

Aus der Medizinischen Klinik m.S.  
Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie  
Universitätsklinikums Charité - Campus Virchow Klinikum  
Humboldt Universität zu Berlin  
Augustenburgerplatz  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Dörken

## **Habilitationsschrift**

### **Untersuchungen im Mausmodell zu den Effekten von Spenderlymphozyteninfusionen nach allogener Knochenmarktransplantation**

Zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt Universität zu Berlin

vorgelegt von  
Dr.med. Markus Y. Mapara  
aus Neu-Delhi/Indien

2002

Dekan: Prof. Dr. Dudenhausen

1. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Huber

2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jochem Kolb

Datum der Habilitation: 26.6.2003

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	=	Akute lymphatische Leukämie
AML	=	Akute myeloische Leukämie
APC	=	Antigen Presenting Cell (Antigen-präsentierende Zelle)
CTX	=	Cyclophosphamid
CML	=	Cell Mediated Lympholysis
DC	=	Dendritic Cell (Dendritische Zelle)
DLI	=	Donor Lymphocyte Infusion (Spenderlymphozyteninfusion)
GVHD	=	Graft-versus-Host-Disease (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion)
GVL	=	Graft-versus-Leukemia (Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion)
HLA	=	Humane Leukozyten Antigene
LGvH	=	Lymphohämatopoetische GVH-Reaktion
MLR	=	Mixed Lymphocyte Reaction
IFN	=	Interferon
IL	=	Interleukin
mAk	=	monoklonaler Antikörper
MHC	=	Major Histocompatibility Complex
MIs	=	Minor Lymphocyte Stimulating Antigen
TCD	=	T-Zelldepletion
TBI	=	Total Body Irradiation (Ganzkörperbestrahlung)
TI	=	Thymic Irradiation (Thymusbestrahlung)
TNF	=	Tumor Nekrose Faktor

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
1.1	ALLOGENE KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION (KMT) .....	6
1.2	TOLERANZENTWICKLUNG IM RAHMEN DER ALLOGENEN KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION .....	6
1.3	PATHOPHYSIOLOGIE DER GRAFT-VERSUS-HOST-DISEASE .....	10
1.4	KLINISCHE ASPEKTE DER GVHD .....	13
1.5	GRAFT-VERSUS-LEUKEMIA (GVL) REAKTION .....	14
1.6	WEITERENTWICKLUNG VON TRANSPLANTATIONSVERFAHREN .....	15
1.6.1	<i>Nicht-myeloablative Konditionierungsprotokolle .....</i>	<i>15</i>
1.6.2	<i>Transplantation über MHC-Grenzen .....</i>	<i>16</i>
1.6.3	<i>Ziele und Fragestellung .....</i>	<i>18</i>
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
2.1	MAUSSTÄMME .....	19
2.2	KNOCHENMARKSTRANSPLANTATIONSVERFAHREN .....	19
2.2.1	<i>Nicht-myeloablative Konditionierung .....</i>	<i>19</i>
2.2.2	<i>Letale Bestrahlung .....</i>	<i>20</i>
2.3	SPENDERLYMPHOZYTENINFUSION .....	20
2.4	GEMISCHTE LYMPHOZYTENKULTUR (MIXED LYMPHOCYTE REACTION MLR) .....	20
2.5	ZELL-VERMITTELTER LYMPHOLYSE-ASSAY (CELL-MEDIATED LYMPHOLYSIS ASSAY [CML]) .....	21
2.6	HAUTTRANSPLANTATION .....	21
2.7	DURCHFLUßZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	22
2.7.1	<i>Untersuchungen zum Chimärismus .....</i>	<i>22</i>
2.7.2	<i>Nachweis der Deletion Superantigen-reaktiver Zellen .....</i>	<i>23</i>
2.8	TUMORZELL-LINIEN .....	23
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>24</b>
3.1	ETABLIERUNG VON GEMISCHTEN CHIMÄREN MITTELS NICHT-MYELOABLATIVER KONDITIONIERUNGSVERFAHREN .....	24
3.2	TOLERANZINDUKTION IN CTX-CHIMÄREN .....	27
3.2.1	<i>In vitro Toleranz .....</i>	<i>27</i>
3.2.2	<i>In vivo Toleranz .....</i>	<i>28</i>
3.2.3	<i>Hinweise für die zentrale Toleranzentwicklung bei CTX-Chimären: .....</i>	<i>29</i>
3.2.3.1	<i>Nachweis von Spender-APC im Thymus von Empfängern .....</i>	<i>29</i>
3.2.3.2	<i>Deletion Superantigen-reaktiver Zellen Empfängern .....</i>	<i>30</i>
3.3	EFFEKTE VON SPENDERLYMPHOZYTEN IN GEMISCHTEN CHIMÄREN .....	34
3.3.1	<i>Spenderlymphozyteninfusionen können GVH oder HVG-Reaktionen induzieren in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt .....</i>	<i>34</i>

3.4	TOLERANZUNTERSUCHUNGEN IN DLI-EMPFÄNGERN .....	39
3.4.1	<i>Nachweis einer Anti-Spender-Alloreaktivität nach DLI-Gabe am Tag 21 .....</i>	39
3.4.2	<i>Nachweis einer Anti-Empfänger-Reaktivität in DLI-Tag 35 Empfängern .....</i>	41
3.4.3	<i>Hinweise für andauernde Anti-Empfänger-(GVH)-Reaktivität in DLI Tag 35 Empfängern .....</i>	42
3.5	DLI-VERMITTELTE GVL-REAKTIONEN.....	43
3.6	UNTERSUCHUNGEN ZUM SCHICKSAL ALLOREAKTIVER ZELLEN IN SPENDERLYMPHOZTENINFUSIONEN.....	45
3.7	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUß DES EMPFÄNGERCHIMÄRISMUS AUF DIE DLI-VERMITTELTE GVL-REAKTION.....	47
3.7.1	<i>DLI führen zur Induktion einer LGVH-Reaktion in gemischten Chimären ohne GVHD .....</i>	49
3.7.2	<i>DLI-vermittelte GVL-Effekte in vollen bzw. gemischten Chimären .....</i>	49
3.7.3	<i>Überlegene GVL-Effekte der Spenderlymphozyten in gemischten Chimären: Rolle der MHC Klasse I Expression auf den Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers .....</i>	51
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
4.1	TOLERANZENTWICKLUNG NACH NICHT-MYELOABLATIVER KONDITIONIERUNG.....	56
4.2	DLI-VERMITTELTE GVL-EFFEKTE .....	58
4.2.1	<i>Rolle von Antigen-präsentierenden Zellen der Empfängers.....</i>	60
4.3	STRATEGIEN ZUR TRENNUNG VON GVHD UND GVL.....	62
4.3.1	<i>Endorganprotektion bzw. Intervention in Zytokinkaskaden .....</i>	63
4.3.2	<i>Antigenspezifität der GVHD/GVL-Reaktion .....</i>	65
4.3.3	<i>Rolle von Suppressorzellen .....</i>	66
4.3.4	<i>NK-Zellen als Mediatoren der GVL-Reaktion ohne GVHD.....</i>	67
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>69</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>71</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>87</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 *Allogene Knochenmarktransplantation (KMT)*

Die Ursprünge der Knochenmarktransplantation gehen auf Arbeiten zurück, die sich mit den Effekten der Bestrahlung bei Mäusen und Kaninchen befassten. Diese frühen Arbeiten zeigten u. a., daß eine 250 rad Ganzkörperbestrahlung zu einer signifikanten Lymphopenie und Antikörpersuppression führte. Im Anschluß an den zweiten Weltkrieg und die Atombombenabwürfe auf Hiroshima und Nagasaki kam es zu einer Belebung dieses Forschungsfeldes mit dem Ziel Mechanismen der Radioprotektion der Hämatopoese zu identifizieren. So konnte gezeigt werden, daß Mäuse durch die intravenöse Gabe von Knochenmark nach letaler Bestrahlung vor deren Folgen geschützt wurden. Nach initialen Überlegungen, daß diese Effekte auf löslichen Faktoren beruhen, konnten mehrere Arbeiten zeigen, daß in der Tat die zellulären Bestandteile des Knochenmarkes für die Protektion der letal bestrahlten Mäuse verantwortlich waren. Des weiteren konnte nachgewiesen werden, daß Tiere die eine Knochenmarkinfusion erhalten hatten, in der Lage waren, Hauttransplantate vom Knochenmarkspenderstamm zu akzeptieren und somit eine Spender-spezifische Toleranz aufwiesen. (Die Anfänge der Knochenmarktransplantation sind ausführlich in dem Buch von Leslie Brent zur Geschichte der Transplantationsimmunologie dargestellt (Brent, 1997).)

Das Interesse an dieser Thematik nahm in der Folgezeit rasant zu. Dies lag v. a. an der Erkenntnis, daß die durch Knochenmark-vermittelte Rekonstitution der Hämatopoese die Applikation supraletaler Strahlen oder Chemotherapiedosierungen zur Behandlung von Tumorerkrankungen erlauben würde. In der zweiten Hälfte der 50er Jahre versuchten sowohl die Gruppe um Mathé als auch um E. D. Thomas die Knochenmarktransplantationen an Patienten vorzunehmen (Brent, 1997; Thomas et al., 1957). Da zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei Histokompatibilitätsprüfung möglich war, entwickelten die Patienten in der Mehrzahl eine schwere GVHD. Die erste erfolgreiche Knochenmarktransplantation bei Patienten erfolgte durch Mathé (Mathé et al., 1965). Basierend auf einem Hundemodell gelang es der Arbeitsgruppe von E.D. Thomas und R. Storb in Seattle, aus der experimentellen Therapieform der allogenen KMT ein mittlerweile etabliertes Routineverfahren zu entwickeln.

## 1.2 *Toleranzentwicklung im Rahmen der allogenen Knochenmarktransplantation*

Toleranz kann als Abwesenheit einer spezifischen Immunantwort (Nichtreaktivität) gegen definierte Antigene bei erhaltener globaler Immunkompetenz definiert werden. Dieses Phänomen wurde erstmalig in den Arbeiten von Owen (Owen et al., 1945) beschrieben.

Toleranz beschreibt somit einen Zustand bei dem sich das Immunsystem nicht gegen den eigenen Organismus richtet und eine Unterscheidung zwischen "Selbst" und "Fremd" zuläßt.

Der experimentelle Beweis, daß Toleranz aktiv erworben werden kann, erfolgte durch Billingham und Medawar (Billingham et al., 1953). Diese Arbeit bediente sich der Injektion einer gemischten Zellsuspension von unterschiedlichen Geweben vom Stamm A in neonatale bzw. fetale Mäuse vom Stamm B. Solche Mäuse welche Zellen vom Stamm A erhalten hatten akzeptierten in der Folge als adulte Tiere Hauttransplantate vom Stamm A, während Hauttransplante von unbeteiligten dritten Spendern (3rd Party) abgestoßen wurden. Später gelang es der Arbeitsgruppe von David Sachs, den Nachweis zu führen, daß die Herstellung eines gemischten hämatopoetischen Chimärismus zur Spender-spezifischen in vitro und in vivo Toleranz führte (Ildstad and Sachs, 1984).

Prinzipiell kann man bei der Toleranzentwicklung von T-Zellen eine zentrale, d. h. Thymus-vermittelte und eine periphere Form der Tolerisierung unterscheiden. Die immunologischen Mechanismen der Toleranzinduktion und -erhaltung gegenüber definierten Antigenen umfassen die klonale Deletion, die Anergisierung, die aktive Suppression und die Ignoranz.

In der T-Zellentwicklung erfolgt die zentrale Tolerisierung der T-Zellen durch Deletion (=negative Selektion) im kortiko-medullären Übergang des Thymus. Hier kommt es zur Interaktion zwischen Thymozyten und Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aus dem Knochenmark. Thymozyten mit einer hohen Affinität des T-Zellrezeptors zum MHC, sterben im Rahmen der negativen Selektion durch Apoptose (Surh and Sprent, 1994). Hierdurch kommt es zur Ausbildung eines T-Zellrepertoires, welches keine autoreaktiven T-Zellpopulationen mehr aufweist. Hinweise für die Rolle der klonalen Deletion zur Toleranzinduktion wurden durch die Analyse von Thymozytensubpopulationen gewonnen. Kappler und Marrack konnten zeigen, daß bestimmte Superantigen-reaktive V $\beta$ -Subpopulationen (z.B. V $\beta$ 5 und V $\beta$ 11) in Mausstämmen, die diese Superantigene in Assoziation mit bestimmten MHC Klasse II (I-E) Moleküle exprimieren deletiert sind, nicht aber in Mausstämmen, die I-E negativ sind (Blackman et al., 1990; Kappler et al., 1987; Kappler et al., 1988; Marrack and Kappler, 1990). Diese endogenen Superantigene wurden initial als MIs (Minor Lymphocyte stimulating Antigen) Determinanten beschrieben, die bei MHC-kompatiblen Mausstämmen zu einer starken MLR-Antwort führen. Diese endogenen Superantigene entstammen dem autologen Retrovirus mmtv (Mouse Mammary Tumor Virus), dessen Genprodukte mmtv 8 und 9 z. B. im Genom der B6 Mäuse exprimiert werden. Diese Genprodukte können an distinkte V $\beta$ -Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors (z.B. V $\beta$ 5 oder V $\beta$ 11) binden, wenn Sie im Kontext bestimmter MHC II-Moleküle (I-E<sup>+</sup>) präsentiert werden und führen dann zur Deletion dieser Superantigen-reaktiven Zellen im Thymus. Diese Deletion erfolgt jedoch nur in I-E<sup>+</sup> nicht aber in I-E<sup>-</sup> Mausstämmen.

Es konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden, daß bei gemischten Chimären im Rahmen der Knochenmarktransplantation die Spender-spezifische Toleranzinduktion (Host-vs.-Graft-Toleranz) durch zentrale Tolerisierung erfolgt. Durch Einwanderung von APC des Spenders in den Empfängerthymus erfolgt dort die Deletion Spender-reaktiver Zellen des Empfängers im Sinne einer negativen Selektion (Abbildung 1). Durch Benutzung MIs<sup>a</sup> reaktiver Spender, bei denen diese V $\beta$  Populationen deletiert werden, und Empfängern, die aufgrund fehlender I-E Expression nicht deletieren, kann man in gemischten Chimären das Schicksal Spender-reaktiver T-Zellen verfolgen. So ist in solchen gemischten Chimären zu beobachten, daß die Superantigen-reaktive T-Zellpopulation nach der Transplantation deletiert wird. Die Daten der Deletion Superantigen-reaktiver Zellen lassen sich auch auf Alloantigen-reaktive T-Zellen übertragen. Manilay et al. (Manilay et al., 1998) bedienten sich eines Alloantigen-spezifischen transgenen Mausmodells zur Überprüfung dieser Frage. In diesem Mausmodell exprimieren die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen einen transgenen T-Zellrezeptor (TCR) (2C). Diese 2C-TCR-ist gegen das MHC-I Antigen L<sup>d</sup> gerichtet (z.B. gegen BALB/c). Manilay et al. untersuchten in gemischten (BALB/c $\rightarrow$ B6.2C) hämatopoetischen Chimären, das Schicksal dieser transgenen T-Zellpopulation mit Hilfe des klonotypischen Antikörpers 1B2. In gemischten Chimären konnte eine Deletion dieser 2C<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>T-Zellen nachgewiesen werden.

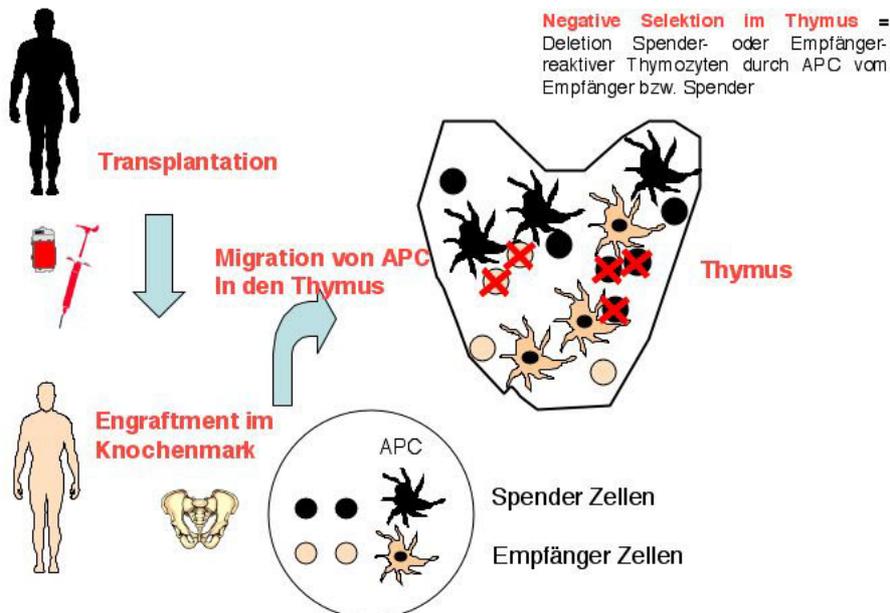


Abbildung 1: *Zentrale Tolerisierung bei gemischten Chimären*

Die Präsenz eines Spenderchimärismus im Thymus ist absolut kritisch für die Erhaltung der Toleranz. So konnte gezeigt werden, daß in Knochenmarkchimären die Antikörpervermittelte Depletion des Spenderchimärismus nur dann zum Verlust der Spender-spezifischen Toleranz führte (d.h. Abstoßung eines Hauttransplantates vom Spenderstamm), wenn der Thymus noch vorhanden war. Wurde das Empfängertier nach KMT, aber vor der Antikörpergabe thymektomiert, verlor das Tier zwar seinen hämatopoetischen Chimärismus blieb aber tolerant gegenüber dem Hauttransplantat. Diese Daten zeigten, daß die Anwesenheit von Spenderzellen im Thymus zwingend ist um neu gebildete T-Zellen zu tolerisieren (Khan et al., 1996).

Die Tolerisierung von Spender-T-Zellen ist wahrscheinlich komplexer. In gemischten Knochenmarkchimären können T-Zellen des Spenders durch Empfänger-APC im Thymus des Empfängers deletiert werden bzw. Empfänger T-Zellen durch APC des Spenders deletiert werden (s. o., s. Abbildung 1). Nach myeloablativer Konditionierung wird die Empfängerhämatopoese komplett durch die Spenderhämatopoese ersetzt. Aus diesem Grund fehlt die oben angesprochene Interaktion der Spender-T-Zellen mit den APC des Empfängers (Ramsdell et al., 1989). Hier müssen zusätzlich Mechanismen (z.B. Anergisierung und Suppression) wirksam werden, die zur Tolerisierung der Spender-T-Zellen führen. So konnte gezeigt werden, daß das Thymusepithel (Salaun et al., 1990) bzw. extrathymische Antigene zur Tolerisierung von Empfänger-reaktiven Spenderzellen führen (Burkly et al., 1990; Morahan et al., 1989; Morahan et al., 1991). Anergisierung wird definiert als fehlende Aktivierung der T-Zellen nach Stimulation durch ihren Antigenrezeptor. T-Zellanergie ist gekennzeichnet durch die fehlende IL-2 Expression und Sekretion nach Aktivierung. Unterschiedliche Mechanismen liegen der Induktion von Anergie zu Grunde. Untersuchungen an anergisierten T-Zellen zeigten, daß solche Zellen komplexe Veränderungen in der Signaltransduktion nach TCR-Stimulation aufweisen und z.B. nicht mehr in der Lage sind u. a. Ick oder ZAP-70 zu aktivieren (Cho et al., 1993; Fields et al., 1996; Kang et al., 1992; Madrenas et al., 1995; Mondino et al., 1996). Neueste Arbeiten zeigen, daß der Zyklin-abhängige Kinase Inhibitor  $p27^{kip1}$  eine zentrale Rolle bei der Blockade der klonalen Expansion anergisierten T-Zelle spielt.

So weisen anerge T-Zellen einen frühen G1-Arrest und eine damit verbundenen Zunahme des hypophosphorylierten Rb-Proteins auf. Die Aktivierung als auch die Anergieinduktion war mit einer Zunahme von Cyclin D2, welche zu einem signifikanten Teil an cdk4-gebunden war. Während bei aktivierten T-Zellen diese Cyclin D2-cdk4-Komplexe Kinaseaktivität aufwiesen, zeigten diese Komplexe in anergisierten Zellen keinerlei Kinaseaktivität. Bei weitergehenden Untersuchungen konnte schließlich bei anergisierten T-Zellen in dem Cyclin D2-cdk4 Komplex der Kinase-Inhibitor  $p27^{kip1}$  nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte eine Zunahme der  $p27^{kip1}$  Expression im Vergleich zu unstimulierten Zellen beobachtet werden. Die Überexpression von  $p27^{kip1}$  führte in T-Zellklonen zur Anergie. Die konditionale Expression von  $p27^{kip1}$  mit Hilfe des tet-Systems

fürhte in Jurkat Zellen zur Inhibition der IL-2 Transkription durch Interaktion von p27<sup>kip1</sup> mit JAB1 einem Koaktivator von c-jun, welches in der Folge zu einer gestörten AP-1 Transaktivierung führte (Boussiotis et al., 2000).

Diese Beobachtungen zeigen wie fließend der Übergang zwischen zentraler und peripherer d.h. extrathymischer Tolerisierung ist. Als Beispiel für die Komplexität der Toleranzentwicklung sei an dieser Stelle die Cyclosporin A-vermittelte Tolerisierung gegenüber Nierentransplantaten im MGH-Miniaturschweinmodell dargestellt die ohne KMT erfolgt. Hierbei kann eine kurzzeitige 12-tägige perioperative Cyclosporin-Gabe zur dauerhaften Transplantatakzeptanz von MHC I-inkompatiblen Transplantaten führen (Rosengard et al., 1992). Erstaunlicherweise ist diese Tolerisierung von der Präsenz des Thymus abhängig. So ist in thymektomierten Tieren Toleranz nicht mehr induzierbar (Yamada et al., 1997). Dieser Beobachtung könnte z.B. durch die Tolerisierung rezirkulierender aktivierter T-Zellen im Thymus erklärt werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht in der Aufnahme von Spenderantigenen durch Empfänger-APC und deren Migration in den Thymus, wo sie die Antigen-reaktiven T-Zellen deletieren. Eine weitere Erklärung könnte die Generierung von regulatorischen Zellenpopulation im Thymus sein.

Somit stellt die aktive Suppression den dritten wichtigen Kardinalmechanismus der Toleranzinduktion bzw. -erhaltung dar. Im Gegensatz zur Anergisierung erfordert die aktive Suppression eine Antigen-spezifische Inhibition der Immunantwort durch regulatorische T-Zellen. Diese aktive spezifische Suppression einer Immunantwort kann auf sekundäre Empfänger übertragen werden. Dieses Konzept wird auch als "infektiöse Toleranz" bezeichnet (Bemelman et al., 1998; Qin et al., 1993).

Aus den o. a. Befunden wird verständlich, daß die Mechanismen der Toleranzinduktion (Deletion, Anergisierung, Suppression) sich nicht gegenseitig ausschließen, sondern sich vielmehr ergänzen. So zeigen Daten nach nicht-myeloablativer Konditionierung, daß im Mausmodell MHC Klasse II<sup>+</sup> Zellen des Spenders bereits nach zwei bis drei Wochen im Thymus nachweisbar sind (Mapara et al., 2001; Tomita et al., 1994). Eine Deletion Spender-reaktiver Zellen war jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt nachweisbar. Dieser Deletion ging eine Anergie der Empfänger-T-Zellen voraus, welche durch IL-2 Gabe durchbrochen werden konnte (Tomita et al., 1994).

### **1.3 Pathophysiologie der Graft-versus-Host-Disease**

Die klinischen Hauptprobleme der allogenen Transplantation liegen nach wie vor im Auftreten der Graft-versus-host-Erkrankung (GVHD), des Transplantatversagens (Engraftment failure) und der Immunsuppression. Diese Probleme sind hauptsächlich durch Störungen in der Entwicklung der Immuntoleranz nach Stammzelltransplantation

verursacht und beruhen u. a auf der immungenetischen Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger bezüglich „major“ oder „minor“ Histokompatibilitätsantigenen. Früh konnte in Tierexperimenten die Beobachtung gemacht werden, daß die Gabe allogener (früher: homologer) Lymphozyten zur Entwicklung eines schweren, z. T. letal verlaufenden Krankheitszustand führte, der als homologe, oder Sekundärkrankheit ("homologue", "secondary disease") bzw. als "Runting disease" bezeichnet wurde. Die Erkenntnis, daß dieses Krankheitsbild auf die Alloreaktivität der Spenderzellen zurück zu führen war, beruht auf den Ergebnissen der Arbeitsgruppen von Brent und Simmons (Brent, 1997). Dabei kommt es zur Aktivierung, Expansion und Migration der Alloantigen-aktivierten T-Zellen in die Zielorgane des Empfängers.

Die Entstehung der GVHD wird durch folgende Faktoren beeinflusst: 1. die Alloreaktivität der Spenderzellen (Baxter-Lowe et al., 1993); 2. die Konditionierungs-induzierte proinflammatorische Reaktion; 3. die T-Zellen des Spenders.

Es gibt für die Entwicklung der GVHD zwei unterschiedliche Mausmodelle. Das eine Modell bedient sich der Transplantation von parentalen Knochenmark - und T-Zellen in die F1-Generation ohne vorhergehende Konditionierung. Das andere Modell beruht auf der Transplantation immungenetisch differenter Spenderzellen nach einer Konditionierungstherapie.

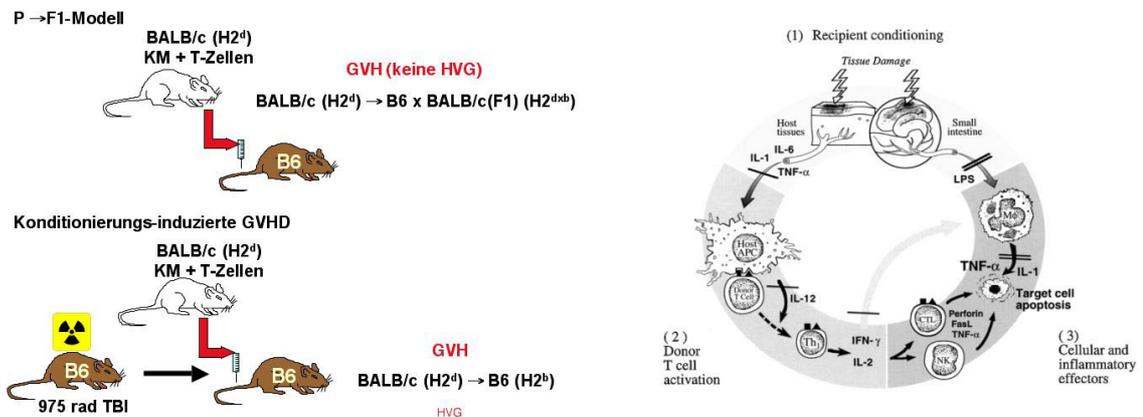


Abbildung 2: A) Experimentelle Modelle der GVHD-Induktion; B) Pathophysiologie der Konditionierungs-induzierten GVHD (aus Hill, GR and Ferrara, JLM 2000, Blood 95:2754-2759)

### A) P → F1-Modell

Die GVHD-Induktion ohne vorhergehende Konditionierung erfolgt durch Applikation von parentalen T-Zellen in Tiere der F1-Generation (P → F1). Hierbei kommt es zu einer rein immunologischen Aktivierung der parentalen Spenderlymphozyten im Sinne einer GVH-Reaktion in den F1-Empfängertieren, da der MHC-Haplotyp des Empfängers als fremd

erkannt wird. Im Gegensatz dazu sind die Empfängertiere gegenüber dem Spender tolerant. Es kommt somit nur zu einer unidirektionalen GVH-Reaktion ohne HVG-Reaktion. Da dieses Modell keine Konditionierung enthält, erlaubt dieses Modell isolierte Untersuchungen zu den Auswirkungen der Alloreaktivität der Spenderzellen. Je nach dem welche MHC-Inkompatibilität von Empfänger und Spender (Klasse I  $\pm$  Klasse II Mismatch) vorliegt und ob T-Zellsubpopulationen bzw. unselektierte T-Zellen verwendet werden, kommt es in diesem Modell zur Entwicklung von zwei unterschiedlichen klinischen GVHD-Verlaufsformen (Rolink et al., 1983): Die eine Verlaufsform, bei isolierter MHC Klasse II Inkompatibilität, ist durch eine lymphoproliferative Phase mit Autoimmunphänomenen (eher einer chronischen GVHD entsprechend) gekennzeichnet. Dieses Krankheitsbild verläuft im wesentlichen nicht letal. Ein komplexeres Bild kann beobachtet werden, wenn eine MHC Klasse I und II Inkompatibilität zwischen Empfänger und Spender vorliegt und unselektierte T-Zellen verabreicht werden. Zunächst kommt es ebenfalls zu einer lymphoproliferativen Phase, die aber schließlich in eine progrediente chronische GVHD mit lymphoide Hypoplasie übergeht (Rolink et al., 1983).

#### B) GVHD-Induktion nach letaler Konditionierung und allogener Transplantation

Alternativ hierzu kann in Empfängertieren nach letaler Bestrahlung und Gabe von MHC-major oder minor inkompatiblen Knochenmark- und Milzzellen eine GVHD induziert werden. Dieses Modell der GVHD-Induktion ist der klinischen Situation wesentlich näher, da es hierbei auch zu einer foudroyanten proinflammatorischen Reaktion kommt, die durch die erhebliche Konditionierungs-abhängige Toxizität bedingt ist. Es gibt Hinweise, daß die Konditionierungsabhängige Mukosa-Schädigung im Darm und die damit verbundene Durchwanderung von Lipopolysacchariden (LPS) aus dem Darmlumen über die geschädigte Mukosa in die Zirkulation das zentrale Ereignis dieses "Zytokinsturms" ist (Cooke et al., 2000a) (Hill and Ferrara, 2000). Mehrere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, daß eine Reduktion der bakteriellen Besiedlung im Darm zu einer geringeren GVHD-Inzidenz führte. So führt die spezifisch-pathogenfreie (SPF) Haltung von Mäusen zur signifikanten Verminderung der GVHD (van Bekkum et al., 1974). Vergleichbare klinische Befunde zeigen, daß eine antimikrobielle Darmdekontamination zur Verminderung des GVHD-Risikos führt (Beelen et al., 1992). Die besondere Bedeutung von LPS in der Pathogenese der GVHD wird durch Daten zur genetischen Resistenz gegen LPS untermauert. So ist bei Mäusen (C3H/HeJ), die Mutationen im Toll-like-receptor 4 (tlr-4) Gen aufweisen (Qureshi et al., 1999), eine genetische Resistenz gegenüber der Wirkung von LPS nachweisbar. Werden solche Tiere als Spender eingesetzt führt dies zu einer signifikanten Reduktion der GVHD (Cooke et al., 2000a). Bei der GVHD-Entwicklung wesentlich beteiligt sind in der Folge u. a. inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 (Cooke et al., 2000b; Hill et al., 1999; Hill et al., 2000). Klinisch konnte gezeigt werden, daß z.B. die Höhe des TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Spiegels nach

Konditionierung und vor der Transplantation mit der GVHD-Induktion korrelierte (Herve et al., 1992; Holler et al., 1990). Durch diese Zytokine begünstigt, könnte es unter anderem zu einer effektiveren Alloantigenpräsentation (Hochregulation von MHC I und II) durch die Empfängerzellen kommen und somit zu einer verstärkten Aktivierung der Spender-T-Zellen. Des Weiteren können die Alloreaktion und die Konditionierung in den Geweben zur Hochregulation von inflammatorischen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen oder Chemokinen führen und verursachen auf diesem Weg die Infiltration der Organe durch die alloreaktiven T-Zellen.

#### **1.4 *Klinische Aspekte der GVHD***

Die klassischen Zielorgane der GVHD sind Haut, Darm, Leber und Lunge. Die GVHD läßt sich in eine akute und eine chronische Verlaufsform unterteilen. Während die akute GVHD im wesentlichen eine direkte Folge der Proliferation und Expansion alloreaktiver Zellen ist, ist die chronische GVHD in ihrer Genese komplexer und klinisch durch autoimmunologische Manifestationen (z.B. Sklerodermie-artige Verläufe, Sjögren Syndrom) bestimmt. Die genauen Mechanismen, die zur Infiltration der Spender-T-Zellen in die extralymphatischen und parenchymatösen Organen wie der Leber oder dem Darm führen sind zur Zeit noch unklar.

Die Möglichkeiten der Therapie bzw. der Prophylaxe beruhen im wesentlichen auf dem Einsatz immunsupprimierender Substanzen. Hierbei sind vor allem Steroide, Cyclosporin (CsA), Methotrexat (MTX) und Mycophenolat Mofetil (MMF) zu nennen. Auch der Einsatz von IL-2-Rezeptorantikörpern hat das therapeutische Repertoire erweitert. Eine weitere Therapie/Prophylaxe-Option der GVHD stellt die Anwendung der photodynamischen Therapie dar, die sowohl in vivo als auch ex vivo angewendet werden kann (Rossetti et al., 1995). Alternativ zur pharmakologischen Immunsuppression wurde frühzeitig die Erkenntnis gewonnen, daß die direkte Depletion von Spender-T-Zellen ex vivo oder in vivo eine effektive Maßnahme zur GVHD-Prophylaxe darstellt (Prentice et al., 1984), die jedoch mit einem signifikant erhöhtem Rezidivrisiko und Transplantatversagen verbunden ist (Goldman et al., 1988; Kernan et al., 1989; Kernan et al., 1987; Martin et al., 1985; Martin et al., 1988; Vallera et al., 1981; Vallera et al., 1982). Der wesentliche Grund für das Transplantatversagen nach T-Zelldepletion beruht darauf, daß die T-Zellen des Transplantates eine sogenannte "facilitator"-Rolle spielen. Dies bedeutet, daß diese T-Zellen des Transplantates wichtig sind um die residuellen Host-versus-Graft-reaktiven Zellen des Empfängers zu eliminieren und somit das Engraftment erst ermöglichen.

## **1.5 Graft-versus-Leukemia (GVL) Reaktion**

Diese gravierenden Folgen der GVHD sind jedoch billigend in Kauf genommen worden, da es bereits in den 50er Jahren Hinweise gab, daß die Alloreaktivität der Spenderzellen auch einen Antitumor Effekt aufweisen könnten. Barnes und Loutit, entwickelten in den 50er Jahren das Konzept der Graft-versus-Leukämie-Reaktion. Diese Konzept konnte im Laufe der Jahrzehnte sowohl tierexperimentell als auch klinisch verifiziert werden. Hierbei wurde häufig eine Koppelung von GVL und GVHD-Auftreten beobachtet, so daß der bessere Anti-Tumoreffekt (GVL) v. a. bei Patienten mit GVHD auftrat (Horowitz et al., 1990; Weiden et al., 1979; Weiden et al., 1981).

Die Beobachtung, daß die Alloreaktivität der Spenderzellen zu einem Antitumoreffekt führen kann, ist der wesentliche Grund, weshalb die Allogene KMT trotz der z. T. verheerenden und mutilierenden klinischen Konsequenzen der GVHD nicht verlassen wurde. Dies war umso begründeter, da es experimentelle Daten (Bortin et al., 1973; Bortin et al., 1979; Chester et al., 1979), aber auch klinische Hinweise (Horowitz et al., 1990) gab, die vermuten ließen, daß die GVL-Reaktion nicht zwingend mit einer GVHD verbunden sein muß. Der eindeutige Nachweis, daß eine GVH-Reaktion auf das lymphohämatopoetische System beschränkt sein kann ohne gleichzeitig eine GVHD zu induzieren, konnte 1988 von Megan Sykes erbracht werden (Sykes et al., 1988). In diesen Experimenten wurde gemischten hämatopoetischen Chimären 10 - 22 Wochen nach KMT eine große Zahl allogener Spenderlymphozyten appliziert. Die gleiche Zelldosis hätte am Tag der KMT zur Entwicklung einer letal-verlaufenden GVHD geführt. Die verzögerte Gabe der Spenderlymphozyten führte jedoch in diesem Fall zur Konversion des gemischten Chimärismus in einen vollen hämatopoetischen Chimärismus ohne gleichzeitige Entwicklung einer GVHD. Somit war der Beweis, für die Existenz einer GVH-Reaktion die auf das lymphohämatopoetische System beschränkt ist (LGVH) erbracht. Diese Beobachtungen ließen den Schluß zu, daß somit auch GVL und GVHD potentiell trennbar sein könnten. Weitere tierexperimentelle Daten wurden von Hans-Jochem Kolb generiert, der im Hundemodell eindeutig zeigen konnte, daß eine Spenderlymphozyteninfusion (Donor lymphocyte infusion, DLI) vor Tag 60 nach KMT zu einer letalen GVHD führte, während sie danach zur Konversion des gemischten in einen vollen Chimärismus ohne Entwicklung von GVHD führten (Kolb et al., 1997). Es war auch Kolb, der in seinen Pionierarbeiten zeigen konnte, daß solche Spenderlymphozyteninfusionen bei Patienten erstaunliche Remissionen zu induzieren vermochten und somit eine neue Ära der Zelltherapie einläutete (Kolb et al., 1995; Kolb et al., 1990). Mittlerweile hat diese Therapieform eine weltweite Verbreitung gefunden und wurde erfolgreich bei mehreren Krankheitsentitäten eingesetzt (Porter et al., 1999). Besonders effektiv sind Spenderlymphozyteninfusionen bei Patienten mit CML. DLI zeigten ebenfalls eine klinische Wirksamkeit bei Patienten mit AML/MDS (Kolb et al., 1995), NHL (Sykes et al., 1999) und multiplem Myelom (Lokhorst et al., 1997; Porter et al.,

1999). Allerdings scheinen DLI keinen Effekt bei ALL-Patienten zu zeigen (Kolb et al., 1995) .

## **1.6 Weiterentwicklung von Transplantationsverfahren**

### **1.6.1 Nicht-myeloablative Konditionierungsprotokolle**

Basierend auf den Erkenntnissen von Billingham, Brent und Medawar (Billingham et al., 1953) bzw. Owen (Owen, 1945), konnte die Arbeitsgruppe von David Sachs zeigen, daß die Induktion eines gemischten hämatopoetischen Chimärismus durch die kombinierte Transplantation von T-Zelldepletiertem syngenen und allogenen Knochenmark nach letaler Bestrahlung zur Spender-spezifischen Toleranz gegen Allo- und Xenotransplantate führte (Ildstad and Sachs, 1984). Initiale Absicht dieser Vorgehensweise war es mit Hilfe des gemischten Chimärismus Toleranz im Rahmen der soliden Organtransplantation zu erzielen. In den späten 80er gelang es erneut der Arbeitsgruppe von David Sachs ein nicht letales Konditionierungsprotokoll zu entwickeln welches ebenfalls die Etablierung eines gemischten Knochenmarkchimärismus erlaubte und zur Spender-spezifischen Toleranz über allogene und xenogene MHC-Grenzen führte (Sharabi et al., 1990; Sharabi and Sachs, 1989). Weiterhin gelang es der Arbeitsgruppe von Samuel Storer nachzuweisen, daß eine alleinige Bestrahlung der Lymphknotenstationen (Total Lymphoid Irradiation, TLI) zum Engraftment allogener Zellen und der Induktion eines gemischten hämatopoetischen Chimärismus führte (Slavin et al., 1978). Diese ersten Daten zeigten, daß es ohne myeloablative Konditionierung prinzipiell möglich ist ein Engraftment der allogenen Stammzellen zu erzielen. Dies weckte die Hoffnung, daß mit Hilfe solcher nicht-myeloablativer Konditionierungsprotokolle auch bei Patienten ein Engraftment der allogenen Stammzellen erreichbar sein könnte. Aufgrund der reduzierten Konditionierungstoxizität wären solche Protokolle auch potentiell bei älteren Patienten und Patienten mit Organdysfunktionen einsetzbar, bei denen bislang der Einsatz einer myeloablativen Konditionierung kontraindiziert war. Eine Reduktion der Konditionierungsintensität wäre auch insofern vertretbar, da der wesentliche Therapieeffekt nicht auf der Chemotherapie-vermittelten Zytoreduktion, sondern auf der immunologisch-vermittelten GVL-Reaktion beruhen würde. Aus diesen Gründen kam es zu rasanten Fortschritten bei der Entwicklung solcher nicht-myeloablativer Konditionierungskonzepte.

Die Arbeitsgruppe um Storb entwickelte ein Protokoll im Hundemodell in dem ein stabiler Chimärismus bei MHC-Kompatibilität erzielt werden konnte. Dieses Protokoll bestand lediglich aus einer niedrig-dosierten Ganzkörperbestrahlung (2Gy) und einer immunsuppressiven Therapie (Cyclosporin und MMF) nach der Transplantation (Storb et al., 1997). Der erste erfolgreiche Bericht über den Einsatz einer nicht-myeloablativen Konditionierung in der MHC-inkompatiblen Situation im "Large Animal" (MGH-

Miniaturschweine) stammte wieder aus der Arbeitsgruppe von Sachs. Basierend auf dem von Sharabi entwickelten Protokoll (s. o.) gelang es mit Hilfe eines CD3-Immuntoxins, einer Thymusbestrahlung und einer hohen Stammzelldosis einen gemischten Chimärismus und Spender-spezifische Toleranz zu induzieren. (Fuchimoto et al., 2000).

Im klinischen Bereich wurde der Einsatz der nicht-myeloablativen Konditionierungskonzepte im wesentlichen von vier unterschiedlichen und unabhängigen Arbeitsgruppen etabliert. So konnte gezeigt werden, daß eine Minimierung der Konditionierungstoxizität bei weiterhin erhaltenem Engraftment möglich ist (Giralt et al., 1997; McSweeney PA et al., 2001; Slavin et al., 1998; Sykes et al., 1999).

Diese verschiedenen Konditionierungsprotokolle zeichnen sich durch unterschiedliche Konditionierungsintensität aus. Dementsprechend rekonstituieren die Patienten in den meisten Protokollen als volle Chimäre. Protokolle die zu einem "längerfristigen" gemischten Chimärismus führen, wurden in Seattle (Storb) bzw. in Boston am Massachusetts General Hospital (Sykes) etabliert. Allerdings beobachtet man auch hier eine spontane Konversion des gemischten Chimärismus in vollen Chimärismus. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß es noch nicht gelungen ist im Patienten eine ähnlich gute in vivo Depletion der nicht-toleranten Spender-T-Zellen zu erreichen, wie es in der Maus oder in "Large Animal"-Modellen der Fall ist. So ist es verständlich warum es im Gegensatz zu den Tiermodellen nach diesen Dosis-reduzierten Konditionierungsprotokollen durchaus zum Auftreten von GVHD kommt. (Giralt et al., 1997; McSweeney PA et al., 2001; Slavin et al., 1998). Insgesamt ist es jedoch nun möglich mit Hilfe dieser neuen Konditionierungsprotokolle eine Grundlage für den Einsatz weiterer zelltherapeutischer Konzepte zu schaffen.

### **1.6.2 Transplantation über MHC-Grenzen**

Wie bereits oben dargestellt müssen im Rahmen der allogenen KMT zwei Barrieren überwunden werden: Zum einen muß die Host-versus-Graft-Reaktion überwunden werden, zum anderen muß die GVH-Reaktion so kontrolliert werden, daß keine letale GVHD entsteht. Mit zunehmender Inkompatibilität zwischen Empfänger und Spender kommen diese Barrieren besonders zum Tragen: Das Auftreten einer GVHD ist direkt mit dem Ausmaß der immungenetischen Disparität (Keever-Taylor et al., 2001) korreliert. Dies läßt sich durch eine rigorose T-Zelldepletion des Transplantates gut beherrschen (Martin and Kernan, 1990). Allerdings kommt es dann zur vermehrten Abstoßung des Transplantates (Engraftment failure) (Kernan et al., 1987), da die T-Zellen des Transplantates zur Eliminierung der HVG-Reaktion notwendig sind (Vallera et al., 1981; Vallera et al., 1982), weiterhin ist nach Transplantation eine vermehrte Rezidiventstehung zu beobachten. Diese Problematik führte dazu, daß eine höhergradige HLA-inkompatible

Transplantation (> 1 Mismatch) in der Regel nicht durchgeführt wird. Ausnahme hiervon stellen die kongenitalen Immundefektsyndrome (SCID) dar, die aufgrund des Immundefektes eine verminderte HVG-Reaktivität aufweisen und bei denen deshalb eine ex vivo T-Zelldepletion des Transplantates zur GVHD-Prophylaxe möglich ist. Bei diesen Patienten gelang es prinzipiell HLA-haploidente Transplantationen vorzunehmen (O'Reilly et al., 1986; Reisner et al., 1983).

Leider gelingt es nur in ca. 40% der Fälle einen MHC-kompatiblen Familien- oder Fremdspender zu finden. Dies bedeutet, daß mehr als die Hälfte der Patienten keinen passenden Spender haben und einer potentiell kurativen Therapie nicht zugeführt werden können. Ein haploidenter Spender (z.B. Eltern oder Geschwister) steht jedoch der überwiegenden Mehrheit zur Verfügung und könnte somit zu einer signifikanten Verbesserung der Spenderverfügbarkeit führen. Um die o. g. Probleme zu überwinden wurde von den Arbeitsgruppen um Reisner und Martelli das "Mega-dose"-Konzept entwickelt. Dies beruht darauf, daß eine rigorose T-Zelldepletion des Transplantates zur GVHD-Prophylaxe im Rahmen der Mismatch Konstellation nur möglich ist, wenn die HVG-Reaktion unterdrückt wird. Dies ist durch eine stärkere Konditionierungstherapie (zur besseren Elimination alloreaktiver T-Zellen des Empfängers) und eine signifikant höhere Stammzelldosis möglich (Bachar-Lustig et al., 1995; Schwartz et al., 1987). Die erhöhte Stammzelldosis hat zwei Gründe: Zum einen verschiebt die höhere Spenderstammzelldosis die Balance zwischen residuellen Empfänger und Spenderstammzellen zu Gunsten des Spenders und erleichtert somit durch Konkurrenz das Engraftment der Spenderzellen. Zum zweiten konnte Reisner zeigen, daß CD34-Stammzellen eine Vetofunktion ausüben und die Empfänger T-Zellen tolerisieren (Bachar-Lustig et al., 1999; Gur et al., 2002; Rachamim et al., 1998). Diese präklinischen Arbeiten und die darauf basierenden klinischen Pionierarbeiten der Arbeitsgruppe in Perugia haben gezeigt, daß haploidente Transplantationen klinisch durchführbar sind (Aversa et al., 1994; Aversa et al., 1998). Von besonderem Interesse ist bei der haploidenten Transplantation der durch NK-Zellen vermittelte GVL-Effekt. Dieser scheint darauf zu beruhen, daß es bei MHC-Inkompatibilität ebenfalls zu einem Mismatch zwischen den inhibitorischen NK-Rezeptoren (Killer Inhibitory Receptors KIR) und ihren Liganden, den MHC-Antigenen kommt. Durch das Fehlen des inhibitorischen Signals kann die NK-Zelle, die entsprechende Zielzelle, die nicht das passende MHC-Antigen exprimiert lysieren (Ruggeri et al., 1999). Dieser KIR-Mismatch ist offensichtlich für die guten klinischen Resultate bei der haploidenten Transplantation bei AML (Ruggeri et al., 1999; Ruggeri et al., 2002) verantwortlich.

### 1.6.3 Ziele und Fragestellung

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es in einem komplett MHC-inkompatiblen (H2<sup>a</sup> H2<sup>b</sup>) Mausmodell die Effekte der Spenderlymphozyten nach nicht-myeloablativer Konditionierung zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollten im Mausmodell im besonderen folgende Themenkomplexe bearbeitet werden:

1. Ist es möglich durch ein neues Cyclophosphamid-haltiges nicht-myeloablatives Konditionierungsprotokoll einen stabilen Chimärismus und eine Spender-spezifische Toleranz zu induzieren und welche Mechanismen liegen dieser Toleranzentwicklung zugrunde?
1. Welche Effekte haben Spenderlymphozyteninfusionen in diesem Modell im Hinblick auf die GVH und HVG-Toleranz.
2. Können in diesem Modell GVL-Effekte durch DLI vermittelt werden und welche Mechanismen liegen diesen GVL-Effekten zu Grunde?
3. Welche Rolle spielen Antigen-präsentierende Zellen des Empfängers bei der GVL-Induktion durch DLI?

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Mausstämme

Es wurden folgende Mausstämme verwendet: C57BL/6 (B6) H2<sup>b</sup>, B10.A (H2<sup>a</sup>), B10.RIII (H2<sup>f</sup>), A.SW(H2<sup>s</sup>), B6.TCRβ<sup>-/-</sup>, B6.β2m<sup>-/-</sup> und BALB/c (H2<sup>d</sup>). Die Mäuse wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) erworben. In Klammern ist der jeweilige MHC-Haplotyp aufgeführt. Die Mäuse erhielten autoklaviertes Futter und wurden in Mikroisolator Käfigen gehalten. Des weiteren verwendeten wir den 2C-TCR-transgenen Mausstamm (B6.2C [2C]), der in C57BL/6 genetischen Background vorliegt. Der transgene TCR ist gegen das MHC-Klasse I Antigen L<sup>d</sup> gerichtet. Die Mäuse stammten von Dr. Dennis Loh (Washington Universität, St. Louis, MS, USA)

### 2.2 Knochenmarktransplantationsverfahren

Zur Herstellung von Knochenmarkchimären verwendeten wir zwei Konditionierungsverfahren. Wenn nicht anders dargestellt, wurde die Mehrzahl der Experimente in der B10.A→B6 Mausstammkombination durchgeführt

#### 2.2.1 Nicht-myeloablative Konditionierung

##### Nicht-myeloablative Konditionierungsprotokolle

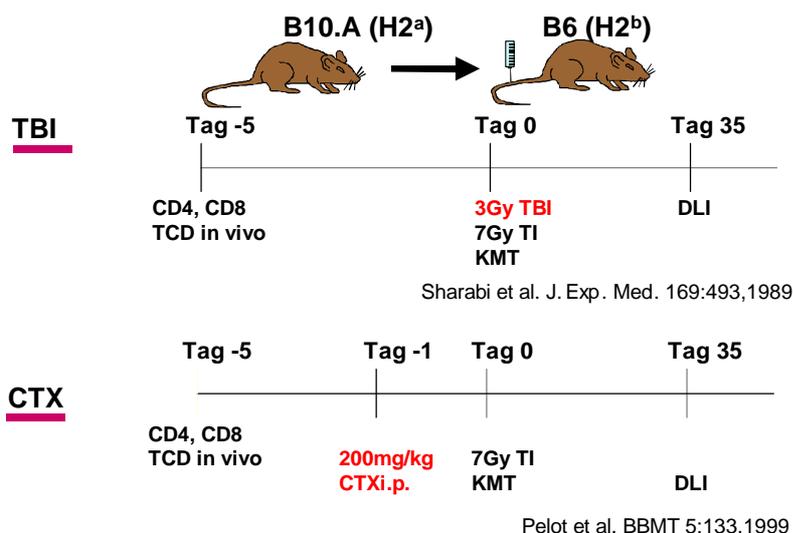


Abbildung 3: Nicht-myeloablative Konditionierungskonzepte

Das in der Arbeit benutzte Cyclophosphamid-haltige Konditionierungsprotokoll (CTX) wurde kürzlich in der Arbeitsgruppe von Megan Sykes entwickelt (Pelot et al., 1999) und

beruht auf dem von Sharabi und Sachs (Sharabi et al., 1990; Sharabi and Sachs, 1989) entwickelten nicht-myeloablativen Konditionierungsverfahren (s. Abbildung 3). Der wesentliche Unterschied zu dem Sharabi-Protokoll besteht darin, daß die Ganzkörperbestrahlung am Tag 0 durch die i. p. Gabe von 200mg/kg Cyclophosphamid am Tag -1 ersetzt wurde. Des weiteren beinhaltet das Konditionierungsprotokoll am Tag-5 die i. p. Gabe von 2.0mg anti-CD4 (Gk1.5) und 1.4mg anti-CD8 (2.43) Antikörpern zur in vivo T-Zelldepletion (TCD), sowie einer Thymusbestrahlung mit 700 rad am Tag 0. Die Thymusbestrahlung erfolgte mit Hilfe einer Kobalt-Bestrahlungsquelle. Nach Abtöten der Tiere durch CO<sub>2</sub>-Narkose erfolgte die Gewinnung von Knochenmark durch Herausspülen der Zellen aus den Femura und Tibiae der Spendermäuse. Die Zellen wurden in Knochenmarkmedium aufgenommen (Medium 199 (Mediatech, Herdon, VA, USA), 4µg/ml Gentamycin, 0.01M HEPES-Puffer, 2µg/ml Dnase (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA)). Den Empfängern wurden  $2 \times 10^7$  Knochenmarkzellen am Tag 0 über die laterale Schwanzvene i. v. injiziert.

### **2.2.2 Letale Bestrahlung**

Zur Generierung von gemischten oder vollen Spenderchimären benutzten wir die von Ildstad und Sachs bzw. von Sykes et al. zuvor beschriebenen Verfahren (Ildstad and Sachs, 1984; Sykes et al., 1988). Die Empfängertiere erhielten mittels einer <sup>137</sup>Cs-Quelle eine letale Ganzkörperbestrahlung mit 1025 rad. Zur Generierung von vollen Spender- bzw. gemischten Chimären wurden die Empfängertiere mit T-Zell-depletiertem (TCD) allogenen (B10.A) Spenderknochenmark (volle Chimäre) oder einer Mischung aus TCD allogenen (B10.A) und syngenen (B6) Knochenmark (gemischte Chimäre) rekonstituiert. Die in vitro T-Zelldepletion erfolgte mit anti-CD4 (Gk1.5) und CD8-Antikörpern (2.43) und anschließender Komplementlyse.

### **2.3 Spenderlymphozyteninfusion**

Zur Gewinnung von Spenderlymphozyten wurden die Milzen von Spendertieren steril präpariert und in Ammonium-Chlorid-Lyse-Puffer (ACK-Lyse Puffer, Biowhittaker) mit Hilfe des Stempels einer 5ml Spritze homogenisiert. Nach Filtration durch einen Nylonfilter wurde die Zellsuspension mit Knochenmarkmedium gewaschen und die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Es wurden  $3 \times 10^7$  Milzzellen pro Maus über die laterale Schwanzvene i. v. appliziert.

### **2.4 Gemischte Lymphozytenkultur (Mixed lymphocyte reaction MLR)**

Milzzellen wurden in MLR-Medium (RPMI 1640 [Mediatech], 15% (v/v) CPSR-2 [Sigma] als Serumersatz, 0.09mM nicht-essentielle Aminosäuren, 2mM L-Glutamin, 1mM

Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin 0.01 M Hepes-Puffer, 0.025 mM 2-Mercaptoethanol, Biowhittaker) kultiviert.

Stimulatorzellen wurden mittels einer <sup>137</sup>Cs-Strahlenquelle mit 3000 rad bestrahlt. In Doppeltansätzen wurden 4x10<sup>5</sup> Stimulatorzellen drei oder vier Tage mit der gleichen Zahl von Responderzellen in 96-Flachboden-Platten bei 37°C kultiviert. Die letzten 16-18h der Kultivierungszeit erfolgten in Gegenwart von 1µCi <sup>3</sup>H-Thymidin pro Well. Danach erfolgte die Ernte der Zellen auf Glasfiltermatten mittels eines Tomtec Erntegeräts (Hamden, CT, USA). Der <sup>3</sup>H-Thymidineinbau wurde mittels eines Betaplatecounters gemessen. Der Stimulations-Index (SI) wurde entsprechend der folgenden Formel bestimmt: cpm Antispender/ cpm Anti-Empfänger.

## **2.5 Zell-vermittelter Lympholyse-Assay (Cell-mediated lympholysis assay [CML])**

Milzzellen wurden in CML-Medium (RPMI 1640 (Biowhittaker), 10% (v/v) Fetales Kälberserum (Sigma), 0.09mM nicht-essentielle Aminosäuren, 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 0.025 mM 2-Mercaptoethanol and 0.01M Hepes Puffer [Biowhittaker]) resuspendiert. Responder- und Stimulatorzellen wurden auf eine Konzentration von 8 x 10<sup>6</sup> cells per ml eingestellt. Die Stimulatorzellen wurden mittels einer <sup>137</sup>Cs-Strahlenquelle mit 3000 rad bestrahlt. 8x10<sup>5</sup> Stimulatorzellen wurden über 5 Tage mit 8 x10<sup>5</sup> Responderzellen in 96-Rundbodenplatten bei 37°C kokultiviert. Nach 5 Tagen Kultur erfolgte eine Serienverdünnung in zweier Schritten, so daß die zytolytische Aktivität bei 5 unterschiedlichen Effektor und Target Verhältnissen bestimmt werden konnte. Als Targetzellen wurden 8x10<sup>3</sup> <sup>51</sup>Cr-markierte Conavalin A (ConA)-stimulierte Lymphoblasten zu jedem Well hinzugefügt. 4h später wurde der Überstand mit Hilfe des Titertekgerätes aufgenommen. (Skatron, Inc, Sterling, VA, USA). Die <sup>51</sup>Cr Freisetzung wurde in einem Gamma-Counter bestimmt (Canberra-Packard, Meriden, CT, USA). Die maximale Chromfreisetzung wurde durch Lyse von Chrom-markierten Zellen in einer 5% NP-40 Lösung ermittelt. Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte mit folgender Formel: PSL (Prozent spezifische Lyse) = 100% x (Experimentelle Chromfreisetzung - Spontane Chromfreisetzung / Maximale Chromfreisetzung - Spontane Chromfreisetzung).

## **2.6 Hauttransplantation**

Die Empfängermäuse wurden mit 0.08 mg/g Ketamin (Fort Dodge, Fort Dodge, IO, USA) und 0.012mg/g Xylazin (Bayer, Shawnee Mission, KA, USA) betäubt und rasiert. Es wurden zwei Transplantbetten angelegt, die durch eine Hautbrücke voneinander getrennt blieben. Hierzu wurden zwei ca 1,5 cm x 1cm messende Hautlappen der Empfängermäuse entfernt ohne den Panniculus carnosus zu verletzen. Entsprechend

zugeschnittene Schwanzhautlappen vom Knochenmarkspenderstamm bzw. von unbeteiligten 3<sup>rd</sup> Party Tieren wurden jeweils in den vorbereiteten Transplantatbetten festgenäht. Danach wurden die Tiere bandagiert. Am Tag 7 wurde der Verband entfernt. Täglich erfolgte die Inspektion auf Zeichen der Transplantatabstoßung oder der Wundinfektion. Eine komplette Transplantatabstoßung wurde diagnostiziert, wenn weniger als 10% des Hauttransplantates im Transplantatbett nachweisbar waren.

## **2.7 Durchflußzytometrische Untersuchungen**

### **2.7.1 Untersuchungen zum Chimärismus**

Nach KMT erfolgte die Immunphänotypisierung der Empfänger zum Chimärismuskachweis im peripheren Blut, in der Milz, im Knochenmark bzw. im Thymus. Thymi und Milzen wurden zur Herstellung einer Einzelzellsuspension sanft in KM-Medium oder in ACK-Lysepuffer (Biowhittaker) homogenisiert. Zur Entfernung von Zellklumpen und Debris wurde die Zellsuspension durch einen Nylonfilter filtriert.

Peripheres Blut (ca 0.3 - 0.5ml) wurde durch Blutentnahme aus der lateralen Schwanzvene gewonnen und in heparinisierten Eppendorfröhrchen gesammelt. Im Anschluß erfolgte eine zweimalige hypotone Lyse der Erythrozyten mit deionisiertem Wasser.

Zur Zwei- oder Dreifarbenimmunfluoreszenzfärbung wurden  $10^6$  Zellen mit einem FITC-, Phycoerythrin (PE) oder Biotinmarkierten (Bio) Antikörper 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Bindung des biotinylierten Antikörper durch eine zweite Inkubation (10 min) mit PE-gekoppeltem Streptavidin nachgewiesen. Um die unspezifische Bindung zu minimieren, erfolgten die Färbungen in Gegenwart eines anti-Fc $\gamma$ RII (10 $\mu$ l 2.42) Antikörpers (Unkeless, 1979). Die folgenden Antikörper wurden zur Chimärismusanalyse verwendet: anti-CD4-FITC, anti-CD8 $\beta$ -FITC, anti-B220-FITC (PharMingen San Diego, CA, USA), anti-Mac-1-FITC (CalTag, San Francisco, CA, USA), 34-2-12-Bio (anti-H2-D<sup>d</sup>). Die nicht-bindenden Kontrollantikörper HOPC-FITC, HOPC-Bio (Dr. David Sachs, Boston, Ma) und Ratte IgG2b-PE (Pharmingen) wurden als Negativkontrollen verwendet. Der prozentuale Anteil von Spenderzellen innerhalb jeder einzelnen Leukozytenpopulation wurde wie folgt berechnet: Netto % der Spenderzellen innerhalb einer definierten Differenzierungsreihe x 100 / Netto % der Spenderzellen innerhalb einer definierten Differenzierungsreihe + Netto % Empfängerzellen innerhalb einer definierten Differenzierungsreihe).

Für jeden H2 Klasse I-spezifischen Ak diente der Mausstamm, der das Allel nicht exprimiert als Negativkontrolle und wurde zur Bestimmung des Cutt-offs für die unspezifische Reaktivität der Antikörper benutzt. Die Populationen des peripheren Blutes

wurden entsprechend ihrer Forward (FSC) und Side Scatter (SSC) Verhaltens unterschieden: Lymphozytenpopulation (niedrige FSC und SSC), Granulozyten (hoher SSC), Monozyten (hoher FSC und niedriger SSC). Tote Zellen wurden durch Propidium Iodid-Färbung ausgeschlossen. Die Messungen erfolgten auf FACScan und FACScalibur Durchflußzytometriegeräten (Becton Dickinson, CA, USA) und wurden mit Hilfe der Software Programme Cellquest bzw. Winlist analysiert.

### **2.7.2 Nachweis der Deletion Superantigen-reaktiver Zellen**

Die Familie der Mls- (Minor Lymphocyte stimulating) Antigene gehören zu den endogenen Superantigenen. Die Mls Determinanten wurden initial als Genprodukte beschrieben, die bei MHC-kompatiblen Mausstämmen zu einer starken MLR-Antwort führen. Die Mls-Zugehörigkeit eines bestimmten Mausstammes ist durch die Gegenwart der Genprodukte des Mouse mammary tumor virus, MMTV) determiniert. Die Genprodukte dieser Mls werden in Assoziation mit bestimmten Klasse II Molekülen exprimiert und führen zu Deletion bestimmter Thymozytenpopulationen deren TCR an die mmtv-Produkte binden können. So können die Genprodukte von mmtv-8,9, die im B6-Stamm exprimiert werden an das MHC-Klasse II Molekül I-E binden und führen in I-E<sup>+</sup> Mausstämmen (z.B. B10.A) zur Deletion von V $\beta$ 5<sup>+</sup> und V $\beta$ 11<sup>+</sup> T-Zellen, während in I-E<sup>-</sup> (B6) Stämmen diese Populationen nicht deletiert werden. Zum Nachweis der Deletion dieser T-Zellpopulationen erfolgte eine Dreifachfärbung der Thymozyten mit FITC-konjugierten (anti-V $\beta$ 5, anti-V $\beta$ 11, anti-V $\beta$ 8, HOPC), PE-markierten (anti-CD4, Ratte IgG2a) und Biotin-markierten Antikörpern. Die Biotin-gefärbten-Zellen wurden durch Streptavidin-konjugiertes CyChrome (Pharmingen) entwickelt. Die Deletion von V $\beta$ 5<sup>+</sup> and V $\beta$ 11<sup>+</sup> Thymocyten wurde durch Live gating von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> reifen Thymozyten [mit hoher TCR-Expression (TCR<sup>hi</sup>) bei 4-farbenmessung] bestimmt. Die unspezifische Bindung wurde durch die Bindung des Kontroll-Ak HOPC-FITC bestimmt und wurde von dem Prozentsatz der Zellen, die mit dem jeweiligen FITC-markierten anti-V $\beta$ -mAk reagierten subtrahiert. Der Nachweis von V $\beta$ 8<sup>+</sup> Thymozyten, die in I-E<sup>+</sup> Tieren nicht deletiert werden, diente als Kontrolle.

## **2.8 Tumorzell-Linien**

Die T-Zell-Leukämie/Lymphomlinie EL4 (H2<sup>b</sup>) wurde in CML-Medium kultiviert. Es wurde eine Working cell bank angelegt. Für jede Injektion wurde eine neue Charge der Zelllinie aufgetaut und maximal zwei Wochen in Kultur gehalten.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung von gemischten Chimären mittels nicht-myeloablativer Konditionierungsverfahren

Es wurde ein neues nicht-myeloablatives Konditionierungsprotokoll, welches kürzlich in der Arbeitsgruppe von Megan Sykes am Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School, Boston, USA) etabliert worden war, wurde auf seine Toleranzinduktion untersucht.

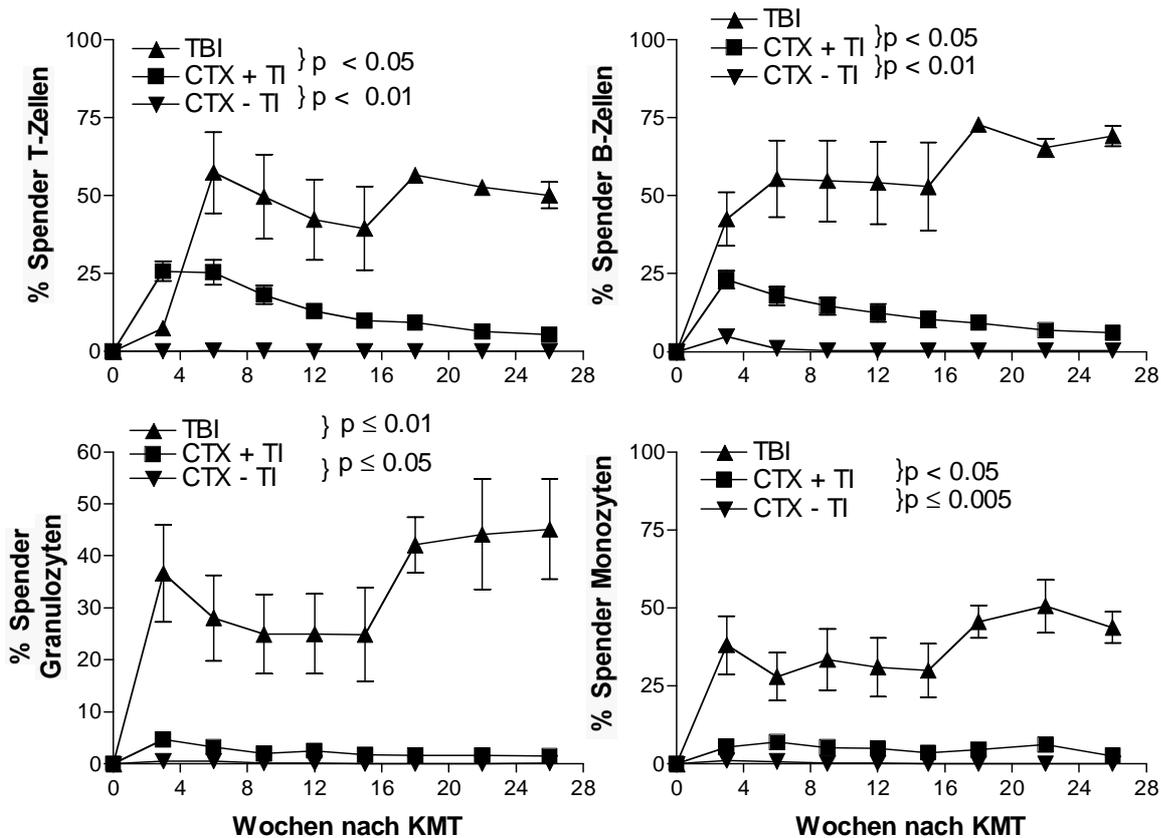


Abbildung 4: Spenderchimärismus im peripheren Blut nach nicht-myeloablativer Konditionierung und KMT:

Wie im Methodenteil dargestellt wurde den Tieren zu den dargestellten Zeitpunkten Blut entnommen. Der Anteil der Spenderzellen (H2D<sup>d</sup>) an der jeweiligen Zellreihe wurde mittels Doppelimmunfluoreszenz bestimmt. Es wurden drei experimentelle Gruppen untersucht: das CTX-Regime mit (CTX + TI, n=8) oder ohne Thymusbestrahlung (CTX - TI, n=8) und das TBI-haltige Konditionierungsprotokoll (TBI, n=5). Die Zunahme des Chimärismus 16 Wochen nach KMT ist dadurch zu erklären, daß in der Gruppe mit TBI zwei experimentelle Tiere mit niedrigem Chimärismus durch die Hauttransplantation starben. Dargestellt ist der Mittelwert des Spenderzellchimärismus ± Standardfehler.

Das CTX-protokoll beinhaltet die in vivo T-Zelldepletion durch anti-CD4 (Gk1.5) und anti-CD8 (2.43) Antikörper (Tag -5), die Gabe von Cyclophosphamid (CTX) 200mg/kg (Tag-1), 700 rad Thymusbestrahlung sowie die i.v. Injektion von  $2 \times 10^7$  Knochenmarkzellen (Bone Marrow Cells, BMC). Die gesamten Untersuchungen wurden in der MHC-inkompatiblen Mausstammkombination B10.A (H2<sup>a</sup>)→B6 (H2<sup>b</sup>) durchgeführt. Aus früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Megan Sykes ging hervor, daß im TBI-haltigen Protokoll die Thymusbestrahlung (Thymic Irradiation [TI]) zur Elimination residueller Empfänger-Thymozyten notwendig ist. Wir wollten überprüfen welche Relevanz die Thymusbestrahlung im CTX-Regime hat. Zu diesem Zweck wurden in einem Experiment drei experimentelle Gruppen erstellt: die erste Gruppe erhielt das Standard-Konditionierungsprotokoll (TBI), die zweite das CTX-Regime mit Thymusbestrahlung (CTX + TI) und die dritte ohne Thymusbestrahlung (CTX - TI). Nach dem CTX-Protokoll konnten wir einen lang anhaltenden Chimärismus in allen hämatopoetischen Differenzierungsreihen nachweisen. Dieser war jedoch signifikant geringer als nach dem TBI-haltigen Protokoll. Es konnte gezeigt werden, daß die Thymusbestrahlung unverzichtbarer Bestandteil des Konditionierungsprotokolls ist, da bei Tieren ohne Thymusbestrahlung kein Engraftment beobachtet werden konnte (s. Abb. 4 und Tabelle 1). Abb. 4 zeigt den Chimärismusverlauf in einem repräsentativen Experiment. Tabelle 1 zeigt den Organchimärismus in Tieren an den Tagen 219 - 232 nach KMT.

**Tabelle 1: Lymphohämatopoietischer Chimärismus**

	Normale B6 Kontrollen	Normale B10.A Kontrollen	B10.A → B6 Chimäre TBI†	B10.A → B6 Chimäre CTX†	TBI vs. CTX
	Mittelwert % H2D <sup>d+</sup> -Zellen (+/-STABW)	Mittelwert % H2D <sup>d+</sup> Zellen (+/-STABW)	Mittelwert% H2D <sup>d+</sup> Zellen (+/-STABW)	Mittelwert% H2D <sup>d+</sup> Zellen (+/-STABW)	p Wert
	n = 3	n = 3	n = 3	n = 7 <sup>®</sup>	

**Knochenmark**

B220	0.06 ± 0.06	99.84 ± 0.27	57.34 ± 16.40	4.17 ± 2.77	<0.05
Mac-1	0.13 ± 0.20	97.77 ± 1.57	43.32 ± 22.06	2.3 ± 1.45	0.08

**Milz**

CD4	0.13±0.12	100±0	50.08 ± 2.63	9.14±5.76	<0.05
CD8	0±0	100±0	55.97±16.21	7.61±6.88	< 0.05
B220	0.51±0.08	100±0	53.94±6.34	5.72±2.77	<0.05

\* Unbehandelte B6 and B10.A Mäuse wurden als Kontrollen benutzt.

† Die Tiere aller experimentellen Gruppen (TBI and CTX) wurden an den Tagen +219, +226 und +232 nach KMT getötet.

® Ein Tier (#129/30) wurde nach der Entwicklung eine Hautinfektion nach Hauttransplantation und nachfolgendem Verlust des Chimärismus ausgeschlossen .

## 3.2 Toleranzinduktion in CTX-Chimären

### 3.2.1 In vitro Toleranz

Nach dem wir zeigen konnten, daß durch das CTX-Regime ein Engraftment und ein stabiler Chimärismus erzeugt werden konnte, stellte sich die Frage, ob durch das CTX-Regime Spender-spezifische Toleranz induziert werden kann. Zu diesem Zweck wurden Milzzellen von chimären Mäusen in der gemischten Lymphozytenkultur (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR) und im zellvermittelten Zytotoxizitätstest (Cell mediated Lympholysis, CML) untersucht. Wie in dem CML-Assay (Abbildung 5). dargestellt, zeigten die Milzzellen von CTX-konditionierten Mäusen eine spezifische Lyse von <sup>51</sup>Cr-markierten 3<sup>rd</sup> Party Zielzellen, nicht aber von Empfänger oder Spenderzellen. Im Gegensatz hierzu wiesen Mäuse, die mit CTX aber ohne Thymusbestrahlung konditioniert worden waren, als Ausdruck fehlender Spender-spezifischer Toleranz zusätzlich zur anti-3<sup>rd</sup>Party-Reaktion, eine signifikante CML-Reaktivität gegenüber den Spenderzellen auf. Die Ergebnisse der MLR waren vergleichbar.

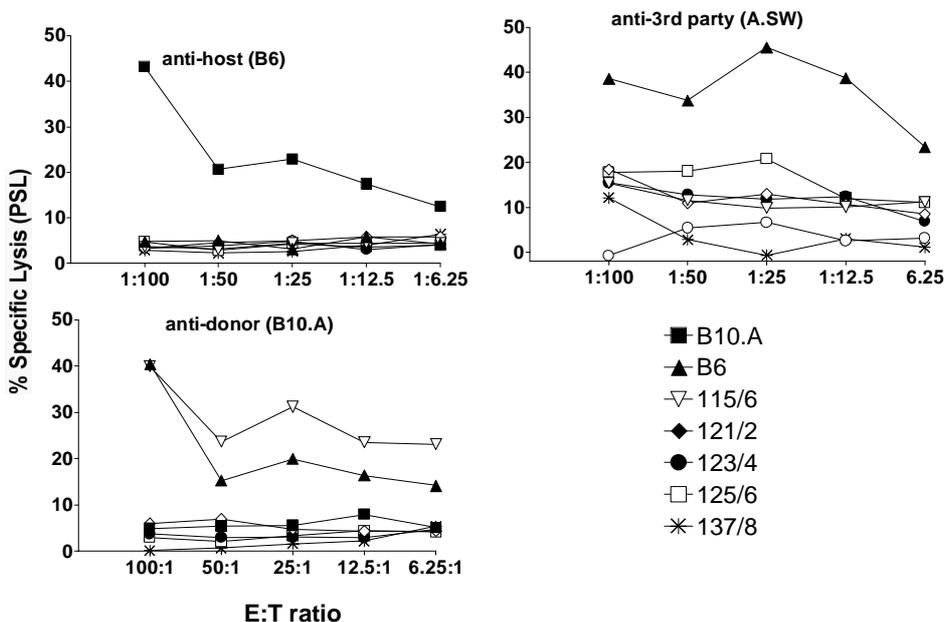


Abbildung 5: CTL-Reaktion in CTX-Langzeitchimären

Am Tag 216 nach KMT wurden die hämatopoetischen Chimären auf ihre CTL-Toleranz gegenüber Empfänger, Spender und 3<sup>rd</sup>-Party Stimulatoren in einem Standard-CML-Assay geprüft. Milzzellen der experimentellen Tiere wurden 5 Tage lang in der Gegenwart der o.g. Stimulatoren kultiviert. Am Tag 5 wurden die Zellen mit <sup>51</sup>Cr-markierten Zielzellen für 4h inkubiert. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten CTX Chimäre (CTX+TI, #121/2, 123/4, 125/6) und TBI-Chimäre (TBI, 137/8) eine Empfänger (Host B6) und Spender (Donor, B10.A)-spezifische Hyporeaktivität, bei leicht verminderter Reaktivität gegen 3<sup>rd</sup>-

Party (A.SW). Im Gegensatz zeigte ein repräsentatives Tier welches das CTX-Regime ohne Thymusbestrahlung (#115/6) erhalten hatte eine ausgeprägte Anti-Spender-Reaktion.

### 3.2.2 In vivo Toleranz

Die Spender-spezifische Akzeptanz von Hauttransplantaten, bei weiterhin erhaltener Abstoßung von 3<sup>rd</sup> Party-Hauttransplantaten, gilt als das härteste Kriterium für Toleranz-induktion. Nachdem *in vitro* Untersuchungen eine Spender-spezifische Toleranz gezeigt hatten, erhielten chimäre C57BL/6 Mäuse 13 Wochen nach KMT Hauttransplantate des Knochenmarkspenderstamms (B10.A) oder von 3<sup>rd</sup> Party Spendern (B10.RIII, H2<sup>f</sup>).

Entsprechend Standardtechniken wurde Schwanzhaut von B10.A und B10.RIII Mäusen auf die chimären B6 Mäuse transplantiert. Der Verband wurde am Tag +7 nach Hauttransplantation entfernt und das Hauttransplantat täglich auf Abstoßungszeichen inspiziert. Die 3<sup>rd</sup> Party B10.RIII Transplantate wurden alle bis spätestens Tag +11 nach Transplantation abgestoßen. Die B10.A Hauttransplantate blieben bis zum Ende der Beobachtungszeit (Tag 230 nach KMT) vital. Die experimentelle Gruppe die CTX ohne Thymusbestrahlung erhalten hatte, stieß die B10.A Hauttransplantate genauso schnell ab wie die 3<sup>rd</sup> Party Transplantate. Daraus ließ sich folgern, daß eine Spender-spezifische Toleranz auch nach den strengsten Kriterien durch das CTX-Regime induziert wurde und, daß die Thymusbestrahlung kritisch für die Toleranzinduktion ist.

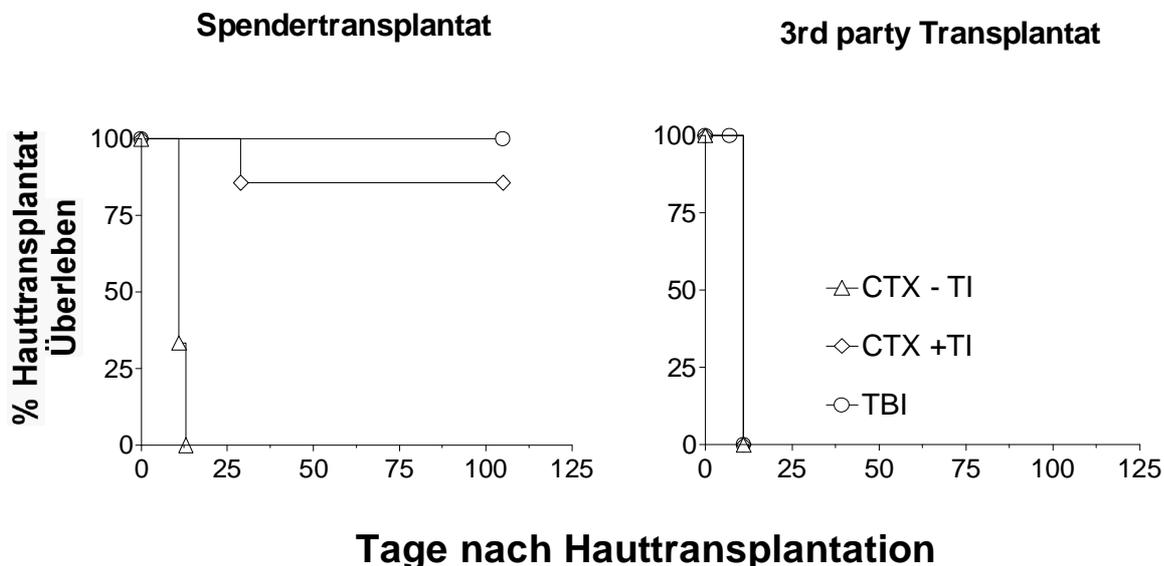


Abbildung 6: *In vivo* Toleranz nach CTX-Regime:

13 Wochen nach KMT wurde bei den Tieren ein Hauttransplantation vorgenommen. Tiere die das CTX (n=8) oder das TBI-Regime (n=3) erhalten hatten zeigten eine Spender-spezifische Toleranz mit Akzeptanz der Spenderhauttransplantate und Abstoßung der 3<sup>rd</sup>

Party Transplantate. Die Tiere, die das CTX-Regime ohne Thymusbestrahlung (n=3) erhalten hatten stießen die Spenderhauttransplantate ebenso schnell ab wie die 3<sup>rd</sup> Party Transplantate.

### 3.2.3 Hinweise für die zentrale Toleranzentwicklung bei CTX-Chimären:

#### 3.2.3.1 Nachweis von Spender-APC im Thymus von Empfängern

Es konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden, daß bei gemischten Chimären im Rahmen der Knochenmarktransplantation die Spender-spezifische-Toleranzinduktion (Host-vs.-Graft-Toleranz) durch zentrale Tolerisierung erfolgt. Durch Einwanderung APC in den Empfängerthymus erfolgt dort die Deletion Spender-reaktiver Zellen des Empfängers im Sinne einer negativen Selektion. Um zu untersuchen ob dies auch durch das CTX-Regime zu erzielen ist, haben wir immunhistologische Untersuchungen des Thymus von CTX-chimären Tieren durchgeführt. In der Tat konnten wir vom Spender-stammende MHC II<sup>+</sup> Zellen im Thymus der CTX-Tiere nachweisen (*Abbildung 7*). Die Besiedlung des Thymus durch solche MHC Klasse II<sup>+</sup> Zellen mit typischer dendritischer Morphologie konnte ab Tag 21 nach Transplantation (CTX-Potokoll) beobachtet werden, während am Tag 16 noch keine dendritischen Zellen im Thymus nachweisbar waren. Allerdings war die Besiedlung mit Spender-APC im Thymus von TBI-Chimären signifikant stärker als bei Tieren nach dem CTX-Regime (*Tabelle 2*). Diese Beobachtung korrelierte somit mit dem generell stärker ausgeprägten hämatopoetischen Chimärismus nach TBI. Dieser Befund ist deshalb ein weiterer Hinweis, daß die Ganzkörperbestrahlung ein stärkeres Engraftment von Spenderstammzellen erzielt.

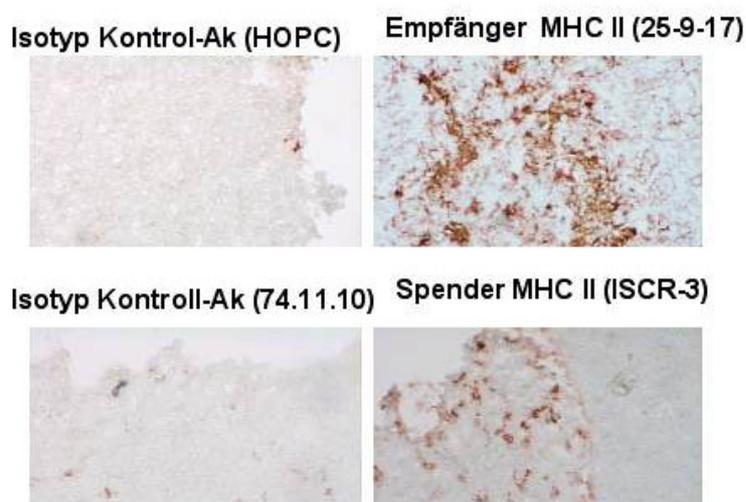


Abbildung 7: Nachweis von MHC II+ Spender APC im Thymus

Dargestellt ist die immunhistologische Untersuchung eines repräsentativen Tieres nach CTX Konditionierung und KMT. Die obere Reihe zeigt die Färbung mit einem I-A<sup>b</sup> (Empfänger)-spezifischen Antikörper (25-9-17) bzw. dem Isotypkontroll-Ak (IgG1, HOPC). Färbung. Die untere Reihe zeigt die Färbung mit dem Antikörper ISCR-3, der mit dem MHC II Molekül I-E<sup>k</sup> (Spender) reagiert bzw. den Isotyp-Kontroll-Ak (74.11.10). Es zeigt sich ein deutlicher Nachweis von MHC II<sup>+</sup> Spenderzellen im Thymus. Die Untersuchungen erfolgten am Tag > +200 nach KMT.

### 3.2.3.2 Deletion Superantigen-reaktiver Zellen Empfängern

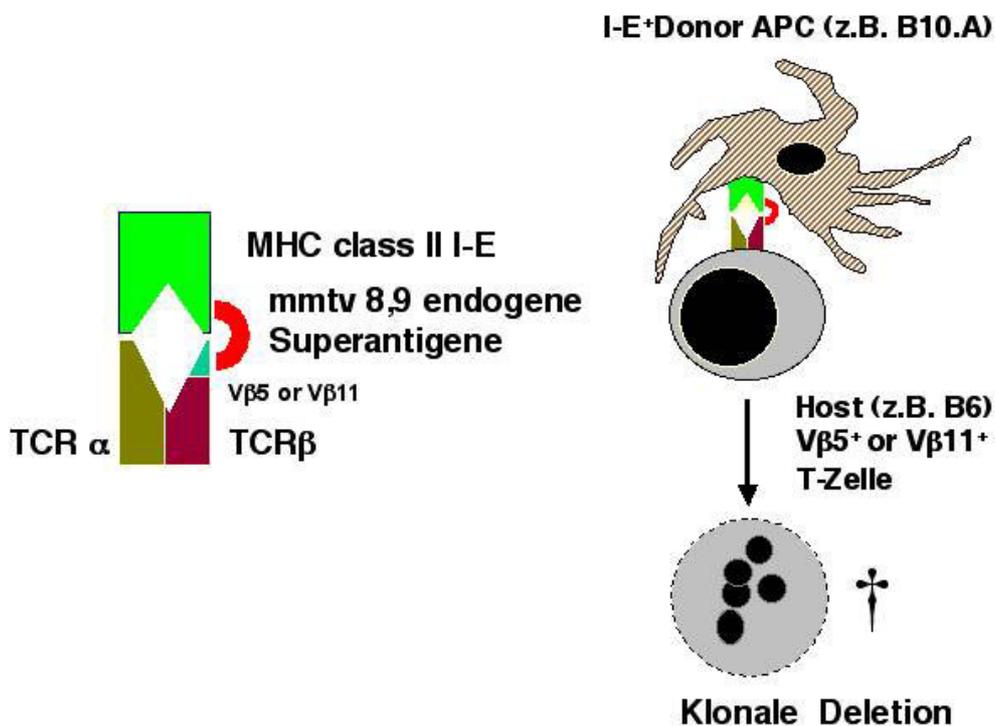


Abbildung 8: Deletion Superantigen-reaktiver Zellen

Um dem Mechanismus der Toleranzentstehung und Erhaltung weiter auf den Grund zu gehen, benutzten wir Minor Lymphocyte stimulating Antigen (MIs) reaktive Empfänger und Spender. Die MIs Determinanten wurden initial als Genprodukte beschrieben, die bei MHC-kompatiblen Mausstämmen zu einer starken MLR-Antwort führen. Dabei handelt sich um endogene Superantigene, die vom autologen Retrovirus mmtv (Mouse Mammary Tumor Virus) entstammen. Die Genprodukte des mmtv 8 und 9 werden im Genom der B6 Mäuse exprimiert und können an distinkte Vβ -Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors (z.B. Vβ5 oder Vβ11) binden, wenn Sie im Kontext bestimmter MHC II-Moleküle (I-E<sup>+</sup>) präsentiert werden (s. *Abbildung 8*) und führen dann zur Deletion dieser Superantigen-reaktiven Zellen. Diese Deletion erfolgt jedoch nur in I-E<sup>+</sup> nicht aber in I-E<sup>-</sup> Mausstämmen.

Durch Benutzung MIs<sup>a</sup> reaktiver Spender, bei denen diese V $\beta$  Populationen deletiert werden, und Empfängern, die aufgrund fehlender I-E Expression nicht deletieren, kann man das Schicksal Spender-reaktiver T-Zellen in gemischten Chimären verfolgen.

Normale Kontroll B6 Mäuse (I-E<sup>-</sup>) zeigten keine Deletion von V $\beta$ 5 oder V $\beta$ 11 Populationen. Im Gegensatz hierzu ist bei B10.A Mäusen eine komplette Deletion dieser Populationen nachweisbar. Gemischte chimäre Tiere (B10.A $\rightarrow$ B6) weisen ebenfalls eine Deletion dieser V $\beta$ <sup>+</sup> Populationen auf, da APC des Spenders (B10.A I-E<sup>+</sup>) V $\beta$ 5 und V $\beta$ 11<sup>+</sup> Thymozyten deletieren können. Wie Tabelle 2 und Tabelle 3 zu entnehmen zeigten Tiere, die mit dem Standard TBI-Protokoll konditioniert worden waren, eine komplette Deletion dieser Thymozytensubpopulationen. Tiere, die mit dem CTX-Regime konditioniert worden waren, zeigten ebenfalls eine signifikante Deletion dieser Thymozyten. In *Tabelle 3* sind die in vitro Toleranz (CML, MLR), sowie die Deletion Superantigen- bzw. Spender-reaktiver Zellen peripherer CD4<sup>+</sup> Milz T-Zellen in den unterschiedlichen experimentellen Gruppen (CTX + TI, CTX -TI, TBI) dargestellt. Es zeigte sich, daß stabile hämatopoetische Chimäre nach CTX- oder TBI-Konditionierung mit Zeichen der in vitro und in vivo Toleranz ebenfalls eine Deletion der V $\beta$ 5<sup>+</sup> und V $\beta$ 11<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus und in der Milz aufwiesen. Tiere, die eine Immunisierung gegen den Spender aufwiesen (siehe (Tier #115/6) CTL-Antwort in *Abbildung 5*) und ihren Chimärismus verloren hatten, zeigten auch keine Deletion der entsprechenden T-Zellpopulationen.

**Tabelle 2: Chimärismus und Deletion Superantigen-reaktiver Zellen im Thymus**

	%V $\beta$ 8 <sup>+</sup> Zellen Mittelwert $\pm$ SD	%V $\beta$ 11 <sup>+</sup> Zellen Mittelwert $\pm$ SD	%V $\beta$ 5 <sup>+</sup> Zellen Mittelwert $\pm$ SD	% Spender Zellen	
				<sup>c</sup> MHC I <sup>+</sup>	<sup>d</sup> MHC II <sup>+</sup>
nI B6 <sup>a</sup> n=3	18.92 $\pm$ 0.48	4.74 $\pm$ 0.35	3.67 $\pm$ 0.71	<sup>e</sup> 0.27 $\pm$ 0.39	0/3
nI B10.A n=3	17.72 $\pm$ 0.73	0.24 $\pm$ 0.13	0.19 $\pm$ 0.03	60.33 $\pm$ 5.55	3/3
TBI n=3	21.90 $\pm$ 2.16	0.28 $\pm$ 0.15	0.31 $\pm$ 0.19	18.39 $\pm$ 17.53	3/3
CTX ohne TI n=3	18.67 $\pm$ 0.20	4.80 $\pm$ 0.15	3.81 $\pm$ 0.62	0.14 $\pm$ 0.13	0/3
Stabile Chimäre n = 7	21.73 $\pm$ 3.06	0.95 $\pm$ 0.72	0.81 $\pm$ 0.63	0.91 $\pm$ 0.90	3/6 <sup>f</sup>
Instabiler Chimerärer	20.63	4.42	2.28	0.03	-

<sup>a</sup> Unbehandelte normale (nI) B6 oder B10.A Mäuse wurden als Kontrollen benutzt.

<sup>b</sup> Das Tier #129/30 entwickelte einen Infektion des Hauttransplantates und stieß in der Folgezeit das Hauttransplantat und die Spenderhämatopoese ab.

<sup>c</sup> MHC Klasse I H2-Dd+ Thymozyten wurden mittels FACS bestimmt

<sup>d</sup> Spender-MHC Klasse II+ dendritische Zellen wurden mittels Immunhistologie im Thymus nachgewiesen.

<sup>e</sup> Ein B6 Kontrolltier wurde wegen hoher unspezifischer Färbung ausgeschlossen.

<sup>f</sup> Es standen nur sechs Präparate für die histologische Untersuchung zur Verfügung.

**Tabelle 3: Deletion in der Milz und Spender-spezifische Toleranz**

	MLR	CML	Deletion der CD4 <sup>+</sup> Vβ Subpopulationen in der Milz				
	Stimulations Index		Maximum PSL				
	α-Spender	α-3 <sup>rd</sup> Party	α-Spender	α-3 <sup>rd</sup> Party	Vβ8	Vβ11	Vβ5
B6 n = 3	11.1 ± 6	5.1 ± 1.9	44.9 ± 6.2	52.9 ± 10.4	17.4 ± 1.3	4.8 ± 0.3	2.5 ± 0.0
B10.A n = 3	1.0 ± 0	3.4 ± 1.0	7.3 ± 1	ND	17.4 ± 1.0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
TBI n = 3	1.0 ± 0.1	1.9 ± 1	5.4 <sup>a</sup>	12.2	21.4 ± 1.5	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.5
CTX ohne TI n=3	2.4 ± 0.8	1.6 ± 0.2	37.6 ± 12.5	26.4 ± 24.8	16.8 ± 1.9	3.8 ± 0.35	4.2 ± 3.5
CTX							
Stabile Chimäre n=7	0.9 ± 0.2	1.4 ± 0.3	7.8 ± 3	19.2 ± 3.8	20.7 ± 1.0	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.3
Instabiler chim.							
#129/30	1.7	2.7	NE	NE	17.41	3.83	1.5

ND Not determined Nicht bestimmt

NE (Not evaluable) Nicht untersuchbar

<sup>a</sup> Nur ein Tier konnte untersucht werden.

<sup>b</sup> PSL = Prozent spezifische Lyse

### **3.3 Effekte von Spenderlymphozyten in gemischten Chimären**

#### **3.3.1 Spenderlymphozyteninfusionen können GVH oder HVG-Reaktionen induzieren in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt**

Ein bislang bei der allogenen Knochenmarktransplantation noch nicht gelöstes Problem ist die angestrebte Trennung des GVL-Effektes von der Graft-versus-host-Erkrankung (GVHD). Durch verzögerte Gabe von Spenderlymphozyten nach Allo-KMT könnte es möglich sein eine GVL-Reaktion ohne gleichzeitige GVHD zu induzieren. Die Gabe nicht-toleranter Spenderlymphozyten führt bei gemischten chimären Mäusen zu einer GVH-Reaktion, welche auf das lympho-hämatopoetische System (Sykes et al., 1988) beschränkt ist. Dies ist an der Konversion des gemischten hämatopoetischen Chimärismus zu einem vollen Spenderchimärismus zu erkennen. Eine Erklärung für das Fehlen der GVHD ist darin zu finden, daß zum Zeitpunkt der DLI-Gabe die toxischen Effekte der Konditionierung (Zytokinsturm, Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen) abgeklungen sind und die alloreaktiven Zellen somit im lymphohämatopoetischen System verbleiben und nicht in anderes Gewebe einwandern. Eine weitere Hypothese für diese Beobachtung wurde kürzlich durch Johnson und Truitt aufgestellt. Diese Autoren konnten eine im Empfänger neu-entstehende  $CD4^+CD8^-$  und  $CD4^-CD8^-$  Suppressorpopulation des Spenders nachweisen, welche zur Suppression der GVHD führt (Johnson et al., 1999). Im Gegensatz hierzu konnten Blazar und Mitarbeiter unter ähnlichen experimentellen Bedingungen eine Empfänger-T-Suppressorpopulation nachweisen, die eine DLI-vermittelte GVHD-Induktion verhindert (Blazar et al., 2000). Wir untersuchten die Effekte von DLI nach CTX-Konditionierung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Applikation in der vollen MHC-Mismatch Konstellation (B10.A  $\rightarrow$  B6). Die Gabe von  $3 \times 10^7$  Spender-Milzzellen am Tag 35 nach KMT führte zur Konversion und zum vollen Spenderchimärismus (Abbildung 10) ohne Auftreten von GVHD (Abbildung 9). Die Empfänger-Tiere wurden einmal pro Woche gewogen und auf klinische Symptome der GVHD (Durchfall, Haut, körperliches Erscheinungsbild [Buckel, Fell]), hin untersucht. Keines der Tiere zeigte Zeichen der akuten oder chronischen GVHD. Die Tiere wurden am Tag 140 nach Transplantation getötet. Die histologische Untersuchung der klassischen GVHD-Zielorgane (Haut, Leber, GI-Trakt) ergab keinerlei Hinweise auf GVHD-Manifestation. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der DLI-Gabe konnten wir komplett divergierende Effekte beobachten. So führte die Verabreichung der DLI am Tag 35 zu einer Konversion der gemischten Chimären zu vollen Chimären ohne gleichzeitige Entwicklung einer GVHD (Abbildung 9, Abbildung 10). Im Gegensatz hierzu führte die Gabe am Tag 21 zu einem Verlust des Chimärismus (s. Abbildung 10 und Tabelle 4). Für diese HVG-Reaktion sind die T-Zellen des Empfängers notwendig, da wir diesen Effekt in TCR- $\beta$ -Gen-defizienten Mäusen nicht beobachten konnten (Abbildung 11).

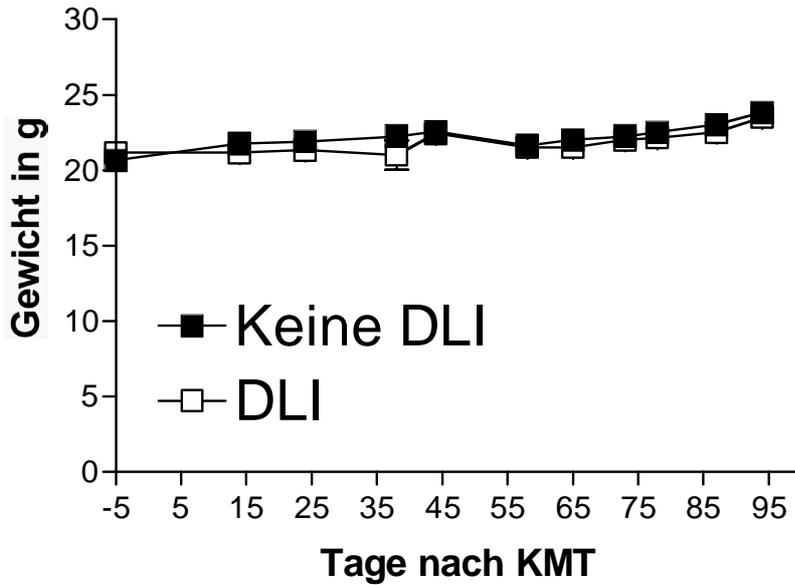


Abbildung 9: Spenderlymphozyten induzieren keine GVHD

DLI welche am Tag 35 nach CTX-Konditionierung und KMT appliziert wurden, induzieren keine GVHD. Dargestellt ist der Gewichtsverlauf in einem exemplarischen Experiment (B10.A→B6). Die Gewichtskurven der Kontrollchimären (Keine DLI, n=12) und der DLI-Empfänger (DLI, n=6) sind fast deckungsgleich. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

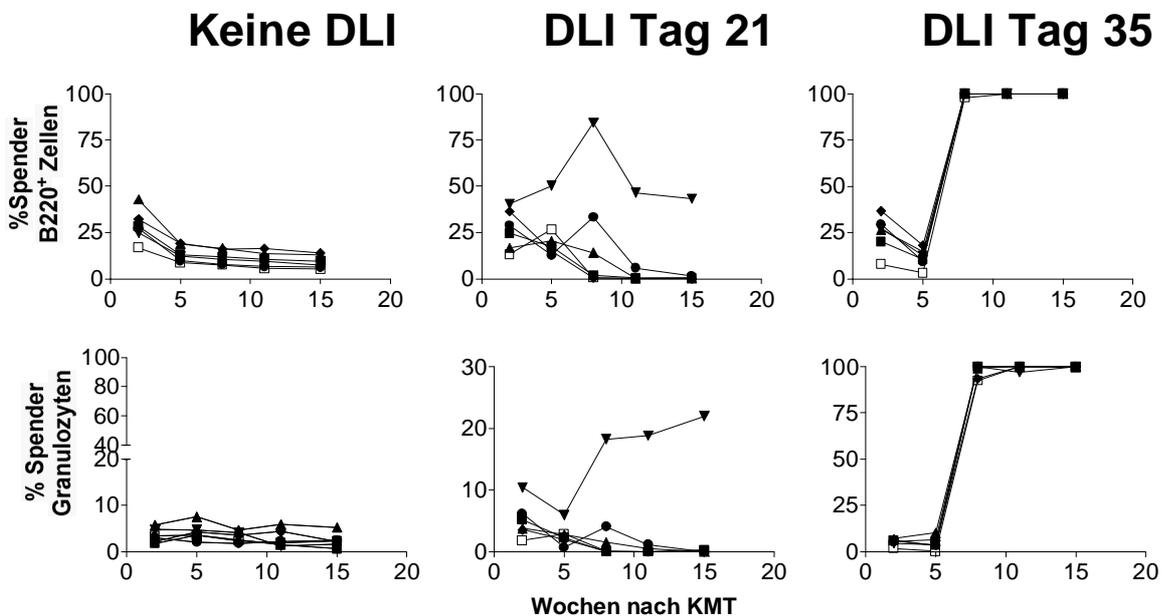


Abbildung 10: Effekte von DLI auf den Empfängerchimärismus

Verabreichung von DLI am Tag 21 nach nicht-myeloablativer KMT führt zum Verlust des Chimärismus. Im Gegensatz hierzu führt die Gabe von DLI am Tag 35 zur Konversion des gemischten in einen vollen Spenderchimärismus. Dargestellt ist anhand eines repräsentativen Experiments die Chimärismusedwicklung in den B-Zellen bzw. den

Granulozyten in Kontrolltieren (No DLI); Tiere, die DLI am Tag 21 oder am Tag 35 erhalten hatten. Es ist der Verlauf einzelner Tiere dargestellt

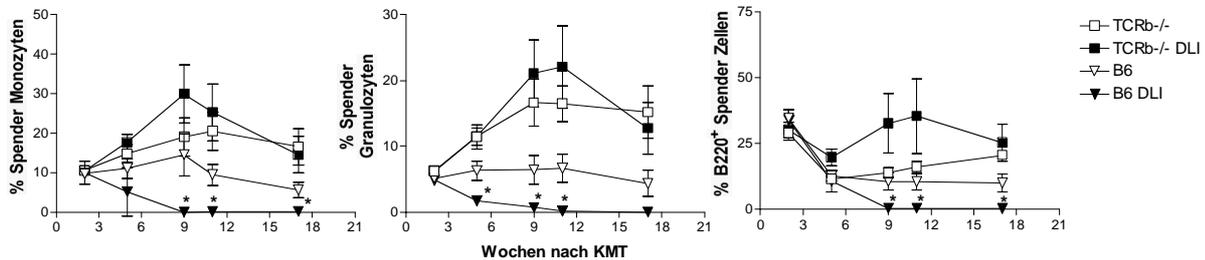


Abbildung 11: T-Zell-vermittelter Verlust des Chimärismus nach DLI-Gabe am Tag 21

TCRb-defiziente Tiere bzw. Wildtyp B6 Mäuse wurden konditioniert und transplantiert. Am Tag 21 erfolgte die DLI-Gabe. Während die Wildtypempfänger nach DLI-Gabe (B6 + DLI, n=7) ihren Chimärismus verloren, blieben die TCRβ-defizienten Mäuse nach DLI-Gabe (TCRβ-/- + DLI, n=8), ebenso wie die Wildtypempfänger ohne DLI (B6, n=7) weiterhin chimär. Als weitere Kontrollgruppe zeigten die TCRβ-/-Mäuse ohne DLI-Gabe einen stabilen gemischten Chimärismus (TCRβ-/-, n=6) Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung.

Um diesem Befund weiter nachzugehen untersuchten wir das Serum der transplantierten Tiere am Tag 21 mit der Frage des Nachweises der anti-CD4 (Gk1.5) und anti-CD8 (2.43) Antikörper. Hierzu wurden Mausmilzzellen mit dem Serum von Kontrolltieren oder von experimentellen Tieren inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Zugabe eines sekundären anti-Ratten Ig2b-Antikörpers. Durch zusätzliche Gabe von 2.43 oder Gk1.5 konnte geprüft werden ob Antigen-sättigende Mengen des Antikörpers nachweisbar waren. Wie in Abbildung 12 gezeigt, konnten bei experimentellen Tieren am Tag 21 sättigende Mengen der Anti-CD4 und Anti-CD8-Antikörper nachgewiesen werden (Keine Zunahme der Fluoreszenz nach zusätzlicher Gabe von Gk1.5 oder 2.43. Aus diesen Daten kann der Schluß gezogen werden, daß sättigende Mengen an T-Zelldepletierenden Antikörpern zwar ausreichen um das DLI-Inokkulum zu depletieren, aber nicht in der Lage ist den Empfänger T-Zellen ausreichend zu depletieren. Deshalb liegt der Schluß nahe, daß das DLI-Inokkulum am Tag 21 komplett T-Zelldepletiert wird und die restlichen Zellen (primär Milz B-Zellen, APC) als APC-Infusion wirken und die residuellen T-Zellen des Empfängers gegen den Spender immunisieren. Weiterhin ist jedoch nicht auszuschließen, daß eine humorale Immunantwort zur Transplantatabstoßung führt. Diese Untersuchungen stehen noch aus.

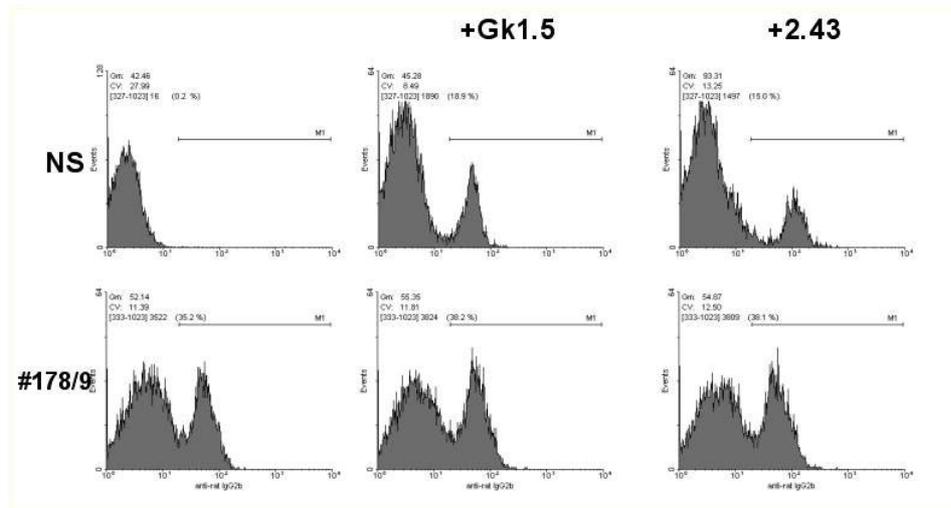


Abbildung 12: Nachweis sättigender Mengen zirkulierender Antikörper am Tag 21 nach CTX Konditionierung

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde das Serum transplantiert Tiere auf die Gegenwart der T-Zelldepletierenden Antikörper Gk1.5 (anti-Maus CD4, Ratte IgG2b) und 2.43 (anti-Maus CD8, Ratte IgG2b) untersucht. B6 Milzzellen wurden entweder mit normalem Serum (NS) oder Serum von experimentellen Tieren inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Spezies (Ratte)- und Isotyp-spezifischen FITC-konjugierten Zweitantikörper inkubiert (anti-Ratte-IgG2b). Am Beispiel von Tier 178/9 zeigt sich ein deutlicher Nachweis von zirkulierendem Ratten-IgG2b-Antikörper. Durch zusätzliche Gabe von 2.43 oder Gk1.5 konnte keine weitere Zunahme der Fluoreszenzintensität erzielt werden. Daraus ergibt sich daß am Tag 21 Antigen-sättigende Mengen der anti-CD4 bzw. anti-CD8 Antikörper im Serum zirkulieren.

**Tabelle 4: Spenderchimmärismus nach CTX-Konditionierung: Einfluß von DLI**

Gruppen	Woche 2			Woche 5			Woche 8			Woche 11			Woche 15			Woche 18			
	Median	Range		Median	Range		Median	Range		Median	Range		Median	Range		Median	Range		
<b>B220+</b>																			
Ktr-	27,88	16.83-43.11	-	12,64	8.76-19.08	-	11,27	7.58-16.49	9,95	5.45-16.37	8,54	5.19-13.9	8,58	4.37-13.35					
DLI Tag 21	26,74	13.21-40.40	-	18,95	12.7-50.28	-	7,93	0.52-84.31	0,37	0.14-46.57	0,39	0.16-43.27	0,31	0.19-49.5					
DLI Tag 35	27,04	8.01-36.77	-	11,68	3.3-18.2	-	100,00	97.85-100	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100					
<b>CD4+</b> <sub>1</sub>																			
Ktr-	-	-	-	26,93	15.57-42.73	-	13,32	6.01-21.51	9,21	3.67-16.41	7,81	3-14.2	3,86	0.79-9.89					
DLI Tag 21	-	-	-	33,93	26.93-62.82	-	12,79	0.66-22.79	2,95	0-16.18	0,68	0-15.9	0,14	0-17.14					
DLI Tag 35	-	-	-	25,87	15.52-36.03	-	95,59	69.62-99.13	100,00	80.47-100	100,00	99.84-100	100,00	100					
<b>CD8+</b> <sub>2</sub>																			
Ktr-	-	-	-	-	-	-	6,35	0-14.38	7,24	3.89-12.79	3,94	0.54-7.08	2,86	0-9.52					
DLI Tag 21	-	-	-	-	-	-	2,20	0-13.3	0,00	0-3.19	0,25	0-7.31	0	0-18.9					
DLI Tag 35	-	-	-	-	-	-	98,20	94.01-99.23	100,00	66.67-100	100,00	100	100,00	100					
<b>Mono</b>																			
Ktr-	4,37	2.4-6.32	5,19	3.36-14.28	5,43	4.26-28	7,78	4.05-28.4	3,01	0.5-5.56	4,11	0.82-12.51							
DLI Tag 21	5,77	2.14-12.69	4,63	2.08-20.65	1,17	0-28.85	0,58	0-27.43	0,00	0-24.83	1,32	0-30.84							
DLI Tag 35	6,50	1.78-8.08	6,58	1.13-13.28	99,69	99.34-100	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100,00	100					
<b>Gran.</b>																			
Ktr-	3,25	1.86-5.77	3,92	2.09-7.54	3,56	1.83-4.69	2,08	1.33-5.89	2,28	0.7-5.25	2,06	1.33-3.92							
DLI Tag 21	4,54	3.85-10.43	2,57	0.71-5.97	0,86	0-18.26	0,23	0-18.83	0,12	0-21.95	0,05	30,08							
DLI Tag 35	5,61	1.86-7.15	3,69	0.21-10.22	99,54	92.4-100	100,00	96.96-100	99,96	99.53-100	100,00	100	100,00	100					

<sup>1,2</sup> Der T-Zellchimmärismus ist aufgrund der Präsenz der T-Zell-depletierenden Ak erst ab Woche 8 evaluierbar.

### 3.4 Toleranzuntersuchungen in DLI-Empfängern

Nachdem gezeigt werden konnte, daß DLI am Tag 21 zum Verlust des Chimärismus und DLI am Tag 35 zur Konversion des gemischten Chimärismus führen, wurde geprüft in wie weit eine Anti-Spender bzw. die Anti-Enpänger-Antwort nach DLI nachweisbar war.

#### 3.4.1 Nachweis einer Anti-Spender-Alloreaktivität nach DLI-Gabe am Tag 21

CTX-Chimäre ohne DLI-Gabe bzw. Tiere, die DLI am Tag 21 erhalten hatten, wurden am Tag 160 nach KMT getötet und mittels MLR und CML auf ihre Immunantwort gegen Spender, Empfänger und 3<sup>rd</sup>-Party untersucht.

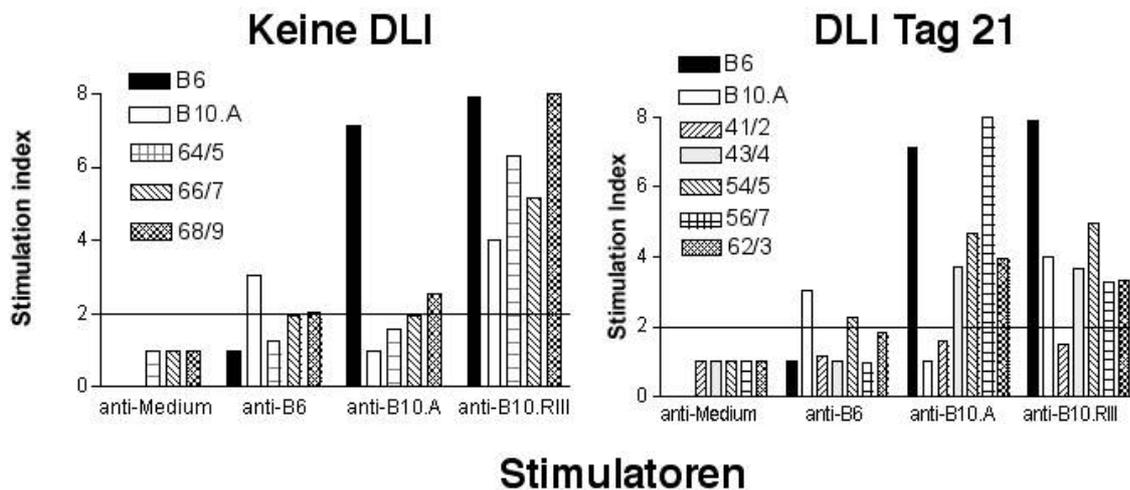


Abbildung 13: Nachweis einer Anti-Spender-Reaktion in DLI Tag 21-Empfängern.

Normale Kontrolltiere, CTX-Chimäre ohne DLI (# 64/5,66/7,68/9; linke Graphik) und DLI Tag 21-Empfänger (experimentelle Tiere # 41/2, 43/4, 54/5, 56/7, 62/3; rechte Graphik) wurden am Tag 160 nach KMT getötet und in einem Standard MLR-Assay untersucht. Die Induktion der Proliferation wurde mittels <sup>3</sup>H-Thymidineinbau bestimmt. Dargestellt ist der Stimulationsindex. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Stimulatorzellen aufgeführt. Es zeigte sich eine ausgeprägte anti-Spender (B10.A) Reaktion in der DLI Tag 21 Gruppe. Im Gegensatz zeigten die CTX-Chimären eine Spender-spezifische Toleranz bei erhaltener Immunkompetenz (normale anti-3<sup>rd</sup>-Party-Reaktion). Dargestellt sind die Ergebnisse von verschiedenen experimentellen Tieren und den entsprechenden Kontrollen.

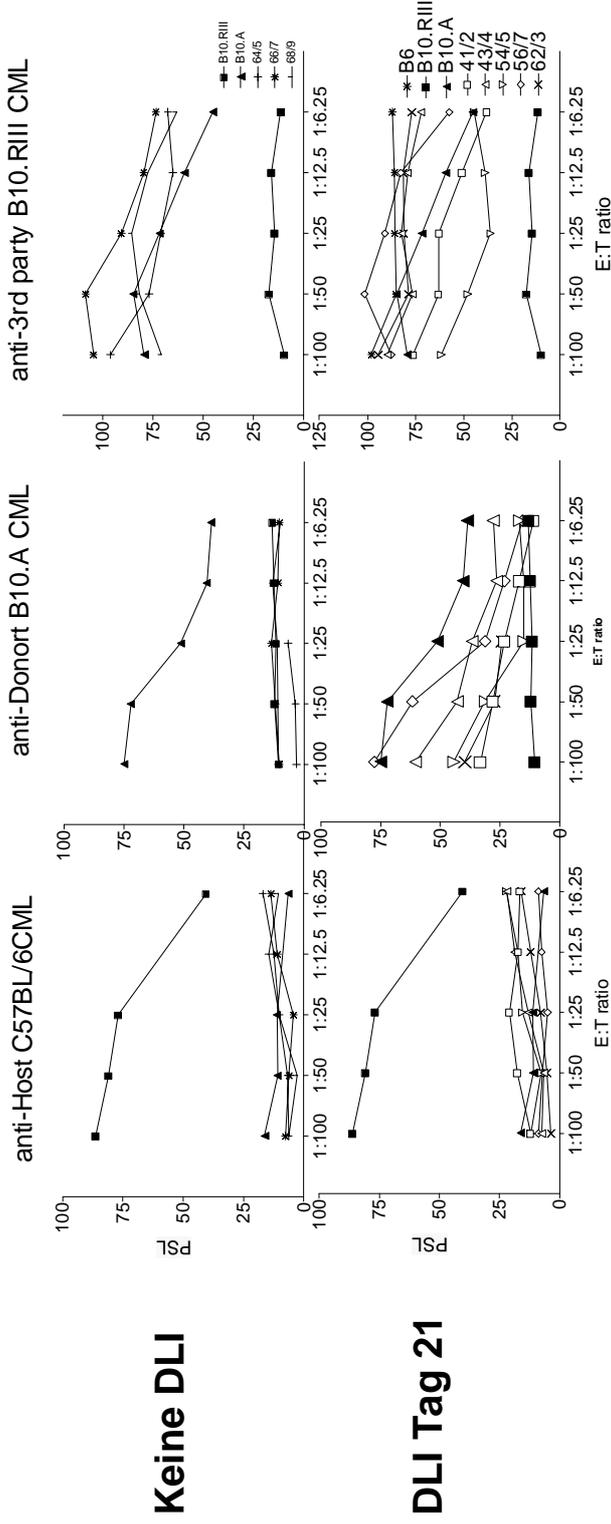


Abbildung 14: Nachweis einer Anti-Spender-CTL-Reaktion in DLI Tag 21 Empfängern.

Normale Kontrolltiere, CTX-Chimäre ohne DLI (obere Reihe) und DLI Tag 21-Empfänger (untere Reihe) wurden am Tag 160 nach KMT getötet und in einem Standard CML-Assay untersucht. Es zeigte sich eine ausgeprägte anti-Spender (B10.A) zytotoxische Reaktion in der DLI Tag 21 Gruppe. Im Gegensatz zeigten die CTX-Chimären eine Spender-spezifische Toleranz bei erhaltener Immunkompetenz (normale anti-3<sup>rd</sup>-Party-Reaktion).

### 3.4.2 Nachweis einer Anti-Empfänger-Reaktivität in DLI-Tag 35 Empfängern

Zur Bestimmung der Immunkompetenz von DLI-Tag 35 Empfängern untersuchten wir solche Langzeitempfänger auf ihre Immunkompetenz in vitro am Tag 164 nach KMT. Hierzu wurden MLR und CML-Untersuchungen vorgenommen. Wie in Abbildung 15 und Abbildung 16 zu erkennen zeigte sich in der MLR bei Empfängern von DLI am Tag 35 eine Anti-Empfänger Alloreaktivität bei leicht verminderter globaler Immunkompetenz (reduzierte anti-3<sup>rd</sup>-Party Antwort). Im Gegensatz fand sich bei CML-Untersuchungen, keine Anti-Empfänger-Reaktivität bei ebenfalls reduzierter 3<sup>rd</sup>-Party Antwort.

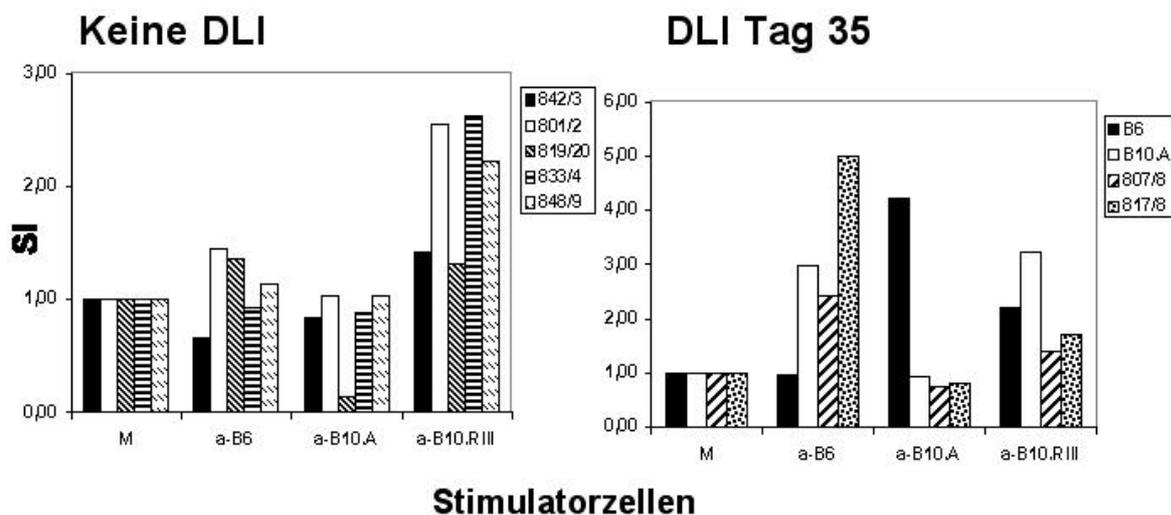


Abbildung 15: Nachweis einer GVH-Reaktivität in Tag 35 DLI-Empfängern

B10.A→ B6 chimäre erhielten DLI am Tag 35 nach KMT oder wurden als Kontrollen beobachtet. Am Tag 164 nach KMT wurden die Tiere getötet und die Milzzellen in MLR bzw CML-Untersuchungen auf ihre Immunreaktivität geprüft. Empfänger von DLI, die zu einem vollen Chimärismus konvertiert waren, zeigten eine Proliferationsinduktion nach Stimulation mit B6-Zellen (Empfänger). Diese Ergebnisse sind auf der rechten Seite dargestellt. Die B10A→B6 chimären Tiere ohne DLI, zeigten wie erwartet eine bilaterale Toleranz und gut erhaltene anti-3<sup>rd</sup>-Party Reaktivität (linke Abbildung).

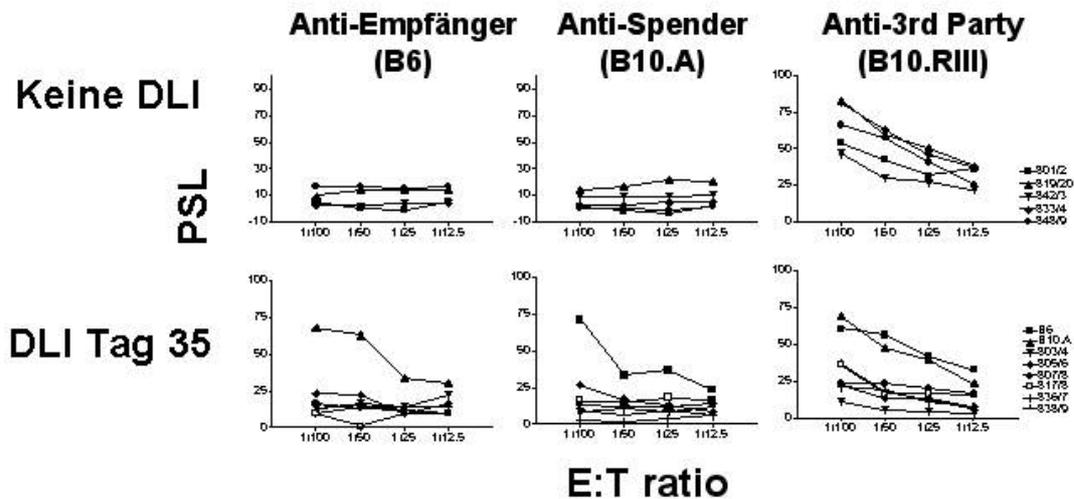


Abbildung 16: Zytotoxische T-Zellantwort in DLI-Empfängern

Im selben Experiment wurden die Tiere ebenfalls auf ihre CML-Reaktivität geprüft. In der Bulk culture konnte jedoch keine GVH-Reagibilität nachgewiesen werden. Allerdings fand sich eine etwas verminderte 3<sup>rd</sup> Party-Antwort im Vergleich zu den CTX-Kontrollchimären. Diese eingeschränkte Immunkompetenz könnte als Ausdruck einer GVH-assoziierten Immunsuppression zu werten sein.

### 3.4.3 Hinweise für andauernde Anti-Empfänger-(GVH)-Reaktivität in DLI Tag 35 Empfängern

Basierend auf den oben aufgeführten Beobachtungen konnte die Schlußfolgerung gezogen werden, daß DLI am Tag 35 zur einer GVH-Reaktion führen ohne allerdings zur Entwicklung von GVHD beizutragen. Um weitere Hinweise für eine LGVH-Reaktion- zu erhalten untersuchten wir die lymphoiden Organe von DLI-Empfängern auf Zeichen einer GVH-Reaktion. Wie in Abbildung 17 dargestellt zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine quantitative und qualitative Veränderung der zellulären Zusammensetzung der lymphatischen Organe der Tag 35 DLI-Empfängen.

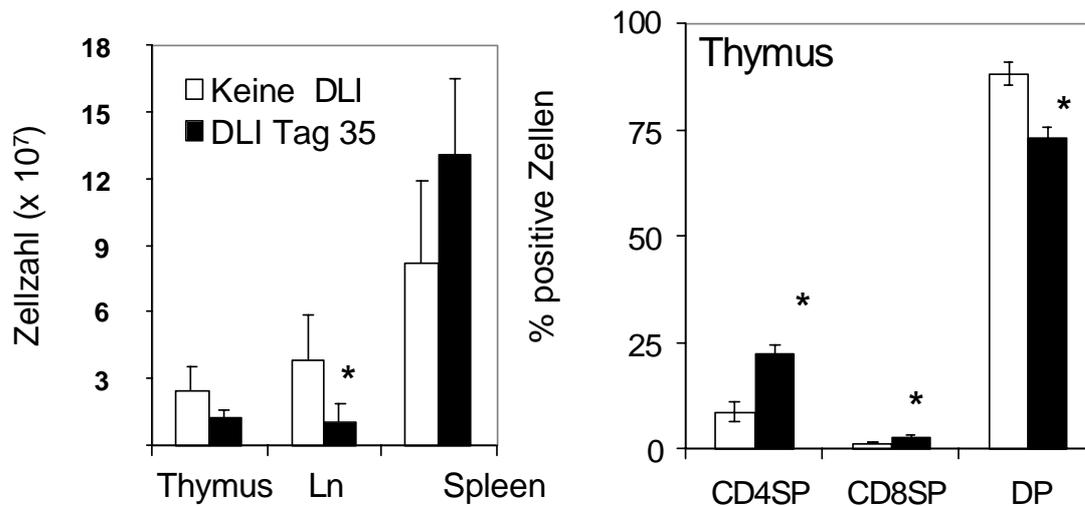


Abbildung 17: Effekte von DLI am Tag 35 auf die zelluläre Zusammensetzung des lymphatischen Kompartiments.

DLI am Tag 35 führten zu einer signifikanten Verminderung (\*  $p < 0.05$ ) der absoluten Thymozyten (Thymus) und der Lymphknotenzellen (LN). Im Gegensatz zeigte sich eine Zunahme der Milzzellzahl (Spleen). Bei genauerer Analyse der Thymozytensubpopulationen zeigte sich ebenfalls eine Störung in Zusammensetzung der Subpopulationen. So ist eine Zunahme der reiferen Einzelpositiven (=single positive; SP)  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  Zellen bei gleichzeitiger Verminderung der doppelpositiven-Population (=double positive; DP) zu beobachten.

### 3.5 DLI-vermittelte GVL-Reaktionen

Nachdem wir zeigen konnten, daß die Gabe von Spenderlymphozyten am Tag 35 nach CTX-Konditionierung und KMT zur Induktion einer isolierten lymphohämatopoetischen GVH-Reaktion führte, gingen wir der Frage nach inwieweit ein GVL-Effekt durch diese DLI-Gabe vermittelt werden kann. Zu diesem Zweck führten wir zunächst eine Reihe von Vorexperimenten durch, um ein Tumormodell zu etablieren und den besten Zeitpunkt der Tumorgabe zu bestimmen. Wir verwendeten als Tumorzelllinie, die T-Zell-Leukämie/Lymphom-Linie EL4. Aufgrund der hohen Tumorigenität der EL4-Zellen (100% Letalität bei 500 Zellen) führte die Applikation der Tumorzellen vor der Transplantation bzw. bis Tag 34 zu einem schnellen Tod der Tiere, ohne daß wir in der Lage waren DLI-vermittelte GVL-Effekte zu beobachten. Wir waren deshalb gezwungen, die Tumorgabe nach der DLI-Applikation vorzunehmen (d. h. am Tag +7 nach DLI). Diese Vorgehensweise wird auch von anderen Gruppen benutzt (Johnson et al., 1999). Obwohl dies im Hinblick auf die beabsichtigte Imitation der klinischen Situation unbefriedigend ist, gelang

es uns auf diese Weise eindeutig GVL-Effekte zu beobachten. Mit dieser Vorgehensweise war es möglich einen signifikanten DLI-vermittelten GVL-Effekt nachzuweisen (Abbildung 18). Die i.v.-Gabe von  $3 \times 10^7$  Spender-Milzzellen am Tag +35 führte zu einem kompletten Verlust der EL4-induzierten Mortalität. Diese Protektion war jedoch nicht ausreichend, um die Tiere vor einer erneuten Tumorzellgabe zu schützen, d.h., alle Tiere, die nach primärer DLI (= Tag 35)- und Tumorgabe (Tag 42) überlebt hatten starben nach einer zweiten Tumorzellgabe (Abbildung 18, Tag 122 nach primärer Tumorgabe). Somit konnten wir zeigen, daß der DLI-vermittelte GVL-Effekt nicht anhaltend war. Das gleiche galt für die Gruppe die initial (d.h. am Tag 35) nur DLI erhalten hatte. Auch hier konnten wir keinerlei GVL-Effekt beobachten, wenn die Tumorzellen am Tag 164 inokkuliert wurden. Dies konnte in einem separaten Experiment, in dem die Tumorzellgabe 10 Wochen nach DLI erfolgte bestätigt werden. Hierbei konnte erneut kein andauernder protektiver Effekt der DLI beobachtet werden. Aus diesen Daten zogen wir die Schlußfolgerung, daß die Gabe von DLI bei gemischten Chimären zu einer potenten, aber nur transienten GVL-Reaktion führten. Der Hauptmechanismus der DLI-vermittelten GVL-Reaktion beruht somit wahrscheinlich auf einen Alloantigen-vermittelten und nicht auf einem Tumorantigen-spezifischen Effekt. Dieser Fragestellung gingen wir mit den nächsten Experimenten weiter nach.

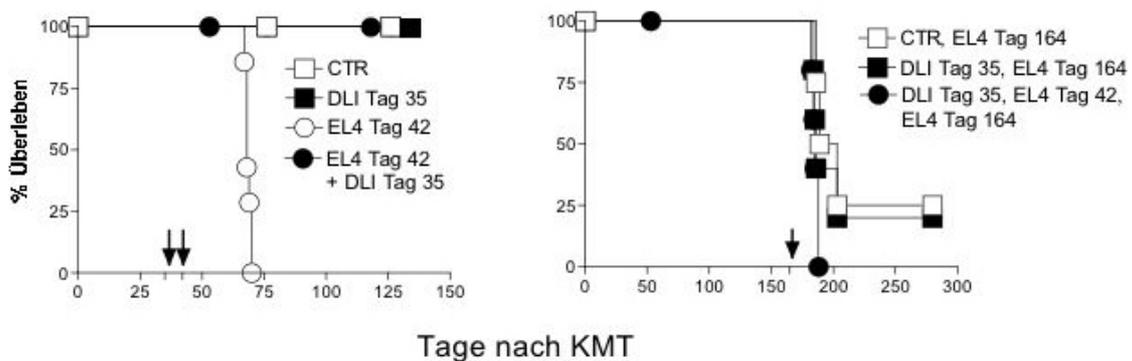


Abbildung 18: DLI-vermittelte GVL-Effekte nach CTX-Konditionierung .

A) Linke Graphik: Die Tiere erhielten  $3 \times 10^7$  Spender-Milzzellen am Tag +35 nach KMT mit oder ohne i.v.-Injektion von 500 EL4-Zellen am Tag +42 nach KMT. Diejenigen Tiere, die EL4-Zellen ohne DLI erhalten hatten (EL4 Tag42, n=7), starben alle innerhalb von 30 Tagen. Im Gegensatz hierzu überlebten alle Tiere, die DLI und Tumorzellen erhalten hatten (EL4 Tag42 + DLI Tag 35, n=5). Die Kontrollgruppen mit (DLI Tag35, n= 5) und ohne DLI (CTR, n=5) zeigten keine Mortalität.

B) Rechte Graphik: Am Tag 164 nach KMT verabreichten wir den überlebenden Tieren aus demselben Experiment in allen Gruppen 500 EL4 Zellen. Zu diesem Zeitpunkt konnten wir keinen Unterschied mehr zwischen den unterschiedlichen Gruppen beobachten.

### **3.6 Untersuchungen zum Schicksal alloreaktiver Zellen in Spenderlymphozyteninfusionen**

Die oben dargestellten Befunde ließen folgende Schlüsse zu:

1. DLI am Tag 35 führen zu einer isolierten GVH-Reaktion im lymphohämatopoetischen System ohne Ausbildung einer GVHD. Als Ausdruck dessen konnte eine Konversion des gemischten Chimärismus in einen vollen Spenderchimärismus beobachtet werden.
2. In Langzeitempängern von Tag 35-DLI zeigten sich Zeichen der andauernden GVH-Reaktivität (z.B. anti-Empfänger MLR, bzw. quantitative und qualitative Veränderungen im lymphatischen Kompartiment ohne gleichzeitigen Nachweis der GVHD-Entwicklung. Allerdings konnte in den Langzeitempängern von DLI (Tag 35) ebenfalls keine anti-Empfänger CTL-Reaktion nachgewiesen werden.
3. DLI (Tag 35) induzieren eine potente, aber nur transiente GVL-Reaktion. Frühere Daten aus dem Sykes-Labor belegen, daß der GVL-Effekt gegen EL4 Zellen ausschließlich durch CD8 Zellen vermittelt wird. Der Verlust der GVL-Reaktivität, 10 Wochen nach DLI-Gabe, könnte somit mit dem Fehlen einer andauernden Alloantigen-spezifischen CTL-Reaktion korrelieren.

Um dem Schicksal Alloantigen bzw. Empfänger-spezifischer Spender-T-Zellen nachzugehen verwendeten wir das Modell der TCR-transgenen B6.2C-Mäuse (2C). Diese Mäuse besitzen in ihren CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen transgenen T-Zellrezeptor, der gegen das MHC I Antigen L<sup>d</sup> gerichtet ist. Diese T-Zellen reagieren somit z.B. gegen den BALB/c (H2<sup>d</sup>) Stamm. BALB/c Mäuse wurden mit dem CTX-Protokoll konditioniert und erhielten B6 Knochenmark. Nach Entwicklung eines gemischten Chimärismus erhielten die Empfänger am Tag 35 nach KMT entweder normale B6-, 2C- oder B6 plus 2C-Milzzellen als DLI. 10 Tage oder 10 Wochen nach DLI wurden die Empfänger getötet. Mit Hilfe des klonotypischen Antikörpers 1B2, welcher den transgenen T-Zellrezeptor nachweist, konnten wir das Schicksal der 2C<sup>+</sup>T-Zellen nach dem adoptiven Transfer verfolgen (quantitative Erfassung, Gewebeverteilung etc.). Wie in Abbildung 20 dargestellt zeigte sich am Tag 10 nach DLI eine massive Expansion (10.9-fach) der 2C-Zellen in der Gruppe die 2C-Zellen und Wildtyp Milzzellen erhalten hatte. Zum gleichen Zeitpunkt betrug der Anteil der 2C Zellen am gesamt CD8 Pool der Milz >75%. Die Gruppe, die nur 2C-Zellen erhalten hatte zeigte im Gegensatz nur eine diskrete Expansion (1.9 fach). Der Anteil der 2C Zellen am CD8 Pool betrug ca. 25%. 10 Wochen nach DLI war es zu einer dramatischen Schrumpfung dieses 2C Pools gekommen. So war die 2C Population auf den Injektionswert geschrumpft (2C + Wildtyp DLI). In der Gruppe, die nur 2C Zellen erhalten hatte waren keine 2C Zellen mehr nachweisbar. Daraus konnte der Schluß gezogen werden, daß es nach Gabe von DLI-Zellen zunächst zu einer signifikanten

Expansion der alloreaktiven Zellen kommt gefolgt von einer schnellen Abnahme der Zellpopulation. Desweiteren kann man folgern, daß die Expansion der CD8<sup>+</sup> 2C Zellen der Hilfe von CD4 Zellen bedarf, da die starke Expansion nur in der Gruppe beobachtet wurde, die sowohl 2C als auch Wildtyp Milzzellen erhalten hatte. Der Hauptmechanismus der CD4-abhängigen Hilfe für CD8<sup>+</sup> CTL wird durch Aktivierung von APC durch die Interaktion von CD4 und APC gewährleistet. Diese Aktivierung bedient sich u.a der Interaktion von CD40 (APC) - CD40-Liganden (CD4<sup>+</sup> T-Zelle)(Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Allerdings kann diese Interaktion durch proinflammatorische bzw. infektiöse Stimulation ersetzt werden. In der dargestellten Konstellation nach nicht-myeloablativer Konditionierung und nur geringen proinflammatorischer Reaktion ist es denkbar, daß die CD8<sup>+</sup>T-Zellexpansion stärker auf die CD4-Hilfe angewiesen ist.

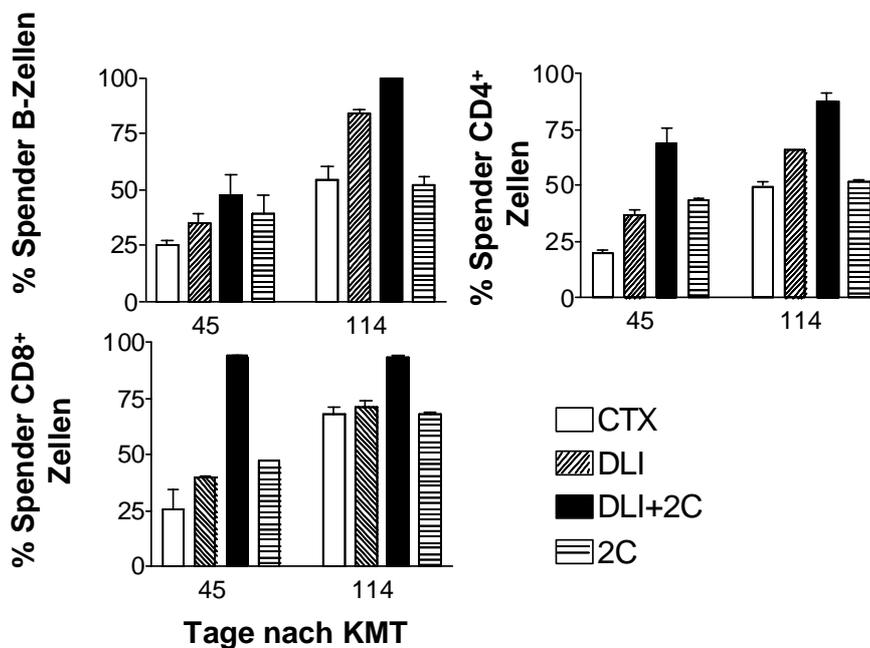


Abbildung 19: Spenderchimärismus in der Milz nach Gabe Alloantigen-spezifischer DLI

B6 →BALB/c gemischte CTX-Chimäre erhielten am Tag 35 nach KMT DLI. Es wurde der Effekt folgender Spenderlymphozyten untersucht:  $1 \times 10^7$  Wildtyp BALB/c Milzzellen (DLI),  $1 \times 10^7$  Wildtypzellen +  $5 \times 10^6$  2C Milzzellen (DLI + 2C);  $5 \times 10^6$  2C Milzzellen (2C). Als Kontrolle dienten CTX-Chimäre ohne DLI-Gabe. Am Tag 45 bzw. am Tag 114 nach KMT wurden die Tiere getötet und die lymphatischen Organe auf Spenderchimärismus untersucht. Im Gegensatz zu den bisherigen Daten wurden in diesem Experiment nur  $1 \times 10^7$  Milzzellen verabreicht. Dies beruhte auf Vorexperimenten in der B6 →BALB/c Kombination, bei denen  $3 \times 10^7$  BALB/c Milzzellen den gemischten Chimärismus konvertieren, aber eine GVHD induzierten. Bei der geringeren Menge an applizierten

Wildtypmilzzellen sahen wir keine Konversion des gemischten Chimärismus. Ebenso führte die Gabe der Empfängerantigen-spezifischen transgenen 2C Zellen nicht zur Konversion. Die gemeinsame Gabe von 2C-Zellen plus Wildtypzellen führte jedoch zur Konversion.

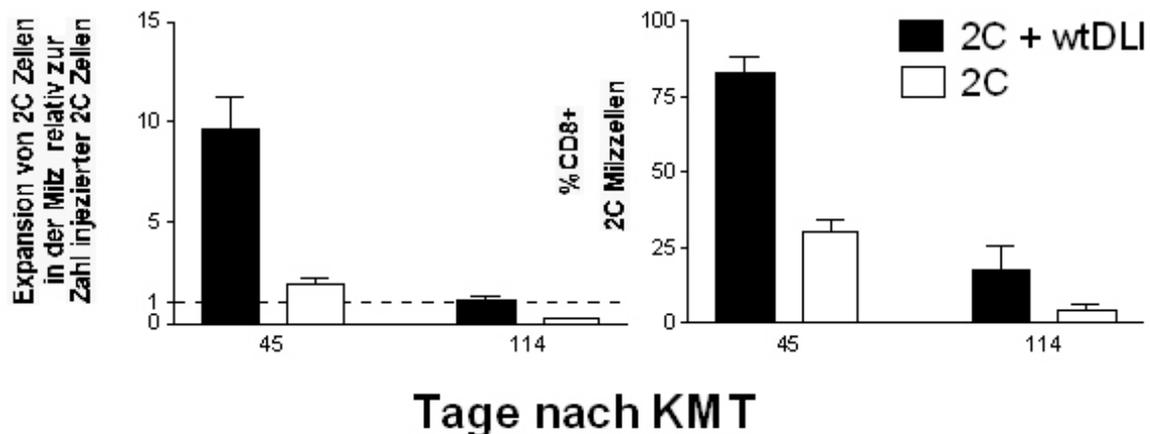


Abbildung 20: *Expansion Alloantigen-spezifischer DLI-T-Zellen in gemischten Chimären*

An den Tagen 45 und 114 nach KMT wurden die Tiere der o.g. experimentellen Gruppen getötet. Mit Hilfe des klonotypischen Antikörpers 1B2, der den 2C TCR erkennt, konnte die Zahl der 2C<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz quantitativ verfolgt werden.

### 3.7 **Untersuchungen zum Einfluß des Empfängerchimärismus auf die DLI-vermittelte GVL-Reaktion**

Ausgehend von der Beobachtung, daß die DLI-vermittelte GVL-Reaktion nach CTX-Konditionierung wahrscheinlich primär Alloantigen-abhängig ist, stellten wir die Hypothese auf, daß DLI bei gemischten Chimären zu einer besseren GVL-Reaktion führen müßte als bei vollen Chimären. Diese verbesserte GVL-Reaktion könnte darauf beruhen, daß durch die Gegenwart von Empfänger-APC in gemischten Chimären eine direkte Alloerkennung stattfindet, die eine gesteigerte Antitumorantwort nach sich ziehen könnte. Bei vollen Chimären wäre der GVL-Effekt nur auf die direkte Tumorzellerkennung oder auf eine indirekte Erkennung und "cross presentation" angewiesen. Um diese Frage experimentell zu prüfen generierten wir gemischte oder volle Chimäre mittels letaler Bestrahlung.

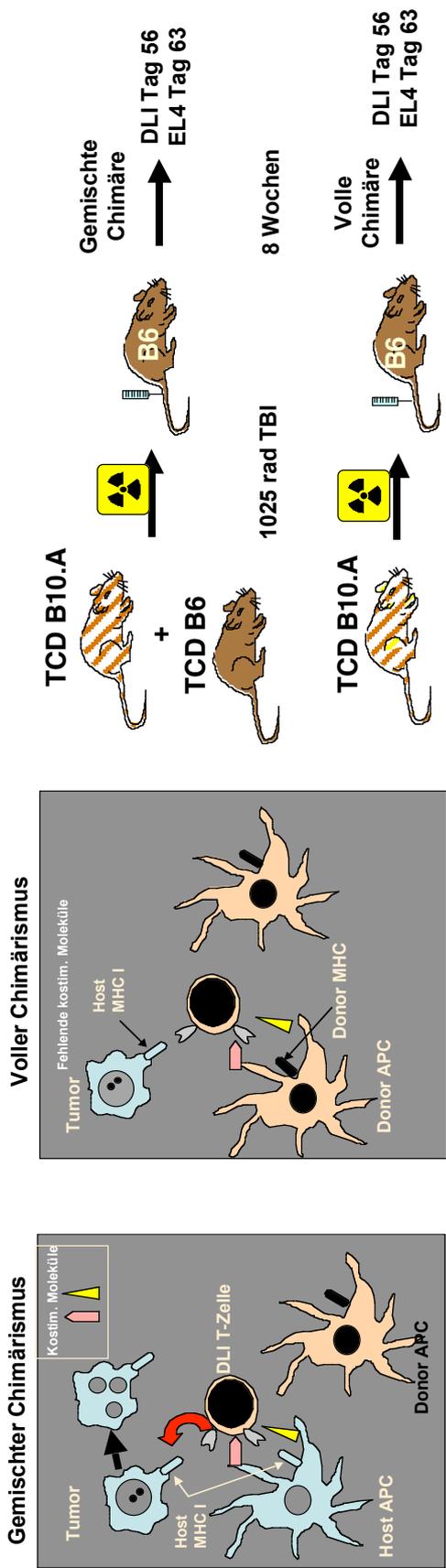


Abbildung 21: Rolle der Empfänger APC bei der DLI-vermittelten GVL-Reaktion. Hypothetisches Modell und experimentelle Vorgehensweise

In B6 Mäusen wurde nach letaler Bestrahlung (1025 rad) ein gemischter bzw. voller hämatopoetischer Chimärismus etabliert durch Transplantation allogener (B10.A) TCD Knochenmarkzellen oder einer Mischung aus allogenen und syngeneten Knochenmarkzellen. 8 Wochen (=Tag 56) nach KMT erhielten die Tiere  $3 \times 10^7$  Spendermilzzellen (DLI) mit oder ohne Injektion von  $500 \text{ EL4}$  Leukämie/Lymphomzellen am Tag 63.

### 3.7.1 DLI führen zur Induktion einer LGVH-Reaktion in gemischten Chimären ohne GVHD

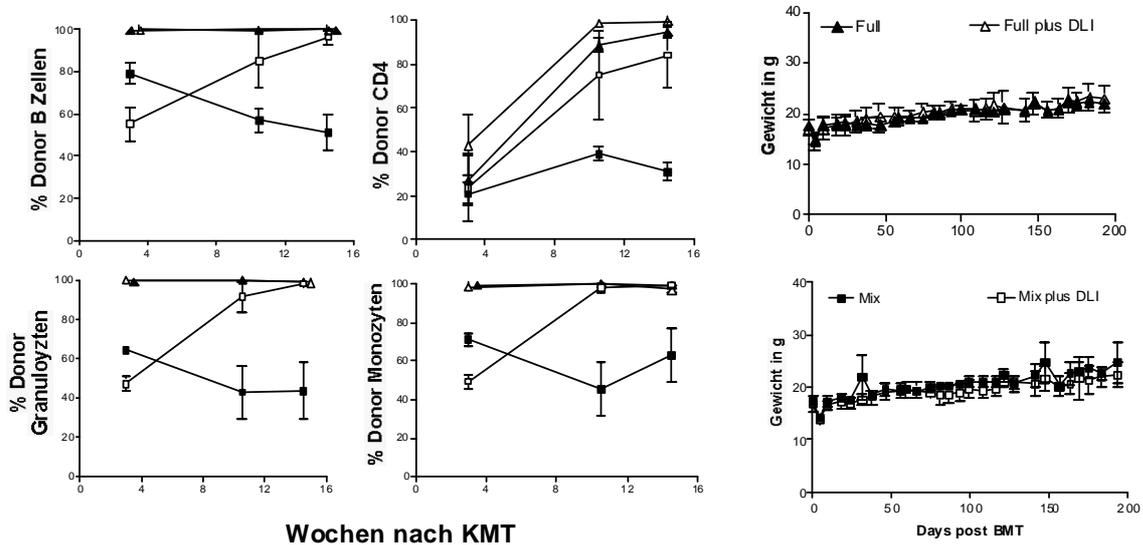


Abbildung 22: DLI vermitteln eine LHGVR.

Dargestellt ist der Chimärismusverlauf in letal bestrahlten B6 Mäusen, die entweder mit TCD B10.A Knochenmark (Full) oder einer Mischung aus TCD B10.A plus TCD B6 (Mix) Knochenmark rekonstituiert wurden.  $3 \times 10^7$  Milzzellen wurden am Tag 56 verabreicht. Gemischte Chimäre (Mix+DLI), die DLI erhielten konvertierten zu einem vollem Chimärismus (linke Abbildung). DLI-Gabe führte weder in gemischten noch in vollen Chimären zur Entwicklung von GVHD. Die rechte Abbildung zeigt den stabilen Gewichtsverlauf der Tiere. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

### 3.7.2 DLI-vermittelte GVL-Effekte in vollen bzw. gemischten Chimären

Da es in gemischten Chimären durch die Präsenz Antigen-präsentierender-Zellen (APC) des Empfängers zum Zeitpunkt der DLI - Gabe zu einer besseren direkten Allo-Stimulierung der DLI-T-Zellen kommen könnte, wollten wir der Hypothese nachgehen, daß die Gabe von DLI in gemischten Chimären zu einer signifikant besseren GVL-Reaktion führen als in vollen Spenderchimären. 8 Wochen (=Tag 56) nach KMT erhielten die Empfänger DLI in Form von  $3 \times 10^7$  Milzzellen, gefolgt von der Tumorinokkulation sieben Tage nach DLI (d.h. Tag +63). In den Experimenten konnten wir keine GVHD-Induktion beobachten. Es zeigte sich jedoch ein hoch signifikant besserer GVL-Effekt in gemischten Chimären (Abbildung 23).

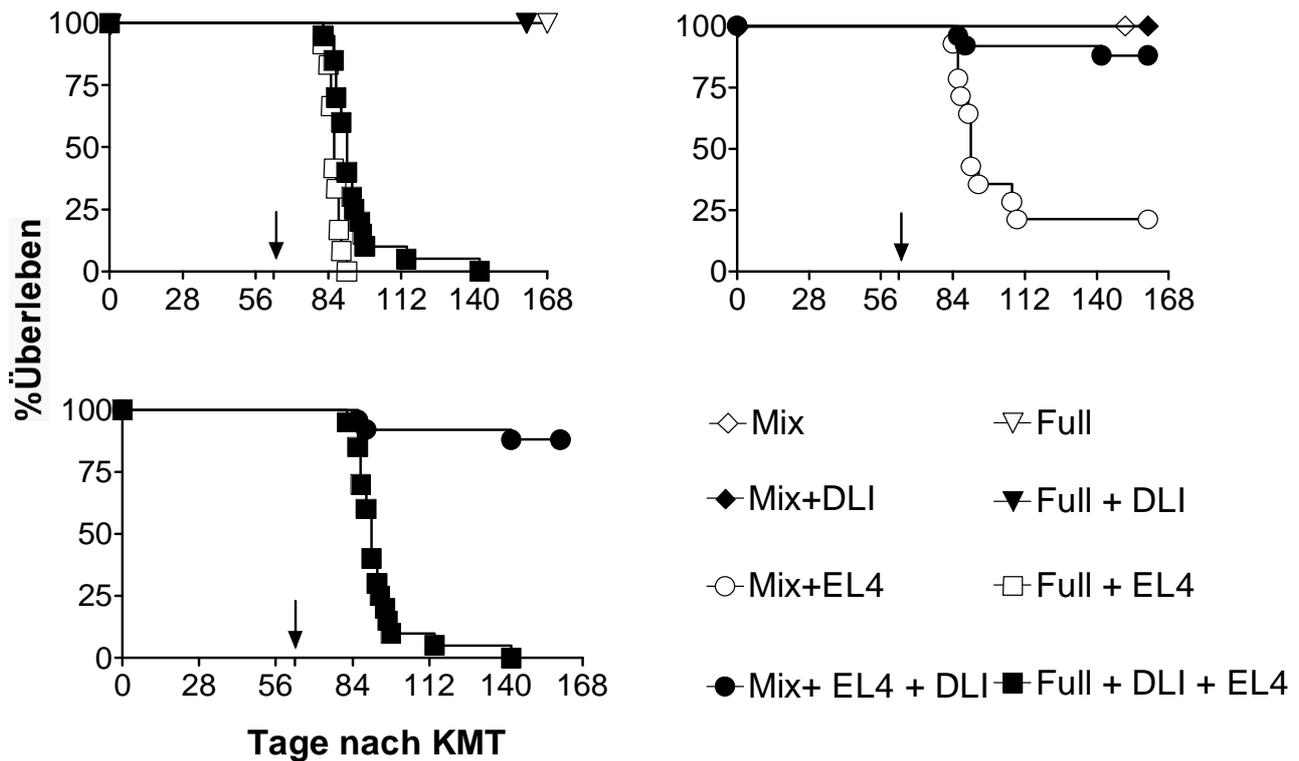


Abbildung 23: *Einfluß des hämatopoetischen Chimärismus auf die DLI-vermittelte GVL-Reaktion*

In gemischten Chimären sind DLI-vermittelte GVL-Reaktionen signifikant stärker als in vollen hämatopoetischen Chimären. Die Abb. zeigt die kumulativen Daten von 4 Experimenten.

- A) Links oben: Volle Chimäre zeigen eine schnelle 100%-ige Mortalität nach Gabe von 500 EL4-Zellen am Tag 63 (Full+EL4, n= 12). Die Applikation von DLI am Tag 56 führt zu einer signifikanten, aber diskreten Überlebensverlängerung (Medianes Überleben 91 versus 86 Tage nach KMT,  $p < 0.05$ ) ohne Heilung (Full+DLI+EL4, n= 20 ). Volle Chimäre (Full, n=7), die weder DLI noch EL4 erhalten, zeigen keine Mortalität. DLI alleine haben keine Toxizität (Full+DLI, n= 14).
- B) Rechts oben: Gemischte hämatopoetische Chimäre weisen im Vergleich zu vollen Chimären bereits spontan ein besseres Überleben auf (Mix+EL4, n=14). Die zusätzliche Gabe von DLI führt zu einem dramatischen Rückgang der Leukämie-induzierten Mortalität (Mix+DLI+EL4, n= 25). Die alleinige Applikation von DLI hat bei gemischten Chimären ebenfalls keine Toxizität (Mix+DLI, n=11). Gemischte Chimäre ohne Manipulation zeigen ebenfalls keine Toxizität (Mix, n=8).

C) *Links unten:* Hier werden die DLI-vermittelten GVL-Effekte in gemischten (Mix+DLI+EL4) und vollen Chimären (Full+DLI+EL4) gegenübergestellt. Der Überlebensvorteil bei den gemischten Chimären war hochsignifikant ( $p < 0.0001$ )

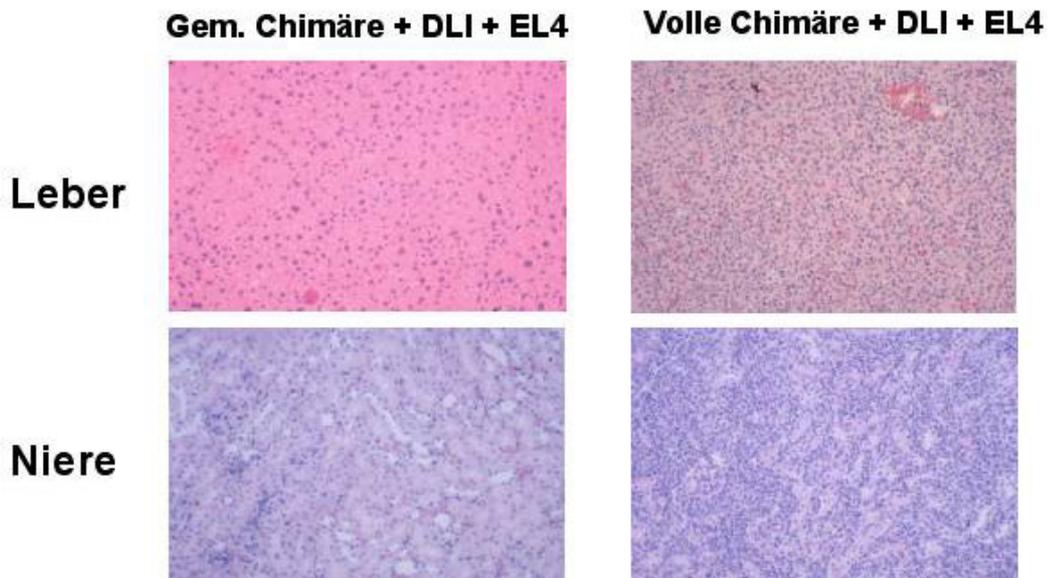


Abbildung 24: *Nachweis von Tumorzellinfiltration in vollen Chimären*

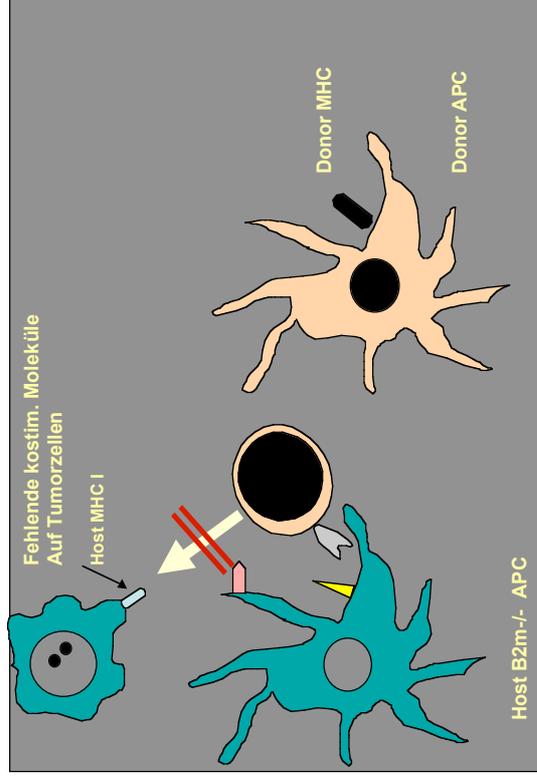
Tiere, die nach EL4-Gabe verstarben wurden histologisch auf eine Infiltration von Leber und Niere, untersucht. Überlebende Tiere wurden 100 Tage nach Tumorzellgabe getötet und ebenfalls auf einen Tumorzellnachweis hin untersucht. Alle vollen Chimäre die DLI und EL4 erhalten hatten, zeigten eine ausgeprägte Infiltration von Leber und Niere. Im Gegensatz hierzu waren die gemischten Chimäre, die DLI und EL4 erhalten hatten, Tumor frei. Dargestellt sind jeweils ein repräsentatives Tiere aus jeder Gruppe.

### 3.7.3 Überlegene GVL-Effekte der Spenderlymphozyten in gemischten Chimären: Rolle der MHC Klasse I Expression auf den Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers

Um zu überprüfen, ob diese bessere direkte Alloantigenerkennung an die Präsenz von MHC Klasse I auf den hämatopoetischen Zellen des Empfängers gekoppelt ist, untersuchten wir die GVL-Reaktion der DLI in gemischten Chimären, deren syngene hämatopoetische Zellen keine MHC I Expression mehr aufwiesen. Dazu verwendeten wir  $\beta 2$ -Mikroglobulin-defiziente B6 Mäuse ( $B6.\beta 2m^{-/-}$ ) als syngene Knochenmarkspender. Es wurden folgende Gruppen miteinander verglichen: TCD B10.A +TCD B6 $\rightarrow$ B6 vs. TCD B10.A +TCD B6 $\beta 2m^{-/-}\rightarrow$ B6 vs. TCD B10.A  $\rightarrow$ B6. Um dies zu gewährleisten und die

Abstoßung der MHC I- Zellen durch NK-Zellen zu verhindern, wurden die Empfängertiere im Rahmen der Konditionierung zusätzlich mit einem anti-NK-Antikörper (NK1.1) NK-Zelldepletiert. Nach stabilem Engraftment und Elimination des Antikörpers aus der Zirkulation erhielten die Empfänger DLI mit oder ohne EL4 Inokkulation. In der Tat war der GVL-Effekt der DLI in den gemischten Chimären komplett MHC I abhängig, so daß in B10.A/B6.β2m<sup>-/-</sup> Chimären durch DLI eine signifikante Verminderung der GVL-Reaktion zu erzielen war (Abbildung 26)

**Bedeutung der MHC I Expression auf Empfänger APC  
Für DLI-vermittelte GVL Effekte in gemischten Chimären**



TCD B10.A

+

TCD B6



+ NK1.1



Gemischte  
Chimäre

DLI Tag 56  
500 Z. EL-4 Tag 63

TCD B10.A

+

TCD B6.  $\square$ 2m $^{-/-}$



+ NK1.1



Gemischte  
Chimäre

DLI Tag 56  
500 Z. EL-4 Tag 63

TCD B10.A

+



+ NK1.1



Volle  
Chimäre

DLI Tag 56  
500 Z. EL-4 Tag 63

Abbildung 25 Rolle der direkten Alloerkenntnis von MHC I auf Empfänger APC bei der DLI-vermittelten GVL-Reaktion. Hypothetisches Modell und experimentelle Vorgehensweise.

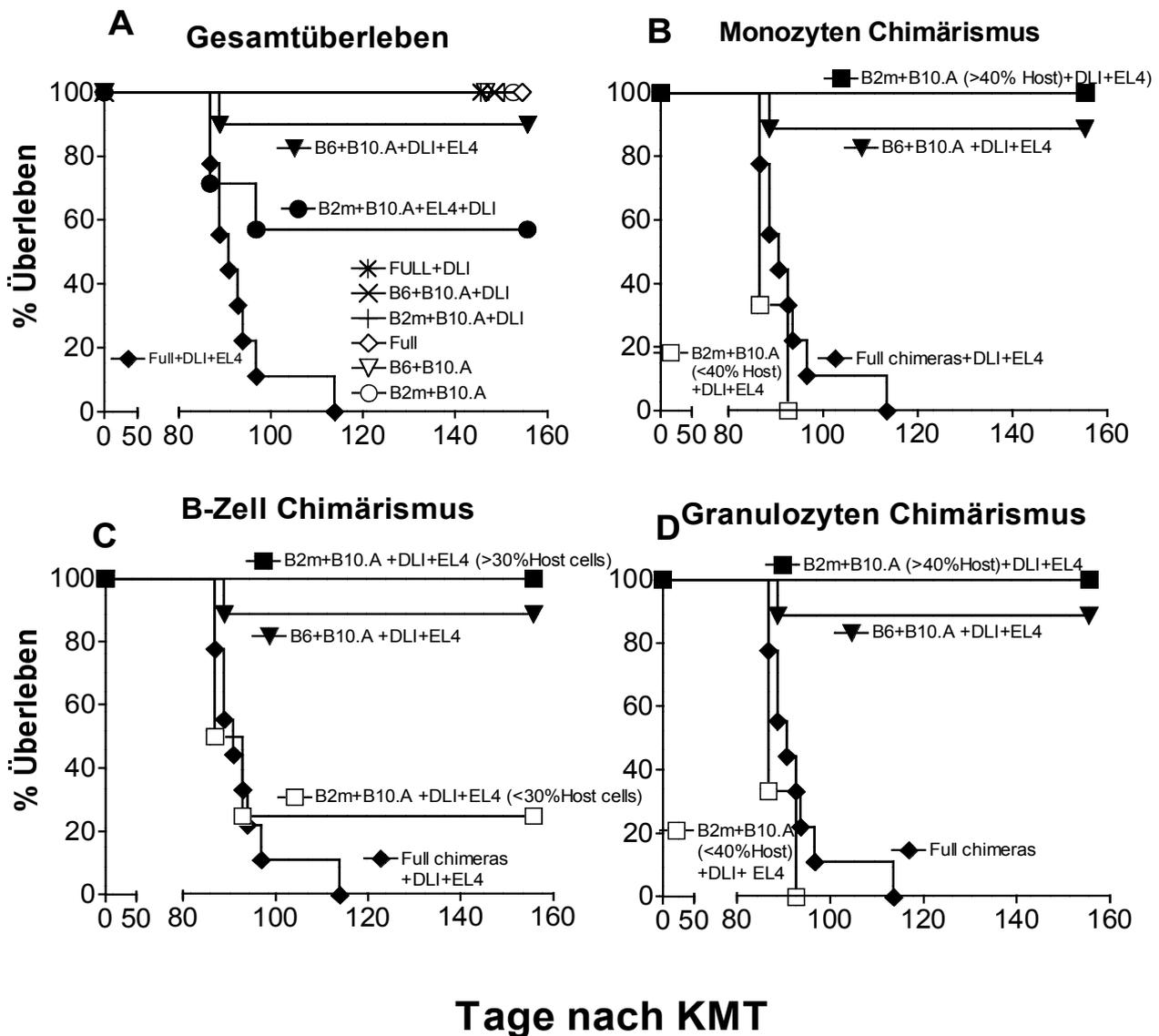


Abbildung 26 *Leukämie-freies Überleben von gemischten Chimären in Abhängigkeit der MHC Klasse I-Expression auf den hämatopoetischen Zellen des Empfängers*

A) Gemischte Chimäre (B6+ B10.A + EL4 n=10) zeigen nach DLI erneut eine fast komplette Protektion vor der EL4 Leukämie-induzierten Mortalität im Vergleich zu vollen Chimären (Full+ DLI + EL4, n = 10). In gemischten Chimären, die in der Expression von MHC Klasse I des Empfängers (B6. $\beta$ 2m<sup>-/-</sup> + B10.A; n = 10) defizient sind, stellt sich zunächst ein intermediärer Befund dar; 3/7 Tiere sterben nach EL4 Inokkulation und DLI-Gabe. B-D) Erfolgt eine Stratifizierung der Mortalität innerhalb dieser Gruppe in Abhängigkeit vom Anteil an Empfängerhämatopoese, zeigt sich, daß die gemischten Tiere mit geringem Empfängeranteil (Empfänger <30-40%) nicht mehr durch die DLI geschützt wurden, während es bei Tieren mit hohem Empfängeranteil zu einer kompletten Protektion kam. Dies konnte ebenfalls durch Korrelationsanalyse bestätigt werden: Im nicht-parametrischen Spearman Test wurden diese Befunde bestätigt (p< 0.0002). Die DLI-

Kontrollgruppen Full + DLI (n=4), B6+B10.A + DLI (n=3), B6.□2m +B10.A + DLI (n=3) zeigten keine Toxizität. Die Chimären ohne weitere Manipulation zeigten ebenfalls keine Konditionierungs-assoziierte Toxizität: Full (n=3), B6+B10. (n=3), B6.□2m +B10.A + DLI (n=3).

## 4 Diskussion

### 4.1 *Toleranzentwicklung nach nicht-myeloablativer Konditionierung*

Im immunologischen Sprachgebrauch läßt sich Toleranz als spezifische Akzeptanz gegenüber einem Transplantat bei erhaltener Reaktivität gegen unverwandte Antigene (3<sup>rd</sup> Party Response) definieren. Allgemeiner formuliert kann man Toleranz als einen physiologischen Prozess definieren, in dem das Immunsystem mit Bestandteilen des eigenen Organismus oder mit Antigenen, die diesem Organismus zugeführt werden (Schwartz, 1999) nicht reagiert.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, können unterschiedliche Mechanismen zur Toleranzentwicklung und –unterhaltung führen. Zu diesen Mechanismen zählen die Ignoranz, die Anergie, die Deletion bzw. die Suppression. Die Induktion einer stabilen Spender-spezifischen Toleranz im Rahmen der soliden Organtransplantation ist ein von vielen Arbeitsgruppen intensiv verfolgtes Ziel, da hierdurch eine dauerhafte immunsuppressive Therapie überflüssig wäre und die dadurch bedingten Komplikationen vermieden werden könnten (z.B. Infektionskomplikationen, Entstehung von Posttransplantationslymphomen etc.). Hierbei werden unterschiedliche Strategien verfolgt um eine Spender-spezifische Toleranz zu induzieren. Aus den o.g. Befunden und Überlegungen geht hervor, daß die Knochenmark/Stammzelltransplantation eine sehr vielversprechende Möglichkeit darstellt um dieses Ziel zu erreichen. Dies ist vor allem darin begründet, daß der gemischte hämatopoetische Chimärismus zu einer zentralen Deletion Spender-reaktiver Empfängerzellen (Sprent et al., 1988) führt und diese Deletionstoleranz sehr robust ist (Nossal, 1994). Aufgrund der intensiven und toxischen Konditionierungstherapie, die erforderlich ist um ein Engraftment der Spenderhämatopoese zu erreichen, war es jedoch bislang nicht möglich dies bei Patienten im Rahmen der soliden Organtransplantation in die Tat um zu setzen. Unter der Hypothese, daß bereits ein hämatopoetischer Mikrochimärismus in der Lage wäre Toleranz zu induzieren (Starzl et al., 1996) führte die Arbeitsgruppe von Starzl in Pittsburgh vor längerer Zeit bereits erste Studien durch, bei denen dem Empfänger nicht nur das Organ sondern auch das Knochenmark - allerdings ohne vorhergehende Konditionierung - transplantiert wurde (Pham et al., 2000a; Pham et al., 2000b) . Ausgangspunkt für diese Studien war die Beobachtung, daß man mit sensitiven Methoden bei einer Vielzahl von organtransplantierten Patienten Zellen des Organspenders im lymphohämatopoetischen System des Empfängers nachweisen konnte. Dieser Mikrochimärismus wird durch sogenannte „Passenger Leukocytes“ verursacht, die aus dem Transplantat in den Empfänger einwandern. Die Rolle des Mikrochimärismus bei der Toleranzentwicklung ist jedoch umstritten, da es nicht klar ist in wieweit der bei Langzeitüberlebenden nach Lebertransplantation häufig nachweisbare hämatopoetische Mikrochimärismus kausal für die Toleranz oder Folge der Toleranz ist (Wood and Sachs, 1996). Ergebnisse der

klinischen Studien sind bislang nicht konklusiv. Durch die Fortschritte bei der Entwicklung nicht-myeloablativer Konditionierungsprotokolle und der damit verbundenen Reduktion der Toxizität, erscheint die Induktion eines Makrochimärismus erfolgversprechender. Durch die Modifikation des Konditionierungsprotokolles von Sharabi gelang es ein Cyclophosphamid-haltiges Protokoll zu generieren, welches ohne Ganzkörperbestrahlung auskommt. Wir konnten mit dieser Methode (s. Abbildung 3) einen stabilen Langzeitchimärismus (s. Abbildung 4) etablieren. Wichtiger jedoch war die Erkenntnis, daß wir auch mit diesem Protokoll eine Spender-spezifische in vitro und in vivo Toleranz induzieren konnten (s. Abbildung 5, 6). Dieses Konditionierungsprotokoll wurde in der Zwischenzeit auch klinisch erfolgreich zur Toleranzinduktion bei Nierentransplantation eingesetzt. So gelang es in der Tat bei zwei Patienten mit Multiplem Myelom und terminaler Niereninsuffizienz durch dieses Konditionierungsprotokoll eine kombinierte allogene HLA-idente Knochenmark- und Nierentransplantation durchzuführen und langandauernde Transplantatakzeptanz selbst nach Absetzen der Immunsuppressiva zu erreichen (Spitzer et al., 1999). Obwohl wir eindeutige Hinweise für eine zentrale Toleranzentwicklung in unserem Tiermodell haben (Abbildung 7, Tabelle 2) (Mapara et al., 2001), läßt sich nicht ausschließen, daß zusätzlich periphere Mechanismen eine Rolle spielen. Denkbar wäre, daß z.B. auch regulatorische Zellen die Toleranzentwicklung oder -unterhaltung beeinflussen. Befunde die, für die enge Interaktion von peripheren und zentralen Mechanismen im Rahmen der Toleranzentwicklung und -unterhaltung sprechen wurden von der Arbeitsgruppe von David Sachs erhoben: Es konnte gezeigt werden, daß in einem MHC I inkompatiblen Nierentransplantationsmodell (MGH-Minischwein) ohne Transplantation hämatopoetischer Zellen die perioperative kurzzeitige Gabe von Cyclosporin (12 Tage) zu einer stabilen dauerhaften Akzeptanz der Spenderniere führte (Rosengard et al., 1992). Die Durchführung einer Thymektomie 21 Tage vor der Transplantation dieser Tiere führte jedoch zum Transplantatverlust (Yamada et al., 1997). Diese Daten lassen unterschiedlich Erklärungsmöglichkeiten zu: 1. Durch Migration von Spender-APC aus dem Transplantat in den Thymus des Empfängers kommt es dort zu einer Deletion der Spender-reaktiven Zellen. 2. Spenderantigene werden durch Empfänger-DC prozessiert, im Thymus präsentiert und führen dort ebenfalls zu einer negativen Selektion bzw. Deletion. 3. Aktivierte T-Zellen rezirkulieren durch den Thymus und werden tolerisiert. 4. Die Thymektomie beeinträchtigt die Entstehung von Suppressorzellpopulationen und führt deshalb zum Transplantatverlust.

Da die Konditionierungstherapien bislang immer noch auf den Einsatz zytotoxischer Substanzen angewiesen sind, hat sich die Stammzelltransplantation zur Toleranzinduktion bei der soliden Organtransplantation noch nicht im klinischen Alltag etabliert. Aus diesem Grund wäre eine komplett nicht-toxische Konditionierung, die ohne Zytoreduktion auskommt wünschenswert. Hierfür sind mittlerweile unterschiedliche Strategien in der Entwicklung. Ein wesentlicher Ansatz beruht auf der Blockierung der Interaktion zwischen

T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle zur Inhibition der Antigen-vermittelten T-Zellaktivierung und somit zur Antigen-spezifischen Toleranz. Die Antigen-vermittelte Aktivierung von T-Zellen erfordert eine komplexe Zell-Zell-Interaktion zwischen T-Zelle und APC, die neben der TCR-MHC-Interaktion eine Vielzahl anderer Corezeptoren erfordert. Die Gesamtheit des T-APC Interface wird immunologische Synapse genannt wird. Eine operationale Einteilung der komplexen Prozesse, welche zur T-Zellaktivierung führen sieht die Notwendigkeit von zwei Signalen zur kompletten T-Zellaktivierung vor: neben einer Interaktion zwischen Antigen und Antigenrezeptor (MHC + Peptid - TCR), Signal I genannt, ist ein sogenanntes kostimulatorisches Signal (Signal II) notwendig. Es konnte eine Vielzahl von Rezeptor-Ligandenpaaren identifiziert werden, die solche kostimulatorische Signale vermitteln (CD40-CD40-Ligand, B7.1 (CD83) bzw. B7.2 (CD86) und CD28 bzw. CTLA-4. Weitere wichtige Korezeptoren mit kostimulatorischer Funktion sind u. a. Adhäsionsmoleküle (ICAM-1/2/LFA-1; LFA-3/CD2).

Blockierung des Signal II, d.h. der Interaktion der kostimulatorischen Rezeptoren zwischen T-Zelle und APC (z.B. CD40-CD40-Ligand bzw. CD28-B7), führt zur Inhibition der T-Zellaktivierung (Lenschow et al., 1992) und zur Alloantigentoleranz. Dies gelang besonders effektiv, wenn beide Moleküle (CD40-CD40L und CD28 - B7) gleichzeitig blockiert wurden (Larsen et al., 1996). Durch die Kombination der Kostimulationsblockade, nicht-myeloablativer Konditionierung und der Knochenmarktransplantation gelang es der Gruppe von Sykes einen stabilen Chimärismus zu induzieren. Die Toleranz in diesem komplett MHC-inkompatiblen Modell war mit der initialen peripheren Deletion Spenderantigen-reaktiver T-Zellen assoziiert, welche nach dem Engraftment der Stammzellen durch die zentrale Thymus-vermittelte Deletion komplettiert wurde (Wekerle et al., 1998). Die in diesem Protokoll noch enthaltene Ganzkörperbestrahlung konnte durch die Applikation einer Megadosis von Stammzellen ersetzt werden (Wekerle et al., 2000). Diese Daten verdeutlichen, daß ein auf nicht-toxischen, immunmodulierenden Prinzipien beruhendes Konditionierungskonzept im Rahmen der allogenen KMT mittlerweile in greifbarer Nähe ist. Ein neuer Ansatz, der vielleicht komplett auf eine Konditionierungstherapie verzichten könnte wurde kürzlich von Fändrich beschrieben. Im Rattenmodell gelang es dieser Arbeitsgruppe durch intraportale Injektion embryonaler Stammzellen einen gemischten lymphohämatopoetischen Chimärismus zu generieren und Spender-spezifische Toleranz zu induzieren. Die Bedeutung dieses Befundes lag in der Tatsache, daß die Induktion des gemischten Chimärismus bei kompletter MHC-Inkompatibilität gelang ohne vorhergehende Konditionierung (Fändrich et al., 2002).

#### **4.2 DLI-vermittelte GVL-Effekte**

Die verzögerte Gabe nicht-toleranter Spenderlymphozyten führt im Mausmodell bei gemischtem hämatopoetischen Chimären zur Konversion des gemischten in einen vollen

hämatopoetischen Chimärismus. Diese auf das lymphohämatopoetische System beschränkte GVH-Reaktion führt nicht zur systemischen GVHD. Diese LGVH-Reaktion ist in der Lage auch GVL-Reaktionen zu vermitteln. Bei Patienten im Rezidiv nach allogener KMT, führt die verzögerte Gabe von DLI in Abhängigkeit der Entität zu potenten anti-Tumoreffekten. In Mausmodellen nach letaler Bestrahlung zeigte die Arbeitsgruppe von Truitt, daß DLI am Tag 21 nach KMT in der MHC-identen, Minor-mismatch Konstellation (B10.BR AKR) starke GVL-Effekte ohne GVHD vermitteln konnten, während in der MHC-inkompatiblen Konstellation die DLI-Gabe vor Tag 28 zur schweren GVHD (Johnson et al., 1993; Johnson and Truitt, 1995) führte. Wie bereits aus anderen Daten zu vermuten (Sykes et al., 1989), ist der DLI-vermittelte GVL-Effekt am stärksten in der MHC-Mismatch Konstellation. Im Gegensatz hierzu mussten beim Minor Mismatch Antigen-aktivierte ("Priming") DLI gegeben werden um einen GVL-Effekt zu beobachten (Johnson et al., 1999b). Dies demonstriert, daß eine Minor Antigen Disparität nicht unbedingt ausreicht um eine lymphohämatopoetische GVH-Reaktion, d.h. die Konversion des gemischten in einen vollen Chimärismus zu erzielen. Dies deckt sich mit Daten aus dem Hundemodell nach nicht-myeloablativer Konditionierung (Georges et al., 2000). Hier konnte durch DLI-Gabe ebenfalls keine Konversionsreaktion beobachtet werden. Diese konnte nur erzielt werden, wenn die DLI-Spender durch eine Hauttransplantation vom Spender vorher immunisiert worden waren. Allerdings war die DLI-Gabe mit der GVHD-Induktion verbunden.

Ähnliche Daten konnten wir ebenfalls in der MHC-kompatiblen, Minor Mismatch Konstellation im Mausmodell erarbeiten (eigene unpublizierte Daten Y. Kim, M. Y. Mapara, M. Sykes, Manuskript in Vorbereitung). So führten DLI in der Minor Mismatch Konstellation in gemischten Chimären nur nach einem Priming der Spender-T-Zellen zu einer Konversion (C3H.SW →B6). Allerdings konnte in diesen Fällen dann eine GVHD beobachtet werden. Eine komplette Konversion war nur ab einer Haploidität zu erzielen. Dies zeigt, daß eine stärkere immungenetische Disparität notwendig ist um eine komplette Konversion zu erzielen. Allerdings ist in der humanen Situation häufig auch in der MHC-identen Konstellation bereits ohne DLI eine spontane Konversion zu beobachten. Die spontane Konversion bei Patienten kann dadurch erklärt werden, daß die in vivo T-Zelldepletion und Immunsuppression in der klinischen Situation nicht ausreicht um die nicht-toleranten (d. h. GVH-reaktiven T-Zellen des Transplantates zu eliminieren. Desweiteren kommt es bei Patienten häufiger zur Entwicklung einer GVHD nach DLI-Gabe.

Unser Interesse galt vor allem der Frage welchen Einfluß die Alloantigen-abhängige Aktivierung der DLI in gemischten Chimären auf den GVL-Effekt ausübt. Zu diesem Zweck etablierten wir zunächst in gemischten Chimären nach nicht-myeloablativer Konditionierung ein GVL-Modell (Abbildung 18). Wir konnten einen sehr potenten, aber

nur transienten DLI-vermittelten GVL-Effekt beobachten, der 10 Wochen nach DLI-Gabe nicht mehr nachweisbar war (Abbildung 18). Dies war um so erstaunlicher, da wir in den DLI-Empfängern Zeichen einer andauernden GVH-Reaktivität nachweisen konnten. Die Untersuchung der lymphatischen Organe zeigte Zeichen einer GVH-Reaktion. So konnten wir eine lymphoide Atrophie in den Lymphknoten und im Thymus nachweisen. Der Thymus zeigte weiterhin eine gestörte zelluläre Zusammensetzung (Vermehrung von  $CD4^+CD8^-$ ,  $CD4^-CD8^+$  Thymozyten bei gleichzeitiger Verringerung der  $CD4^+CD8^+$  Thymozyten). In DLI-Empfängern, bei denen die DLI-Gabe lange Zeit zurück lag (>Tag 100 nach DLI-Gabe) konnten wir eine MLR-Antwort gegen Empfängerantigen nachweisen. Da die GVL-Reaktion gegen EL4 ausschließlich CD8-vermittelt ist, gingen wir der Frage nach, ob zu einem späteren Zeitpunkt nach DLI eine Empfänger-spezifische CD8-Antwort nachweisbar wäre. In der Tat konnten wir in der CML-Reaktion (Bulk culture) keine GVH-Reaktivität nachweisen. So drängte sich der Schluß auf, daß die fehlende CML-Reaktion in den DLI-Empfängern Ausdruck einer quantitativ oder funktionell-verminderten CD8-Antwort sein könnte. Für weitergehende Untersuchungen verwendeten wir das Alloantigen-spezifische 2C-TCR-Modell.

Hier konnten wir nachweisen, daß es am Tag 10 nach DLI bei gemischten Chimären zu einer drastischen Expansion Empfänger-Alloantigen-spezifischer T-Zellen kommt. Diese schnelle Expansion war allerdings nur transient. 10 Wochen nach DLI waren diese Alloantigen-spezifischen Zellen fast nicht mehr nachweisbar. Diese Daten lassen den Schluß zu, daß die quantitative Abnahme der Alloantigen-spezifischen Zellen des Spenders mit dem Verlust der GVL-Reaktion korreliert ist. Diese Situation ist somit mit einem Phänomen vergleichbar, welches bei der anti-viralen T-Zellantwort beobachtet werden kann; Das Konzept der klonalen Erschöpfung ("clonal exhaustion") findet man z.B. bei hoher Antigen-Beladung mit einem nicht-zytopathischen LCMV (Lymphochoriomenigitisvirus). Hierbei kommt es initial zu einer enormen Expansion der virusspezifischen CTL-Zellen. Dieser folgt jedoch eine dramatische Abnahme der Virus-spezifischen T-Zellpopulation durch Aktivierungs-induzierten Zelltod. Dies resultiert schließlich in einer unkontrollierten Virusinfektion, die zum Tod der Tiere führt (Gallimore et al., 1998; Moskopidid et al., 1993).

#### **4.2.1 Rolle von Antigen-präsentierenden Zellen der Empfänger**

Basierend auf den oben dargestellten Daten wollten wir der Hypothese nachgehen, daß DLI vermittelte GVL-Effekte in gemischten Chimären signifikant stärker wären als in vollen Chimären. Zu diesem Zweck erhielten volle oder gemischte Chimäre acht Wochen nach KMT DLI. Wir konnten eine hämatopoetische Konversionsreaktion ohne GVHD-Induktion (Abbildung 22) beobachten. Da die LGVH-Reaktion in den gemischten Chimären zu einer hoch-signifikanten GVL-Reaktion führte, konnten wir unsere Hypothese verifizieren

(Abbildung 23). Unsere Daten zeigen sehr klar, daß zum Zeitpunkt der DLI-Gabe die Präsenz von Empfänger-APC absolut kritisch ist für die Induktion eines potenten GVL-Effekt. Weiterhin konnten wir zeigen, daß der Effekt durch direkte Immunerkennung des Alloantigens erfolgt. Die indirekte Immunerkennung (d.h. Präsentation von Empfänger-Alloantigenen durch den MHC des Spenders) scheint in diesem Modell keine überragende Rolle zu spielen, da die vollen Chimären eine viel schwächere GVL-Reaktion zeigten. Interessant wäre es jedoch, ein Experiment durchzuführen in dem Empfänger und Spender zumindest partiell denselben MHC exprimieren (z.B. Haploidente Konstellation B6 → [B6 x BALB/c]<sub>F1</sub>). Alternativ und von klinischem Interesse wäre auch die Minor-Mismatch-Konstellation. Leider war in unserem EL4-Modell der Minor Mismatch nicht ausreichend um DLI-vermittelte GVL-Effekte zu induzieren. Klinische Hinweise, daß dieses Konzept in der Tat der DLI-vermittelten GVL-Reaktion zugrunde liegt konnten von mehreren Arbeitsgruppen erhoben werden. So zeigten Orsini et al., daß bei Myelompatienten die Konversionsreaktion nach DLI-Gabe mit dem Ansprechen der Erkrankung (Orsini et al., 2000; Spitzer et al., 2000) verbunden war. Dies unterstreicht deshalb um so deutlicher, daß der DLI-Effekt primär Alloantigen-vermittelt ist und daß diese potente Alloreaktion nicht notwendigerweise mit einer GVHD-Induktion verbunden sein muß.

Seit den Arbeiten von Shlomchik ist die Rolle von Empfänger-APC im Rahmen der allogenen KMT ein sehr aktuelles Thema. Shlomchik konnte nachweisen, daß die Präsenz von Empfänger-APC nach letaler Bestrahlung verantwortlich ist für die Entstehung der T-Zell-vermittelten GVHD-Entwicklung (Shlomchik et al., 1999). Weiterhin konnte kürzlich nachgewiesen werden, daß die Gabe des monoklonalen Antikörpers CAMPATH-1G nicht nur zur erwarteten T-Zelldepletion sondern auch zu einer effektiven Depletion der dendritischen Zellen in vivo führt (Klanginsirikul et al., 2002). Dies könnte erklären warum die CAMPATH-Antikörper eine sehr gute Effektivität in der Prävention der GVHD aufweisen. Einerseits scheinen diese Befunde zunächst im Widerspruch zu unseren Daten zu stehen, da unsere gemischten Chimären nach DLI-Gabe keine GVHD entwickelten. Auf der anderen Seite untermauern diese Daten die Relevanz der Empfänger-APC für die potente Aktivierung der allogenen T-Zellen und demonstrieren welchen Einfluß die zeitliche Abfolge der Gabe von Spender-T-Zellen spielt: Werden die Spender T-Zellen zum Zeitpunkt 0 am Tag der Konditionierung, d.h. zum Zeitpunkt der inflammatorischen Gewebereaktion ("cytokine storm") gegeben, vermitteln diese T-Zellen in Abhängigkeit der Anwesenheit von Empfänger-APC eine letale GVHD. Werden T-Zellen 8 Wochen nach KMT gegeben, führt die DLI-Gabe bei gemischten Chimären trotz der Anwesenheit einer großen Menge von Empfänger APC nicht zur GVHD-Entwicklung (Abbildung 22). Diese Daten kann man so erklären, daß die durch Empfänger-APC induzierte GVH-Reaktion nur dann zu einer GVHD fortschreitet, wenn gleichzeitig ein proinflammatorisches Milieu in den Geweben vorliegt. Fehlt dieses proinflammatorische

Milieu verbleibt die Alloreaktion auf das lymphohämatopoetische System beschränkt. Dafür sprechen auch Ergebnisse von Yu et al.. Mit Hilfe des 2C Modells konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, daß die alleinige Gabe der alloreaktiven 2C-CD8<sup>+</sup>T-Zellen nur dann zu einer letalen GVHD führt, wenn gleichzeitig LPS verabreicht wurde (Yu et al., 1999). Die Einwanderung der alloreaktiven T-Zellen in extra-lymphohämatopoetische Organe ist ein komplexer Prozess, der u.a die Expression definierter Adhäsionsmoleküle bzw. von Chemokinen in den Zielorganen erfordert. Es ist zu postulieren, daß die Expression von Adhäsionsmolekülen bzw. Chemokinen erst durch einen entsprechenden Entzündungsreiz in den Geweben induziert wird. In der Tat konnten wir zeigen, daß die Art der Konditionierungstherapie (letale Bestrahlung bzw. das hier beschriebene nicht-myeloablative Konditionierungsprotokoll) einen erheblichen Einfluß auf die Expression von Chemokinen in den GVHD-Targetorganen ausübt (Mapara und Sykes, Manuskript in Vorbereitung).

Dieses Prinzip kann man auch im syngenen Modell erkennen. Der adoptive Transfer Tumor-spezifischer transgener T-Zellen ist nicht in der Lage einen Tumor zu eliminieren, wenn dieser in einem extralymphatischen Organ (z.B. Leber) lokalisiert ist. Wenn allerdings unspezifische Entzündungsreize gesetzt werden (Bestrahlung, peritumoröse cpG Injektion) ist eine Tumoreliminierung möglich (Ganss et al., 2002; Kawarada et al., 2001). Aus diesen Befunden läßt sich ableiten, warum der Einsatz der allogenen Stammzelltransplantation bei nicht-hämatopoetischen Tumorerkrankungen nur einen begrenzten Erfolg haben dürfte und dann immer an eine GVHD-Entwicklung gekoppelt sein sollte. Basierend auf den neuen Entwicklungen auf dem Gebiet der nicht-myeloablativen Konditionierungsprotokolle, wurde die allogene Stammzelltransplantation auch bei einer Reihe von soliden Tumoren eingesetzt. Bislang - mit Ausnahme des Nierenzellkarzinoms (Childs et al., 2000). - allerdings ohne großen Erfolg. Bei anderen soliden Tumoren ist der Graft-Versus-Tumor (GVT)-Effekt höchstens kasuistisch dokumentiert (Eibl et al., 1996).

### **4.3 Strategien zur Trennung von GVHD und GVL**

Die GVHD stellt nach wie vor die Hauptkomplikation und Mortalitätsursache nach allogener KMT dar. Andererseits ist die durch die allogene Stammzelltransplantation vermittelte GVL-Reaktion, die zur Zeit potenteste Form der Immuntherapie. Somit ist es von größtem Interesse GVHD und GVL zu separieren. Folgende Faktoren spielen eine überragende Rolle in der Pathophysiologie der GVHD: 1. Die immungenetische Disparität zwischen Empfänger und Spender; 2. Präsenz und Zahl von T-Zellen im Transplantat; 3. Zytokinsturm in Folge der Konditionierung.

Wie bereits oben dargestellt ist die T-Zelldepletion zwar sehr effektiv im Hinblick auf die Verhinderung der GVHD, sie ist allerdings mit einer höheren Transplantatabstoßungs- und

Rezidivrate verbunden. Ein interessanter Ansatz zur Kontrolle der GVHD ohne Immunsuppression bzw. initiale T-Zelldepletion ist der Suizidgentransfer in die T-Zellen des Transplantates. Dies wurde von der Arbeitsgruppe um Bordignon erstmalig erfolgreich gezeigt. Dieser Ansatz beruht auf der retroviralen Transduktion von T-Zellen mit einem Suizidgen (z.B. Herpes Simplex Thymidin-Kinase). Hierdurch wäre es möglich die T-Zellen initial im Transplantat zu belassen um somit das Engraftment zu ermöglichen. Nur im Fall der Entwicklung einer GVHD, würden die transduzierten T-Zellen durch systemische Gabe des Prodrugs (z.B. Gancyclovir) eliminiert und die GVHD terminiert (Bonini et al., 1997). Diese Vorgehensweise kann auch für die DLI-Gabe modifiziert werden. So interessant dieser Ansatz erscheint, bestehen jedoch einige Probleme für die Umsetzung. So erfordert diese Vorgehensweise eine große Logistik (retroviraler Gentransfer, GMP-gerechte Vektorproduktion), birgt nicht-kalkulierbare Risiken und ist z. Z. noch in der Erprobung. Wie kürzlich im Tiermodell gezeigt, besteht das Risiko der retroviral-induzierten Insertionsmutagenese weiterhin und hat im Mausmodell zur Entwicklung von Leukämien geführt (Baum et al. 2002). Alternativ könnte das trunkierte Markergen bei induzierten Leukämogenese beteiligt sein. Obwohl es sich hierbei um Vektoren handelte, die für den Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen gedacht waren, ist dieses Risiko auch beim retroviralen Gentransfer in T-Zellen ebenfalls gegeben. Auf der anderen Seite bestehen immer noch Schwierigkeiten beim effizienten Gentransfer in T-Zellen. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Immunogenität des Suizidgens, die zur Elimination der transduzierten T-Zellen führen könnte. Weitere Strategien der Intervention die potentiell zur Trennung von GVHD und GVL beitragen könnten sind im folgenden ausgeführt .

1. Blockade der Einwanderung von T-Zellen in die GVHD-Organen.
2. Inhibition der Zytokinkaskaden die zur Aktivierung der T-Zellen führen.
3. Identifikation von "Tumor-assoziierten" oder Minor-Antigenen mit limitierter Gewebeexpression (z.B. Hämatopoese-spezifische Antigene) zur Fokussierung der GVL-Reaktion auf den Tumor und dementsprechender Einsatz Antigen-spezifischer T-Zellen
4. Einsatz von Suppressor T-Zellen zur Unterdrückung der GVHD.
5. Einsatz von NK-Zellen als GVL-Mediatoren im Rahmen eines KIR-Mismatch

#### **4.3.1 Endorganprotektion bzw. Intervention in Zytokinkaskaden**

Eine Strategie zur Trennung von GVHD und GVL besteht darin zu verhindern, daß die Alloantigen-aktivierten und -spezifischen T-Zellen aus dem lymphohämatopoetischen System emigrieren und in die GVHD-Targetorgane einwandern. Der Prozess der Extravasation der Leukozyten aus der Blutbahn erfordert die Interaktion der Zellen mit Adhäsionsmolekülen (Selektine und Integrine) auf Endothelien, der Adhäsion, der

gerichteten Migration in Abhängigkeit eines Chemokingradienten, sowie der Diapedese. Im Modell der GVHD ist zu beachten, daß es durch die Konditionierungstherapie bzw. durch das Alloinokkulum zu diversen Veränderungen dieser Variablen auf Seiten des Empfängers, als auch auf Seite der Spenderzellen kommt. Auf der Empfängerseite kommt es z.B. zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel der Empfängerorgane (Shen et al., 1994). In einem P → F1 Modell der GVHD konnte die Gabe von anti-VLA-4 Antikörpern die Entwicklung von Leberläsionen inhibieren (Itoh et al., 2000).

Weiterhin kommt es durch die Konditionierung alleine zu einer signifikanten, transienten Induktion unterschiedlicher Chemokine in den GVHD-Targetorganen. So konnten wir zum Beispiel nach letaler Bestrahlung am Tag 5 nach Konditionierung eine hochgradige Induktion von IP-10 im Colon der Empfängertiere nachweisen. Nach allogener KMT wurde diese Hochregulation dramatisch verstärkt (Mapara et al. Manuskript in Vorbereitung). In der Leber konnten wir u.a. eine signifikante Hochregulation von MCP-1 nachweisen. Eine andere Arbeitsgruppe konnte funktionell nachweisen, daß MIP-1 $\alpha$  signifikant zur Infiltration der Leber im Rahmen der GVHD beiträgt (Serody et al., 2000; Serody et al., 1999). Diese unterschiedlichen Organmuster bezüglich der Expressionsprofil von Chemokinen könnte auch erklären warum die Art der Polarisierung der Spender T-Zellen (Th1 vs. Th2), das Homing in unterschiedliche Organe beeinflusst. So konnten Nikolic et al. zeigen, daß STAT 4-defiziente Mäuse, die eine hochgradig verminderte Th1, aber eine verstärkte Th2-Antwort aufweisen vor allem eine GVHD von Leber und Haut induzieren, während STAT6-defiziente Spender (verstärkte Th1 bei verminderter Th2 Antwort) vor allem eine schwere GVHD im Darm induzieren (Nikolic et al., 2000). Diese Daten lassen vermuten, daß eine Inhibition des Homingverhalten der T-Zellen durch Blockade bestimmter Kandidatenchemokine die GVHD-Entwicklung beeinflussen könnte.

Ein anderer Weg könnte der Einsatz immunmodulierender Zytokine sein. Bislang herrscht noch kein klares Bild bezüglich der Art des pathogenetischen Beitrags einzelner Zytokine zur Entwicklung der GVHD. So gibt es in Abhängigkeit des untersuchten Modells widersprüchliche Daten. Einerseits wurde von einigen Arbeitsgruppen ein GVHD-Modell postuliert in dem Th1-Zytokine primär für die akute GVHD verantwortlich, während die Th2-Antwort eine GVHD-inhibitorische Wirkung aufwies (Fowler et al., 1994; Krenger et al., 1996; Krenger et al., 1995). Dies galt jedoch nur für den prophylaktischen Einsatz dieser Th2-Zellen. Mit Th2-Zellen oder Th2-Zytokinen konnte eine bereits initiierte GVHD nicht beeinflusst werden. Mittlerweile gibt es eine Reihe von Daten, die mit diesem relativ einfachen Modell der T-Zellpolarisierung und deren Einfluß auf die GVHD-Entwicklung nicht vereinbar sind. So gibt es Befunde die zeigen, daß z.B. die Gabe des Th2-Zytokins IL-10 eher zur verstärkten GVHD führt (Blazar et al., 1995; Krenger et al., 1994). Die o.g. Daten von Nikolic belegen eindeutig, daß sowohl Th1 als auch Th2-Zellen GVHD induzieren können. Daten aus der Gruppe von Sykes zeigten wiederum, daß die Gabe

von Th1-Zytokinen wie IL-2 oder IL-12 in der Lage ist eine GVHD zu verhindern (Sykes et al., 1992; Sykes et al., 1995; Yang et al., 1998). Hierbei war von besonderem Interesse, daß der IL-12 Effekt durch IFN- $\gamma$  des Spenders vermittelt wurde. Somit besteht bislang noch keine Klarheit welche genaue Rolle Th1- und Th2-Zellen bei der GVHD-spielen.

Weitere Zytokine, für die Daten eine regulatorische Rolle bei der GVHD nahelegen, sind KGF, IL-11 und IL-18. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß IL-18 die akute und chronische GVHD Entwicklung regulieren kann (Okamoto et al., 2000; Reddy et al., 2001). Weitere Befunde zeigen, daß Keratinocyte Growth Factor (KGF) (Krijanovski et al., 1999; Panoskaltsis-Mortari et al., 2000) oder IL-11 (Teshima et al., 1999) in der Lage sind eine GVHD zu verhindern ohne den GVL-Effekt zu beeinträchtigen. KGF, welches zu einer besseren Immunrestitution der T-Zellen führt, ist besonders interessant, da es u.a. das Thymusepithel und die Thymusarchitektur vor den Folgen der GVHD schützt.

#### **4.3.2 Antigen-spezifität der GVHD/GVL-Reaktion**

Die enge Assoziation der GVHD mit der GVL legt den Schluss nahe, daß die GVL-Reaktion vor allem gegen Alloantigene (Minor oder Major) gerichtet ist, d.h. Antigene, die vom Spender als Fremd erkannt werden. Es konnte in der Zwischenzeit eine Vielzahl von Minorantigenen identifiziert werden. Die Arbeitsgruppe von Goulmy konnte in der MHC-identen Empfänger-Spenderkonstellation Minor Antigene charakterisieren, die mit der Entwicklung der GVHD assoziiert sind (den Haan et al., 1995; Goulmy et al., 1996). So konnten bei Patienten mit florider akuter oder chronischer GVHD oder im Verlauf der Therapie Minorantigen-spezifische GVH-reaktive T-Zellen mit Hilfe von Tetrameren quantitativ nachgewiesen werden (Mutis et al., 1999). Interessanterweise war bei einem Teil der Antigene die Expression auf das hämatopoetische Gewebe beschränkt (De Bueger et al., 1992). In einem Hautexplantationsmodell konnte untersucht werden, in wie weit solche Hämatopoese-spezifische GVH-reaktive T-Zellen in der Lage sind in vitro bzw. in situ zur Haut-GVHD beizutragen. In der Tat zeigten Hämatopoese-spezifische T-Zellen nur eine marginale GVH-Reaktivität und Destruktion des Hautpräparate in vitro, während z. B. HY-spezifische T-Zellen zu schweren GVHD-Veränderungen (Grad III-IV) führten (Dickinson et al., 2002). Im Tiermodell konnte (Minor Mismatch C3H.SW (H2<sup>b</sup>) $\rightarrow$ B6 (H2<sup>b</sup>)) andererseits gezeigt werden, daß die Gabe eines Minor-Antigen-spezifischen T-Zellklons (B6<sup>dom1</sup>) eine isolierte GVL-Reaktion vermitteln kann, wenn dieser Klon alleine appliziert wird. Das Fehlen der GVHD war nicht auf eine restringierte Gewebeexpression zurückzuführen, da das entsprechende Minorantigen sehr breit exprimiert wird. Bei Koinjektion mit naiven T-Zellen, die gegen andere Minorantigene gerichtet sind, kam es sehr wohl zur Entwicklung einer moderaten GVHD. Eine Erklärung für diese Befunde könnte sein, daß es zum sogenannten Epitope-Spreading kommt. Hierbei kommt es im Rahmen der Destruktion der hämatopoetischen Zellen durch die

B6<sup>dom1</sup>-spezifischen T-Zellen zur Freisetzung von anderen Minorantigenen, die dann in Folge durch "Crosspresentation" in einer inflammatorischen Konstellation zur Aktivierung der naiven T-Zellen und somit zur GVHD führen (Fontaine et al., 2001). Interessanterweise wurde darüber hinaus die Beobachtung gemacht, daß die Stärke und Dauer der durch die Applikation der B6<sup>dom1</sup>-spezifischen T-Zellen vermittelten GVL-Reaktion abhängig davon war, ob das dieses Minorantigen nur auf den hämatopoetischen Zellen oder zusätzlich auf den nicht-hämatopoetischen Zellen des Empfängers exprimiert war. Im letzteren Fall kam es nur zu einer 60% Heilung im Tumormodell trotz einer signifikant stärkeren Expansion der Minor-Antigen-spezifischen T-Zellen am Tag 15. Diese Daten sind somit ebenfalls mit dem Modell der "Clonal exhaustion" vergleichbar und in Übereinstimmung mit den in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Befunde bezüglich der Expansion Alloantigen-reaktiver Zellen (siehe Abschnitt 4.2). Auch aus diesem Grund sind Antigene, die eine restringierte Gewebeexpression aufweisen von besonderem Interesse.

Das Ausnutzen einer Immunantwort gegen "Tumor-spezifische" oder Tumor-assoziierte Antigene könnte ebenfalls eine Strategie darstellen um GVHD und GVL zu separieren. Hierbei muß jedoch kritisch hinterfragt werden, ob solche Antigene auch stark genug sind eine der Alloantwort vergleichbare GVL-Reaktion zu induzieren. Tierexperimentelle Daten geben Anlaß zur Hoffnung, daß die Vakzinierung des Empfängers nach KMT oder eine Vakzinierung des Knochenmark- oder DLI-Spenders, potente GVL-Reaktionen induzieren kann (Anderson et al., 2000a; Anderson et al., 2000b; Teshima et al., 2001). Andererseits gelang es in der allogenen KMT bislang nicht eine Tumor-spezifische GVL-Antwort z.B. bei CML-Patienten nachzuweisen. Mit unterschiedlichen Methoden konnten in der Zwischenzeit verschiedene Antigene identifiziert werden, gegen die eine Immunantwort im Rahmen der allogenen KMT bei Patienten erzeugt wird (Molldrem et al., 2000). Bcr-abl gehörte jedoch bislang nicht dazu. Die Gruppe von Ritz konnte zwar bei Patienten nach DLI einen bcr-abl-spezifischen T-Zellklon gegen Peptid-gepulste Spender-APC generieren, allerdings hatte dieser T-Zellklon keine zytolytische Aktivität gegen die CML-Leukämiezellen des Patienten. Für die CML legt dies zumindest den Schluß nahe, daß eine bcr-abl-spezifische T-Zell-vermittelte anti-Tumor-Reaktion für den DLI-vermittelten GVL-Effekt nicht relevant ist (Zorn et al., 2001).

#### **4.3.3 Rolle von Suppressorzellen**

Suppressorzellen spielen wahrscheinlich bei der Induktion und Erhaltung der Selbsttoleranz und Verhinderung der Entwicklung von Autoimmunität eine essentielle Rolle. Dabei verhindern diese Zellen die Aktivierung und Proliferation autoreaktiver T-Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entkommen sind oder mit extrathymischen Antigenen reagieren. Die Arbeiten von Sakaguchi konnten zeigen, daß der Transfer von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen in Nacktmäuse zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung führt.

Durch Kotransfer von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen konnte dies verhindert werden (Sakaguchi et al., 1995). Diese CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen stammen aus dem Thymus (Itoh et al., 1999), sind mittlerweile auch im Menschen nachgewiesen worden (Dieckmann et al., 2001) und stellen die wesentliche regulatorische T-Zellpopulation dar. Neueste Daten zeigen, daß diese CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen auch an der Entstehung der Alloantigentoleranz beteiligt sind (Taylor et al., 2001). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß solche regulatorische Zellen nach allogener KMT die Entstehung der GVHD beeinflussen können (Blazar et al., 2000; Johnson et al., 1999a). Von besonderem klinischen Interesse sind die Befunde, daß ex vivo aktivierte und expandierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders die Entstehung einer GVHD verhindern können (Taylor et al., 2002).

#### **4.3.4 NK-Zellen als Mediatoren der GVL-Reaktion ohne GVHD**

Die Arbeiten von Martelli, Reisner und Velardi haben in letzter Zeit das Augenmerk auf den Einsatz von NK-Zellen als wesentliche Vermittler der GVL-Reaktivität bei MHC-Mismatch gelenkt. Dieser Effekt scheint darauf zu beruhen, daß es bei MHC-Inkompatibilität ebenfalls zu einem Mismatch zwischen den inhibitorischen NK-Rezeptoren (Killer Inhibitory Receptors KIR) und ihren Liganden, den MHC-Antigenen kommt. Durch das Fehlen des inhibitorischen Signals kann die NK-Zelle, die entsprechende Zielzelle mit fehlendem MHC-Antigen lysieren (Ruggeri et al., 1999). Dieser KIR-Mismatch ist offensichtlich für die guten klinischen Resultate, die bei der haploidenten Transplantation von AML-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung beobachtet werden verantwortlich. (Ruggeri et al., 1999; Ruggeri et al., 2002). Bei ALL-Patienten gab es offensichtlich keinen signifikanten GVL-Effekt. Ein weiterer bemerkenswerter Befund aus dieser Arbeitsgruppe ist, daß die alloreaktiven NK-Zellen ausschließlich hämatopoetische Zellen attackieren, nicht aber epitheliale Zellen. Die Grundlage für diese Selektivität der NK-Zellen ist bislang ungeklärt. Basierend auf diesen Daten konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, daß der Einsatz von alloreaktiven NK-Zellen im Rahmen der Konditionierung zur Elimination von Empfänger-APC führt und das Entstehen einer GVHD verhindert (Ruggeri et al., 2002). Diese Daten passen somit zu den von Shlomchik publizierten Befunden (Shlomchik et al., 1999) und unseren Ergebnissen, die zeigen, daß die Empfänger-APC für Alloaktivierung der Spender T-Zellen notwendig sind. Aufgrund der Präsenz der alloreaktiven NK-Zellen wäre zu postulieren, daß der Verlust an T-Zellaktivierung und der damit-verbundene Verlust an T-Zell-vermittelter GVL-Reaktivität durch die NK-Zellen kompensiert wird. Trotz der Tatsache, daß diese Vorgehensweise sehr attraktiv sind, gibt es jedoch noch eine Reihe von ungelösten Problemen im Rahmen der haploidenten Transplantation (u.a. langandauernde Immuninkompetenz der Patienten, fehlender Effekt bei ALL).

Insgesamt muß festgehalten werden, daß es in den letzten Jahren einen erheblichen Fortschritt im Hinblick auf das Verständnis der Mechanismen, die der GVHD und GVL-Reaktion zu Grunde liegen, gegeben hat. Die hier dargestellten Befunde stellen nur einen Teil der erhobenen Daten dar. Die Entwicklungen geben berechtigten Anlaß zur Hoffnung, daß diese Erkenntnisse auch ihren Eingang in den klinischen Alltag finden werden.

## 5 Zusammenfassung

Die allogene Stammzelltransplantation ist das Therapieverfahren der Wahl für eine Reihe von malignen und nicht-malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Dies ist darin begründet, daß dieses Verfahren nicht nur die Applikation einer myeloablativen und somit maximalen zytostatischen Therapie erlaubt (oder daß sie verbunden ist dem kompletten Ersatz der Empfängerhämatopoese durch den Spender), sondern vor allem dadurch, daß sie mit einem immunologisch vermittelten Anti-Tumor-Effekt, der Graft-versus-Leukämie-Reaktion (GVL) verbunden ist. In der Klinik ist die Anwendung der allogenen Stammzelltransplantation durch die assoziierten schwerwiegenden Komplikationen, zur Zeit noch erheblich eingeschränkt. Dies bezieht sich im wesentlichen auf die konditionierungsabhängige Toxizität und die Induktion der Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD), welche u. a. auf der Alloreaktivität der Spenderzellen und Konditionierungs-bedingten inflammatorischen Reaktion beruht. Aus diesem Grund ist es eines der wichtigsten klinischen Ziele, Strategien zu entwickeln, um die GVL-Reaktion von der GVHD zu trennen. Ziel dieser Arbeit war es, im präklinischen Mausmodell die Mechanismen, die der Spenderlymphozyten-vermittelten GVL-Reaktion zu Grunde liegen zu verstehen und somit Strategien zu erarbeiten, die zur Trennung von GVHD und GVL beitragen können. Die Schlüsselergebnisse sollen hier nochmals kurz zusammengefasst werden. Es konnte zunächst nachgewiesen werden, daß in der komplett MHC-differenten Konstellation ein neues nicht-myeloablatives Cyclophosphamid-haltiges Konditionierungsprotokoll zur Etablierung eines dauerhaften gemischten hämatopoetischen Chimärismus führte. Die Gabe von Spenderlymphozyten 5 Wochen nach der Transplantation führte zu Konversion des gemischten Chimärismus in einen vollen Chimärismus ohne Entwicklung einer GVHD. Diese LHGVH-Reaktion war assoziiert mit einer potenten, aber nur transienten GVL-Reaktivität. Die DLI-Gabe konnte die Empfänger jedoch nicht vor einer verzögerten (d. h. 10 Wochen nach DLI) Reexposition mit der EL4 T-Zell-Leukämie/Lymphomzelllinie ) schützen. So wie der initiale GVL-Effekt verbunden war mit einer massiven Expansion Alloantigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, war der Verlust der GVL-Reaktivität assoziiert mit dem Verschwinden dieser Alloantigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Der zentrale Befund der dargestellten Experimente war die Beobachtung, daß die Präsenz von Empfänger-APC zum Zeitpunkt der DLI-Gabe entscheidend für die Potenz des GVL-Effektes war. So führte die DLI-Gabe bei gemischten hämatopoetischen Chimären zu einer starken GVL-Reaktion mit fast kompletter Protektion vor der EL4 Lymphom/Leukämie-induzierten Mortalität. Im Gegensatz hierzu führte die DLI-Gabe bei vollen hämatopoetischen Chimären zur Verlängerung des Gesamtüberlebens ohne jedoch eine Heilung zu erzielen, d.h. es verstarben schließlich alle Tiere an der EL4-

induzierten Leukämie. Diese Daten zeigen somit, daß die DLI-induzierten GVL-Effekte primär durch Alloantigen-spezifische T-Zellen vermittelt werden und dies ohne gleichzeitige GVHD-Entwicklung möglich ist. Auf Basis dieser Daten kann man postulieren, daß zur Optimierung des DLI-vermittelten GVL-Effektes die Empfänger einen gemischten hämatopoetischen Chimärismus aufweisen sollten. Weiterhin haben diese Ergebnisse Implikationen für die Entwicklung von klinisch einsetzbaren nicht-myeloablativen Konditionierungsprotokollen. Diese Daten machen deutlich, daß es weiterhin von großem Interesse ist Konditionierungsprotokolle zu entwickeln bzw. die bereits vorhandenen zu optimieren, um einen stabilen gemischten Chimärismus mit minimaler inflammatorischer Reaktion zu erzielen. Solche Protokolle könnten dann einerseits die ideale GVHD-freie Ausgangsbasis für den Einsatz innovativer zellulärer Strategien zur Verbesserung der GVL-Reaktion sein. Andererseits könnte diese Protokolle für Behandlung nicht-maligner Erkrankungen bzw. zur Toleranzinduktion im Rahmen der soliden Organtransplantation einsetzbar sein .

## Literaturverzeichnis

Anderson, L. D., Jr., Mori, S., Mann, S., Savary, C. A., and Mullen, C. A. (2000a): Pretransplant tumor antigen-specific immunization of allogeneic bone marrow transplant donors enhances graft-versus-tumor activity without exacerbation of graft-versus-host disease, *Cancer Res* 60, 5797-802.

Anderson, L. D., Jr., Savary, C. A., and Mullen, C. A. (2000b): Immunization of allogeneic bone marrow transplant recipients with tumor cell vaccines enhances graft-versus-tumor activity without exacerbating graft-versus-host disease, *Blood* 95, 2426-33.

Aversa, F., Tabilio, A., Terenzi, A., Velardi, A., Falzetti, F., Gionnoni, C., Iacucci, R., Zei, T., Martelli, M. P., Gambelunghe, C., et al. (1994): Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum, *Blood* 84, 3948-3955.

Aversa, F., Tabilio, A., Velardi, A., Cunningham, I., Terenzi, A., Falzetti, F., Ruggieri, L., Barbabietolo, G., Aristei, C., Latini, P., et al. (1998): Treatment of high risk leukemia with T cell depleted stem cells in patients from related donors with one fully matched haplotype., *N Engl J Med* 339:, 1186-1193.

Bachar-Lustig, E., Li, H. W., Gur, H., Krauthgamer, R., Marcus, H., and Reisner, Y. (1999): Induction of donor-type chimerism and transplantation tolerance across major histocompatibility barriers in sublethally irradiated mice by Sca-1(+)Lin(-) bone marrow progenitor cells: synergism with non-alloreactive (host x donor)F(1) T cells, *Blood* 94, 3212-21.

Bachar-Lustig, E., Rachamin, N., Li, H.-W., Lan, F., and Reisner, Y. (1995): Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice, *Nature Medicine* 1, 1268-1273.

Baxter-Lowe, L. A., Casper, J., Flomenberg, N., Dinauer, D., Camitta, B., Drobyski, W., Garbrecht, F., Pietryga, D., Horowitz, M., Anderson, T., et al. (1993): Impact of HLA disparity in bone marrow transplantation, *J Immunol* 150, 321A #1842.

Beelen, D. W., Haralambie, E., Brandt, H., Linzenmeier, G., Muller, K.-D., Quabeck, K., Sayer, H. G., Graeven, U., Mahmoud, H. K., and Schaefer, U. W. (1992): Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation, *Blood* 80, 2668-2676.

Bemelman, F., Honey, K., Adams, E., Cobbold, S., and Waldmann, H. (1998): Bone marrow transplantation induces either clonal deletion or infectious tolerance depending on the dose, *J Immunol* 160, 2645-2648.

Billingham, R. E., Brent, L., and Medawar, P. B. (1953): Actively acquired tolerance" of foreign cells, *Nature* 172, 603-606.

Blackman, M., Kappler, J., and Marrack, P. (1990): The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells, *Science* 248, 1335-1341.

Blazar, B. R., Lees, C. J., Martin, P. J., Noelle, R. J., Kwon, B., Murphy, W., and Taylor, P. A. (2000): Host T cells resist graft-versus-host disease mediated by donor leukocyte infusions, *J Immunol* 165, 4901-9.

Blazar, B. R., Taylor, P. A., Smith, S., and Vallera, D. A. (1995): Interleukin-10 administration decreases survival in murine recipients of major histocompatibility complex disparate donor bone marrow cells, *Blood* 85, 842-851.

Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C., and Bordignon, C. (1997): HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia, *Science* 276, 1719-1724.

Bortin, M. M., Rimm, A. A., Saltzstein, E. C., and Rodey, G. E. (1973): Graft-versus-leukemia. III. Apparent independent antihost and antileukemic activity of transplanted immunocompetent cells, *Transplantation* 16, 182-188.

Bortin, M. M., Truitt, R. L., Rimm, A. A., and Bach, F. H. (1979): Graft-versus-leukaemia reactivity induced by alloimmunisation without augmentation of graft-versus-host reactivity, 281, 490-491.

Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Taylor, P. A., Berezovskaya, A., Grass, I., Blazar, B. R., and Nadler, L. M. (2000): p27kip1 functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes, *Nat Med* 6, 290-7.

Brent, L. (1997): *A history of Transplantation immunology* (San Diego, Academic Press).

Burkly, L. C., Lo, D., and Flavell, R. A. (1990): Tolerance in transgenic mice expressing major histocompatibility molecules extrathymically on pancreatic cells, *Science* 248, 1364-1368.

Chester, S. J., Esparze, A. R., and Albala, M. M. (1979): Graft-versus-leukemia without fatal graft-versus-host disease in AKR mice, 35, 637-639.

Childs, R., Chernoff, A., Contentin, N., Bahceci, E., Schrump, D., Leitman, S., Read, E. J., Tisdale, J., Dunbar, C., Linehan, W. M., et al. (2000): Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation, *N Engl J Med* 343, 750-758.

Cho, E. A., Riley, M. P., Sillman, A. L., and Quill, H. (1993): Altered protein tyrosine phosphorylation in anergic Th1 cells, *J Immunol* 151, 20-8.

Cooke, K. R., Hill, G. R., Gerbitz, A., Kobzik, L., Martin, T. R., Crawford, J. M., Brewer, J. P., and Ferrara, J. L. (2000a): Hyporesponsiveness of donor cells to lipopolysaccharide stimulation reduces the severity of experimental idiopathic pneumonia syndrome: potential role for a gut-lung axis of inflammation, *J Immunol* 165, 6612-9.

Cooke, K. R., Hill, G. R., Gerbitz, A., Kobzik, L., Martin, T. R., Crawford, J. M., Brewer, J. P., and Ferrara, J. L. (2000b): Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduces lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation, *Transplantation* 70, 272-9.

De Bueger, M., Bakker, A., Van Rood, J. J., Van Der Woude, F., and Goulmy, E. (1992): Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens, *J Immunol* 149, 1788-1794.

den Haan, J. M. M., Sherman, N. E., Blokland, E., Huczko, E., Koning, F., Drijfhout, J. W., Skipper, J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Engelhard, V., and Goulmy, E. (1995): Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen, *Science* 268, 1476-1480.

Dickinson, A. M., Wang, X. N., Sviland, L., Vyth-Dreese, F. A., Jackson, G. H., Schumacher, T. N., Haanen, J. B., Mutis, T., and Goulmy, E. (2002): In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens, *Nat Med* 8, 410-4.

Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001): Ex Vivo Isolation and Characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Cells with Regulatory Properties from Human Blood, *J Exp Med* 193, 1303-1310.

Eibl, B., Schwaighofer, H., Nachbaur, D., Marth, C., Gachter, A., Knapp, R., Bock, G., Gassner, C., Schiller, L., Petersen, F., and Niederwieser, D. (1996): Evidence for a graft-versus-tumor effect in a patient treated with marrow ablative chemotherapy and allogeneic bone marrow transplantation for breast cancer, *Blood* 88, 1501-1508.

Fandrich, F., Lin, X., Chai, G. X., Schulze, M., Ganten, D., Bader, M., Holle, J., Huang, D. S., Parwaresch, R., Zavazava, N., and Binas, B. (2002): Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning, *Nat Med* 8, 171-8.

Fields, P. E., Gajewski, T. F., and Fitch, F. W. (1996): Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells, *Science* 271, 1276-8.

Fontaine, P., Roy-Proulx, G., Knafo, L., Baron, C., Roy, D. C., and Perreault, C. (2001): Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease, *Nat Med* 7, 789-94.

Fowler, D. H., Kurasawa, K., Smith, R., Eckhaus, M. A., and Gress, R. E. (1994): Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice, *Blood* 84, 3540-3549.

Fuchimoto, Y., Huang, C. A., Yamada, K., Shimizu, A., Kitamura, H., Colvin, R. B., Ferrara, V., Murphy, M. C., Sykes, M., White-Scharf, M., et al. (2000): Mixed chimerism and tolerance without whole body irradiation in a large animal model, *J Clin Invest* 105, 1779-89.

Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A. C., Pluckthun, A., Elliott, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. (1998): Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes, *J Exp Med* 187, 1383-93.

Ganss, R., Ryschich, E., Klar, E., Arnold, B., and Hammerling, G. J. (2002): Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication, *Cancer Res* 62, 1462-70.

Georges, G. E., Storb, R., Thompson, J. D., Yu, C., Gooley, T., Bruno, B., and Nash, R. A. (2000): Adoptive immunotherapy in canine mixed chimeras after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation, *Blood* 95, 3262-9.

Giralt, S., Estey, E., Albitar, M., Van Besien, K., Rondon, G., Anderlini, P., O'Brien, S., Khouri, I., Gajewski, J., Mehra, R., et al. (1997): Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: Harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy., *Blood* 89, 4531-6.

Goldman, J. M., Gale, R. P., Horowitz, M. M., Biggs, J. C., Champlin, R. E., Gluckman, E., Hoffman, R. G., Jacobsen, S. J., Marmont, A. M., McGlace, P. B., et al. (1988): Bone

marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: Increased risk of relapse associated with T-cell depletion, *Ann. Intern. Med.* 108, 806-14.

Goulmy, E., Schipper, R., Pool, J., Blokland, E., Falkenburg, J. H., Vossen, J., Grathwohl, A., Vogelsang, G. B., van Houwelingen, H. C., and van Rood, J. J. (1996): Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation, *N Engl J Med* 334, 281-5.

Gur, H., Krauthgamer, R., Berrebi, A., Klein, T., Nagler, A., Tabilio, A., Martelli, M. F., and Reisner, Y. (2002): Tolerance induction by megadose hematopoietic progenitor cells: expansion of veto cells by short-term culture of purified human CD34(+) cells, *Blood* 99, 4174-4181.

Herve, P., Flesch, M., Tiberghien, P., Wijdenes, J., Racadot, E., Bordignon, P., Plouvier, E., Stephan, J. L., Bordeau, H., Holler, E., et al. (1992): Phase I-II trial of a monoclonal anti-tumor necrosis factor  $\beta$  antibody for the treatment of refractory severe acute graft-versus-host disease, *Blood* 79, 3362-3368.

Hill, G. R., and Ferrara, J. L. (2000): The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation, *Blood* 95, 2754-9.

Hill, G. R., Teshima, T., Gerbitz, A., Pan, L., Cooke, K. R., Brinson, Y. S., Crawford, J. M., and Ferrara, J. L. (1999): Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia, *J Clin Invest* 104, 459-467.

Hill, G. R., Teshima, T., Rebel, V. I., Krijanovski, O. I., Cooke, K. R., Brinson, Y. S., and Ferrara, J. L. (2000): The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity, *J Immunol* 164, 656-63.

Holler, E., Kolb, H. J., Moller, A., Kempeni, J., Liesenfeld, S., Pechumer, H., Lehmacher, W., Ruckdeschel, G., Gleixner, B., Riedner, C., et al. (1990): Increased serum levels of tumor necrosis factor precede major complications of bone marrow transplantation, *Blood* 75, 1011-1016.

Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., Kolb, H.-J., Rimm, A. A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., et al. (1990): Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation, *Blood* 75, 555-562.

Ildstad, S. T., and Sachs, D. H. (1984): Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts, *Nature* 307(5947), 168-170.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999): Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance, *J Immunol* 162, 5317-26.

Itoh, S., Matsuzaki, Y., Kimura, T., Unno, R., Ikegami, T., Shoda, J., Doy, M., Fujiwara, M., and Tanaka, N. (2000): Suppression of hepatic lesions in a murine graft-versus-host reaction by antibodies against adhesion molecules, *J Hepatol* 32, 587-95.

Johnson, B. D., Becker, E. E., LaBelle, J. L., and Truitt, R. L. (1999a): Role of immunoregulatory donor T cells in suppression of graft-versus-host disease following donor leukocyte infusion therapy, *J Immunol* 163, 6479-87.

Johnson, B. D., Becker, E. E., and Truitt, R. L. (1999b): Graft-vs.-host and graft-vs.-leukemia reactions after delayed infusions of donor T-subsets, *Biol Blood Marrow Transplant* 5, 123-32.

Johnson, B. D., Drobyski, W. R., and Truitt, R. L. (1993): Delayed infusion of normal donor cells after MHC-matched bone marrow transplantation provides an antileukemia reaction without graft-versus-host disease, *Bone Marrow Transplantation* 11, 329-336.

Johnson, B. D., and Truitt, R. L. (1995): Delayed infusion of immunocompetent donor cells after bone marrow transplantation breaks graft-host tolerance and allows for persistent antileukemic reactivity without severe graft versus host disease, *Blood* 85, 3302-12.

Kang, S. M., Beverly, B., Tran, A. C., Brorson, K., Schwartz, R. H., and Lenardo, M. J. (1992): Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy, *Science* 257, 1134-8.

Kappler, J. W., Roehm, N., and Murrack, P. (1987): T cell tolerance by clonal elimination in the thymus, *Cell* 49, 273-280.

Kappler, J. W., Staerz, U. D., White, J., and Murrack, P. (1988): Self tolerance eliminates T cells specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex, *Nature* 332, 35-40.

Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., Sacher, T., Arnold, B., and Hammerling, G. J. (2001): NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides, *J Immunol* 167, 5247-53.

Keever-Taylor, C. A., Bredeson, C., Loberiza, F. R., Casper, J. T., Lawton, C., Rizzo, D., Burns, W. H., Margolis, D. A., Vesole, D. H., Horowitz, M., et al. (2001): Analysis of risk factors for the development of GVHD after T cell- depleted allogeneic BMT: effect of HLA disparity, ABO incompatibility, and method of T-cell depletion, *Biol Blood Marrow Transplant* 7, 620-30.

Kernan, N. A., Bordignon, C., Heller, G., Cunningham, I., Castro-Malaspina, H., Shank, B., Flomenberg, N., Burns, J., Yang, S. Y., Black, P., et al. (1989): Graft failure after T-cell-depleted human leukocyte antigen identical marrow transplants for leukemia: I. Analysis of risk factors and results of secondary transplants, *Blood* 74, 2227-2236.

Kernan, N. A., Flomenberg, N., Dupont, B., and O'Reilly, R. J. (1987): Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia, *Transplantation* 43, 842-847.

Khan, A., Tomita, Y., and Sykes, M. (1996): Thymic dependence of loss of tolerance in mixed allogeneic bone marrow chimeras after depletion of donor antigen, *Transplantation* 62, 380-387.

Klanginsirikul, P., Carter, G. I., Byrne, J. L., Hale, G., and Russell, N. H. (2002): Campath-1G causes rapid depletion of circulating host dendritic cells (DCs) before allogeneic transplantation but does not delay donor DC reconstitution, *Blood* 99, 2586-91.

Kolb, H.-J., Schattenberg, A., Goldman, J. M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D., et al. (1995): Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients, *Blood* 86, 2041-2050.

Kolb, H. J., Gunther, W., Schumm, M., Holler, E., Wilmanns, W., and Thierfelder, S. (1997): Adoptive immunotherapy in canine chimeras, *Transplantation* 63, 430-436.

Kolb, H. J., Mittrmuller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M., and Wilmanns, W. (1990): Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients, *Blood* 76, 2462-2465.

Krenger, W., Cook, K. R., Crawford, J. M., Sonis, S. T., Simmons, R., Pan, L., Delmonte, J., Karandikar, M., and Ferrara, J. L. M. (1996): Transplantation of polarized type 2 donor T cells reduces mortality caused by experimental graft-vs-host disease, *Transplantation* 62, 1278-1285.

Krenger, W., Snyder, K., Smith, S., and Ferrara, J. L. M. (1994): Effects of exogenous interleukin-10 in a murine model of graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens, *Transplantation* 58, 1251-1257.

Krenger, W., Snyder, K. M., Byon, J. C. H., Falzarano, G., and Ferrara, J. L. M. (1995): Polarized type 2 alloreactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease, *Journal of Immunology* 155, 585-593.

Krijanovski, O. I., Hill, G. R., Cooke, K. R., Teshima, T., Crawford, J. M., Brinson, Y. S., and Ferrara, J. L. (1999): Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease, *Blood* 94, 825-831.

Larsen, C. P., Elwood, E. T., Alexander, D. Z., Ritchie, S. C., Hendrix, R., Tucker-Burden, C., Rae Cho, H., Aruffo, A., Hollenbaugh, D., Linsley, P. S., et al. (1996): Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways, 381, 434-438.

Lenschow, D. J., Zeng, Y., Thistlethwaite, J. R., Montag, A., Brady, W., Gibson, M. G., Linsley, P. S., and Bluestone, J. A. (1992): Long-term survival of xenogeneic pancreatic islets induced by CTLA4Ig, *Science* 257, 789-92.

Lokhorst, H. M., Schattenberg, A., Cornelissen, J. J., Thomas, L. L. M., and Verdonck, L. F. (1997): Donor leukocyte infusions are effective in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation, *Blood* 90, 4206-4211.

Madrenas, J., Wange, R. L., Wang, J. L., Isakov, N., Samelson, L. E., and Germain, R. N. (1995): Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists, *Science* 267, 515-8.

Manilay, J. O., Pearson, D. A., Sergio, J. J., Swenson, K. G., and Sykes, M. (1998): Intrathymic deletion of alloreactive T cells in mixed bone marrow chimeras prepared with a non-myeloablative conditioning regimen, *Transplantation* 66, 96-102.

Mapara, M. Y., Pelot, M., Zhao, G., Swenson, K., Pearson, D., and Sykes, M. (2001): Induction of stable long-term mixed hematopoietic chimerism following a cyclophosphamide-based non-myeloablative conditioning regimen leads to donor-specific in vitro and in vivo tolerance, *Biol Blood Marrow Transplant* 7, 646-655.

Marrack, P., and Kappler, J. (1990): The staphylococcal enterotoxins and their relatives, *Science* 248, 705-711.

Martin, P. J., Hansen, J. A., Buckner, C. D., Sanders, J. E., Deeg, H. J., Stewart, P., Appelbaum, F. R., Clift, R., Fefer, A., Witherspoon, R. P., et al. (1985): Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts, *Blood* 66, 664-672.

Martin, P. J., Hansen, J. A., Torok-Storb, B., Durnam, D., Przepiorka, D., O'Quigley, J., Sanders, J., Sullivan, K. M., Witherspoon, R. P., Deeg, H. J., et al. (1988): Graft failure in patients receiving T cell-depleted HLA-identical allogeneic marrow transplants, *Bone Marrow Transplantation* 3, 445-456.

Martin, P. J., and Kernan, N. (1990): T cell depletion for GVHD prevention in humans. In *Graft Versus Host Disease: Research and Clinical Management*, S. Burakoff, H. J. Deeg, J. Ferrara, and K. Atkinson, eds. (New York, Marcel Dekker, Inc), pp. 371-387.

Mathe, G., Amiel, J., Schwarzenberg, L., Catton, A., and Schneider, A. (1965): Adoptive immunotherapy of acute leukemias: experimental and clinical results, *Cancer Res* 25, 1525-1531.

McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, Chauncey TR, Gooley TA, Hegenbart U, Nash RA, et al. (2001): Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects., *Blood* 97, 3390-400.

Molldrem, J. J., Lee, P. P., Wang, C., Felio, K., Kantarjian, H. M., Champlin, R. E., and Davis, M. M. (2000): Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia, *Nat Med* 6, 1018-23.

Mondino, A., Whaley, C. D., DeSilva, D. R., Li, W., Jenkins, M. K., and Mueller, D. L. (1996): Defective transcription of the IL-2 gene is associated with impaired expression of c-Fos, FosB, and JunB in anergic T helper 1 cells, *J Immunol* 157, 2048-57.

Morahan, G., Allison, J., and Miller, J. F. A. P. (1989): Tolerance of class I histocompatibility antigens expressed extrathymically, 339, 622-624.

Morahan, G., Hoffman, M. W., and Miller, J. F. A. P. (1991): A nondeletional mechanism of peripheral tolerance in T-cell receptor transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11421-11425.

Moskophidis, D., Laine, E., and Zinkernagel, R. M. (1993): Peripheral clonal deletion of antiviral memory CD8+ T cells, *Eur J Immunol* 23, 3306-11.

Mutis, T., Gillespie, G., Schrama, E., Falkenburg, J. H., Moss, P., and Goulmy, E. (1999): Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate

minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease, *Nat Med* 5, 839-42.

Nikolic, B., Lee, S., Bronson, R. T., Grusby, M. J., and Sykes, M. (2000): Th1 and Th2 cells both contribute to acute GVHD, and each subset has distinct end-organ targets, *J Clin Invest* 105, 1289-1293.

Nossal, G. J. V. (1994): Negative selection of lymphocytes, *Cell* 76, 229-239.

O'Reilly, R. J., Brochstein, J., Collins, N., Keever, C., Kapoor, N., Kirkpatrick, D., Kernan, N., Dupont, B., Burns, J., and Reisner, Y. (1986): Evaluation of HLA-haplotype disparate parental marrow grafts depleted of T lymphocytes by differential agglutination with a soybean lectin and E-rosette depletion for the treatment of severe combined immunodeficiency, *Vox Sang* 51, 81-6.

Okamoto, I., Kohno, K., Tanimoto, T., Iwaki, K., Ishihara, T., Akamatsu, S., Ikegami, H., and Kurimoto, M. (2000): IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice, *J Immunol* 164, 6067-74.

Orsini, E., Alyea, E. P., Chillemi, A., Schlossman, R., McLaughlin, S., Canning, C., Soiffer, R. J., Anderson, K. C., and Ritz, J. (2000): Conversion to full donor chimerism following donor lymphocyte infusion is associated with disease response in patients with multiple myeloma, *Biol Blood Marrow Transplant* 6, 375-386.

Owen, R. D. (1945): Immunogenetics consequences of vascular anastomoses between bovine twins, *Science*, 400-401.

Panoskaltis-Mortari, A., Taylor, P. A., Rubin, J. S., Uren, A., Welniak, L. A., Murphy, W. J., Farrell, C. L., Lacey, D. L., and Blazar, B. R. (2000): Keratinocyte growth factor facilitates alloengraftment and ameliorates graft-versus-host disease in mice by a mechanism independent of repair of conditioning-induced tissue injury, *Blood* 96, 4350-6.

Pelot, M. R., Pearson, D. A., Swenson, K., Zhao, G., Sachs, J., Yang, Y. G., and Sykes, M. (1999): Lymphohematopoietic graft-vs-host reactions can be induced without graft-vs-host disease in murine mixed chimeras established with a cyclophosphamide-based non-myeloablative conditioning regimen, *BiolBlood Marrow Transplant* 5, 133-143.

Pham, S. M., Rao, A. S., Zeevi, A., Kormos, R. L., McCurry, K. R., Hattler, B. G., Fung, J. J., Starzl, T. E., and Griffith, B. P. (2000a): A clinical trial combining donor bone marrow infusion and heart transplantation: intermediate-term results, *J Thorac Cardiovasc Surg* 119, 673-81.

Pham, S. M., Rao, A. S., Zeevi, A., McCurry, K. R., Keenan, R. J., Vega, J. D., Kormos, R. L., Hattler, B. G., Fung, J. J., Starzl, T. E., and Griffith, B. P. (2000b): Effects of donor bone marrow infusion in clinical lung transplantation, *Ann Thorac Surg* 69, 345-50.

Porter, D. L., Connors, J. M., Van Deerlin, V. M. D., Duffy, K. M., McGarigle, C., Saidman, S. L., Leonard, D. G. B., and Antin, J. H. (1999): Graft-versus-tumor induction with donor leukocyte infusions as primary therapy for patients with malignancies, *J Clin Oncol* 17, 1234-1243.

Prentice, H. G., Janossy, L., Price-Jones, L., Trejdosiewicz, L. K., Panjwani, S., Graphakos, S., Ivory, K., Blacklock, H. A., Gilmore, M. J. M. L., Tidman, N., et al. (1984): Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients, *Lancet*, 472-475.

Qin, S., Cobbold, S. P., Pope, H., Elliott, J., Kioussis, D., Davies, J., and Waldmann, H. (1993): "Infectious" transplantation tolerance, *Science - Sci* 259, 974-977.

Qureshi, S. T., Gros, P., and Malo, D. (1999): Host resistance to infection: genetic control of lipopolysaccharide responsiveness by TOLL-like receptor genes, *Trends Genet* 15, 291-4.

Rachamim, N., Gan, J., Segall, H., Krauthgamer, R., Marcus, H., Berrebi, A., Martelli, M., and Reisner, Y. (1998): Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants: donor-type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture, *Transplantation* 65, 1386-93.

Ramsdell, F., Lantz, T., and Fowlkes, B. J. (1989): A nondeletional mechanism of thymic self tolerance, *Science* 246, 1038-1041.

Reddy, P., Teshima, T., Kukuruga, M., Ordemann, R., Liu, C., Lowler, K., and Ferrara, J. L. (2001): Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis, *J Exp Med* 194, 1433-40.

Reisner, Y., Kapoor, N., Kirkpatrick, D., Pollack, M. S., Cunningham-Rundles, S., Dupont, B., Hodes, M. Z., Good, R. A., and O'Reilly, R. J. (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, 341-8.

Rolink, A. G., Pals, S. T., and Gleichmann, E. (1983): Allosuppressor and allohelper T cells in acute and chronic graft-vs.- host disease. II. F1 recipients carrying mutations at H-2K and/or I-A, *J Exp Med* 157, 755-71.

Rosengard, B. R., Ojikutu, C. A., Guzzetta, P. C., Smith, C. V., Sundt, T. M., 3rd, Nakajima, K., Boorstein, S. M., Hill, G. S., Fishbein, J. M., and Sachs, D. H. (1992): Induction of specific tolerance to class I-disparate renal allografts in miniature swine with cyclosporine, *Transplantation* 54, 490-7.

Rossetti, F., Zulian, F., Dall'Amico, R., Messina, C., Montini, G., and Zacchello, F. (1995): Extracorporeal photochemotherapy as single therapy for extensive, cutaneous, chronic graft-versus-host disease, *Transplantation* 59, 149-151.

Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., and Velardi, A. (1999): Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation, *Blood* 94, 333-9.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., et al. (2002): Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants, *Science* 295, 2097-100.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25): Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases, *J Immunol* 155, 1151-1164.

Salaun, J., Bandeira, A., Khazaal, I., Calman, F., Coltey, M., Coutinho, A., and Le Douarin, N. M. (1990): Thymic epithelium tolerizes for histocompatibility antigens, *Science* 247, 1471-1474.

Schwartz, E., Lapidot, T., Gozes, D., Singer, T. S., and Reisner, Y. (1987): Abrogation of bone marrow allograft resistance in mice by increased total body irradiation correlates with eradication of host clonable T cells and alloreactive cytotoxic precursors, *J Immunol* 138, 460-465.

Schwartz, R. H. (1999): Immunological Tolerance. In *Fundamental Immunology*, W. Paul, ed. (Philadelphia, New York, Lippincott), pp. 701 - 739.

Serody, J. S., Burkett, S. E., Panoskaltsis-Mortari, A., Ng-Cashin, J., McMahon, E., Matsushima, G. K., Lira, S. A., Cook, D. N., and Blazar, B. R. (2000): T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  is critical to the recruitment of CD8(+) T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease, *Blood* 96, 2973-80.

Serody, J. S., Cook, D. N., Kirby, S. L., Reap, E., Shea, T. C., and Frelinger, J. A. (1999): Murine T lymphocytes incapable of producing macrophage inhibitory protein-1 are

impaired in causing graft-versus-host disease across a class I but not class II major histocompatibility complex barrier, *Blood* 93, 43-50.

Sharabi, Y., Aksentijevich, I., Sundt III, T. M., Sachs, D. H., and Sykes, M. (1990): Specific tolerance induction across a xenogeneic barrier: production of mixed rat/mouse lymphohematopoietic chimeras using a nonlethal preparative regimen, *Journal of Experimental Medicine* 172, 195-202.

Sharabi, Y., and Sachs, D. H. (1989): Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a non-lethal preparative regimen, *J Exp Med* 169, 493-502.

Shen, N., Ffrench, P., Guyotat, D., Ffrench, M., Fiere, D., Bryon, P. A., and Dechavanne, M. (1994): Expression of adhesion molecules in endothelial cells during allogeneic bone marrow transplantation, *Eur J Haematol* 52, 296-301.

Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomchik, M. J., and Emerson, S. G. (1999): Prevention of Graft Versus Host Disease by Inactivation of Host Antigen-Presenting Cells, *Science* 285, 412-415.

Slavin, S., Fuks, Z., Kaplan, H. S., and Strober, S. (1978): Transplantation of allogeneic bone marrow without graft-versus-host disease using total lymphoid irradiation, *Journal of Experimental Medicine* 147, 963-972.

Slavin, S., Nagler, A., Naparstek, E., Kapelushnik, J., Aker, M., Cividalli, G., Varadi, G., Kirschbaum, M., Ackerstein, A., Samuel, S., et al. (1998): Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematological diseases, *Blood* 91, 756-763.

Spitzer, T. R., Delmonico, F., Tolkoff-Rubin, N., McAfee, S., Sackstein, R., Saidman, S., Colby, C., Sykes, M., Sachs, D. H., and Cosimi, A. B. (1999): Combined histocompatible leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism, *Transplantation* 68, 480-484.

Spitzer, T. R., McAfee, S., Sackstein, R., Colby, C., Toh, H. C., Multani, P., Saidman, S., Weyouth, D. W., Preffer, F., Poliquin, C., et al. (2000): Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for refractory hematologic malignancies, *Biol Blood Marrow Transplant* 6, 309-320.

Sprent, J., Lo, D., Gao, E.-K., and Ron, Y. (1988): T cell selection in the thymus, *Immunol Rev* 101, 174-190.

Starzl, T. E., Demetris, A. J., Murase, N., Trucco, M., Thomson, A. W., and Rao, A. S. (1996): The lost chord: microchimerism and allograft survival, *Immunology Today* 17, 577-584.

Storb, R., Yu, C., Wagner, J. L., Deeg, H. J., Nash, R. A., Leisenring, W., and Shulman, H. (1997): Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation, *Blood* 89, 3048-3054.

Surh, C. D., and Sprent, J. (1994): T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus, *Nature* 372, 100-3.

Sykes, M., Abraham, V. S., Harty, M. W., and Pearson, D. A. (1992): Selective inhibition of CD4 graft-vs-host activity in IL-2-treated mice, 25, 1225-1226.

Sykes, M., Bukhari, Z., and Sachs, D. H. (1989): Graft-versus-leukemia effect using mixed allogeneic bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplantation* 4, 465-474.

Sykes, M., Preffer, F., McAfee, S., Saidman, S. L., Weymouth, D., Andrews, D., Colby, C., Sackstein, R., Sachs, D. H., and Spitzer, T. R. (1999): Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-vs-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone marrow transplantation, *Lancet* 353, 1755-1759.

Sykes, M., Sheard, M. A., and Sachs, D. H. (1988): Graft-versus-host-related immunosuppression is induced in mixed chimeras by alloresponses against either host or donor lymphohematopoietic cells, *J Exp Med* 168, 2391-2396.

Sykes, M., Szot, G. L., Nguyen, P. L., and Pearson, D. A. (1995): Interleukin-12 inhibits murine graft-vs-host disease, *Blood* 86, 2429-2438.

Taylor, P. A., Lees, C. J., Blazar, B. R., Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., et al. (2002): The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality, *Blood* 99, 3493-9.

Taylor, P. A., Noelle, R. J., and Blazar, B. R. (2001): CD4(+)CD25(+) Immune Regulatory Cells Are Required for Induction of Tolerance to Alloantigen via Costimulatory Blockade, *J Exp Med* 193, 1311-8.

Teshima, T., Hill, G. R., Pan, L., Brinson, Y. S., van den Brink, M. R., Cooke, K. R., and Ferrara, J. L. (1999): IL-11 separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease after bone marrow transplantation, *J Clin Invest* 104, 317-325.

Teshima, T., Mach, N., Hill, G. R., Pan, L., Gillessen, S., Dranoff, G., and Ferrara, J. L. (2001): Tumor cell vaccine elicits potent antitumor immunity after allogeneic T- cell-depleted bone marrow transplantation, *Cancer Res* 61, 162-71.

Thomas, E. D., Lochte, H. L., Lu, W. C., and Ferrebee, J. W. (1957): Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy, *N Engl J Med* 257, 491-496.

Tomita, Y., Khan, A., and Sykes, M. (1994): Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a non-myeloablative regimen, *J Immunol* 153, 1087-1098.

Unkeless, J. C. (1979): Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors, *J Exp Med* 150, 580-596.

Vallera, D. A., Soderling, C., Carson, G., and Kersey, J. (1981): Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice: the effect of elimination of T cells from donor grafts by treatment with monoclonal Thy1.2 plus complement or antibody alone, *Transplantation* 31, 218.

Vallera, D. A., Soderling, C. C. B., Carlson, G. J., and Kersey, J. H. (1982): Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice. II. T cell requirement for engraftment in total lymphoid irradiation-conditioned recipients, *Transplantation* 33, 243-248.

van Bekkum, D. W., Roodenburg, J., Heidt, P. J., and van der Waaij, D. (1974): Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora, *J Natl Cancer Inst* 52, 401-4.

Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D., and Storb, R. (1979): Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic marrow grafts, *N Engl J Med* 300, 1068-1073.

Weiden, P. L., Sullivan, K. M., Flournoy, N., Storb, R., and Thomas, E. D. (1981): Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease, *N Engl J Med* 304, 1529-1533.

Wekerle, T., Kurtz, J., Ito, H., Ronquillo, J. V., Dong, V., Zhao, G., Shaffer, J., Sayegh, M., and Sykes, M. (2000): Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory

blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment., *Nature Medicine* 6, 464-469.

Wekerle, T., Sayegh, M. H., Hill, J., Zhao, Y., Chandraker, A., Swenson, K. G., Zhao, G., and Sykes, M. (1998): Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance, *J Exp Med* 187, 2037-2044.

Wood, K. J., and Sachs, D. H. (1996): Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect, *Immunology Today* 15, 584-588.

Yamada, K., Gianello, P. R., Ierino, F. L., Lorf, T., Shimizu, A., Meehan, S., Colvin, R. B., and Sachs, D. H. (1997): Role of the thymus in transplantation tolerance in miniature swine. I. Requirement of the thymus for rapid and stable induction of tolerance to class I-mismatched renal allografts, *J Exp Med* 186, 497-506.

Yang, Y. G., Dey, B., Sergio, J. J., Pearson, D. A., and Sykes, M. (1998): Donor-derived interferon-g is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12, *J Clin Invest* 102, 2126-2135.

Yu, X.-Z., Bidwell, S., Martin, P. J., and Anasetti, C. (1999): Visualization, fate, and pathogenicity of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the graft-versus-host reaction, *J Immunol* 163, 4780-4787.

Zorn, E., Orsini, E., Wu, C. J., Stein, B., Chillemi, A., Canning, C., Alyea, E. P., Soiffer, R. J., and Ritz, J. (2001): A CD4<sup>+</sup> T cell clone selected from a CML patient after donor lymphocyte infusion recognizes BCR-ABL breakpoint peptides but not tumor cells, *Transplantation* 71, 1131-7.

## Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem wissenschaftlichen Mentor und Lehrer Herrn Prof. Dr. Dörken. Die Promotion in seinem Labor an der Universität Heidelberg hat mein Interesse und meine Freude am Fach Hämatologie/Onkologie, sowie an wissenschaftlicher Arbeit geweckt. Seit dieser Zeit förderte mich Herr Prof. Dörken stetig und gab mir auch den nötigen Freiraum, um meinen wissenschaftlichen und klinischen Interessen nachgehen zu können. Durch seine analytische und kritische Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen, prägte er ganz entscheidend meine wissenschaftliche und klinische Entwicklung.

Die dargestellten Daten sind ein Teil der während meines zweijährigen Forschungsaufenthaltes im Labor von Frau Prof. Megan Sykes am Transplantation Biology Research Center des Massachusetts General Hospital in Boston erarbeiteten Forschungsergebnisse. Megan Sykes danke ich für die exzellente Betreuung, ihren Enthusiasmus, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die sehr angenehme Atmosphäre in ihrem Labor. Ebenso danke ich Frau Dr. Yong-Mi Kim und den anderen Kollegen des TBRC für die gute Kooperation. Mein Dank gilt ebenso meiner technischen Assistentin Frau Sheng-Ping Wang.

Herrn PD Dr. Bargou, Dr. Kurt Bommert und Dr. Peter Daniel danke ich für die anregenden Diskussionen, die Freundschaft und gute Zusammenarbeit während der Pionierjahre auf dem Campus Buch.

Frau Dr. rer. nat. habil. Ida Körner bin ich zu großem Dank verpflichtet für die freundschaftliche, langjährige gute und sehr erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen des Stammzelltransplantationslabors an der Robert-Rössle-Klinik (Charité Campus Buch).

Ich danke meiner Frau Dr. Suzanne Lentzsch sowie Frau Dr. Corinna Leng für die kritische Durchsicht und das Korrekturlesen des Manuskriptes

# EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

.....  
Datum

.....  
Unterschrift