Zellmembran der verschiedenen Krankheitserreger erzeugt.

Drei verschiedene Reaktionswege führen zur Aktivierung des Komplementsystems:

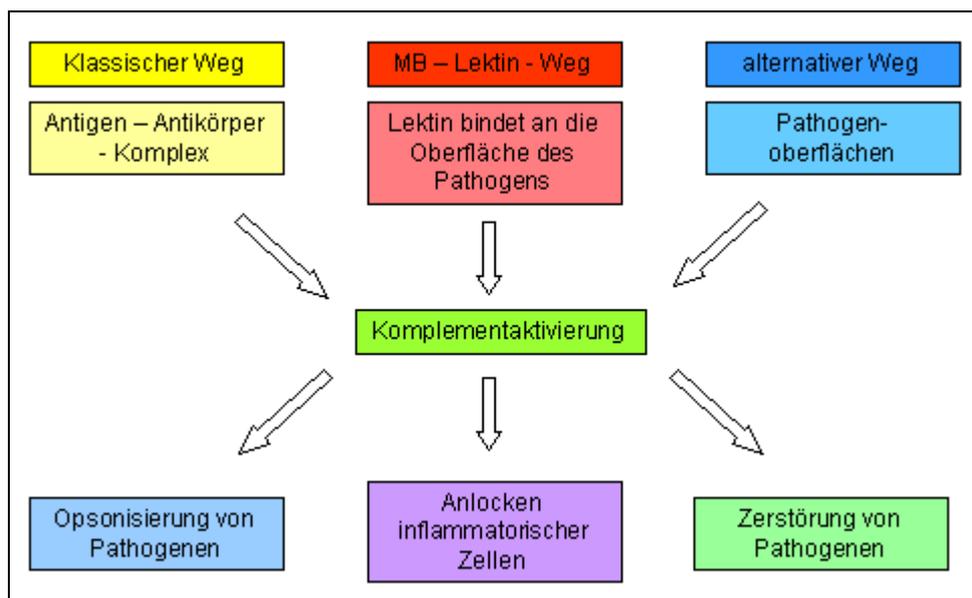


Abbildung 2.3.3.2: Die drei verschiedenen Wege der Aktivierung der Komplementkaskade. Aus Janeway, Immunologie, 2002

Bei allen drei Aktivierungswegen der Komplementkaskade findet eine Reihe von Spaltungsreaktionen statt, an deren Ende der Membranangriffskomplex (engl. Membrane Attack Complex = MAC) steht, der Zellmembranen lysieren kann (Müller-Eberhard, Annu Rev Immunol 1986; Boyle, Mol Cell Biochem 1984).

Die Wirkung des Membranangriffskomplexes kann eingesetzt werden, um in einem Transplantat spezifisch T-Zellen zu entfernen und damit einer Graft-versus-Host-Krankheit vorzubeugen. Monoklonale Antikörper werden dabei eingesetzt, um die

unerwünschten T-Zellen zu markieren. Nach Zugabe von Komplement wird die Komplementkaskade über den klassischen Weg, also die Erkennung eines Antigen-Antikörper-Komplexes aktiviert und bildet am Ende der ablaufenden Enzymkaskade den MAC. Dieser zerstört dann alle Zellen, auf denen der Antikörper gebunden war, wohin gegen die hämatopoetischen Stammzellen unberührt bleiben (Schuening et al., Transplantation 1987; Szer et al., Blood 1985). In Kombination mit einem humanen CD6-Antikörper konnten bereits gute klinische Erfolge erzielt werden (Soiffer et al., J Clin Oncol 1992 und 2001).

2.4 Der MHC-Komplex

Die Identifikation von Haupthistokompatibilitätsmerkmalen und wachsende Kenntnisse über deren Struktur schufen die Grundlage für die Auswahl von gewebeverträglichen Spendern zur Knochenmarktransplantation (Bach FH et al., New Eng J Med 1976; Bach, Annu Rev Genet 1976).

Der humane Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex = MHC) ist auf dem kurzen Arm des Chromosomes 6 lokalisiert (Hansen et al, Hematol Oncol Clin North Am 1990). Er umfasst den Genkomplex des humanen Leukozytenantigens (engl. Human Leukocyte Antigen = HLA), welcher aus einer Reihe eng gekoppelter Gene besteht. Moleküle des HLA-Komplexes werden kodominant exprimiert, d.h. sowohl die väterlichen als auch die mütterlichen Allele werden exprimiert. Das HLA-System zeichnet sich durch einen starken Polymorphismus aus. Es kodiert für genetische Merkmale, die in vielen verschiedenen phänotypischen Ausprägungen vorkommen und nach den Mendel'schen Gesetzen vererbt werden, was eine möglichst umfassende Antigen-Präsentation gewährleistet. Es lassen sich zwei Klassen von HLA-Antigenen abgrenzen. Die zu den Klasse I-Antigenen gehörenden HLA-Determinanten -A, -B und -C sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 44.000 Da. Sie sind auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden. Die Antigene der Klasse II sind in der HLA-D-Region zusammengefasst und werden in die Subregionen HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP unterteilt. Sie sind Zellen eigen, die zur Auslösung einer Immunantwort beitragen. Moleküle der Klasse III sind strukturell nicht verwandt mit denen der Klassen I und II. Sie spielen bei der Antigenpräsentation keine Rolle, sondern wirken bei der Komplementaktivierung.

Die Aufklärung der genauen Struktur von MHC I und II erfolgte durch Radiokristallographie (Brown et al., Nature 1993). MHC I-Moleküle sind Heterodimere und bestehen aus einer großen α -Kette, die als Transmembrandomäne in die Unterdomänen α_1 , α_2 , und α_3 aufgeteilt werden kann. Sie assoziiert nichtkovalent mit dem β_2 -Mikroglobulin, dessen Struktur außerhalb des Chromosoms 6 codiert ist. Die MHC II-Moleküle besitzen zwei Transmembranglykoproteinketten (α und β), die jeweils wieder zwei Unterdomänen beinhalten.

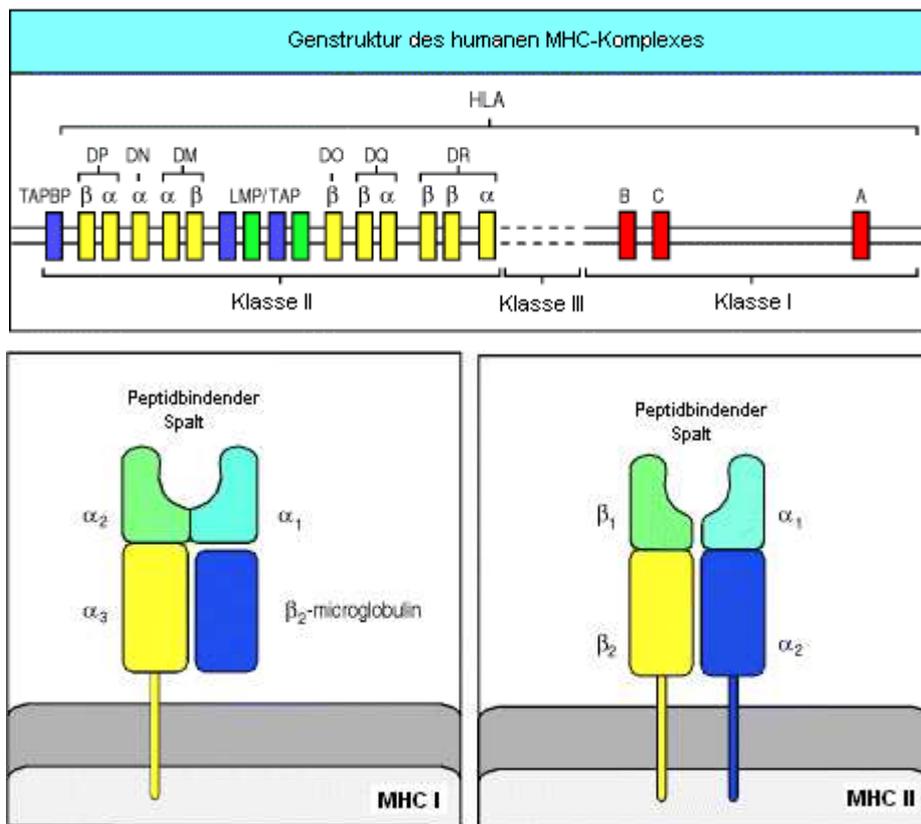


Abbildung 2. 4: Die Struktur der humanen MHC-Komplexe der Klasse I und II. Nach Janeway, Immunologie, 2002.

Die Typisierung dieser Antigene erlaubt die Auswahl eines geeigneten Spenders zur Knochenmarkstransplantation. Im Rahmen von internationalen Kooperationen wurden in mehreren „International Histocompatibility Workshops“ die Antigen-Typisierung standardisiert und die Alloantigene genau definiert (Schreuder et al., Tissue Antigens 2005).

2.4.1 Der canine MHC-Komplex

Anfang der 70er Jahre wurden erste Experimente durchgeführt, die eindeutig die Existenz eines caninen MHC-Komplexes zeigten (Templeton et al., Transplantation 1971).

Der Komplex des Hundeleukozytenantigens (engl. Dog Leukocyte Antigen = DLA) liegt auf dem caninen Chromosom 12, was mit Hilfe der „Fluoreszenz in situ Hybridisierungsmethode“ FISH im Jahre 1996 herausgefunden wurde (Dutra et al., Cytogenet Cell Genet 1996). Sowohl der Aufbau von MHC I als auch der von MHC II ähneln dem der humanen MHC-Moleküle. Im Gegensatz zu Maus und Mensch sind Moleküle der Klasse II beim Hund auf fast allen Lymphozyten präsent (Doxiadis et al., Exp Clin Immunogenet 1989).

Genlocus	Gentyp	Klasse	Anzahl bekannter Allele
DLA-DRA1	Komplett	II	1
DLA-DRB1	Komplett	II	43
DLA-DRB2	Pseudo	II	-
DLA-DQA1	Komplett	II	11
DLA-DQB1	Komplett	II	31
DLA-DQB2	Pseudo	II	-
DLA-88	Komplett	I?a	48
DLA-79	Komplett	Ib	11
DLA-12	Komplett	I? a or b	3
DLA-64	Komplett	I? a or b	3
DLA-53	Pseudo	I	-
DLA-12a	Pseudo	I	-

Abbildung 2.4.1: Übersicht über die bekannten Genloci des caninen MHC-Komplexes und deren Zugehörigkeit. Aus Ruvinsky & Sampson, The Genetics of the Dog, 2001.

2.4.2 DLA-Typisierung

Mit Hilfe verschiedener Methoden kann der DLA-Typ eines Hundes charakterisiert werden, d. h. es wird bestimmt, welche Allele eines bestimmten Genlocus präsent sind. Wie auch im humanen System wurden während der 70er und 80er Jahre drei internationale Workshops abgehalten, welche die DLA-Antigene genauer definierten (Vriesendorp et al., Tissue Antigens 1973; Deeg et al., Transplantation 1986; Bull et al.,

Transplantation 1987). Darin wurde der DLA-Komplex unterteilt in drei serologisch definierte Loci, DLA-A, -B und -C. Ein vierter Locus, DLA-D wurde durch die MLC (engl. Mixed Lymphocyte Culture = gemischte Lymphozytenkultur) definiert (Deeg et al., Transplantation 1986). Die DLA-A Loci sind auf der Oberfläche von Leukozyten des peripheren Blutes exprimiert und gehören zu den Klasse I-Molekülen, denen ebenfalls die DLA-C Genprodukte angehören, die jedoch nur schwach exprimiert werden (Van der Feltz and Ploegh, Immunogenetics 1984; Neefjes et al., Immunogenetics 1986). Die DLA-B Allele werden seit 1986 wieder den Klasse II-Antigenen zugeordnet (Doxiadis et al., Exp Clin Immunogenet 1989).

Die DLA-Typisierung wurde anfänglich vor allem durch zelluläre und serologische Methoden durchgeführt (Albert et al., Tissue Antigens 1973; Deeg et al., Transplantation 1986; Bull et al., Transplantation 1987). Eine gängige Methode dabei ist die gemischte Lymphozytenkultur, in der Lymphozyten von zwei verschiedenen Individuen für ein paar Tage zusammen kultiviert werden. Durch Bestrahlung einer der beiden Lymphozytenpopulationen kann sichergestellt werden, dass diese nicht mehr proliferiert, man erhält also eine Reaktion in nur eine Richtung. Die quantitative Messung der Zellproliferation erlaubt einen Rückschluss auf den Grad der genetischen Diversität der beiden Individuen. Verantwortlich für die Reaktion in einer gemischten Lymphozytenkultur sind die Allele des DLA-D Locus.

Später wurde die DLA-Typisierung durch die Analyse von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) ergänzt (Williamson et al., Transplant Proc 1989; Burnett et al., Transplantation 1994). Diese molekularbiologische Genotypisierung mittels kreuzreagierender humaner Sonden zeigte eine große Ähnlichkeit der caninen MHC Klasse II-Antigene mit denen des Menschen (Sarmiento et al., Tissue Antigens 1988; Sarmiento et al., Immunogenetics 1988; Sarmiento et al., Tissue Antigens 1989; Sarmiento et al, Immunogenetics 1990 und 1992).

Heute werden außerdem Methoden wie single stranded conformational polymorphism (SSCP) (Wagner et al., Tissue Antigens 1998), sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP) (Poulton et al., Eur J Immunogenet 1998) und die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) (Happ et al., Vet Immunol Immunopathol 1999) angewendet.

2.4.3 Bedeutung des Hundemodells für die Stammzelltransplantation

Die hohe Ähnlichkeit im Aufbau des caninen MHC-Komplexes zum menschlichen MHC-Komplex macht den Hund zu einem unverzichtbaren Modell für die Knochenmarktransplantation. Neben dem Menschen hat nur diese Säugetierspezies sowohl eine große genetische Diversität als auch einen stark vermischten Genpool (Morell, Science 1997). Der Hund war die erste nicht ingezüchtete Spezies, in der gezeigt wurde, welche Relevanz die Bestimmung der Histokompatibilität *in vitro* für den Ausgang der Knochenmarktransplantation hat (Epstein RB et al., Transplantation 1968). Seither konnten am Hundemodell für den Fortschritt der hämatopoetischen Stammzelltransplantation entscheidende Ergebnisse erzielt und in die Klinik übertragen werden. Dabei wurden unter anderem wegweisende Erkenntnisse auf dem Gebiet der autologen Transplantationen erzielt (Weiden et al., Exp Hemat 1975; Vriesendorp et al., Tissue Antigens 1982; Appelbaum et al., Transplantation 1985). Die Ganzkörperbestrahlung als Mittel zur Immunsuppression und zur Verhinderung der Transplantatabstoßung wurde ebenfalls am Hundemodell erforscht (Thomas et al., Rad Res, 1970; Lösslein et al., Transplant Proc 1987; Kolb et al., Radiother Oncol 1990; Storb et al., Blood 1994). Außerdem konnte die Wirkung und der Einsatz von immunsuppressiven Medikamenten am Hund ausgetestet und optimiert werden (Deeg et al., Transplantation 1984; Storb et al., Transplantation 1969; Storb et al., Blood 1982; Storb et al., Bone Marrow Transplant 1986). Das Wissen über die Ähnlichkeit des caninen MHC-Komplexes mit dem des Menschen und die wachsende Verfügbarkeit von gut typisierten Hundezuchten erlaubte Studien auf dem Gebiet der Transplantatabstoßung (Storb et al., Transplantation 1968 und 1986) und der Graft-versus-Host Disease (Storb et al., Immunological Reviews 1985; Thomas et al., Blood 1962; Storb et al., Transplantation 1970). Mit Hilfe des polyklonalen T-Zell-Antikörpers ATG oder verschiedener monoklonaler Antikörper konnte eine effektive T-Zelldepletion zur Verhinderung einer GvHD betrieben werden (Kolb et al., Transplantation 1979; Schumm et al., Tissue Antigens 1994; Diaconescu et al., Biol of Blood and Marrow Transpl 2005). Im Hundemodell wurde außerdem die adoptive Immuntherapie entwickelt (Kolb et al., Haematol Blood Transfus 1980; Kolb et al., Bone Marrow Transplant 1993, Kolb et al., Transplantation 1997), die durch gezielte Gabe von Spenderlymphozyten nach der Transplantation in Leukämiepatienten eine lang anhaltende Remission erzeugen kann (Kolb HJ, Vox Sang 1998).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Hund, Beagle

GSF Neuherberg

3.1.2 Materialien für die Laborarbeit

3.1.2.1 Chemikalien

³ H-Thymidin	Amersham, Life Science
Aqua ad injectabilia	Delta Select
Aqua dest	Millipore
Brillantkresylblaulösung	Merck
Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA SE; CFSE)	Invitrogen
Colzemid	Gibco
DMSO	Serva
Eisessig	Merck
Essigsäure 3%	Apotheke Klinikum Großhadern
Essigsäure 96%	Merck
Ficoll-Hypaque spezifische Dichte = 1,078 g/ml (Biocoll)	Biochrom
Giemsa-Farbstoff, modifiziert	Sigma
Heparin	Essex Pharma
Immersionsöl	Zeiss
Kaliumchloridlösung 0,74 mol/l	Apotheke LMU Innenstadt
Kaninchenkomplement	Cedarlane
May-Grünwald-Farbstoff	Sigma
Meerschweinchenkomplement	Sigma
Methanol	Merck
Natrium Azid	Merck
Propidiumjodid 10 mg	Sigma

Puffertablette pH 7,2 nach Weise	Merck
Szintillationscocktail M40	Perkin Elmer/Packard
To-Pro-3iodide	Invitrogen
Tri-Natriumcitrat-2-hydrat	Merck
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma
Türks Lösung	Merck

3.1.2.2 Zellkulturmedien und Reagenzien

BSA (Bovines Serumalbumin) pH 7,0	Sigma
DMEM + 1000mg/l Glucose + GlutaMAX® + Pyruvat	Gibco
Earle´s Medium 199 + L-Glutamine + 1,25 g/l Natriumbikarbonat	Gibco
FCS (Fötales Kälberserum)	Invitrogen
Hundeserumpool	eigene Herstellung
L-Glutamin	Invitrogen
Natriumchlorid-Lösung 0,81% in Phosphatpuffer 0,0067 mol/l	Apotheke Innenstadt Universität München
Natrium-Pyruvat 7,5%	Gibco
MethoCult GF 4434 Methylcelluloseagar	Cell Systems
Natriumbicarbonat 7,5%	Gibco
Panexin	PAN Biotech
PBS (Phosphate-buffered saline)	Cell Concepts
Penicillin-Streptomycin (1000 IU/ml)	Invitrogen
PHA (Phytohämagglutinin)	Sigma
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Cell Concepts
Trypsin-EDTA	Biochrom KG
Waymouth Medium + L-Glutamine	Gibco

3.1.2.3 Lösungen

BSA-Stocklösung	10 g in 100 ml PBS
Einfriermedium für Knochenmark	RPMI + 20% DMSO
Einfriermedium für Zellen	FCS + 10% DMSO
FACS-Puffer	PBS + 2% FCS + 0,1 % Natriumazid
Fixationslösung für Blut	25% Essigsäure 96%
	75% Ethanol
Fixationslösung für KM	25% Eisessig
	75% Methanol
Gepuffertes Aqua ad inj.	1 Puffertablette nach Weise in 1 l Aqua ad inj
Giemsa-Färbelösung	10 ml Giemsa + 190 ml gepuffertes Aqua ad inj.
Kalibrationslösung für CFSE-Messung im Durchflusszytometer	50 µl Calibrate APC-Beads
	750 µl To-Pro-3iodide
	700 µl PBS
MACS-Puffer	PBS + 5% BSA-Stocklösung
Medium zur KM-Entnahme	2 ml Heparin + 98 ml Earle's Medium 199
MLC-Medium	RPMI
	+ 5% HSP
	+ 2,6% Natriumpyruvat
	+ 1% Penicillin-Streptomycin
	+ 1% L-Glutamin
mSC-Medium	DMEM (+ 1000mg/l Glucose + GlutaMAX®
	+ Pyruvat)
	+ 10% FCS
	+ 1% Penicillin-Streptomycin
Natriumcitratlösung 0,95%	9,5 g in 100 ml Aqua dest
Propidiumjodid-Arbeitslösung (0,05 µg/µl)	500 µl Propidiumjodid-Stocklösung + 9,5 ml PBS
Propidiumjodid-Stocklösung (1 µg/µl)	10 mg Propidiumjodid + 10 ml PBS

3.1.2.4 Antikörper

3.1.2.4.1 Monoklonale Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	verwendete Markierung	Bezugsquelle
CD3	CA17.2A12	MslgG1	FITC/RPE	Serotec
CD4	YKIX302.9	RatlgG2a	FITC/RPE	Serotec
CD6	MT-606	MslgG2b	Unmarkiert	Prof. Dr. Rieber, Universität Dresden
CD8	YCATE55.9	RatlgG1	FITC/RPE	Serotec
CD34	1H6	MslgG1	RPE	BD Pharmingen
B-Zellen	-	MslgG1	RPE	Dako Cytomation

Isotypkontrolle	Markierung	Bezugsquelle
MslgG1	FITC/PE	Dako Cytomation
MslgG2b	Unmarkiert	Dako Cytomation
RatlgG1	FITC/RPE	Serotec
RatlgG2a	FITC/RPE	Serotec

Sekundäre Antikörper	Spezifität	Markierung	Bezugsquelle
Goat-anti-Mouse	IgG, F(ab') ₂ Fragment	FITC/RPE	Jackson ImmunoResearch
Goat-anti-Rabbit	IgG (H+L)	FITC, Cy5	Jackson ImmunoResearch

3.1.2.4.2 Polyklonale Antikörper

ATG (Anti-Thymozyten-Globulin)

Fresenius

KHTG (Kaninchen-anti-Hund-Thymozyten-Globulin)

eigene Herstellung

3.1.2.5 Magnetische Beads zur Zellseparation

Dynabeads M-450 Sheep Anti Mouse IgG	Dynal
Goat Anti Mouse IgG Micro Beads	Miltenyi Biotec

3.1.2.6 Beads zur Kalibration des Durchflusszytometers

Calibrate APC-Beads	Becton Dickinson
---------------------	------------------

3.1.2.7 Verbrauchsmaterialien

96 Loch-Rundbodenplatten	Peske OHG
96 Loch-Unifilterplatten	Packard
Combifix Adapter	Braun
Combitips plus 0,5ml, 2,5ml, 5ml	Eppendorf
Einweg-Pipetten: 2ml, 5ml, 10ml und 25ml	Peske OHG
FACS-Röhrchen	Peske OHG
Falconröhrchen: 15ml und 50ml	Becton Dickinson
Filter Unit 0,22 µm	Millipore
Kryoröhrchen	Nunc
MACS-Säulen (LD)	Miltenyi
Pasteurpipetten	Hirschmann
Perfusionsspritze 50 ml	Becton Dickinson
Pipettenspitzen: 2-10µl, 10-200µl und 100-1000µl	Peske OHG
Reaktionsgefäße: 0,5ml, 1,5ml und 2ml	Eppendorf
Spritzen 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml	Becton Dickinson
T25 und T175 Zellkulturflaschen	Peske OHG
Thrombo Plus Röhrchen	Sarstedt
Zellkulturplatten, 6 Loch	Peske OHG
Zellsieb (Porengröße 40 µm)	Becton Dickinson

3.1.3 Materialien für die Arbeit am Hund

3.1.3.1 Anästhetika

Name	wirksame Bestandteile	Bezugsquelle
Diazepam-ratiopharm	Diazepam Injektionslösung 10mg/2ml	Ratiopharm
Isofluran	IsoFlo – Isofluran 250 ml	Abbott Animal Health
Midazolam-ratiopharm	Midazolamhydrochlorid 15 mg/3 ml	Ratiopharm
Narcoren	Pentobarbital-Natrium	Merial
Propofol	Recofol 20mg/ml	Leiras Oy

3.1.3.2 Analgetika

Name	wirksame Bestandteile	Bezugsquelle
Novaminsulfon- ratiopharm 2,5	Metamizol-Natrium 1 H ₂ O 500mg/ml	Ratiopharm
Rimadyl	Carprofen 20 mg	Pfizer
Temgesic	Buprenorphinhydrochlorid	Essex Pharma

3.1.3.3 Antibiotika

Name	wirksame Bestandteile	Bezugsquelle
Amphotericin B	Ampho-Moronal, 100mg Amphotericin B pro Tablette	Dermapharm AG, Grünwald
Cefotaxim	Cefotaxim-Natrium 1 g	Hikma
Colistinsulfat	Diarönt mono, 95mg Colistinsulfat pro Tablette	MIP Pharma GmbH, St. Ingbert
Combactam	Sulbactam-Natrium 1,0 g	Pfizer
Leukase N Puder	Framycetinsulfat	Dermapharm AG
Meronem	Meropenem 1000mg	Astrazeneca
Neomycinsulfat- Kapseln	Neomycinsulfat 250 mg	Apotheke Universität Großhadern-München
Piperacillin	Piperacillin-Natrium 4 g	Fresenius
Synulox	Amoxicillin-Trihydrat 495,1 mg Kaliumclavulanat 118,85 mg	Pfizer

Tardomycel	Tardomycel comp III., Benzylpenicillin-benzathin, Benzylpenicillin-Procaïn, Dihydrostreptomycinsulfat, Methyl-4-hydroxybenzoat, Propyl-4-hydroxybenzoat	Bayer
Tazobac	Tazobac 4,5g Trockensubstanz, Piperacillin + Tazobactam- Natrium	Wyeth Pharma GmbH
Vancomycin	Vancomycinhydrochlorid 1000mg	Abbott

3.1.3.4 Weitere Medikamente

Name	wirksame Bestandteile	Bezugsquelle
Aqua ad iniectabilia	100 ml	Delta Select
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Dexpanthenol	Bayer
Exhirud-Salbe		Sanofi Synthelabo
Fenistil Injektionslösung	Dimetidinmaleat	Novartis Consumer Health
Lidocainhydrochlorid	Xylocain 10% 5x50ml	Astra Zeneca
Otomax Ohrentropfen	Genatmicin 3 mg/ml Betamethason 0,88 mg/ml Clotrimazol 8,8 mg/ml	Provet AG
Paspertin	Metoclopramid 10mg/2ml	Solvay Arzneimittel
Refobacin Augensalbe	Gentamicinsulfat	Merck
Solu-Decortin	Prednison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz, 50 mg/ml	Merck
Xylocain Gel 2%	Lidocainhydrochlorid	Astra Zeneca GmbH

3.1.3.5 Antikoagulanzen

Name	wirksame Bestandteile	Bezugsquelle
ACD	ACD-A-Lösung 600 ml	Fresenius Homo Care
Heparin	Heparin-Natrium 25.000 I.E./5 ml	Braun

3.1.3.6 Verbrauchsmaterialien

Material	genaue Bezeichnung	Bezugsquelle
Belüftungskanüle		Dialex Biomedica
Braunüle	Vasofix Braunüle	Braun
Butterfly	Dispomed HIH OHG	Ecoflo
Dreiwegehahn	Discofix C-3	Braun
Handschuhe	Sempermed supreme surgical gloves Größe 7	Semperit Technische Produkte GmbH & Co. KG
Infusionsschlauch	BD R87V	BD Infusion Therapy GmbH
Intubierbesteck		Heine
Kanülen	BD Microlance	Becton Dickinson
Klebeband	Leukoplast hospital	BSN medical GmbH
Monovette	Serum 4,5 ml	Sarstedt
Mundschutz		Mölnlycke Health Care
Nadel zur Knochenmarkentnahme	Biopsienadel	Gallini Medical Devices
OP-Tücher	Secodrape Abdecktuch 75 x 90 cm	Hartmann
Perfusionsspritze	BD Perfusion 50 ml	BD Drogheda
Perfusionsspritze 20 ml		Braun
Spritze 1 ml	BD Plastipak	Becton Dickinson
Spritzen	BD Discardit II 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Becton Dickinson
Sterile Skalpellklingen		Braun
Tischabdeckung	Foliodrape	Sengewald
Transfusionsbesteck	REF EMC2240	Baxter, S. A.
Transfusionsbeutel	REF R4R2001 150 ml/500 ml Transfer Pack	Baxter Healthcare Corporation
Tubus	CE 0124 XF 8,5 oral	Rusch Germany
Tupfer	Gazin Mullkompressen 7,5x7,5cm	Lohmann Rauscher
Tupfer	Pur-Zellin	Hartmann
Verschlusskappe	Combi Stopper	Braun
Zählröhrchen	EDTA KE/1.3	Sarstedt
Zentraler Venenkatheter	Cavafix Certo Splittocan	Braun

3.1.3.7 Desinfektionsmittel

Kodan Tinktur Forte farblos

Schultze & Mayr

3.1.4 Geräte

Absaugpumpe	Neuberger Laboport
β-Counter, TopCount, 6 detector	Perkin Elmer LAS GmbH
Bestrahlungsanlage (Gammacell 40)	Atomic Energy of Canada
Cell Harvester	Packard
Einfrierbox Qualifreeze	Nalgene
Einmalhandschuhe	SemperCare
Eismaschine	Ziegra
FACS Calibur und CellQuest Software	Becton Dickinson
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	Labotect
Inkubationsschrank	Heraeus Instruments
Kühlschränke	Liebherr
MidiMacs-Magnet	Miltenyi
Mikroskop	Zeiss
Narkosegerät	Matrx
Pipetten 2-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe (Accu-jet)	Brand
Pulsoxymeter	BCI International
Schermaschine	Aesculap
Separationsmagnet	Dynal
Separator Vario MACS	Miltenyi Biotec
Sterilbank (Hera safe)	Heraeus Instruments
Stickstofftank für die Langzeitlagerung (-196°C)	Messer-Griesheim
Variopette (Stepper)	Eppendorf
Vortexer	Bender und Hobein
Wasserbad	Köttermann
Zentrifuge	Heraeus Instruments

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturmethoden

3.2.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Blut und Knochenmark

Die peripheren mononukleären Zellen (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells = PBMCs) wurden mittels Dichtezentrifugation isoliert. In ein 50ml-Falconröhrchen wurden 15 ml Ficoll (Dichte 1,077 g/ml) vorgelegt. Das den Hunden an der Vena jugularis entnommene heparinisierte Vollblut wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt, Knochenmark im Verhältnis 1:2. 35 ml dieser Zellmischung wurden mit einer Pipette langsam auf die Ficollphase geschichtet. Zur Ausbildung eines Dichtegradienten wurde das Röhrchen bei 20°C, 2.700 Umdrehungen pro Minute (rpm) und einem Auslauf ohne Bremse 20 min lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befinden sich alle Erythrozyten und der überwiegende Teil der Granulozyten im Bodensatz. In der Interphaseschicht befinden sich alle Zellen geringerer Dichte. Hier wurde ein weißer Ring sichtbar, der sich aus B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und Makrophagen zusammensetzt. Diese Schicht wurde großzügig abpipettiert und in ein neues steriles 50ml-Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen, das Zellpellet in RPMI mit 10% FCS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Um die Anzahl der Zellen und deren Vitalität zu bestimmen, wurden 10 µl Zellsuspension mit Türks Lösung oder Trypanblau verdünnt. Bei letzterer Methode nehmen lediglich die toten Zellen, deren Zellwand nicht mehr intakt ist, den Farbstoff auf und färben sich dunkelblau, so dass sie eindeutig von den lebenden Zellen zu unterscheiden sind. Diese Methode wurde bei aufgetautem Zellmaterial angewendet, da hier ein höherer Prozentsatz an toten Zellen zu erwarten war. Frisches Material wurde dahin gegen mit Türks Lösung gefärbt. Zellen und Farbstoff wurden gut gemischt und 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Unter Verwendung eines inversen Mikroskops wurden die lebenden Zellen gezählt.

Die Zellzahl berechnete sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \cdot 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

3.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ bis $2 \cdot 10^7$ pro ml Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) eingefroren. Dazu wurden die Zellen in 15ml- oder 50ml-Falconröhrchen durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde leicht aufgerüttelt und auf Eis gestellt. Schließlich wurde auf Eis vorgekühltes Einfriermedium zugegeben und die Zellsuspension auf die zuvor beschrifteten und ebenfalls vorgekühlten Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden in die mit 4°C temperierte spezielle Einfrierbox gestellt, die durch Absenkung der Temperatur um 1°C pro Minute einen schonenden Einfriervorgang gewährleistet. Die Zellen wurden für mindestens 24 h bei -80°C gefroren, ehe sie für die Langzeitlagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt wurden.

3.2.1.4 Auftauen von Zellen

Der Auftauvorgang bedeutet für Zellen eine starke Belastung, durch die sie zerstört werden können. Aus diesem Grund muss der Vorgang möglichst schonend durchgeführt werden.

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad gegeben. War die Zellsuspension soweit aufgetaut, dass nur noch ein kleines Eisklumpchen vorhanden war, wurde das Kryoröhrchen aus dem Wasserbad entnommen und unter der Sterilbank weiter bearbeitet. Es wurde 1 ml FCS in das Kryoröhrchen gegeben, so dass das Eisklumpchen schmolz. Die Zellsuspension wurde dann mit der Pipette komplett aufgenommen, in ein mit Medium (RPMI + 10% FCS) gefülltes 15ml-Falconröhrchen überführt und zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und gezählt.

3.2.1.5 Herstellung von Hundeserumpool

Zur Herstellung von Hundeserumpool als Zusatz für die Zellkultur wurden junge, ca. 6-10 Monate alte Rüden verwendet. Pro Tier wurden 100 ml Blut an der Vena jugularis abgenommen, in Serum-Monovetten gefüllt und bei 3.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Serum wurde großzügig abpipettiert, gepoolt und in mit Granulat gefüllte 50ml-Falconröhrchen überführt, die dann wiederum bei 3.000 rpm für 10 min zentrifugiert wurden. Erneut wurde das Serum abpipettiert, in frische 50ml-Falconröhrchen überführt und für 30 min im 56°C warmen Rüttelwasserbad inaktiviert. Danach wurde das Serum steril abfiltriert und in 10 ml Aliquots bei -20°C eingefroren und bis zur Verwendung gelagert.

3.2.1.6 Magnetische Zellseparation

3.2.1.6.1 Grundprinzip

Bei dieser Trennmethode werden Zellen über monoklonale Antikörper direkt oder indirekt mit superparamagnetischen Mikropartikeln markiert. Die Zellsuspension mit den spezifisch markierten und den unmarkierten Zellen wird auf eine Trennsäule aufgetragen, die sich in einem Magnetfeld befindet und eine Matrix aus Stahlwolle oder magnetischen Kugeln besitzt. Während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen, bleiben die markierten in der Säule hängen, aus der sie dann außerhalb des Magnetfeldes herausgewaschen werden können. Das MACS- wie das Dynabead-System kann entweder zur Positivselektion oder zur Depletion einer Zellpopulation verwendet werden. Die Zellseparationen wurden gemäß den Herstellerprotokollen von Miltenyi Biotec oder Dynal durchgeführt. Für die Zellseparation mit dem MACS-Magneten wurden LD-Säulen verwendet.

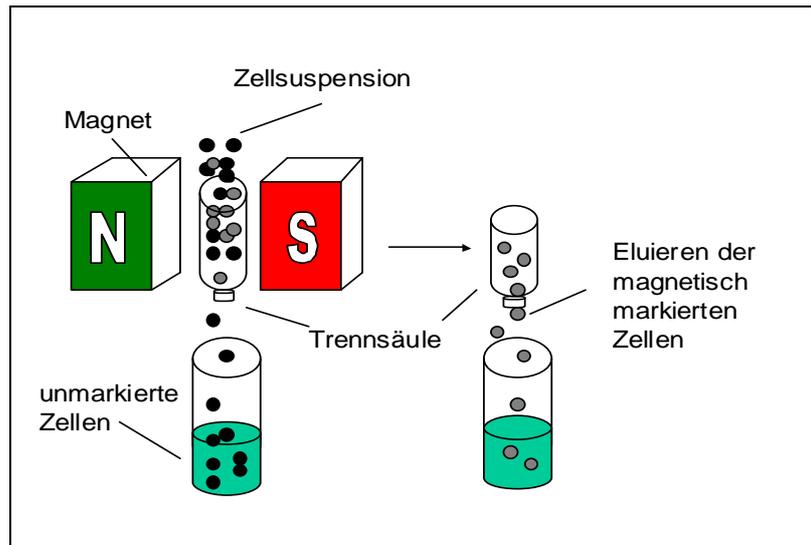


Abbildung 3.2.1.6.1: Grundprinzip der magnetischen Zellseparation. Zur Zellseparation wird die Zielpopulation mit magnetischen Partikeln markiert. Während die unmarkierten Zellen unberührt den Magneten passieren, werden die markierten Zellen zunächst zurückgehalten und können eluiert werden, nachdem der Magnet entfernt wurde.

3.2.1.6.2 Separation mit MACS (engl. Magnetic Cell Separation)

Die über Dichtezentrifugation gewonnenen PBMCs wurden in dem von Miltenyi vorgegebenen Volumen an MACS-Puffer (PBS mit 0,5% BSA) aufgenommen. Nach Zugabe von 0,5 μg des CD6-Antikörpers MT-606 pro 10^6 Zellen wurde gut gemischt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde e mit MACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Zu den Zellen wurden Goat-anti-Mouse Micro Beads (Durchmesser ca. 50 nm) gegeben. Diese binden an alle Zellen, die vorher mit dem Mausantikörper gegen CD6 markiert wurden. Nach einer 15minütigen Inkubationsphase bei 4°C, der sich wiederum ein Waschschrift anschloss, wurde das Zellpellet in MACS Puffer resuspendiert und mittels MACS-Säule im magnetischen Feld separiert. Die Positivfraktion wurde nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld mit einem Stempel herausgedrückt. Sowohl die CD6-negative als auch die CD6-positive Fraktion wurden in einer definierten Menge an Medium (RPMI + 10% FCS) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.2.1.6.3 Separation mit Dynabeads

Die Zellen wurden analog zur Depletion mit dem MACS-System mit Antikörper markiert und gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von in MACS-Puffer gewaschenen Sheep-anti-Mouse Dynabeads (Durchmesser ca. 4,5 μm) in der vom Hersteller angegebenen Menge. Während der 15minütigen Inkubationszeit wurde das Gemisch alle paar Minuten leicht geschüttelt, um die sich durch ihr relativ hohes Gewicht schnell am Boden absetzenden Dynabeads wieder gleichmäßig in der Zellsuspension zu verteilen. Das Gemisch aus Dynabeads und Zellen wurde in einem 15ml-Falconröhrchen in die vorgesehene Magnethalterung gestellt. Anders als beim System von Miltenyi wird hier die Zellsuspension nicht auf eine Säule aufgetragen, sondern die mit Dynabeads markierten Zellen werden an die dem Magneten nächstliegende Wand des Falconröhrchens gezogen, während die unmarkierten Zellen weiter im Überstand schwimmen und abgekippt werden können. Um eine bessere Depletionsrate zu erhalten wurde die Negativfraktion ein weiteres Mal an den Magneten gehalten um nach dem ersten Depletionsschritt noch vorhandene positiv markierte Zellen zu entfernen. Sowohl die CD6-negative als auch die CD6-positive Fraktion wurden in einer definierten Menge an Medium (RPMI + 10% FCS) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.2.1.7 Durchflusszytometrische Zellanalyse

3.2.1.7.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf Fluoreszenz. Ein an einen Antikörper gebundenes Farbstoffmolekül wird durch eine bestimmte Frequenz angeregt und gibt die eingestrahlte Energie in einer größeren Wellenlänge wieder ab. Dies kann im FACS-Gerät (engl. Fluorescence Associated Cell Sorter) gemessen werden.

Die über eine Kapillare aufgesaugten Zellen werden durch eine vibrierende Fließkammer in Einzelzellsuspension gebracht und in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dabei kommt es an den Zellen zu einer Lichtstreuung und die Farbstoffmoleküle, die über die monoklonalen Antikörper an die Zelle gebunden sind, werden zur Fluoreszenz angeregt.

Die ersten Parameter, die bestimmt werden, hängen mit der Streuung der Zellen zusammen. Die Vorwärts Lichtstreuung gibt Aufschluss über die Größe der Zellen, wohin gegen die seitliche Lichtstreuung (im 90° Winkel gemessen) Aussagen über die Granularität bzw. das Plasma-Kern-Verhältnis zulässt. Dadurch erkennt man die Abgrenzung zwischen den unterschiedlichen Populationen der PBMCs.

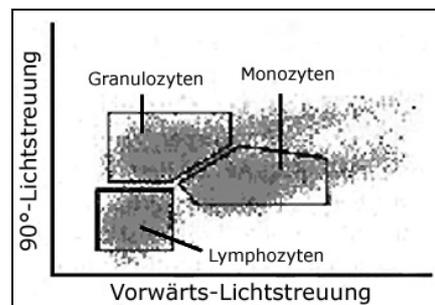


Abbildung 3.2.1.7.1a: Abgrenzung der einzelnen Zellpopulationen der PBMCs. Gezeigt ist ein Dotplot mit der Vorwärts-Lichtstreuung auf der Abszisse und der 90°-Lichtstreuung auf der Ordinate. Die Lymphozyten (kleine Zellen mit hohem Kernanteil) lassen sich dabei gut von Granulozyten (großes Plasma-Kern-Verhältnis, granuliertes Zytoplasma) und Monozyten (große Zellen mit intermediärem Verhalten) abgrenzen.

Neben diesen Streuungsparametern werden auch die Fluoreszenzdaten ausgewertet. Die Stärke des Signals korreliert im Sättigungsbereich des Antikörpers in etwa mit der Dichte des Antigens bzw. der Bindungskonstante des eingesetzten Antikörpers. Durch den Einsatz unterschiedlich markierter Antikörper ist es möglich, verschiedene Antigene in einer Färbung zu bestimmen. Die Farbstoffe FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat) und PE (Phycoerythrin) werden beispielsweise mit der gleichen Wellenlänge angeregt, fluoreszieren jedoch in zwei unterschiedlichen Frequenzen. Die Auftragung der Daten geschieht in Histogrammen bzw. in Dotplots. In Histogrammen wird auf der Ordinate die Anzahl der Signale aufgetragen, auf der Abszisse die Intensität der jeweiligen Fluoreszenz. Dotplots sind eine Gegenüberstellung der Signalintensitäten zweier verschiedener Färbungen.

Da es sich bei der Durchflusszytometrie um eine relative Methode handelt, muss die Veränderung durch die zusätzliche Fluoreszenz aus den markierten Antikörpern durch einen Nullwert (Isotypkontrolle) korrigiert werden. Ebenso muss die Eigenfluoreszenz der untersuchten Zellen berücksichtigt werden.

Fluoreszenzkanal	Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Fluoreszenz 1 (FL-1)	Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)	495 nm	525 nm
Fluoreszenz 2 (FL-2)	Phycoerythrin (PE)	490 nm/565 nm	578 nm
Fluoreszenz 3 (FL-3)	Propidiumjodid (PI)	536 nm	617 nm
Fluoreszenz 4 (FL-4)	Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5)	496 nm/546 nm	667 nm

Tabelle. 3.2.1.7.1b: Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

3.2.1.7.2 Probenvorbereitung

Die zu untersuchenden Zellen wurden in FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS und 0,1% Natrium Azid) gewaschen und auf eine Konzentration von mindestens 200.000 Zellen pro 50 µl FACS-Puffer eingestellt. Entsprechend der zu untersuchenden Oberflächenantigene wurde die entsprechende Menge an FACS-Röhrchen beschriftet und jeweils ein Aliquot der vorbereiteten Zellsuspension vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Antikörper, wobei sich die Menge nach den Angaben der jeweiligen Hersteller richtete bzw. zuvor austitriert wurde. Da einige der verwendeten Antikörper eine relativ hohe Ausgangskonzentration aufwiesen, wurden für diese Vorverdünnungen von 1:10 mit FACS-Puffer angelegt. So lagen die zu pipettierenden Volumina in einem Bereich, auf den die verwendeten Standardpipetten geeicht waren. Doppelfärbungen mit unterschiedlichen Farbmolekülen wurden dabei in einem einzigen Färbeschritt durchgeführt, wohin gegen die Markierung von ungefärbten Antikörpern durch einen Sekundärantikörper in einem zweiten Färbeschritt geschah. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit auf Eis und im Dunkeln wurden die Röhrchen mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann bis zu einem Restvolumen von 50 µl mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Um die abzentrifugierten Zellen wieder in Lösung zu bringen wurden die Zellen auf einem Vortexer aufgeschüttelt. Es erfolgte nach gleichem Schema eine eventuelle Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der an unmarkierte Primärantikörper bindet. Nach Zugabe von 250 µl FACS-Puffer wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Um lebende von toten Zellen abgrenzen zu können erfolgte kurz vor der Messung die Zugabe von Propidiumjodid zu jeder Probe. Dieser Farbstoff dringt ins Zellinnere von

toten Zellen, so dass diese erkannt und aus der Auswertung ausgeschlossen werden können.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm Cell Quest.

3.2.1.8 Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Zur Gewinnung mesenchymaler Stammzellen wurden aus 10 ml Knochenmark eines gesunden Hundes wie beschrieben die mononukleären Zellen isoliert. Diese wurden in mSC-Medium aufgenommen und in einer Dichte von 160.000 Zellen/cm² in 30 ml Medium in einer T175-Zellkulturflasche ausgesät. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Mesenchymale Stammzellen wachsen adhärent in fibroblastenartigen Clustern. Alle 2-3 Tage wurde der Überstand und damit nicht-adhärenente Zellpopulationen abpipettiert und durch neues Medium ersetzt. Bevor die Zellen vollständig konfluent waren, wurden sie geerntet und in neue T175-Zellkulturflaschen überführt.

Dazu wurde zunächst das Medium abpipettiert und die Oberfläche der adhärenent wachsenden Zellen mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Durch Zugabe von 8 ml Trypsin-EDTA pro Zellkulturflasche wurden die Zellen vom Boden abgelöst. Dieser Vorgang dauerte zwischen 5 und 10 min. Die Ablösung der Zellen wurde dabei durch sanftes Klopfen gegen die Zellkulturflasche unterstützt. Der Trypsinierungsvorgang wurde durch Zugabe von 8 ml PBS + 5% FCS gestoppt. Nach Absaugen der Zellsuspension und Überführen in sterile 50 ml-Falconröhrchen wurde die Oberfläche der Zellkulturflasche nochmals gespült, um die restlichen Zellen abzulösen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in mSC-Medium aufgenommen und in einer Zelldichte von 4.000 Zellen/cm² in 30 ml Medium in neue T175-Zellkulturflaschen ausgesät. Das Medium wurde danach alle 3-4 Tage gewechselt und bei Bedarf die Zellen erneut passagiert.

Die mSCs wurden für Versuche zur Suppression der MLC eingesetzt. Dazu wurden mSCs der dritten Passage verwendet, die zuvor mit 12 Gy bestrahlt wurden, um ihre Eigenproliferation zu unterdrücken.

3.2.1.9 Gemischte Lymphozytenkultur (Mixed Lymphocyte Culture = MLC)

Die gemischte Lymphozytenkultur dient zum Nachweis T-zellvermittelter Alloreaktionen durch Kokultur von PBMCs zweier Hunde. Dabei werden die Zellen eines Hundes durch Bestrahlung inaktiviert und dienen als Stimulatorzellen für die vitalen Zellen des zweiten Hundes. Man erhält so eine Reaktion in nur eine Richtung, die umso intensiver ausfällt, je höher die Differenz in den Haupthistokompatibilitätsantigenen der Klasse II zwischen den Individuen ist. Dabei kann die Proliferation der stimulierten Responderzellen entweder durch Einbau von mit Tritium markiertem Thymidin gemessen werden oder durch initiale Markierung der Ausgangszellpopulation mit dem Farbstoff CFDA (Carboxyfluoreszein Diazetat). Dieser Farbstoff kann die Zellmembran durchdringen und wird dort durch zelluläre Kinasen durch Abspaltung von Acetatgruppen zu CFSE (Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidylester) verstoffwechselt. Dieser Stoff, der stark fluoreszierende Eigenschaften besitzt, kann nicht wieder aus dem Zellinneren entweichen. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen an Tochterzellen weitergegeben, die so eine geringere Fluoreszenzaktivität besitzen als die Ausgangszelle. Die Fluoreszenz kann im Durchflusszytometer auf dem Kanal der Fluoreszenz 1 gemessen werden.

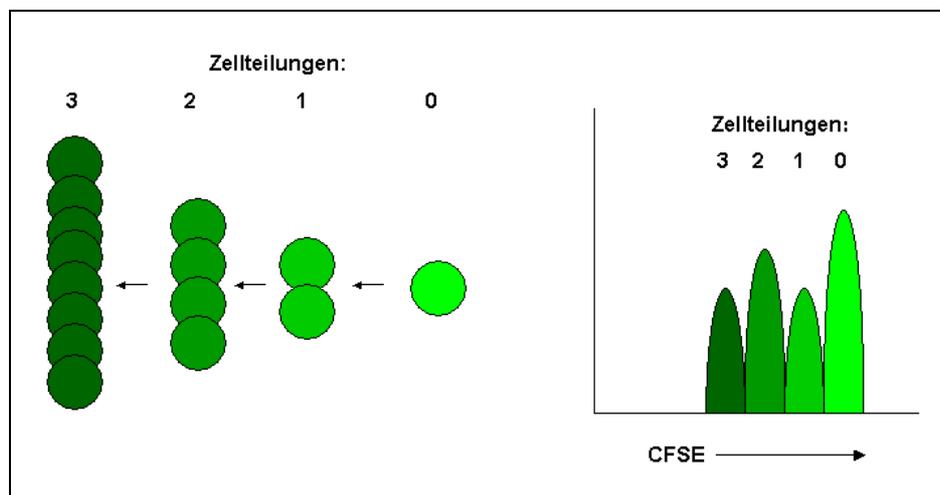


Abbildung 3.2.1.9: Grundprinzip der Messung der Zellproliferation mit dem Farbstoff CFSE. Nach Markierung der Ausgangszellpopulation mit dem Farbstoff CFSE wird dieser bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben, wobei die Fluoreszenzintensität nach jeder Teilung abnimmt. Der Farbstoff kann im Durchflusszytometer auf dem Kanal der Fluoreszenz 1 gemessen werden.

Die Durchführung der MLC erfolgte nach der Methode von Grosse-Wilde (Grosse-Wilde et al., Tissue Antigens, 1974). PBMCs aus dem Blut zweier Hunde wurden mit MLC-Medium (RPMI + 5% HSP + 2,6% Na-Pyruvat + 1% Penicillin-Streptomycin + 1% L-Glutamat) auf $10^5/100\mu\text{l}$ eingestellt. Die Stimulatorzellen wurden mit 40 Gy bestrahlt und jeweils 10^5 Responderzellen mit 10^5 bestrahlten Stimulatorzellen in einer 96-Loch Rundbodenplatte gemischt und bei 38°C im Brutschrank mit 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kokultiviert. Zur Evaluierung der suppressiven Eigenschaften von CD6-depletiertem Knochenmark auf die MLC-Reaktion wurde zu der Mischung aus bestrahlten Stimulatorzellen und Responderzellen noch undepletiertes Knochenmark, CD6-negative oder CD6-positive Knochenmarkzellen in verschiedenen Konzentrationen gegeben. Die Knochenmarkzellen wurden vorher mit 12 Gy bestrahlt, um ihre Eigenproliferation zu verhindern. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die gemessene Zellproliferation nur den Lymphozyten zuzuschreiben war.

3.2.1.9.1 Messung der Zellproliferation durch Einbau von ^3H -Thymidin

Für die Evaluierung der Zellproliferation mit Hilfe des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin wurden Triplikate angesetzt und nach 5 Tagen pro Loch $1\ \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin in $50\ \mu\text{l}$ MLC-Medium zugegeben. Nach einer Inkubation von 18 h wurde die ^3H -Thymidin-Inkorporation gemessen. Dazu wurde die Zellsuspension mittels eines Zell-Harvesters durch eine 96-Loch-Filterplatte gesaugt. Die Zellen mit dem inkorporierten ^3H -Thymidin blieben dabei in der Filterplatte hängen, während das Medium mit dem noch freien ^3H -Thymidin durch den Filter hindurchgespült wurde. Die Filterplatten wurden einen Tag lang getrocknet und dann nach Zugabe von $30\ \mu\text{l}$ Szintillationscocktail in einem TopCount gemessen. Das Ergebnis wurde in Counts pro Minute angegeben. Zur Auswertung wurde aus den Triplikaten der Mittelwert gebildet.

3.2.1.9.2 Messung der Zellproliferation durch CFSE

Die Messung der Zellproliferation mit Hilfe von CFSE erfolgte im Durchflusszytometer. Zu Beginn der MLC wurde dazu die nicht-bestrahlte Zellpopulation in einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ /ml in PBS aufgenommen. Pro 5 ml PBS erfolgte die Zugabe von 1 μ l CFSE und die Zellen wurden während des Färbeprozesses für 15 min bei 38°C und 5% CO₂ im Brutschrank gelagert, wobei das Röhrchen mit den Zellen alle paar Minuten leicht geschüttelt wurde, um eine gleichmäßige Aufnahme des Farbstoffs zu gewährleisten. Am Ende des Färbeprozesses wurden die Zellen zweimal gewaschen und dann in der benötigten Konzentration in MLC-Medium aufgenommen und in der MLC eingesetzt. Vor der Messung der Proben im Durchflusszytometer wurden je 10 μ l einer Mischung aus Kalibrationsbeads und dem Farbstoff To-Pro-3iodide, der tote Zellen färbt, zugegeben. Das Durchflusszytometer wurde so eingestellt, dass je 2.000 Beads gemessen, und die in dieser Zeit detektierten Zellen angezeigt wurden. Die toten Zellen wurden von der Messung ausgeschlossen.

Eine Auswertung der MLC erfolgte nur bei niedriger autologer Proliferation (negative Kontrolle) und guter Reaktivität gegen die Kontrollzellen (positive Kontrolle). Bei einigen Ansätzen wurde zur Abschätzung der maximal möglichen Proliferation der Zellen ein Kontrollansatz mitgeführt, bei dem die Zellen durch das Lektin PHA zur Proliferation angeregt wurden. Die einzusetzende Konzentration an PHA wurde für jede verwendete Charge neu ausgetestet und lag zwischen 5-10 μ g/ml Medium.

3.2.1.10 Colony Forming Unit (CFU)-Assay

250.000 über Dichtezentrifugation isolierte Knochenmarkzellen wurden mit 2 ml Methylcelluloseagar gemischt und so lange stehen gelassen, bis sich die beim Vortexen entstandenen Bläschen wieder zurückgebildet hatten. Vorsichtig wurde das Methylcellulosegemisch mit einer Pipette aufgesaugt und blasenfrei in einer 6 Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Freibleibende Löcher wurden mit je 2 ml PBS aufgefüllt und die Platte für 14 Tage beim 38°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Auszählung der gewachsenen CFUs mit Hilfe eines Rasters im Mikroskop.

Folgende CFUs wurden unterschieden:

CFU-G:	Granulozytäre Kultur
CFU-M:	Monozytäre Kultur
CFU-E:	Erythrozytäre Kultur
BFU-E:	großflächig wachsende erythrozytäre Kultur
CFU-GM:	Kultur mit granulozytären und monozytären Anteilen
CFU-GEMM:	Kultur mit granulozytären, erythrozytären, monozytären, und makrophagischen Anteilen

3.2.2 Tierexperimentelle Methoden

3.2.2.1 DLA-Typisierung

Die in den Versuchen eingesetzten Hunde der Rasse Beagle stammen aus der Zucht des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF) in Neuherberg. Seit 1972 werden in dieser Zucht die Stammbäume der Hunde kontinuierlich dokumentiert. Alle Hunde werden regelmäßig gegen Staupe, Hepatitis und Leptospirose geimpft, sowie zweimal jährlich entwurmt. Die Histokompatibilitäts-Typisierung erfolgt für jeden Wurf über die gemischte Lymphozytenkultur mit parentalen Zellen und homozygoten Testzellen, sowie mit STR-PCR. Die Typisierung wurde durchgeführt von Dr. Martin Herber. Für jedes Tier werden die parentalen Haplotypen für DLA-A und DLA-B angegeben.

3.2.2.2 Entnahme von Knochenmark

45 min vor Beginn der Knochenmarkentnahme wurde den Tieren Buprenorphin (Temgesic®) in einer Dosierung von 0,008 mg/kg intramuskulär gespritzt. An der Vena cephalica antebrachii wurde ein Venenverweilkatheter gelegt, über den die Tiere 0,5 mg/kg Diazepam und 5 mg/kg Propofol zur Narkoseeinleitung verabreicht bekamen. Anschließend wurde ein Tubus in die Trachea eingeführt und die Tiere an ein Narkosegerät angeschlossen, über das sie Isofluran und Sauerstoff zur

Aufrechterhaltung der Narkose verabreicht bekamen. Während der gesamten Dauer der Narkose wurden Pulsfrequenz und Sauerstoffsättigung des Blutes über ein Pulsoxymeter verfolgt sowie die Atemfrequenz in regelmäßigen Abständen überprüft. Das Fell wurde an den Stellen zur Punktion der Knochen großzügig ausrasiert, Haarreste entfernt und die Haut sorgfältig mehrmals mit Alkohol desinfiziert. Für die Entnahme von Knochenmark aus den Humeri wurden die Tiere auf dem Rücken liegend auf einem Kissen gelagert und die Vorderläufe straff nach caudal gebunden. Die Knochenmarkentnahme aus Femora und Beckenknochen erfolgte in Seitenlage des Tieres. Vor Beginn der Entnahme wurde der jeweilige Bereich mit einem sterilen Operationstuch abgedeckt.

Nach gründlicher Reinigung und Desinfektion der Hände wurden sterile Operationshandschuhe angezogen. Das Operationsbesteck sowie Verbrauchsmaterialien wie Tupfer, sterile Behälter für das Knochenmark und die sterilen Spritzen zur Aspiration wurden während der Knochenmarkentnahme auf einem Tisch gelagert, der mit einem sterilen Operationstuch abgedeckt wurde.

Die Haut der Tiere wurde an den relevanten Stellen mit einer Skalpellklinge auf einer Länge von ca. 2-3 mm eingeschnitten und dann mit einer in der Humanmedizin üblichen Nadel, die zuvor mit heparinisiertem Medium gespült worden war, der Knochen in seiner Mitte längs angebohrt. Nach Durchdringen der Kortikalis wurde der Mandrin der Nadel entfernt und eine Spritze aufgesetzt, in der ca. 3 ml Medium vorgelegt wurden. Durch Aspiration wurde das Knochenmark, das sich zusammensetzt aus blutbildendem Mark, Fett und Blut, in die Spritze gesaugt. Der jeweilige Röhrenknochen wurde durch erneutes Einsetzen des Mandrins und Veränderung der Lage der Nadelspitze über seine gesamte Länge durchrastert, um die maximale Menge an blutbildendem Mark gewinnen zu können. Zur Volumensubstitution wurde den Tieren während des gesamten Eingriffs Ringer-Lactat-Lösung als Dauertropfinfusion verabreicht. Eventuelle Blutungen kleiner Hautgefäße wurden am Ende der Knochenmarkentnahme durch Kompression mit sterilen Tupfern gestillt und die Inzisionsstelle mit antibiotischem Puder abgedeckt. Bei Anzeichen von Schmerzen erhielten die Tiere in den folgenden Tagen 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl®) per os.

Das gewonnene Knochenmark wurde durch zwei Siebe mit unterschiedlicher Porengröße gefiltert, um es von Knochenbruchstücken und anderen Artefakten zu befreien, bevor es dann im Labor weiter verarbeitet wurde.

3.2.2.3 T-Zelldepletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement

Das aus Humeri, Femora und Becken der Hunde gewonnene und mit heparinisiertem Medium versetzte Knochenmark wurde in 50ml-Falconröhrchen gefüllt und bei 2.700 rpm für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der nach der Zentrifugation deutlich sichtbare Buffy Coat (BC) wurde mit einer Spritze mit aufgesetzter großlumiger Kanüle großzügig abgesaugt, in neue Falconröhrchen überführt und im Verhältnis 1:2 mit PBS gemischt. Aus dem PBS-BC-Gemisch wurden wie bereits beschrieben die mononukleären Zellen durch Dichtezentrifugation isoliert und nachfolgend in RPMI aufgenommen. Die Zellzahl wurde durch Zählung der mit Türks Lösung verdünnten Zellsuspension mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Abnahme der nötigen Zellmenge für FACS- und CFU-Analysen wurden die verbleibenden Zellen abzentrifugiert, in 30 ml RPMI aufgenommen und mit $0,5 \mu\text{g}/10^6$ Zellen mit dem CD6-Antikörper MT-606 für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen zweimal mit RPMI gewaschen, in 32 ml RPMI aufgenommen und auf zwei Falconröhrchen verteilt.

Das lyophilisierte Kaninchenkomplement wurde nach Herstellerangaben in der entsprechenden Menge Aqua ad injectabilia gelöst, steril filtriert und je 4 ml in jedes Falconröhrchen zur Zellsuspension gegeben. Die Falconröhrchen wurden anschließend bei 37°C für 1 h im Schüttelwasserbad inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde das Kaninchenkomplement durch zweimaliges Waschen der Zellen mit RPMI entfernt und die Zellsuspension anschließend durch ein Zellsieb gegeben, um den bei der Lyse der CD6-positiven Zellen entstandenen Zellschrott zu entfernen.

3.2.2.4 T-Zelldepletion mit Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)

Das einem Spendertier entnommene Knochenmark wurde in einem Transfusionsbeutel gesammelt. Die Zugabe von ATG in verschiedenen Konzentrationen erfolgte abhängig vom Volumen des gewonnenen Knochenmarks ohne Berücksichtigung der Zellzahl. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit wurde das Knochenmark entweder direkt transplantiert oder bis zur Verwendung kryokonserviert.

3.2.2.5 Kryokonservierung von Knochenmark zur Transplantation

Um einen schonenden Einfriervorgang der Knochenmarkspräparate zu gewährleisten, wurde eine Gefrierschutzlösung aus RPMI und 20% DMSO hergestellt und bei 4°C vorgekühlt. Je 90 ml Knochenmark wurden in einen speziellen Einfrierbeutel gegeben und unter dauerndem Schwenken mit 90 ml der Gefrierschutzlösung vermischt. Der Beutel wurde anschließend in eine vorgekühlte Metallplatte gegeben, die ihn vollständig umschließt und eine Lagerung in dafür vorgesehenen Türmen erlaubt. In dieser Metallplatte wurde der Beutel mit der Knochenmarklösung in eine Einfriermaschine gestellt und über einen Zeitraum von 1 h langsam auf -100°C heruntergekühlt. Zur langfristigen Lagerung wurde das Knochenmark dann in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

3.2.2.6 Auftauen von kryokonserviertem Knochenmark zur Transplantation

Das in flüssigem Stickstoff für einige Wochen vor der Transplantation gelagerte Knochenmark wurde aus dem Stickstofftank entnommen und unter dauerndem Schwenken in einem lauwarmen Wasserbad nur so weit aufgetaut, bis noch kleine Eisklumpchen vorhanden waren. Mit der Transplantation wurde sofort begonnen wie unter 3.2.2.8 beschrieben und das Präparat langsam über einen Zeitraum von 1-2 h transfundiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine kleine Probe abgezweigt und wie unter 3.2.2.7 beschrieben verarbeitet.

3.2.2.7 Bestimmung der Zellzahl von Knochenmark zur Transplantation

Während der Aspiration von Knochenmark aus den Röhrenknochen wird nicht nur reines Knochenmark gewonnen, sondern gleichzeitig auch Blut aspiriert. Daher muss zur Bestimmung der Anzahl der aus dem Knochenmark stammenden mononukleären Zellen der Wert der mononukleären Zellen des gewonnenen Präparates um die Anzahl der mononukleären Zellen in einer äquivalenten Menge Blut korrigiert werden. Vor Beginn der Knochenmarkentnahme wurde dazu dem Hund eine Blutprobe entnommen und wie unter 3.2.1.2 beschrieben die Anzahl der Leukozyten pro μl bestimmt. Ein

Giemsa-gefärbter Blutaussstrich wurde beurteilt und der Prozentsatz an mononukleären Zellen im Blut bestimmt.

Auch aus dem gewonnenen Knochenmark wurde eine Probe entnommen und die Anzahl der Leukozyten pro μl Knochenmark analog ausgezählt, sowie der Prozentsatz der mononukleären Zellen bestimmt.

Die Errechnung der Anzahl der mononukleären Zellen aus dem Knochenmark erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{MNC (KM)} = (\text{Leukozyten}/\mu\text{l im gesamten Präparat} \cdot \text{Volumen des gesamten Präparats in } \mu\text{l} \cdot \% \text{ mononukleäre Zellen im gesamten Präparat}) - (\text{Leukozyten}/\mu\text{l im Blut} \cdot \text{Volumen des Blutes im Präparat in } \mu\text{l} \cdot \% \text{ mononukleäre Zellen im Blut})$$

Das Volumen des Blutes wurde dabei errechnet durch das Gesamtvolumen des Präparats abzüglich des Volumens des verbrauchten Mediums.

Für eine autologe Knochenmarkstransplantation, bei der das Präparat vor der Transplantation eingefroren war, wurde nach dem Auftauen erneut die Anzahl der Leukozyten bestimmt und außerdem durch eine Färbung mit Trypanblau analysiert, wie hoch der Prozentsatz an toten Zellen nach dem Auftauen war. Diese wurden dann in der oben stehenden Formel mit berücksichtigt und von der Gesamtzellzahl abgezogen.

3.2.2.8 Ganzkörperbestrahlung von Hunden

Vor Beginn der Bestrahlung wurden die Hunde einer gründlichen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Bei ungestörtem Allgemeinbefinden wurde den Hunden ein Venenverweilkatheter an der Vena cephalica antebrachii gelegt und über diesen 0,5 mg/kg Diazepam und 5 mg/kg Propofol zur Narkoseeinleitung verabreicht. Nach Intubation wurden die Tiere über den Tubus an ein Narkosegerät angeschlossen und die Narkose mit Isofluran und Sauerstoff aufrechterhalten. Über zwei Kameras konnten die Hunde während der Bestrahlung beobachtet und die Atemfrequenz sowie die am Pulsoxymeter angezeigte Sauerstoffsättigung des Blutes und die Herzfrequenz überwacht werden.

Die Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 10 Gy erfolgte an der GSF in Neuherberg durch eine Cobaltstrahlenquelle mit einer Strahlendosis von 5,5 cGy/min. Die genaue Kalibration der Strahlenquelle mit Hilfe eines Dosimeters in Form eines Hundephantoms sowie die Einstellung der Strahlenfeldgröße und des Abstandes des Hundes von der Quelle erfolgte vor jeder Bestrahlung durch Herrn Dr. Panzer, den für die Strahlenquelle verantwortlichen Physiker der GSF. Die Hunde wurden auf dem Bauch liegend mit nach cranial und caudal gestreckten Gliedmaßen mit ihrer Längsachse senkrecht zum Strahlenverlauf gelagert. Nach der Hälfte der Gesamtdosis wurden die Hunde um 180° gedreht und nun von der anderen Körperseite bestrahlt. Dies versprach eine möglichst homogene Verteilung der Strahlung. Um ein zu starkes Absinken der Körpertemperatur zu verhindern, wurden die Tiere während der Bestrahlung unter einer Rotlicht-Wärmelampe gelagert.



Abbildung 3.2.2.8: Ganzkörperbestrahlung eines Hundes in Vollnarkose. Die Bestrahlung mit einer Cobaltquelle (links im Bild) findet unter Vollnarkose des Hundes mit Isofluran und Sauerstoff statt.

Am Ende der Bestrahlung wurde den noch in Narkose liegenden Hunden ein zentraler Venenkatheter (ZVK) in die Vena jugularis eingeführt und mit zwei Knopfheften an der Haut fixiert. Die Hunde erhielten anschließend einen Halsverband unter dem das Ende des ZVKs mit aufsitzendem Dreiwegehahn befestigt wurde.

Nach dem Erwachen aus der Narkose erhielten die Hunde 0,5 mg/kg Paspertin i.v. als Antiemetikum, bevor sie nach einer kurzen Erholungszeit in den Versuchsbereich am GSF-Hämatologikum transportiert wurden.

3.2.2.9 Knochenmarktransplantation

Für die Transplantation von CD6-depletiertem Knochenmark wurden die Zellen nach der Behandlung mit MT-606 und Kaninchenkomplement (s. 3.2.2.3) in 50 ml RPMI aufgenommen, die Gesamtzellzahl bestimmt und die zu transplantierende Zellzahl pro kg Körpergewicht des Empfängers berechnet. Proben für FACS- und CFU-Analysen wurden abgenommen und die restlichen Zellen den Hunden über einen Zeitraum von 1-2 h langsam transfundiert.

Mit ATG vorinkubiertes Knochenmark wurde dem Empfängertier entweder direkt oder nach dem Auftauprozess (s. 3.2.2.6) intravenös verabreicht. Die Zellzahlbestimmung erfolgte hier wie unter 3.2.2.7 beschrieben. Nach Ende der Transplantation wurden die Hunde noch einige Zeit beobachtet, um eine eventuell auftretende anaphylaktische Reaktion frühstmöglich zu erkennen und behandeln zu können.

3.2.2.10 Behandlungsplan für bestrahlte und transplantierte Hunde

Da durch die Bestrahlung mit 10 Gy die Darm-Blut-Schranke durchlässig wird, wurde den Hunden ab dem 6. Tag vor der Bestrahlung bis 10 Tage danach täglich zweimal eine selektive Darmdekontamination bestehend aus Colisinsulfat, Amphotericin B und Neomycinsulfat verabreicht. Dies tötet die Darmbakterien so weit ab, dass ein Übertritt von Toxinen in die Blutbahn verhindert wird.

Die Tiere bekamen ab dem Tag der Bestrahlung 5 Tage lang kein Wasser und für 6 Tage kein Futter. Um den Flüssigkeitshaushalt auszugleichen erfolgte zweimal täglich eine subkutane Infusion von 5% Glucoselösung und Ringer-Lactat. Der Erhaltungsbedarf der Hunde wurde dabei nach folgender Tabelle berechnet:

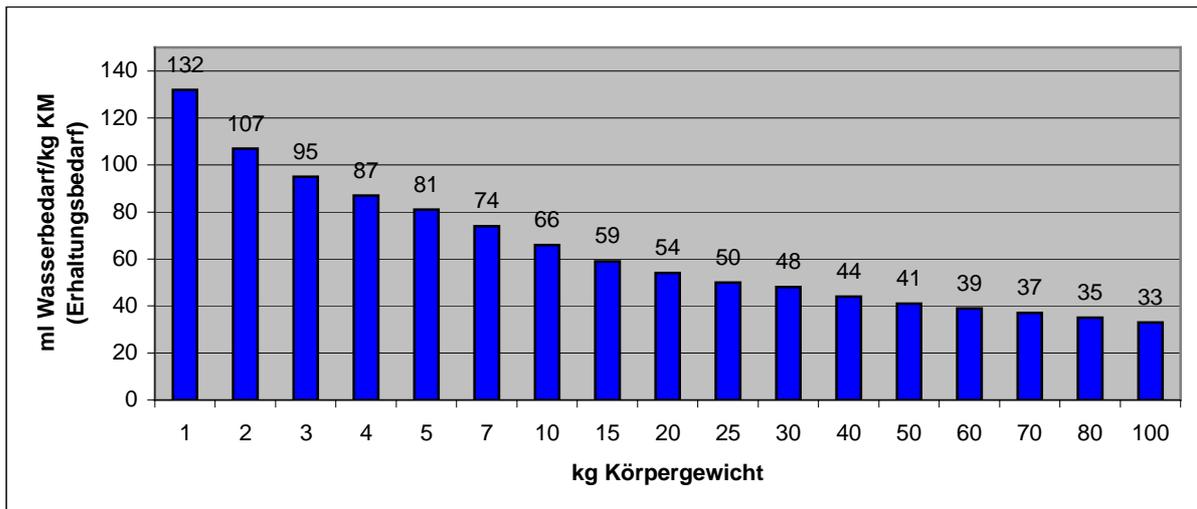


Abbildung 3.2.2.10: Erhaltungsbedarf an Flüssigkeit in ml pro kg Körpergewicht des Hundes. Aus: Kraft, Dosierungsvorschläge für Arzneimittel bei Hund und Katze, 2003.

Ab Tag 5 nach der Transplantation wurde den Hunden abgekochtes Wasser ad libitum angeboten. Stieg die Leukozytenzahl stabil auf über 1.000/ μ l wurde auf das Abkochen des Wassers verzichtet. Die Tiere erhielten ab Tag 6 zu Beginn mehrmals täglich kleine Portionen eines leicht verdaulichen Dosenfutters. Angepasst an Allgemeinzustand und Appetit des Hundes wurde nach und nach auf normales Dosen-Alleinfutter umgestellt. Bei Erholung der Leukozytenzahl auf über 1.000/ μ l erhielten die Tiere wieder ihre gewohnte Futterration.

Die Hunde wurden ab dem Zeitpunkt der Bestrahlung mindestens zweimal täglich einer intensiven Allgemeinuntersuchung unterzogen. Zählung der Leukozyten- und Thrombozytenzahl sowie Ermittlung des Hämatokrits und Erstellung eines Differentialblutbildes fanden dabei täglich sowohl maschinell als auch per Hand statt. Ein bis zweimal wöchentlich wurden die gängigen Serumparameter der Tiere ermittelt und ggf. die Therapie in Form einer leber- oder pankreasschonenden Diät angepasst.

Bei einem Anstieg der Temperatur auf $>39,8^{\circ}\text{C}$ oder zweimalig auf $>39,0^{\circ}\text{C}$ erhielten die Tiere eine intravenöse Antibiotikatherapie mit 100 mg/kg Piperacillin und 25 mg/kg Combactam. Konnte damit nach drei Tagen keine Senkung des Fiebers erreicht werden, wurde die Antibiose umgestellt auf 20 mg/kg Vancomycin und 50 mg/kg Cefotaxim. Bei sehr hohem Fieber wurde zusätzlich Metamizol in einer Dosierung von 50 mg/kg intravenös oder oral verabreicht. Die Dauer der Antibiotikatherapie richtete sich nach dem Zustand der Tiere, wurde aber mindestens für 10 Tage aufrecht erhalten.

Sank die Thrombozytenzahl auf Werte unter 10.000/ μ l wurden den Tieren Thrombozytenkonzentrate von DLA-identischen gesunden Spendertieren wie unter

3.2.2.11 beschrieben verabreicht. Bei Absinken des Hämatokrits unter 30% wurde Vollblut (s. 3.2.2.12) transfundiert. Um gegebenenfalls auftretende anaphylaktische Reaktionen schnell erkennen und behandeln zu können wurden die Empfängertiere nach der Transfusion für einige Stunden intensiv überwacht. Eine Therapie erfolgte bei Bedarf mit 1-2 mg/kg Fenistil i.v.

3.2.2.11 Herstellung eines Thrombozytenkonzentrats

In der Regel wurde den transplantierten Hunden ab einem Thrombozytenwert von unter 10.000/ μ l ein Thrombozytenkonzentrat verabreicht. Bei Fieber und gestörtem Allgemeinbefinden bzw. bei Anzeichen einer stark gestörten Blutgerinnung wie petechialen Blutungen auf den Schleimhäuten wurden die Thrombozytenkonzentrate allerdings auch schon bei höheren Thrombozytenwerten transfundiert. Hierbei wurde jeweils individuell für jedes Tier entschieden.

Einem gesunden DLA-kompatiblen Spenderhund wurden 150 ml Blut abgenommen und in einen Transfusionsbeutel gefüllt. Als Antikoagulanzen wurden insgesamt 18 ml ACD-A verwendet, da dieses eine relativ geringe biologische Halbwertszeit hat und so die Blutgerinnung beim Empfängertier anders als Heparin nicht maßgeblich beeinträchtigt. Der Transfusionsbeutel wurde für 4 min mit 4.000 Umdrehungen pro Minute und einem Auslauf ohne Bremse zentrifugiert. Vorsichtig wurde der Beutel aus der Zentrifuge entnommen, um die durch die Zentrifugation getrennten Blutbestandteile nicht wieder zu vermischen. Der Transfusionsschlauch des Beutels wurde abgeklemmt, der untere Teil abgeschnitten und darauf ein Combifix-Adapter gesetzt. Mit einer Spritze wurden nach Öffnen der Klemme ca. 50 ml der sich im unteren Teil des Transfusionsbeutels befindlichen Erythrozyten abgezogen, die der Spender intravenös zurückerhielt. Der Transfusionsschlauch wurde mit einer Klammer verschlossen und der Inhalt des Beutels durch sanftes Schwenken vermischt. Vor der Transfusion wurde der Beutel mit 20 Gy bestrahlt, um die Leukozyten zu inaktivieren. Während der Transfusion wurde auf allergische Reaktionen des Empfängertieres geachtet und diese ggf. mit Fenistil behandelt. Um dem vorzubeugen, erhielt jeder Hund maximal zwei Thrombozytenkonzentrate bzw. Vollblutspenden vom selben Spender. Das erste Thrombozytenkonzentrat wurde grundsätzlich vom Knochenmarkspender gewonnen.

3.2.2.12 Transfusion von Blut bei erniedrigtem Hämatokrit

Bei Abfallen des Hämatokrits unter 30% nach der Transplantation erhielten die Hunde eine Vollblutspende eines DLA-kompatiblen Spenders. Dazu wurden dem Spendertier 100 ml Blut entnommen, das mit 12 ml ACD-A als Antikoagulanzen versetzt wurde. Zur Inaktivierung der Leukozyten wurde das Blut mit 20 Gy bestrahlt. Während der Transfusion wurde auf allergische Reaktionen des Empfängertieres geachtet und diese ggf. mit Fenistil behandelt. Präventiv erhielt jeder Hund maximal zwei Vollblutspenden bzw. Thrombozytenkonzentrate vom selben Spender.

3.2.2.13 Tägliche Blutuntersuchung transplantierte Hunde

3.2.2.13.1 Leukozytenwerte

In einer Glaspipette wurde EDTA-Blut im Verhältnis 1:50 mit Eisessig gemischt und für 20 min auf einen Rüttler gelegt. Nach dieser Zeit wurde mit der Zellsuspension eine Neubauerzählkammer beschickt und vier Großquadrate ausgezählt. Die Anzahl der Leukozyten/ μl wurde durch Multiplikation der gezählten Zellen mit dem Verdünnungsfaktor 50 erhalten.

3.2.2.13.2 Thrombozytenwerte

Je nach zu erwartender Gesamtthrombozytenzahl wurden 20 μl , 50 μl oder 100 μl EDTA-Blut in ein Thrombo PLUS[®]-Röhrchen pipettiert und dieses leicht geschwenkt. Nach ca. 10 min wurde mit dem am Stopfen des Thrombo PLUS[®]-Röhrchens befindlichen Probeträgers eine Neubauerzählkammer gefüllt. Diese wurde für einige Minuten in einer feuchten Kammer platziert, um die Thrombozyten absedimentieren zu lassen. Es wurden fünf kleine Quadrate ausgezählt und die Gesamtthrombozytenzahl/ μl durch Multiplikation mit den Faktoren 5.000, 2.000 oder 1.000 erhalten.

3.2.2.13.3 Hämatokrit

Zur Bestimmung des Hämatokrits wurde EDTA-Blut in eine Mikrokapillare gesaugt, diese mit Knetmasse am unteren Ende verschlossen und daraufhin bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Hämatokrit wurde mit Hilfe einer speziellen Schablone abgelesen.

3.2.2.13.4 Differentialblutbild

Ca. 6 µl EDTA-Blut wurden dünn auf einem Objektträger ausgestrichen. Nach einer Trocknungszeit von wenigen Minuten wurde der Objektträger nach Pappenheim gefärbt. Dazu wurde er zunächst 5 min in May-Grünwaldlösung gestellt, mit Aqua dest. abgespült und anschließend für 15-20 min in 5%iger Giemsalösung zu Ende gefärbt. Die überschüssige Lösung wurde abermals mit Aqua dest. abgespült und der Ausstrich vor der Analyse für einige Minuten zum Trocknen bei Raumtemperatur gelagert. Im Mikroskop wurden insgesamt 100 Leukozyten ausgezählt und dabei die prozentualen Anteile an stabkernigen neutrophilen Granulozyten, segmentkernigen neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten bestimmt.

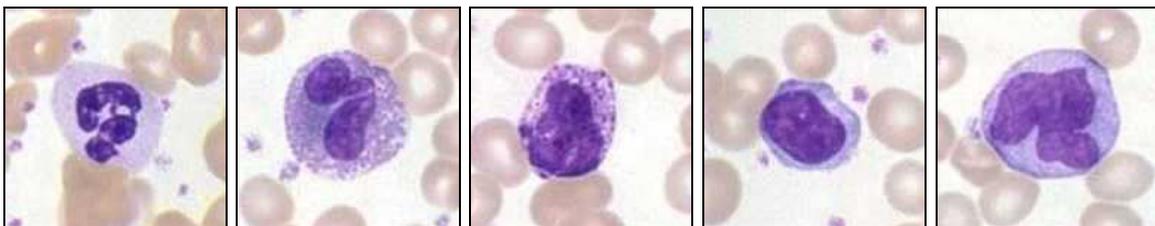


Abbildung 3.2.2.13.4: Differentialblutbild. Von links nach rechts: Neutrophiler Granulozyt, Eosinophiler Granulozyt, Basophiler Granulozyt, Lymphozyt, Monozyt

3.2.2.13.5 Retikulozyten

EDTA-Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit Brilliantkresylblaulösung gemischt und für 30 min inkubiert bevor es auf einen Objektträger ausgestrichen wurde. Im Mikroskop wurden 1.000 Erythrozyten analysiert und der Promilleanteil an Retikulozyten ermittelt.

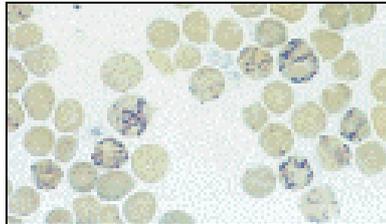


Abbildung 3.2.2.13.5: Retikulozyten. Im Gegensatz zu reifen Erythrozyten (im Bild blassrosa) besitzen die Retikulozyten noch Reste von Zellorganellen und RNA. Das Ribonucleoprotein der Ribosomen kann in der Brilliantkresylblaufärbung dunkel gefärbt werden und erlaubt so die Erkennung der Retikulozyten im Mikroskop.

3.2.2.14 Chimärismusbestimmung

3.2.2.14.1 Chimärismusbestimmung im Knochenmark

Unter Vollnarkose mit Diazepam und Propofol wurden den Tieren ca. 5 ml Knochenmark aus dem Beckenkamm entnommen und in 20 ml RPMI + 20% FCS aufgenommen. Über Nacht wurden je 4 ml der Zellsuspension in 15 ml-Falconröhrchen bei 38°C im Brutschrank inkubiert und die Zellteilung am nächsten Morgen durch Zugabe von 150 µl Colzemid gestoppt. Das Colzemid wurde nach 2stündiger Inkubation mit 1.500 rpm für 10 min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Unter ständigem Schütteln erfolgte die Zugabe von hypertoner Kaliumchloridlösung (0,074 mol/l), die bei Raumtemperatur für 30 min auf den Zellen belassen und danach wie oben abzentrifugiert wurde. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen durch tröpfchenweise Zugabe einer Fixationslösung bestehend aus 75% Eisessig und 25% Methanol fixiert. Diese Fixationslösung wurde nach 30 min abzentrifugiert und die Fixation noch zwei- bis dreimal wiederholt, bevor die Zellen am Schluss in 2 ml Fixationslösung aufgenommen wurden.

6-8 Tropfen der so erhaltenen Knochenmarklösung wurden auf einen Objektträger aufgetropft, dieser zur Fixation mehrmals durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen und die Objektträger bis zur Auswertung bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Auswertung wurden die Chromosomen der in Mitose befindlichen Zellen mikroskopisch untersucht. Da Knochenmarksspender und -empfänger immer ein unterschiedliches Geschlecht besaßen, erfolgte eine Beurteilung der Geschlechtschromosomen XX oder XY in jeder Zelle. Durch Ermittlung des Anteils an Zellen mit dem Geschlecht des Knochenmarkspenders konnte eine Aussage darüber getroffen werden, wie hoch der Anteil des Spenderchimärismus lag.

3.2.2.14.2 Chimärismusbestimmung im Blut

Dem Hund wurden 50 ml Blut aus der Vena jugularis entnommen und die mononukleären Zellen wie bereits beschrieben isoliert. Diese wurden in Waymouth Medium + 2,4% L-Glutamin + 1,5% Penicillin-Streptomycin + 2% NaHCO₃ (7,5%) auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^6$ /ml eingestellt. Zwei T25-Zellkulturflaschen wurden mit je 5 ml der Zellsuspension + 0,5 ml Hundeserumpool + 5 µg/ml PHA befüllt und für 60 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde die Zellsuspension jeder Flasche in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt, mit 150 µl Colzemid für 2 h inkubiert und danach das Medium bei 1.500 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen aufgeschüttelt und je 5 ml 0,95% Natriumcitrat dazugegeben. Nach einer Einwirkzeit von 30 min wurde das Natriumcitrat wie oben angegeben abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen erneut aufgeschüttelt. Tropfenweise wurde nun unter dauerndem Schütteln eine Fixationslösung bestehend aus 25% Essigsäure und 75% Methanol zugegeben und nach 30 min abzentrifugiert. Dieser Fixationsschritt wurde wiederholt und danach tröpfchenweise so viel Fixationslösung zugegeben, bis eine milchige Trübung entstanden war. Bis zur Auswertung wurde die Lösung bei 4°C im Kühlschrank gelagert und weiter verfahren wie unter 3.2.2.8.2 beschrieben.

3.2.2.15 Leukapherese zur Gewinnung einer DLT (engl. Donor Lymphocyte Transfusion)

Für die Leukapherese, also das Absammeln der Leukozyten aus dem Blut, wurde der jeweilige Hund nüchtern gehalten. An der Vena jugularis wurden bei jedem Leukaphereseschritt 200 ml Blut entnommen. Als Antikoagulanzen wurde dabei eine möglichst geringe Menge Heparin (ca. 30 µl für 50 ml Blut) eingesetzt. Das gewonnene Blut wurde in 50 ml-Falconröhrchen gefüllt und bei 2.700 rpm für 15 min zentrifugiert. Die Zentrifuge lief dabei ungebremst aus. Nach der Zentrifugation wurde der deutlich sichtbare Ring aus Leukozyten vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in einen Transfusionsbeutel gefüllt. Der Rest des Blutes wurde mit Natriumchloridlösung wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt, in Spritzen aufgezogen und dem Spenderhund über einen Venenkatheter an der Vena cephalica antebrachii zurückgegeben, bevor erneut 200 ml Blut aus der Vena jugularis entnommen wurden. Je nach Konstitution des Tieres wurden insgesamt vier Leukaphereseläufe durchgeführt.

Die Zellzahl der gesammelten Leukozyten wurde bestimmt und mit Hilfe eines gefärbten Blutausstrichs der prozentuale Anteil an mononukleären Zellen errechnet.

Die so gewonnene DLT wurde dem Spendertier langsam transfundiert.

3.2.3 Methoden zur Austestung einer neuen ATG-Charge

3.2.3.1 Bindungstest

Bei diesem Test sollte herausgefunden werden, wie gut das ATG an canine PBMCs bindet. Zur Quantifizierung wurde dabei das Durchflusszytometer verwendet.

Einem gesunden Spendertier wurde Blut entnommen und wie bereits beschrieben die mononukleären Zellen isoliert, in RPMI + 10% FCS aufgenommen und gezählt. Pro Ansatz wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Zu dem zuvor aufgeschüttelten Zellpellet wurden je 50 µl einer zuvor in RPMI angelegten ATG-Verdünnungsreihe (log 2, beginnend bei 1:50) gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das ungebundene ATG wurde in einem Waschschriff mit FACS-Puffer entfernt und die Zellen mit einem gegen Kaninchen gerichteten Sekundärantikörper inkubiert, der FITC als Fluoreszenzmolekül trug. Nach 30minütiger

Inkubation auf Eis folgte ein weiterer Waschschrift und die Zellen wurden zur Analyse im Durchflusszytometer in je 250 µl FACS-Puffer aufgenommen. Als Kontrollen dienten unbehandelte PBMCs, nur mit Sekundärantikörper inkubierte PBMCs und PBMCs, die mit ATG 12/02 (Charge alten ATGs, dass sehr potente T-Zelldepletion mit minimaler Stammzelltoxizität aufweist) statt ATG 10/05 inkubiert wurden.

3.2.3.2 Zytotoxizitätstest

Um herauszufinden ab welcher Konzentration ATG toxisch auf Zellen wirkt, wurden je $1 \cdot 10^6$ PBMCs eines gesunden Hundes mit einer zuvor in RPMI angelegten log₂-Verdünnungsreihe von ATG 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das ungebundene ATG wurde gewaschen und die Zellen in 200 µl RPMI + 25% Kaninchenkomplement aufgenommen. Einer einstündigen Inkubation bei 37°C folgte ein weiterer Waschschrift, bevor die Zellen zur Analyse in je 250 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt wurden. Zur Bestimmung des Anteils an toten Zellen wurden in jedes Röhrchen 10 µl Propidiumjodid gegeben und der Prozentsatz der toten Zellen auf dem Kanal der Fluoreszenz 3 im Durchflusszytometer bestimmt. Als Kontrollen wurden unbehandelte PBMCs, mit Kaninchenkomplement aber ohne ATG behandelte PBMCs und PBMCs, die statt ATG mit KHTG (Kaninchen-anti-Human-Thymozyten-Globulin, ATG-Vorgänger aus den 70er Jahren, wird in der Arbeitsgruppe als Positivkontrolle eingesetzt) inkubiert wurden, mitgeführt.

3.2.3.3 ATG-CFU-Assay

Bei diesem Test sollte ermittelt werden, ab welcher Konzentration ATG toxisch auf Stammzellen wirkt. Dazu wird deren Wachstumsverhalten in einem CFU-Assay beurteilt.

Aus frisch entnommenem Knochenmark wurden die mononukleären Zellen isoliert, in RPMI aufgenommen, gezählt und auf $2 \cdot 10^6$ /ml eingestellt. In RPMI wurde eine ATG-Verdünnungsreihe mit log 2 angelegt, beginnend bei 1:25. Je 250 µl der Knochenmarkszellsuspension (entsprechend 500.000 Zellen) wurden in 15 ml-Falconröhrchen überführt und mit je 250 µl der einzelnen ATG-Verdünnungen gemischt.

Damit war die Endkonzentration von ATG im Zellgemisch eine log 2-Verdünnungsreihe beginnend bei 1:50. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde ein Waschschrift angeschlossen und danach zu jeder Probe 250 µl autologes Serum des Knochenmarkspenders gegeben. Nach einer weiteren Inkubationspause von 1 h bei 37°C wurden die Zellen erneut gewaschen und in 200 µl RPMI aufgenommen. Je 100 µl wurden mit 2,5 ml Methylcelluloseagar gemischt und möglichst blasenfrei in 6 Loch-Zellkulturplatten ausplattiert.

Die Auswertung erfolgte nach 10-14 Tagen Inkubation bei 38°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank.

4 Ergebnisse

4.1 T-Zelldepletion mit Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)

ATG, ein aus mit Hundethymozyten immunisierten Kaninchen gewonnener polyklonaler Antikörper, wurde in der Arbeitsgruppe routinemäßig zur T-Zelldepletion bei allogener Stammzelltransplantation verwendet. Da es sich hierbei um einen polyklonalen Antikörper handelt, sind starke Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen zu verzeichnen. Jede Charge muss daher vor ihrem Einsatz ausgetestet werden.

Durch drei autologe Knochenmarktransplantationen sollte herausgefunden werden, ob die ATG-Charge 6/00 das Anwachsen des Transplantats verzögert. Dazu wurde das Knochenmark dreier Hunde mit den ATG-Verdünnungen 1:100, 1:200 und 1:400 inkubiert und anschließend den mit 10 Gy bestrahlten Hunden transplantiert. Der Verlauf der Leukozyten- und Thrombozytenwerte wurde verglichen mit dem mehrerer in früherer Zeit autolog transplantierten Hunde, deren Knochenmark nicht mit ATG behandelt worden war.

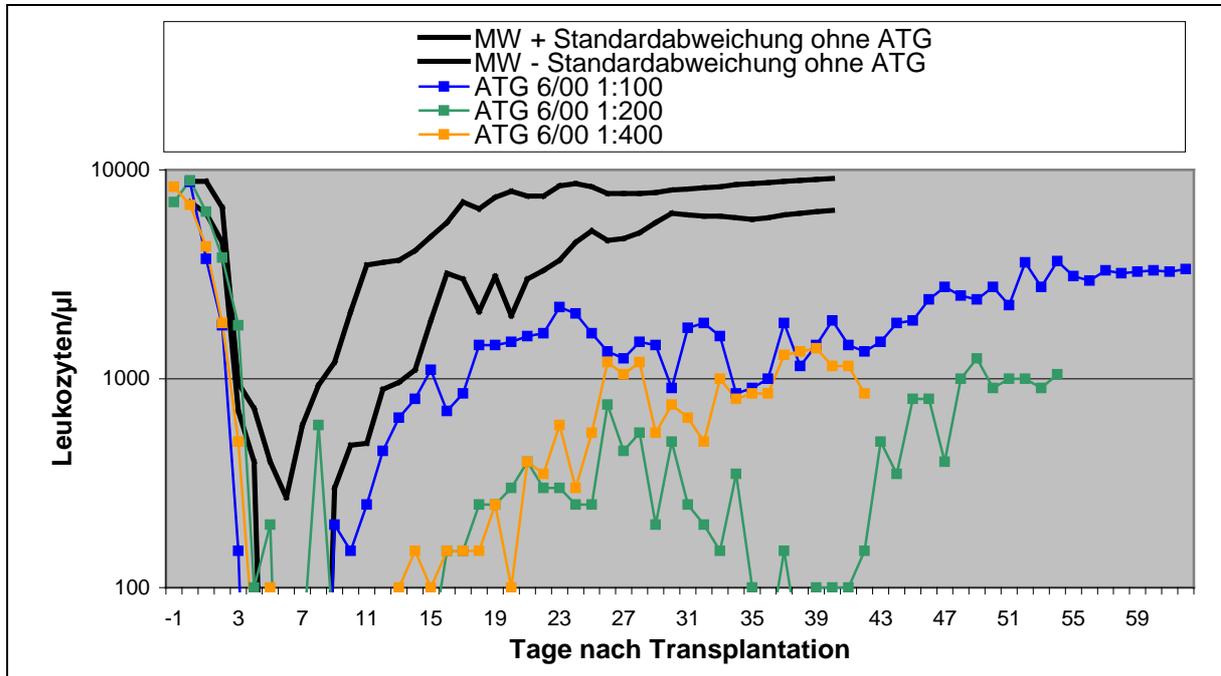


Abbildung 4.1a: Verlauf der Leukozytenwerte nach autologer KMT mit ATG 6/00 in verschiedenen Verdünnungen. Vor der autologen Transplantation wurde das Knochenmark 30 min mit den verschiedenen Verdünnungen an ATG 6/00 inkubiert. Die schwarzen Linien zeigen den Mittelwert (MW) + bzw. - Standardabweichung des Leukozytenverlaufs von ohne ATG autolog transplantierten Hunden.

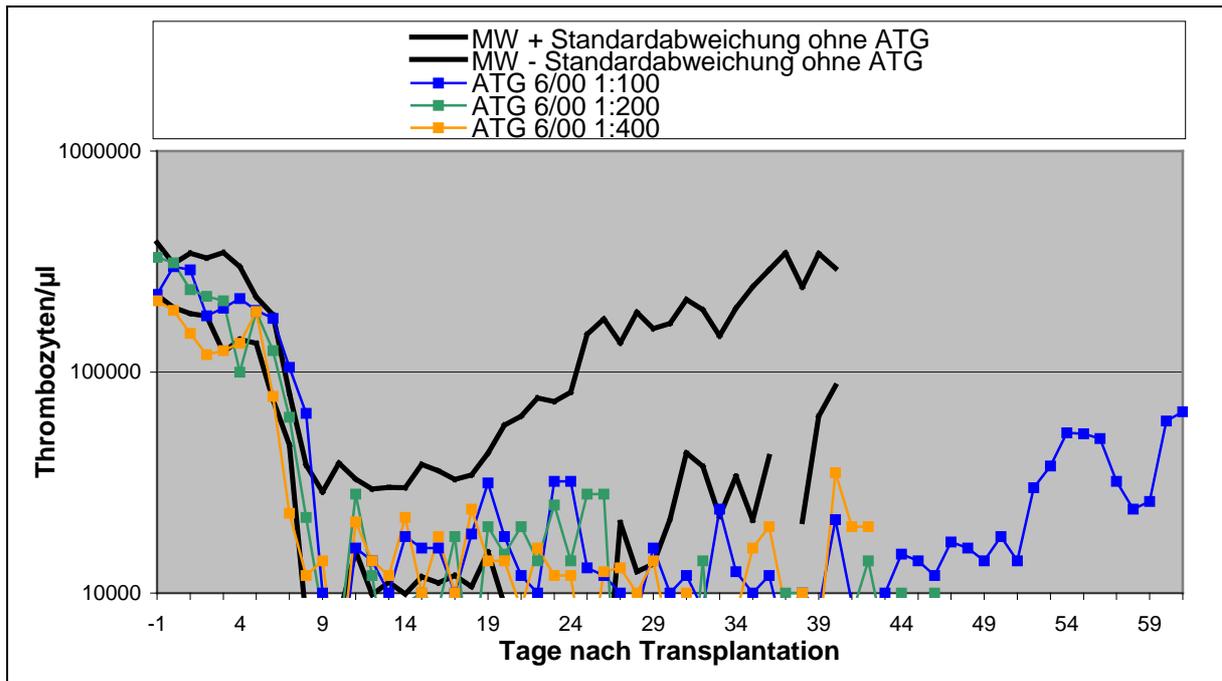


Abbildung 4.1b: Verlauf der Thrombozytenwerte nach autologer KMT mit ATG 6/00 in verschiedenen Verdünnungen. Die schwarzen Linien zeigen den Mittelwert (MW) + bzw. - Standardabweichung des Thrombozytenverlaufs von ohne ATG autolog transplantierten Hunden.

Sowohl die Leukozyten- als auch die Thrombozytenwerte aller drei Hunde stiegen deutlich langsamer an, als die der Vergleichsgruppe ohne ATG, obwohl in allen Experimenten dieselbe Zellzahl ($1,0 \cdot 10^8$ mononukleäre Zellen (MNCs) pro kg Körpergewicht) transplantiert worden war (s. Abb. 4.1a und b). Die Hündin, deren Knochenmark mit einer ATG-Verdünnung von 1:200 vorinkubiert wurde, bekam kein stabiles Engraftment und musste an Tag 72 nach der Transplantation euthanasiert werden.

Die Ergebnisse dieser drei autologen Knochenmarkstransplantationen führten zu der Entscheidung, eine neue Charge ATG herzustellen, da die Charge 6/00 nicht zufrieden stellend einsetzbar war.

4.1.1 In vitro-Austestung von ATG 10/05

In Zusammenarbeit mit der Firma Fresenius wurde eine neue Charge ATG (ATG 10/05) durch Immunisierung von Kaninchen mit Hundethymozyten und anschließender Aufreinigung des Antikörpers aus dem Serum der Kaninchen hergestellt und zunächst in vitro ausgetestet.

Um die geeignete Konzentration zur Anwendung im Hundemodell herauszufinden, mussten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie gut bindet ATG an canine T-Zellen?
2. In welcher Konzentration kann ATG canine T-Zellen ausreichend depletieren?
3. Ab welcher Konzentration wirkt ATG toxisch auf hämatopoetische Stammzellen?

Durch diese in vitro-Tests sollte herausgefunden werden, in welcher Konzentration ATG eingesetzt werden muss, um eine bestmögliche T-Zelldepletion zu gewährleisten, ohne jedoch die Vitalität der hämatopoetischen Stammzellen zu beeinträchtigen.

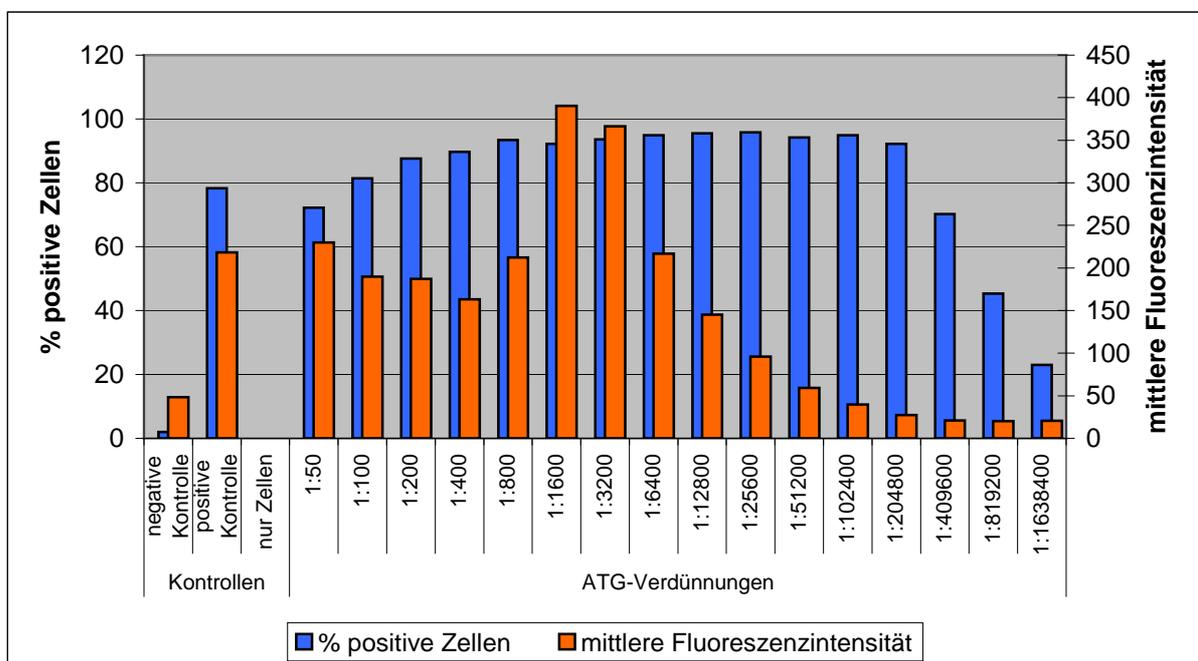


Abbildung 4.1.1a: Bindungstest von ATG 10/05 an PBMCs. Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe von ATG wurden PBMCs für 30 min auf Eis mit den unterschiedlichen ATG-Verdünnungen inkubiert. Die Detektion des gebundenen ATGs auf der Oberfläche erfolgte durch einen FITC-markierten Sekundärantikörper gegen Kaninchenglobulin. Die Auswertung des Prozentsatzes an positiv markierten Zellen sowie der mittleren Fluoreszenzintensität erfolgte im Durchflusszytometer.

Für den Bindungstest wurden PBMCs eines gesunden Spenders mit ATG in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und die positiv markierten Zellen mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper abgegriffen (Abb. 4.1.1a). Bis zu einer Verdünnung von 1:204.800 blieben über 90% der Zellen positiv markiert, jedoch muss zur Beurteilung der biologischen Aktivität der Zellen die mittlere Fluoreszenzintensität herangezogen werden. Die Analyse im Durchflusszytometer zeigte, dass die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen bei einer Verdünnung von 1:1.600 ihr Maximum erreicht und danach wieder abnimmt (Abb. 4.1.1a).

Zur Analyse der zytotoxischen Eigenschaften von ATG wurden PBMCs eines gesunden Spenders nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an ATG mit Kaninchenkomplement inkubiert. Der Prozentsatz an toten Zellen wurde im Durchflusszytometer nach Zugabe von Propidiumjodid, welches nur tote Zellen anfärbt, bestimmt (Abb. 4.1.1b). Wie zu erwarten nahm der Anteil an toten Zellen mit steigender Verdünnung des ATGs kontinuierlich ab.

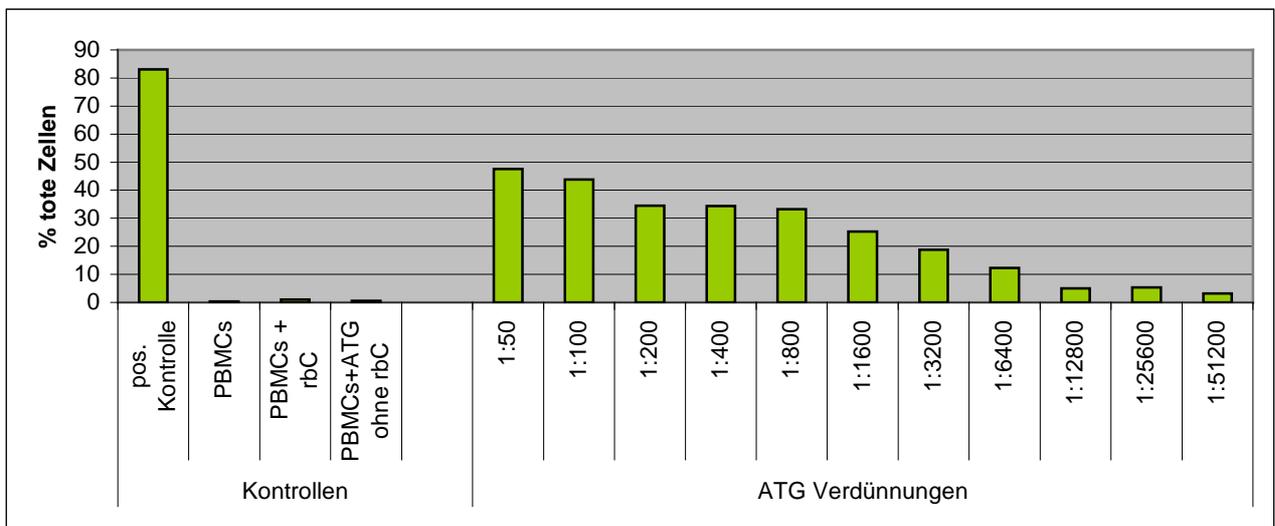


Abbildung 4.1.1b: Zytotoxizitätstest von ATG 10/05 auf PBMCs. PBMCs eines gesunden Spendertieres wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen an ATG für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von Kaninchenkomplement für 1 h wurde der Prozentsatz an toten Zellen durch eine Färbung mit Propidiumjodid im Durchflusszytometer bestimmt. rbC (engl. Rabbit Complement) = Kaninchenkomplement.

Im CFU-Assay konnte gezeigt werden, dass bei einer ATG-Konzentration von 1:600 ein maximales Wachstum der Kolonien auftrat, das dem der nativen Kontrolle entsprach (Abb. 4.1.1c).

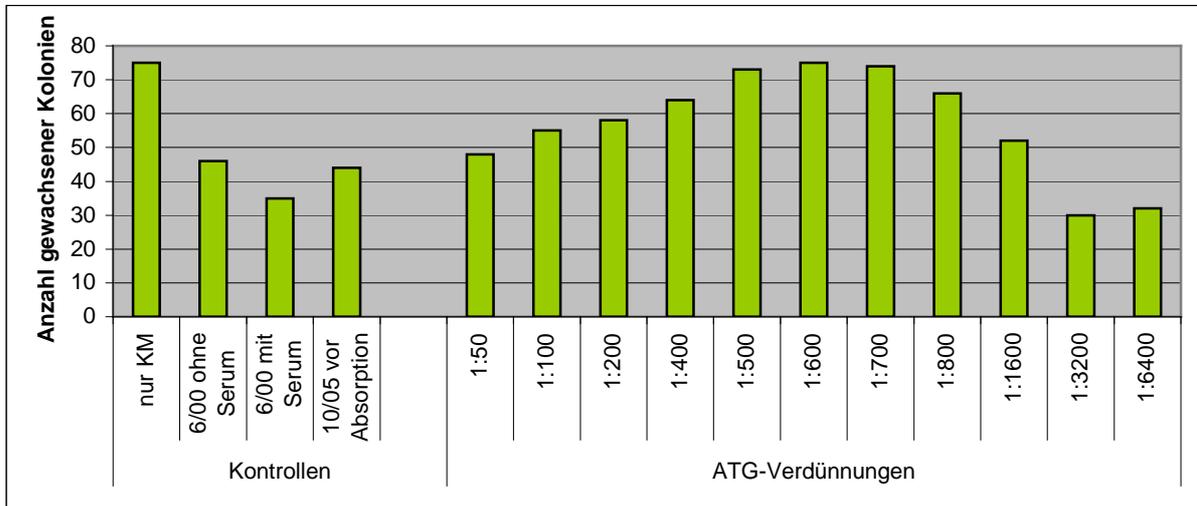


Abbildung 4.1.1c: CFU-Assay mit ATG 10/05. Mit ATG 10/05 vorinkubierte KM-Zellen wurden mit autologem Serum des KM-Spenderhundes behandelt und in einem CFU-Assay ausgesät. Nach 14 Tagen wurde im Mikroskop die Anzahl an gewachsenen Kolonien bestimmt.

Aus unbekanntem Gründen nahm die Anzahl der gewachsenen Kolonien im CFU-Assay mit höherer ATG-Verdünnung wieder ab.

Die in vitro-Experimente zeigten, dass die ATG-Charge 10/05 im Bereich einer Verdünnung von 1:100-1:1.600 die gewünschte Wirkung, nämlich eine gute zytotoxische Wirkung bei gleichzeitig unverminderter Wachstumsfähigkeit der hämatopoetischen Stammzellen aufweist.

4.1.2 In vivo-Austestung von ATG 10/05

Die beschriebenen in vitro-Experimente geben zwar eine ungefähre Auskunft darüber, wie die jeweiligen ATG-Chargen einzusetzen sind, jedoch erlauben diese in vitro-Tests keine verlässliche Aussage zur Wirkung im in vivo-System. Daher ist es unerlässlich, vor Anwendung im allogenen Transplantationssystem die Aktivität des ATGs im autologen Transplantationssystem zu überprüfen.

Zwei Hunden wurde einige Wochen vor Beginn des Experiments Knochenmark entnommen und im Verhältnis 1:100 bzw. 1:400 mit ATG für 30 min inkubiert, bevor es

dann wie oben beschrieben mit Einfriermedium versetzt und in einer Einfriermaschine auf -100°C heruntergekühlt wurde. Bis zur Verwendung wurde das Knochenmark in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Hunde erhielten 24 h vor der Transplantation eine Ganzkörperbestrahlung mit 10 Gy. Am folgenden Tag wurde das kryokonservierte Knochenmark möglichst schonend aufgetaut, die Zahl der lebenden Zellen bestimmt und den Hunden je $1,0 \cdot 10^8$ MNC/kg Körpergewicht langsam transfundiert. Die in den Knochenmarkpräparaten enthaltene Gefrierschutzlösung bereitete den Hunden keine Probleme. Wurden Volumina von mehr als 250 ml transfundiert, erhielten die Hunde Furosemid und zusätzliche Infusionen mit Ringer-Lactat-Lösung, um das DMSO möglichst schnell wieder aus dem Körper zu entfernen. Nach der Transplantation wurden die Hunde nach dem üblichen Schema behandelt. Bei Bedarf wurden Thrombozytenkonzentrate bzw. Transfusionen mit Vollblut verabreicht und die Hunde wurden in der Phase der starken Leukopenie prophylaktisch mit Antibiotika behandelt. Beide Hunde, die ATG 10/05 zur T-Zelldepletion erhielten, hatten ein verspätetes Engraftment. Ein Leukozytenanstieg über $500/\mu\text{l}$ fand bei Hund 746, dessen Knochenmark mit einer ATG-Verdünnung von 1:400 inkubiert worden war, erst an Tag 38 statt. Hund 743, dessen Knochenmark mit einer ATG-Verdünnung von 1:100 inkubiert worden war, hatte erst ab Tag 48 wieder Leukozytenwerte, die stabil über $500/\mu\text{l}$ lagen (Abb. 4.1.2a).

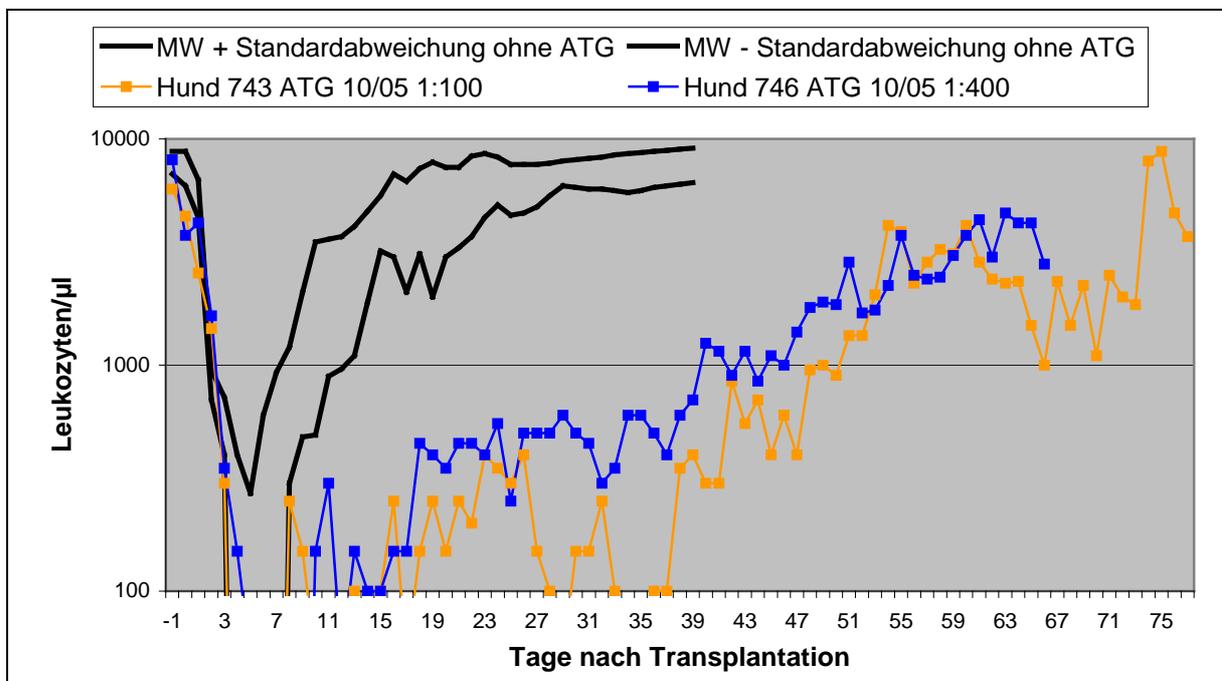


Abbildung 4.1.2a: Verlauf der Leukozytenwerte nach autologer Transplantation von Hund 743 bzw. 746 mit ATG 10/05 in den Konzentrationen 1:100 bzw. 1:400. Die schwarzen Linien zeigen den Mittelwert (MW) + bzw. - Standardabweichung des Leukozytenverlaufs nach autologer KMT ohne ATG.

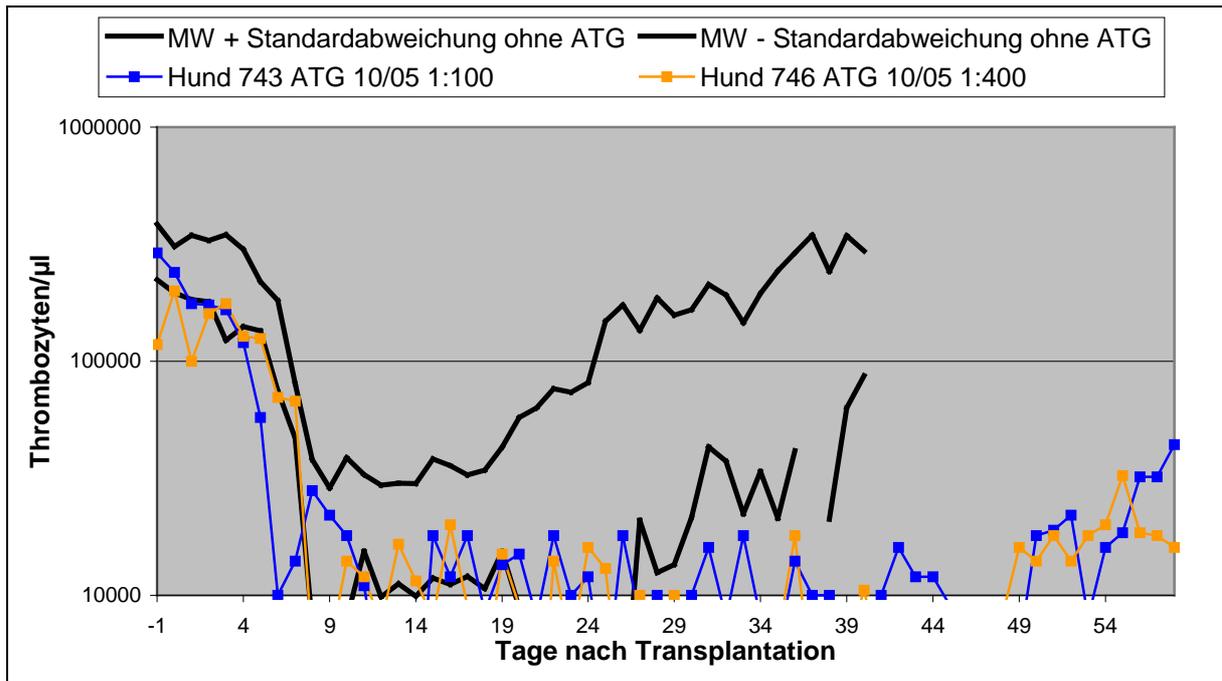


Abbildung 4.1.2b: Verlauf der Thrombozytenwerte nach autologer Transplantation von Hund 743 bzw. 746 mit ATG 10/05 in den Konzentrationen 1:100 bzw. 1:400. Die schwarzen Linien zeigen den Mittelwert des Thrombozytenverlaufs nach autologer KMT ohne ATG + bzw. – Standardabweichung.

Der Verlauf von Leukozyten- und Thrombozytenwerten war bei beiden Hunden schlechter als derjenige der Vergleichsgruppe autolog transplantierte Hunde, die kein ATG erhielten. Bei beiden Hunden wuchs das Transplantat deutlich verspätet an und beide Hunde benötigten mehr als 10 Thrombozyten- und Vollbluttransfusionen, um die lange Phase der Thrombozytopenie zu überbrücken (Abb. 4.1.2b).

Um eine Aussage über die Wirksamkeit dieser ATG-Charge für die Prävention einer GvHD treffen zu können, wurde eine allogene Knochenmarktransplantation im DLA-identischen Transplantationssystem durchgeführt. Dazu wurde das Knochenmark mit einer ATG-Konzentration von 1:800 vorinkubiert und anschließend eine Zellzahl von $2,4 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht transplantiert. Trotz dieser hohen Zellzahl wuchs das Transplantat bei der Hündin nicht an und sie musste am Tag 36 in totaler Aplasie euthanasiert werden (Daten nicht gezeigt).

Nach dieser Transplantation war klar, dass auch die ATG-Charge 10/05 nicht die für eine Transplantation erforderlichen Eigenschaften besitzt. Es bestand also die Notwendigkeit, eine kostengünstige und leicht durchführbare Alternative für die routinemäßige T-Zelldepletion bei der Knochenmarktransplantation zu finden.

Dazu sollten die monoklonalen T-Zellantikörper CA17 (bindet an canines CD3) und MT-606 (bindet an canines CD6) auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, die

Komplementkaskade zu aktivieren und dadurch eine selektive Depletion der positiv markierten Zellen zu ermöglichen.

4.2 Titration des Antikörpers MT-606

Um herauszufinden, in welcher Konzentration der monoklonale Antikörper MT-606 in zukünftigen Versuchen einzusetzen war, wurde eine Titrationsreihe angelegt und PBMCs eines gesunden Hundes mit unterschiedlichen Konzentrationen an MT-606 inkubiert.

Zur Analyse der Bindungskapazität des Antikörpers wurden die mit MT-606 vormarkierten Zellen nach einem Waschschrift mit einem FITC-markierten Ziege-anti-Maus Antikörper gefärbt und konnten durchflusszytometrisch analysiert und ausgewertet werden.

Der Antikörper wies dabei eine sehr gute Markierung der Zellen mit deutlicher Trennung zwischen positiv und negativ markierter Fraktion auf (Abb. 4.2).

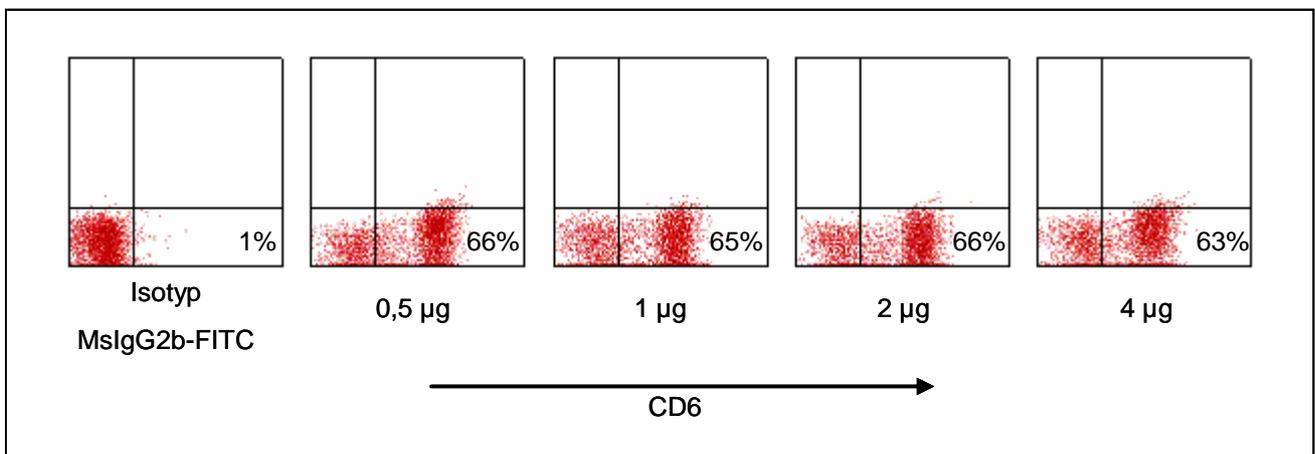


Abbildung 4.2: Titration des mAK MT-606. Der Antikörper wurde in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, um PBMCs zu markieren. Die Analyse mit Hilfe eines FITC-markierten sekundären Antikörpers erfolgte im Durchflusszytometer auf dem Kanal der Fluoreszenz 1.

Zwischen den einzelnen eingesetzten Konzentrationen war kein merklicher Unterschied zu verzeichnen. Es fiel auf, dass in jedem Fall eine Aufteilung der CD6-positiven Fraktion in eine stark und eine schwach positive Fraktion gemessen werden konnte.

Für weitere Experimente wurden Konzentrationen von 0,5 µg MT-606 pro $1 \cdot 10^6$ Zellen eingesetzt, da keine Notwendigkeit bestand, den Antikörper stärker konzentriert einzusetzen.

4.3 T-Zelldepletion mit monoklonalem Antikörper und Kaninchenkomplement

Die beiden monoklonalen unmarkierten Antikörper MT-606 und CA17 wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Komplementkaskade zu aktivieren, was zu einer Lyse der positiv markierten Zellen führt.

Als Komplementquelle wurde Kaninchenkomplement verwendet, das in unserem Labor routinemäßig für Zytotoxizitätsassays eingesetzt wird. Das Kaninchenkomplement wurde für diesen Zweck austitriert und in einer Konzentration von 25 Volumenprozent zur Lyse der Zellen eingesetzt. Da nicht bekannt war, ob MT-606 oder CA17 komplementaktivierende Eigenschaften besitzen, wurde zunächst an der Konzentration des eingesetzten Kaninchenkomplements nichts verändert, sondern das Protokoll aus den Zytotoxizitätsstudien übernommen.

PBMCs von gesunden Hunden wurden zunächst mit der vorher ermittelten idealen Menge (Daten zur Titration des Antikörpers CA17 nicht gezeigt, für MT-606 s. 4.2) an Antikörper inkubiert und nach einem Waschschrift, der ungebundenen Antikörper entfernt, in Medium resuspendiert und mit 25% Kaninchenkomplement versetzt. Nach einstündiger Inkubationszeit im Schüttelwasserbad wurde die verbleibende Zellzahl bestimmt und eine Analyse der Depletionseffizienz im Durchflusszytometer durchgeführt.

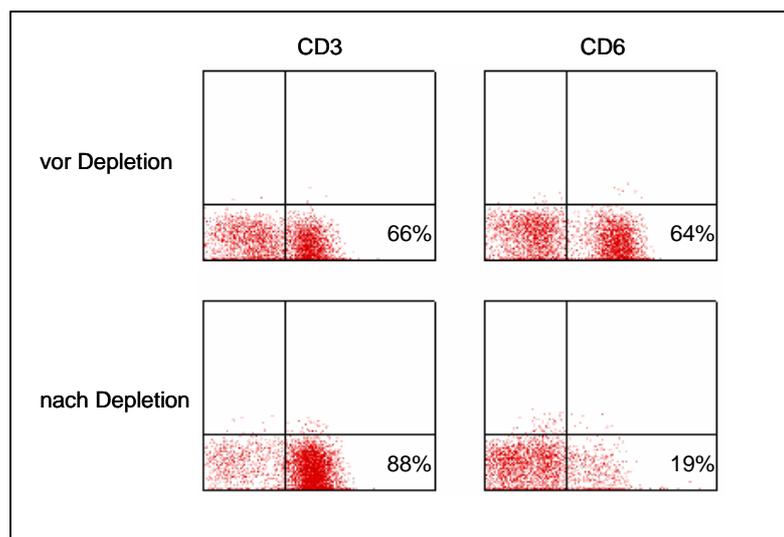


Abbildung 4.3a: Depletion von PBMCs mit monoklonalen Antikörpern und rbC. PBMCs eines Hundes wurden zunächst mit den monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen CD3 bzw. CD6 inkubiert und danach durch Zugabe von 25% rbC die Kapazität einer Depletion der Positivfraktion untersucht. Die Auswertung erfolgte im Durchflusszytometer. Gezeigt ist das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse vor und nach der Depletion.

Der CD3-Antikörper CA17 besaß nicht die Fähigkeit, die Komplementkaskade zu aktivieren. Der Prozentsatz an CD3-positiv gefärbten Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse wurde nicht weniger (Abb. 4.3a).

Der CD6-Antikörper MT-606 zeigte ein besseres Potential zur Aktivierung der Komplementkaskade. Hier konnte der Anteil an CD6-positiven Zellen um 93,3% reduziert werden, was auch aus Abb. 4.3a durch eine deutliche Reduktion der CD6-positiven Zellfraktion ersichtlich ist.

Die Ergebnisse dieses ersten Depletionsversuchs mit MT-606 und Kaninchenkomplement erschienen viel versprechend und wurden in Folgeversuchen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Allerdings war der unspezifische Zellverlust der Kontrollgruppe nach Inkubation mit 25% Kaninchenkomplement ohne mAK (monoklonalen Antikörper) immer relativ hoch und lag zwischen 50% und 60%. Dies war zurückzuführen auf eine zelltoxische Wirkung des Kaninchenkomplements in hohen Konzentrationen. Um diese zu minimieren und gleichzeitig die Depletion von positiv markierten Zellen maximal zu halten, wurde das verwendete Kaninchenkomplement im nächsten Schritt austitriert.

Es wurden Konzentrationen von 10%-25% eingesetzt und zur Optimierung der T-Zelldepletion in einem Parallelansatz die Inkubationszeit mit Kaninchenkomplement auf 2 · 1 h ausgedehnt. Da die endgültige Anwendung dieser Methode für die Stammzelltransplantation geplant war, wurden die folgenden Versuche mit Knochenmarkzellen statt PBMCs durchgeführt.

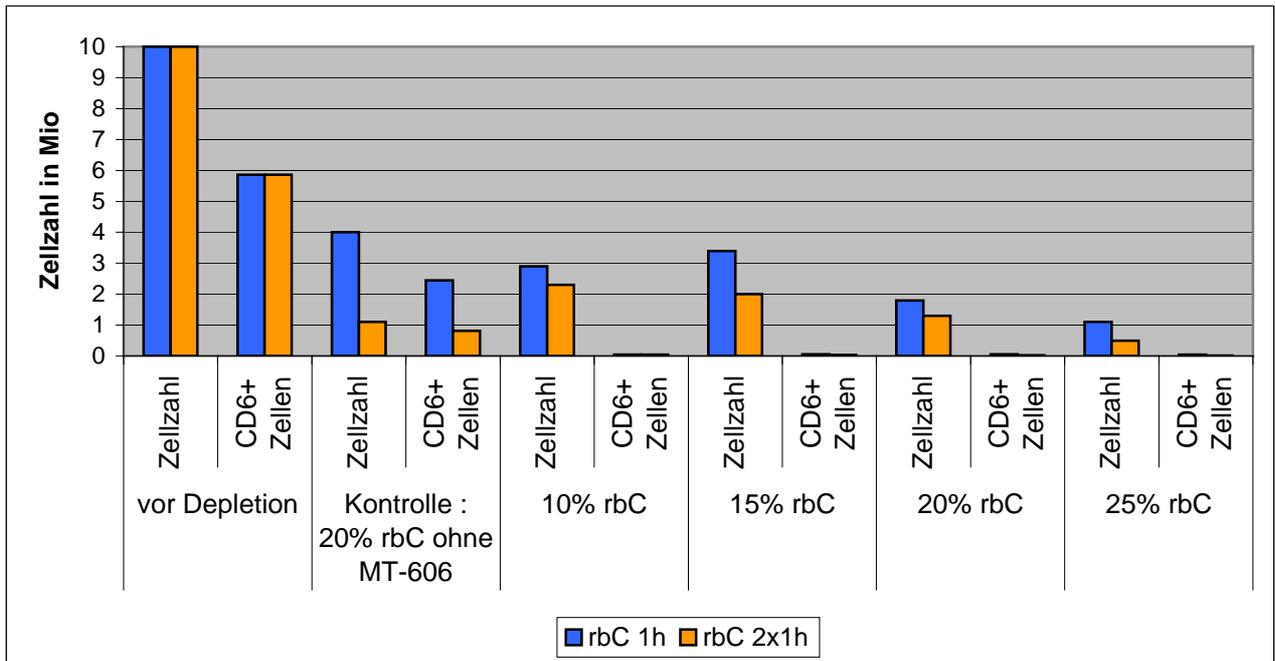


Abbildung 4.3b: Depletion von KM mit MT-606 und unterschiedlichen Konzentrationen an rbC. KM-Zellen wurden mit MT-606 und unterschiedlichen Konzentrationen an rbC inkubiert, um herauszufinden, bei welcher Konzentration an rbC eine maximale Depletion stattfindet. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer.

Wie aus Abbildung 4.3b ersichtlich, erfolgte bereits nach einer einzigen einstündigen Inkubation mit Kaninchenkomplement eine fast vollständige Depletion der CD6-positiven Zellen. Mit einer Konzentration von 15% Kaninchenkomplement war die CD6-Depletion vollständig und der unspezifische Zellverlust minimal.

Um zu klären, ob das Kaninchenkomplement stammzelltoxisch wirkt, wurde im selben Experiment von jeder Knochenmarksprobe vor und nach Inkubation mit mAK und rbC ein CFU-Assay angesetzt.

Probe	CFU-M	CFU-E	BFU-E	CFU-G	CFU-GM	CFU-GEMM	Anzahl gesamt
vorher	8	3	-	10	2	1	24
10% rbC	22	39	8	47	12	7	135
15% rbC	36	39	8	41	8	6	138
20% rbC	34	28	2	53	16	6	138
25% rbC	35	19	4	57	8	1	124

Tabelle 4.3c: CFU-Assay von mit unterschiedlichen Konzentrationen an rbC CD6-depletiertem KM. Je 250.000 Zellen CD6-depletierts KM wurden in einem CFU-Assay analysiert, um herauszufinden, bei welcher Konzentration von rbC eine maximale CD6-Depletion bei gleichzeitig minimaler Stammzelltoxizität stattfindet.

Die T-Zelldepletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement wirkte sich nicht auf die Viabilität der Stammzellen aus. Pro Loch wurden 250.000 mononukleäre Zellen ausgesät. Da das undepletierte Knochenmark noch alle T-Zellen enthält, wurde relativ gesehen eine geringere Anzahl an Stammzellen eingesetzt als bei den depletierten Knochenmarkszellen. Dies erklärt die deutlich erhöhte Anzahl an gewachsenen Kolonien bei den depletierten Proben. Das Verteilungsmuster der verschiedenen Kolonien hat sich jedoch nicht verändert (Tab. 4.3c).

Um zu analysieren, welche Art von T-Zellen bei der CD6-Depletion vorwiegend depletiert werden, wurde eine durchflusszytometrische Analyse mit CD3-, CD4- und CD8-Antikörpern jeweils in Doppelfärbung mit CD6 gemacht (Abb. 4.3d).

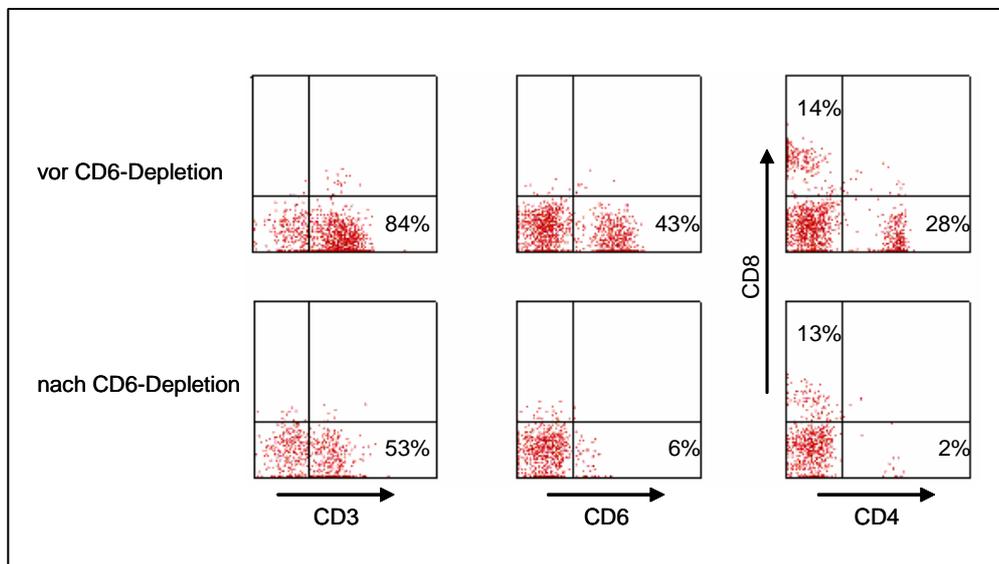


Abbildung 4.3d: Analyse der unterschiedlichen Zellfraktionen nach Depletion von KM mit MT-606 und rbC – Darstellung im Dotplot. CD6-depletierte KM-Zellen wurden mit AK gegen CD3, CD4, CD6 und CD8 markiert und im Durchflusszytometer analysiert.

Die CD6+ Fraktion verschwand zu ca. 98%. Es fiel auf, dass die CD4+ Fraktion im Gegensatz zur CD8+ Fraktion ebenfalls um annähernd 100% reduziert wurde, was bedeutet, dass eine CD6-Depletion vor allem die CD4+ Zellen eliminiert, wohin gegen die CD8+ Zellen nur teilweise depletiert werden. Da die CD3+ Zellen ähnlich wie beim Menschen auch beim Hund zu ca. zwei Dritteln aus CD4+ und zu einem Drittel aus CD8+ Zellen bestehen, wird auch die CD3+ Fraktion nur teilweise depletiert. Diese Beobachtung wurde bei allen nachfolgenden Versuchen bestätigt.

4.4 T-Zelldepletion mit monoklonalem Antikörper und Meerschweinchenkomplement

Als alternative Komplementquelle wurde neben Kaninchenkomplement auch Meerschweinchenkomplement (MsC) ausgetestet. Es sollte hierbei neben einer generellen Anwendbarkeit von Meerschweinchenkomplement zur T-Zelldepletion untersucht werden, ob das Meerschweinchenkomplement eine T-Zelldepletion mit geringerem unspezifischem Zellverlust gewährleistet. Wie bei den ersten Versuchen mit Kaninchenkomplement wurde die initiale Austestung an PBMCs durchgeführt, da diese mit geringerem Aufwand gewonnen werden können als Knochenmarkzellen und das Spendertier nur minimal beeinträchtigt wird. Da aus Erfahrungen im Labor bereits bekannt war, dass Meerschweinchenkomplement eine geringere zytotoxische Wirkung als Kaninchenkomplement aufweist, wurden Verdünnungen zwischen 25% und 100% ausgetestet.

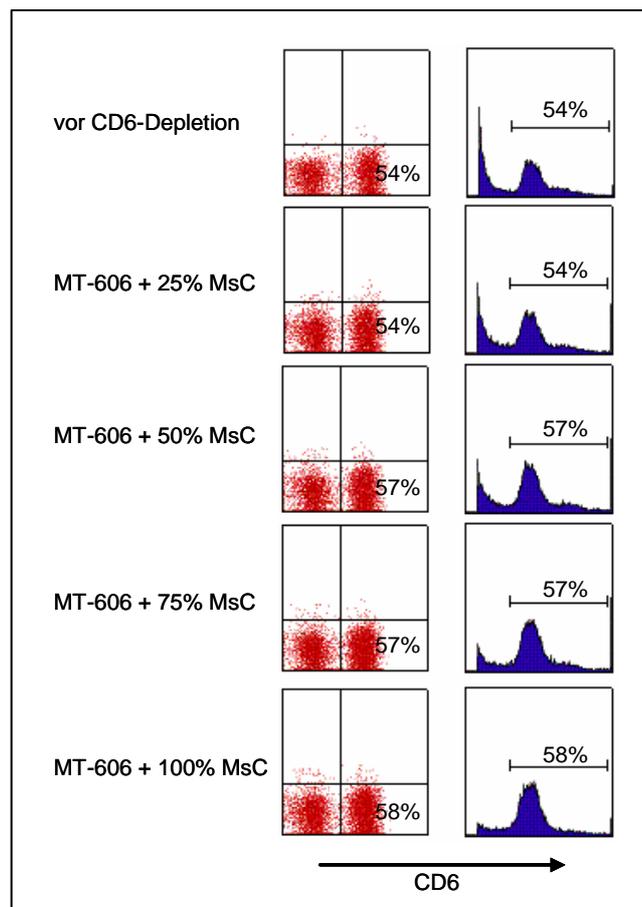


Abbildung 4.4: Depletion von PBMCs mit MT-606 und MsC – durchflusszytometrische Analyse. PBMCs wurden mit MT-606 und MsC in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert und die Potenz einer CD6-Depletion im Durchflusszytometer analysiert. MT-606 wurde im Kanal der Fluoreszenz 1 (FL1) gemessen. Linke Reihe: Dotplots FL1-FL2, rechte Reihe: Histogramme der FL1.

Schon die qualitative Analyse im Durchflusszytometer zeigte, dass die mit MT-606 positiv markierte Zellpopulation in keinem Fall abnahm (Abb. 4.4). Dieses Ergebnis wurde in der quantitativen Auswertung bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Anders als Kaninchenkomplement führt das Meerschweinchenkomplement selbst unverdünnt nicht zu einer zufrieden stellenden T-Zelldepletion in Verbindung mit MT-606 und wurde in den folgenden Versuchen nicht mehr eingesetzt.

Die mit MT-606 und Kaninchenkomplement durchgeführte T-Zelldepletion zeigte in vitro viel versprechende Ergebnisse. Es sollte nun die Potenz dieser T-Zell-Depletionsmethode zur Verhinderung einer GvHD bei der allogenen Knochenmarktransplantation getestet werden.

4.5 Allogene Knochenmarktransplantation von DLA-homozygoten Spendern und DLA-heterozygoten Empfängern

4.5.1 Transplantation Hund 735 → Hund 733

Die erste Transplantation von mit MT-606 und Kaninchenkomplement depletiertem Knochenmark erfolgte im homo-hetero-System. Das bedeutet, dass der Spender homozygot für DLA ist, wohin gegen der Empfänger einen heterozygoten DLA-Locus besitzt und einen Haplotyp mit dem Spender gemeinsam hat (Abb. 4.5.1a). In der MLC dieser beiden Hunde zeigte sich eine Reaktion in nur eine Richtung, nämlich vom für DLA homozygoten zum heterozygoten Hund. Das homo-hetero-System ist somit ein starkes GvHD-System, in dem nun getestet werden sollte, ob die Depletion von CD6-positiven Zellen mit Hilfe von MT-606 und Kaninchenkomplement ausreicht, um eine GvHD zu verhindern.

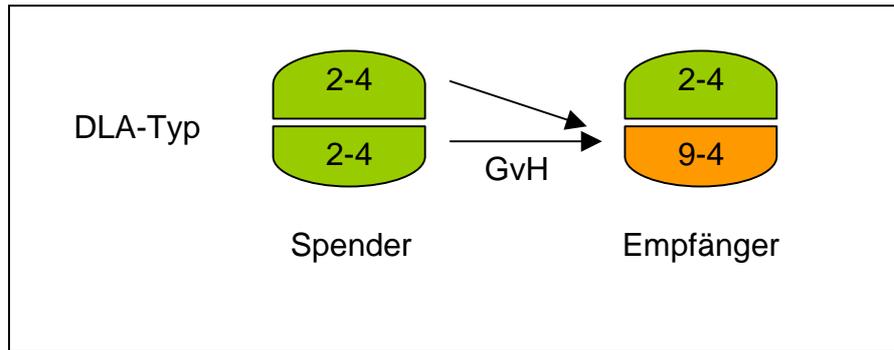


Abbildung 4.5.1a: DLA-Typen von Spender und Empfänger. Angegeben sind jeweils die parentalen Haplotypen für DLA-A und DLA-B. Bei diesem Transplantationssystem, bei dem der Spender homozygot, der Empfänger jedoch heterozygot für DLA ist, ist eine starke Reaktion in der GvH-Richtung bei einer minimalen Reaktion in der HvG (Host-versus-Graft)-Richtung zu erwarten.

Dem Spenderrüden wurden in Vollnarkose insgesamt 345 ml Knochenmark entnommen und daraus wie beschrieben die mononukleären Zellen isoliert, insgesamt $3,1 \cdot 10^9$. Nach der CD6-Depletion verblieben $2,4 \cdot 10^9$ MNCs, woraus sich eine Zelldosis von $1,8 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht zur Transplantation errechnete.

Die durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkzellen vor und nach der Depletion ergab folgendes Bild:

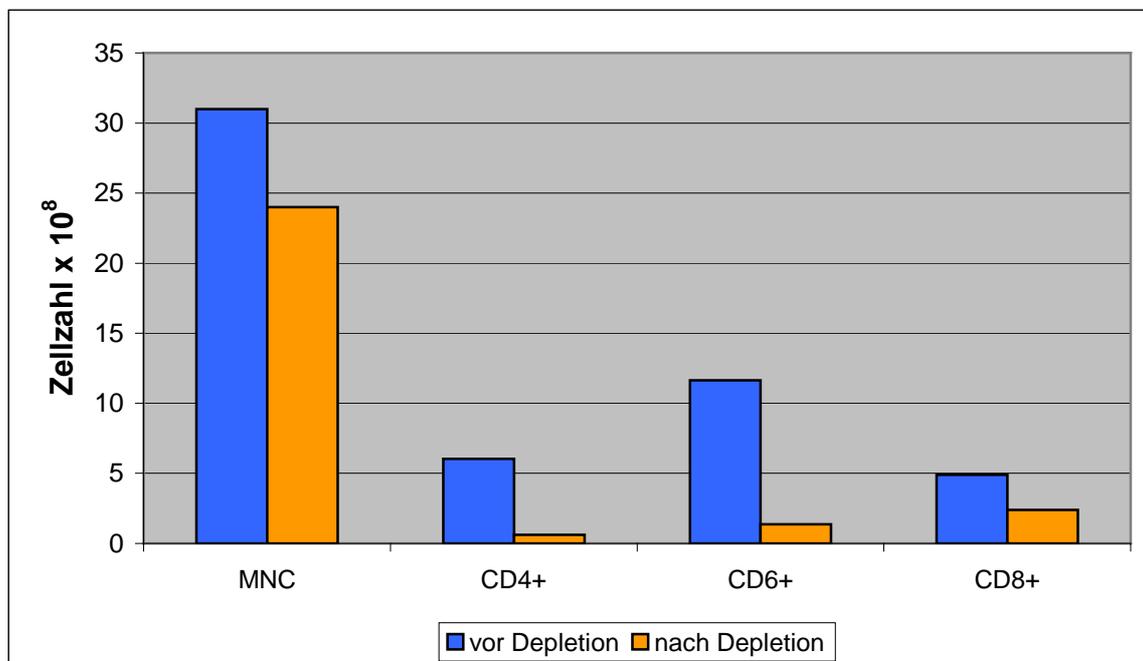


Abbildung 4.5.1b: Analyse von KM von Hund 735 vor und nach Depletion mit MT-606 und rbC. Vom entnommenen KM wurden vor und nach der Depletion Proben für die durchflusszytometrische Analyse entnommen. Die Markierung mit mAKs gegen CD4, CD6 und CD8 erlaubte im Durchflusszytometer eine Messung des prozentualen Anteils an positiv markierten Zellen. Die quantitative Auswertung erfolgte unter Einbeziehung der Gesamtzellzahlen.

Eine nahezu vollständige Depletion von CD6-positiven Zellen geht einher mit einer starken Depletion der CD4-positiven Zellen, wohin gegen die CD8-positiven Zellen nur teilweise depletiert werden (Abb. 4.5.1b). Diese Ergebnisse wurden auch bei nachfolgenden Depletionen immer wieder bestätigt.

Um einen Anhaltspunkt über die Fähigkeit der transplantierten Zellen zur Bildung von Kolonien zu erhalten, wurden CFU-Assays von Zellen vor und nach der Depletion angesetzt. Je 250.000 mononukleäre Zellen wurden dazu in speziellem Methylcelluloseagar ausgesät und nach 14tägiger Inkubation im Brutschrank bei 38°C im Mikroskop ausgewertet.

Dabei zeigte sich, dass CD6-depletiertes Knochenmark mehr CFU-Wachstum aufwies als undepletiertes Knochenmark. Diese Tatsache kann dadurch erklärt werden, dass bei Einsatz von 250.000 Zellen im CFU-Assay in CD6-depletiertem Knochenmark prozentual mehr Stammzellen enthalten sind als in undepletiertem Knochenmark.

Nach der CD6-Depletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement wurden $1,8 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht transplantiert.

Die Leukozytenregeneration bei der Hündin verlief wie folgt:

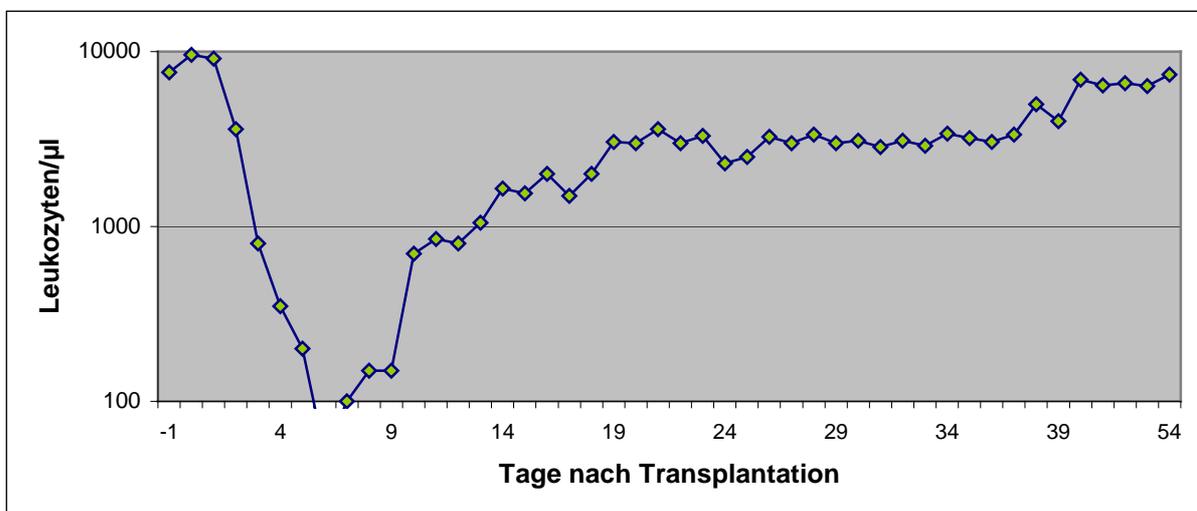


Abbildung 4.5.1c: Leukozytenregeneration von Hund 733 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM. Ab dem Tag der Ganzkörperbestrahlung (Tag -1) wurde der Hündin jeden Tag eine Blutprobe entnommen und die Zahl der Leukozyten bestimmt.

Nach der myeloablativen Ganzkörperbestrahlung mit 10 Gy an Tag -1 fielen die Leukozytenwerte zunächst bis Tag 6 auf ein Minimum von 50/µl ab, bevor dann ab Tag 7 das Transplantat soweit angewachsen war, dass neue funktionstüchtige Leukozyten produziert werden konnten. Ab Tag 40 nach der Transplantation lagen die Werte wieder im Referenzbereich von > 6.000/µl (Abb. 4.5.1c). Das Allgemeinbefinden der Hündin

war während der gesamten Zeit ungestört. Ab Tag 16 hatte die Hündin eine leicht erhöhte Körpertemperatur und bekam daraufhin zweimal täglich das Breitspektrum-Antibiotikum Tazobac® (Piperacillin + Tazobactam, 100 mg/kg) intravenös verabreicht. Es konnten aber im Folgenden weder Anzeichen einer bakteriellen oder viralen Infektion festgestellt werden, noch war das Allgemeinbefinden der Hündin in irgendeiner Art beeinträchtigt, so dass der Temperaturanstieg vermutlich auf das schnelle Anwachsen des Transplantats zurückzuführen war. Nach 10tägiger antibiotischer Versorgung fiel die Temperatur wieder auf Normalniveau und die Antibiose konnte abgesetzt werden.

Der Verlauf der Thrombozytenzahlen nach der Transplantation stellte sich so dar:

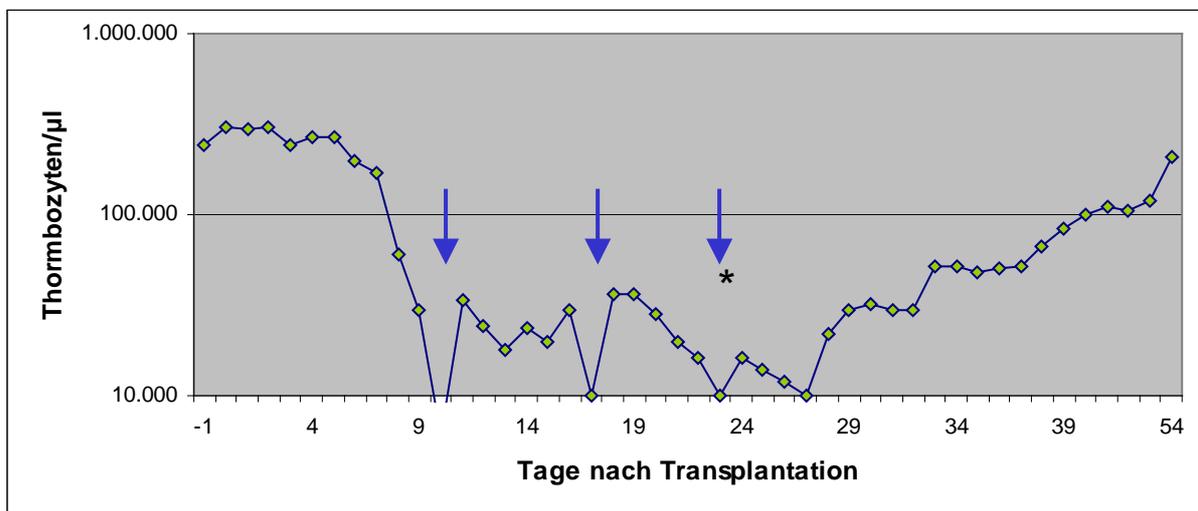


Abbildung 4.5.1d: Thrombozytenregeneration von Hund 733 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM. Nach der Transplantation wurde der Hündin jeden Tag eine Blutprobe entnommen und die Zahl der Thrombozyten bestimmt. War diese kleiner als 10.000/µl, wurde ein Thrombozytenkonzentrat eines DLA-identischen Hundes verabreicht. Die Verabreichung von Thrombozytenkonzentraten ist durch Pfeile gekennzeichnet. Ein * bei dem Pfeil bedeutet, dass an diesem Tag Vollblut transfundiert wurde.

Anders als die Leukozytenzahlen fielen die Thrombozytenzahlen erst bis zum 10. Tag nach der Transplantation auf ein Minimum ab (Abb. 4.5.1d). In der Regel werden den transplantierten Hunden bei Thrombozytenwerten unter 10.000/µl Thrombozytenkonzentrate von DLA-identischen, gesunden Spendertieren verabreicht. Das erste Thrombozytenkonzentrat wird immer vom jeweiligen Knochenmarkspender gewonnen. Die Hündin erhielt Thrombozytenkonzentrate an den Tagen 10 und 17 sowie eine Vollbluttransfusion an Tag 23, da an diesem Tag neben einer geringen Thrombozytenzahl auch der Hämatokrit stark erniedrigt (36%) war. Ab diesem Tag

waren keine weiteren Bluttransfusionen nötig und die Hündin zeigte ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

An den Tagen 20, 50 und 100 nach der Transplantation und danach in jährlichem Abstand wurde wie beschrieben der Grad des Chimärismus in Blut und Knochenmark bestimmt. Bei dieser Hündin lag der Anteil des Spenderchimärismus sowohl im Blut als auch im Knochenmark von Anfang an bei 100%.

Es konnte also festgestellt werden, dass die CD6-Depletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement ausreichte, um selbst in diesem starken GvHD-System die Entstehung einer GvHD zu verhindern und dabei gleichzeitig das Anwachsen des Transplantats nicht zu beeinträchtigen.

Um zu prüfen, ob die Hündin vollständig tolerant gegenüber dem Spenderorganismus geworden war, wurde an Tag 121 nach der Transplantation ein Hautstück des Spenders auf die Empfängerhündin transplantiert. Um dieses auch nach Nachwachsen des abrazierten Fells wieder identifizieren zu können, wurde es vor dem Annähen um 180° gedreht, so dass die Fellwuchsrichtung entgegengesetzt zu derjenigen der Empfängerhündin verläuft. Das Hautstück wurde bis zum Ziehen der Fäden durch einen Verband geschützt, der regelmäßig kontrolliert und gewechselt wurde. Prophylaktisch erhielt die Hündin für 8 Tage zweimal täglich 10 mg/kg Amoxicillin + Clavulansäure (Synulox®-Tabletten). Nach 10 Tagen war das Hautstück gut angewachsen und die Fäden konnten gezogen werden (Abb. 4.5.1e).

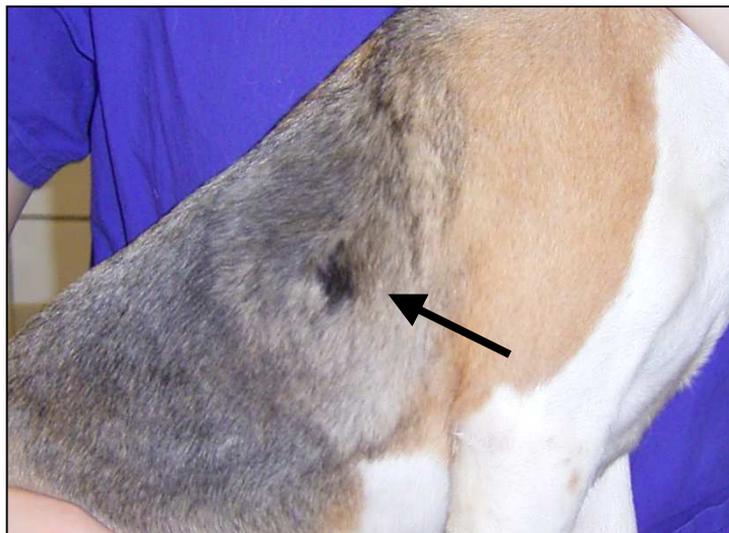


Abbildung 4.5.1e: Zustand nach KMT und anschließender Transplantation eines Hautstücks vom Knochenmarkspender. Um die Toleranz gegenüber Organen des Spenders nach der KMT zu testen, wurde der Hündin an Tag 121 ein Hautstück des Spenders transplantiert (Pfeil). Die Fellwuchsrichtung wurde um 180° gedreht, um ein Wiederauffinden des transplantierten Hautstücks zu erleichtern.

4.5.2 Hund 736 → Hund 739

An Hand einer zweiten Transplantation im homo-hetero-System sollte die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses aus dem ersten Transplantationsversuch mit CD6-depletiertem Knochenmark überprüft werden.

Für diese zweite Transplantation wurden der Spenderhündin in Vollnarkose 350 ml Knochenmark entnommen, aus dem $3,4 \cdot 10^9$ mononukleäre Zellen isoliert wurden. Nach der Depletion verblieben $1,23 \cdot 10^9$ mononukleäre Zellen, was einer Zelldosis von $0,8 \cdot 10^8$ pro kg Körpergewicht des Empfängerrüden entsprach. Diese Zellzahl war deutlich geringer als diejenige, welche bei der ersten Transplantation gewonnen werden konnte.

Die Qualität der transplantierten Zellen wurde durch einen CFU-Assay beurteilt, in dem aus 250.000 eingesetzten Zellen insgesamt 114 Kolonien wuchsen. Trotz ausreichender koloniebildender Fähigkeit der transplantierten Zellen erwies sich jedoch eine Zelldosis von $0,8 \cdot 10^9$ mononukleären Zellen pro kg Körpergewicht als zu gering und das Transplantat konnte nicht anwachsen.

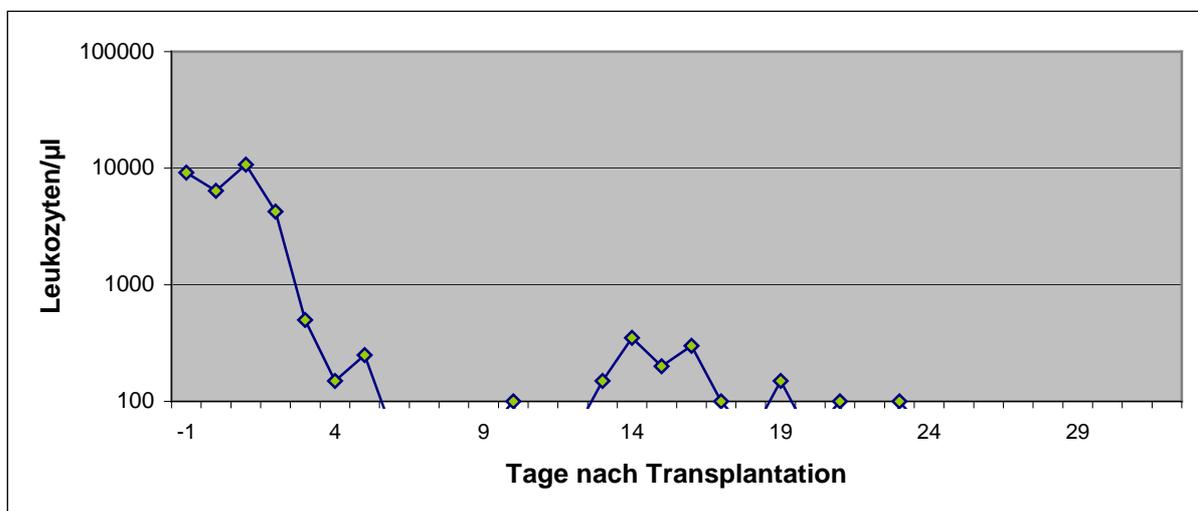


Abbildung 4.5.2a: Leukozytenregeneration von Hund 739 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM. Die geringe Zahl an transplantierten Stammzellen ($0,8 \cdot 10^8$ MNCs/kg) reichte nicht aus, um ein stabiles Anwachsen des Transplantats und eine ausreichende Regeneration der Leukozytenzahlen zu gewährleisten.

Nach dem starken Abfall der Leukozytenzahlen bis Tag 7 erfolgte zwar ab Tag 11 ein leichter Anstieg, doch es kam zu keiner stabilen Erholung der Leukozytenzahlen (Abb. 4.5.2a). Ähnlich verhielt es sich mit den Thrombozytenwerten (Abb. 4.5.2b).

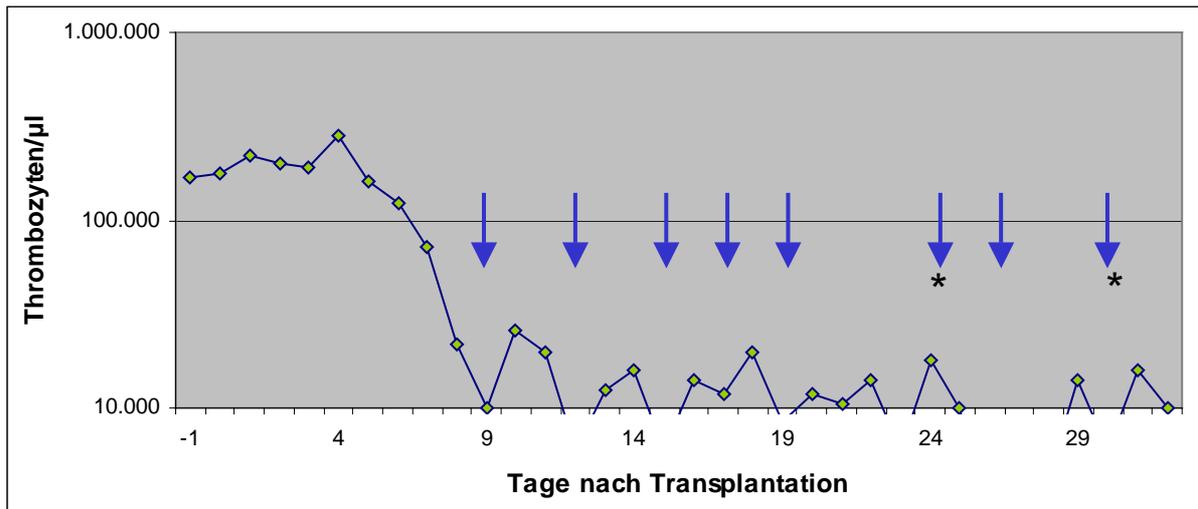


Abbildung 4.5.2b: Thrombozytenregeneration von Hund 739 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM. Trotz wiederholt verabreichter Thrombozytenkonzentrate konnte wegen der geringen Zahl an transplantierten Stammzellen ($0,8 \cdot 10^8$ MNCs/kg) keine Regeneration der Hämatopoese erreicht werden. Die Verabreichung von Thrombozytenkonzentraten ist durch Pfeile gekennzeichnet. Ein * bei dem Pfeil bedeutet, dass an diesem Tag Vollblut transfundiert wurde.

Nach erstmaligem Abfall der Thrombozytenzahlen unter $10.000/\mu\text{l}$ erhielt der Hund zahlreiche Thrombozytenkonzentrate an den Tagen 9, 12, 15, 17, 20, 23 und 28 und außerdem Vollbluttransfusionen an den Tagen 26 und 30, da hier der Hämatokrit auf Werte unter 30% abgefallen war (Abb. 4.5.2b).

Das Allgemeinbefinden des Hundes verschlechterte sich im Lauf der Zeit. Nach Abfall der Leukozytenzahlen trat eine Schwellung von Carpal- und Tarsalgelenk der rechten Seite auf, so dass der Hund eine mittel- bis hochgradige Lahmheit aufwies. Um der Infektion entgegen zu wirken wurde er zweimal täglich mit 100 mg/kg Piperacillin und Tazobactam (Tazobac®) behandelt, was eine anfängliche Besserung der Symptome mit sich brachte. Ab Tag 22 entwickelte der Hund hohes Fieber, stellte die Nahrungsaufnahme fast komplett ein und hatte ein hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden. Die Antibiose wurde daraufhin umgestellt auf 20 mg/kg Meropenem (Meronem®), dem ab Tag 27 zusätzlich noch 20 mg/kg Vancomycin beigemischt wurde. Daraufhin besserte sich das Allgemeinbefinden des Tieres so weit, dass wieder eine eigenständige Nahrungsaufnahme gewährleistet war.

Die andauernde Immuninkompetenz führte ab Tag 26 dazu, dass der Hals an der Stelle der täglichen Blutentnahmen stark anschwell und massive Entzündungszeichen aufwies. Die betroffene Stelle wurde mit Betaisodonasalbe behandelt und mit einem Watteverband geschützt. Ab Tag 29 verschlechterte sich der Zustand des Hundes nochmals deutlich. Nun wurde zusätzlich das Antibiotikum Clindamycin verabreicht. Am Morgen des 33. Tages lag der Hund in Seitenlage und war nicht mehr ansprechbar. Die

klinische Untersuchung ergab neben einem starken Lungenödem ein hochgradig insuffizientes Herz und eine massive Kreislaufdepression. Der Hund wurde daraufhin euthanasiert.

Bei der Sektion fielen vor allem die massiven petechialen Blutungen in der Unterhaut, am Skrotum, in Pleura und Peritoneum sowie in den Nierenkapseln und den Darmschleimhäuten auf, die Zeichen der andauernden Thrombozytopenie waren. Diese konnte auch durch kontinuierliche Verabreichung von Thrombozytenkonzentraten nicht behoben werden.

Es wurde geschlussfolgert, dass für ein stabiles Anwachsen des Transplantats eine deutlich höhere Zellmenge als $0,8 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht nötig sind.

4.5.3 Transplantation Hund 698 → Hund 701

Für die nächste Transplantation im homo-hetero-System wurde der Hündin eine größere Menge an Knochenmark entnommen, um sicher gehen zu können, dass die Zellmenge für ein stabiles Engraftment ausreicht.

Aus 590 ml Knochenmark wurden $4,1 \cdot 10^9$ mononukleäre Zellen isoliert. Nach der Depletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement verblieben $3,75 \cdot 10^9$ Zellen, so dass dem Empfängerrüden $2 \cdot 10^8$ MNCs pro kg Körpergewicht transplantiert werden konnten. Diese hohe Zellzahl ermöglichte einen schnellen Anstieg von Leukozyten (Abb. 4.5.3a) und Thrombozyten (Abb. 4.7b).

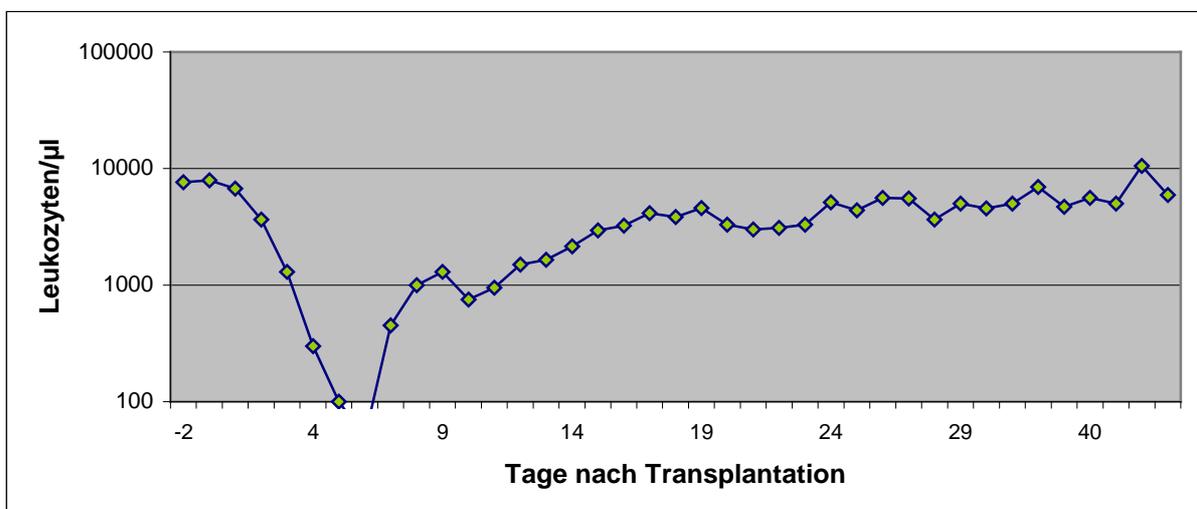


Abbildung 4.5.3a: Leukozytenregeneration von Hund 701 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM. Die hohe transplantierte Zellzahl resultierte in einem sehr schnellen Anwachsen des Transplantats, was durch die schnell wieder ansteigenden Leukozytenzahlen im Blut sichtbar wurde.

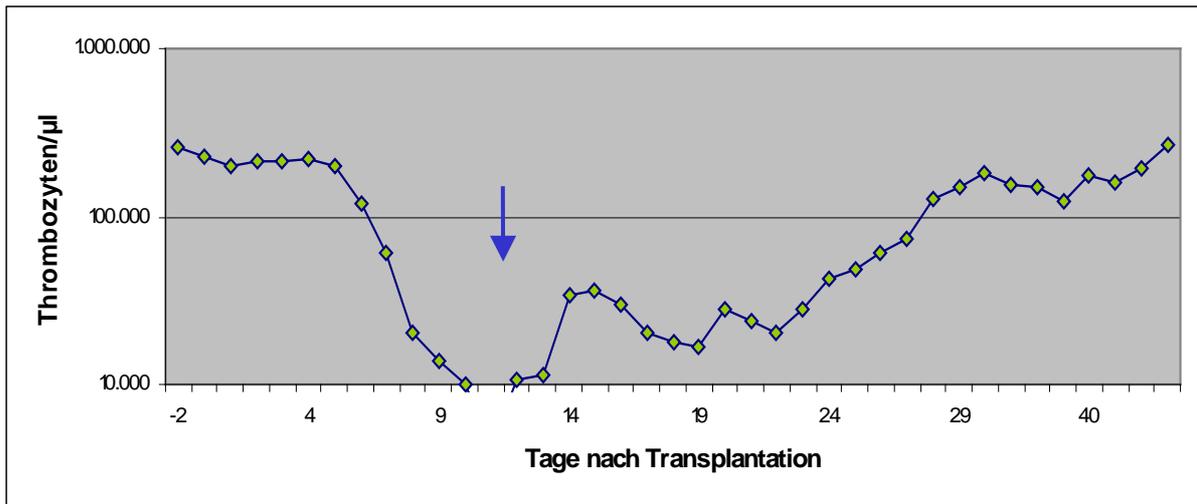


Abbildung 4.5.3b: Thrombozytenregeneration von Hund 701 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM. Die Verabreichung des Thrombozytenkonzentrats ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Der Rüde benötigte nur ein einziges Thrombozytenkonzentrat an Tag 11 (Abb. 4.5.3b). Das Allgemeinbefinden des Hundes war durchweg ungestört. Die Analyse des Chimärismus in Blut und Knochenmark zeigte folgendes Bild:

Tag	Blut	KM
20	80%	15%
50	90%	86%
100	100%	100%
1 Jahr	100%	100%

Tabelle 4.5.3c: Übersicht über den Spenderchimärismus nach KMT. An den Tagen 20, 50, 100, 365 und danach jährlich wurden dem Hund Knochenmarks- und Blutproben entnommen und durch Analyse der Chromosomen das Geschlecht bestimmt, wodurch ein Rückschluss auf den Anteil des Spenderchimärismus gezogen werden konnte.

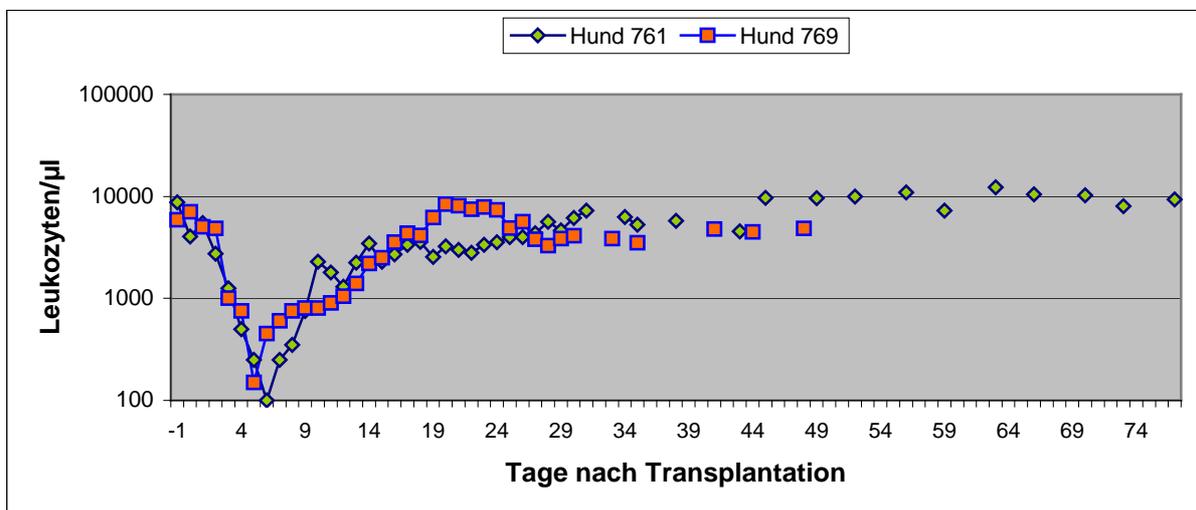
Ein anfänglich gemischter Chimärismus sowohl im Blut als auch im Knochenmark konvertierte ab Tag 100 zu einem vollen Spenderchimärismus (Abb. 4.5.3c). Ab Tag 54 waren die Blutwerte des Hundes stabil und das Allgemeinbefinden ungestört, so dass ab diesem Tag keine weiteren routinemäßigen Blutzählungen stattfanden.

Nach der Transplantation von insgesamt drei Hunden im homo-hetero-System war klar, dass die CD6-Depletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement eine effektive Methode zur Verhinderung einer GvHD ist und bei Transplantation einer ausreichenden Zellzahl zu einem stabilen Engraftment und einer sehr schnellen Erholung von Leukozyten- und Thrombozytenzahlen führt.

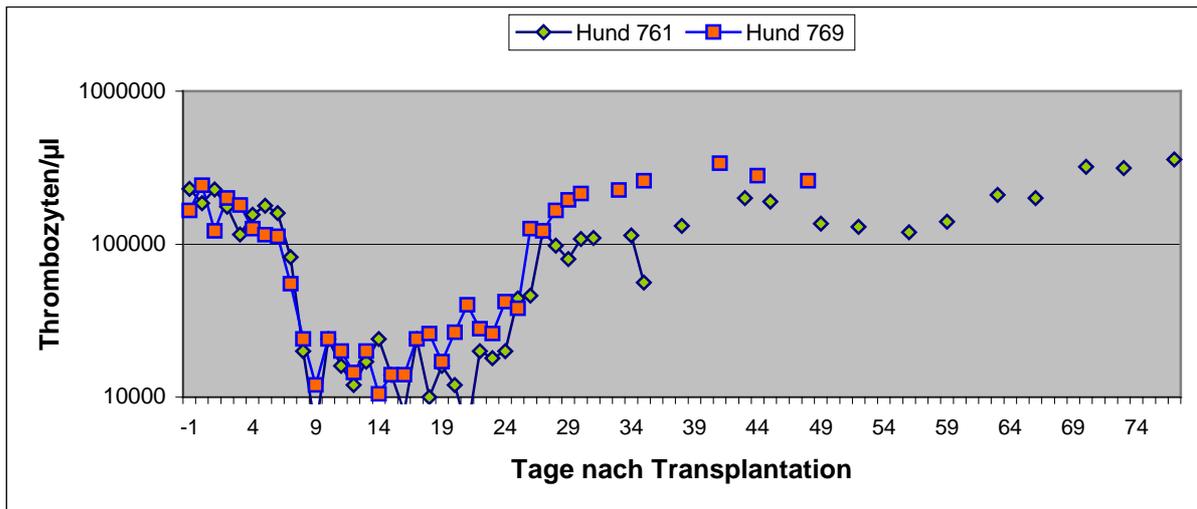
4.6 Allojene Knochenmarkstransplantation von DLA-identischen Spendern und Empfängern (Hund 767 → Hund 761 und Hund 772 → Hund 769)

Die Wirksamkeit der CD6-Depletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement wurde außer im homo-hetero-System auch im DLA-identischen Transplantationssystem getestet. Zwei Hündinnen erhielten dabei Zelldosen von $1,7 \cdot 10^8$ bzw. $1,8 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht, die aus 450 ml bzw. 600 ml der jeweiligen Spenderrüden isoliert worden waren.

Auch im DLA-identischen System verlief die Leukozyten- und Thrombozytenregeneration so problemlos wie im homo-hetero-System (Abb. 4.6a und b).



Abbildungen 4.6a: Verlauf der Leukozyten von Hund 761 und Hund 769 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM. Gezeigt sind die Verlaufskurven der Leukozyten nach KMT im DLA-identischen System.



Abbildungen 4.6b: Verlauf der Thrombozyten von Hund 761 und Hund 769 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM. Gezeigt sind die Verlaufskurven der Thrombozyten nach KMT im DLA-identischen System.

Bei beiden Hunden verlief die Zellregeneration annähernd identisch und beide Tiere zeigten ein ungestörtes Allgemeinbefinden während der gesamten Zeit nach der Transplantation.

Die Analyse des Chimärismus zeigte folgendes Bild:

Tag	Blut (761 ; 769)	KM (761 ; 769)
20	0% ; 10%	100% ; 100%
50	75% ; 15%	100% ; 100%
100	100% ; 100%	100% ; 100%

Tabelle 4.6c: Übersicht über den Grad des Spenderchimärismus nach KMT mit CD6-depletiertem KM im DLA-identischen System. Ein anfänglich gemischter Chimärismus im Blut wurde erst ab Tag 100 zu einem vollen Spenderchimärismus. Im KM konnte bereits ab Tag 20 ein voller Spenderchimärismus festgestellt werden.

Wie bei einem Teil der Transplantationen im homo-hetero-System bestand auch hier anfänglich ein gemischter Chimärismus im Blut, der sich erst an Tag 100 in einen vollständigen Spenderchimärismus umwandelte. Der Spenderchimärismus im Knochenmark lag ab der ersten Untersuchung bei beiden Hündinnen bei 100%.

Auch im DLA-identischen Transplantationssystem ist die T-Zell-Depletionsmethode mit MT-606 und Kaninchenkomplement also eine verlässliche Methode zur Verhinderung einer GvHD und stellt so eine kostengünstige und einfach durchführbare Alternative zur T-Zelldepletion mit ATG dar.

4.7 CD6-Depletion mit MACS

Im Gegensatz zur T-Zelldepletion mit monoklonalem Antikörper und Kaninchenkomplement bietet das MACS-System die Möglichkeit, auch die Positivfraktion weiter zu analysieren. Mit Hilfe dieser Methode sollte die Rolle des Antikörpers MT-606 und die von diesem Antikörper positiv markierten Zellen, bzw. die nach der CD6-Depletion übrig gebliebenen Zellen weiter untersucht werden.

In einem FACS-Ansatz wurden undepletiertes Knochenmark, die CD6-negative Fraktion und die CD6-positive Fraktion nach MACS-Depletion auf den Anteil an CD3-, CD4-, CD6- und CD8-positiven Zellen untersucht.

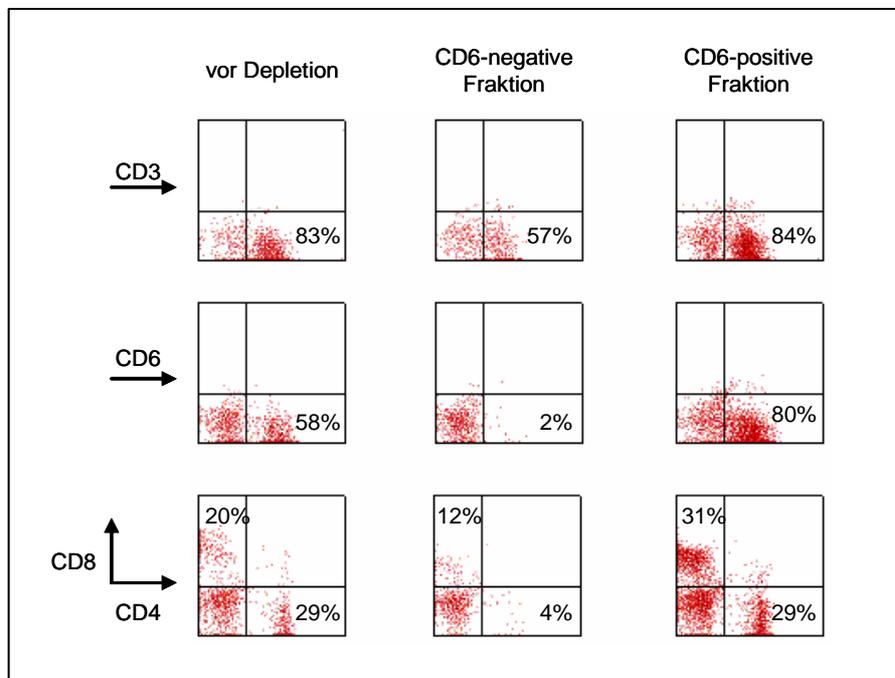


Abbildung 4.7: Analyse der CD6-positiven und CD6-negativen KM-Fractionen. KM-Zellen wurden mit MT-606 markiert und dann mit Hilfe von magnetischen Partikeln in eine CD6-positive und eine CD6-negative Fraktion aufgeteilt. Im Durchflusszytometer erfolgte die Analyse der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD6 und CD8.

Bei der Depletion mit dem MACS-System wurde die CD4-positive Fraktion fast vollständig depletiert, wohin gegen die CD8-positive Fraktion nur teilweise entfernt wurde. In der Positivfraktion ist eine Anreicherung der CD3-, CD4-, CD6- und CD8-positiven Fraktionen erkennbar. Die Tatsache, dass die CD6-positive Fraktion im Durchflusszytometer nur zu 80% positiv war, liegt daran, dass LD-Säulen verwendet wurden, die vor allem eine sehr gute Depletion garantieren und weniger – wie LS-Säulen – zur Anreicherung einer positiven Fraktion geeignet sind.

Die mit MACS depletierten Zellen wurden in weiteren in vitro-Experimenten eingesetzt. Im Hinblick auf ein zukünftig zu bearbeitendes Projekt, bei dem im haploidentischen Transplantationssystem die regulatorische Wirkung von CD6-negativen mobilisierten Stammzellen ausgetestet werden soll, wurde die Fähigkeit der CD6-depletierten Knochenmarkzellen zur Unterdrückung der Lymphozytenproliferation in der gemischten Lymphozytenkultur untersucht.

4.8 Die gemischte Lymphozytenkultur (Mixed Lymphocyte Culture = MLC)

Mit der MLC sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Haben CD6-depletierte Knochenmarkzellen einen supprimierenden Effekt auf die Lymphozytenproliferation in der MLC?
2. Ist dieser potenzielle supprimierende Effekt auch in der undepletierten Zellfraktion zu finden?
3. Kann im Gegenzug gezeigt werden, dass die CD6-positive Fraktion keinen supprimierenden Effekt auf die Lymphozytenproliferation in der MLC hat?
4. Welche Rolle spielen die magnetischen Partikel, die an die CD6-positive Fraktion gebunden sind?

4.8.1 Kulturbedingungen

Routinemäßig wird im Labor für die MLC mit caninen Lymphozyten das Grundmedium RPMI mit Zusatz von 2,6% Natrium-Pyruvat, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin verwendet. Ein weiterer Zusatz im Medium ist Hundeserumpool (HSP). HSP wirkt in hohen Konzentrationen stimulierend auf die Lymphozytenproliferation, was sich in einer starken Proliferation der autologen Kontrolle zeigt, die nicht proliferieren sollte. Nur bei minimaler Proliferation dieser Kontrolle und andererseits starker Proliferation der Lymphozyten nach allogener Stimulation ist die MLC auswertbar. Deshalb muss HSP so eingesetzt werden, dass die Proliferation der Lymphozyten nach allogener Stimulation optimal ist, aber gleichzeitig die autologen Kontrollen eine möglichst geringe Proliferation aufweisen.

Um die ideale Konzentration der für zukünftige Versuche zu verwendenden HSP-Charge für die MLC herauszufinden, wurde eine MLC mit drei verschiedenen HSP-Konzentrationen angesetzt (Abb. 4.8.1a).

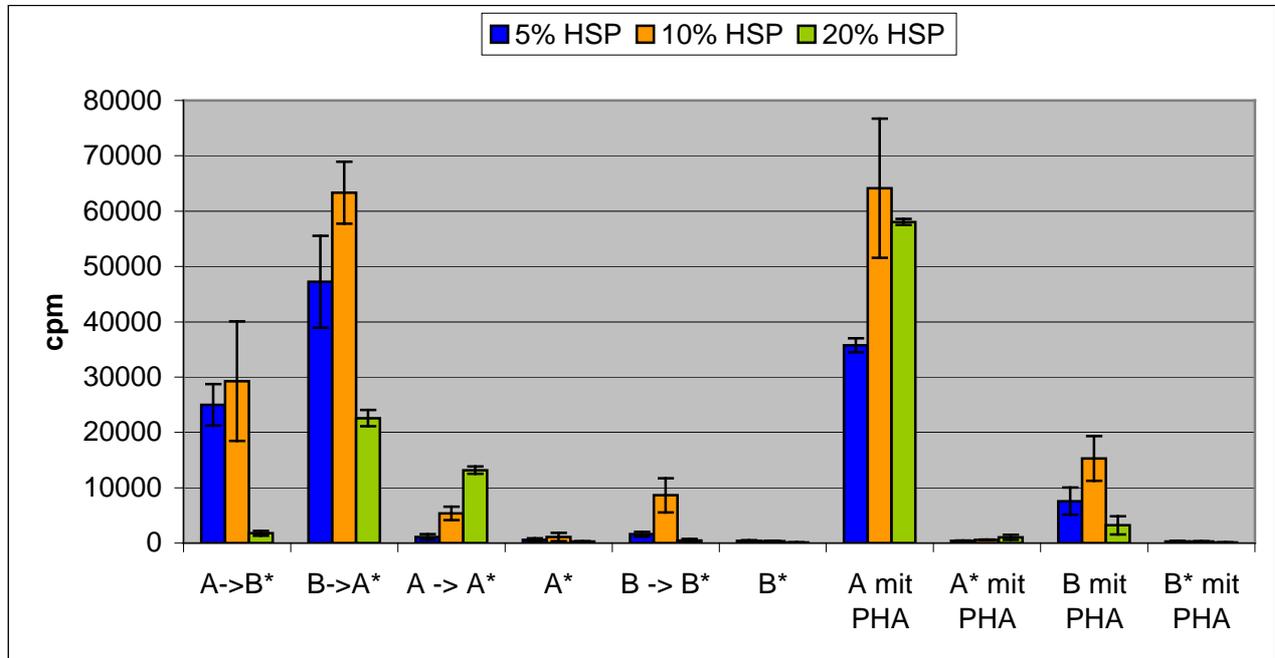


Abbildung 4.8.1a: Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen an HSP in der MLC. Um optimale Wachstumsbedingungen für canine PBMCs in der gemischten Lymphozytenkultur herauszufinden, wurden für das MLC-Medium unterschiedliche Konzentrationen an HSP ausgetestet und die Zellen auf ihre Proliferationsfähigkeit nach Stimulation durch Stimulatorzellen oder PHA hin untersucht. Das Read-out-System war dabei der Einbau von ^3H -Thymidin. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Messwerten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. Die Kennzeichnung durch * bedeutet, dass diese Zellen mit 20 Gy bestrahlt wurden, so dass sie nicht mehr proliferieren konnten.

Die Kontrolle mit PHA sollte Aufschluss über die maximale Proliferationsfähigkeit der Zellen geben. Es fiel auf, dass durch Zusatz von 5% Hundeserum die Zellen gut proliferiert, wobei die autologen Kontrollen nur minimale Counts per Minute (cpm) zeigten. Durch steigende Zugabe von HSP wiesen auch die autologen Kontrollen hohe cpm auf, was die richtige Beurteilung der MLC verhindert. Zudem war bei einem hohen Anteil an HSP die allogene Proliferation im Vergleich zu Ansätzen mit weniger HSP vermindert.

HSP hat den entscheidenden Nachteil, dass jede hergestellte Charge unterschiedliche Eigenschaften besitzt, und so die Kulturbedingungen nicht gut standardisiert werden können. Als Alternative zu Hundeserum wurde deshalb in einem weiteren Ansatz Panexin als serumfreier Zellkulturzusatz ausgetestet.

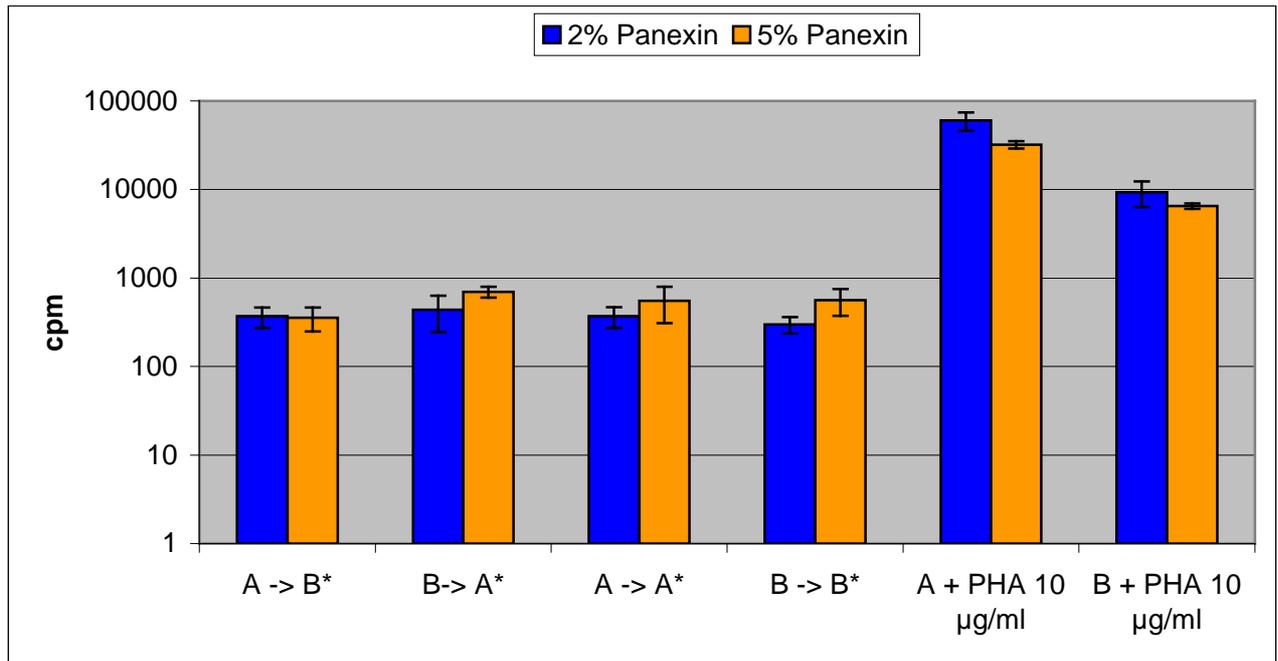


Abbildung 4.8.1b: MLC mit caninen PBMCs unter serumfreien Kulturbedingungen. Als Alternative zu HSP wurde Panexin als Mediumszusatz in unterschiedlichen Konzentrationen ausgetestet und die Proliferationsfähigkeit der PBMCs nach Stimulation mit Stimulatorzellen oder PHA untersucht. Read-out-System war der Einbau von ^3H -Thymidin. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Messwerten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. Die Kennzeichnung durch * bedeutet, dass diese Zellen mit 20 Gy bestrahlt wurden, so dass sie nicht mehr proliferieren konnten. Die Y-Achse hat eine logarithmische Skalierung.

Zwar ließen die Zellen sich in Medium mit Panexin auch sehr gut durch PHA stimulieren, jedoch war bei der Stimulation durch PBMCs eines DLA-unpassenden Spenderhundes kaum eine Proliferation der Zellen zu verzeichnen, die den autologen Kontrollwert überstieg. Das System mit Panexin hätte im Gegensatz zu Hundeserum den Vorteil von immer gleich bleibenden Kulturbedingungen, jedoch waren die zu erzielenden cpm so niedrig, dass im Folgenden auf Hundeserum in einer Konzentration von 5% zurückgegriffen wurde.

4.8.2 MLC-Suppression durch CD6-negative Knochenmarkszellen

Mit diesem in vitro-Assay sollte untersucht werden, in wie weit CD6-depletierte Knochenmarkszellen in der Lage sind, die Proliferation von Lymphozyten in der MLC zu unterdrücken.

Im Folgenden werden exemplarisch einige der gewonnenen Daten gezeigt. Dabei muss erwähnt werden, dass die Bezeichnung Hund A bzw. Hund B sich jeweils nur auf ein Experiment bezieht. In der Regel wurden bei jedem Experiment unterschiedliche Kombinationen von Hunden eingesetzt.

4.8.2.1 Messung der Zellproliferation mit ^3H -Thymidin

Zur Messung der Zellproliferation durch ^3H -Thymidin wurde die MLC zunächst für fünf Tage im Brutschrank zusammen mit den undepletierten oder CD6-depletierten Knochenmarkszellen inkubiert. An Tag 5 erfolgte die Zugabe von ^3H -Thymidin, dessen Einbau in die proliferierenden Zellen am folgenden Tag gemessen wurde. Das Ausmaß der Zellproliferation wird durch den Einbau an radioaktiv markiertem Thymidin, der in Counts per Minute (cpm) angegeben wird, bestimmt.

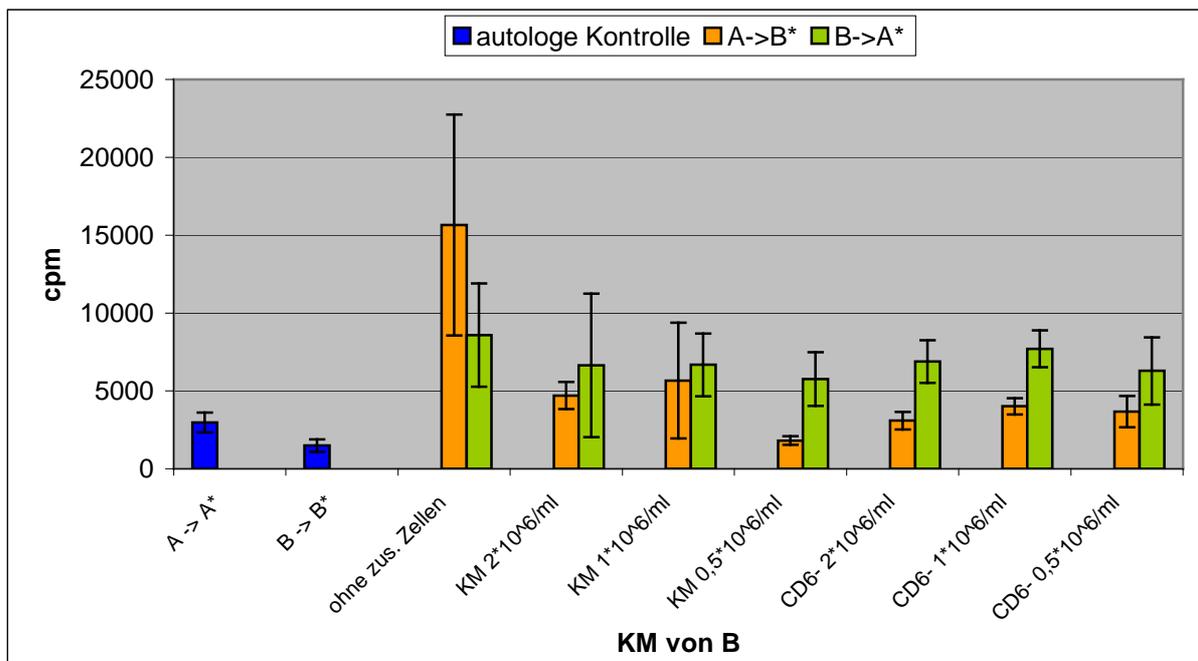


Abbildung 4.8.2.1a: MLC-Suppression durch CD6-depletiertes KM. Zu einer MLC wurden undepletierte sowie CD6-depletierte KM-Zellen gegeben. Durch den Einbau von ^3H -Thymidin wurde die Zellproliferation gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Messwerten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. Die Kennzeichnung durch * bedeutet, dass diese Zellen mit 20 Gy bestrahlt wurden, so dass sie nicht mehr proliferieren konnten.

Es ist deutlich, dass in diesem Beispiel (Abb. 4.8.2.1a) sowohl das undepletierte Knochenmark, als auch das CD6-depletierte Knochenmark supprimierend auf die Proliferation der Lymphozyten wirkte, was durch einen geringeren Einbau an ^3H -Thymidin gemessen werden konnte. Die Suppression war stärker ausgeprägt, wenn der Knochenmarkspender als Stimulator für die Zellproliferation fungierte, also in diesem Beispiel in der Richtung A→B.

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in folgendem Experiment reproduziert.

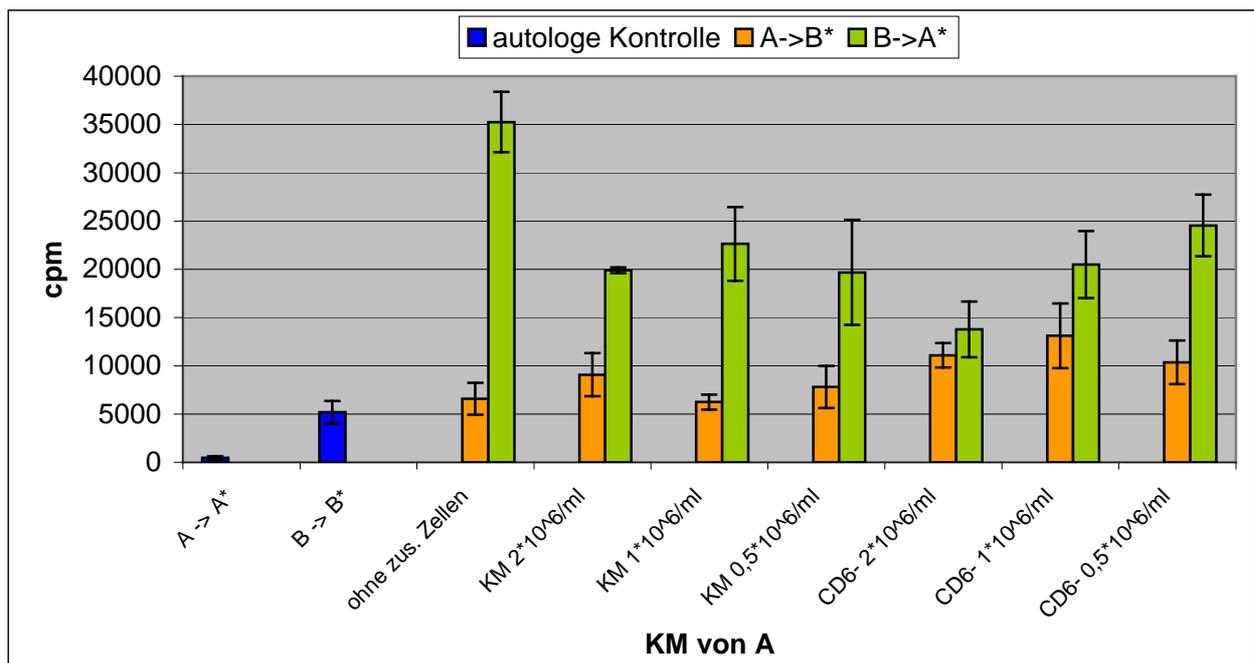


Abbildung 4.8.2.1b: MLC-Suppression durch CD6-depletiertes KM. Zu einer MLC wurden undepletierte sowie CD6-depletierte KM-Zellen gegeben. Durch den Einbau von ^3H -Thymidin wurde die Zellproliferation gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Messwerten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. Die Kennzeichnung durch * bedeutet, dass diese Zellen mit 20 Gy bestrahlt wurden, so dass sie nicht mehr proliferieren konnten.

Wie aus Abb. 4.8.2.1b ersichtlich funktionierte auch in diesem Fall die Suppression am Besten, wenn der Knochenmarkspender als Stimulator diente. Die in diesem Fall relativ hohe autologe Zellproliferation von Hund B widerspricht einer Auswertung des Versuchs nicht, da nach Stimulation mit Zellen von Hund B eine ca. 7fache Steigerung der cpm verzeichnet werden konnte. Die Assays wurden nur dann als nicht auswertbar gehandhabt, wenn die allogene Zellproliferation nicht mindestens 5fach höher war als die autologe Kontrolle.

In diesen beiden Experimenten konnte zwar ein supprimierender Effekt auf die Zellproliferation durch Zugabe von CD6-depletierten Knochenmarkszellen beobachtet werden, jedoch zeigte sich der Effekt in ähnlichem Ausmaß auch bei Zugabe von

undepletiertem Knochenmark. Um festzustellen, ob der supprimierende Effekt tatsächlich auf eine Zellpopulation zurückzuführen ist, die bei der CD6-Depletion angereichert wird, wurde in den nächsten Experimenten die CD6-positive Fraktion ebenfalls zu der MLC gegeben und deren Auswirkung auf die Zellproliferation getestet. Für die ersten MLC-Versuche wurde die CD6-Depletion mit Dynabeads statt des MACS-Systems durchgeführt. Da die CD6-positive Fraktion an Dynabeads gebunden war, wurden als weitere Kontrolle auch reine Dynabeads zugegeben.

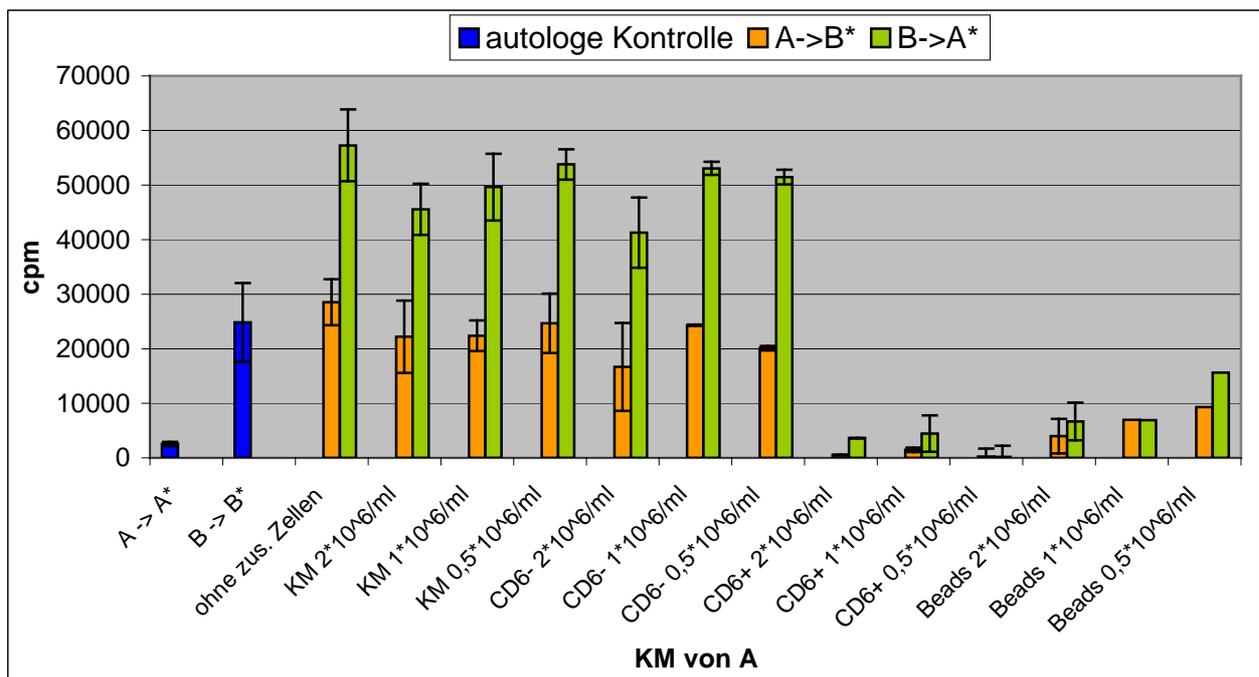


Abbildung 4.8.2.1c: MLC-Suppression durch CD6-depletiertes KM. Zu einer MLC wurden undepletierte sowie CD6-depletierte KM-Zellen gegeben. Außerdem wurde in diesem Ansatz auch die CD6-positive Fraktion mitgeführt sowie als Kontrolle reine Dynabeads zu der MLC gegeben. Durch den Einbau von ³H-Thymidin wurde die Zellproliferation gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Messwerten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben. Die Kennzeichnung durch * bedeutet, dass diese Zellen mit 20 Gy bestrahlt wurden, so dass sie nicht mehr proliferieren konnten.

Die deutlichste Suppression der Lymphozytenproliferation konnte bei der CD6-positiven Fraktion festgestellt werden (Abb. 4.8.2.1c). Dies ist allerdings ausschließlich auf die Wirkung der Dynabeads zurückzuführen, denn diese zeigten ebenfalls einen stark supprimierenden Effekt. Dynabeads sind mit einem Durchmesser von ca. 4,5 µm groß genug, um sich zwischen die Stimulator- und Effektorzellen zu drängen und dabei den Zell-zu-Zell Kontakt und somit auch die Proliferation zu verhindern. Dieses Ergebnis konnte in weiteren Experimenten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

In diesem Experiment war kein supprimierender Effekt von undepletiertem bzw. CD6-depletiertem Knochenmark auf die Lymphozytenproliferation zu verzeichnen. Es zeigte

sich sogar ein stimulativer Einfluss auf die Lymphozytenproliferation, was auch in nachfolgenden Experimenten beobachtet werden konnte (Abb. 4.8.2.1d).

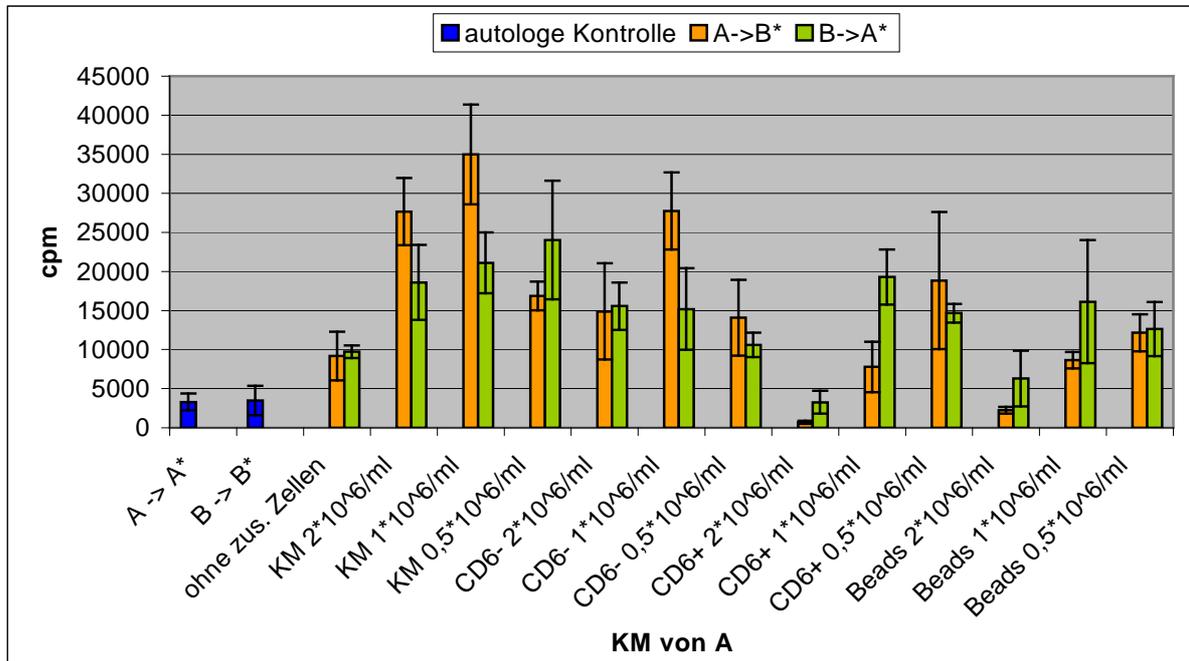


Abbildung 4.8.2.1d: MLC-Suppression durch CD6-depletiertes KM. Zu einer MLC wurden undepletierte sowie CD6-depletierte KM-Zellen gegeben. Außerdem wurde in diesem Ansatz auch die CD6-positive Fraktion mitgeführt sowie als Kontrolle reine Dynabeads zu der MLC gegeben. Durch den Einbau an ³H-Thymidin wurde die Zellproliferation gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Messwerten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. Die Kennzeichnung durch * bedeutet, dass diese Zellen mit 20 Gy bestrahlt wurden, so dass sie nicht mehr proliferieren konnten.

Es konnte auch nach wiederholten Experimenten kein reproduzierbarer supprimierender Effekt von CD6-depletierten Knochenmarkszellen auf die Lymphozytenproliferation beobachtet werden. Das nachfolgende Diagramm (Abb. 4.8.2.1e) soll einen Überblick über die durchgeführten Experimente und die relative Suppression bezogen auf die allogene Kontrolle geben.

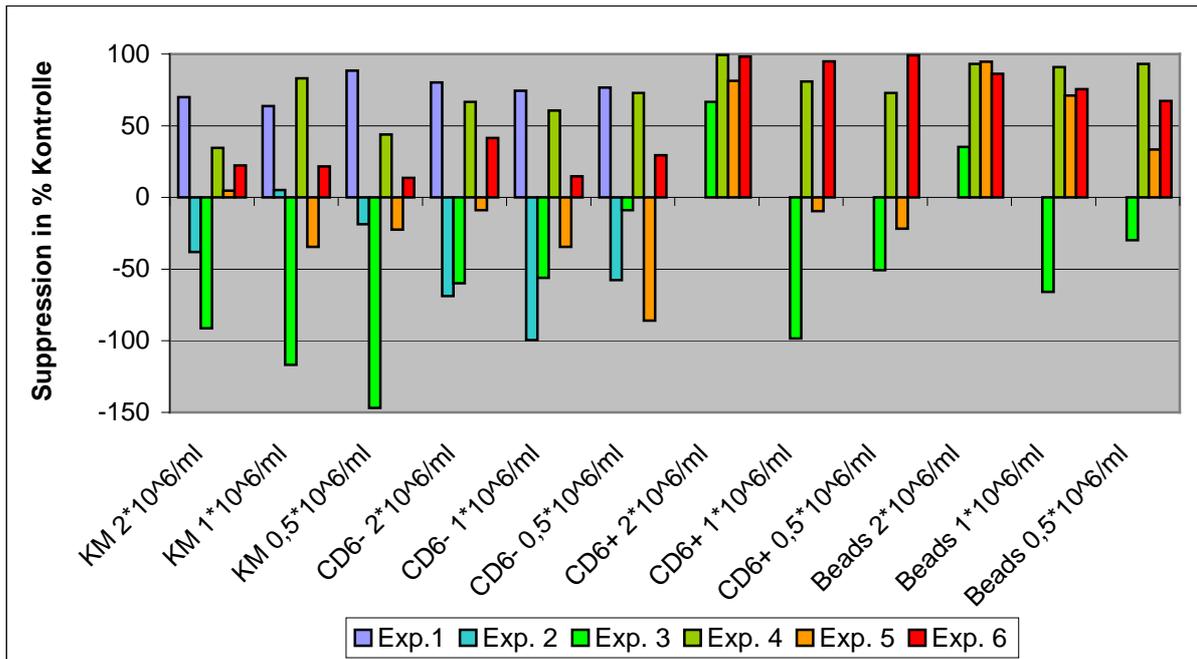


Abbildung 4.8.2.1e: Übersicht der durchgeführten Experimente zum Nachweis von supprimierenden Eigenschaften CD6-depletierter KMs auf die MLC-Reaktion. Gezeigt ist die Suppression in % der Kontrolle ohne Zugabe von Knochenmarkszellen. Als Read-out-System diente bei diesen Experimenten durchgehend der Einbau von ³H-Thymidin.

4.8.2.2 Messung der Zellproliferation mit CFSE

Die hohe Schwankungsbreite der erzielten Ergebnisse ließ die Frage aufkommen, ob das System der Messung der Zellproliferation mit radioaktiv markiertem Thymidin ungeeignet für den Nachweis der supprimierenden Eigenschaften von CD6-depletierter Knochenmarkszellen sei. Daher wurde getestet, inwiefern die Messung der Zellproliferation im caninen System durch den Fluoreszenzfarbstoff CFSE möglich ist. Zunächst wurden dazu PBMCs mit PHA bzw. mit Stimulatorzellen eines zweiten Hundes stimuliert und an sieben aufeinander folgenden Tagen auf ihre Proliferationskapazität hin untersucht (Abb. 4.8.2.2a).

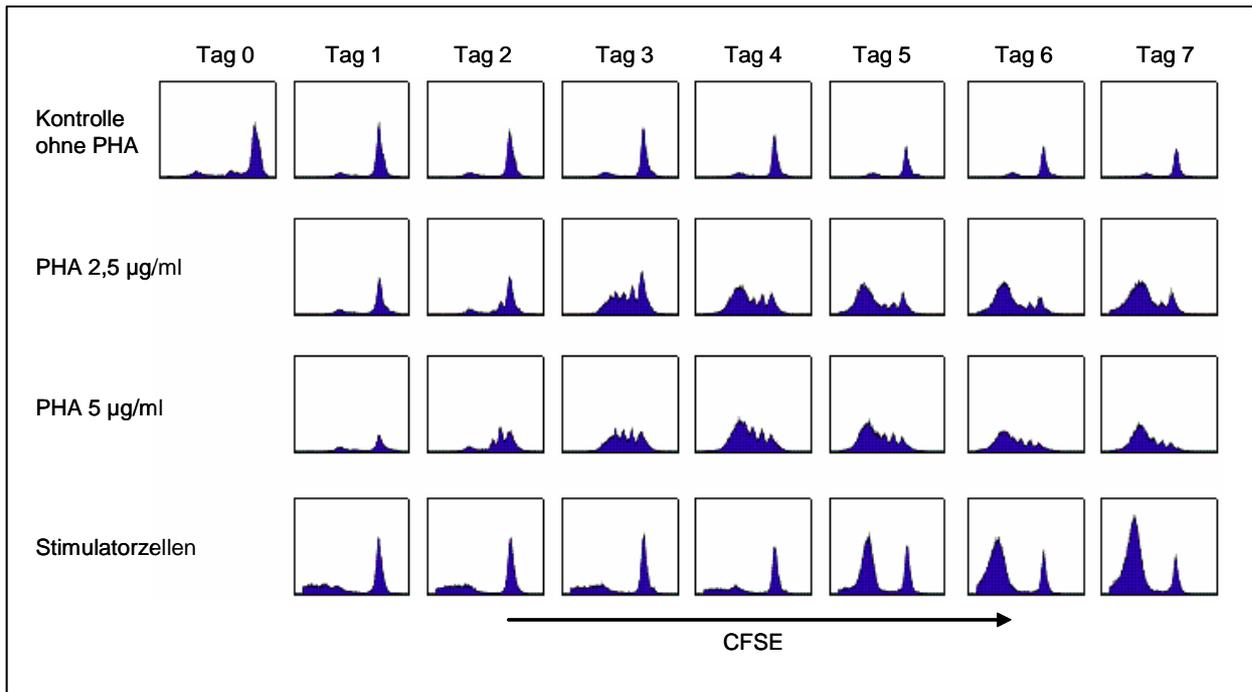


Abbildung 4.8.2.2a: Analyse der Proliferation von PBMCs durch den Farbstoff CFSE. PBMCs wurden mit dem Farbstoff CFSE gefärbt. Mit Hilfe von Stimulatorzellen oder PHA wurden sie zur Proliferation angeregt und die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. CFSE erscheint dabei auf dem Kanal der Fluoreszenz 1. Es sind die Histogramme der FL1 dargestellt.

Dieses Experiment zeigt die generelle Anwendbarkeit der CFSE-Markierung von caninen Zellen zur Messung der Zellproliferation. Die Fluoreszenzstärke der Kontrollzellen verliert im Lauf der Zeit an Intensität, d.h. die Höhe des Peaks im Histogramm nimmt ab. Dies ist ein bekanntes Phänomen bei der Färbung von Zellen mit CFSE.

Um das Ausmaß der Proliferation von mit CFSE gefärbten Zellen zu bestimmen, muss auf Peaks links des Ausgangspeaks geachtet werden. Da die Zellen bei der Teilung den Farbstoff gleichmäßig unter den „Tochterzellen“ aufteilen, weisen diese eine geringere Fluoreszenzstärke auf als die Ausgangspopulation.

Während bei der Stimulation mit PHA schon ab Tag 2 eine deutliche Proliferation zu verzeichnen war, konnte durch Stimulation mit PBMCs eines zweiten Hundes erst ab Tag 5 eine Proliferation der Zellen beobachtet werden (Abb. 4.8.2.2a). Anders als bei der Stimulation mit PHA zeigte sich nicht das für Proliferationsassays mit CFSE-gefärbten Zellen typische „Säbelzahnmuster“, sondern es entstand ein zweiter großer Peak neben der Ausgangspopulation. Dieser ist ab Tag 5 deutlich ausgeprägt.

Für die folgenden Versuche, in denen die supprimierenden Eigenschaften von CD6-depletierten Knochenmarkszellen untersucht werden sollten, wurde eine Analyse der Zellen an den Tagen 5, 6 und 7 durchgeführt.

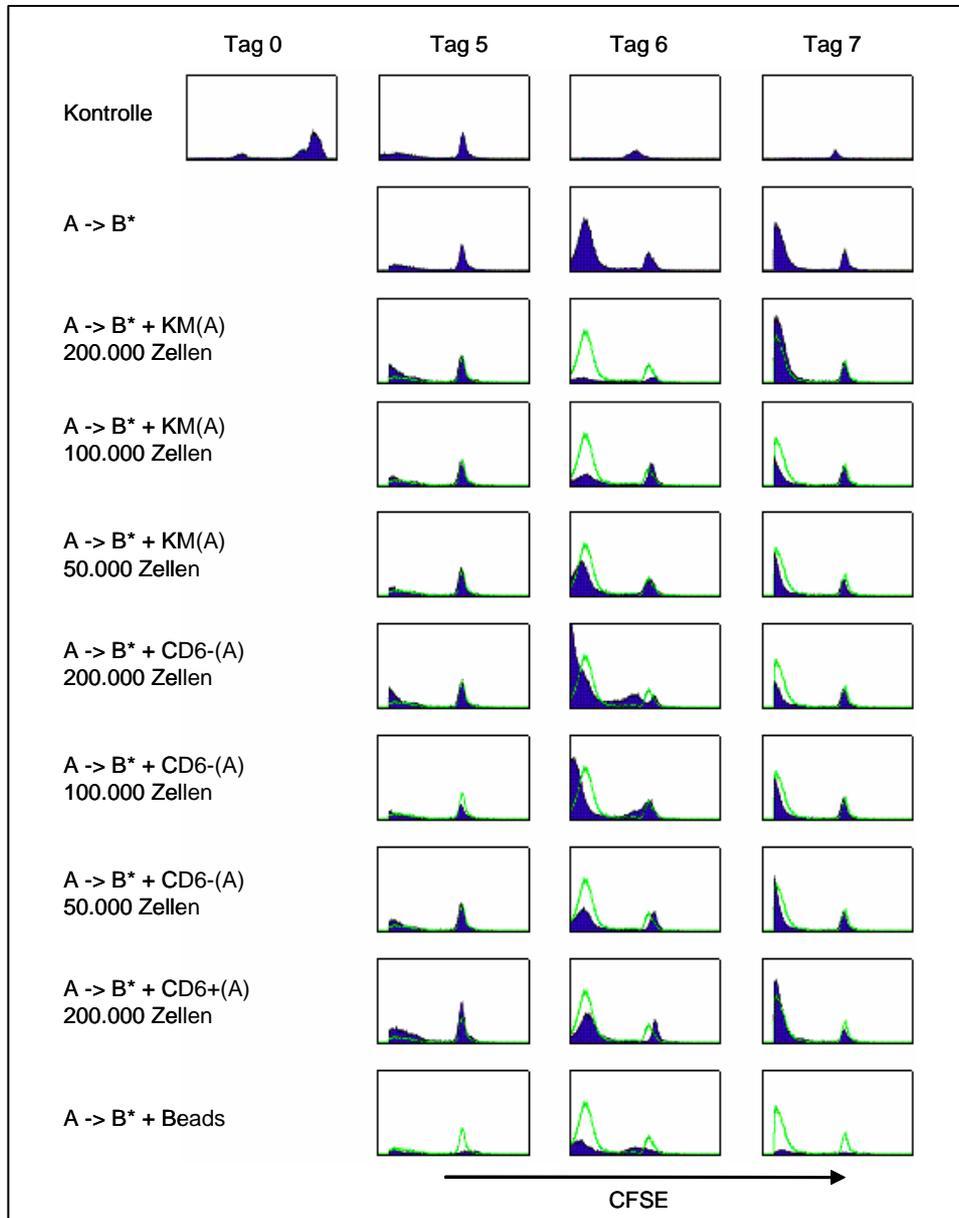


Abbildung 4.8.2.2b: Analyse der suppressiven Eigenschaften von CD6-depletiertem KM auf die MLC Reaktion. Zu einer MLC wurden unterschiedliche Zellzahlen undepletierten KMs, CD6-depletierten KMs, sowie der CD6-Positivfraktion und als Kontrolle reine Dynabeads gegeben. Read-out-System war die Weitergabe des Farbstoffs CFSE von der Mutter- auf die Tochterpopulationen. Die Analyse erfolgte im Durchflusssytometer auf dem Kanal der Fluoreszenz 1. Überlappend in grün ist die Kontrolle der Proliferation ohne Zugabe von Knochenmarkszellen gezeigt.

Auch in diesem Experiment konnte keine reproduzierbare Suppression der MLC-Reaktion durch CD6-depletiertes Knochenmark festgestellt werden (Abb. 4.8.2.2b). Anders als bei den Versuchen mit ³H-Thymidin war hier an Tag 6 zwar noch eine hemmende Wirkung der an Dynabeads gekoppelten CD6-positiven Zellen zu

verzeichnen, diese konnte jedoch an Tag 7 nicht mehr beobachtet werden. Die Kontrolle mit reinen Dynabeads wies dagegen auch an Tag 7 noch eine stark supprimierende Wirkung auf die Lymphozytenproliferation auf. Die Versuche mit CFSE wurden mehrmals angesetzt, doch auch in diesem System konnte der vermutete Effekt nicht bestätigt werden.

Durch reine Beurteilung der Fluoreszenzpeaks im Durchflusszytometer konnte bei einigen Ansätzen keine eindeutige Aussage über einen möglichen suppressiven Effekt des CD6-negativen Knochenmarks gemacht werden. Deshalb wurde außerdem bei dieser Meßmethode mit CFSE eine quantitative Bestimmung der Zellproliferation durchgeführt. Dazu wurde mit der CellQuest-Software der Prozentsatz an proliferierenden Zellen bestimmt und dieser zur Ermittlung der Suppression in Relation zu den proliferierenden Zellen der allogenen Kontrolle gesetzt.

Auch diese quantitative Auswertung konnte den vermuteten Effekt nicht bestätigen (Abb. 4.8.2.2c).

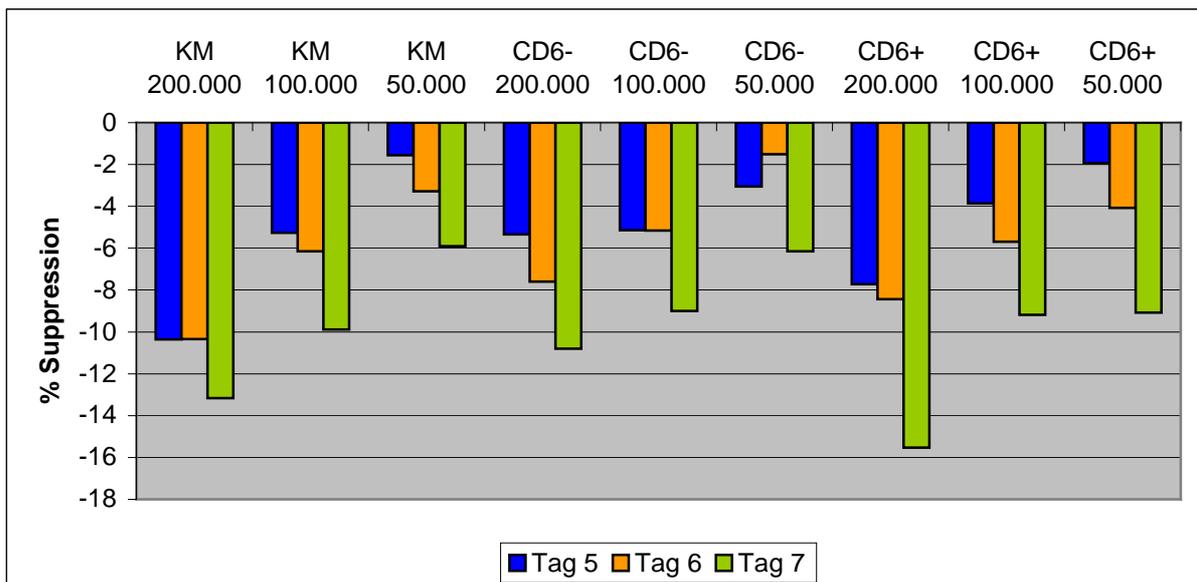


Abbildung 4.8.2.2c: Suppression der MLC-Reaktion durch CD6-depletieretes KM. Mit Hilfe des Farbstoffs CFSE wurde im Durchflusszytometer die Proliferation von Zellen durch Stimulatorzellen und nach Zugabe von undepletiertem KM, CD6-depletiertem KM und CD6-positivem KM gemessen. Die Kontrolle mit reinen Beads war nicht nötig, da in diesem Ansatz zur Depletion Micro Beads von Miltenyi verwendet wurden, die mit einem Durchmesser von ca. 50 nm die Proliferation der Zellen in der MLC im Gegensatz zu Dynabeads nicht hemmen. Gezeigt ist die prozentuale Suppression der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle ohne Knochenmarkzellen.

In diesem Experiment zeigte sich sowohl nach Zugabe von undepletiertem Knochenmark, als auch nach Zugabe der CD6-negativen sowie der CD6-positiven Zellfraktion ein stimulativer Effekt auf die Proliferation der Lymphozyten.

Nach zahlreichen durchgeführten Experimenten wurde geschlussfolgert, dass ein supprimierender Effekt von CD6-depletierten Zellen in der MLC nicht nachweisbar ist.

4.8.3 MLC-Suppression durch mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Suppression der Lymphozytenproliferation in der MLC (Le Blanc et al., Scand J Immunol 2003). Da mit den CD6-depletierten Knochenmarkzellen der vermutete Effekt in der MLC nicht bestätigt werden konnte, wurde versucht, die MLC-Suppression nach Zugabe von mesenchymalen Stammzellen (engl. Mesenchymal Stem Cells = mSCs) nachzuweisen. Dies sollte vor allem dazu dienen, die generelle Einsetzbarkeit des etablierten MLC-Systems zum Nachweis der suppressiven Eigenschaft einer Zellpopulation zu zeigen.

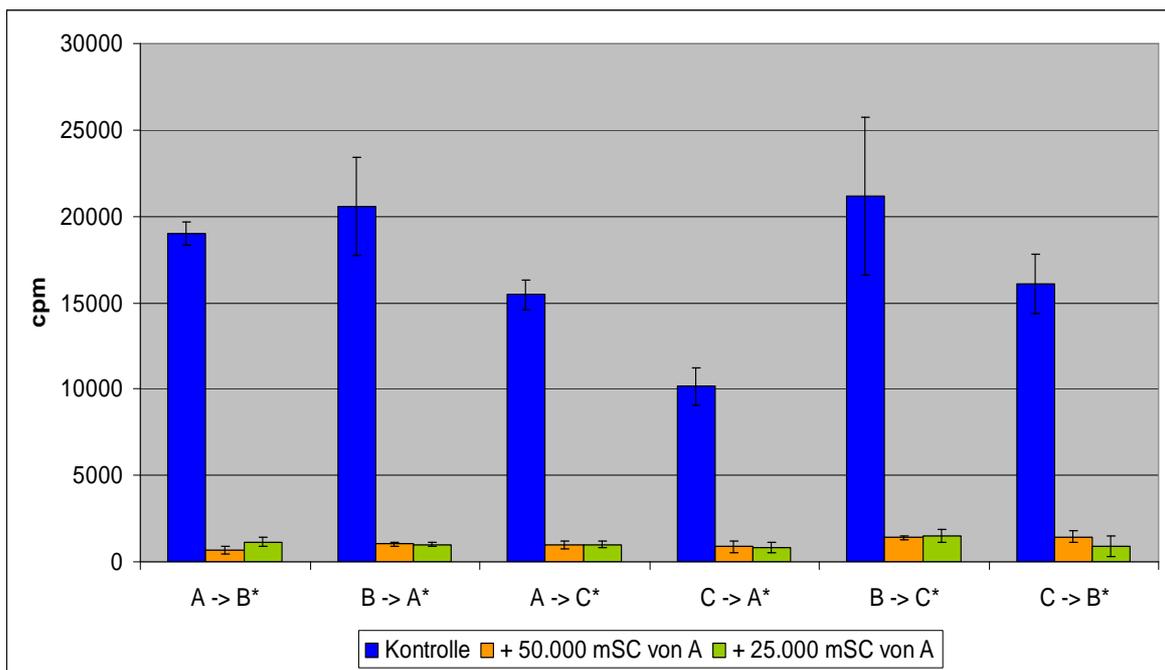


Abbildung 4.8.3a: MLC-Suppression durch mesenchymale Stammzellen. Zu einer MLC mit drei verschiedenen Hunden (A, B, C) wurden verschiedene Mengen an mSCs des Hundes A gegeben. Durch den Einbau von ³H-Thymidin an Tag 5 wurde die Zellproliferation gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Messwerten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt. Die Kennzeichnung durch * bedeutet, dass die Zellen mit 20 Gy bestrahlt wurden, so dass sie nicht mehr proliferieren konnten.

Wie aus Abb. 4.8.3a ersichtlich, zeigten die mesenchymalen Stammzellen eine supprimierende Wirkung auf die Lymphozytenproliferation in der MLC. Dabei war es unabhängig, ob die mSCs vom Stimulator (B/C → A*), Responder (A/C → B*) oder von einem dritten Hund (B → C* und C → B*) stammten.

Außerdem wurde getestet, ob mSCs in der Lage sind, die PHA-induzierte Lymphozytenproliferation zu unterdrücken (Abb. 4.8.3b).

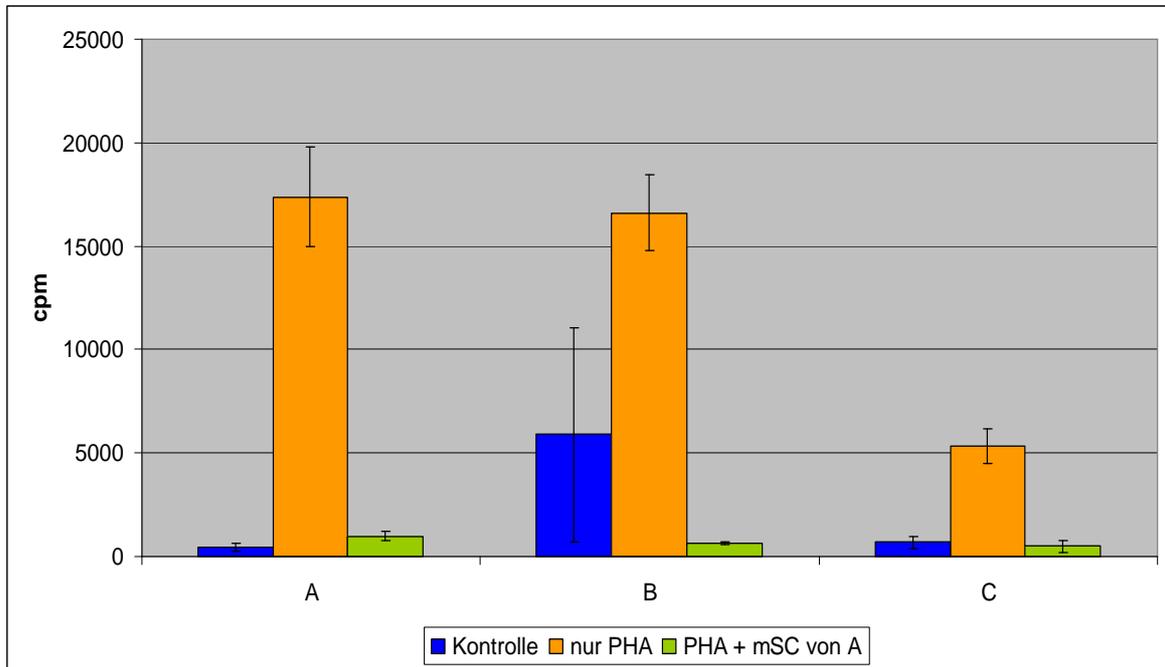


Abbildung 4.8.3b: Suppression der PHA-induzierten Lymphozytenproliferation durch mesenchymale Stammzellen. Zu den durch PHA stimulierten Lymphozyten drei verschiedener Hunde wurden je 25.000 mSCs des Hundes A gegeben. Durch den Einbau von ^3H -Thymidin an Tag 5 wurde die Zellproliferation gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Messwerten. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Die mesenchymalen Stammzellen unterdrückten auch die PHA-induzierte Zellproliferation unabhängig davon, ob die Lymphozyten vom mSC-Donator oder von einem anderen Hund stammten.

Die erzielten Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten reproduziert (Daten nicht gezeigt).

Damit konnte gezeigt werden, dass das angewendete MLC-System generell geeignet ist zum Nachweis der supprimierenden Eigenschaften einer Zellpopulation.

4.9 Transfusion von Spenderlymphozyten nach allogener Knochenmarktransplantation mit DLA-homozygoten Spendern und DLA-heterozygoten Empfängern zur Induktion einer GvHD

Wie gezeigt, stellt die T-Zelldepletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement ein geeignetes System zur effektiven GvHD-Prophylaxe dar. Allerdings geht eine T-Zelldepletion, wie bereits in der Einleitung angesprochen, mit dem erhöhten Risiko eines Krankheitsrezidivs einher, da die T-Zellen, die den GvH-Effekt bedingen, auch für den GvL-Effekt verantwortlich sind.

Um den GvL-Effekt nach der Transplantation T-zelldepletierter Stammzellen aufrecht zu erhalten, können nach der Transplantation Spenderlymphozyten transfundiert werden. Dies birgt aber das Risiko einer schweren, im schlimmsten Fall lebensbedrohlichen GvHD. Zur Untersuchung der Therapiemöglichkeiten einer bei der adoptiven Immuntherapie auftretenden GvHD ist es nötig, ein System zu schaffen, in dem eine GvHD nach der Transplantation von T-zelldepletierten Stammzellen induziert werden kann.

Es sollte nun untersucht werden, ob bei transplantierten Tieren im homo-hetero-System durch zusätzliche Gabe von Spenderlymphozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation eine GvHD induziert werden kann.

Folgende Fragen sollten dabei erörtert werden:

1. Welche Zellzahl muss transfundiert werden, um eine GvHD auszulösen?
2. Wie äußert sich die induzierte GvHD bzw. welche Organe sind vorwiegend betroffen?
3. Ab welchem Zeitpunkt nach der Transplantation löst die nachträgliche Transfusion von Spenderlymphozyten keine GvHD aus, da die Tiere bereits tolerant geworden sind?

Insgesamt wurden zur Beantwortung dieser Fragen vier Hunde im homo-hetero-System transplantiert.

4.9.1 Transplantation Hund 698 → Hund 703

Dem Spendertier wurden 485 ml Knochenmark entnommen, daraus $1,75 \cdot 10^9$ mononukleäre Zellen isoliert, und dem Empfänger eine Zelldosis von $1,0 \cdot 10^8$ MNC/kg Körpergewicht transplantiert.

Um ein System einer induzierbaren GvHD im homo-hetero-System zu etablieren, wurde diesem Hund nach der Transplantation eine Transfusion mit Lymphozyten des Spenders verabreicht. Der Zeitpunkt für diese DLT musste so gewählt werden, dass der Hund noch nicht tolerant gegenüber Zellen des Spenders geworden war. Für die DLT wurde Tag 3 nach der Transplantation festgesetzt.

Zur Gewinnung der Lymphozyten für die DLT wurden dem Spendertier in vier Leukapheresegängen je 150 ml Blut entnommen, abzentrifugiert und der Leukozytenring vorsichtig abgenommen. Es wurden so 203 ml Buffy Coat gesammelt, der $1,32 \cdot 10^9$ mononukleäre Zellen enthielt. Der Empfängerrüde erhielt eine Zelldosis von $0,9 \cdot 10^8$ mononukleären Zellen pro kg Körpergewicht.

An Tag 12 nach der Transplantation wurde der Grad des Spenderchimärismus bestimmt, der in Blut und Knochenmark bei 100% lag. Dies sprach für ein Anwachsen des Transplantats, obwohl die Leukozytenwerte zu diesem Zeitpunkt noch unter $500/\mu\text{l}$ lagen (Abb. 4.9.1a).

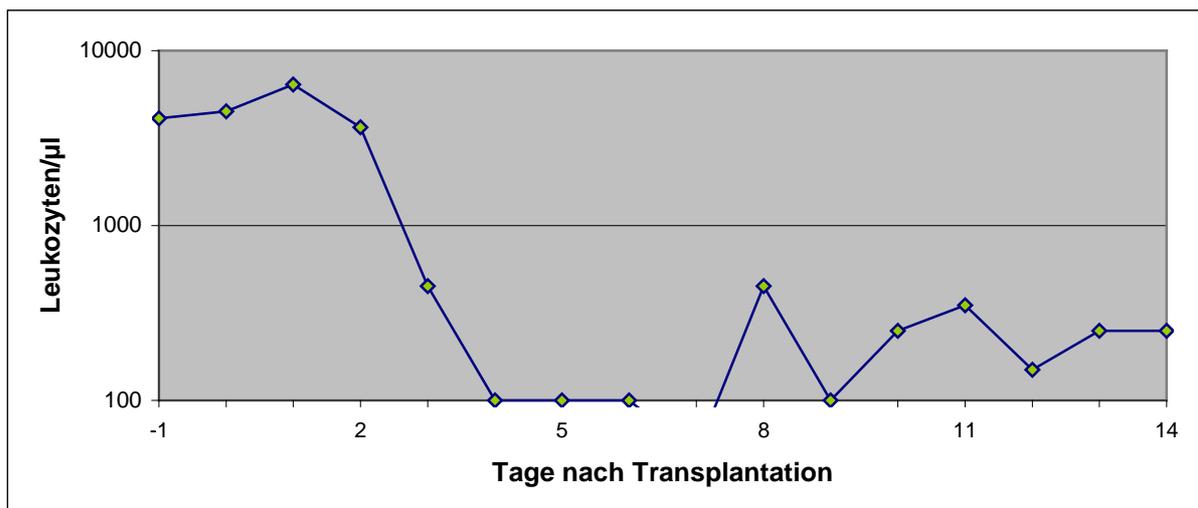


Abbildung 4.9.1a: Leukozytenregeneration von Hund 703 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM und DLT an Tag 3.

Ab Tag 9 nach der Transplantation verschlechterte sich das Allgemeinbefinden des Hundes sukzessive. Es wurde eine beginnende Hautrötung an Skrotum und Lefzen festgestellt, an Tag 11 kam blutiger Nasenausfluss dazu. Die Hautrötung breitete sich weiter auf die Ohren aus und die Conjunktiven beider Augen waren stark gerötet und wiesen eine verwaschene Gefäßzeichnung auf (Abb. 4.9.1b). Ab Tag 13 setzte der Hund blutigen Urin und Durchfall ab und das Allgemeinbefinden verschlechterte sich zusehends. Diese Symptomatik wurde als Beginn einer GvHD mit Ausdehnung auf die Haut und den Gastrointestinaltrakt gedeutet.



Abbildung 4.9.1b: Anzeichen einer beginnenden GvHD der Haut. An Tag 3 nach KMT wurden dem Hund $1,32 \cdot 10^9$ Lymphozyten des Spenders transfundiert, die eine GvHD auslösten.

Das weitere Fortschreiten der beginnenden GvHD konnte nicht beobachtet werden. An Tag 14 zog sich der Hund bei der morgendlichen Behandlung ein stumpfes Trauma mit Ruptur der Leber zu. Begünstigt durch die transplantationsbedingt niedrigen Thrombozytenwerte blutete der Hund aus der Rupturstelle an der Leber in die Bauchhöhle. Durch den massiven Blutverlust verschlechterte sich das Allgemeinbefinden des Hundes so stark, dass er am Mittag des 14. Tages in einen komatösen Zustand verfiel und eingeschläfert werden musste. Eine anschließende

Sektion sollte Klarheit über den sich abrupt verschlechternden Gesundheitsstatus des Hundes geben.

Die Abdominalhöhle des Hundes war gefüllt mit ca. 800 ml ungeronnenem Blut, das aus der rupturierten Leber ausgetreten war (Abb.4.9.1c).

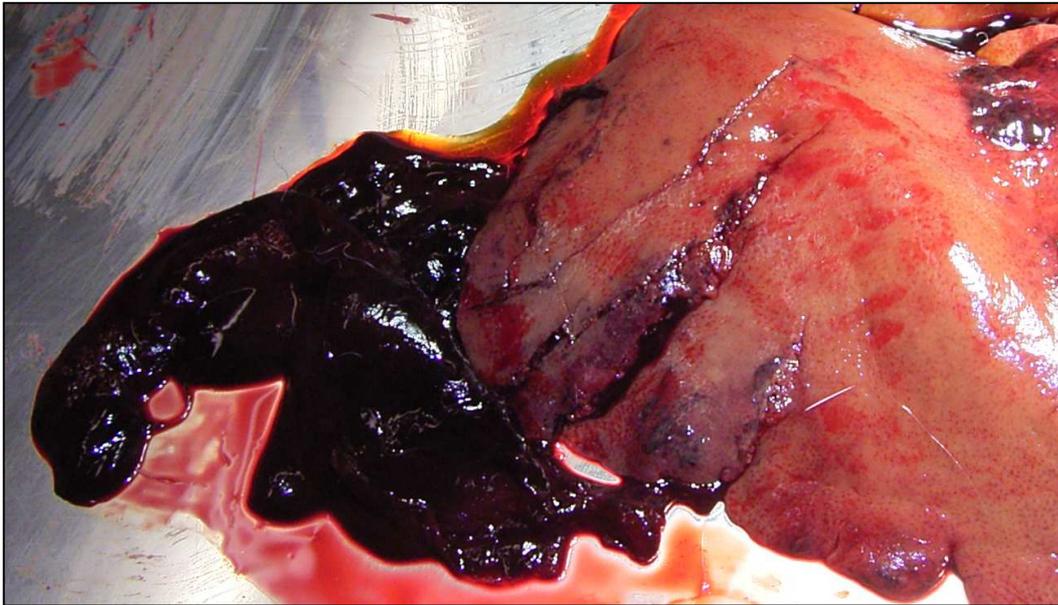


Abbildung 4.9.1c: Ruptur der Leber nach stumpfem Trauma. Nach der Euthanasie des Hundes auf Grund seines schlechten Allgemeinbefindens erfolgte eine Sektion, bei der eine Ruptur von Leberkapsel und -parenchym festgestellt wurde.

Der Hund litt an akutem Herz-Kreislaufversagen auf Grund der Ruptur von Leberkapsel- und Parenchym mit der Folge der inneren Verblutung in die Bauchhöhle. Das durch die beginnende GvHD vorgeschädigte Leberparenchym wies eine so hohe Vulnerabilität auf, dass die oben erwähnte an sich geringe Traumatisierung zu diesem Leberriß führte. Bei der pathohistologischen Untersuchung, durchgeführt von der Firma VetMedLab, wurden an der Leber multifokal geringgradige entzündliche Reaktionsherde aus neutrophilen Granulozyten und einzelnen Lymphozyten festgestellt. Eine leichte multifokale Gallenganshyperplasie, eine leichte bis mittelgradige diffuse Cholestase sowie eine leichte diffuse Dilatation der Disse'schen Räume war zu verzeichnen. Außerdem fiel eine multifokal leichte großtropfige Ito-Zellverfettung auf.

Die Haut an der Lefze zeigte Anzeichen einer perivaskulären bis diffusen Entzündungsreaktion mit orthokeratotischer Hyperkeratose und epithelialer Hyperplasie sowie ein diffuses superfizielles Ödem.

Im Jejunum befanden sich einzelne Kryptabszesse unter Beteiligung von neutrophilen Granulozyten, die im Zusammenhang mit einer mittel- bis hochgradigen diffusen lymphohistiozytären Entzündung standen. Multifokal fiel mäßige Zottenspitzenatrophie

sowie eine leichte bis mittelgradige superfizielle Fibrose auf. Diese lymphohistiozytären Entzündungen sind Hinweise auf eine GvHD-Reaktion.

Die endgültige Diagnose einer GvHD-Reaktion kann zwar auf Grund des kurzen Beobachtungszeitraumes nicht mit Sicherheit gestellt werden, aber die oben beschriebenen Befunde deuten darauf hin, dass die Transfusion von Spenderlymphozyten an Tag 3 bei diesem Hund eine GvHD induziert hat.

4.9.2 Transplantation Hund 732 → Hund 734

Mit einer weiteren Transplantation im homo-hetero-System sollte erneut die Induzierbarkeit einer GvHD durch Transfusion von Spenderlymphozyten untersucht werden.

Aus 515 ml Knochenmark der Spenderhündin wurden $3,3 \cdot 10^9$ mononukleäre Zellen isoliert. Nach der CD6-Depletion konnten dem Empfängertier $1,7 \cdot 10^9$ MNCs/kg Körpergewicht transplantiert werden. Um eine GvHD zu induzieren, wurden dem Empfängerrüden an Tag 20 nach der Transplantation $1,0 \cdot 10^8$ MNCs des Spenders pro kg Körpergewicht transfundiert.

Der Verlauf der Leukozyten- und Thrombozytenzahlen im Blut war wie folgt:

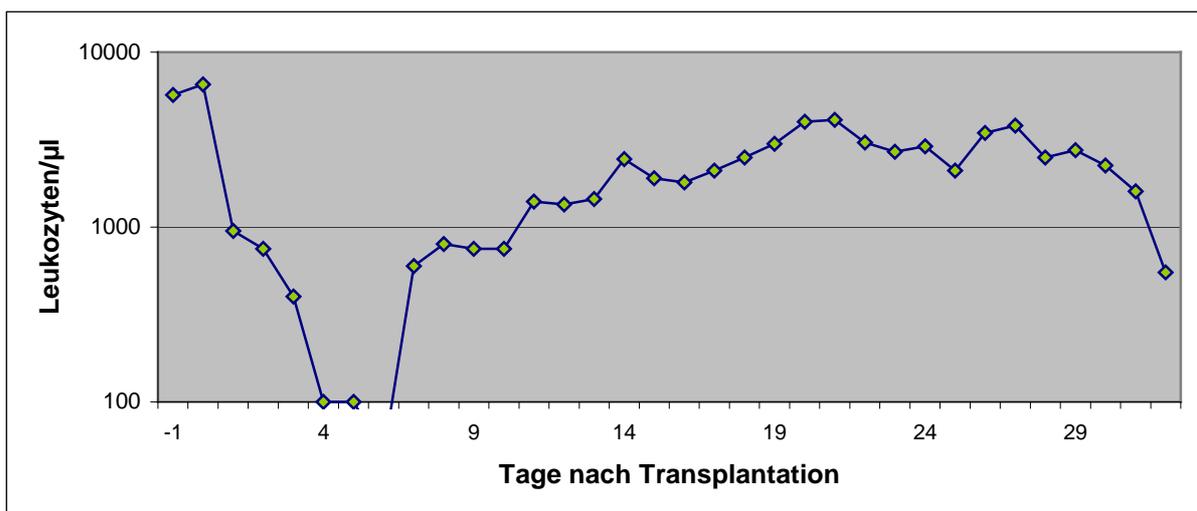


Abbildung 4.9.2a: Leukozytenregeneration von Hund 734 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM und DLT an Tag 20.

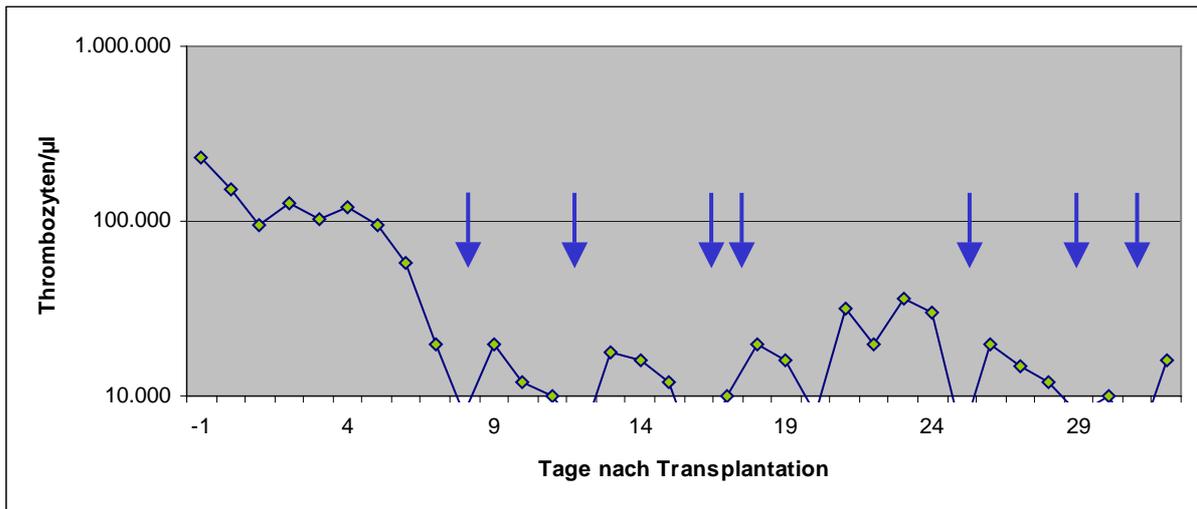


Abbildung 4.9.2b: Thrombozytenregeneration von Hund 734 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM und DLT an Tag 20. Die Verabreichung von Thrombozytenkonzentraten ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Ab Tag 6 nach der Transplantation stiegen die Leukozytenzahlen kontinuierlich an und erreichten an Tag 20 ein Maximum von 4.000/µl (Abb. 4.9.2a). Die Thrombozytenwerte stiegen langsamer an als bei den davor transplantierten Hunden, so dass dieser Rüde Transfusionen von Thrombozyten an den Tagen 8, 12, 16, 17, 25, 29 und 31 benötigte (Abb. 4.9.2b). Allerdings fiel der Hämatokrit nie so weit ab, dass Vollblut transfundiert werden musste.

An Tag 20 wurde vor Transfusion der Spenderlymphozyten der Grad des Spenderchimärismus bestimmt, der sowohl im Knochenmark als auch im Blut bei 100% lag. Für ein gutes Anwachsen des Transplantats sprach auch die hohe Zahl an Leukozyten im Blut.

Das Allgemeinbefinden des Hundes war bis zum Tag 24 nach der Transplantation weitgehend ungestört. Ein leichter Anstieg der Körpertemperatur ab Tag 14 wurde mit Piperacillin und Combactam behandelt. Nach 3tägiger Anwendung dieser Antibiotika konnte keine Senkung der Temperatur erreicht werden, so dass die Antibiose laut Protokoll umgestellt wurde auf Vancomycin und Cefotaxim.

Ab Tag 24 verweigerte der Rüde die Futteraufnahme. Versuche, den Appetit mit 0,1 mg/kg Diazepam i.v. anzuregen, blieben erfolglos. Das starke Ansteigen der Leberserumwerte (Abb. 4.9.2c) kombiniert mit einem deutlich reduzierten Allgemeinbefinden waren ein erster Hinweis auf eine beginnende GvHD der Leber.

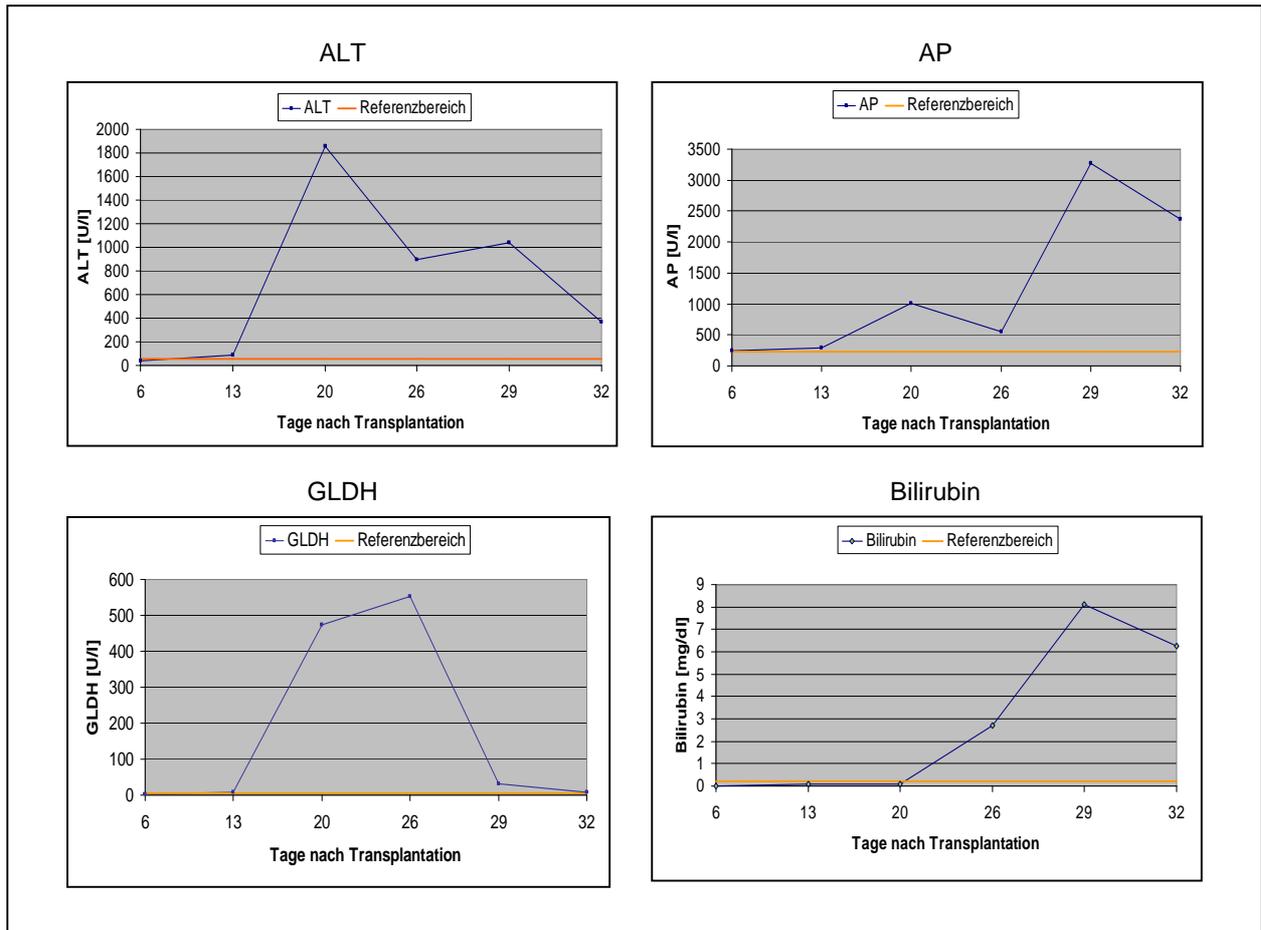


Abbildung 4.9.2c: Verlauf der Serumwerte von ALT, AP, GLDH und Bilirubin nach KMT und DLT an Tag 20. Dem Rüden wurden an Tag 20 $1,09 \cdot 10^9$ Lymphozyten des Spenders transfundiert, die eine GvHD der Leber auslösten. Die Serumparameter wurden ab dem Zeitpunkt der KMT zweimal wöchentlich bestimmt.

Neben der Verweigerung der Futteraufnahme ab Tag 24 litt der Hund ab Tag 27 unter fast kontinuierlichem Erbrechen, das auch durch die Verabreichung von 0,5 mg/kg Paspertin i.v. nur kurzzeitig aussetzte. Um einer Dehydratation vorzubeugen, wurde dem Hund ab diesem Zeitpunkt Kochsalzlösung infundiert, die den Flüssigkeitsverlust durch das Erbrechen ausgleichen sollte. Die Menge der infundierten Flüssigkeit wurde der oralen Wasseraufnahme des Hundes und dem Dehydratationsgrad angepasst. Zusätzlich erhielt der Hund eine Dauertropfinfusion mit einer Nährlösung zur intravenösen Verabreichung. Der sich stark verschlechternde Allgemeinzustand und ein augenscheinlich werdender Ikterus wurden ab Tag 31 begleitet von blutigem Durchfall. Am Morgen des 32. Tages hatte der Hund das klinische Erscheinungsbild einer GvHD Grad III erreicht (Tab. 4.9.2d) und wurde daraufhin euthanasiert.

Ausdehnung des Organbefalls			
Stadium	Haut	Leber	Gastrointestinaltrakt
1	Erythem auf < 25% der Haut	Bilirubin 2-3 mg/dl	Diarrhoe > 500 ml/Tag oder anhaltende Übelkeit
2	Erythem auf 25-50% der Haut	Bilirubin 3-6 mg/dl	Diarrhoe > 1000 ml/d
3	Erythem auf > 50% der Haut	Bilirubin > 15 mg/dl	Diarrhoe > 1500 ml/d
4	Generalisiertes Exanthem mit Blasenbildung	Bilirubin > 15 mg/dl	Starke Bauchschmerzen mit oder ohne Ileus
Grad	Haut	Leber	Gastrointestinaltrakt
I	Stadium 1-2	keine Beteiligung	Keine Beteiligung
II	Stadium 3 oder	Stadium 1 oder	Stadium 1
III	---	Stadium 2-3 oder	Stadium 2-4
IV	Stadium 4 oder	Stadium 4	---

Tabelle 4.9.2d: Gradeinteilung der akuten GvHD. Nach Glucksberg et al., 1974.

Am Tag der Euthanasie fielen erstmals auch beginnende Veränderungen der Haut am rechten Vorderlauf auf, welche Hinweise auf eine Ausbreitung der GvHD auf die Haut gewesen sein könnten (Abb. 4.9.2e).



Abbildung 4.9.2e: Anzeichen einer beginnenden Haut-GvHD bei Hund 734. An Tag 32 nach der KMT wurden bei dem Hund neben deutlichen Anzeichen einer GvHD von Leber und Magen-Darm-Trakt zusätzlich erste Anzeichen einer Haut-GvHD festgestellt. Die haarlose Stelle am Vorderlauf gibt den Blick frei auf ein Erythem der Haut.

Nach der Euthanasie wurde der Hund seziiert, um Veränderungen der von der GvHD betroffenen Leber analysieren zu können. Dabei fiel vor allem auf, dass sämtliche Schleimhäute, Peritoneum, Pleura und Gefäßendothelien hochgradig ikterisch verfärbt waren. Der Gallenabfluss war allerdings ungestört, so dass eine Cholestase als Ursprung des Ikterus ausgeschlossen werden konnte.

Eine histopathologische Untersuchung der entnommenen Proben steht noch aus. Diese könnte die Verdachtsdiagnose GvHD endgültig bestätigen.

4.9.3 Transplantation Hund 741 → Hund 742

Analog des Transplantationssystems bei Hund 734 wurde hier wieder versucht, durch Transplantation von CD6-depletiertem Knochenmark und zusätzliche Gabe von Spenderlymphozyten an Tag 20 eine GvHD zu induzieren. Von $3,5 \cdot 10^9$ MNCs, die aus 500 ml Knochenmark isoliert worden waren, blieben nach der Depletion $3,0 \cdot 10^9$ MNCs. Diese $2,2 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht wurden dem Empfängertier transplantiert. Durch die relativ hohe Zelldosis erfolgte ein schnelles Anwachsen des Transplantats und sowohl die Leukozyten- als auch die Thrombozytenzahlen im Blut erholten sich schnell (Abb. 4.9.3a und b).

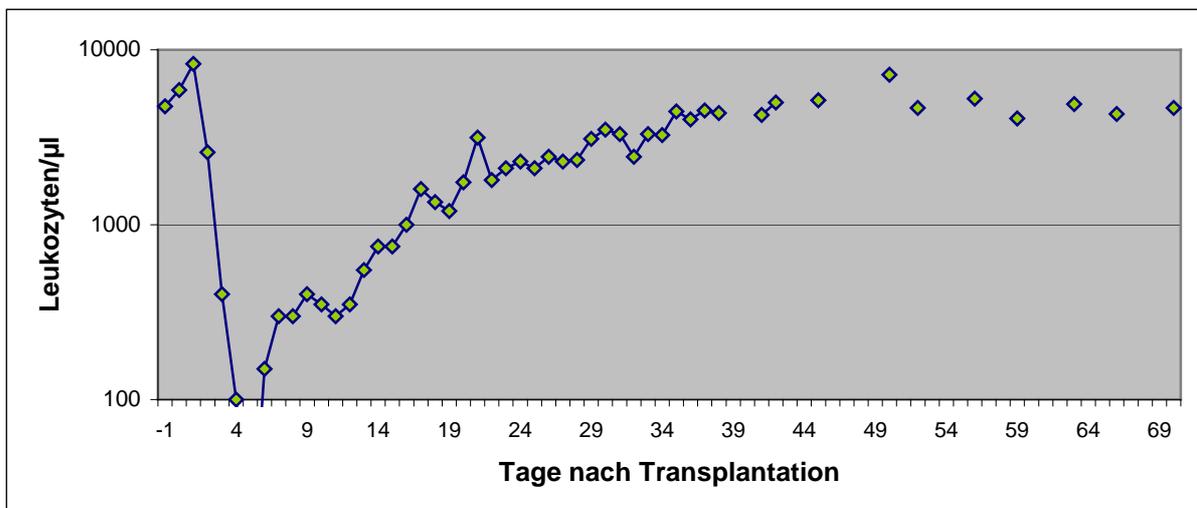


Abbildung 4.9.3a: Regeneration der Leukozytenzahlen von Hund 742 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM.

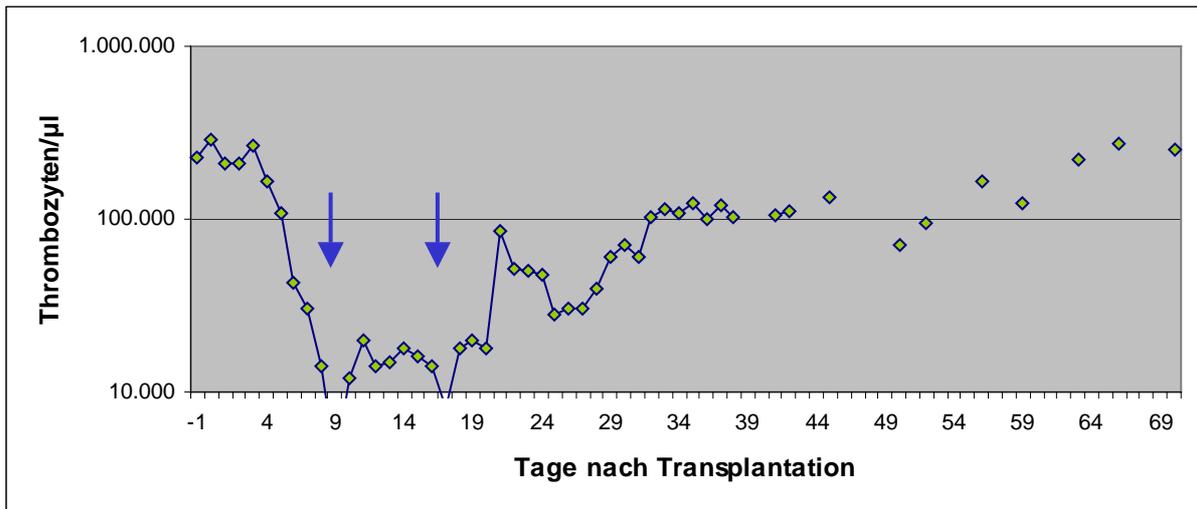


Abbildung 4.9.3b: Regeneration der Thrombozytenzahlen von Hund 742 nach Transplantation von CD6-depletiertem KM. Die Tage, an denen Thrombozytenkonzentrate verabreicht wurden, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

In der Phase der Leukopenie ab Tag 3 entwickelte der Rüde als Folge der Immunsuppression eine Entzündung des äußeren Gehörgangs, die mit Otomax® behandelt wurde. Das Allgemeinbefinden des Hundes blieb jedoch dadurch unverändert. An Tag 9 und Tag 17 wurden dem Rüden Thrombozytenkonzentrate gesunder Spendertiere verabreicht, welche die Folgen einer anhaltenden Thrombozytopenie abschwächen sollten.

Für die DLT wurden der Spenderhündin an Tag 20 durch Leukapherese $1 \cdot 10^9$ mononukleäre Zellen entnommen und dem Empfängertier transfundiert. Dies ergab eine zu transfundierende Zelldosis von $0,8 \cdot 10^8$ mononukleären Zellen pro kg Körpergewicht. Auch nach Transfusion der Spenderlymphozyten verschlechterte sich der Zustand des Tieres nicht und klinische Hinweise auf eine beginnende GvHD blieben aus. Lediglich die Leberenzyme im Serum stiegen massiv an, jedoch zeigte der Hund keinerlei klinische Symptome wie Übelkeit, zentralnervöse Störungen oder Ikterus.

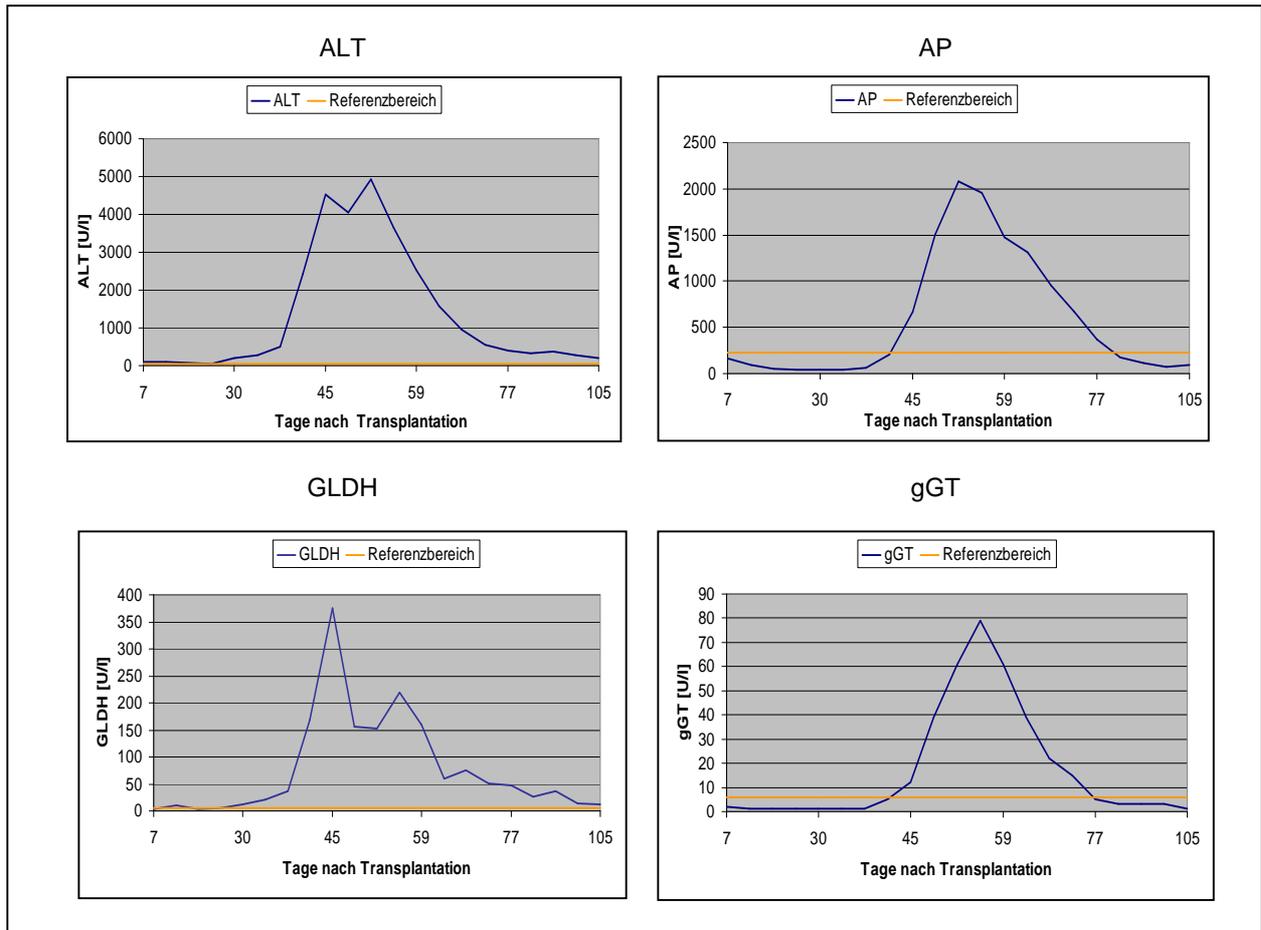


Abbildung 4.9.3c: Verlauf der Serumwerte von ALT, AP, GLDH und gGT nach KMT und DLT an Tag 20. Obwohl dem Rüden eine zu der von Hund 734 vergleichbare Anzahl an Spenderlymphozyten an Tag 20 nach KMT transfundiert wurde, konnte keine GvHD ausgelöst werden. Die Leberwerte im Serum stiegen zwar anfänglich an, fielen jedoch ab Tag 60 kontinuierlich ab und erreichten um Tag 100 wieder den Referenzbereich. Der Bilirubinwert (nicht gezeigt) überstieg zu keinem Zeitpunkt den Referenzbereich.

Trotz dieses starken Anstiegs der relevanten Leberserumwerte nach Transfusion der Spenderlymphozyten wurde die Leber durch diese DLT nicht nachhaltig geschädigt. Alle Leberwerte erreichten um Tag 80 wieder ihr Normalniveau und auch nach dieser Zeit war das Allgemeinbefinden des Hundes ungestört. Bilirubin, das bei einer GvHD der Leber auf jeden Fall ansteigt, war zu keinem Zeitpunkt erhöht. Die Spenderlymphozyten konnten also bei diesem Hund keine GvHD induzieren, obwohl analog zum Protokoll bei der Transplantation von Hund 734 verfahren wurde. Allerdings wurde der anfänglich gemischte Chimärismus zu einem vollen Chimärismus konvertiert (Tab. 4.9.3d).

Tag	Blut	KM
20	5%	25%
55	90%	100%
100	100%	100%

Tabelle 4.9.3d: Übersicht über den Grad des Spenderchimärismus nach KMT und DLT an Tag 20. Zwar konnte die DLT an Tag 20 keine GvHD induzieren, jedoch wurde der anfänglich gemischte Chimärismus zu einem vollen Spenderchimärismus konvertiert.

4.9.4 Hund 782 → Hund 786

In diesem Transplantationssystem sollte wiederum die Induzierbarkeit einer GvHD durch Verabreichung einer DLT untersucht werden. Da nach DLT an Tag 20 nur einer von zwei Hunden eine GvHD entwickelte, wurde die DLT nun auf Tag 14 vorverlegt. Es war nicht davon auszugehen, dass der Hund an diesem frühen Zeitpunkt nach der Transplantation bereits tolerant gegenüber Zellen des Spenders geworden war.

Aus 525 ml Knochenmark wurden $4,75 \cdot 10^9$ mononukleäre Zellen isoliert. Nach der CD6-Depletion konnten dem Hund $2,8 \cdot 10^8$ mononukleäre Zellen pro kg transfundiert werden. Durch diese hohe Zelldosis erholten sich die Leukozytenwerte des Hundes sehr schnell (Abb. 4.9.4a).

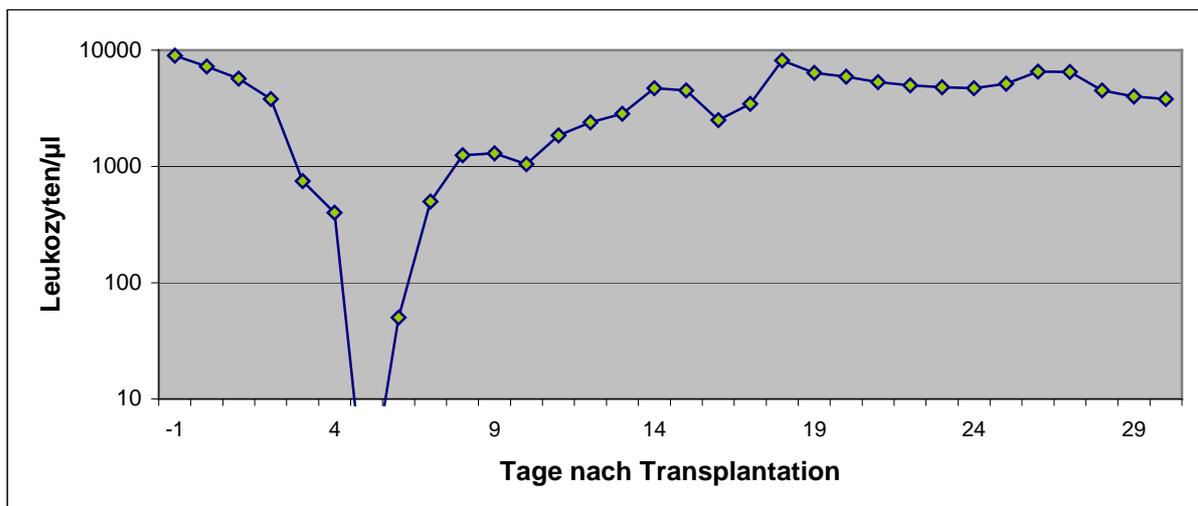


Abbildung 4.9.4a: Verlauf der Leukozytenzahl nach Transplantation von CD6-depletiertem KM und DLT an Tag 14. Die hohe Zellzahl, die transplantiert wurde ($2,8 \cdot 10^8$ MNC/kg) führte zu einer schnellen Erholung der Leukozytenzahlen.

Die Thrombozytenzahlen stiegen weniger schnell an und der Hund benötigte bis Tag 30 insgesamt vier Thrombozytenkonzentrate (Abb. 4.9.4b).

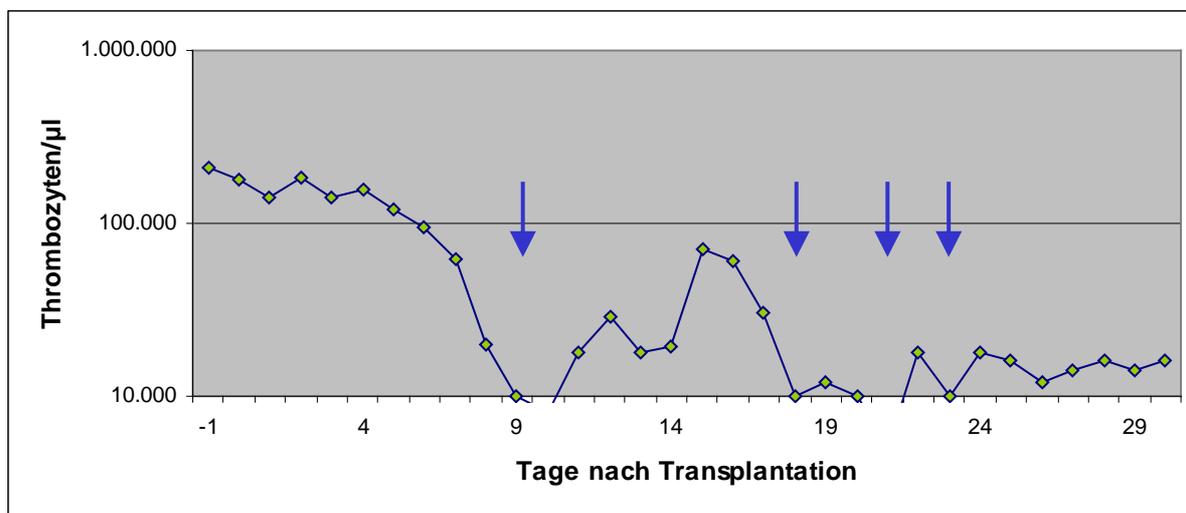


Abbildung 4.9.4b: Verlauf der Thrombozytenzahl nach Transplantation von CD6-depletiertem KM und DLT an Tag 14. Trotz Transplantation einer hohen Zellzahl und Transfusion von Spenderlymphozyten an Tag 14 stellte sich bis zur Euthanasie an Tag 30 keine Erholung der Thrombozytenzahl ein. Die Tage, an denen Thrombozytenkonzentrate verabreicht wurden, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

An Tag 14 erhielt der Hund eine Transfusion mit Lymphozyten des Spenders, um die Auslösbarkeit einer GvHD zu testen. Der Spenderhündin wurden dazu insgesamt $1,7 \cdot 10^9$ mononukleäre Zellen mittels Leukapherese entnommen und dem Empfängertier transfundiert, was eine Zelldosis von $1,13 \cdot 10^8$ mononukleäre Zellen pro kg Körpergewicht ergab. Die Transfusion der Spenderlymphozyten hatte zunächst keine Auswirkung auf das Allgemeinbefinden des Hundes. Erst ab Tag 20, also ca. eine Woche nach der DLT, verschlechterte sich das Allgemeinbefinden des Tieres. Der Hund verweigerte die Nahrungsaufnahme und zeigte Zeichen von Übelkeit. Ab Tag 19 hatte der Hund beiderseits eine hochgradige Konjunktivitis, die vermutlich ein erstes Anzeichen einer beginnenden Haut-GvHD war (Abb. 4.9.4c). Um eine Sekundärinfektion im Bereich der Augen zu verhindern, wurde zweimal täglich Refobacin Augensalbe in beide Augen gegeben. Zusätzlich zeigte der Hund ab Tag 20 blutigen Nasenausfluss gepaart mit einem Anschwellen der Nasenschleimhäute, was ihm die Atmung erschwerte. Die Nase wurde daraufhin zweimal täglich mit Kochsalzlösung vorsichtig gespült und dabei eventuelle Verkrustungen entfernt.

Bei der routinemäßigen Knochenmarkentnahme zur Chimärismusbestimmung an Tag 20 fiel an der rasierten Hautstelle eine unregelmäßige Rötung auf (Abb. 4.9.4c). Der Hund reagierte außerdem bei Berührung der Haut sehr empfindlich, was wiederum auf eine beginnende Manifestation einer GvHD in der Haut hindeutete.



Abbildung 4.9.4c: Hochgradige beidseitige Konjunktivitis und Rötung der Haut als Anzeichen einer beginnenden GvHD der Haut. Durch Transfusion von Lymphozyten des Spenders konnte nach Transplantation von CD6-depletiertem KM eine GvHD induziert werden, die Irritationen an Haut und Schleimhäuten hervorrief.

Ab Tag 20 stiegen die Leberwerte des Hundes stark an (Abb. 4.9.4d), was sich ab Tag 24 durch beginnenden Ikterus an den Schleimhäuten von Auge und Lefze sowie an der Ohrinnenseite zeigte. Diese ikterische Färbung der Schleimhäute nahm zu, während sich das Allgemeinbefinden des Hundes immer weiter verschlechterte. Neben Inappetenz zeigte der Hund anhaltende Übelkeit gepaart mit Erbrechen.

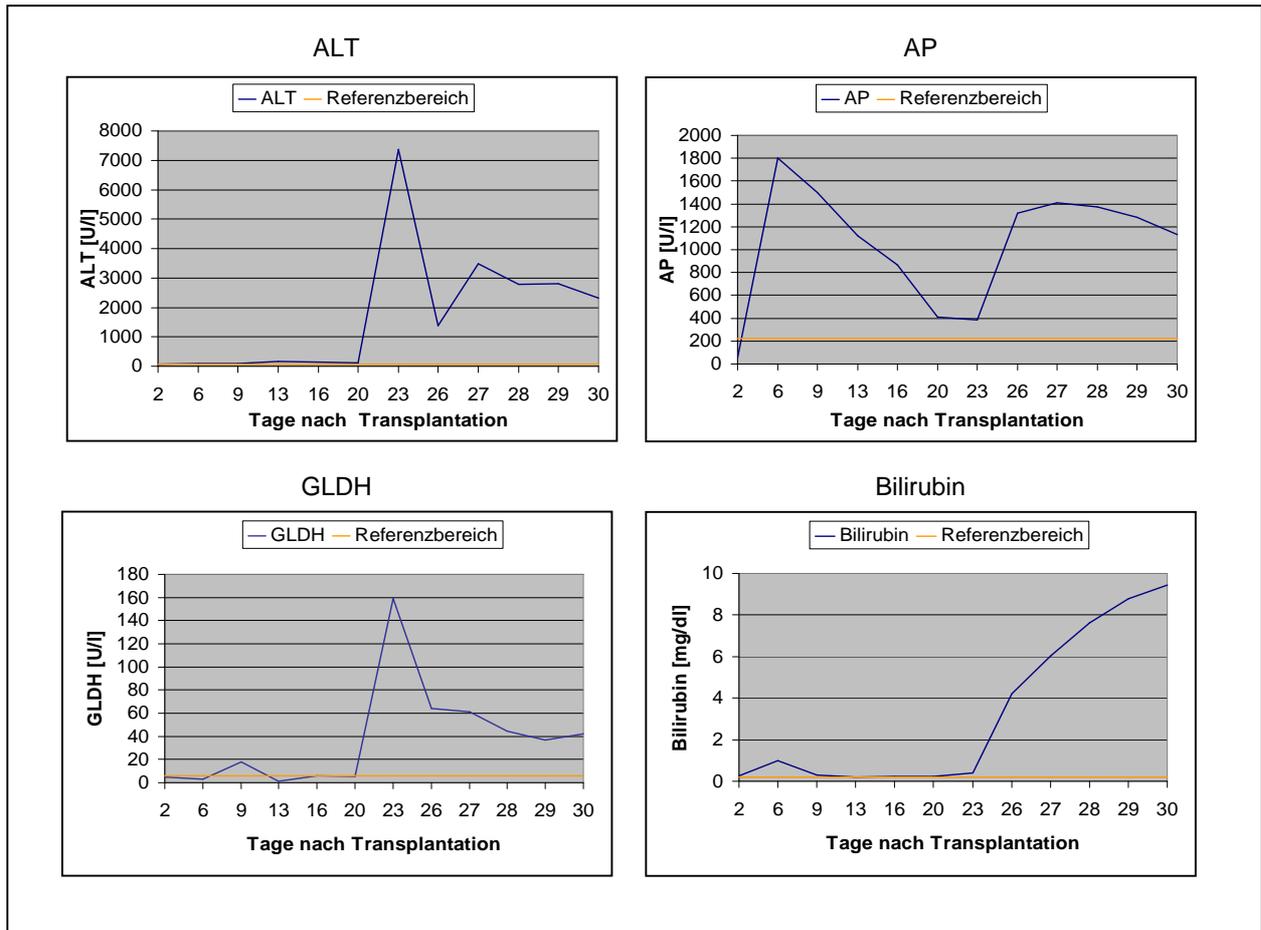


Abbildung 4.9.4d: Verlauf der Serumwerte von ALT, AP, GLDH und Bilirubin nach KMT und DLT an Tag 14. Etwa 6 Tage nach Transfusion der Spenderlymphozyten stiegen die Leberwerte im Serum des Hundes massiv an. Vor allem der Bilirubinwert, der für die Gradeinteilung der GvHD herangezogen wird, stieg um mehr als 45fach an.

An Tag 30 hatte sich der Allgemeinzustand des Tieres so weit verschlechtert, dass er euthanasiert wurde. Neben dem für eine GvHD der Leber typischen massiven Anstieg des Bilirubins zeigte die Leber auch bei der Sektion morphologische Veränderungen. Die Oberfläche zeigte gleichmäßig verteilte, dunkel verfärbte Stellen. Der deutliche Ikterus der Schleimhäute zeigte sich ebenfalls an der Intima der großen Gefäße sowie am subkutanen Fettgewebe.

Die vier durchgeführten Knochenmarktransplantationen zeigten eine generelle Induzierbarkeit einer GvHD in einem homo-hetero-Transplantationssystem nach T-Zelldepletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement und zusätzlicher Gabe von Spenderlymphozyten. Der Zeitpunkt der DLT sollte dabei vor Tag 20 liegen, da ab Tag 20 im beschriebenen System bereits die Möglichkeit einer Toleranz gegenüber den Spenderlymphozyten gegeben ist. Eine Zellzahl von $1,0 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht ist für die DLT ausreichend. Diese Zellmenge kann problemlos an einem Tag durch Leukapherese vom Spenderhund gewonnen werden, wobei die Belastung für diesen Hund minimal ist. Das beschriebene System bietet also so eine ideale Grundlage für alle Experimente, in denen eine GvHD induziert werden soll.

In Tabelle 4.10 sind alle durchgeführten Transplantationen in der Übersicht dargestellt.

4.10 Übersicht über alle durchgeführten Transplantationen mit CD6-depletiertem Knochenmark

Hund Nr.	DLA-match	MNC/kg	DLT	Leukoz. > 500/ μ l	Thromboz. > 20.000/ μ l	Chimärismus Tag 20	Chimärismus Tag 50	Chimärismus Tag 100	GvHD	Überleben
733	ho-he	$1,8 \cdot 10^8$	-	Tag 10	Tag 28	KM 100% Blut n.e.	KM 100% Blut 100%	KM 100% Blut 100%	-	> 1,5 Jahre
739	ho-he	$0,8 \cdot 10^8$	-	-	-	n.e.	-	-	-	32 Tage
701	ho-he	$2,0 \cdot 10^8$	-	Tag 8	Tag 20	KM 15% Blut 80%	KM 86% Blut 90%	KM 100% Blut 100%	-	> 1,5 Jahre
703	ho-he	$1,0 \cdot 10^8$	Tag 3 $0,9 \cdot 10^8$ MNCs	-	-	KM 100% Blut n.e.	-	-	?	14 Tage
734	ho-he	$1,7 \cdot 10^8$	Tag 20 $1,0 \cdot 10^8$ MNCs	Tag 7	-	KM 100% Blut 100%	-	-	+	32 Tage
742	ho-he	$2,2 \cdot 10^8$	Tag 20 $0,8 \cdot 10^8$ MNCs	Tag 13	Tag 21	KM 25% Blut 5%	KM 100% Blut 90%	KM 100% Blut 100%	-	> 1 Jahr
786	ho-he	$2,8 \cdot 10^8$	Tag 14 $1,1 \cdot 10^8$ MNCs	Tag 7	-	KM 100% Blut 100%	-	-	+	30 Tage
761	DLA=	$1,8 \cdot 10^8$	-	Tag 9	Tag 24	KM 82% Blut 0%	KM 100% Blut 75%	KM 100% Blut 100%	-	> 1 Jahr
769	DLA=	$1,7 \cdot 10^8$	-	Tag 7	Tag 17	KM 100% Blut 10%	KM 100% Blut 25%	KM 100% Blut 100%	-	> 1 Jahr

Tabelle 4.10: Übersicht der durchgeführten Transplantationen mit CD6-depletiertem KM. Von den insgesamt neun transplantierten Hunden wurden zwei in einem DLA-identischen Transplantationssystem durchgeführt. Sieben Transplantationen erfolgten im homo-hetero-System, dabei wurde vier Hunden an verschiedenen Tagen zusätzlich eine Transfusion von Lymphozyten des Knochenmarkspenders verabreicht. n.e. = nicht evaluierbar. ? = die klinischen Symptome deuteten auf eine GvHD hin, eine endgültige Diagnose konnte jedoch durch den kurzen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen nicht gestellt werden.

5 Diskussion

5.1 T-Zelldepletion mit ATG

ATG ist ein polyklonaler Antikörper gegen T-Zellen, der gewonnen wird, indem Kaninchen oder Pferde mit T-Lymphozyten immunisiert werden. Vor dem Einsatz in einem *in vivo* Transplantationssystem muss die Fähigkeit jeder ATG-Charge zur T-Zelldepletion durch verschiedene *in vitro*-Tests analysiert werden, und jede Charge wird mit Leber-, Nieren- und Plazentahomogenisat, sowie mit Erythrozyten inkubiert, um unspezifische Antikörperbestandteile zu entfernen (Rodt et al., *Transplant Proc* 1979). Die meisten ATG-Chargen besitzen zytotoxische Eigenschaften gegenüber CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD45, HLA-DR und Klasse I HLA (Bonney-Berard et al., *Transplantation* 1991). Da es sich bei ATG um einen polyklonalen Antikörper handelt, kann nicht genau gesagt werden, ob die T-zelltoxische Wirkung auf der Aktivierung von Komplement, auf Antikörper-abhängiger Zelltoxizität, auf Apoptose oder anderen Mechanismen beruht. Um eine zufrieden stellende T-Zelldepletion zu erreichen, kann ATG entweder im Rahmen der Konditionierung an mehreren Tagen intravenös verabreicht werden (*in vivo*), oder das Knochenmark wird vor der Transplantation für 30 Minuten mit einer bestimmten Menge an ATG vorinkubiert und nach dieser Zeit dem Empfänger transplantiert, ohne den Antikörper allerdings vorher wieder zu entfernen (*ex vivo*).

In der klinischen Anwendung wird ATG vor der Transplantation intravenös zur GvHD-Prophylaxe verabreicht. Damit konnten auch bei Hochrisiko-Patienten gute Ergebnisse erzielt werden (Storb et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; Weiden et al., *Transplantation* 1979).

Im Hundemodell wird ATG routinemäßig sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* zur T-Zelldepletion eingesetzt (Schumm et al., *Tissue Antigens* 1994; Kolb et al., *Transplantation* 1997 und 1979; Kolb et al., *Haematol Blood Transfus* 1980). In dieser Arbeit wurden zur T-Zelldepletion mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers ATG verschiedene Chargen ATG (6/00 und 10/05) eingesetzt, die beide in Zusammenarbeit mit der Firma Fresenius produziert worden waren.

Im *in vivo*-System wurde bei beiden ATG-Chargen ein verspätetes Anwachsen des Transplantats im autologen Transplantationssystem festgestellt. Als Vergleichswert wurde dazu eine Gruppe autolog transplantierte Hunde herangezogen, die dieselbe

Konditionierung - nämlich 10 Gy Ganzkörperbestrahlung - bekamen, und denen dieselbe Menge an mononukleären Zellen ($1 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht) transplantiert worden war. Da es sich bei ATG um einen polyklonalen Antikörper handelt, variieren die Eigenschaften stark von Charge zu Charge. In hohen Konzentrationen wirkt ATG stammzelltoxisch, jedoch darf es nicht zu stark verdünnt eingesetzt werden, da sonst die immunsupprimierende Aktivität nachlässt und keine ausreichende GvHD-Prophylaxe mehr betrieben werden kann. Die ausführlichen in vitro-Experimente, die für jede ATG-Charge neu durchgeführt wurden, sollten einen Anhaltspunkt darüber geben, in welcher Konzentration ATG gut an die T-Zellen bindet (Bindungstest), wie effizient dabei die zytotoxische Wirkung ausgeprägt ist (Zytotoxizitätstest) und ab welcher Konzentration die hämatopoetischen Zellen in ihrer Fähigkeit zur Bildung von Kolonien eingeschränkt werden (CFU-Assay). Der Bereich an Konzentrationen, in dem die jeweilige ATG-Charge zur effektiven T-Zelldepletion eingesetzt werden kann, ohne ein Anwachsen des Transplantats zu verhindern, ist meist sehr gering. Durch die autologen Knochenmarktransplantationen sollte die Konzentration herausgefunden werden, mit der das Anwachsen des Transplantats nicht verspätet erfolgt. Liegt diese Konzentration im Bereich, in dem eine zufrieden stellende T-Zelldepletion erfolgt, kann die Charge für allogene Knochenmarktransplantationen eingesetzt werden. Dies war nicht der Fall. Es wurde zwar eine Knochenmarktransplantation im DLA-identischen System durchgeführt, es konnte jedoch kein Anwachsen des Transplantats erreicht werden. Mit anderen ATG-Chargen konnte im Hundemodell im homo-hetero Transplantationssystem ein stabiles Anwachsen des Transplantats mit gleichzeitig effektiver Prävention einer GvHD erreicht werden (Kolb et al., Transplantation 1979).

Die erzielten Ergebnisse mit den vorhandenen ATG-Chargen zeigten die Notwendigkeit einer alternativen Methode zur T-Zelldepletion für Knochenmarktransplantationen auf.

5.2 T-Zelldepletion mit MT-606

Als Alternative zur T-Zelldepletion mit ATG wurden in früherer Zeit bereits mehrere monoklonale Antikörper gegen canine T-Zellen untersucht (Mysliwicz et al. Transplantation 1988). Diese waren aber nicht spezifisch genug, um in einem Transplantationssystem eingesetzt werden zu können.

Der monoklonale Mausantikörper MT-606 erkennt das humane CD6-Antigen (Reiter C., in Knapp et al., Leukocyte typing IV, 1989). Er zeigt eine Kreuzreaktion mit Hundezellen und bindet an ca. 70% der PBMCs. Im Hundemodell konnten bereits gute Erfolge mit der Transplantation von CD6-depletiertem Knochenmark erzielt werden (Schumm et al., Prog Clin Biol Res 1992 und Tissue Antigens 1994). Deshalb wurde der CD6-Antikörper auf seine Fähigkeit untersucht, die Komplementkaskade zu aktivieren. In einem Vorversuch wurde zunächst ausgetestet, in welcher Konzentration der Antikörper für die nachfolgenden Versuche einzusetzen war. Es sollte so viel Antikörper verwendet werden, dass sich die Zellbindung im Sättigungsbereich befindet. Zu hohe Antikörperkonzentrationen resultieren allerdings in unspezifischer Bindung an Zellen, die nicht notwendiger Weise positiv für das jeweilige Antigen sind. Der Antikörper MT-606 wies bereits in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{g}/10^6$ Zellen eine ausreichende Bindung an alle CD6-positiven Zellen auf und wurde in dieser Konzentration für alle nachfolgenden Experimente eingesetzt.

Die Depletionsmethode mit Kaninchenkomplement, die sich in Kombination mit MT-606 als effektive CD6-Depletionsmethode herausstellte, hat im Gegensatz zur Depletion mit Hilfe von paramagnetischen Partikeln entscheidende Vorteile. Neben dem finanziellen Aspekt ist die Methode mit Kaninchenkomplement einfach durchführbar und kann problemlos auf eine große Zellmenge, wie sie zur Transplantation benötigt wird, ausgeweitet werden. Die hämatopoetischen Stammzellen werden durch das Kaninchenkomplement nicht angegriffen, was durch unverändertes Verhalten im CFU-Assay gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zu Soiffer et al. (J Clin Oncol 1992), die zur vollständigen CD6-Depletion eine dreimalige Inkubation mit CD6-Antikörper und Kaninchenkomplement anwendeten, war die Depletion bereits nach einer einzigen Inkubation mit MT-606 und Kaninchenkomplement zufrieden stellend. Der zeitliche Aufwand, den Sao et al. (Int J Hematol 1999) als bedeutendsten Vorteil der Depletionsmethode mit magnetischen Partikeln gegenüber der Depletionsmethode mit Komplement erwähnen, war in der vorliegenden Arbeit bei der Komplementmethode deutlich geringer, als bei der Depletion mit magnetischen Partikeln.

Die Depletion der CD6-positiven Zellen ging einher mit einer nahezu vollständigen Depletion der CD4-positiven Zellen, wohin gegen die CD8-positiven Zellen nur teilweise depletiert wurden. Damit konnten die Beobachtungen von Schumm et al. (Tissue Antigens 1994) bestätigt werden.

Ein Nachteil der Depletionsmethode mit Komplement ist, dass die Positivfraktion nicht weiter analysiert werden kann. Da für die MLC-Ansätze allerdings diese Positivfraktion als Kontrolle mitgeführt werden sollte, wurde die CD6-Depletion sowohl mit dem Dynabead- als auch mit dem MACS-System etabliert. In beiden Fällen werden die CD6-positiven Zellen an magnetische Partikel gebunden und stehen nach der Depletion zur weiteren Analyse zur Verfügung. Auch mit dieser Methode konnte durch die CD6-Depletion eine vollständige CD4-Depletion bei nur unvollständiger CD8-Depletion erreicht werden (Abb. 4.7).

5.3 Transplantation von KM nach CD6-Depletion mit MT-606 und rbC

Die in vitro erzielten Ergebnisse mit durch MT-606 und Kaninchenkomplement CD6-depletiertem Knochenmark waren viel versprechend, so dass diese Methode zur T-Zelldepletion in vivo eingesetzt wurde.

Als Transplantationssystem wurde das homo-hetero-System gewählt. Der Spender ist dabei DLA-homozygot, der Empfänger DLA-heterozygot und besitzt einen mit dem Spender gemeinsamen Haplotyp. Daraus resultiert eine starke Reaktion in der GvH-Richtung, wohin gegen die Reaktion des Empfängers gegen den Spender nur minimal ausgeprägt ist. Das homo-hetero-System ist damit ein starkes GvH-System, das in diesem Fall eingesetzt wurde, um zu überprüfen, ob die CD6-Depletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement ausreicht, um eine GvHD zu verhindern.

Zwei von insgesamt drei transplantierten Hunden zeigten nach Transplantation von CD6-depletiertem KM ein schnelles Anwachsen des Transplantats und eine prompte Erholung von Leukozyten- und Thrombozytenwerten. Ihnen wurden zwischen $1,8$ und $2,0 \cdot 10^8$ MNCs/kg transplantiert. Ein Hund musste an Tag 32 nach der Transplantation in totaler Aplasie eingeschläfert werden. Die transplantierte Zellzahl von $0,8 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht war nicht ausreichend für ein Anwachsen des Transplantats. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Schumm et al. (Tissue Antigens 1994), die in einem haploidentischen Transplantationssystem ein stabiles Anwachsen des Transplantats erst ab einer Zelldosis von $0,9 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht erreichen konnten.

Bodenberger et al. (Exp Hematol 1980) konnten zeigen, dass schon eine Zelldosis von $0,55 \cdot 10^7$ MNCs/kg in autolog transplantierten Hunden nach fraktionierter Bestrahlung

zu einer kompletten Erholung des hämatopoetischen Systems führt. Im homo-hetero-System nach T-Zelldepletion mit MT-606 und Kaninchenkomplement erwies sich diese Zelldosis jedoch als nicht ausreichend, und auch in anderen Untersuchungen im homo-hetero-System wurden den Hunden immer deutlich höhere Zellzahlen transplantiert (Kolb et al., Transplantation 1979).

Keiner der mit CD6-depletierter Knochenmark transplantierten Hunde zeigte klinische Anzeichen einer GvHD. Eine ähnliche Beobachtung machten Schumm et al. (Tissue Antigens 1994), die elf im homo-hetero-System transplantierte Hunde untersuchten. Eine GvHD-Prophylaxe wurde dabei durch CD6-Depletion mit magnetischen Partikeln durchgeführt. Von den elf Hunden stießen zwar vier das Transplantat ab, allerdings entwickelte nur ein Hund eine GvHD. Die CD6-Depletion ist also als alleinige GvHD-Prophylaxe einsetzbar, was neben dem homo-hetero-System auch an Hand von zwei Transplantationen im DLA-identischen System gezeigt werden konnte.

Die Analyse des Chimärismus fand routinemäßig an den Tagen 20, 50, 100, 365 und danach jährlich statt. Nach Transplantation von CD6-depletierter Knochenmark hatte nur eine Hündin schon ab Tag 20 einen vollen Spenderchimärismus, alle anderen Hunde waren anfänglich gemischte Chimären. Dies bedeutet, dass in Knochenmark und Blut sowohl Zellen des Spenders als auch Zellen des Empfängers gefunden wurden. Da es sich bei Spender und Empfänger immer um Hunde unterschiedlichen Geschlechts handelte, wurde der Grad des Chimärismus durch Analyse der Geschlechtschromosomen festgestellt.

Es ist bereits bekannt, dass im Hundemodell die Transplantation von CD6-depletierter Knochenmark meist in einem anfänglich gemischtem Chimärismus resultiert (Schumm et al., Tissue Antigens 1994). Auch bei Patienten, die T-zelldepletieretes Knochenmark erhielten, trat ein gemischter Chimärismus auf (Bretagne et al., Blood 1987). Ab Tag 100 nach der Transplantation hatten aber alle Hunde zu 100% die Zellen ihres jeweiligen Knochenmarkspenders in Blut und Knochenmark.

Die Hauttransplantation nach einer Knochenmarktransplantation ist eine gängige Methode zur Überprüfung der Toleranz gegenüber dem Spenderorganismus (Kolb et al., Transplantation 2003 und 1997; Slavin et al., Diabetes 1980; Rapaport et al., J Clin Invest 1978). Bei einer Hündin wurde eine Hauttransplantation des Spenders an Tag 121 durchgeführt. Das transplantierte Hautstück wuchs bei der Hündin problemlos an, da sie zum Zeitpunkt der Hauttransplantation bereits vollständig tolerant gegenüber den Spenderzellen geworden war. Es ist durchaus vorstellbar, dass eine

Stammzelltransplantation mit resultierendem vollen Chimärismus und damit Toleranz gegenüber dem Spenderorganismus als Wegbereiter für eine nachfolgende Organtransplantation verwendet werden könnte. Dies hätte den Vorteil, dass der Organempfänger nicht wie bisher ein Leben lang auf immunsupprimierende Medikamente angewiesen wäre. Allerdings müssten dazu die transplantationsbedingten Nebenwirkungen und das potenzielle Auftreten einer GvHD noch besser kontrollierbar sein. Im Hundemodell wurde die Knochenmarktransplantation bereits erfolgreich als Wegbereiter für Nieren- und Herztransplantationen eingesetzt (Kahn et al., J Thorac Cardiovasc Surg 1980; Strober et al., Transplant Proc 1979).

5.4 Suppressoraktivität von CD6-depletierten Knochenmarkzellen

Da sich die Transplantation von CD6-depletierten Knochenmarkzellen als geeignet zur Prophylaxe einer GvHD im in vivo-System herausgestellt hatte, sollte untersucht werden, ob dieser regulatorische Effekt auch in der gemischten Lymphozytenkultur durch Hemmung der Lymphozytenproliferation nachzuweisen war. Obwohl in der klinischen Anwendung bereits hervorragende Ergebnisse mit der Kotransplantation von CD6-depletierten Stammzellen zur GvHD-Prophylaxe im haploidentischen Transplantationssystem erzielt wurden (Kolb et al., Transplantation 2003; Kolb, unveröffentlichte Daten), konnte der zu Grunde liegende Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

In diesem Zusammenhang haben Kaufman et al. (Blood 1994) den Begriff „Vermittlerzellen“ (engl. „facilitator cells“) geprägt. Sie beschreiben damit diejenigen Zellen, die für ein stabiles Anwachsen der hämatopoetischen Stammzellen im Empfängerorganismus verantwortlich sind. Diese sind nach den Untersuchungen von Kaufman et al. CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen, die jedoch keinen T-Zellrezeptor besitzen. Da bei der CD6-Depletion die CD3⁺CD8⁺ Zellfraktion nicht depletiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass diese Vermittlerzellen sich in der CD6-negativen Zellpopulation befinden und daher das rasche und komplikationslose Anwachsen des Transplantats bedingen. Die genauere Charakterisierung dieser Vermittlerzellen im Hundemodell scheitert jedoch an der Verfügbarkeit passender Antikörper, so dass auf einen funktionellen Nachweis, nämlich die Unterdrückung der Zellproliferation in der gemischten Lymphozytenkultur zurückgegriffen wurde.

Das Prinzip der gemischten Lymphozytenkultur besteht darin, dass T-Zellen eines Spenders die Zellen eines anderen Spenders als fremd erkennen und dann beginnen zu proliferieren. Das Ausmaß der Proliferation kann durch verschiedene Methoden evaluiert werden. In dieser Arbeit wurde einerseits der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen, andererseits wurde die Zellproliferation durch Weitergabe des Farbstoffs CFSE an die Tochterzellen sichtbar gemacht und quantifiziert. Durch Bestrahlung einer der beiden Zellfraktionen erhält man in der gemischten Lymphozytenkultur eine Reaktion in nur eine Richtung.

Zu Beginn der Experimente wurden zunächst die Zellkulturbedingungen ausgetestet. Im Speziellen wurde dabei untersucht, in welcher Konzentration Hundeserumpool eingesetzt werden konnte, und ob dieser durch einen standardisierten serumfreien Zellkulturzusatz ersetzbar war. Da Serum immer eine mögliche Quelle für undefinierte lösliche Stoffen, wie z.B. Zytokine, Zytokinantagonisten, lösliche Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle darstellt, die unter Umständen das Wachstumsverhalten der Zellen in der MLC beeinflussen könnten, wurde als Alternative zu HSP auch Panexin als serumfreier Zellkulturzusatz ausgetestet. In diesem System war allerdings kaum eine Proliferation der Lymphozyten nach allogener Stimulation zu verzeichnen, weshalb für alle Experimente auf Hundeserumpool zurückgegriffen wurde. Die einzelnen Chargen an HSP unterscheiden sich deutlich voneinander, so dass die anfänglich getestete Charge für alle nachfolgenden Experimente verwendet wurde.

Bei den Vorversuchen fiel auf, dass eine zu hohe Konzentration an HSP zu einer unspezifischen Proliferation der Zellen führte. Der Serumzusatz wurde so gewählt, dass die autologen Kontrollen in der MLC, die als Negativkontrollen dienten, möglichst unter 1000 cpm lagen, wohin gegen nach allogener Stimulation eine ausreichende Proliferation zu verzeichnen sein musste.

Die erzielten Ergebnisse waren sehr heterogen. Es konnte zwar in einigen Fällen eine Suppression der Lymphozytenproliferation in der MLC nachgewiesen werden, jedoch war diese dann nicht spezifisch beschränkt auf die CD6-negative Zellpopulation. In den Fällen, in denen die CD6-negativen Knochenmarkzellen die MLC-Reaktion abschwächen konnten, resultierte auch die Zugabe von undepletiertem Knochenmark in einer geringeren Lymphozytenproliferation. Dies alleine widerspricht noch nicht der Hypothese, dass CD6-negative Knochenmarkzellen eine regulatorische Funktion in der MLC übernehmen. Geht man nämlich davon aus, dass eine ganz bestimmte Zellpopulation für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden kann, so ist diese

Zellpopulation natürlich auch schon im undepletierten Knochenmark vorhanden. Durch die CD6-Depletion würde diese dann angereichert werden, weshalb man hier eine stärkere Unterdrückung der Lymphozytenproliferation erwarten würde. Dies war allerdings nicht der Fall.

Die Zellen für die MLC wurden durch Dichtezentrifugation isoliert. Dabei sollten sich zwar in der Mittelschicht nur die mononukleären Zellen anreichern, jedoch fiel sowohl bei der mikroskopischen Beurteilung als auch bei der Analyse der Zellen im Durchflusszytometer immer eine mehr oder weniger starke Verunreinigung durch Granulozyten auf. Dies könnte der Grund sein, warum die Lymphozytenproliferation unterschiedlich ausfällt. Sollte ein hoher Anteil an Granulozyten die MLC-Reaktion an sich schon hemmen, könnte die regulatorische Wirkung der CD6-depletierten Zellen diesem Effekt unterlegen sein und sich so nicht weiter darstellen lassen. Dies wäre eine Erklärung, warum eine niedrige Ausgangsproliferation nach allogener Stimulation nicht weiter gehemmt werden kann (s. Abb. 4.8.2.1a: B→A*).

Wenn ein regulatorischer Effekt tatsächlich in der CD6-negativen Zellpopulation begründet liegt, sollte dieser in der CD6-positiven Fraktion nicht zu verzeichnen sein. In einigen Experimenten wurde daher die CD6-positive Fraktion mitgeführt. Da diese an die magnetischen Partikel gekoppelt war, wurde auch die Reaktion von magnetischen Partikeln alleine in der MLC untersucht. Dabei fiel auf, dass Dynabeads die Reaktion in der MLC massiv unterdrücken (Abb. 4.8.2.1c). Dies liegt vermutlich an der Größe der magnetischen Partikel. Mit einem Durchmesser von 4,5 µm sind sie groß genug, um den Zell-zu-Zell Kontakt der zwei MLC-Partner zu unterbinden, was darin resultiert, dass keine Erkennung einer fremden Zelle und damit auch keine Proliferation stattfindet. Der zu verzeichnende suppressive Effekt der CD6-positiven Fraktion ist also lediglich darauf zurück zu führen, dass diese Zellen an Dynabeads gebunden waren. In späteren Experimenten wurden daher Micro Beads der Firma Miltenyi zur magnetischen Zelldepletion eingesetzt, welche mit einem Durchmesser von ca. 50 nm die MLC-Reaktion nicht unterdrückten (Abb. 4.8.2.2c).

Die Messung der Zellproliferation durch den Fluoreszenzfarbstoff CFSE stellt eine Alternative zur Messung des Einbaus von ³H-Thymidin dar. Vorteile dieser Methode sind neben dem Gebrauch einer im Gegensatz zu ³H-Thymidin nicht-radioaktiven Substanz die einfache Probenvorbereitung, eine simple Datenerhebung am FACS-Gerät und die Möglichkeit, die proliferierende Zellpopulation durch Gegenfärbung mit einem Antikörper genau charakterisieren zu können (Lyons, J Immunol Methods 2000).

In einem Vorversuch wurde getestet, ob die Methode der Färbung mit CFSE auf canine Zellen übertragbar ist. Dazu wurden PBMCs mit PHA bzw. durch allogene DLA-inkompatible PBMCs eines anderen Hundes stimuliert und die Proliferation an sieben aufeinander folgenden Tagen gemessen. Es fiel ein deutlicher Unterschied zwischen mit PHA stimulierten Zellen und denen nach allogener Stimulation auf. Die mit PHA stimulierten Zellen zeigten das für CFSE typische Proliferationsmuster mit mehreren dicht beieinander liegenden Fluoreszenzpeaks, von denen jeder Peak auf einen Teilungszyklus hindeutet. Die Zellproliferation konnte dabei ab dem zweiten Tag nach Stimulation beobachtet werden. Die Zellen nach allogener Stimulation bildeten nur einen großen Peak links des Ausgangspeaks, welcher ab Tag 5 zu erkennen war. Aus diesem Grund wurden für nachfolgende Experimente die Tage 5 bis 7 zur Messung der Zellproliferation festgelegt.

Vor der Messung wurde zu jeder Probe eine definierte Anzahl an Kalibrationsbeads gegeben. Das FACS-Gerät wurde so eingestellt, dass die Messung gestoppt wurde, sobald 2000 Kalibrationsbeads gezählt wurden und nicht wie üblicher Weise nach der Messung einer bestimmten Zellzahl. Durch diese Vorgehensweise wurde die nach der Proliferation der Lymphozyten höhere Gesamtzellzahl in der Auswertung insofern berücksichtigt, dass dann auch eine höhere Zellzahl gemessen wurde. Durch Beurteilung des Proliferationspeaks nach allogener Stimulation und Vergleich mit den Peaks der Proben, zu denen undepletiertes KM, CD6-depletiertes KM oder CD6-positives KM gegeben wurde, konnte eine Aussage über eine Suppression der MLC-Reaktion getroffen werden. Aus Abb. 4.8.2.2b geht hervor, dass eine gute Proliferation erst an Tag 6 zu verzeichnen ist. Undepletiertes Knochenmark wirkte sich bis zu diesem Tag supprimierend auf die Zellproliferation aus, was durch einen deutlich verkleinerten Peak links des Ausgangspeaks ersichtlich ist. Je weniger KM-Zellen zu der MLC gegeben wurden, desto geringer fiel die Suppression aus. Dieser Effekt war allerdings an Tag 7 nicht mehr zu beobachten. Die Peakhöhen der allogenen Kontrolle und der Ansätze mit KM-Zellen waren dann annähernd gleich.

Das CD6-depletierte Knochenmark zeigte auch im Ansatz mit CFSE keine hemmende Wirkung auf die Lymphozytenproliferation. Ein deutlicher Unterschied zum Ansatz mit ³H-Thymidin war, dass die an Dynabeads gekoppelten CD6-positiven Zellen keine Hemmung der MLC-Reaktion bedingten, wohin gegen die reinen Dynabeads, wie in allen vorherigen Experimenten auch, die Proliferation an allen Messtagen deutlich unterdrückten. Die Gründe für diesen Effekt sind nicht bekannt. Da reine Dynabeads

eine Lymphozytenproliferation unterdrücken können, gilt dies natürlich auch für die an Dynabeads gekoppelten CD6-positiven Zellen.

In einem weiteren MLC-Experiment mit CFSE erfolgte die Auswertung quantitativ. Die proliferierten bzw. nicht-proliferierten Zellen wurden mit Hilfe der CellQuest-Software quantifiziert und der Grad der Proliferation in Relation zu dem der autologen Kontrolle gesetzt. Dies erfolgte für ein Experiment, in der die reine Beurteilung der Fluoreszenzspeaks kein so eindeutiges Ergebnis lieferte wie in Abb. 4.8.2.2b. In diesem Ansatz (Abb. 4.8.2.2c) wirkten sich die Knochenmarkzellen stimulatив auf die Proliferation der Lymphozyten aus und sowohl nach Zugabe von vollem KM, als auch nach Zugabe der CD6-negativen bzw. der CD6-positiven Fraktion, erfolgte eine Steigerung der Lymphozytenproliferation.

Da im Gegensatz zu den Beobachtungen im humanen System (Kolb et al., Transplantation 2003) in keinem der durchgeführten Experimente eine reproduzierbare Suppression der CD6-negativen Knochenmarkzellen festgestellt werden konnte, stellte sich die Frage, ob das hier verwendete MLC-System nicht geeignet für den Nachweis eines solchen Effekts ist.

Aus der Literatur ist bekannt, dass mesenchymale Stammzellen eine hohe Potenz besitzen, die MLC-Reaktion zu unterdrücken (Rasmusson et al., Exp Cell Res 2005). Daher wurden mesenchymale Stammzellen eines Hundes erzeugt und in wie in der Literatur beschriebenen Konzentrationen in der MLC eingesetzt. Die Reaktion der MLC konnte daraufhin auf das Niveau der autologen Kontrolle gesenkt werden, und zwar unabhängig davon, ob der Spender der mesenchymalen Stammzellen als Stimulator, Responder oder weder als Stimulator noch als Responder in der MLC fungierte (Abb. 4.8.3a). Die mesenchymalen Stammzellen konnten auch die Lymphozytenproliferation nach Stimulation durch PHA unterdrücken (Abb. 4.8.3b), was auch in der Literatur bereits beschrieben ist (Rasmusson et al., Exp Cell Res 2005; Le Blanc et al., Scand J Immunol 2004).

Durch den Einsatz von mesenchymalen Stammzellen in der MLC wurde gezeigt, dass das etablierte System an sich funktioniert. Die CD6-negativen Knochenmarkzellen zeigten im Hundemodell eine sehr gute Fähigkeit zur Prävention einer GvHD. Der Effekt, der sich dahinter verbirgt, war allerdings mit einem MLC-System nicht nachweisbar.

Es existieren verschiedene Hypothesen darüber, welche Zellpopulation für die Induktion der Graft-versus-Host-Toleranz verantwortlich zu machen ist. Im Mausmodell wurde

eine CD8⁺ Zellfraktion gefunden, die das Anwachsen des Transplantates beschleunigte (Kimberly et al., *Immunity* 1999) und die Entstehung einer GvHD effektiv unterdrücken konnte (Colson et al., *Blood* 2004). Da bei der CD6-Depletion die CD8⁺ Zellen weitestgehend erhalten bleiben (Abb. 4.3d), könnte diese Population für den beobachteten Effekt verantwortlich sein. Eine CD3-CD8⁺ Zellpopulation konnte auch bei Untersuchungen am Affen durch die Produktion von TGF- β 1, einem inhibitorischen Zytokin, das zur Induktion der Apoptose in der Zielzelle führt, einer GvH-Reaktion entgegen wirken (Asiedu et al., *Transplantation* 1999). Im humanen System war ein suppressiver Effekt CD6-depletierter Knochenmarkzellen in der MLC nachweisbar und konzentrierte sich dabei auf die CD6-negative, CD8-positive Zellpopulation (Kolb et al., *Transplantation* 2003). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit im Hundemodell allerdings nicht bestätigt werden.

Basierend auf den beschriebenen Beobachtungen wurde ein klinisches Protokoll zur haploidentischen Stammzelltransplantation entwickelt, bei dem der Patient an Tag 0 undepletiertes Knochenmark und zusätzlich an Tag 6 CD6-depletierte Stammzellen des selben Spenders erhält, die zuvor mit G-CSF und SCF aus dem Knochenmark mobilisiert und durch Leukapherese gewonnen wurden. Durch diese doppelte Verabreichung von hämatopoetischen Stammzellen erhofft man sich ein gutes Anwachsen des Transplantats, wobei die GvH-Reaktion effektiv durch die in den CD6-depletierten Stammzellen enthaltenen Suppressorzellen verhindert wird. Bislang konnten viel versprechende Ergebnisse mit einer zufrieden stellenden Überlebensrate, einer relativ geringen Rezidivrate und einer guten Unterdrückung der GvH-Reaktion erzielt werden (Kolb et al., *Transplantation* 2003).

Neben den CD8⁺ Zellen werden auch anderen Zellpopulationen suppressive Eigenschaften zugesprochen. Die Beobachtungen von Soiffer et al. (*Blood* 1990) zeigten, dass bei der CD6-Depletion die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) nicht depletiert werden. Es könnte also auch sein, dass diese für den beobachteten Effekt einer Unterdrückung der GvH-Reaktion in vivo verantwortlich sind. Günther et al. (*Tissue Antigens*, 1994) konnten allerdings im Hundemodell mit in vitro-Tests zeigen, dass zwar die Aktivität von NK-Zellen in der CD6-negativen Zellpopulation der PBMCs verstärkt ist, jedoch die CD6-Depletion im Knochenmark die NK-Aktivität nicht signifikant beeinflusste.

Sakaguchi et al. charakterisierten im Mausmodell CD4⁺CD25⁺ Zellen, welche die Entstehung von Autoimmunerkrankungen unterdrücken konnten (*J Immunol* 1995).

Weitere Untersuchungen fanden heraus, dass diese Zellen auch für die Transplantationstoleranz verantwortlich sind (Gregori et al., J Immunol 2001; Adeegbe et al., J Immunol 2006), und es wurden unterschiedliche Gene charakterisiert, welche den regulatorischen Zellen eigen sind (Colson et al., Blood 2004).

So existieren viele Ansätze, Suppressorzellen zu charakterisieren. Daraus ergibt sich ein kompliziertes Bild an verschiedenen Zellpopulationen, die untereinander in Wechselwirkung treten und die Immunantwort beeinflussen. Die Zellpopulation, die im CD6-depletierten Knochenmark für die Induktion der Graft-versus-Host-Toleranz verantwortlich ist, konnte bislang jedoch noch nicht identifiziert werden. Ziel weiterer Untersuchungen, in denen das Hundemodell eine entscheidende Rolle spielen wird, wird es sein, die Suppressorzellen zu charakterisieren und deren Mechanismus soweit aufzuklären, dass sie gezielt für eine GvHD-Prophylaxe eingesetzt werden können.

5.5 Transfusion von Spenderlymphozyten nach allogener KMT zur Induktion einer GvHD

Bei der allogenen Stammzelltransplantation stellt eine auftretende Graft-versus-Host Krankheit selbst nach prophylaktischer Vorbehandlung nach wie vor ein schwer beherrschbares Risiko für den Patienten dar. Um dem Auftreten einer GvHD vorzubeugen, wird vor der Transplantation eine T-Zelldepletion durchgeführt. Die T-Zelldepletion bei Leukämiepatienten kann zwar das Risiko einer GvHD verringern (Henslee et al., Transplant Proc 1987; Prentice et al., Lancet 1984; Rodt et al., Transplant Proc 1979), dadurch steigt allerdings auch das Risiko eines Rückfalls in die Leukämie (Goldman et al., Ann Intern Med 1988). Die für eine GvHD verantwortlichen T-Zellen des Stammzellspenders bedingen nämlich ebenso den Graft-versus-Leukämie Effekt (Horowitz et al., Blood 1990). Dieser ist gerichtet gegen Leukämiezellen, die selbst nach intensiver Chemo- und Radiotherapie nicht vollständig eliminiert werden können (Horowitz et al., Blood 1990; Brenner et al., Leukemia 1992). Eine T-Zelldepletion des Transplantats geht deshalb einher mit einem Verlust der antileukämischen Wirkung, was zu einer hohen Rezidivrate führt (Goldman et al., Ann Intern Med 1988). Eine Trennung des GvL-Effekts vom GvH-Effekt kann durch Transplantation T-zelldepletierter Stammzellen mit nachfolgender Transfusion von Spenderlymphozyten zur adoptiven Immuntherapie erreicht werden. Dies birgt aber das

Risiko einer schweren, im schlimmsten Fall lebensbedrohlichen GvHD (Weiden et al., J Immunol 1976). In dieser Arbeit wurde das System einer induzierbaren GvHD durch die Transplantation von CD6-depletiertem Knochenmark und anschließender Transfusion von Spenderlymphozyten etabliert. Dieses erlaubt nun die Untersuchung neuer therapeutischer Ansätze und deren Optimierung im präklinischen Hundemodell.

Die adoptive Immuntherapie, bei der nach der Knochenmarktransplantation Lymphozyten des Spenders transfundiert werden, scheint viel versprechend zu sein, um die Nebenwirkungen einer T-Zelldepletion auszugleichen. Die durch adoptive Immuntherapie transfundierten T-Zellen konnten bei CML-Patienten nach allogener Stammzelltransplantation eine langanhaltende Remission erzeugen (Kolb et al., Blood 1990), und die positiven Effekte der DLT wurden in vielen Studien bestätigt (Drobyski et al., Bone Marrow Transplant 1992; Helg et al., Bone Marrow Transplant 1993; Kolb et al., Blood 1995; Collins et al., J Clin Oncol 1997).

Die DLT geht immer einher mit dem Risiko einer schweren GvHD. Eine Untersuchung im DLA-identischen Transplantationssystem konnte zeigen, dass die DLT bis zwei Monate nach der Transplantation eine GvHD auslöste. Zu einem späteren Zeitpunkt bewirkten die Spenderlymphozyten keine GvHD mehr, da der Spender dann bereits tolerant gegenüber dem Empfängerorganismus geworden war (Kolb et al., Transplantation 1997). In dieser Arbeit sollten analoge Untersuchungen im homo-hetero-System durchgeführt werden.

Nach Transplantation von CD6-depletiertem Knochenmark konnte bei drei Hunden durch DLT eine klinische GvHD ausgelöst werden. Der Zeitpunkt der DLT-Gabe war entweder an Tag 3, Tag 14 oder Tag 20. Bei einem weiteren Hund (742) konnte durch DLT an Tag 20 keine GvHD ausgelöst werden. Dieser Hund hatte im Gegensatz zu Hund 734, bei dem die DLT an Tag 20 eine GvHD auslöste, allerdings noch einen gemischten Chimärismus, der erst durch die DLT zu einem vollen Spenderchimärismus konvertierte. Offensichtlich spielte dies eine entscheidende Rolle, denn abgesehen vom Grad des Chimärismus waren die Versuchsbedingungen bei beiden Hunden dieselben (Tabelle 4.10).

Ebenso könnten regulatorische T-Zellen für diesen Effekt verantwortlich gewesen sein. Es wäre denkbar, dass bei Hund 742 eine beginnende GvHD, die sich durch anfänglichen Anstieg der Leberenzyme darstellte (Tab. 4.9.3c), durch die Entstehung von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen wieder unterdrückt wurde. Leider stehen für

den Hund bislang keine passenden Antikörper zur Verfügung, um diese Hypothese zu bestätigen.

Auch bei den Untersuchungen von Kolb et al. (Transplantation 1997) konnte in einer Gruppe von sechs Hunden ein anfänglich gemischter Chimärismus nach der DLT in einen vollen Spenderchimärismus umgewandelt werden, ohne eine GvHD auszulösen, wenn die DLT erst an Tag 61 und 62 verabreicht wurde. DLTs zu einem früheren Zeitpunkt resultierten auch in o.g. Studie in einer letalen GvHD.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen im DLA-identischen System (Kolb et al., Transplantation 1997) wurde in dieser Arbeit die DLT nur an einem einzigen Tag verabreicht. $1 \cdot 10^8$ Spenderlymphozyten pro kg Körpergewicht des Empfängers reichten zur Induktion einer GvHD aus.

5.6 Ausblick: Suizidgentherapie mit HSV-TK

Um die gewollten Effekte einer DLT, nämlich die Reaktion gegen nach der Konditionierung übrig gebliebene leukämische Zellen, zu erhalten und gleichzeitig eine potenziell auftretende GvHD steuern zu können, können die Lymphozyten der DLT vor der Transfusion mit einem Suizidgen transduziert werden. Sobald bei dem Patienten dann eine GvHD auftritt, können die dafür verantwortlichen Zellen, die das Suizidgen tragen, spezifisch abgeschaltet werden.

Ein häufig eingesetztes Suizidgen ist die Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus (HSV-TK). Zellen, die dieses Gen tragen, können Ganciclovir phosphorylieren. Das phosphorylierte Ganciclovir interferiert mit der DNA-Synthese und führt zur Fragmentierung der DNA, was im Tod der HSV-TK tragenden Zelle resultiert. Die Gentherapie mit HSV-TK wurde zwar schon erfolgreich bei Patienten angewendet (Bondanza et al., Blood 2006; Bonini et al., Science 1997; Bordignon et al., Hum Gene Ther 1995; Tiberghien et al., Blood 1994), jedoch wurde bislang noch nicht überzeugend demonstriert, dass die transduzierten Zellen funktionsfähig sind und eine möglicherweise entstehende GvHD tatsächlich durch die Gabe von Ganciclovir therapiert werden kann.

Das in dieser Arbeit etablierte System mit Transplantation von CD6-depletiertem Knochenmark und nachfolgender Verabreichung einer DLT zur Induktion einer GvHD

bietet die perfekte Grundlage, um einen „Proof of Principle“ der Suizidgentherapie durchzuführen. Folgende Fragen müssten dazu geklärt werden:

1. Können auch HSV-TK-transduzierte T-Zellen eine GvHD auslösen, oder büßen sie durch die Transduktion ihre Fähigkeit zur Induktion einer GvHD ein?
2. Kann die induzierte GvHD tatsächlich durch Verabreichung von Ganciclovir abgeschaltet werden?

Die Anwendbarkeit der HSV-TK Suizidgentherapie im Hundemodell wurde bereits gezeigt (Weissinger et al., Cytokines Cell Mol Ther 2000), jedoch fehlt der Nachweis, dass transduzierte Zellen tatsächlich eine GvHD auslösen können, und dass diese dann durch Gabe von Ganciclovir gestoppt werden kann.

Diese Fragen zu erörtern und damit den Nachweis für die Funktionalität der Gentherapie mit HSV-TK zu führen wird Inhalt kommender Untersuchungen sein, in denen das in dieser Arbeit etablierte System einer induzierbaren GvHD im Hundemodell Anwendung finden soll.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von Antikörpern und ihrer immunsuppressiven Wirkung im präklinischen Hundemodell. Dazu wurde eine T-Zelldepletionsmethode mit dem caninen CD6-Antikörper MT-606 und Kaninchenkomplement zur alleinigen GvHD-Prophylaxe bei der allogenen Knochenmarktransplantation entwickelt. Zusätzlich sollten die regulatorischen Eigenschaften von CD6-depletierten Knochenmarkzellen in vitro in der gemischten Lymphozytenkultur untersucht werden.

Mit Hilfe des kreuzreagierenden Antikörpers MT-606, der das canine CD6-Antigen erkennt, konnte eine einfache und kostengünstige Depletionsmethode etabliert werden, welche die Fähigkeit des CD6-Antikörpers MT-606 zur Aktivierung der Komplementkaskade ausnützt. Es wurde zunächst durch in vitro-Experimente gezeigt, dass die Methode mit MT-606 und Kaninchenkomplement eine effektive Depletion der CD6-positiven Zellen gewährleistet, wohin gegen die hämatopoetischen Stammzellen unangetastet bleiben. Die CD6-Depletion geht einher mit einer nahezu vollständigen Depletion der CD4-positiven Zellen, während die CD8-positiven Zellen nur teilweise depletiert werden.

Durch drei Knochenmarktransplantationen im homo-hetero-System und zwei im DLA-identischen System wurde gezeigt, dass sich die CD6-Depletion als alleinige Methode zur GvHD-Prophylaxe eignet. Die Etablierung einer Toleranz gegenüber dem Spenderorganismus wurde durch eine Hauttransplantation vom Spender auf den Empfänger bei einem Hund gezeigt. Regelmäßige Analysen des Spenderchimärismus konnten zeigen, dass die Transplantation von CD6-depletiertem Knochenmark eine langfristige Erholung des hämatopoetischen Systems garantiert.

In mehreren in vitro-Experimenten sollte die regulatorische Fähigkeit von CD6-depletierten Knochenmarkzellen in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) untersucht werden. Die MLC ist eine Kurzzeit-Suspensionskultur, die es erlaubt, die Reaktivität von T-Zellen eines Spenders gegen die durch Bestrahlung inaktivierten PBMCs eines anderen Spenders zu untersuchen. Die Lymphozytenproliferation oder ihre eventuelle Inhibition können durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin oder durch die Weitergabe des Farbstoffs CFSE von der Mutter- auf die Tochterzellen quantifiziert werden. Trotz Anwendung unterschiedlicher Analysesysteme konnte kein supprimierender Effekt von CD6-depletierten Knochenmarkzellen auf die

Lymphozytenproliferation in der gemischten Lymphozytenkultur nachgewiesen werden. In einigen Fällen wirkten die CD6-depletierten Knochenmarkzellen sogar stimulierend auf die Proliferation der Lymphozyten. Um die generelle Anwendbarkeit des verwendeten MLC-Systems zum Nachweis von supprimierenden Eigenschaften einer Zellpopulation zu zeigen, wurden mesenchymale Stammzellen an Stelle von CD6-depletierten Knochenmarkzellen eingesetzt. Diese bewiesen eine hohe Potenz zur Unterdrückung der Lymphozytenproliferation in der MLC. Trotz offensichtlicher Wirkung bei der GvHD-Prophylaxe konnte ein regulatorischer Effekt von CD6-depletierten Knochenmarkzellen in der MLC nicht gezeigt werden, obwohl das System durchaus zum Nachweis von supprimierenden Eigenschaften anderer Zellen geeignet ist.

In einer zweiten Reihe von Transplantationen wurde untersucht, ob durch zusätzliche Transfusion von Spenderlymphozyten (DLT) nach der Transplantation von CD6-depletiertem Knochenmark im Empfänger eine GvHD induziert werden kann. Der Zeitpunkt der DLT variierte bei den einzelnen Transplantationen, es wurde aber immer eine Zelldosis von ca. $1 \cdot 10^8$ MNCs/kg Körpergewicht transfundiert. Bei je einem Hund konnte durch DLT an den Tagen 3, 14 oder 20 eine GvHD induziert werden, deren Hauptmanifestationsort bei zwei Hunden die Leber und bei einem Hund die Haut war. Bei einer Wiederholung des Transplantationsschemas mit DLT an Tag 20 konnte bei einem weiteren Hund keine GvHD induziert werden. Offensichtlich bestand zu diesem Zeitpunkt bereits eine Toleranz gegenüber dem Spenderorganismus.

Das etablierte System mit Transplantation von CD6-depletiertem Knochenmark und DLT vor Tag 20 zur Induktion einer GvHD eignet sich hervorragend, um die Einsetzbarkeit von HSV-TK-transduzierten Zellen zur Gentherapie zu testen. Dies wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

7 Summary

Characterization of antibodies and their immunosuppressive effects caused in the dog as a preclinical transplantation model

The aim of this study was the characterization of antibodies and their immunosuppressive effects caused in the dog as a preclinical model. For this a T-cell depletion method with the canine CD6-antibody MT-606 and rabbit complement for the sole form of GvHD prophylaxis in allogeneic bone marrow transplantation has been established. In addition, the regulatory effects of CD6-depleted bone marrow cells were to be investigated in the mixed lymphocyte culture.

Using a cross reactive antibody which recognizes the canine CD6 antigen, a simple and economical depletion method could be established, which makes use of the ability of the CD6 antibody MT-606 to activate the complement cascade. Initially, several in vitro experiments using MT-606 and rabbit complement could verify the effective depletion of CD6-positive cells whereas hematopoietic stem cells remained unaffected at the same time. CD6-depletion is associated with an almost complete depletion of CD4-positive cells while CD8-positive cells are only being depleted partially.

Three bone marrow transplantations in the homo-hetero setting and two in a DLA-identical setting could prove the feasibility of CD6-depletion as the sole form of GvHD prophylaxis. The establishment of tolerance to the bone marrow donor was shown by the transplantation of skin from the donor to the host in one dog. Continuous analysis of donor chimerism could show a long-term stable engraftment of CD6-depleted bone marrow.

The regulatory effects of CD6-depleted bone marrow cells were researched by repeated in vitro experiments with mixed lymphocyte cultures (MLCs). MLC is a short-term suspension culture which allows to investigate T-cell reactivity of one donor to radiation-inactivated PBMCs of another donor. The proliferation of lymphocytes or its potential suppression can be measured either by incorporating radioactively labelled thymidine or by transferring the fluorescent CFSE from mother- to daughter-cells. Despite of the use of different read-out-systems, no stable suppressive effect of CD6-depleted bone marrow cells on the proliferation of lymphocytes could be detected in MLC. In a few experiments, the CD6-depleted bone marrow cells even had a stimulative effect on the proliferation of lymphocytes.

To test the general practicability of the employed MLC-system for the detection of suppressive effects of certain cell populations, mesenchymal stem cells were used instead of CD6-depleted bone marrow cells. They showed a high potency of suppressing the lymphocyte proliferation in MLC.

Despite obvious effects in regard to GvHD-prophylaxis, a regulatory effect of CD6-depleted bone marrow cells could not be shown in MLC, even though the system is by all means appropriate to verify suppressive qualities of certain cells.

A second series of bone marrow transplantations was meant to answer the question whether the additional transfusion of donor lymphocytes (DLT) after the transplantation of CD6-depleted bone marrow could induce GvHD in the host. The time for the DLT was variable in the different transplantations, but all dogs received a cell dose of $1 \cdot 10^8$ MNCs/kg body weight. In one dog each, GvHD could be induced by DLT on day 3, 14 and 20, respectively. Main effector organs were the liver in two dogs and the skin in one dog. The repetition of the transplantation setting with DLT on day 20 could not induce GvHD in a fourth dog. Obviously, this dog had already become tolerant to the donor at the time of DLT.

The established system of transplantation of CD6-depleted bone marrow and DLT until day 20 for induction of GvHD is particularly suitable to test the feasibility of HSV-TK-transduced cells for gene therapy. This will be the subject of future investigations.

8 Literaturverzeichnis

(2000). "Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients." *Biol Blood Marrow Transplant* 6(6a): 659-713; 715; 717-27; quiz 729-33.

Abkowitz, J. L., S. N. Catlin, et al. (2002). "Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals." *Blood* 100(7): 2665-7.

Adler, L. T., L. J. Annaratone, 3rd, et al. (1990). "Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in rabbits. I. A positive role for graft-versus-host reactivity in engraftment." *Bone Marrow Transplant* 5(1): 51-6.

Albert, E. D., V. M. Erickson, et al. (1973). "Serology and genetics of the DLA-system. I. Establishment of specificities." *Tissue Antigens* 3(6): 417-30.

Appelbaum, F. R., H. J. Deeg, et al. (1985). "Marrow transplant studies in dogs with malignant lymphoma." *Transplantation* 39(5): 499-504.

Armitage, J. O. (1994). "Bone marrow transplantation." *N Engl J Med* 330(12): 827-38.

Asiedu C., M. Yuru, et al. (1999). „Immunoregulatory Role of the CD8 in the veto effect.“ *Transplantation* 67(3): 327-80.

Atkinson, K., M. Cooley, et al. (1987). "CD4+ T cells appear capable of initiating graft-versus-host disease across non-major histocompatibility complex (MHC) barriers in man." *Bone Marrow Transplant* 2(1): 79-84.

Aul, C., N. Gattermann, et al. (1997). "Fatal hyperleukocytic syndrome in a patient with chronic myelomonocytic leukemia." *Leuk Res* 21(3): 249-53.

Austin, H., E. Delzell, et al. (1988). "Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment." *Am J Epidemiol* 127(3): 419-39.

Baack, B. R., T. Osler, et al. (1993). "Steam press burns of the hand." *Ann Plast Surg* 30(4): 345-9.

Bach, F. H. (1976). "Genetics of transplantation: the major histocompatibility complex." *Annu Rev Genet* 10: 319-39.

Bach, F. H. and J. J. van Rood (1976). "The major histocompatibility complex - genetics and biology. (First of three parts)." *N Engl J Med* 295(15): 806-13.

Bach, F. H. and J. J. van Rood (1976). "The major histocompatibility complex - genetics and biology (Second of three parts)." *N Engl J Med* 295(16): 872-8.

Bach, F. H. and J. J. van Rood (1976). "The major histocompatibility complex - genetics and biology (Third of three parts)." *N Engl J Med* 295(17): 927-36.

- Barnes, D. W. and J. F. Loutit (1957). "Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II." *Br J Haematol* 3(3): 241-52.
- Basara, N., M. G. Kiehl, et al. (2001). "New therapeutic modalities in the treatment of graft-versus-host disease." *Crit Rev Oncol Hematol* 38(2): 129-38.
- Bensinger, W., J. Singer, et al. (1993). "Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor." *Blood* 81(11): 3158-63.
- Bensinger, W. I., P. J. Martin, et al. (2001). "Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers." *N Engl J Med* 344(3): 175-81.
- Billingham, R. E. (1966). "The biology of graft-versus-host reactions." *Harvey Lect* 62: 21-78.
- Bodenberger, U., H. J. Kolb, et al. (1980). "Fractionated total body irradiation and autologous bone marrow transplantation in dogs: hemopoietic recovery after various marrow cell doses." *Exp Hematol* 8(4): 384-94.
- Bondanza, A., V. Valtolina, et al. (2006). "Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes." *Blood* 107(5): 1828-36.
- Bonini, C., G. Ferrari, et al. (1997). "HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia." *Science* 276(5319): 1719-24.
- Bonnefoy-Berard, N., C. Vincent, et al. (1991). "Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins." *Transplantation* 51(3): 669-73.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med* 3(7): 730-7.
- Bordignon, C., C. Bonini, et al. (1995). "Transfer of the HSV-tk gene into donor peripheral blood lymphocytes for in vivo modulation of donor anti-tumor immunity after allogeneic bone marrow transplantation." *Hum Gene Ther* 6(6): 813-9.
- Bousser, J. and S. Tara (1951). "[Three cases of chronic myeloid leukemia caused by benzol.]" *Arch Mal Prof* 12(4): 399-404.
- Boyle, M. D. (1984). "Is the membrane attack complex of complement an enzyme?" *Mol Cell Biochem* 61(1): 5-15.
- Bretagne, S., M. Vidaud, et al. (1987). "Mixed blood chimerism in T cell-depleted bone marrow transplant recipients: evaluation using DNA polymorphisms." *Blood* 70(5): 1692-5.
- Bristow, M. R., W. A. Minobe, et al. (1993). "Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart." *J Clin Invest* 92(6): 2737-45.

- Brown, E. J. (1991). "Complement receptors and phagocytosis." *Curr Opin Immunol* 3(1): 76-82.
- Brown, J. H., T. S. Jardetzky, et al. (1993). "Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1." *Nature* 364(6432): 33-9.
- Bull, R. W., H. M. Vriesendorp, et al. (1987). "Joint report of the Third International Workshop of Canine Immunogenetics. II. Analysis of the serological typing of cells." *Transplantation* 43(1): 154-61.
- Burnett, R. C., S. A. DeRose, et al. (1994). "A simple restriction fragment-length polymorphism assay for MHC class II gene testing of dog families." *Transplantation* 57(2): 280-2.
- Byrd, J. C., K. Rai, et al. (2005). "Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011." *Blood* 105(1): 49-53.
- Camos, M. and D. Colomer (2006). "Molecular biology in acute leukemia." *Clin Transl Oncol* 8(8): 550-9.
- Cerny, T., B. Borisch, et al. (2002). "Mechanism of action of rituximab." *Anticancer Drugs* 13 Suppl 2: S3-10.
- Collins, R. H., Jr., O. Shpilberg, et al. (1997). "Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation." *J Clin Oncol* 15(2): 433-44.
- Colson Y.L., K. Christopher, et al. (2004). "Absence of clinical GvHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells." *Blood* 104(12):3829-35.
- Cooper, N. R. (1986). "Assays for complement activation." *Clin Lab Med* 6(1): 139-55.
- Couban, S., D. R. Simpson, et al. (2002). "A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies." *Blood* 100(5): 1525-31.
- Creutzig, U., J. Ritter, et al. (1987). "Early deaths due to hemorrhage and leukostasis in childhood acute myelogenous leukemia. Associations with hyperleukocytosis and acute monocytic leukemia." *Cancer* 60(12): 3071-9.
- Deeg, H. J., R. F. Raff, et al. (1986). "Joint report of the Third International Workshop on Canine Immunogenetics. I. Analysis of homozygous typing cells." *Transplantation* 41(1): 111-7.
- Deeg, H. J., R. Storb, et al. (1984). "Combined immunosuppression with cyclosporine and methotrexate in dogs given bone marrow grafts from DLA-haploidentical littermates." *Transplantation* 37(1): 62-5.

- den Haan, J. M., L. M. Meadows, et al. (1998). "The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism." *Science* 279(5353): 1054-7.
- Dexter, T. M. (1982). "Stromal cell associated haemopoiesis." *J Cell Physiol Suppl* 1: 87-94.
- Dexter, T. M. (1987). "Growth factors involved in haemopoiesis." *J Cell Sci* 88 (Pt 1): 1-6.
- Dexter, T. M., P. Simmons, et al. (1984). "The regulation of hemopoietic cell development by the stromal cell environment and diffusible regulatory molecules." *Prog Clin Biol Res* 148: 13-33.
- Dexter, T. M. and E. Spooncer (1987). "Growth and differentiation in the hemopoietic system." *Annu Rev Cell Biol* 3: 423-41.
- Diaconescu, R., M. T. Little, et al. (2005). "What role is there for antithymocyte globulin in allogeneic nonmyeloablative canine hematopoietic cell transplantation?" *Biol Blood Marrow Transplant* 11(5): 335-44.
- Doxiadis, I., K. Krumbacher, et al. (1989). "Biochemical evidence that the DLA-B locus codes for a class II determinant expressed on all canine peripheral blood lymphocytes." *Exp Clin Immunogenet* 6(3): 219-24.
- Drobyski, W. R., R. C. Ash, et al. (1994). "Effect of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis on engraftment, relapse, and disease-free survival in unrelated marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia." *Blood* 83(7): 1980-7.
- Drobyski, W. R., M. S. Roth, et al. (1992). "Molecular remission occurring after donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation." *Bone Marrow Transplant* 10(3): 301-4.
- Dutra, A. S., E. Mignot, et al. (1996). "Gene localization and syntenic mapping by FISH in the dog." *Cytogenet Cell Genet* 74(1-2): 113-7.
- Epstein, R. B., R. Storb, et al. (1968). "Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs." *Transplantation* 6(1): 45-58.
- Farrukh, H. M., M. White, et al. (1993). "Up-regulation of beta 2-adrenergic receptors in previously transplanted, denervated nonfailing human hearts." *J Am Coll Cardiol* 22(7): 1902-8.
- Fearon, D. T. and K. F. Austen (1975). "Properdin: initiation of alternative complement pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(8): 3220-4.
- Ferrara, J. L. and H. J. Deeg (1991). "Graft-versus-host disease." *N Engl J Med* 324(10): 667-74.
- Ferrara, J. L., R. Levy, et al. (1999). "Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease." *Biol Blood Marrow Transplant* 5(6): 347-56.

- Ferretti, G., C. Marconi, et al. (2002). "The heart rate response to exercise and circulating catecholamines in heart transplant recipients." *Pflugers Arch* 443(3): 370-6.
- Gandy K.L., J Domen, et al. (1999). "CD8+TCR+ and CD8+TCR- cells in whole bone marrow facilitate the engraftment of hematopoietic stem cells across allogeneic barriers." *Immunity* 11(5):579-90.
- Gajewski, J. and R. Champlin (1996). "Bone marrow transplantation from unrelated donors." *Curr Opin Oncol* 8(2): 84-8.
- Gee, A. P., V. Mansour, et al. (1989). "T-cell depletion of human bone marrow." *J Immunogenet* 16(2): 103-15.
- Gilmore, M. J., J. Patterson, et al. (1986). "Standardization of T-cell depletion in HLA matched bone marrow transplantation." *Br J Haematol* 64(1): 69-75.
- Gluckman, E., V. Rocha, et al. (1997). "Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group." *N Engl J Med* 337(6): 373-81.
- Glucksberg, H., R. Storb, et al. (1974). "Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors." *Transplantation* 18(4): 295-304.
- Goldman, J. M., R. P. Gale, et al. (1988). "Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion." *Ann Intern Med* 108(6): 806-14.
- Gordon, M. Y., G. P. Riley, et al. (1987). "Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment." *Nature* 326(6111): 403-5.
- Guan, Y., B. Gerhard, et al. (2003). "Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML)." *Blood* 101(8): 3142-9.
- Günther W., M. Schumm, et al. (1994). „NK activity of canine blood and marrow cells.“ *Tissue Antigens* 43(3): 198-201
- Guzman, M. L. and C. T. Jordan (2004). "Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia." *Cancer Control* 11(2): 97-104.
- Hansen, J. A., S. Y. Choo, et al. (1990). "The HLA system in clinical marrow transplantation." *Hematol Oncol Clin North Am* 4(3): 507-15.
- Hapel, A. J., J. M. Osborne, et al. (1985). "Expression of 20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in mouse macrophages, hemopoietic cells, and cell lines and its induction by colony-stimulating factors." *J Immunol* 134(4): 2492-7.
- Happ, G. M., E. Aquilla, et al. (1999). "DLA-DRB1 histocompatibility genotyping using RT-nested PCR and cycle sequencing." *Vet Immunol Immunopathol* 69(2-4): 93-100.

- Helg, C., E. Roux, et al. (1993). "Adoptive immunotherapy for recurrent CML after BMT." *Bone Marrow Transplant* 12(2): 125-9.
- Henslee, P. J., J. S. Thompson, et al. (1987). "T cell depletion of HLA and haploidentical marrow reduces graft-versus-host disease but it may impair a graft-versus-leukemia effect." *Transplant Proc* 19(1 Pt 3): 2701-6.
- Hill, G. R., W. Krenger, et al. (1997). "The role of cytokines in acute graft-versus-host disease." *Cytokines Cell Mol Ther* 3(4): 257-66.
- Horowitz, M. M., R. P. Gale, et al. (1990). "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." *Blood* 75(3): 555-62.
- Jacobson, L. O., E. L. Simmons, et al. (1950). "The role of the spleen in radiation injury and recovery." *J Lab Clin Med* 35(5): 746-70.
- Janeway, C. A., et al. (2002). "Immunologie." 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag
- Janosy, G., H. G. Prentice, et al. (1986). "T lymphocyte regeneration after transplantation of T cell depleted allogeneic bone marrow." *Clin Exp Immunol* 63(3): 577-86.
- Kahn, D. R., J. H. Dufek, et al. (1980). "Heart and kidney transplantation using total lymphoid irradiation and donor bone marrow in mongrel dogs." *J Thorac Cardiovasc Surg* 80(1): 125-8.
- Kersey, J. H., D. Valleria, et al. (1985). "Monoclonal antibodies and immunotoxins in bone marrow transplantation: purging marrow of ALL or GVHD cells with preservation of stem cells." *Haematol Blood Transfus* 29: 34-8.
- Kolb, H. J. (1998). "Donor leukocyte transfusions for treatment of leukemic relapse after bone marrow transplantation. EBMT Immunology and Chronic Leukemia Working Parties." *Vox Sang* 74 Suppl 2: 321-9.
- Kolb, H. J., U. Bodenberger, et al. (1980). "Bone marrow transplantation in DLA-haploidentical canine littermates: fractionated total body irradiation (FTBI) and in vitro treatment of the marrow graft with anti-T-cell globulin (ATCG)." *Haematol Blood Transfus* 25: 61-71.
- Kolb, H. J., W. Guenther, et al. (2003). "Tolerance and chimerism." *Transplantation* 75(9 Suppl): 26S-31S.
- Kolb, H. J., W. Gunther, et al. (1997). "Adoptive immunotherapy in canine chimeras." *Transplantation* 63(3): 430-6.
- Kolb, H. J. and E. Holler (1997). "Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte transfusions." *Curr Opin Oncol* 9(2): 139-45.
- Kolb, H. J., L. K. Losslein, et al. (1990). "Dose rate and fractionation of total body irradiation in dogs: short and long term effects." *Radiother Oncol* 18 Suppl 1: 51-9.

- Kolb, H. J., J. Mittermüller, et al. (1990). "Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients." *Blood* 76(12): 2462-5.
- Kolb, H. J., J. Mittermüller, et al. (1993). "Adoptive immunotherapy in human and canine chimeras." *Bone Marrow Transplant* 12 Suppl 3: S61-4.
- Kolb, H. J., I. Rieder, et al. (1979). "Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VI. Graft-versus-host tolerance in DLA-incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with absorbed antithymocyte globulin." *Transplantation* 27(4): 242-5.
- Kolb, H. J., A. Schattenberg, et al. (1995). "Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients." *Blood* 86(5): 2041-50.
- Kraft, W. (2003). "Dosierungsvorschläge für Arzneimittel bei Hund und Katze." 3. Auflage. Schattauer
- Le Blanc, K., L. Tammik, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex." *Scand J Immunol* 57(1): 11-20.
- Lorenz, E., C. Congdon, et al. (1952). "Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections." *Radiology* 58(6): 863-77.
- Lorenz, E., D. Uphoff, et al. (1951). "Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections." *J Natl Cancer Inst* 12(1): 197-201.
- Lorenz, W. (1952). "[Active protection against radiation.]" *Fortschr Geb Röntgenstr Nuklearmed* 76(Suppl.): 70.
- Lösslein, L. K., H. J. Kolb, et al. (1987). "Hyperfractionation of total-body irradiation and engraftment of marrow from DLA-haploidentical littermates." *Transplant Proc* 19(1 Pt 3): 2707-8.
- Lum, L. G. (1987). "The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation." *Blood* 69(2): 369-80.
- Lyons, A. B. (2000). "Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution." *J Immunol Methods* 243(1-2): 147-54.
- Main, J. M. and R. T. Prehn (1955). "Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow." *J Natl Cancer Inst* 15(4): 1023-9.
- Martin, P. J., J. A. Hansen, et al. (1985). "Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts." *Blood* 66(3): 664-72.
- Martin, P. J., J. A. Hansen, et al. (1988). "Effects of treating marrow with a CD3-specific immunotoxin for prevention of acute graft-versus-host disease." *Bone Marrow Transplant* 3(5): 437-44.

- McNally, R. J. and L. Parker (2006). "Environmental factors and childhood acute leukemias and lymphomas." *Leuk Lymphoma* 47(4): 583-98.
- Messner, H. A., A. A. Fauser, et al. (1980). "Properties of human pluripotent hemopoietic progenitors." *Blood Cells* 6(4): 595-607.
- Messner, H. A. and E. A. McCulloch (1973). "Interacting cell populations affecting granulopoietic colony formation by normal and leukemic human marrow cells." *Blood* 42(5): 701-10.
- Metcalf, D. (1977). "In-vitro cloning techniques for hemopoietic cells: clinical applications." *Ann Intern Med* 87(4): 483-8.
- Metcalf, D. (1985). "The granulocyte-macrophage colony stimulating factors." *Cell* 43(1): 5-6.
- Metcalf, D. (1985). "Molecular control of granulocyte and macrophage production." *Prog Clin Biol Res* 191: 323-37.
- Moffitt, M. C. and M. M. Frank (1994). "Complement resistance in microbes." *Springer Semin Immunopathol* 15(4): 327-44.
- Morax, S. and T. Hurbli (1992). "Orbito-palpebral reconstruction in anophthalmos and severe congenital microphthalmos." *Adv Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 9: 67-80.
- Morell, V. (1997). "The origin of dogs: running with the wolves." *Science* 276(5319): 1647-8.
- Moreton, P. and P. Hillmen (2003). "Alemtuzumab therapy in B-cell lymphoproliferative disorders." *Semin Oncol* 30(4): 493-501.
- Müller-Eberhard, H. J. (1986). "The membrane attack complex of complement." *Annu Rev Immunol* 4: 503-28.
- Mysliwietz, J. J., G. Hoffmann-Fezer, et al. (1988). "Recognition of two epitopes of an antigen present on canine T cells but not on hemopoietic progenitors by four monoclonal antibodies." *Transplantation* 45(2): 443-8.
- Nash R.A., M. S. Pepe, et al. (1992). "Acute graft-versus-host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate." *Blood* 80(7): 1838-45.
- Neefjes, J. J., I. Doxiadis, et al. (1986). "An analysis of class I antigens of man and other species by one-dimensional IEF and immunoblotting." *Immunogenetics* 23(3): 164-71.
- Neurath, H. and K. A. Walsh (1976). "Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review)." *Proc Natl Acad Sci USA* 73(11): 3825-32.
- Onrust, S. V., H. M. Lamb, et al. (1999). "Rituximab." *Drugs* 58(1): 79-88; discussion 89-90.

- Porcu, P., L. D. Cripe, et al. (2000). "Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: a review of pathophysiology, clinical presentation and management." *Leuk Lymphoma* 39(1-2): 1-18.
- Porcu, P., S. Farag, et al. (2002). "Leukocytoreduction for acute leukemia." *Ther Apher* 6(1): 15-23.
- Poulton, K. V., L. J. Kennedy, et al. (1998). "A study of HLA-DPB1 phenotypes reveals DPB1*6301 in a rural population from Cameroon." *Eur J Immunogenet* 25(5): 375-7.
- Poynton, C. H. (1988). "T cell depletion in bone marrow transplantation." *Bone Marrow Transplant* 3(4): 265-79.
- Prentice, H. G., H. A. Blacklock, et al. (1984). "Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients." *Lancet* 1(8375): 472-6.
- Rapaport, F. T., R. J. Bachvaroff, et al. (1978). "Induction of allogeneic unresponsiveness in adult dogs. Role of non-DLA histocompatibility variables in conditioning the outcome of bone marrow, kidney, and skin transplantation in radiation chimeras." *J Clin Invest* 61(3): 790-800.
- Rasmusson, I., O. Ringden, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms." *Exp Cell Res* 305(1): 33-41.
- Reid, K. B. and M. W. Turner (1994). "Mammalian lectins in activation and clearance mechanisms involving the complement system." *Springer Semin Immunopathol* 15(4): 307-26.
- Reiter, C. (1989). "Cluster report CD6." In: Knapp, W., B. Dorken, et al., eds. „Leukocyte typing IV.“ 4th edition. Oxford University 1989: 339.
- Reisner, Y., N. Kapoor, et al. (1983). "Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A, B, D, DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells." *Blood* 61(2): 341-8.
- Rodt, H., H. J. Kolb, et al. (1979). "GVHD suppression by incubation of bone marrow grafts with anti-T-cell globulin: effect in the canine model and application to clinical bone marrow transplantation." *Transplant Proc* 11(1): 962-6.
- Rodt, H., S. Thierfelder, et al. (1974). „Anti-lymphocytic antibodies and marrow transplantation. 3. Effect of heterologous anti-brain antibodies on acute secondary disease in mice.“ *Eur J Immunol* 4(1): 15-9.
- Rosner, F. and S. L. Lee (1972). "Down's syndrome and acute leukemia: myeloblastic or lymphoblastic? Report of forty-three cases and review of the literature." *Am J Med* 53(2): 203-18.

- Roy, D. C., R. Tantravahi, et al. (1990). "Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: a stable equilibrium." *Blood* 75(1): 296-304.
- Rushton, L. and H. Romaniuk (1997). "A case-control study to investigate the risk of leukaemia associated with exposure to benzene in petroleum marketing and distribution workers in the United Kingdom." *Occup Environ Med* 54(3): 152-66.
- Ruvinsky, A. and J. Sampson, eds. (2001). "The Genetics of the Dog." CABI Publishing.
- Sakaguchi S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* 155(3): 1151-64.
- Sao, H., K. Kitaori, et al. (1999). "A new marrow T cell depletion method using anti-CD6 monoclonal antibody-conjugated magnetic beads and its clinical application for prevention of acute graft-vs.-host disease in allogeneic bone marrow transplantation: results of a phase I-II trial." *Int J Hematol* 69(1): 27-35.
- Sarmiento, U. M., S. DeRose, et al. (1992). "Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: I. DQA." *Immunogenetics* 35(6): 416-20.
- Sarmiento, U. M., J. I. Sarmiento, et al. (1990). "Allelic variation in the DR subregion of the canine major histocompatibility complex." *Immunogenetics* 32(1): 13-9.
- Sarmiento, U. M. and R. Storb (1990). "Nucleotide sequence of a dog class I cDNA clone." *Immunogenetics* 31(5-6): 400-4.
- Sarmiento, U. M. and R. Storb (1990). "Nucleotide sequence of a dog DRB cDNA clone." *Immunogenetics* 31(5-6): 396-9.
- Sarmiento, U. M. and R. F. Storb (1988). "Characterization of class II alpha genes and DLA-D region allelic associations in the dog." *Tissue Antigens* 32(4): 224-34.
- Sarmiento, U. M. and R. F. Storb (1988). "Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the dog." *Immunogenetics* 28(2): 117-24.
- Sarmiento, U. M. and R. F. Storb (1989). "RFLP analysis of DLA class I genes in the dog." *Tissue Antigens* 34(3): 158-63.
- Scandura, J. M. (2005). "Advances in the molecular genetics of acute leukemia." *Curr Oncol Rep* 7(5): 323-32.
- Schreuder, G. M., C. K. Hurley, et al. (2005). "HLA dictionary 2004: summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens." *Hum Immunol* 66(2): 170-210.
- Schuening, F., R. Storb, et al. (1987). "Facilitation of engraftment of DLA-nonidentical marrow by treatment of recipients with monoclonal antibody directed against marrow cells surviving radiation." *Transplantation* 44(5): 607-13.

- Schumm, M., W. Günther, et al. (1994). "Prevention of graft-versus-host disease in DLA-haplotype mismatched dogs and hemopoietic engraftment of CD6-depleted marrow with and without cG-CSF treatment after transplantation." *Tissue Antigens* 43(3): 170-8.
- Schumm, M., H. J. Kolb, et al. (1992). "Graft versus host tolerance in dogs across one DLA-haplotype by depletion of CD6 positive cells." *Prog Clin Biol Res* 377: 419-25.
- Simpson, E., D. Scott, et al. (2002). "Minor H antigens: genes and peptides." *Transpl Immunol* 10(2-3): 115-23.
- Sjovall, L., C. Lindqvist, et al. (1992). "A new method of reconstruction in a patient undergoing bilateral total maxillectomy." *Int J Oral Maxillofac Surg* 21(6): 342-5.
- Slavin, S., R. Or, et al. (1987). "Allogeneic bone marrow transplantation without graft-versus-host disease: true tolerance of graft against the host through depletion of donor T lymphocytes pregrafting in malignant and nonmalignant disorders." *Transplant Proc* 19(1 Pt 3): 2614-5.
- Slavin, S., S. Strober, et al. (1980). "Immunosuppression and organ transplantation tolerance using total lymphoid irradiation." *Diabetes* 29 Suppl 1: 121-3.
- Soiffer, R. J., L. Bosserman, et al. (1990). "Reconstitution of T-cell function after CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation." *Blood* 75(10): 2076-84.
- Soiffer, R. J., D. Fairclough, et al. (1997). "CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission." *Blood* 89(8): 3039-47.
- Soiffer, R. J., C. Murray, et al. (1992). "Prevention of graft-versus-host disease by selective depletion of CD6-positive T lymphocytes from donor bone marrow." *J Clin Oncol* 10(7): 1191-200.
- Soiffer, R. J. and J. Ritz (1993). "Selective T cell depletion of donor allogeneic marrow with anti-CD6 monoclonal antibody: rationale and results." *Bone Marrow Transplant* 12 Suppl 3: S7-10.
- Sponcer, E., J. T. Gallagher, et al. (1983). "Regulation of haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. IV. Glycosaminoglycan synthesis and the stimulation of haemopoiesis by beta-D-xylosides." *J Cell Biol* 96(2): 510-4.
- Staudt, L. M. (2002). "Gene expression profiling of lymphoid malignancies." *Annu Rev Med* 53: 303-18.
- Storb, R., K. G. Blume, et al. (2001). "Cyclophosphamide and antithymocyte globulin to condition patients with aplastic anemia for allogeneic marrow transplantations: the experience in four centers." *Biol Blood Marrow Transplant* 7(1): 39-44.
- Storb, R. and H. J. Deeg (1986). "Failure of allogeneic canine marrow grafts after total-body irradiation. Allogeneic "resistance" versus transfusion-induced sensitization." *Transplantation* 42(6): 571-80.

- Storb, R., H. J. Deeg, et al. (1982). "Cyclosporin-A abrogates transfusion-induced sensitization and prevents marrow graft rejection in DLA-identical canine littermates." *Blood* 60(2): 524-6.
- Storb, R., R. B. Epstein, et al. (1968). "Marrow grafts by combined marrow and leukocyte infusions in unrelated dogs selected by histocompatibility typing." *Transplantation* 6(4): 587-93.
- Storb, R., R. B. Epstein, et al. (1969). "Allogeneic canine bone marrow transplantation following cyclophosphamide." *Transplantation* 7(5): 378-86.
- Storb, R., T. C. Graham, et al. (1970). "Treatment of canine graft-versus-host disease with methotrexate and cyclo-phosphamide following bone marrow transplantation from histoincompatible donors." *Transplantation* 10(2): 165-72.
- Storb, R., H. J. Kolb, et al. (1986). "Prevention of graft-versus-host disease by immunosuppressive agents after transplantation of DLA-nonidentical canine marrow." *Bone Marrow Transplant* 1(2): 167-77.
- Storb, R., R. F. Raff, et al. (1994). "Fractionated versus single-dose total body irradiation at low and high dose rates to condition canine littermates for DLA-identical marrow grafts." *Blood* 83(11): 3384-9.
- Storb, R. and E. D. Thomas (1985). "Graft-versus-host disease in dog and man: the Seattle experience." *Immunol Rev* 88: 215-38.
- Strober, S., M. Gottlieb, et al. (1979). "Use of total lymphoid irradiation (TLI) in bone marrow and organ transplantation." *Transplant Proc* 11(4): 1930-3.
- Szer, J., H. J. Deeg, et al. (1985). "Failure of autologous marrow reconstitution after cytolytic treatment of marrow with anti-Ia monoclonal antibody." *Blood* 65(4): 819-22.
- Tefferi, A., M. A. Elliott, et al. (2006). "Atypical myeloproliferative disorders: diagnosis and management." *Mayo Clin Proc* 81(4): 553-63.
- Tefferi, A. and G. Gilliland (2006). "Classification of chronic myeloid disorders: from Dameshek towards a semi-molecular system." *Best Pract Res Clin Haematol* 19(3): 365-85.
- Templeton, J. W. and E. D. Thomas (1971). "Evidence for a major histocompatibility locus in the dog." *Transplantation* 11(4): 429-31.
- Thomas, E., R. Storb, et al. (1975). "Bone-marrow transplantation (first of two parts)." *N Engl J Med* 292(16): 832-43.
- Thomas, E. D., J. A. Collins, et al. (1962). "Marrow transplants in lethally irradiated dogs given methotrexate." *Blood* 19: 217-28.
- Thomas, E. D., R. LeBlond, et al. (1970). "Marrow infusions in dogs given midlethal or lethal irradiation." *Radiat Res* 41(1): 113-24.

- Thomas, E. D., R. Storb, et al. (1975). "Bone-marrow transplantation (second of two parts)." *N Engl J Med* 292(17): 895-902.
- Tiberghien, P., C. W. Reynolds, et al. (1994). "Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation?" *Blood* 84(4): 1333-41.
- Vallera, D. A., R. C. Ash, et al. (1983). "Anti-T-cell reagents for human bone marrow transplantation: ricin linked to three monoclonal antibodies." *Science* 222(4623): 512-5.
- van der Feltz, M. J. and H. L. Ploegh (1984). "Immunochemical analysis of glycosylated and nonglycosylated DLA class I antigens." *Immunogenetics* 19(2): 95-107.
- Volanakis, J. E. (1990). "Participation of C3 and its ligands in complement activation." *Curr Top Microbiol Immunol* 153: 1-21.
- Vriesendorp, H. M. (1982). "Bone marrow graft survival after total body irradiation in dogs." *Transplantation* 34(5): 312.
- Vriesendorp, H. M., E. D. Albert, et al. (1976). "Joint report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics." *Transplant Proc* 8(2): 289-314.
- Vriesendorp, H. M., W. M. Klapwyk, et al. (1982). "Factors controlling the engraftment of transplanted dog bone marrow cells." *Tissue Antigens* 20(1): 63-80.
- Vriesendorp, H. M., D. L. Westbroek, et al. (1973). "Joint report of 1st International Workshop on Canine Immunogenetics." *Tissue Antigens* 3(2): 145-63.
- Wagner, J. E., A. D. Donnenberg, et al. (1988). "Lymphocyte depletion of donor bone marrow by counterflow centrifugal elutriation: results of a phase I clinical trial." *Blood* 72(4): 1168-76.
- Wagner, J. L., J. D. Works, et al. (1998). "DLA-DRB1 and DLA-DQB1 histocompatibility typing by PCR-SSCP and sequencing." *Tissue Antigens* 52(4): 397-401.
- Weiden, P. L., K. Doney, et al. (1979). "Antihuman thymocyte globulin for prophylaxis of graft-versus-host disease. A randomized trial in patients with leukemia treated with HLA-identical sibling marrow grafts." *Transplantation* 27(4): 227-30.
- Weiden, P. L., R. Storb, et al. (1975). "Treatment of canine malignancies by 1200 R total body irradiation and autologous marrow grafts." *Exp Hematol* 3(2): 124-34.
- Weiden, P. L., K. M. Sullivan, et al. (1981). "Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation." *N Engl J Med* 304(25): 1529-33.
- Weissinger, E. M., M. Franz, et al. (2000). "Expression of HSV-TK suicide gene in primary T lymphocytes: the dog as a preclinical model." *Cytokines Cell Mol Ther* 6(1): 25-33.

Williamson, P., J. T. Byrne, et al. (1989). "Restriction fragment length polymorphism analysis of class II genes and canine bone marrow transplantation: correlation with mixed lymphocyte reactivity." *Transplant Proc* 21(5): 3824-5.

Williamson, P., F. W. Nicholas, et al. (1989). "Restriction fragment length polymorphism analysis of canine class II major histocompatibility complex genes." *Transplant Proc* 21(5): 3751-2.

Xun, C. Q., J. S. Thompson, et al. (1994). "Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice." *Blood* 83(8): 2360-7.

Yang, Y. C., A. B. Ciarletta, et al. (1986). "Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3." *Cell* 47(1): 3-10.

Zittoun, R. A., F. Mandelli, et al. (1995). "Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups." *N Engl J Med* 332(4): 217-23.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kolb für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Neben seinen vielen Anregungen, welche die Entstehung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglichten, ließ er mir auch viel Freiraum, um eigene Ideen und Vorstellungen umzusetzen, wofür ich sehr dankbar bin.

Herrn Prof. Dr. Hirschberger, der sich bereit erklärt hat, meine Arbeit für die tierärztliche Fakultät zu betreuen, möchte ich für sein stets ehrliches Interesse, seine aufbauende Persönlichkeit und seine große Hilfsbereitschaft danken und weiß dies sehr zu schätzen.

Herrn Dr. Heiko Adler gebührt mein besonderer Dank. Neben hervorragender wissenschaftlicher Betreuung hatte er jederzeit ein offenes Ohr und half mir in vielen Gesprächen mit stets konstruktiven Ratschlägen weiter. Seine permanente Bereitschaft, die erzielten Ergebnisse zu diskutieren und folglich neue Ideen zu entwickeln, möchte ich besonders würdigen.

Vielen Dank an meinen ehemaligen Kollegen Dr. Martin Herber. Die hervorragende Teamarbeit mit ihm machte die reibungslose Durchführung aller tierexperimentellen Arbeiten möglich.

Ein großer Dank geht hierfür auch an alle Tierpfleger in Großhadern und Neuherberg, vor allem an Herrn Michael Hagemann, Frau Daniela Golanski und Herrn Horst Wenig. Sie sorgten für eine großartige Koordination und Abwicklung der täglichen Routinearbeiten im Tierstall und waren vor allem in der Anfangszeit meiner Arbeit durch ihre langjährige Erfahrung und den professionellen Umgang mit den Versuchstieren eine große Hilfe.

Frau Gisela Werner und Frau Andrea von Arco-Zinneberg danke ich für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und bei der Einweisung in diverse Arbeitstechniken.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Panzer und Herrn Wagner, die bei der Bestrahlung der Hunde alle physikalisch-technischen Einstellungen der Bestrahlungsanlage vorgenommen haben und für einen reibungslosen Ablauf sorgten.

Vielen anderen Mitgliedern der KKG-HZT schulde ich Dank für ihre Hilfsbereitschaft, ihre aufmunternden Worte, ihre moralische Unterstützung, ihre tatkräftige Hilfe in manch schwieriger Situation und vor allem für das freundschaftliche und doch professionelle Arbeitsklima.

Vor allem möchte ich mich natürlich aus ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Ihre stete Unterstützung jeglicher Art, ihre unermüdliche Geduld und die richtigen Worte zur richtigen Zeit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

9.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Anna Zorn
Anschrift: Landshuter Allee 132a, 80637 München
Geburtsdatum: 26. Januar 1980
Geburtsort: Amberg

Schulbildung

1986 - 1990 Dreifaltigkeitsschule Amberg
1990 - 1999 Gregor-Mendel-Gymnasium Amberg
1997 Mary Carroll High School, Corpus Christi, Texas, USA
1999 Allgemeine Hochschulreife

Studium

1999 - 2005 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München als Stipendiatin des Bayerischen Staates

17.03.2003 Erster Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
05.10.2004 Zweiter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
21.01.2005 Dritter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung

Approbation

11.02.2005 Approbation als Tierärztin

Dissertation:

2005 - 2007 Dissertation in der Klinischen Kooperationsgruppe „Hämatopoetische Zelltransplantation“ der GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit und dem Klinikum Großhadern der LMU München unter Leitung von Professor Dr. Hans-Jochem Kolb