

***In vivo*-Effekte proliferationsbasierter T-Zellselektion bei allogener Knochenmarktransplantation in murinen Systemen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Annette Pachnio

Kiel 2005

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Knochenmark-/Stammzelltransplantation	1
1.1.1. Historische Entwicklung	1
1.1.2. Formen der Transplantation	2
1.1.3. Konditionierung der Empfänger	2
1.1.4. Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen	3
1.2. Donor-Lymphozyten-Infusion	3
1.3. Graft-versus-Leukämie Effekt	5
1.4. <i>Graft-versus-Host Disease</i>	6
1.4.1. Akute GvHD	7
1.4.1.1. Pathophysiologie der akuten GvHD	7
1.4.1.2. Risikofaktoren und Behandlung	9
1.4.2. Chronische GvHD	9
1.4.2.1. Pathogenese der chronischen GvHD	10
1.4.2.2. Risikofaktoren und Behandlung	10
1.5. Strategien zur Vermeidung von GvHD/ Transplantat Modifikationen	11
1.6. Zielstellung der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Material	16
2.1.1. Zellen und Zelllinien	16
2.1.2. Chemikalien und Substanzgemische	17
2.1.3. Radioaktive Substanzen	19
2.1.4. Verbrauchsmaterialien	19
2.1.5. Geräte	20
2.2. Methoden	21
2.2.1. Zellkultivierung	21
2.2.2. Mäuse	22
2.2.3. Tierexperimentelle Methoden	22
2.2.3.1. Immunisierung	22
2.2.3.2. Tumorinduktion	23
2.2.3.3. Knochenmarktransplantation	23

	Seite
2.2.3.4. Venöse Blutentnahme	24
2.2.4. Isolierung von Leukozyten aus Blut, Milz und Knochenmark	24
2.2.5. Zellzählung	25
2.2.6. Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)	25
2.2.7. Mitomycin C-Behandlung	26
2.2.8. Markierung von Lymphozyten mit Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester (CFSE)	26
2.2.9. Sortieren der CFSE-markierten Zellen	27
2.2.10. Aufreinigung von Lymhozyten über Dichtegradienten	27
2.2.11. Restimulation und Passage sortierter Zellen	27
2.2.12. Zytotoxizitätstest	28
2.2.13. Durchflusszytometrie	28
2.2.13.1. Immunfärbung für die Durchflusszytometrie	29
2.2.13.2. Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung	30
2.2.14. Histologien	30
2.2.14.1. Einbettung der Gewebe in Paraffin	30
2.2.14.2. Deparaffinierung der Gewebe	31
2.2.14.3. Hämalaun-Eosin Färbung (HE-Färbung)	31
3. Ergebnisse	32
3.1. Kulturbedingungen für die Generierung alloreaktiver T-Zellen	32
3.2. Ermittlung einer geeigneten Interleukin (IL)-2 Konzentration zur Passagierung der gemischten Lymphozytenreaktion	34
3.3. Markierung von Lymphozyten mit Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester (CFSE)	35
3.4. Bestimmung des geeigneten Zeitpunktes für die Separation und geeignete Kriterien des Sortierens CFSE-markierter Lymphozyten	37
3.5. Zytotoxische Aktivität der sortierten Zellfraktionen	40
3.6. Charakterisierung der sortierten „high“- und „low“-Fraktionen	41
3.7. <i>In vitro</i> Restimulierbarkeit der sortierten Fraktionen	43
3.8. Etablierung der geeigneten Transplantationsbedingungen	44
3.8.1. T-Zell-Depletion	45
3.8.2. Bestrahlungsdosis	45

	Seite
3.9. Etablierung eines Tumormodells	46
3.10. Etablierung des MHC-disparaten Transplantationsmodells	47
3.11. MHC-disparates Transplantationsmodell (C3H → DBA)	51
3.11.1. Anwachsen der transferierten hämatopoetischen Zellen	51
3.11.2. Durchflusszytometrische Analyse von Milz und Knochenmark nach KMT	52
3.11.3. Histologische Ergebnisse	55
3.11.4. <i>Ex vivo</i> Restimulierbarkeit der übertragenen „high“-Fraktion	57
3.12. Zusammenfassung der Ergebnisse im MHC-disparaten Transplantationsmodell	59
3.13. Etablierung des MHC-identen Transplantationsmodells	59
3.14. Übertragung gegen DBA/2-Milz präimmunisierter Zellen	62
3.14.1. Entwicklung einer GvHD im MHC-identen Modell	62
3.14.2. Leukopenie der Rezipiententiere bei GvHD	63
3.14.3. Anwachsen der transferierten Donorzellen	65
3.14.4. Durchflusszytometrische Analyse von Milz und Knochenmark nach KMT	67
3.14.5. Anzahl T-Lymphozyten in der Milz der Rezipiententiere	69
3.14.6. Fehlen von B-Lymphozyten im Knochenmark bei GvHD	70
3.14.7. Tumorkontrolle nach allogener Transplantation	71
3.15. Übertragung gegen den Tumor immunisierter Zellen im MHC-identen Transplantationsmodell	73
3.15.1. Leukopenie in der Milz der Rezipiententiere bei GvHD	73
3.15.2. Durchflusszytometrische Analyse von Milz und Knochenmark nach KMT	75
3.15.3. Anzahl B-Lymphozyten im Knochenmark	77
3.16. Zusammenfassung der Ergebnisse im MHC-identen Transplantationsmodell	77
3.17. Etablierung eines haploidenten Transplantationsmodells	79
3.17.1. Transfer naiver Donorzellen	81
3.17.2. Transfer präimmunisierter <i>in vitro</i> stimulierter Donorzellen	82
3.18. Transfer alloreaktiver Zellen in Rag1 ^{-/-} Empfängertiere	84
3.18.1. Überlebensdauer nach dem Transfer	84
3.18.2. <i>In vivo</i> Restimulation der alloreaktiven Zellen	85

	Seite
4. Diskussion	87
4.1. Transplantatmodifikationen zur Vermeidung einer GvHD-Induktion	88
4.2. Entwicklung eines proliferationsbasierten Separationsverfahrens	89
4.3. Untersuchung der <i>in vivo</i> Effekte separierter Zellfraktionen im Kontext allogener Knochenmarktransplantation in murinen Systemen	92
4.3.1. Unterstützung des Transplantatanwachsens	92
4.3.2. Potential der separierten Zellfraktionen zur GvHD-Induktion	95
4.3.3. Tumorkontrolle nach Transplantation	97
4.4. Anwendung des Verfahrens zur Gewinnung tumorreaktiver T-Zellen	99
4.5. Ausblick	102
5. Zusammenfassung/Summary	104
5.1 Zusammenfassung	104
5.2 Summary	106
6. Literaturverzeichnis	108
7. Anhang	122
8. Danksagung	128
9. Lebenslauf	129

Abkürzungsverzeichnis

AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
Ak	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxy-fluorescein Diacetate Succinimidylester
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle/ min.)
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CTL	zytotoxische T-Zelle
CTLA	zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen
DC	dendritische Zelle
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer (<i>Fluorescence activated cell sorter</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GCV	Ganciclovir
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (<i>graft-versus-host disease</i>)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie (<i>graft-versus-leukemia</i>)
Gy	Gray (Energiedosis; 1J/kg)
HE	Hämalaun-Eosin
HLA	humane Leukozytenantigene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

i.p.	intrapreitoneal
i.v.	intravenös
IVC	individuell belüftete Käfige (<i>individually ventilated cages</i>)
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
MACS	magnetische Zellsortierung (<i>magnetic cell sorting</i>)
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion (<i>mixed lymphocyte reaction</i>)
MLTC	gemischte Lymphozyten und Tumorzellkultur (<i>mixed lymphocyte tumor culture</i>)
MMC	Mitomycin C
MΦ	Makrophage
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non essential amino acids</i>)
NK	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBSCT	periphere Blutstammzell-Transplantation
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
Rag	Rekombination aktivierendes Gen
RIC	<i>reduced intensity conditioning</i>
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium
s.c.	subcutan
SCID	<i>severe combined immuno deficiency</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tx	(Knochenmark) Transplantation
ÜS	Überstand

1. Einleitung

1.1. Knochenmark-/Stammzelltransplantation

Die allogene Knochenmarktransplantation (KMT) bzw. die allogene Transplantation peripherer Blutstammzellen (PBSCT) ist ein gut etabliertes Therapieverfahren, bei dem Stammzellen eines gesunden Spenders auf Empfänger mit Erkrankungen des hämatopoetischen Systems übertragen werden. Indikation für eine Transplantation sind akute und chronische, myeloische und lymphatische Leukämien (AML, CML, ALL, CLL) im Stadium der Remission, und maligne Lymphome. Auch für nicht-maligne Erkrankungen wie aplastische Anämie (vSAA), Immundefizienz (SCID, Wiskott-Aldrich-Syndrom) oder Hämoglobinopathien (β -Thalassämia major) stellt die KMT/PBSCT (im Folgenden unter dem Begriff KMT subsumiert) eine erfolgreiche Behandlungsoption dar.

1.1.1. Historische Entwicklung

Die Geschichte der Knochenmarktransplantation begann 1949 mit einem Versuch von Leon Jakobson et al. (Jacobson *et al.* 1949) Diese fanden heraus, dass das Abschirmen der Milz mit Blei, während einer Bestrahlung mit einer ansonsten tödlichen Dosis, das Überleben von Mäusen erlaubte. Zwei Jahre später zeigten Lorenzen et al., dass durch die Infusion von Milz- und Knochenmarkzellen ein radioprotektiver Effekt erzielt werden konnte (Lorenz *et al.* 1951). Ford et al. konnten 1956 in zytogenetischen Tests nachweisen, dass die blutbildenden Zellen letal bestrahlter und transplantierte Mäuse Charakteristiken des Spenders aufwiesen (Ford *et al.* 1956). Im gleichen Jahr wurde zum ersten Mal über die Behandlung leukämischer Mäuse mit der Infusion gesunden Knochenmarks nach Bestrahlung berichtet (Barnes *et al.* 1956). Erst in den 60er Jahren wurden aussichtsreiche Versuche zur erfolgreichen klinischen Anwendung an Hunden von E.D. Thomas durchgeführt (Thomas *et al.* 1962; Thomas *et al.* 1964). Beim Menschen wurden Knochenmarkstransplantationen zunächst bei Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen, sondern mit Dysfunktionen des hämatopoetischen Systems vorgenommen. Dazu zählen die aplastische Anämie (Thomas *et al.* 1972; Storb *et al.* 1974), die Thalassämie major (Lucarelli *et al.* 1984) sowie die Sichelzellanämie (Johnson *et al.* 1984). Ende der 70er Jahre wurden erstmals Transplantationen bei Patienten mit leukämischen Erkrankungen in Erstremission durchgeführt (Beutler *et al.* 1979; Thomas *et al.* 1979), nachdem Patienten mit malignen Erkrankungen im Endstadium nur mit mäßigem Erfolg transplantiert wurden (Thomas *et al.* 1977). Dabei kam es nachweislich zu einer Verbesserung der Langzeitüberlebensrate. Durch die Identifizierung der humanen

Histokompatibilitätsantigene (HLA), sowie die Entwicklung neuer Medikamente zur Immunsuppression, und die Verbesserung der Chemo- und Strahlentherapie, konnte die Behandlung weiter optimiert und die Heilungschancen gesteigert werden.

1.1.2. Formen der Transplantation

In Abhängigkeit von der Herkunft des Spendermaterials unterscheidet man drei Formen der Transplantation: autolog, syngen und allogene.

Bei der autologen Transplantation stammen die übertragenen Zellen vom Spender selbst. Diese Art der KMT wird bei malignen Erkrankungen nach Hochdosischemotherapie oder Bestrahlung durchgeführt. Eine Ausnahme bilden dabei hämatologisch onkologische Erkrankungen, da die Gefahr besteht, dass trotz einer Aufreinigung (*purging*) leukämische Zellen übertragen werden, die ein Rezidiv auslösen (Gulati 1993). Zudem fehlt hier der sogenannte Graft-versus-Leukämie (GvL)-Effekt (siehe 1.3), eine Reaktion immunkompetenter Zellen des Spenders gegen die malignen Zellen.

Von syngener Transplantation spricht man, wenn Spender und Empfänger genetisch identisch, d.h. Zwillinge sind. Dabei besteht kein, bzw. nur ein extrem geringes Risiko immunologischer Epiphänomene, jedoch vermitteln die übertragenen Zellen auch in dieser Konstellation keinen GvL-Effekt.

Die allogene Knochenmarktransplantation stellt ein wichtiges Therapieprinzip der akuten Leukämien mit Hochrisikokonstellationen oder im Rückfall dar. Hierbei wird Knochenmark zwischen genetisch nicht-identischen Individuen übertragen. Dies birgt zwar das Risiko einer Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (*Graft-versus-host disease*, (GvHD, siehe 1.4) vermittelt durch immunkompetente Zellen im Spenderknochenmark, gleichzeitig kann aber bei einem allogenen Transfer der GvL-Effekt beobachtet werden (Porter *et al.* 1999).

1.1.3. Konditionierung der Empfänger

Im Vorfeld der Transplantation werden die Empfänger mit einer Hochdosischemo- oder Radiochemotherapie behandelt. Diese klassische Konditionierung ist myeloablativ (Eliminierung sämtlicher hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark) und immunsuppressiv. Dies dient mehreren Zwecken zugleich: Zum einen sollen so viele der leukämischen Zellen wie möglich zerstört werden, zum anderen sollen auf diese Weise so viele T-Lymphozyten des Rezipienten wie möglich eliminiert werden, um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern. Durch diese Konditionierungstherapie kommt es bei den Patienten zu einer „funktionellen Asplenie“ (die immunologische Funktion der Milz wird

unterbunden). Deshalb muss die Behandlung unter möglichst keimarmen Bedingungen stattfinden. Zehn bis 14 Tage nach der Transplantation kommt es zur Rekonstitution von Granulozyten, die einen relativen Schutz vor bakteriellen Infektionen gewähren. Die Anfälligkeit gegenüber Virus- und Pilzinfektionen besteht jedoch über einen wesentlich längeren Zeitraum. Heute wird zunehmend eine Konditionierung mit reduzierter Intensität (RIC) angewandt. Diese ist nicht myeloablativ und ermöglicht ein Anwachsen der transplantierten Zellen daher in erster Linie durch Immunsuppression.

1.1.4. Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen

Klassischerweise werden die transplantierten Stammzellen aus dem Knochenmark gewonnen. Hierbei werden aus den Beckenkämmen der Spender unter Vollnarkose 1000-1500 ml Knochenmarkblut entnommen, aus dem die Stammzellen übertragen werden. Eine heute anerkannte Alternative bieten Stammzellen aus dem peripheren Blut. Diese sind charakterisiert durch die Expression des Oberflächenantigens CD34. Man beobachtete, dass bei Patienten, die chemotherapeutisch behandelt wurden, Stammzellen vermehrt auch im peripheren Blut zu finden waren (Juttner *et al.* 1990). Die Anzahl der Zellen konnte durch die Gabe von Wachstumsfaktoren wie GM-CSF und G-CSF noch gesteigert werden (Gianni *et al.* 1989). Heute ist es ein übliches Verfahren, den Spender im Vorfeld der Transplantation für 4-5 Tage mit den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (GM-CSF, G-CSF) zu behandeln und dann ohne operativen Eingriff die Stammzellen mittels Leukapherese aus dem peripheren Blut „abzusammeln“. Über eine Infusion werden die Stammzellen dann in den Empfänger übertragen. Eine weitere Quelle hämatopoetischer Stammzellen stellt das Nabelschnurblut dar. Die Anzahl der daraus gewonnenen Zellen ist jedoch sehr begrenzt und wird daher eher in der Pädiatrie eingesetzt.

1.2. Donor-Lymphozyten-Infusion

In Mausexperimenten konnte 1962 erstmals gezeigt werden, dass Donormilzzellen, übertragen nach einer allogenen KMT in stabile Chimäre (mit Donorzellen rekonstituierte Tiere), keine GvHD auslösen (Vos *et al.* 1962). In den 70er Jahren bestätigten weitere Studien mit Hunden und Mäusen diese Beobachtungen (Weiden *et al.* 1976; Slavin *et al.* 1978). Das Potential einer solchen Übertragung von Donorlymphozyten nach einer Transplantation als eine Form der Tumorthherapie wurde erst vor etwa 15 Jahren erkannt.

1990 konnten Kolb *et al.* bei CML Patienten mit Rezidiv erstmals eine Remission durch die Gabe von Lymphozyten des ursprünglichen Knochenmarkspenders erzielen (Kolb *et al.*

1990). Bis dahin waren wiederkehrende Erkrankungen mit der Gabe von IFN- α behandelt worden. Diese Behandlung resultierte jedoch nur bei einigen Patienten in einer Suppression des Philadelphia-Chromosoms und war nicht kurativ (Arcese *et al.* 1990; Higano *et al.* 1992). Die Alternative zur Behandlung mit IFN- α war eine erneute Transplantation mit Knochenmark. Dadurch konnte ebenfalls in einigen Fällen eine Remission erzielt werden, jedoch ist eine erneute Transplantation mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert (Mrsic *et al.* 1992; Radich *et al.* 1993). Die bei der Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) übertragenen Zellen sind im Wesentlichen T-Zellen aus dem peripheren Blut des Donors. Im Gegensatz zu den oben genannten Tierversuchen, kommt es beim Menschen jedoch nach der Übertragung solcher Infusionen nach wie vor in den meisten Fällen zu der Entwicklung einer GvHD. Das ist jedoch stark abhängig von der Anzahl der übertragenen Zellen, sowie vom Zeitpunkt der DLI nach der KMT. In den letzten Jahren hat sich die DLI als Therapieverfahren zur Behandlung von Rezidiven, insbesondere bei CML-Patienten, etabliert. Bei der Behandlung von akuten Leukämien ist die Gabe von Lymphozyten deutlich weniger erfolgreich. Die rasche Proliferation der malignen Zellen scheint den entstehenden GvL-Effekt zu überwältigen.

Neben der Gabe von unmanipulierten Lymphozyten gibt es eine Reihe von Ansätzen, antigenspezifische T-Zellen zu übertragen. Diese sollen gezielt zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden. So zum Beispiel, um Epstein-Barr-Virus assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen zu behandeln, die unmittelbar nach der Transplantation auftreten können (Papadopoulos *et al.* 1994; Rooney *et al.* 1995). *In vitro* Versuche zeigten, dass diese virusspezifischen T-Zellklone keine Aktivität gegen HLA-Moleküle des Empfängers entwickeln. Dies würde Vorteile hinsichtlich der Entwicklung einer GvHD haben. Auch die Gewinnung leukämiespezifischer CTL wird untersucht. Falkenburg *et al.* konnten in einem Fall solche spezifische Zellen generieren und *in vitro* expandieren. Durch Behandlung des Patienten mit einer Infusion dieser spezifischen T-Zellen konnte eine Remission erzielt werden jedoch nicht ohne das Auftreten einer GvHD. Das Verfahren zur Gewinnung leukämiespezifischer CTL in ausreichenden Mengen ist jedoch sehr aufwendig und zum jetzigen Zeitpunkt limitiert.

1.3. Graft-versus-Leukämie Effekt

Bereits vor 30 Jahren schlugen Barnes und Loutit vor, dass der Transfer von Knochenmark mit einem Antitumor-Effekt assoziiert ist, der nicht durch eine Chemo- oder Bestrahlungstherapie zu erklären ist (Barnes *et al.* 1956). Dieser Effekt wird oft als Graft-versus-Leukämie (GvL)-Effekt bezeichnet. Der GvL-Effekt wird, wie auch die GvHD (siehe 1.4), hauptsächlich durch T-Zellen vermittelt. Dies wird aus der Tatsache geschlossen, dass eine T-Zelldepletion zwar das Auftreten und die Schwere einer GvHD mindert, jedoch auch mit einer erhöhten Rückfallrate assoziiert ist (Apperley *et al.* 1988; Horowitz *et al.* 1990). Kolb *et al.* konnten zeigen, dass durch die Transfusion von Donorlymphozyten, insbesondere bei Patienten mit CML, aber auch bei AML-Patienten im Rezidiv, eine erneute Remission induziert werden kann (Kolb *et al.* 1990; Helg *et al.* 1993; Jiang *et al.* 1993). So konnte bei vielen CML-Patienten eine dauerhafte, molekularbiologisch nachweisbare Remission erzielt werden. Bei akuten Leukämien ist das Ansprechen auf DLI-Gaben deutlich schlechter und abhängig von der Resterkrankung zum Zeitpunkt der Infusion (Kolb *et al.* 1995; Mehta *et al.* 1997). Dies liefert einen Hinweis darauf, dass zwischen den Effektorzellen (Lymphozyten) und den Zielzellen (Leukämiezellen) ein bestimmtes Verhältnis nicht unterschritten werden sollte. Auch das schnelle Voranschreiten der akuten Erkrankungen wirkt sich negativ aus. Bei der CML zeigt sich der positive Effekt einer Lymphozyteninfusion oft erst nach einer Verzögerung. Dies reflektiert wahrscheinlich die Expansionsphase Tumor-reaktiver T-Zellklone.

Der genaue Mechanismus des GvL-Effektes ist jedoch noch nicht verstanden. Unklar ist, ob dieser Effekt durch CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen vermittelt wird (Hsieh *et al.* 2000). Auch NK Zellen spielen eine Rolle (Lowdell *et al.* 1995). Dabei können die T-Zellantworten gegen Minor-Histokompatibilitäts-Antigene (mH-Antigene) oder gegen leukämiespezifische Antigene gerichtet sein. Es wird vermutet, dass T-Zellen des Donors, die mH-Antigene des Spenders erkennen, verantwortlich sind für die Induktion einer GvHD. Es wurden aber auch mH Antigen-spezifische T-Zellen aus Patienten isoliert, die keine GvHD entwickelten. Einige dieser T-Zellen erkennen bevorzugt hämatopoetische Zellen, während andere auch Zellen unterschiedlicher Gewebe angreifen (de Bueger *et al.* 1991; de Bueger *et al.* 1992). Es konnte gezeigt werden, dass alle mH Antigen-spezifischen CD8⁺ CTL zirkulierende reife Leukämiezellen lysieren und Vorläuferzellen supprimieren können. mH Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen sind ebenfalls in der Lage, myeloische Leukämievorläuferzellen zu supprimieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mH Antigen-spezifische T-Zellen eine potente Immunantwort gegen die leukämischen Zellen aufbauen können. Die

Hauptaufgabe der CD4⁺ Zellen scheint darin zu bestehen, Leukämie-reaktive, mH Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu rekrutieren (Zorn *et al.* 2002). In einigen Fällen konnten CTL isoliert werden, die spezifisch Leukämiezellen von anderen hämatopoetischen Zellen unterscheiden, was jedoch wahrscheinlich auf der Tatsache beruht, dass einige mH-Antigene im hämatopoetischen System differentiell exprimiert werden. So eine differentielle Expression konnte für die mH-Antigene HA1 und HA2 gezeigt werden (Marijt *et al.* 2003). In vielen malignen Zellen sind chromosomale Translokationen die Ursache für die Produktion von Fusionsproteinen. Dazu gehört zum Beispiel die 9:22-Translokation (Philadelphia-Chromosom, bcr-abl-Fusionsprotein) bei der CML. Wenn Peptidsequenzen dieser neu entstandenen Proteine im Kontext von MHC-Molekülen auf der Oberfläche von Leukämiezellen präsentiert werden, könnte dies T-Zellen aktivieren, die solche Zellen dann spezifisch erkennen (Bocchia *et al.* 1996). Bis jetzt ist jedoch nicht klar, ob diese leukämiespezifischen Antigene genutzt werden können, um spezifische T-Zellantworten gegen die malignen Zellen zu induzieren.

1.4. Graft-versus-Host Disease

Das Phänomen der *Graft-versus-Host Disease* (GvHD) wurde erstmals im Mausmodell nach dem allogenen Transfer von Knochenmark beschrieben. Obwohl die Tiere sich von der Strahlenkrankheit (der „primären Krankheit“) erholten, starben sie später an der so genannten „sekundären Krankheit“ (van Bekkum *et al.* 1967). Als Ursache dafür erkannte man die Reaktion immunkompetenter Zellen des Spenders gegen das Gewebe des Empfängers. Aufgrund der Richtung dieser Immunreaktion ist diese Erkrankung heute als Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (*Graft-versus-Host Disease*) bekannt (Billingham *et al.* 1959).

Sie bildet die Hauptkomplikation nach einer Knochenmarktransplantation und tritt je nach Übereinstimmungsgrad von Spender und Empfänger in unterschiedlicher Häufigkeit und Schweregrad auf. Man unterscheidet aufgrund des zeitlichen Verlaufs zwei Formen von GvHD: Zum einen die akute Form, zum anderen die chronische Form. Vermittelt werden diese Reaktionen von T-Zellfraktionen, die im Transplantat enthalten sind. Eine weitere Voraussetzung für das Entstehen einer GvHD ist die Tatsache, dass sich Spender und Empfänger in ihren Gewebemerkmale, den so genannten Major-Histokompatibilitäts-Antigenen (MHC, beim Menschen HLA (humane Leukozytenantigene) genannt) unterscheiden, wobei schon Unterschiede in Minor-Antigenen (im MHC präsentierte körpereigene (*self-origin*) Peptide) ausreichen können, um eine GvHD zu induzieren. Hinzu

kommt die Tatsache, dass der Spender nach den Konditionierungsmaßnahmen für eine Knochenmarktransplantation durch Chemo- und Bestrahlungstherapie nicht über ein ausreichendes Immunsystem verfügt, um eine effektive Antwort gegen die transplantierten Zellen aufzubauen. Diese Voraussetzungen wurden 1966 von Billingham formuliert (Billingham 1966) und sind bis heute gültig.

1.4.1. Akute GvHD

Die akute Form der GvHD beginnt üblicherweise zwei bis fünf Wochen nach der Transplantation, bei HLA-unterschiedlichen Transplantaten und ohne vorherige Prophylaxe auch schon innerhalb weniger Tage. Die Häufigkeit und die Schwere der Erkrankung hängen von verschiedenen Faktoren ab. Dabei spielen die Unterschiede der Gewebemerkmale von Spender und Empfänger ebenso eine Rolle wie die Anzahl von T-Lymphozyten im Transplantat und die Art der Prophylaxe-Behandlung. So kann sich bei 10%- 80% der Patienten eine GvHD entwickeln. Man unterscheidet verschiedene Schweregrade von I-IV, entsprechend der auftretenden Organdysfunktionen. Die Grade I und II sind assoziiert mit einer niedrigen Morbidität, sind jedoch ein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen GvHD im weiteren Verlauf. Für die Grade III und IV ergibt sich eine deutlich schlechtere Prognose. Die Mortalität im Falle einer GvHD vom Grad IV liegt bei nahezu 100%. Betroffene Zielorgane der akuten GvHD sind hauptsächlich das Immunsystem, Haut, Leber und der Gastrointestinaltrakt. Andere Gewebe können jedoch ebenso betroffen sein (Atkinson 2000).

1.4.1.1. Pathophysiologie der akuten GvHD

An der Entstehung der akuten GvHD sind verschiedene Pathomechanismen beteiligt. Eine Rolle spielen dabei unterschiedliche Zellpopulationen, Zytokine, Spender- und Empfängerkomponenten (Ferrara *et al.* 1996). Man unterscheidet drei Phasen des Verlaufs (siehe Abb.1): Bereits bei der Konditionierung des Empfängers kommt es zu einer Schädigung des Gewebes, in erster Linie von mitotisch aktiven Zellverbänden in der Haut, den Schleimhäuten des Gastrointestinal- und Respirationstraktes und der Leber (Eissner *et al.* 1995; Holler *et al.* 1995). Dies führt zur Freisetzung insbesondere von proinflammatorischen Faktoren wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-1 (IL-1) und IL-6, welche die Funktion von T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APC) beeinflussen. In der so genannten afferenten Phase kommt es zur Aktivierung von Donor T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen (M Φ) und dendritische Zellen

(DC), welche Antigen in Form von MHC-, bzw. HLA-Peptid Komplexen präsentieren (Sette *et al.* 1995). Dabei spielen Interaktionen kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 auf APCs und CD28 (auf T-Zellen) eine bedeutende Rolle (June *et al.* 1994; Schultze *et al.* 1996). Die Freisetzung von Zytokinen wie IL-2 und IFN- γ , sowie die erhöhte Expression von MHC-Molekülen und die Rekrutierung zusätzlicher Effektorzellen, führen zu einer Verstärkung der T-Zellaktivierung und der Reifung von zytotoxischen T-Zellen (CTL). Letztendlich kommt es zu einem Angriff der Spenderzellen auf das Gewebe des Empfängers. Dies wird als die effere Phase bezeichnet. Die zytotoxischen T-Zellen vermitteln ihre Wirkung auf die Zielzellen direkt durch die Freisetzung von Perforin/Granzym, wobei die Zellen lysiert werden, oder durch Fas/FasL Interaktion. Letzteres führt zur Induktion von Apoptose in der Zielzelle. Indirekt können die CTL außerdem über die Freisetzung von TNF- α in den Empfängerzellen Apoptose induzieren (Ferrara *et al.* 1999).

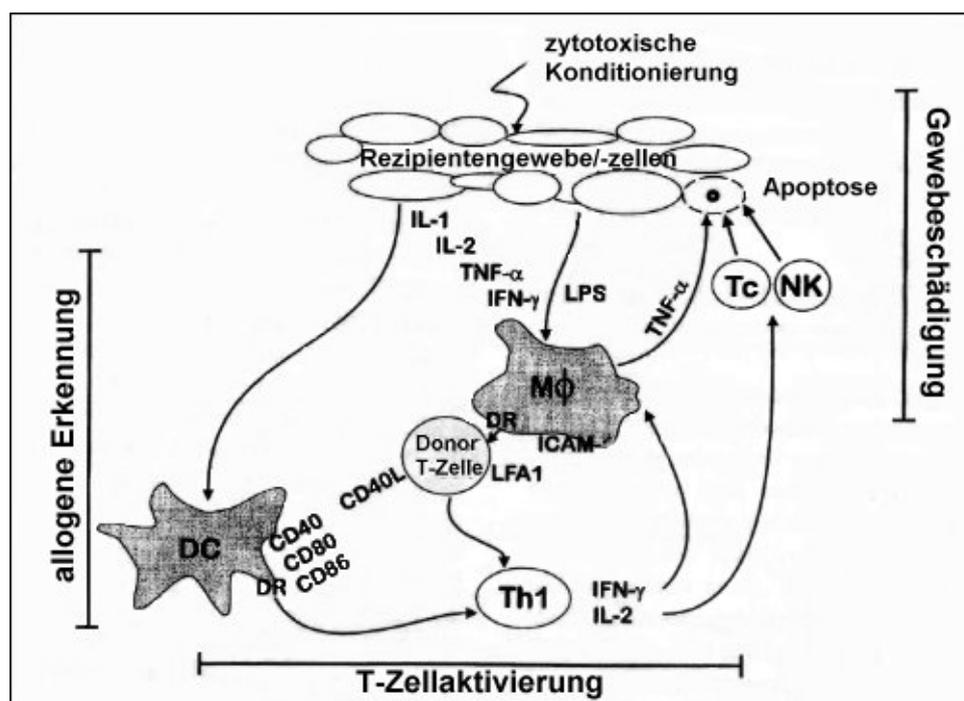


Abb.1: Schematische Darstellung des immunopathophysiologischen Verlaufs der akuten GvHD (modifiziert nach H.J. Deeg und M. Yamaguchi; Antkinson K., ed. *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*): **1.** das Konditionierungsregime vor der Transplantation resultiert in einer Gewebeschädigung und der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine; **2.** allogene Erkennung: antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen (M Φ) und dendritische Zellen (DC)) präsentieren den Donorzellen Antigen in Form von MHC-Peptid-Komplexen. Außerdem liefern sie kostimulatorische Signale (z. Bsp. CD80, CD86 und CD40). Diese und weitere kostimulatorische Interaktionen (ICAM-LFA1) führen zur **3.** Aktivierung von Donor-T-Zellen und einer vermehrten Zytokinfreisetzung. Dies verstärkt wiederum die Funktion der antigenpräsentierenden Zellen. Die Reifung zytotoxischer T-Zellen, zusammen mit anderen Faktoren (wie TNF- α) führt zur weiteren Schädigung von Rezipientengewebe (im Wesentlichen durch Apoptose) und damit zu einer klinischen Manifestation der GvHD.

1.4.1.2. Risikofaktoren und Behandlung

Es gibt eine Reihe von Faktoren, die bei der Entwicklung einer GvHD eine Rolle spielen. So ist die Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger von entscheidender Bedeutung. Die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer GvHD ist bei einer Transplantation zwischen HLA-identischen Geschwistern am niedrigsten und am höchsten bei nicht übereinstimmenden Transplantationspaaren, wie nicht-verwandten, nicht genetisch-identen Spendern und Empfängern (Atkinson 2000). Das Alter und das Geschlecht von Spender und Rezipient spielen ebenfalls eine Rolle. So werden Transplantationen überwiegend bei Patienten <55 Jahren durchgeführt. Das Risiko einer GvHD-Entstehung ist nach der Übertragung von weiblichen Spenderzellen in einen männlichen Rezipienten 2-3 mal größer, als nach der Übertragung in einen Empfänger des gleichen Geschlechts (Gale *et al.* 1987). Die immunkompetenten Spenderzellen erkennen bei einer weiblich-männlichen Donor-Empfänger-Konstellation Y-chomosomale Proteine, bzw. Peptide, die im Kontext der MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

Ein wichtiger Faktor zur Vermeidung einer GvHD ist die Prophylaxe. So führt ein Auslassen der Prophylaxe-Behandlung in 90%-100% zur Entwicklung einer GvHD. Mit der heute üblichen vorbeugenden Behandlung kann die Inzidenz einer GvHD deutlich reduziert werden. Zur Behandlung, ebenso wie zur Prophylaxe einer GvHD, werden hauptsächlich Immunsuppressiva und Corticosteroide eingesetzt. Ihr anti-inflammatorischer Effekt, sowie die Fähigkeit Lymphozyten in der Interphase zu lysieren, führen meist zu einer umgehenden Verbesserung des Zustands des Patienten. Zu den eingesetzten Mitteln zählen Methotrexat, Cyclophosphamid, Cyclosporine und Prednisolone in unterschiedlicher Dosis und Kombination (Atkinson 2000).

1.4.2. Chronische GvHD

Die GvHD, die 100 Tage oder noch später nach der Transplantation auftritt, wird als chronische GvHD bezeichnet. Sie kommt bei etwa 50% der Patienten nach HLA-identischer Geschwistertransplantation vor, ist aber in nur ca. 5% der Fälle lebensbedrohlich (Atkinson 1990). Die chronische GvHD kann sich aus einer akuten GvHD entwickeln, nach einer Phase ohne klinisch offensichtlicher GvHD auftreten oder aber auch *de novo* entstehen, ohne dass es vorher zu einer akuten GvHD kam (Shulman *et al.* 1980; Sullivan *et al.* 1981). Es handelt sich bei der chronischen GvHD um ein systemisches Multiorgansyndrom. Betroffen sind überwiegend die Haut und Schleimhäute, Lungen und der Gastrointestinaltrakt.

1.4.2.1. Pathogenese der chronischen GvHD

Ausgelöst wird die chronische GvHD ebenfalls durch den Angriff von Donor T-Zellen im Transplantat auf Rezipientenzellen, die sich durch Major- oder Minor- Histokompatibilitäts-Antigene vom Spender unterscheiden. Dadurch kommt es zur Schädigung von Epithelien, Infiltration von inflammatorischen Zellen, Fibrosen und im lymphoiden System zu einer Hypozellularität und Atrophie.

Ein dominanter Effekt der chronische GvHD ist die erhebliche Immundefizienz. Dies resultiert in einer funktionellen Asplenie. Aus diesem Grund kommt es oft zu Infektionen, insbesondere durch bakterielle Erreger (Atkinson *et al.* 1979; Atkinson *et al.* 1982). Zur Pathogenese der Erkrankung tragen ebenfalls zirkulierende autoreaktive T-Zellen, Autoantikörper sowie abnormale regulatorische Zellen bei. Daher gleicht die chronische GvHD einer Autoimmunkrankheit. Obwohl bekannt ist, dass T-Zellen die Ursache der GvHD sind, ist jedoch der genaue Mechanismus der Organzerstörung noch nicht genau verstanden. Zwei Fakten sind jedoch sicher: Die inflammatorischen Infiltrate bestehen im Wesentlichen aus CD8⁺ mononukleären Zellen und es konnte gezeigt werden, dass die Lymphozyten direkten Kontakt zu den Epithelzellen haben (Ferrara *et al.* 1989). Dies legt die Vermutung nahe, dass sie direkte Zytotoxizität ausüben. Weiterhin konnte in einem murinen Modell gezeigt werden, dass T-Zellen in der chronischen GvHD Lymphokine freisetzen, die in Fibroblasten die Kollagensekretion erhöhen. Dies ist eine mögliche Ursache für Fibrosen (De Clerc *et al.* 1986; Liem *et al.* 1999).

1.4.2.2. Risikofaktoren und Behandlung

Für die Entstehung einer chronischen GvHD sind insbesondere Patienten prädisponiert, die an einer akuten GvHD leiden (Atkinson *et al.* 1990). Darüber hinaus haben auch das Alter und das Geschlecht von Donor und Rezipient einen wesentlichen Einfluss bei der Entstehung der Erkrankung. Es scheint, dass der Transfer von G-CSF mobilisierten Stammzellen aus dem peripheren Blut mit einem höheren Risiko einer chronischen GvHD assoziiert ist (Storek *et al.* 1997). Behandelt wird die chronische GvHD mit Cyclosporin, Steroiden, Azathioprin, Thalidomid oder UV-A Strahlen (Atkinson *et al.* 1986; Sullivan *et al.* 1988; Bacigalupo *et al.* 1990; Vogelsang *et al.* 1992).

1.5. Strategien zur Vermeidung von GvHD/ Transplantat Modifikationen

Seit erkannt wurde, dass im Transplantat enthaltene T-Zellen die Ursache für das Entstehen einer GvHD sind, wurden zahlreiche Versuche unternommen, das Transplantat zu modifizieren. Bereits Anfang der 70er Jahre fand man im Tiermodell erste Ansätze, die GvHD zu behandeln. Dabei wurden zunächst die Rezipienten vor dem Transfer mit Anti-Lymphozyten-Globulinen behandelt (van Bekkum *et al.* 1972).

Die wohl effektivste Methode zur Vermeidung einer GvHD ist die Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat (Lowenberg *et al.* 1986; Champlin 1990). Dafür wurde bereits eine Vielzahl von Strategien entwickelt. Zum einen werden die T-Zellen durch physikalische Methoden (Lectin-Separation, Auswaschen oder E-Rosetten) separiert, zum anderen durch den Einsatz von Antikörpern aus dem Transplantat entfernt (Blazar *et al.* 1985). Dabei werden zum Beispiel Toxin-gekoppelte Antikörper verwendet, oder die Knochenmarkzellen werden mit Antikörper und Komplement inkubiert (Preijers *et al.* 1988; Cavazzana-Calvo *et al.* 1990; Soiffer *et al.* 1990). In beiden Ansätzen wird eine Lyse der T-Zellen erreicht. In einem neueren Verfahren werden immunomagnetische Mikrobeads eingesetzt, die an gegen die T-Zellen gerichtete Antikörper gekoppelt sind. Mit Hilfe dieser Depletionsverfahren können 90%- 99,9% aller T-Zellen eliminiert werden. Dadurch kann eine beträchtliche Reduktion in der Inzidenz und der Schwere der GvHD erzielt werden. Dem gegenüber stehen jedoch schwerwiegende Probleme. Das Risiko des Transplantatversagens steigt mit der Depletion der T-Zellen deutlich an (Maraninchi *et al.* 1987; Wiesneth *et al.* 1988). Durch einen langanhaltenden Defekt der T-Zellimmunität kommt es zu erhöhter Infektneigung und die Inzidenz EBV-assoziiertes lymphoproliferativer Erkrankungen steigt. Ein weiterer schwerwiegender Nachteil der T-Zelldepletion ist die erhöhte Rezidivneigung der Patienten. Dies ist zurückzuführen auf das Fehlen des GvL-Effektes, der ebenfalls durch T-Zellen vermittelt wird, die im Transplantat enthalten sind (Apperley *et al.* 1988).

In den letzten Jahren wurden daher verschiedene Ansätze entwickelt, das Transplantat zu modifizieren, um das Entstehen einer GvHD zu vermeiden, aber gleichzeitig den GvL-Effekt und die Fähigkeit zur Infektabwehr zu erhalten. Einen interessanten Ansatz stellt die Blockade kostimulatorischer Moleküle dar. Zur Aktivierung von T-Zellen sind, neben der Interaktion des T-Zellrezeptors (TCR) mit dem im Kontext des MHC präsentierten Antigen, kostimulatorische Signale nötig. Andernfalls werden die T-Zellen anerg und eine Immunreaktion wird nicht ausgelöst. Kommt es jedoch neben der Interaktion des TCR mit dem MHC-Peptid-Komplex zu einer Wechselwirkung zwischen CD28 (exprimiert auf der T-Zelloberfläche) und einem der kostimulatorischen Moleküle, so führt dies zu einer

Aktivierung der T-Zelle. Liganden des CD28 sind die Moleküle der B7-Familie (B7.1 und B7.2) und das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen-4 (CTLA-4). Gribben et al. haben mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen B7.1 und B7.2, sowie mit dem Fusionsprotein CTLA-4-Ig, den kostimulatorischen Weg der T-Zellaktivierung blockiert (Gribben *et al.* 1996). Durch diese *ex vivo* Blockade konnten anerge, für die alloreaktive Stimulation unempfindliche, T-Zellen generiert werden. Die prinzipielle klinische Anwendbarkeit konnte in einem ersten Einsatz gezeigt werden (Guinan *et al.* 1999).

Die Übertragung regulatorischer T-Zellen zur Vermeidung einer GvHD stellt einen weiteren Ansatz dar. Durch die Kultur primärer CD4⁺ T-Zellen mit allogenen Stimulatoren in Gegenwart von IL-10 und TGF- β , bzw. IFN- α konnten supprimierende CD4⁺ T-Zellen generiert werden, die nach T-Zellrezeptor-Stimulation die Proliferation alloreaktiver CD4⁺ T-Zellen hemmen (Zeller *et al.* 1999; Levings *et al.* 2001). Ein weiterer Typ regulatorischer T-Zelle ist charakterisiert durch die Expression von CD4 und CD25. Die Zellen sind aus dem peripheren Blut und lymphatischen Organen der Maus und auch des Menschen isoliert worden. Auf der Oberfläche exprimieren sie Marker (CD45RO), die sie als *Memory*-T-Zellen charakterisieren (Diekmann *et al.* 2001; Jonuleit *et al.* 2001). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass diese CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, frisch isoliert aus der Milz oder *ex vivo* aktiviert und expandiert, das Entstehen einer letalen akuten GvHD nach einer allogenen KMT supprimieren (Hoffmann *et al.* 2002; Taylor *et al.* 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die regulatorischen T-Zellen eine Rolle bei der Toleranzinduktion gegenüber allo-Antigenen spielen (Taylor *et al.* 2001; Kingsley *et al.* 2002). Humane CD4⁺CD25⁺ T-Zellen isoliert aus peripherem Blut können *in vitro* ohne Verlust ihrer Funktion expandiert werden und supprimieren *in vitro* in einer gemischten Lymphozytenreaktion (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) Alloreaktivität (Levings *et al.* 2001).

Neben der Induktion von Anergie in alloreaktiven T-Zellen und der Übertragung regulatorischer T-Zellen verfolgen mehrere Arbeitsgruppen eine andere Strategie, um das Entstehen einer GvHD zu vermeiden: die Transplantatmodifikation durch selektive Elimination alloreaktiver T-Zellsubgruppen. Einer der ersten Ansätze war die Elimination durch gegen den IL-2-Rezeptor (IL-2R, CD25) gerichtete Immunotoxine nach Stimulation *in vitro* (Cavazzana-Calvo *et al.* 1990). Diese Behandlung resultierte in einer 1.5-log Reduzierung alloreaktiver Zellen. Wie im Mausmodell gezeigt wurde, reicht das jedoch nur für eine Abschwächung des GvHD-Risikos aus (Cavazzana-Calvo *et al.* 1994). Weitere Versuche ergaben, dass aber die Anti-Leukämie- und Anti-Virus-Aktivität im Transplantat

erhalten bleiben (Montagna *et al.* 1999). Inzwischen wurden bereits die ersten klinischen Tests zur Anwendbarkeit dieser Methode durchgeführt (Andre-Schmutz *et al.* 2002).

Im Gegensatz zu Cavazzana-Calvo *et al.* depletierten Koh *et al.* aktivierte Lymphozyten aufgrund der Oberflächenexpression des CD69-Moleküls (Koh *et al.* 1999). Effizienter zur Elimination alloreaktiver T-Zellen erweist sich ein Verfahren, das gegen beide Oberflächenmarker, CD25 und CD69 gerichtet ist (Fehse *et al.* 2000). Auch Depletionsverfahren, die sich gegen drei Aktivierungsmarker richten (CD25, CD69 und HLA-DR), wurden angewandt (Rencher *et al.* 1996).

Ein neuerer Ansatz von Hartwig *et al.* besteht darin alloreaktive T-Zellen durch Induktion des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (*activation induced cell death*, AICD) zu eliminieren. Der AICD wird vermittelt durch die Interaktion von CD95 mit seinem Liganden (CD95L, das sogenannte „Fas-FasLigand-System“) und stellt einen Weg zur Kontrolle der Expansion Antigen-aktivierter T-Zellen dar (Lenardo *et al.* 1999). Durch repetitive Stimulation alloreaktiver T-Zellen *ex vivo* mit allo-Antigen wird AICD in diesen Zellen induziert. Eine solche Behandlung vor dem Transfer erlaubt die Elimination alloreaktiver Zellen ohne Verlust der antiviralen, bzw. antileukämischen T-Zellen. Eine weitere Option zur Depletion alloreaktiver T-Zellen haben Chen *et al.* 2002 veröffentlicht. Durch einen photodynamischen Prozess werden gegen den Empfänger reaktive Zellen aus dem Transplantat eliminiert (Chen *et al.* 2002). Dabei wird ein photoaktives Rhodaminderivat genutzt. Dieses wird in den Mitochondrien aktivierter Zellen zurückgehalten. In ruhenden T-Zellen wird der Farbstoff durch einen Transporter aus der Zelle gepumpt. In aktivierten Zellen ist dieser Transporter inaktiviert. Werden die Zellen nun sichtbarem Licht (514 nm) ausgesetzt, werden sie durch Oxidation der Mitochondrien getötet. Die gleiche Arbeitsgruppe hat 2004 eine weitere Methode entwickelt, um die Entstehung einer GvHD zu vermeiden (Chen *et al.* 2004). Hierbei werden *memory*-, bzw. aktivierte T-Zellen übertragen, die bereits mit ihrem entsprechenden Antigen in Kontakt gekommen sind. Selektioniert werden bei diesem Verfahren Zellen, die CD62L-negativ (L-Selektin-negativ) sind. CD62L wird auf naiven T-Zellen exprimiert und bewirkt deren *homing* in die Lymphknoten. Bei Aktivierung der T-Zellen wird die Expression des CD62L herunterreguliert. Hatten die Spender T-Zellen bis dato keinen Kontakt mit Empfänger Antigen (antigen-naiv), so sind die potentiell alloreaktiven Zellen in der Population naiver T-Zellen (CD62L⁺) enthalten und können auf diese Weise aus dem Transplantat entfernt werden.

Die Möglichkeit alloreaktive T-Zellen nach dem Transfer *in vivo* zu eliminieren bietet sich durch die Transfektion transferierter T-Zellen mit einem so genannten Suizidgen, der Herpes

Simplex Virus Thymidine Kinase (Bonini *et al.* 1997; Cohen *et al.* 1997). Dieses Suizidgen erlaubt es, das Überleben der Donor T-Zellen durch Gabe des antiviralen Wirkstoffes Ganciclovir (GCV) zu regulieren. Dieser an sich nicht toxische Wirkstoff wird relativ selektiv durch die virale Thymidinkinase phosphoryliert, durch zelluläre Kinasen weiter phosphoryliert und das entstehende Pseudonukleotidtriphosphat wirkt dann in sich teilenden Zellen toxisch (Kettenabbruch der DNA Synthese). Die Spezifität der Zelltötung ist daher eher abhängig von der Zellzyklusphase, in der sich die Zellen befinden, als von der Alloerkennung. Denn auch homeostatische Signale treiben die T-Zellproliferation (Prlic *et al.* 2001; Goldrath *et al.* 2004). Deshalb ist der Zeitpunkt der GCV-Gabe entscheidend.

Anfang des Jahres 2004 veröffentlichten Godfrey *et al.* parallel zu unseren Arbeiten einen Ansatz alloreaktive T-Zellen *ex vivo* zu depletieren (Godfrey *et al.* 2004). Dabei werden die CD4⁺ Responder-T-Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester (CFSE) markiert. Proliferierende, alloreaktive, Zellen verlieren an Fluoreszenzintensität und lassen sich durch FACS-Analyse von sich nicht teilenden Zellen differenzieren und durch FACS-Sorting separieren. Erste Versuche, bei denen die separierten Zellen im Mausmodell übertragen wurden, zeigten eine verminderte Inzidenz von GvHD.

1.6. Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es ein Verfahren zu entwickeln, das die Reduktion alloreaktiver CTL unter gleichzeitiger Anreicherung leukämiespezifischer Zellen ermöglicht. Als Kriterium für die T-Zellaktivierung diente hierbei nicht die Expression bestimmter Aktivierungsmarker wie etwa CD25 oder CD69, sondern die Proliferation der T-Zellen.

Die T-Zellproliferation wird generell als Indikator für den Aktivierungsgrad und als Maß für die Zahl der reaktiven T-Zellen verwendet. Dies zeigt sich unter anderem darin, dass in einer Vielzahl von Veröffentlichungen mit T-Zell-immunologischen Fragestellungen der ³H-Thymidin-Einbau als Methode zur Bestimmung der T-Zellaktivierung eingesetzt wird. In der Vergangenheit konnte in einer Zahl unabhängiger experimenteller Systeme gezeigt werden, dass T-Zellen nur in sehr begrenztem Umfang antigenunabhängig proliferieren und, dass für die Proliferation eine spezifische TCR-Stimulation notwendig ist (Weiss 1998).

In der hier bearbeiteten Fragestellung sollte die Beurteilung der T-Zellproliferation auf Einzellbasis erfolgen. Die Zellen wurden *in vitro* mit CFDA-SE gefärbt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der über Diffusion in das Zytoplasma der Zellen gelangt und über Azobindungen kovalent an zytoplasmatische Proteine bindet. Teilen sich im Folgenden bestimmte Zellgruppen des Ansatzes, so geben sie die Hälfte des Farbstoffes an die beiden Tochterzellen ab. Dies ist im Durchflusszytometer sehr gut erfassbar und erlaubt eine Separation proliferierender Zellen von nicht proliferierenden Zellen mittels FACS-Sorting. Die Gegenfärbung mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern erlaubt eine genaue Identifikation der Subpopulationen.

Im Mausmodell sollte der Frage nachgegangen werden, ob auf diese Weise eine Trennung GvL- und GVHD-vermittelnder Zellen aus Donor-Lymphozyten-Präparationen möglich ist und ob die nicht proliferierenden Zellen nach dieser Prozedur noch einen protektiven Effekt gegen die spezifische Leukämie *in vivo* zeigen, während die proliferierenden Zellen diejenigen sind, welche für die Induktion einer GvHD verantwortlich sind. Dabei wurden sowohl ein MHC-identen als auch ein MHC-disparates Modell gewählt. In letzterem unterscheiden sich Donor und Rezipient durch Major- und Minorantigene, während im MHC-identen Modell nur die Minorantigene unterschiedlich sind.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zellen und Zelllinien

Murine Lymphozyten:

Die Zellen wurden aus Milz, Knochenmark oder Blut isoliert

Murine Tumor Zelllinien:

P815/B7

Hierbei handelt es sich um eine Mastozytom-Zelllinie auf DBA/2-Hintergrund. Diese wurde mit dem kostimulatorischen Molekül B7.1 (CD80) transfiziert (Fields *et al.* 1998) und diente in dieser Arbeit als Modelltumor sowie als Zielzelllinie im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest.

EB

EB ist ein durch Methylcholanthren induziertes, wenig metastasierendes T-Zell-Lymphom aus DBA/2 (Parr 1972). Die Zellen dienten im Zytotoxizitätstest als Zielzellen.

Die Kultur erfolgte in RPMI1640 mit 10% FKS.

AG104A

Diese Zelllinie stammt aus dem Labor von Hans Schreiber, University of Chicago, Chicago, USA. Es handelt sich um ein spontanes Fibrosarkom aus dem Mausstamm C3H (Ward *et al.* 1989). Diese adhärent wachsenden Zellen wurden von uns ebenfalls im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest als Zielzellen eingesetzt.

8101 Re12

Bei 8101 Re12 handelt es sich um einen durch UV-Licht induzierten Tumor auf C57BL/6-Hintergrund (Ward *et al.* 1989). Die Zelllinie stammt ebenfalls aus dem Labor von Hans Schreiber, Chicago.

In unseren Versuchen wurden die Zellen als Zielzellen im Zytotoxizitätstest verwendet.

3.1.2. Chemikalien und Substanzgemische

Medien und Lösungen

RPMI1640	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, D
L-Glutamin 200mM (100x)	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, D
Fötales Kälberserum	Sigma, Steinhausen, D
Trypsin/EDTA (10x)	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, D
Non essential amino acids	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, D
β -Mercaptoethanol 50mM	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, D
Gentamicin 50mg/ml	Sigma, Steinhausen, D
MethoCult	StemCell Technologies, St. Katharinen, D
DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, D
T-Zell-Medium	RPMI1640 10% FKS 1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 1% NEAA 0,1% β -Mercaptoethanol 0,1% Gentamicin
1x PBS pH 7,4:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM H_2PO_4 H_2O ad 1 Liter
FACS-Puffer:	1x PBS (pH 7,4) + 0,5% BSA + 0,1% Natriumazid
MACS-Puffer:	1x PBS (pH 7,2) + 0,5% BSA + 2mM EDTA
Erythrozyten-Lyse:	1,55 M NH_4Cl 100 mM KHCO_3 1 mM EDTA
Lympholyte-M	Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada
Trypanblau 0,4%ig	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, D

Chemikalien

BSA	Roth, Karlsruhe, D
Natriumazid	Merck, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Mitomycin C	Sigma, Steinhagen, D
Interleukin-2 (Proleukin)	Chiron GmbH, Ratingen, D
Heparin (Liquemin N5000)	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
CFSE	Molecular Probes, Eugene OR, USA
Propidium Iodid	Fluka, Buchs, Schweiz

Antikörper für Durchflusszytometrie und Zellseparation

Primärantikörper:

Tabelle 1: in der Durchflusszytometrie verwendete Primärantikörper

Antigen	Klon	Markierung	Nachweis von	Hersteller
H2-K ^d	SF1-1.1	PE	MHC I	BD Pharmingen
H2-K ^k	16-3-22.4	FITC	MHC I	Southern Biotech
H2-K ^b	AF6-88.5	FITC	MHC I	BD Pharmingen
CD5.1/Ly1.1	H11-86.1	FITC	T-Lymphozyten	BD Pharmingen
CD3 ϵ	145-2C11	FITC	T-Lymphozyten	Southern Biotech
CD4	Gk1.5	FITC	T-Helferzellen	Southern Biotech
CD4	Gk1.5	Biotin	T-Helferzellen	BD Pharmingen
CD8 α	53-6.7	PE	cytotoxische T-Zellen	Southern Biotech
CD8 α	53-6.7	Biotin	cytotoxische T-Zellen	BD Pharmingen
B220/CD45R	RA3-6B2	PE	B-Zellen	BD Pharmingen
IgM	R6-60.2	FITC	reife B-Zellen	BD Pharmingen
CD19	1D3	Biotin	B-Zellen	BD Pharmingen
Gr1	RBG8C5	keine	Granulozyten	Hybridom-ÜS
Mac1/CD11b	5C6	keine	Macrophagen	Hybridom-ÜS
ckit	ACK-2	keine	myeloische Vorläufer	Hybridom-ÜS
Thy1.2	30-H12	PE	T-Zellen	DPC Biermann
Thy1.2	5a-8	Biotin	T-Zellen	Caltag
CD25	3C7	PE	aktivierte T-Zellen	BD Pharmingen
CD25	7D4	Biotin	aktivierte T-Zellen	BD Pharmingen
CD49b	DX5	Biotin	NK-Zellen	BD Pharmingen

Sekundärantikörper:

α Ratte IgG2b-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Streptavidin-PE-Cy7 (PC7)	Caltag Laboratories, Burlingame CA, USA

Blocking Reagenzien:

α FcRezeptor-Antikörper	Hybridomüberstand (Klon 2.4G2)
humanes ImmunglobulinG	Baxter Hyland Immuno, Heidelberg, D

Magnetische Beads:

α Thy1.2-Micro Beads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
α CD8 α -Micro Beads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D

3.1.3. Radioaktive Substanzen

Na ₂ - ⁵¹ CrO ₄	Amersham, Freiburg, D
--	-----------------------

3.1.4. Verbrauchsmaterialien

Kulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² Sarstedt, Nümbrecht, D
Kryoröhrchen	2 ml Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml Sarstedt, Nümbrecht, D
Kulturplatten	24 well, 96 well Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Petrischalen	6 cm, 10 cm Durchmesser Sarstedt, Nümbrecht, D
Nylonsiebe	100 μ m Maschen BD Falcon, Heidelberg, D
Separationssäulen	Depletion (LD), positive Selektion (SD) Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml Sarstedt, Nümbrecht, D
Spritzen	1 ml, 5 ml, 20 ml zum Einmalgebrauch BD, Heidelberg, D

Kanülen	20G, 23G, 27G BD, Heidelberg, D
Eppendorf-Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml Eppendorf, Hamburg, D
Polystyren-Röhrchen	3,5 ml, 5 ml Sarstedt, Nümbrecht, D BD Falcon, Heidelberg, D
3.1.5. Geräte	
Brutschrank	NU AIRE US Autoflow Zapf Instrumente, Sarstedt, D
Sterilbank	Clan LAF VFR1806 Clan LAF, Humlebaek, Dänemark
Pipetten	1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl Eppendorf, Hamburg, D
Pipetteboy	Eppendorf, Hamburg, D
Neubauer-Zählkammer	Eydam, Kiel, D
Zentrifuge	GS-6KR Centrifuge Beckmann, Fullerton, CA, USA
MidiMACS-Separator	Mitenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Durchflusszytometer	FACSscan, FACS Canto Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS-Sorter	Epics Altra Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
γ-Counter	Wallac, Turku, Finnland
Bestrahlungsgerät	Gamma Cell 40 (Cäsium ¹³⁷) Atomic Energy, Canada

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultivierung

Allgemeine Bedingungen der Zellkultur

Die Arbeit mit Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Zellen in RPMI 1640, versetzt mit 5% FKS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin, kultiviert.

Umsetzen adhärenter Zellen

Das Arbeitsmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 3 ml (25 cm² große Kulturflasche) bis 5 ml (75 cm² große Kulturflasche) temperiertem (37 °C) 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 500 µl bis 1 ml Trypsin/EDTA vollständig abgelöst. Das Trypsin wurde mit einem Äquivalent FKS neutralisiert. Die Zellen konnten so auf neue Kulturflaschen verteilt oder für Experimente eingesetzt werden.

Gefrierkonservierung von Zellen

Die meisten Zellen können unter weitestgehender Erhaltung ihrer Vitalität durch Gefrierkonservierung unbegrenzt gelagert werden. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, bzw. Suspensionszellen direkt in ein Röhrchen überführt, 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert und anschließend in vorgekühltem Medium oder FKS resuspendiert. Dann wurden 10% DMSO zugegeben, Portionen a 800-1000 µl auf Kryoröhrchen verteilt und für 1-2 Stunden bei -20 °C gelagert, bevor sie in -80 °C und letztendlich in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Auftauen eingefrorener Zellen

Die Zellen wurden vorsichtig mit 1 ml vortemperiertem Medium im Kryoröhrchen resuspendiert und in 5 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 5 min. bei 1100 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt.

Mycoplasmentest

In der Zellkultur besteht immer die Gefahr einer Kontamination durch Mycoplasmen. Diese rufen Veränderungen in Stoffwechsel, Wachstum und der Morphologie der betroffenen Zellen hervor. So können Untersuchungsergebnisse erheblich verfälscht werden. Mit einem Mycoplasmen Detektions Kit (Venor GeM, Minerva Biolabs, Berlin) wurden die kultivierten Zellen deshalb routinemäßig auf Freiheit von Mycoplasmen überprüft. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.2. Mäuse

Die Versuche wurden mit 6-12 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Als Rezipienten dienten weibliche Tiere des Stammes DBA/2, als Donoren Mäuse der Stämme Balb/c bzw. C3H. Die Tiere stammten aus eigener Zucht oder wurden bei Harlan-Winkelmann (Borchen) gekauft und in der tierexperimentellen Einrichtung der Universität Kiel konventionell gehalten. Sie erhielten Wasser und Trockenfutter *ad libitum*. C3HxDBA/2-F1 Generationen stammten ebenfalls aus eigener Zucht. Rag1^{-/-}-Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund wurden uns freundlicherweise von Prof. T. Blankenstein (Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch) zur Verfügung gestellt. Aufgrund der Immundefizienz wurden die Tiere nicht konventionell gehalten sondern unter sterilen Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen (*individually ventilated cages*, IVCs). Die Versuche wurden gemäß der Richtlinien der europäischen Union durchgeführt und von der deutschen Tierschutzbehörde genehmigt. Nach Abschluss eines Experiments wurden die Tiere durch zervikale Dislokation der Analyse zugeführt.

3.2.3. Tierexperimentelle Methoden

2.2.3.1. Immunisierung

Spendertiere, Balb/c und C3H, wurden 16 und 9 Tage vor dem Transfer mit DBA-Milzzellen oder Tumorzellen (P815/B7) immunisiert. Dazu wurden Einzelzell-suspensionen von DBA/2-Milzzellen gewonnen. Diese mit 20 Gy gamma-bestrahlten Zellen wurden in 1x PBS (pH 7,4) resuspendiert und 1×10^7 Zellen pro Tier in einem Volumen von 200µl i.p. injiziert. Die Tumorzellen wurden für die Immunisierung mit 100 Gy bestrahlt und 5×10^6 Zellen, ebenfalls in 200µl PBS resuspendiert, s.c. injiziert.

2.2.3.2. Tumorinduktion

P815/B7-Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, gewaschen und in 1x PBS aufgenommen. $5-20 \times 10^5$ Zellen in 200 μ l PBS wurden mittels einer 27G-Kanüle s.c. in die rechte Flanke der Rezipiententiere, DBA/2-Mäuse, injiziert. Das Tumorstadium wurde regelmäßig überprüft und der Tumordurchmesser mit Hilfe einer Schieblehre in drei senkrecht zueinander stehenden Dimensionen gemessen. Das Tumorstadium wurde nach der Formel $(a \times b \times c) / 2$ berechnet. Bei einem Tumordurchmesser von 1,5 cm wurden die Tiere der Analyse zugeführt.

2.2.3.3. Knochenmarktransplantation

Konditionierung

Drei Tage vor dem Transfer wurden die Empfängertiere für die Transplantation konditioniert. Um das Immunsystem der Rezipienten zu eliminieren und so eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern, wurden die Tiere mit 14 Gy letal bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Cäsium¹³⁷ Quelle und wurde in drei Dosen von jeweils 4,7 Gy im Abstand von 12 Stunden verabreicht.

Bei einer subletalen Bestrahlung wurden 10 Gy in zwei Dosen gegeben.

Depletion der Thy1.2-positiven Zellen

Um sicher gehen zu können, dass die beobachteten Effekte nach dem Transfer ausschließlich von T-Zellen in den übertragenen Fraktionen vermittelt werden, wurde das zu transplantierende Knochenmark T-Zell-depletiert. Dazu wurde das MACS-System der Firma Miltenyi (Bergisch Gladbach) eingesetzt. Mit Hilfe magnetischer Beads wurden die Thy1.2-positiven Zellen aus dem Knochenmark entfernt. Die Zellen wurden dafür wie unter 2.2.4 beschrieben isoliert und in 90 μ l MACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Dann erfolgte die Zugabe direkt gekoppelter anti-Thy1.2 Microbeads (10 μ l pro 10^7 Zellen) und anschließende Inkubation für mindestens 15 Minuten bei 4-12 °C. Nicht gebundene Microbeads wurden durch einen Waschschrift entfernt. Daraufhin folgte die Depletion der Thy1.2-positiven Zellen im MACS-Zellseparator nach Angaben des Herstellers.

Die Effizienz der Depletion wurde anschließend durch eine α -Thy1.2-Färbung im FACS überprüft. Der Anteil residueller T-Zellen betrug regelmäßig unter 0,5%.

Intravenöse Injektion der Leukozyten-Fractionen

Die zu transferierenden Zellen wurden in 1x PBS aufgenommen. Die Tiere wurden für einige Minuten mit Rotlicht bestrahlt, um die Durchblutung der Schwanzvenen zu verstärken und dann in einer PVC-Röhre so fixiert, dass ihr Schwanz zugänglich blieb. 5-10x 10⁶ Zellen des Thy1.2-depletierten Knochenmarks in 200µl PBS wurden in die Schwanzvene injiziert. Die sortierten Zellfraktionen sowie Zellen der unsortierten MLR wurden ebenfalls in einem Volumen von 200µl PBS aufgenommen und in die Schwanzvene gespritzt.

Monitoring nach dem Transfer

Nach dem Transfer wurden die Tiere zunächst täglich gewogen und begutachtet. Bei Anzeichen einer GvHD wie Gewichtsverlust (maximal 25%), struppigem Fell und zusammengekauertter Haltung wurden sie der Analyse zugeführt.

2.2.3.4. Venöse Blutentnahme

Um das Anwachsen der transplantierten Zellen zu überprüfen, wurde venöses Blut aus der lateralen Schwanzvene entnommen. Dazu wurden die Tiere einige Minuten mit Rotlicht bestrahlt und in einem PVC-Röhrchen fixiert. Der Schwanz wurde desinfiziert und mit einem Skalpell die Schwanzvene geritzt. Das Blut wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit 15µl Heparin aufgefangen.

2.2.4. Isolierung von Leukozyten aus Blut, Milz und Knochenmark

Blut

Zur Lyse der Erythrozyten wurden die entnommenen 100µl Blut in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Gegebenenfalls wurde der Lyseschritt wiederholt. Die Zahl der erhaltenen Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 2.2.5).

Milz

Die Milzen wurden steril präpariert und in Medium aufgenommen. Sie wurden dann zwischen den geschliffenen Enden von zwei Objekträgern homogenisiert und über Nygonsiebe von verbleibenden größeren Fragmenten gereinigt. Die Zellen wurden 8 min. bei 1100 rpm zentrifugiert, in 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 1 Minute inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und gezählt.

Knochenmark

Femora und Tibiae, sowie die Humeri der Spender-Tiere wurden nach zervikaler Dislokation entnommen und von Muskelgewebe befreit. Die Knochen wurden durch lateralen Schnitt beidseits eröffnet und so das Mark zugänglich gemacht. Mittels einer 27G-Kanüle wurde kaltes Medium durch die Knochen gespült und die darin enthaltenen Knochenmarkszellen in einer Petrischale aufgefangen. Anschließend wurden die Zellen mit einer 23G-Kanüle durch wiederholtes Aufziehen vereinzelt. Nach 8 min. Zentrifugation bei 1100 *rpm* wurden die Erythrozyten, wie bei der Milz beschrieben, lysiert und die Zellen anschließend gezählt.

2.2.5. Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden die Zellen 1:1 mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Die durchschnittliche Anzahl von Zellen in einem Großquadrat $\times 10^4$ entspricht der Zellzahl pro Milliliter. Anschließend muss der Verdünnungsfaktor, der durch das Mischen mit Trypanblau entsteht, noch mit einbezogen werden. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Er dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytoplasma und färbt diese Zellen tiefblau. Bei der Auszählung wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt.

2.2.6. Gemischte Lymphozytenreaktion (*mixed lymphocyte reaction*, MLR)

Die gemischte Lymphozytenreaktion dient dazu, *in vitro* eine Immunantwort zu erzeugen. Frische Milzzellen des Spenderstammes wurden wie oben beschrieben gewonnen und in T-Zell-Medium aufgenommen. 5×10^6 Zellen wurden pro well in einer 24-well Platte ausgesät und mit der gleichen Menge Splenozyten des Empfängerstammes in zwei ml Endvolumen kokultiviert. Die Zellen des Empfängerstammes waren mit 20 Gy bestrahlt, um zu erreichen, dass die Immunantwort nur in einer Richtung erfolgte. Nach 4 Tagen der Kultur wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt, um die zytolytische Aktivität der T-Zellen nachzuweisen.

Eine Spezialform der MLR ist die gemischte Lymphozyten und Tumorzellkultur (*mixed lymphocyte tumor culture*, MLTC). Als Stimulatoren dienten hier nicht bestrahlte Milzzellen, sondern mit Mitomycin C (MMC) behandelte Tumorzellen. Pro 2-ml well wurden 2×10^5 Zellen eingesetzt.

2.2.7. Mitomycin C-Behandlung

Bei MMC handelt es sich um ein Zytostatikum. Es inhibiert die DNA-Synthese und die Kernteilung. In diesem Fall diente die Behandlung mit MMC dazu, ein Auswachsen der Tumorzellen zu verhindern. 5×10^6 Tumorzellen wurden in 1,8 ml Medium resuspendiert und 200 μ l MMC (Endkonzentration 50 μ g/ml) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1- 1,5 h bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen 5 min. bei 1100 *rpm* zentrifugiert und dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden sie in T-Zellmedium aufgenommen und wie unter 2.2.5 beschrieben gezählt.

2.2.8. Markierung von Lymphozyten mit Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester (CFSE)

Um die Proliferation von Lymphozyten, bzw. das Ablaufen einer Immunantwort verfolgen zu können, wurden die Spendermilzzellen, die in der MLR eingesetzt wurden, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Das farblose CFDA-SE (Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester) ist ein hydrophobes Molekül, das in die Zellen diffundiert. Intrazelluläre Esterasen spalten die beiden Acetatreste ab, wobei das grün fluoreszierende CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidylester) entsteht. Dieses bindet unter Abspaltung der Succinimidylgruppe kovalent an Arginin- und Lysinreste zytoplasmatischer Proteine. Bei einer Teilung der Zelle werden die CFSE-markierten Proteine zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben. Sich teilende Zellen sind deshalb durch Abnahme der Fluoreszenzintensität klar von sich nicht teilenden Zellen zu unterscheiden.

Da bis zu 48 Stunden nach der Markierung die Fluoreszenz auch bei ruhenden Zellen nachlässt, weil Proteine mit kurzer Halbwertszeit abgebaut und sekretorische Proteine abgegeben werden, müssen immer ruhende Zellen als Kontrolle eingesetzt werden.

Die CFSE-Markierung wurde in PBS durchgeführt. Zu $1-4 \times 10^7$ Zellen/ml wurde CFDA-SE in einer Endkonzentration von 3 μ M hinzugegeben und durch Schwenken mit der Zellsuspension gemischt. Die Zellen wurden 12 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 8 min. bei 1100 *rpm* zentrifugiert und die Zellen in zusatzfreiem Medium weitere 25 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation und die Zellen wurden in T-Zell-Medium aufgenommen.

2.2.9. Sortieren der CFSE-markierten Zellen

Um für den Transfer die gewünschten Zellpopulationen zu erhalten, wurden die Zellen mit Hilfe eines FACS-Sorters sortiert. Zum Sortieren wurden die CFSE-markierten Zellen der MLR eingesetzt. Um tote Stimulatorzellen und Debris zu beseitigen, wurden die Zellen zuvor über Lympholyte-M aufgereinigt (siehe 2.2.10) und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde für das Sortieren auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Nun wurden die Zellen der MLR sortiert. *Gegattet* wurde dabei zum einen auf die hoch fluoreszierenden, ruhenden Zellen, zum anderen auf die sich teilenden Zellen, die aufgrund der Proliferation an Fluoreszenzintensität verloren haben. Sortiert wurde am Epics Altra, die genutzte Software war Expo32.

2.2.10. Aufreinigung von Lymphozyten über Dichtegradienten

Um die Zellen der MLR von toten Stimulatorzellen und Debris zu befreien, wurden die Kulturen über einen Dichtegradienten aufgereinigt. Dafür wurden die Zellen zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Nun wurde das gleiche Volumen Lympholyte-M mit der Zellsuspension überschichtet und bei Raumtemperatur 20 min. bei 1100 *rpm* zentrifugiert. Die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten/ Makrophagen) sammelten sich in der Interphasengrenze und wurden abgenommen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen.

2.2.11. Restimulation und Passage sortierter Zellen

Um *in vitro* zeigen zu können, dass die ruhenden Zellen der sortierten MLR im Stande sind eine Immunreaktion gegen so genannte *third party*-Antigene auszuführen, wurden die Zellen wieder in Kultur genommen und restimuliert. Nach dem Sortieren wurden die Zellen 15 min. bei 1100 *rpm* zentrifugiert und in T-Zell-Medium resuspendiert. Sie wurden in einer 24-well Platte ausgesät und Stimulatoren (bestrahlte Splenozyten) zugefügt. Außerdem muss bei einer Restimulation, bzw. Passage Interleukin-2 (IL-2) zu den Kulturen hinzugegeben werden. Aktivierte T-Zellen benötigen diesen Faktor zur Proliferation. In der frischen MLR wird dieses Zytokin von Zellen produziert, die jedoch im Laufe längerer Inkubationszeiten zu Grunde gehen. Nach 4-6 Tagen Kultur können die Zellen erneut im Zytotoxizitätstest auf zytolytische Aktivität hin untersucht werden.

2.2.12. Zytotoxizitätstest

Die zytolytische Aktivität von T-Zellen wurde in einem standardisierten ⁵¹Chrom-Freisetzungstest ermittelt. Dieser dient als Funktionstest zur Untersuchung von zytotoxischen Effektorzellen. Er wurde in 96-well Rundbodenplatten durchgeführt und als Doppelwerte bestimmt. Als Targetzellen dienten Tumorzellen des Mausstammes, dessen Milzzellen als Stimulatoren in der MLR eingesetzt wurden, oder die Zellen, die in der MLTC als Stimulatoren dienten. Die entsprechende Menge Zellen wurde in 100 µl Medium aufgenommen, 50 µCi Na₂-⁵¹CrO₄ zugegeben, und eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert und der radioaktive Überstand entfernt. Anschließend wurde dreimal mit Medium gewaschen und auf eine Zellzahl von 5x10⁴ Zellen/ml eingestellt. Pro Ansatz wurden 100 µl der Zellsuspension pipettiert (= 5000 Zellen). Als Effektorzellen dienten die Zellen der MLR, bzw. MLTC. Diese wurden in sechs Titerstufen in Schritten von 1:2 eingesetzt (100µl/well). Zur Bestimmung der spontanen Freisetzung wurde zu den ⁵¹Chrom-markierten Zellen Medium anstelle von Effektorzellen hinzugefügt. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der radioaktiv markierten Zellen mit Detergens ermittelt. Die Zellen wurden für 4,5 bis maximal 8 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ kokubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde freigesetzte Radioaktivität in 100 µl Kulturüberstand im Gamma-counter gemessen.

Die spezifische Lyse wurde wie folgt errechnet:

$$\frac{\text{spezifische Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}}{\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}} \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

2.2.13. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Proteinexpressionsmuster von Zellen auf der Grundlage von Emission und Lichtbrechung untersucht werden. Dafür werden die Zellen in die partikelfreie schnell fließende Trägerflüssigkeit des Durchflusszytometers gebracht. Dabei werden sie einzeln hintereinander aufgereiht und fließen durch einen scharf gebündelten Laserstrahl. Jede Zelle erzeugt Signale durch Streuung des Lichts und die Emission von Fluoreszenz. Über Linsen, Spiegel und Filtersysteme wird die Strahlung auf Photodetektoren geleitet und verstärkt. Im *forward scatter* (FSC) wird das Vorwärtsstreulicht erfasst, das im 180°-Winkel durchgelassen wurde. Es gibt Informationen über die Größe der Zellen, während das im 90°-Winkel gemessene Seitwärtsstreulicht, erfasst im *side scatter* (SSC), Aussagen über die Granularität der Zellen erlaubt. Im Punktwolken-Diagramm (*dot blot*) stellen die

Zellen distinkte Populationen dar, die dann für die Analyse über ein Gate eingegrenzt werden können.

Haben Fluoreszenzmoleküle an die Zelloberfläche gebunden, so werden diese von dem Laserstrahl (Argonlaser, $\lambda=488\text{nm}$) angeregt und geben die absorbierte Energie in Form von Licht höherer Wellenlänge wieder ab. Dieses wird in den Detektoren in ein elektronisches Signal umgewandelt. Die Autofluoreszenz der Zellen wird durch Negativkontrollen ermittelt.

2.2.13.1. Immunfärbung für die Durchflusszytometrie

Die Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie ist eine immunzytochemische Färbung. Dabei können mit unterschiedlichen Farbstoffen markierte Antikörper unterschiedlicher Spezifitäten eingesetzt werden, um Zellen im selben Ansatz zu färben. Auf diese Weise können verschiedene Antigene auf einer Zelle dargestellt werden. Die Färbungen wurden in 96-well Rundbodenplatten mit den in Tabelle 1 aufgeführten Antikörpern durchgeführt. Dafür wurden pro Färbung $1-5 \times 10^5$ Zellen ausgesät.

Direkte Färbung membranständiger Antigene

Bei dieser Art der Färbung wurden monoklonale Antikörper eingesetzt, die direkt mit den Fluorochromen gekoppelt sind. In unseren Experimenten wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC)- und Phycoerythrin (PE)-konjugierte Antikörper verwendet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben ausgesät, für 5 min. bei 1100 rpm zentrifugiert, in 10 μl Blocking Reagenz (α F_c-Rezeptor, Hybridomüberstand von 2.4G2) resuspendiert und für 10 Minuten inkubiert. Dies dient dazu unspezifische Bindung der Antikörper an F_c-Rezeptoren zu verhindern. Anschließend erfolgte die Zugabe der Fluoreszenz-markierten Antikörper und die Zellen wurden für 15 Minuten unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in Röhrchen überführt und bis zur Messung in Dunkelheit auf Eis gehalten.

Indirekte Färbung membranständiger Antigene

Diese Art der Färbung wird durchgeführt, wenn man mit Antikörpern arbeitet, die nicht direkt mit den Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind. Dabei werden mit Fluorochrom-markierte, sekundäre Antikörper eingesetzt. Diese binden an die Primärantikörper und machen sie so der FACS-Analyse zugänglich.

Die Zellen wurden wiederum in 96-well Rundbodenplatten ausgesät, zentrifugiert und unspezifische Bindungsstellen geblockt (humanes ImmunglobulinG). Danach erfolgte die

Zugabe des Primärantikörpers. Es wurde für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper durch zwei Waschschrte mit FACS-Puffer entfernt. Nach Zugabe des Sekundärantikörpers folgte eine Inkubation von 15 Minuten unter Lichtausschluss auf Eis. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in Röhrcen bis zur Messung in Dunkelheit auf Eis gehalten.

2.2.13.2. Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung

Die Zellen wurden dann im Durchflusszytometer gemessen. Pro Ansatz wurden 10000 lebende Zellen aquiriert. Dafür wurde zu den einzelnen Proben jeweils Propidiumiodid hinzugegeben und ein *Gate* um die lebenden Zellen gelegt.

Die Auswertung erfolgte mit der Software CellQuest, bzw. FACS-Diva.

2.2.14. Histologien

Für die histologische Analyse der Organe transplanrierter Mäuse wurde ein Stück des jeweiligen Organs entnommen und in 4% Paraformaldehyd (PFA) eingelegt. Diese wurden anschließend in Paraffin eingebettet und am Mikrotom geschnitten (2.2.14.1). Für die weitere Analyse wurden die Gewebe deparaffiniert (2.2.14.2) und dann mit Hämalaun-Eosin gefärbt (2.2.14.3).

2.2.14.1. Einbettung der Gewebe in Paraffin

Für die Einbettung in Paraffin wurden die fixierten Gewebe zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Beginnend mit einer 50%igen Ethanollösung, gefolgt von 70%, 80%, 90% und 100% EtOH, wurden die Gewebe jeweils zweimal 30 min. bis 2h unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Der abschließende Entwässerungsschritt erfolgte durch Inkubation in Methylbenzoat.

Die Gewebe wurden dann über Nacht bei 56 °C in flüssigem Paraffin inkubiert. Um Rückstände des Methylbenzoats vollständig zu entfernen wurde das Paraffin noch einmal gewechselt. Anschließend setzte man den Ofen mit den Geweben in Paraffin für vier Stunden unter Unterdruck, um Luftblasen im Paraffinblock zu vermeiden. Die Gewebe wurden dann in Blöcke positioniert und mit Paraffin aufgegossen. Die Aushärtung erfolgte über Nacht. Das Schneiden der so gewonnenen Paraffinblöcke erfolgte am Mikrotom. Es wurden Schnitte von 7µm Dicke erzeugt, die auf Objektträger gebracht und über Nacht bei 40 °C getrocknet wurden.

2.2.14.2. Deparaffinierung der Gewebe

Für die weitere Färbung der Schnitte mussten die Gewebe zunächst vom Paraffin befreit werden. Dafür wurden die Objektträger für jeweils 5 min. in einer absteigenden Alkoholreihe inkubiert. Zunächst zweimal in Xylol, anschließend je zweimal in 100%, 90% und 70% EtOH. Daran schloss sich ein Waschschrift mit 1x PBS an. So konnten die Schnitte für Färbungen eingesetzt werden.

2.2.14.3. Hämalaun-Eosin Färbung (HE-Färbung)

Zur Erkennung der Histologien in den Gewebeschnitten wurden diese vom Paraffin befreit (2.2.14.2) und anschließend gefärbt. Die Kernfärbung erfolgte dann für sieben Minuten mit Hämalaun nach Meyer. Anschließend wurden die Gewebe mit H₂O gespült und mit HCl/Ethanol für 5 Sekunden differenziert. Daraufhin wurden die Objektträger mit den Schnitten für 15-20 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert und nochmals mit aqua dest. gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für 5-10 min. mit Eosin. Es schloss sich ein erneuter Waschschrift mit aqua dest. an. In 80% EtOH wurde 5 Sekunden differenziert und die Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (je zweimal 90%, 100% EtOH und 2x Xylol) entwässert.

Um die Objekte unter dem Mikroskop begutachten zu können wurden sie nach dem Entwässern mit Mowiol betropft und ein Deckgläschen auf die Schnitte gelegt. Das Mowiol härtete über Nacht bei 4 °C aus. So konnten die Gewebeschnitte unter dem Mikroskop angeschaut werden.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, über ein proliferationsbasiertes Verfahren *in vitro* stimulierte alloreaktive (gegen fremdes Gewebe aktivierte) T-Zellen von *in vitro* ruhenden Zellen zu separieren. Zu diesem Zweck wurden die immunreaktiven Zellen einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Mit jeder Teilung der so markierten Zellen halbiert sich die Intensität des Farbstoffes. Dies erlaubt eine Separation ruhender und proliferierender Zellen basierend auf der Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie und Zellsortierung. *In vivo* wurden dann die Effekte der auf diese Weise erhaltenen Zellfraktionen in murinen Systemen im Kontext einer T-Zell-depletierten Knochenmarktransplantation untersucht. Ziel war es die T-Zellvermittelte Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD) bei allogener Transplantation (Übertragung von Knochenmark zwischen genetisch nicht-identischen Individuen) zu vermeiden. Darüber hinaus wurde die Potenz der separierten Zellpopulationen bezüglich einer Unterstützung des Transplantat-anwachsens und Tumorkontrolle evaluiert.

Der erste Schritt der Untersuchungen war die Festlegung der Bedingungen für die *in vitro* Generierung, Markierung und Separation der T-Zellen.

3.1. Kulturbedingungen für die Generierung alloreaktiver T-Zellen

Die Gewinnung alloreaktiver, zytotoxischer T-Zellen (CTL) und die Überprüfung ihrer zytolytischen Aktivität waren für die Durchführung des Projekts von entscheidender Bedeutung. In initialen Experimenten wurden zunächst die Kulturbedingungen für die MLR geprüft und festgelegt. So musste sichergestellt sein, dass in der gemischten Lymphozytenreaktion eine spezifische allo-Aktivierung der T-Zellen erreicht werden konnte, und dass es nicht durch die Kulturbedingungen zu einer unspezifischen Aktivierung kam. Eine unspezifische Teilung der Zellen würde die Separation alloreaktiver T-Zellen aufgrund des Proliferationsverhaltens unmöglich machen.

Zum Ausschluss einer solchen unspezifischen Komponente der T-Zellstimulation wurde die Kultur der MLR zunächst mit unterschiedlichen Chargen fetalen Kälberserums (FKS, jeweils 10% des Kulturmediums) durchgeführt. Dabei wurden Produkte vier verschiedener Hersteller ausgetestet. Die Überprüfung der zytolytischen Aktivität erfolgte anschließend im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest (siehe 2.2.12). Wie in Abbildung 2 dargestellt, zeigten die Zellen, die mit der FKS-Präparation der Firma Sigma kultiviert wurden, die höchste zytolytische Aktivität. Ohne Stimulatoren kultivierte Lymphozyten zeigten im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest keine zytolytische

Aktivität (siehe Abb.3), also keine unspezifische Aktivität. Für alle folgenden Experimente wurde daher das Serum dieses Herstellers verwendet.

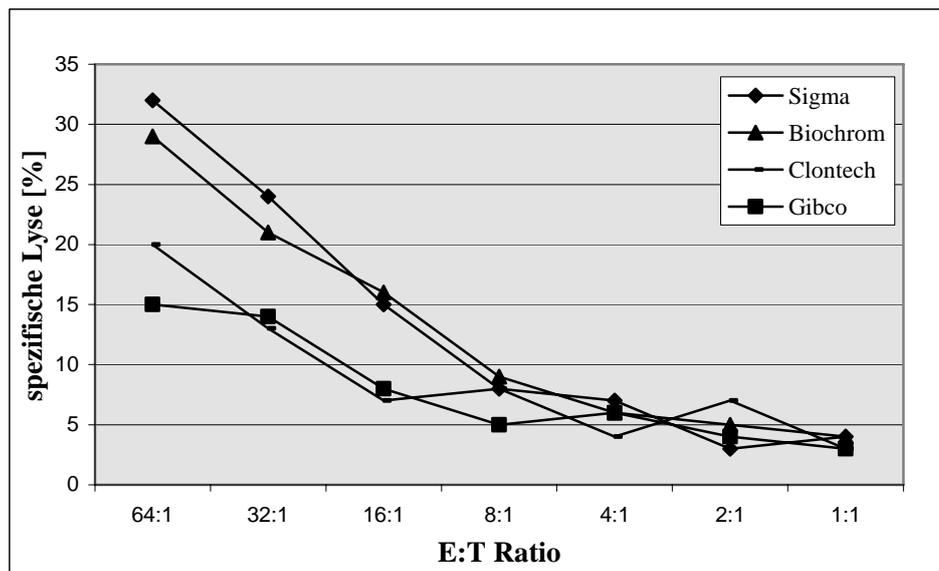


Abb.2: Prüfung verschiedener FKS-Chargen für die Kulturbedingungen der MLR: Splenozyten aus dem C3H-Mausstamm wurden mit Zellen einer DBA/2-Tumorzelllinie stimuliert; dem Medium wurden 10% FKS unterschiedlicher Chargen zugesetzt; die Messung der zytolytischen Aktivität erfolgte im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest. Präsentiert ist die spezifische Lyse in Prozent, die bei unterschiedlichen Effektor:Target-Verhältnissen erzielt wurde. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Zur Überprüfung der Spezifität der generierten CTL gegenüber den als Stimulator eingesetzten Zellen wurden in einer gemischten Lymphozyten- und Tumorzellkultur (MLTC) Splenozyten mit der aus dem Mausstamm DBA/2 stammenden Tumorzelllinie P815/B7 stimuliert. Im anschließenden $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest wurde neben P815/B7 eine weitere DBA/2 Tumorzelllinie (EB) als Zielzelle eingesetzt. Wie Abbildung 3 zeigt, wurde gegen P815/B7 eine deutlich höhere zytolytische Aktivität nachgewiesen als gegen EB. Da beide Zelllinien aus dem Mausstamm DBA/2 sind kommt es zu einer gewissen Kreuzreaktivität der aktivierten T-Lymphozyten gegenüber den Tumorzelllinien P815/B7 und EB. Dies legt den Schluss nahe, dass ein Teil der aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) DBA/2-spezifische Antigene erkennt, die von beiden Tumorzelllinien exprimiert werden, während andere wiederum Antigene erkennen, die spezifisch für die als Stimulator eingesetzte Tumorzelllinie, in diesem Fall P815/B7, sind. Setzte man als Kontrolle unstimulierte Splenozyten im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest ein, so ließ sich bei diesen keine zytolytische Aktivität nachweisen.

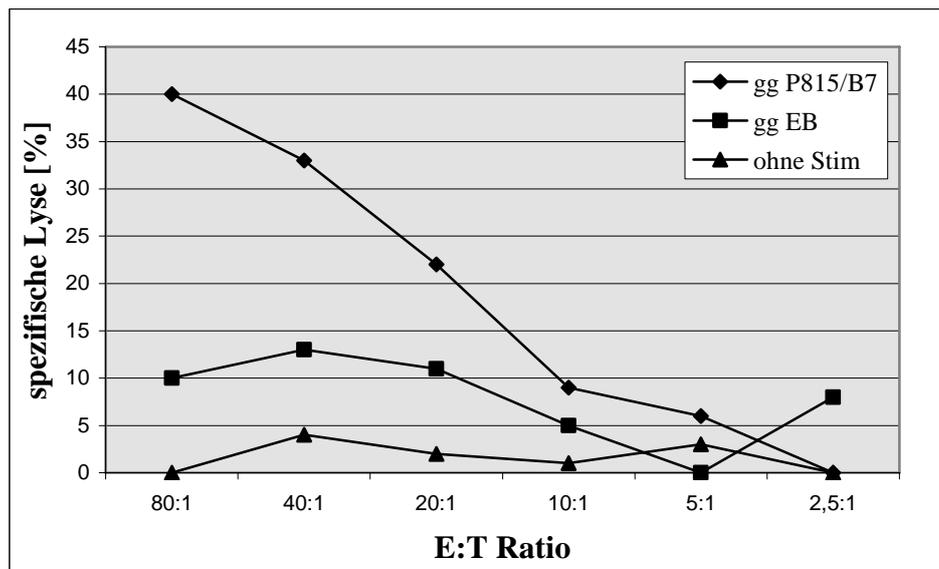


Abb.3: Spezifität der generierten CTL: C3H-Splenozyten wurden unstimuliert oder mit P815/B7-Zellen als Stimulatoren kultiviert; die Messung der zytolytischen Aktivität erfolgte im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest; als Zielzellen wurden P815/B7 oder eine weitere DBA/2-Tumorzelllinie (EB) eingesetzt. Die Abbildung fasst die Daten zweier Experimente zusammen. Dargestellt ist die spezifische Lyse in Prozent bei bestimmten Effektor:Target-Verhältnissen.

3.2. Ermittlung einer geeigneten Interleukin (IL)-2 Konzentration zur Passagierung der gemischten Lymphozytenreaktion

Um zeigen zu können, dass die ruhenden T-Zellen der MLR nach der Separation *in vitro* restimulierbar sind, wurden sie erneut in Kultur genommen und mit frischen Stimulatoren versetzt. Bei der Kultur einer MLR über einen längeren Zeitraum müssen regelmäßig neue Stimulatoren (bestrahlte Milzzellen, Antigen) zugegeben werden. Außerdem wird das Zytokin IL-2 zugesetzt, welches für die T-Zellproliferation sowie das T-Zellüberleben notwendig ist. In zu hoher Konzentration von IL-2 wird jedoch eine unspezifische T-Zellaktivierung induziert. Daher haben wir zu Beginn der Arbeiten zunächst eine geeignete IL-2-Konzentration ermittelt. Hierfür wurden in einer MLR alloreaktive T-Zellen gewonnen und diese mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem IL-2 passagiert.

Abbildung 4 stellt die Ergebnisse zweier Experimente dar. Kulturen, denen IL-2 in einer Konzentration von 10, bzw. 20 U/ml zugefügt worden war, zeigten die gleiche zytolytische Aktivität gegenüber den eingesetzten Zielzellen, wie Zellen, die ohne dieses Zytokin kultiviert wurden. Durch die Gabe von 50 U/ml IL-2 wurde eine höhere Lyse der Zielzellen bewirkt. Dies deutet daraufhin, dass dadurch bereits eine gewisse unspezifische Aktivierung bewirkt wurde. Wir haben aus diesem Grund in den folgenden Experimenten eine Konzentration von 20 U/ml des Zytokins eingesetzt.

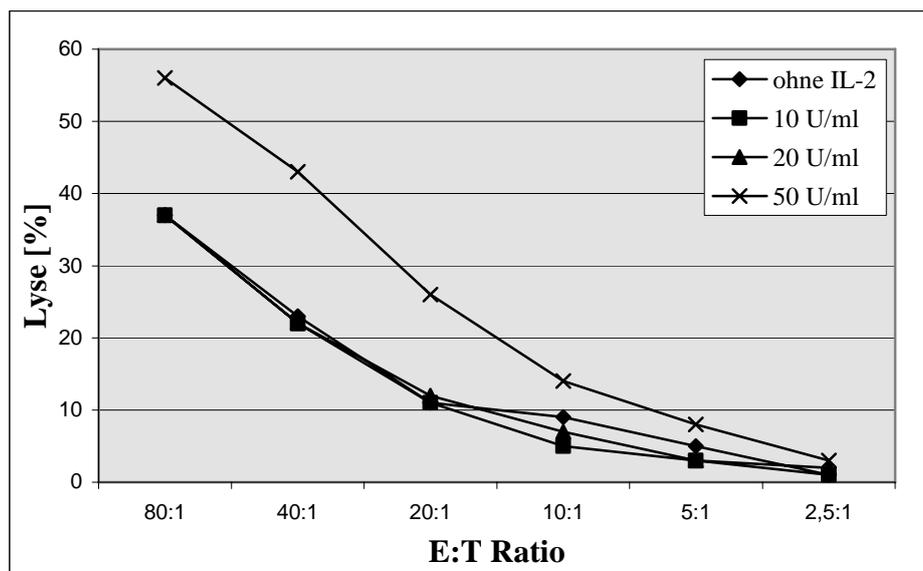


Abb.4: Ermittlung der geeigneten IL-2 Konzentration: C3H-Splenozyten wurden mit bestrahlten DBA/2-Milzzellen stimuliert. Nach 4 Tagen erfolgte eine Passage der Zellen und die Kulturen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des rekombinanten IL-2 versetzt. 5 Tage nach der Restimulation wurde die zytolytische Aktivität gegen eine Zelllinie des Stammes DBA/2 bestimmt. Aufgetragen wurde die prozentuale Lyse der Zielzellen (Targetzellen) bei unterschiedlichen Effektor:Target-Verhältnissen.

3.3. Markierung von Lymphozyten mit Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester

Nachdem die Kulturbedingungen für die *in vitro* Generierung und Passagierung zytotoxischer T-Zellen definiert waren, musste die Färbung der Splenozyten mit dem Farbstoff Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester (CFSE) etabliert werden. Da die ruhenden von proliferierenden Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität (hochfluoreszierend: „high“, bzw. niedrig fluoreszierend: „low“) separiert werden sollten, musste gewährleistet sein, dass eine gute Trennung der beiden Populationen erzielt wird. Zudem sollte es möglich sein, die Zellen mit anderen Fluorochromen gegenzufärben, um eine weitere Charakterisierung der einzelnen Zellfraktionen mittels Durchflusszytometrie vorzunehmen. Dazu musste zunächst die geeignete Konzentration des Farbstoffes ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Splenozyten aus dem Mausstamm C3H mit 0,5µM; 1µM; 3µM und 5µM CFSE gefärbt und für vier Tage mit P815/B7 (DBA/2-Tumorzelllinie) stimuliert. Mittels FACS-Analyse wurde dann ermittelt, welche der eingesetzten Konzentrationen für unsere Zwecke am besten geeignet war. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

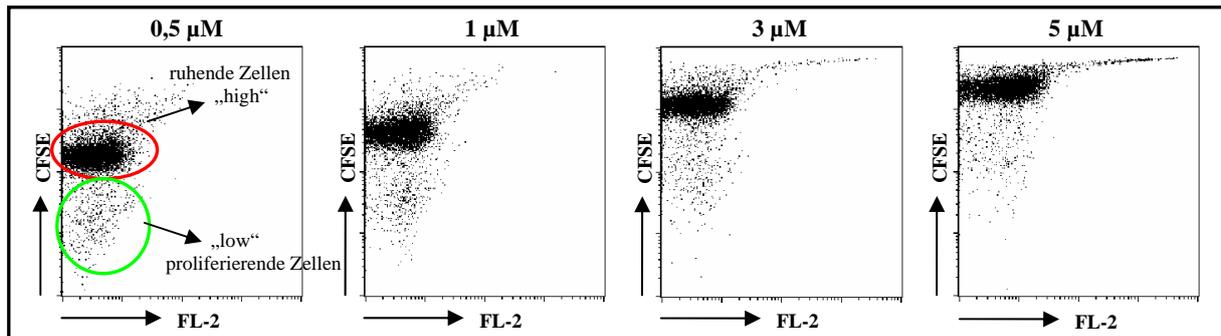


Abb.5: Ermittlung der geeigneten CFSE-Konzentration: C3H-Splenozyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Farbstoffes CFSE markiert und mit P815/B7-Tumorzellen stimuliert. Nach 4-tägiger Stimulation wurden die Zellen der MLTC durchflusszytometrisch analysiert.

Die Färbung mit 0,5µM CFSE erlaubt eine gute Kompensation des CFSE für die FACS-Analyse, die Trennung der beiden Populationen ist jedoch nur mäßig. Bei 5µM CFSE ist die Intensität des Farbstoffes so hoch, dass eine Gegenfärbung, insbesondere der Fraktion ruhender Zellen, für die weitere Charakterisierung nicht möglich ist. Für die Folgeexperimente wurde die Konzentration von 3µM CFSE gewählt. Hierbei erhält man eine gute Trennung von ruhenden und sich teilenden Zellen. Zudem ist die Intensität der Färbung so, dass sie eine Kompensation des CFSE für mögliche Gegenfärbungen in der FACS-Analyse erlaubt.

Zugleich wurde der Einfluss der CFSE-Färbung auf die Zytotoxizität der CTL untersucht. Milzzellen einer C3H-Maus wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des CFSE gefärbt und mit bestrahlten DBA/2-Splenozyten (MHC=H2^d) stimuliert. Nach fünf Tagen der Kokultur wurde die zytolytische Aktivität der Zellen gegen ein H2^d-Target gemessen. Wie in Abb.6 dargestellt konnte in allen Kulturen unabhängig von der gewählten CFSE-Konzentration die gleiche T-Zellaktivität nach *in vitro* Stimulation detektiert werden. Der Farbstoff hat also keinen Einfluss auf die Stimulation, Aktivierung und die lytische Aktivität der zytotoxischen T-Zellen.

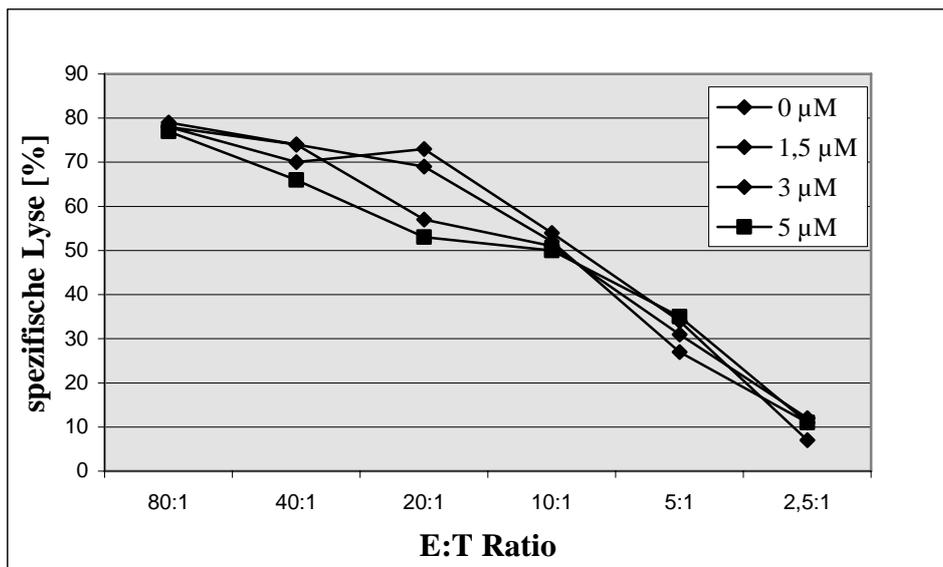


Abb.6: Einfluss der CFSE-Konzentration auf die zytolytische Aktivität: Splenozyten aus dem C3H-Mausstamm, markiert mit unterschiedlichen Konzentrationen des Farbstoffes CFSE wurden mit DBA/2-Milzzellen stimuliert und die Aktivität der generierten CTL im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest bestimmt. Der Farbstoff übt keinen Einfluss auf die Aktivierung und die lytische Aktivität der CTL aus. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier Experimente.

3.4. Bestimmung des geeigneten Zeitpunktes für die Separation und geeigneter Kriterien des Sortierens CFSE-markierter Lymphozyten

Um das Verfahren des Sortierens der CFSE-markierten Lymphozyten zu etablieren, musste neben der richtigen Konzentration des Farbstoffes auch der richtige Zeitpunkt für die Separation ermittelt werden. Separiert man zu früh besteht die Gefahr, dass in der Fraktion sich nicht teilender Zellen noch alloreaktive Zellen verbleiben, die *in vivo* eine GvHD auslösen könnten. Wartet man zu lange, gehen die ruhenden T-Zellen in Kultur zugrunde. Um einen positiven Effekt der ruhenden Fraktion zeigen zu können, muss diese aber vitale T-Zellen enthalten, die verbleibende Reaktivität gegenüber immunologischen Stimuli besitzen. Um den richtigen Zeitpunkt für das Sortieren der MLR zu ermitteln, wurde deshalb die Kinetik der *in vitro*-Proliferation bestimmt. Splenozyten einer C3H-Maus wurden mit $3\mu\text{M}$ CFSE gefärbt, mit bestrahlten DBA/2-Milzzellen stimuliert und von Tag eins bis fünf täglich im Durchflusszytometer gemessen. Dabei wurden der Anteil der T-Zellen sowie der Anteil der proliferierenden Zellen der MLR bestimmt. Wie in Abbildung 7 dargestellt erhält man bereits ab Tag 2 eine gute Trennung der ruhenden und proliferierenden Zellen, der Anteil der T-Zellen (Thy1.2^+) an der Fraktion sich teilender Zellen („low“-Fraktion) ist jedoch sehr gering. Sowohl die Zahl der proliferierenden Zellen als auch der Anteil T-Zellen in dieser Fraktion stiegen bis Tag 5 kontinuierlich an. An Tag 2 der Stimulation machten die Zellen der „low“-Fraktion (niedrige CFSE-Intensität) 17% der MLR aus, 4% waren Thy1.2^+ Zellen.

Einen Tag später hatten bereits 24% der Zellen deutlich an Intensität der CFSE-Färbung verloren, etwa die Hälfte der Zellen exprimierte das T-Zellantigen Thy1.2. Fünf Tage nach der Stimulation hatten sich 49% der Zellen geteilt. Nur ein Fünftel der proliferierenden Zellen waren keine T-Zellen. Es zeichnet sich jedoch ab, dass die Zahl der Thy1.2⁺-Zellen in der Fraktion der ruhenden Zellen („high“-Fraktion) zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich abnimmt. Drei Tage nach Beginn der Stimulation waren etwa ein Drittel der ruhenden Zellen Thy1.2⁺. An Tag 5 machten die T-Zellen jedoch nur noch ein Fünftel der „high“-Fraktion aus. Wir haben uns daher entschieden die Zellen an Tag 4 nach Stimulation zu sortieren und zu transplantieren.

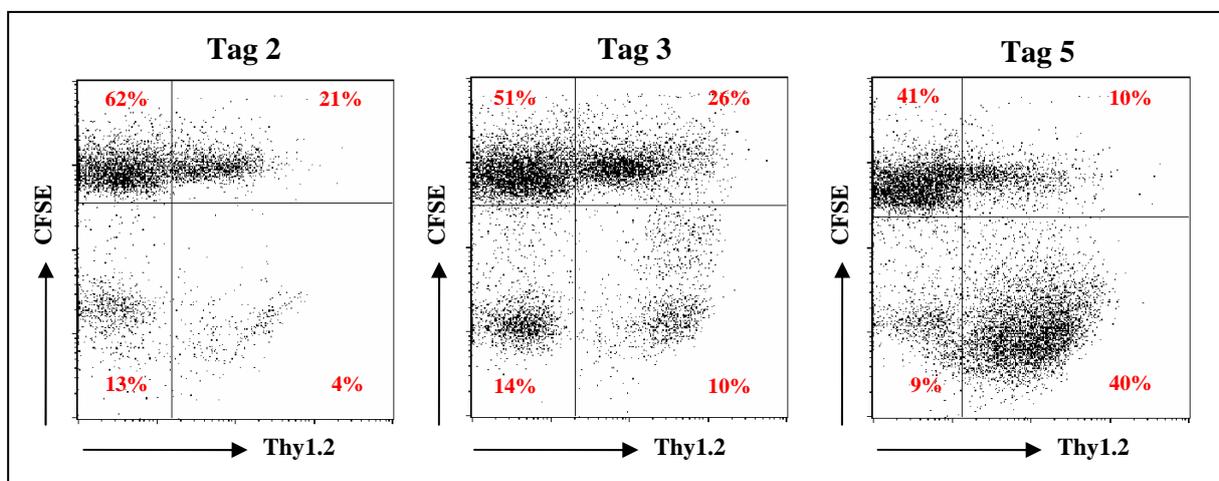


Abb.7: Kinetik der Proliferation und Anteil Thy1.2-positiver Zellen einer MLR: C3H-Milzzellen, mit 3 μ M CFSE markiert, wurden mit DBA/2-Splenozyten stimuliert (Daten von zwei Experimenten). Die Zellen wurden täglich durchflusszytometrisch analysiert und durch Färbung der Thy1.2⁺ Zellen der Anteil T-Zellen an den Fraktionen der ruhenden (hohe CFSE-Intensität) und proliferierenden (abnehmende CFSE-Intensität) Zellen bestimmt. Der Anteil proliferierender T-Zellen (Thy1.2⁺) nahm während einer fünftägigen Stimulation stetig zu. In der Fraktion der *in vitro* ruhenden Zellen war der Anteil vitaler T-Zellen an Tag 5 bereits abnehmend.

Um die Zahl der zu sortierenden Partikel zu reduzieren, wurden die vitalen Zellen im Anschluss an die Kultur und vor der Separation über einen Dichtegradienten (siehe 2.2.10) von toten Zellen und Debris gereinigt (siehe Abb.8). Dadurch konnte die Ausbeute der sortierten Zellen deutlich gesteigert und die Zeit des Sortierens verkürzt werden. Zum Sortieren wurden die folgenden Kriterien festgelegt: zunächst wurden die lebenden Zellen eingegrenzt (siehe Abb.8 B). Bestimmt wurden diese anhand des Scattergramms und initial auch durch eine Propidium-Iodidfärbung zur Darstellung toter Zellen.

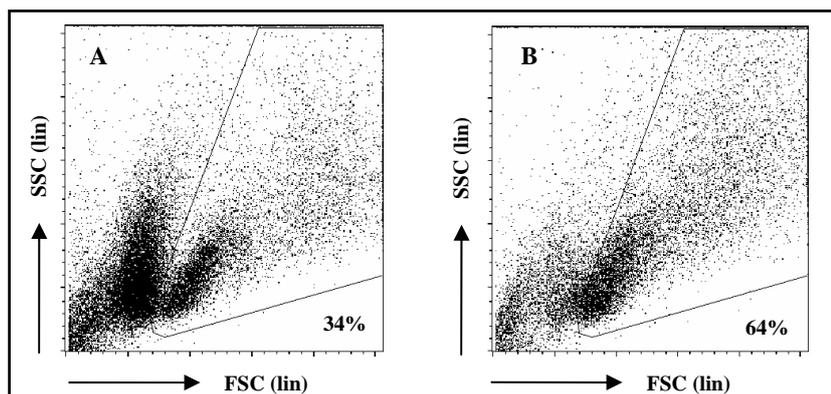


Abb.8: Aufreinigung der MLR nach 4 Tagen Stimulation: **A)** durchflusszytometrische Analyse der MLR-Kultur ohne Aufreinigung. **B)** durchflusszytometrische Analyse der MLR-Kultur nach Aufreinigung mit Lympholyte-M. Der Anteil vitaler Zellen (hier eingegrenzt durch ein *Gate*) wird dadurch deutlich erhöht. Dargestellt sind jeweils das Vorwärtsstreulicht (FSC) und das Seitwärtsstreulicht (SSC) der analysierten Zellen (siehe auch 2.2.13).

Als „high“-Fraktion wurden die Zellen sortiert, die während der Kultur nicht proliferierten, als „low“-Fraktion, die sich teilenden Zellen, die deutlich an Fluoreszenz-Intensität verloren haben. Abbildung 9 stellt die Eingrenzung der Fraktionen graphisch dar (links), außerdem eine Reanalyse der sortierten Zellen (Mitte), um die Reinheit der Fraktionen zu demonstrieren.

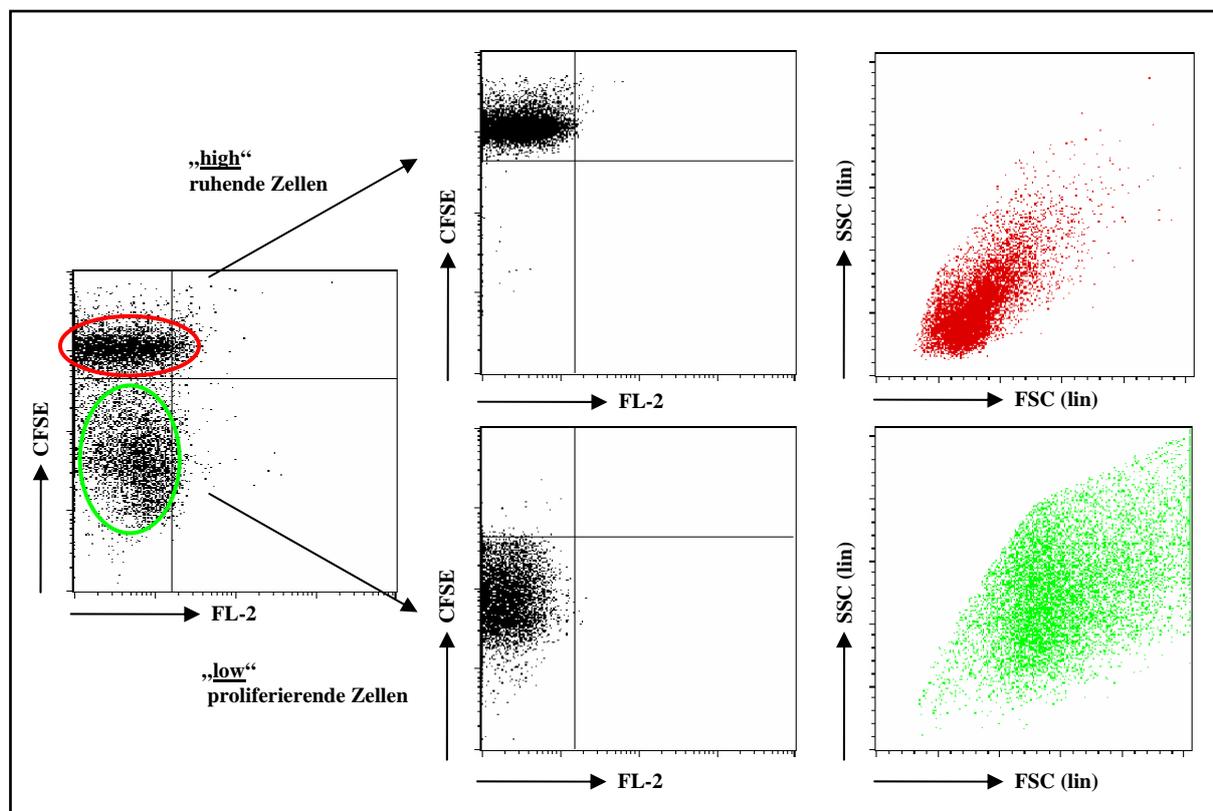


Abb.9: Gaten der zu sortierenden Fraktionen, Reanalyse und Phänotyp der sortierten Fraktionen: links: Zum Sortieren wurden die lebenden Zellen anhand des *Scattergramms* (siehe Abb.8) eingegrenzt; die „high“-Fraktion (rot) und die „low“-Fraktion (grün) wurden anhand der eingezeichneten *Gates* aufgrund der CFSE-Intensität (y-Achse) festgelegt und sortiert. Mitte: Reanalyse der sortierten Fraktionen. rechts: Phänotyp der sortierten Fraktionen im *Scattergramm*

(aufgetragen wurde *forward scatter* (FSC) gegen *side scatter* (SSC), siehe 2.2.13.): „high“-Fraktion bestehend aus kleinen granulären Zellen, die Zellen der „low“-Fraktion besitzen einen blastoiden Phänotyp.

Weiterhin wurde der Phänotyp der beiden Subfraktionen in der Durchflusszytometrie analysiert (rechts). Die ruhenden („high“-) Zellen stellen überwiegend kleine, wenig granuläre Zellen dar, während die Zellen der „low“-Fraktion einen blastoiden Phänotyp aufweisen. Dieses entspricht dem morphologischen Phänotyp aktivierter Lymphozyten.

3.5. Zytotoxische Aktivität der sortierten Zellfraktionen

Im Anschluss an die Separation wurden die beiden Fraktionen auf ihre zytolytische Aktivität hin analysiert. Dabei ergab sich im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest gegen ein allogenes Target (DBA/2-Tumorzelllinie), dass die Zellen der „low“-Fraktion eine erhebliche lytische Aktivität besitzen. Diese ist vergleichbar mit der Aktivität der Gesamt-MLR. Im Gegensatz dazu wird das allogene Target von den Zellen der „high“-Fraktion nicht erkannt (siehe Abbildung 10). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Zellen der „low“-Fraktion *in vivo* nach einer Transplantation das Potential besitzen eine Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (GvHD) zu induzieren, während die Zellen der „high“-Fraktion tolerant gegenüber Rezipientenzellen sein sollten.

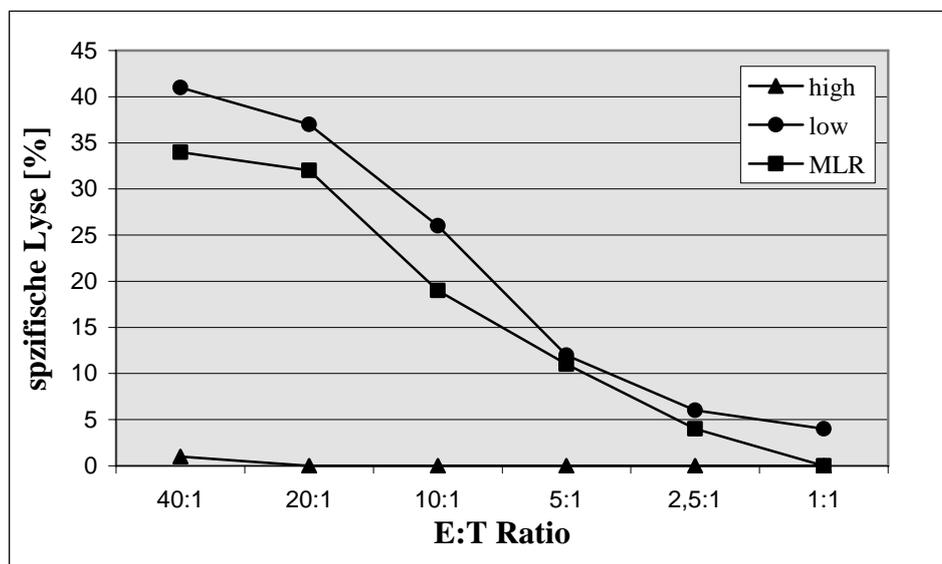


Abb.10: Zytolytische Aktivität der separierten Fraktionen: C3H-Splenozyten wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit Milzzellen des Stammes DBA/2 stimuliert, separiert und die zytolytische Aktivität der unseparierten MLR sowie der sortierten Fraktionen im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest gegen P815/B7 (DBA/2-Hintergrund) bestimmt: Zellen der „low“-Fraktion bzw. der unseparierten MLR lysierten eine allogene Zielzelle in vergleichbarer Weise, während durch die Zellen der „high“-Fraktion keine zytolytische Aktivität nachweisbar war. Aufgetragen wurde das Verhältnis der Effektoren (CTL) zu Targetzellen gegen die spezifische Lyse in Prozent.

3.6. Charakterisierung der sortierten „high“- und „low“-Fraktionen

Die weitere Charakterisierung der Subpopulationen der MLR erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Durch die Anfärbung von Oberflächenmolekülen, die für bestimmte Leukozytenpopulationen spezifisch sind, konnte die genaue Zusammensetzung der sortierten Zellpopulationen ermittelt werden. Die Subpopulationen der T-Helferzellen ($CD4^+$) und zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) wurden ebenso angefärbt wie B-Lymphozyten ($CD19^+$), natürliche Killerzellen (NK-Zellen, $CD49b^+$) und myeloische Zellen ($Gr-1^+$). In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der FACS-Analyse dargestellt. Die „low“-Fraktion besteht im Wesentlichen aus T-Zellen, wobei das Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen etwa 2:1 ist. Ein Großteil dieser T-Zellen exprimiert CD25 (IL-2 Rezeptor) auf der Oberfläche, ein Molekül, dessen Expression bei Aktivierung der T-Zellen induziert wird. B-Zellen ($CD19^+$) machen den restlichen Anteil der proliferierenden Zellen aus.

Auch die „high“-Fraktion wird hauptsächlich von T- und B-Zellen gebildet. Dabei ist in dieser Subpopulation jedoch der Anteil der B-Zellen höher als in der „low“-Fraktion. $CD19^+$ Zellen machen 50-60% der Fraktion aus. Das Verhältnis zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen liegt bei etwa 1:1, bzw. etwas auf Seiten der $CD4^+$ Zellen. CD25 wird in der Fraktion der ruhenden Zellen von nur sehr wenigen Zellen (4%) exprimiert. Weder in der „high“- noch in der „low“-Fraktion sind NK- und myeloische Zellen nachweisbar (gezeigt durch die fehlende Expression von $CD49b$ und $Gr-1$). Die hier dargestellten Daten sind repräsentativ für die verschiedenen Mäusestammkonstellationen, mit denen die Untersuchungen durchgeführt wurden. Dabei haben wir zum einen im MHC-disparaten System mit der Stammkonstellation C3H ($H2^k$) \rightarrow DBA/2 ($H2^d$) und C3H ($H2^k$) \rightarrow C57BL/6 ($H2^b$) gearbeitet, im MHC-identen System (BALB/c ($H2^d$) \rightarrow DBA/2 ($H2^d$)) und mit der haploidenten Konstellation C3H ($H2^k$) \rightarrow C3H \times DBA/2 F1 ($H2^{kxd}$). Außerdem wurden Splenozyten des Stammes BALB/c mit der Tumorzelllinie P815/B7 stimuliert.

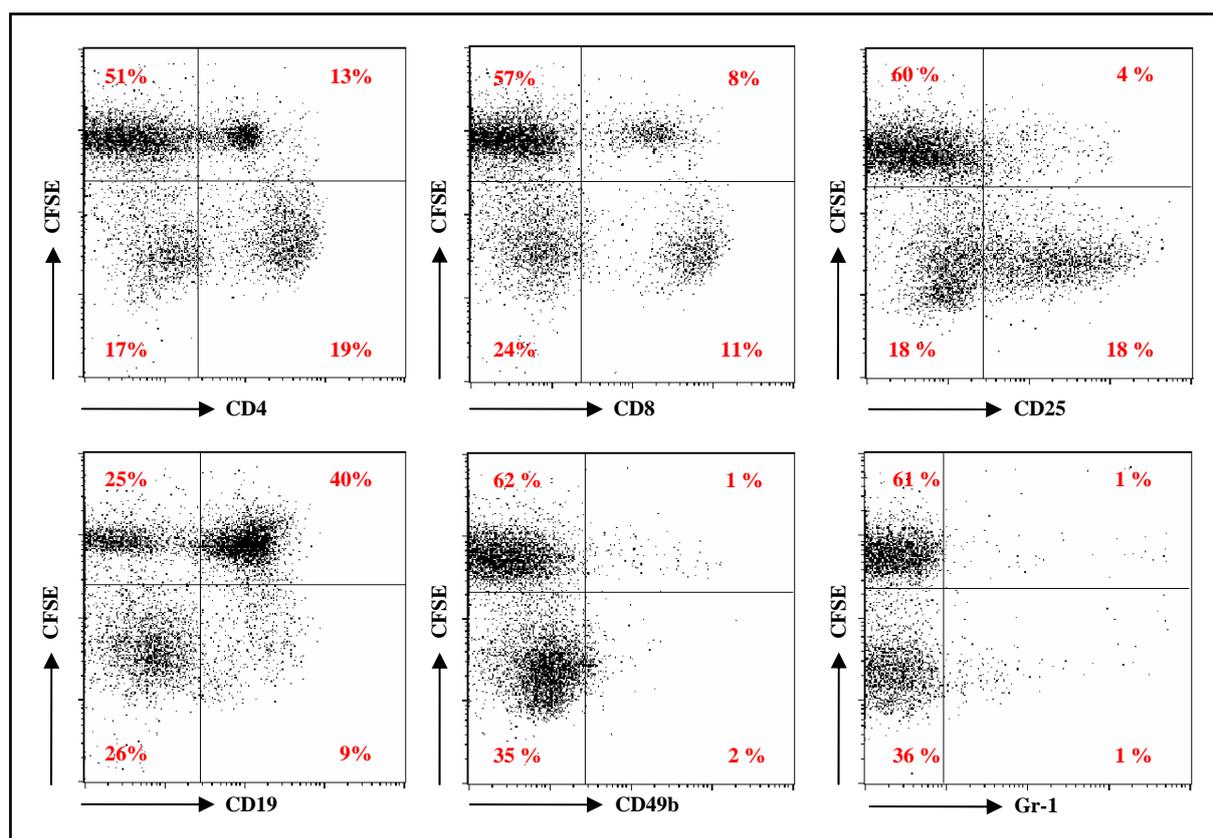


Abb. 11: Zelluläre Zusammensetzung der Subfraktionen der MLR: Splenozyten naiver C3H-Donoren wurden mit bestrahlten DBA/2-Milzzellen stimuliert und die zelluläre Zusammensetzung der Fraktionen der MLR mittels Gegenfärbung in der Durchflusszytometrie bestimmt. Gefärbt wurden spezifische Oberflächenmarker von T-Zellsubpopulationen (CD4, CD8, CD25), B-Zellen (CD19), NK-Zellen (CD49b) und myeloischen Zellen (Gr-1)

Tabelle 2 stellt zusammenfassend die Daten für den Anteil der T- und B-Lymphozyten an den separierten Fraktionen, „high“ und „low“, der verschiedenen Stammkonstellationen dar.

Tabelle 2: Anteil der T- und B-Lymphozyten an der „high“- und „low“-Fraktion der unterschiedlichen Konstellationen. Jeweils zusammengefasst sind die Ergebnisse von 4 Experimenten (1+2), bzw. 3 Experimenten (4, 5, 6) und 2 Experimenten (3).

	Konstellation	Fraktion	CD4 [%]	CD8 [%]	CD19 [%]
1	C3H α DBA/2	„high“	31 \pm 15	24 \pm 12	46 \pm 9
		„low“	59 \pm 15	17 \pm 3	29 \pm 5
2	BALB/c α DBA/2	„high“	23 \pm 6	14 \pm 2	51 \pm 9
		„low“	53 \pm 4	26 \pm 7	25 \pm 4
3	C3H _n α C3D2 F1	„high“	32	17	n.b.
		„low“	57	21	n.b.
4	C3H _{imm} α C3D2 F1	„high“	32 \pm 8	20 \pm 5	n.b.
		„low“	41 \pm 4	39 \pm 17	n.b.
5	C3H α C57BL/6	„high“	31 \pm 6	18 \pm 7	50
		„low“	48 \pm 13	35 \pm 7	18
6	BALB/c α P815/B7	„high“	28 \pm 2	12 \pm 1	43 \pm 13
		„low“	23 \pm 5	31 \pm 10	47 \pm 18

In der Konstellation 6 (BALB/c anti P815/B7) war die Zahl der proliferierenden Zellen zum Zeitpunkt der Separation deutlich niedriger, mit etwa 15-20% der Zellen der gemischten Lymphozyten und Tumorzellkultur (MLTC). Dies ist dadurch begründet, dass hier die BALB/c-Splenozyten nicht mit Milzzellen stimuliert wurden, sondern mit Mytomycin C (MMC) behandelten Tumorzellen. Das Spektrum der präsentierten Antigene wurde somit limitiert und eine geringere Anzahl T-Zellen aktiviert. Auch der Anteil der jeweiligen T-Zellpopulationen an der „high“- bzw. „low“-Fraktion war in dieser Kultur niedriger, im Vergleich zu Kulturen, in denen bestrahlte Splenozyten als Stimulatoren eingesetzt wurden. Der Anteil der B-Lymphozyten an der „low“-Fraktion nahm dagegen zu.

3.7. *In vitro* Restimulierbarkeit der sortierten Fraktionen

Damit der Transfer ruhender T-Zellen („high“-Fraktion) *in vivo* einen positiven Effekt hat, müssen die nicht proliferierenden Zellen Reaktivität gegen unverwandte Stimulatoren (*third party*-Antigene) zeigen können, um sowohl Infektionen als auch die zugrunde liegende maligne Erkrankung erfolgreich bekämpfen zu können.

Wir haben deshalb die Zellen einer MLR (C3H gegen C57BL/6) an Tag 4 sortiert und die sortierte „high“- Fraktion, sowie unsortierte MLR-Zellen *in vitro* mit dem ursprünglichen Target (C57BL/6-Splenozyten), oder unverwandten frischen Stimulatorzellen (DBA/2-Milzzellen) restimuliert. An Tag 5 nach der Restimulation wurden die Zellen im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt: Wurden die Zellen der unseparierten MLR gegen das ursprüngliche Target (C57BL/6) passagiert, so zeigten die Zellen im Assay eine gute zytolytische Aktivität gegen C57BL/6-Zellen (A). Bei den sortierten „high“-Zellen wurde keine Lyse der Zielzellen beobachtet (A). Auch *in vitro* gegen unverwandte Antigene restimuliert zeigten die Zellen der „high“-Fraktion keine zytotoxische Aktivität (B). Dagegen konnte jedoch gezeigt werden, dass in der unsortierten MLR eine zytolytische Antwort gegen ein unverwandtes neues Target (DBA/2) induziert werden kann (B). Dies zeigt, dass eine Restimulation der in der MLR kultivierten Zellen prinzipiell möglich ist, eine Stimulation der „high“-Zellen *in vitro* jedoch wahrscheinlich nicht ausreichend ist, um eine messbare Immunreaktion zu induzieren.

Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für die untersuchten Stammkonstellationen (siehe Tabelle 2). Durchgeführt wurden drei unabhängige Experimente.

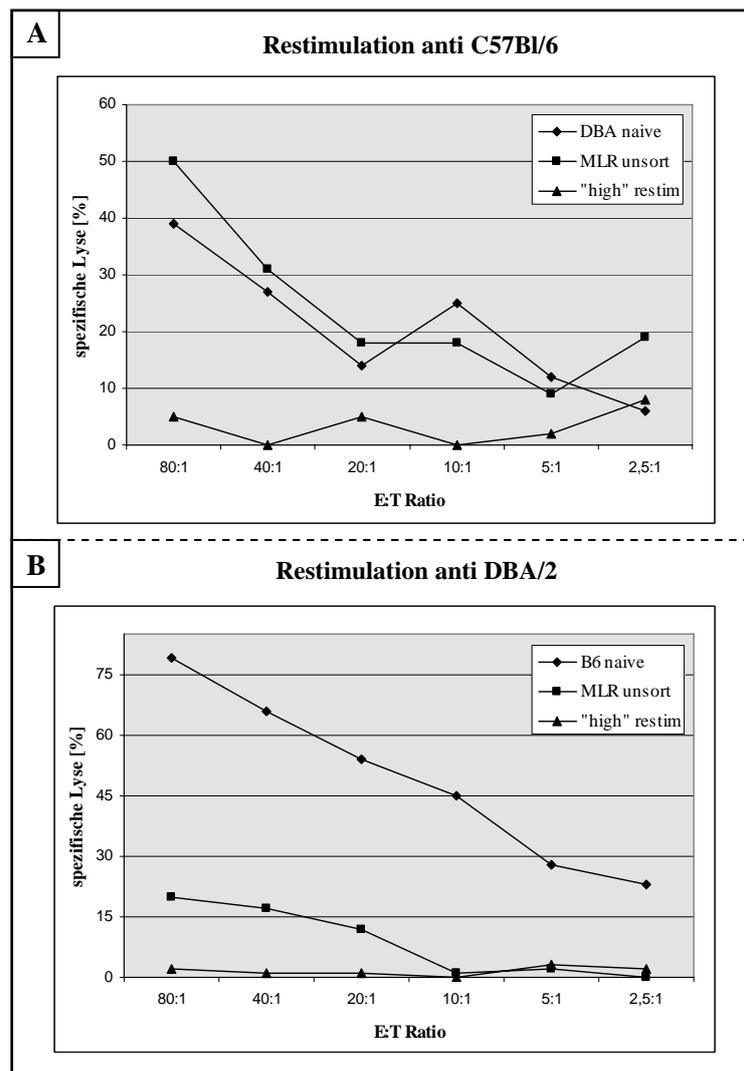


Abb.12: Restimulierbarkeit der *in vitro* ruhenden T-Zellen: C3H-Splenozyten wurden mit bestrahlten C57BL/6-Milzzellen stimuliert, die ruhenden Zellen an Tag 4 separiert und *in vitro* mit C57BL/6-Milzzellen (A) oder DBA/2-Splenozyten (B; *third party*) restimuliert. Die Zellen der unseparierten MLR wurden ebenfalls passagiert. Als Positivkontrollen wurden Splenozyten naiver (unbehandelter) Tiere stimuliert. Nach 5 Tagen der Kultur wurde die zytolytische Aktivität der Zellen im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest bestimmt. Zellen der unsortierten MLR konnten auch nach viertägiger Kultur gegen unverwandte Antigene (DBA/2-Splenozyten) aktiviert werden (B), während die Zellen der „high“-Fraktion keine lytische Aktivität gegenüber *third party*-Antigenen aufwiesen.

3.8. Etablierung der geeigneten Transplantationsbedingungen

Um die *in vivo*-Effekte der einzelnen Fraktionen („high“ und „low“) zu untersuchen, wurden die separierten Zellen der *in vitro*-Kulturen zusammen mit T-Zell-depletierem Knochenmark im murinen System transplantiert. Es sollte sowohl im MHC-disparaten, als auch im MHC-identen Modellsystem gearbeitet werden, um das Potential der übertragenen Zellen hinsichtlich der Induktion einer GvHD, sowie eines Graft-versus-Leukämie (GvL)-Effektes zu untersuchen. Dafür mussten zunächst, unabhängig von den durchgeführten Transplantationsmodellen, einige Voraussetzungen für die Transferexperimente geschaffen werden. So musste eine Methode für die Depletion der Thy1.2^+ Zellen aus dem Knochenmark der

Donortiere etabliert und die geeignete Bestrahlungsdosis zur Konditionierung der Rezipienten ermittelt werden.

3.8.1. T-Zell-Depletion

Um sicherstellen zu können, dass die von uns beobachteten *in vivo*-Effekte von T-Zellen in den zum Knochenmark addierten Fraktionen vermittelt wurden, sollten die im Spenderknochenmark enthaltenen T-Zellen depletiert werden. Dafür haben wir wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben das Separationssystem der Firma Miltenyi eingesetzt und immunomagnetisch die transferierten Knochenmarkzellen Thy1.2 (CD90) depletiert.

Abbildung 13 stellt das Ergebnis einer solchen Depletion dar. Vor der Separation sind im Knochenmark der Spendertiere etwa 2-5% Thy1.2⁺ Zellen enthalten. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen, mittels einer Färbung gegen das Oberflächenmolekül CD3 (Pan T-Zellmarker), nach der Elimination zeigt, dass die T-Lymphozyten nahezu komplett aus dem zu transferierenden Knochenmark entfernt wurden. Der residuelle Anteil von T-Zellen am übertragenen Knochenmark betrug regelmäßig unter 0,5%.

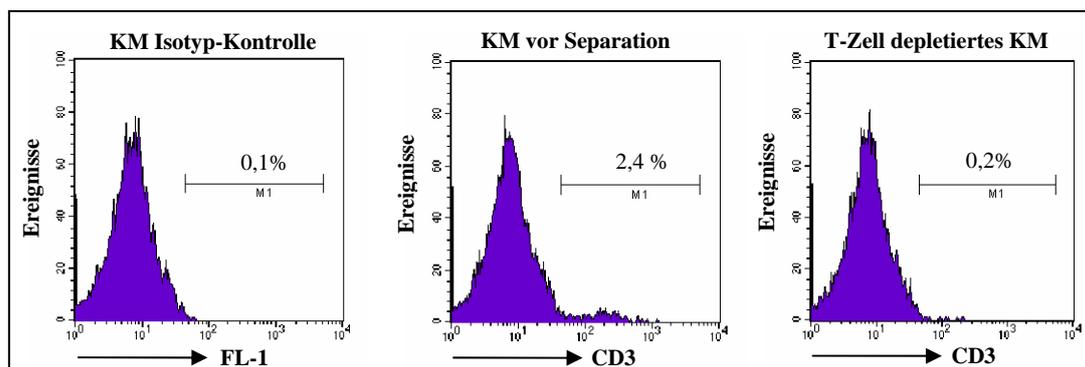


Abb. 13: Depletion Thy1.2⁺ Zellen aus dem Knochenmark: Die Knochenmarkszellen der Donortiere wurden mit Hilfe des MACS-Systems von Thy1.2⁺ Zellen befreit. Die Effizienz der Depletion wurde durchflusszytometrisch mittels CD3-Färbung erfasst.

3.8.2. Bestrahlungsdosis

Ein weiteres wichtiges Kriterium der Transplantationsbedingungen stellt die Konditionierung der Empfängertiere dar. Dies dient dazu das Immunsystem des Rezipienten weitestgehend zu eliminieren und so ein Anwachsen der transferierten Zellen zu gewährleisten. Zu diesem Zweck haben wir die Empfängertiere vor dem Transfer mit einer Cäsium¹³⁷ Quelle gamma-bestrahlt (siehe 2.2.3.3). Dabei haben wir zunächst eine Dosis von 10 Gy gewählt. Es zeigte sich jedoch, dass es nach dieser Konditionierung in einem Großteil der Fälle zu einer Repopulation der Tiere mit Rezipientenzellen kam. Die applizierte Dosis war subletal. Dadurch kommt es zu einem Überleben von Rezipienten-T-Zellen, die dann transplantierte

Donorzellen abstoßen. Aus diesem Grund haben wir im Folgenden die Bestrahlungsdosis auf 14 Gy erhöht. Auf diese Weise wurden eine endogene Rekonstitution der Rezipiententiere sowie eine Abstoßung der transferierten Zellen verhindert (Daten nicht gezeigt).

3.9. Etablierung eines Tumormodells

Für die Beobachtung des GvL-Effektes, vermittelt durch im Transplantat enthaltene immunkompetente Zellen, war es von Bedeutung ein geeignetes Tumormodell zu etablieren. In Vorexperimenten mussten Tumordosis und Wachstumskinetik etabliert werden. Eine weitere Vorbedingung ist, dass ein etablierter Tumor durch die Konditionierung vor der Knochenmarktransplantation (KMT) nicht in seinem Wachstum beeinträchtigt wird.

Als Modelltumor haben wir die Mastozytomzelllinie P815/B7 gewählt. Dieser Tumor auf DBA/2-Hintergrund ist mit dem murinen B7.1 (CD80, kostimulatorisches Molekül der T-Zellaktivierung) transfiziert und ist hochimmunogen. In unbehandelten DBA/2- und BALB/c-Tieren wird dieser Tumor in der Mehrzahl der Tiere abgestoßen. Die Abstoßung wird dabei durch CD8⁺ T-Zellen vermittelt (Gajewski *et al.* 1996).

Eine wichtige Bedingung für den Einsatz in unseren Versuchen war, dass ein etablierter Tumor in seinem Wachstum nicht durch die Konditionierung der Rezipienten mittels Bestrahlung beeinträchtigt wird. In initialen Experimenten zur Dosisfindung wurde daher das Wachstum der Tumore in bestrahlten und syngen (genetisch identisch) transplantierten BALB/c- und DBA/2-Tieren nach subcutaner (s.c.) Inokulation von 5×10^6 bzw. 1×10^7 Zellen untersucht (siehe Abb.14). Dabei konnte in jedem Fall ein Auswachsen der Tumore gezeigt werden, das bedeutet, der Tumor wurde durch die Konditionierungstherapie nicht beeinträchtigt. Durch die hohe Zahl inokulierter P815/B7-Zellen ist eine Abstoßung jedoch nicht möglich. In Folgeexperimenten wurden Tumorzelldosen von 2×10^6 oder 5×10^5 Zellen pro Tier für die Tumorinduktion gewählt. Beide Zellzahlen erlaubten ein Auswachsen des Tumors nach Transplantation T-Zell-depletierter Knochenmarks, ermöglichten jedoch auch eine Abstoßung nach syngener Transplantation, bzw. auch dann, wenn ausschließlich ein Tumor induziert wurde.

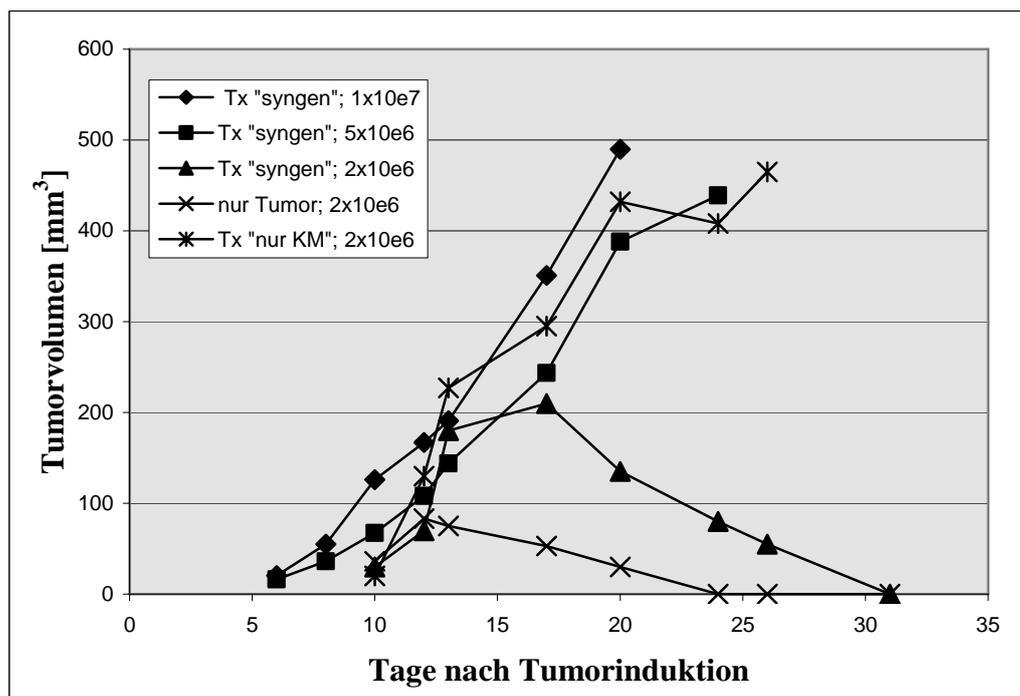


Abb.14: Etablierung eines Tumormodells: Zunächst wurden 1×10^7 , bzw. 5×10^6 Zellen der Tumorzelllinie P815/B7 subcutan in DBA/2-Rezipienten injiziert, anschließend erfolgte die Konditionierung der Tiere durch Bestrahlung, und eine syngene Transplantation von T-Zell-depletiertem Knochenmark zusammen mit $1,5 \times 10^7$ Splenozyten. Der Tumor wuchs in jedem Fall aus. Daraufhin wurde eine Dosis von 2×10^6 Zellen inokuliert. Nach syngener Transplantation erfolgte eine Abstoßung des Tumors, wurde T-Zell-depletiertes KM übertragen wuchs der Tumor aus. Induzierte man einen Tumor (2×10^6) ohne nachfolgende Bestrahlung und Transplantation, so wurde eine Abstoßung beobachtet.

3.10. Etablierung des MHC-disparaten Transplantationsmodells

Neben dem Tumormodell zur Beobachtung des GvL-Effektes musste ein Transplantationsmodell gefunden werden, das es ermöglicht eine GvHD zu induzieren. Zunächst wurde ein MHC-*mismatch* Modell gewählt. Donor und Rezipient sind vollständig disparat in den MHC-Klasse I und II-Molekülen. Als Donoren dienten Mäuse vom Stamm C3H (MHC H2^k), Rezipienten waren DBA/2-Tiere (MHC H2^d). Initial wurden Vorexperimente durchgeführt, bei denen 3×10^7 Zellen unseparierte naive oder präaktivierte Splenozyten zusammen mit 5×10^6 Knochenmarkzellen (nicht T-Zell-depletiert) in sublethal bestrahlte Rezipienten übertragen wurden. Neun Tage nach dem Transfer wiesen die Tiere Anzeichen einer schweren GvHD, wie Gewichtsverlust, struppiges, stumpfes Fell, zusammengekauerte Haltung und einer verminderte motorische Aktivität, auf (siehe Abb.15).



Abb.15: DBA/2-Tiere: links: gesunde unbehandelte Kontrolltiere, rechts: allogene transplantierte Rezipiententiere (C3H → DBA/2) mit typischen Anzeichen einer GvHD: struppiges, stumpfes Fell, zusammengekauerte Haltung, reduzierte motorische Aktivität.

Bei Auftreten der Anzeichen einer GvHD wurden die Tiere der histologischen und durchflusszytometrischen Analyse zugeführt. Für die histologische Untersuchung wurden Organe, mit Paraformaldehyd fixiert, für die angenommen wurde, dass sie in Folge einer GvHD-Induktion Veränderungen aufweisen. Dazu zählen: Leber und Milz, außerdem Dickdarm und Haut. Um die leukozytäre Zusammensetzung der Milz- und Knochenmarkzellen zu untersuchen wurden die Zellen aus Rezipiententieren isoliert und in der Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 16 stellt die Ergebnisse der FACS-Analyse der Vorexperimente im MHC-disparaten System dar. Durchgeführt wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils drei Tieren pro Gruppe.

In Kontrolltieren, in diesem Fall einer unbehandelten DBA/2-Maus, sind etwa 30% der aus der Milz stammenden Leukozyten Thy1.2^+ (T-Lymphozyten). Dabei beträgt die physiologische CD4:CD8-Ratio ca. 3:1. Myeloische Zellen sind in Milzen unbehauelter Tiere kaum nachzuweisen, hier dargestellt durch die Expression des Markers Gr-1, der von der Mehrzahl der myeloischen Zelltypen exprimiert wird (Hestdal *et al.* 1991). Sie machen nur ca. 2% der Zellen aus. Im Knochenmark der analysierten Kontrolltiere haben B-Lymphozyten (angefärbt durch den Pan-B-Zellmarker B220) einen Anteil von etwa 30%. Die übrigen Zellen sind überwiegend myeloischen Ursprungs.

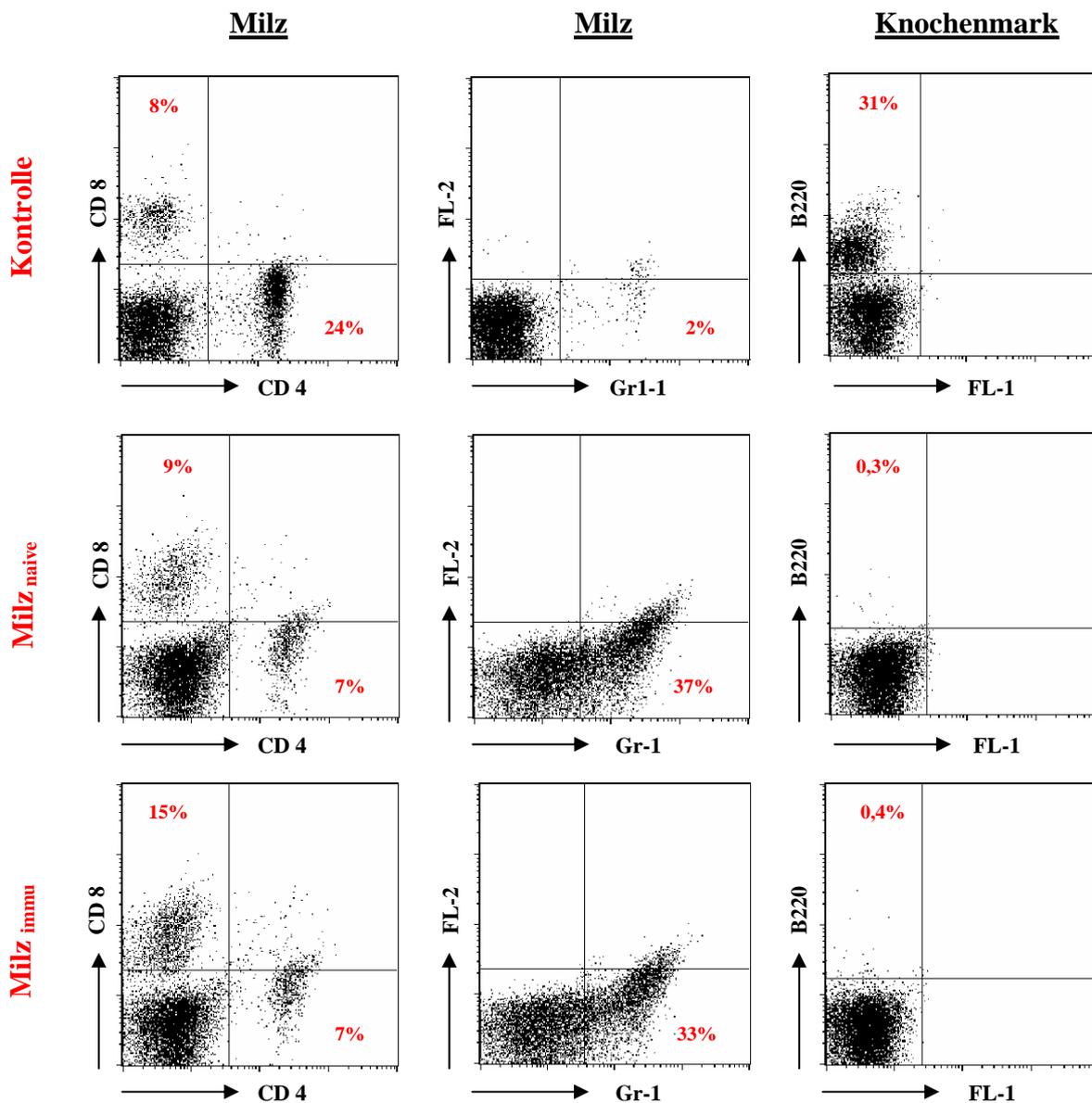


Abb. 16: Leukozytäre Zusammensetzung reisolierter Milz- und Knochenmarkszellen 9 Tage nach allogener Transplantation (C3H → DBA/2): Die Expression spezifischer Oberflächenmarker für T-Zellpopulationen (Helferzellen CD4, zytotoxische T-Zellen CD8), B-Lymphozyten (B220) und myeloische Zellen (Gr-1) wurde in unbehandelten Kontrolltieren sowie Rezipienten naiver bzw. präimmunisierter Milz durchflusszytometrisch bestimmt: Verschiebung der CD4/CD8-Ratio mit zunehmender Stärke der induzierten GvHD und Fehlen der B-Lymphozyten im KM. Anstieg der Myelopoese in der Milz allogenen transplantierten Tiere. Zusammengefasst sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente, in denen drei Tiere pro Gruppe untersucht wurden.

Wurden DBA/2-Tiere mit naiven C3H-Zellen transplantiert, verschob sich bei Einsetzen einer GvHD das Verhältnis der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu Gunsten der CD8⁺ Zellen. Die Ratio war dann 1:1.

Einen zusätzlichen Marker für das Entstehen einer GvHD stellt das Fehlen von B-Zellen dar: Für Mensch und Maus ist beschrieben, dass ein Fehlen der B-Zellen im Knochenmark mit der Entwicklung einer GvHD korreliert (Storek *et al.* 1993; Storek 2002). Bei den hier

untersuchten Rezipienten naiver C3H-Splenozyten fehlten B-Zellen fast vollständig sowohl im Knochenmark als auch in der Milz, während die Anzahl der myeloischen Zellen (Gr-1^+) in der Milz deutlich anstieg. Übertrug man Milzzellen einer gegen den Rezipienten präimmunisierten C3H-Maus so war die induzierte GvHD noch ausgeprägter, dokumentiert durch eine Verschiebung der CD4/CD8-Ratio (1:2). B-Zellen fehlten ebenfalls vollständig, während die Myelopoese in der Milz stark zunahm (33% Gr-1^+ Zellen).

Untersuchte man die zytolytische Aktivität der in der Milz enthaltenen T-Lymphozyten im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest gegen Zellen des Rezipientenstammes, so konnte Zytotoxizität dieser gegen Zellen des Empfängers nachgewiesen werden (siehe Abb. 17). Dabei zeigten die T-Zellen, die aus Milzen von Rezipienten immunisierter Splenozyten reisoliert wurden eine noch höhere Aktivität gegen den Empfänger als die Zellen von Rezipienten naiver Donorzellen. Dies korrelierte mit den Ergebnissen der FACS-Analyse, die ergab, dass der Anteil zytotoxischer, CD8^+ , T-Zellen bei Rezipienten präaktivierter Splenozyten höher war als bei Empfängern naiver Milzzellen.

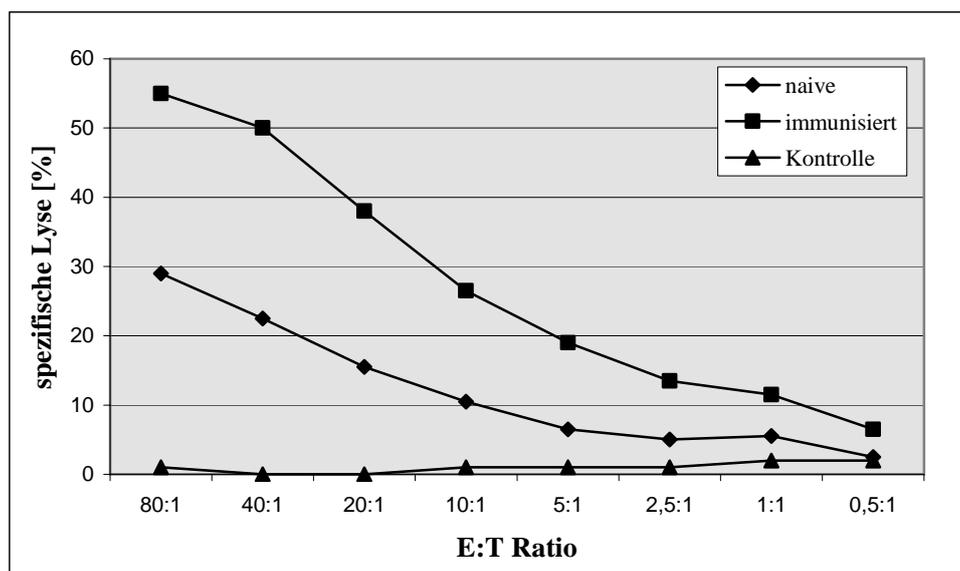


Abb.17: Zytolytische Aktivität reisolierter Splenozyten gegenüber Rezipientenzellen: Milzzellen der Rezipienten (C3H \rightarrow DBA) sowie Splenozyten eines unbehandelten Kontrolltieres wurden isoliert und im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest die zytolytische Aktivität gegen Empfängerzellen (DBA/2) gemessen. Zytolytische Aktivität reisolierter Donorzellen gegenüber einer vom Rezipientenstamm stammenden Zelllinie korrelierte mit der Stärke einer induzierten GvHD. Höhere spezifische Lyse nach Transplantation präaktivierter Donorsplenozyten als nach Transfer naiver Splenozyten.

3.11. MHC-disparates Transplantationsmodell (C3H → DBA)

Nachdem in den oben beschriebenen Vorexperimenten die Induzierbarkeit einer GvHD, auch ohne vorherige Immunisierung der Donoren, gezeigt werden konnte, wurde dieses Modell für weitere Experimente ausgewählt. Naive C3H-Splenozyten wurden *in vitro* mit bestrahlten Milzzellen des Stammes DBA/2 allostimuliert und proliferierende von ruhenden T-Zellen wie unter 3.4 beschrieben separiert. Die erhaltenen Fraktionen, „high“ und „low“, wurden zusammen mit 1×10^7 T-Zell-depletierten Knochenmarkzellen in letal bestrahlte Empfängertiere transplantiert. Dabei wurde jeweils die gleiche Anzahl T-Zellen (8×10^5 Zellen/Tier) übertragen. Als Kontrollen dienten Rezipienten, die ausschließlich T-Zell-depletiertes Knochenmark erhielten und Tiere, die als Donorlymphozyten unseparierte MLR-Zellen bzw. Splenozyten bekamen. Sobald die Tiere nach der Transplantation Anzeichen einer GvHD aufwiesen (zwischen Tag 7-10) wurden sie der Analyse zugeführt.

3.11.1. Anwachsen der transferierten hämatopoetischen Zellen

Zunächst wurde bei der Analyse der transplantierten Tiere das Anwachsen der transferierten Zellen, das *Engraftment*, untersucht. Dafür wurde der Anteil Donorzellen ($H2-K^{k+}$) in der Milz bestimmt. Unterschieden wurde dabei zwischen dem Anteil der Donorzellen an der gesamt T-Zellpopulation, sowie dem Anteil, den die Donorzellen an den übrigen Leukozyten ausmachen. Die Spenderzellen wurden durchflusszytometrisch anhand der MHC Klasse I-Expression identifiziert.

Abbildung 18 stellt die dabei erhaltenen Daten graphisch dar. Bei Tieren, die nur mit T-Zell-depletiertem Knochenmark transplantiert wurden, machten die residuellen Rezipientenzellen einen wesentlichen Anteil der reisolierten Splenozyten aus.

Bei Addition der ruhenden Zellen der MLR („high-Fraktion“) zum Knochenmark wurde ein gemischter Chimärismus beobachtet. Etwa 2/3 der T-Zellen in der Milz stammten vom Donor, wohingegen der Anteil der Empfängerzellen an den restlichen Leukozyten (B-Zellen, myeloische Zellen) noch deutlich höher lag (etwa 70%).

Nach Zugabe alloreaktiver Zellen in Form der „low“-Fraktion, unseparierter MLR oder C3H-Milzzellen wurden die residuellen Rezipientenzellen nahezu komplett eliminiert. Donorzellen machen 80-90% der reisolierten Splenozyten aus, in der Population der T-Zellen stammten etwa 90% der Zellen vom Spender, während der Anteil der restlichen Leukozyten bei durchschnittlich 70-80% lag.

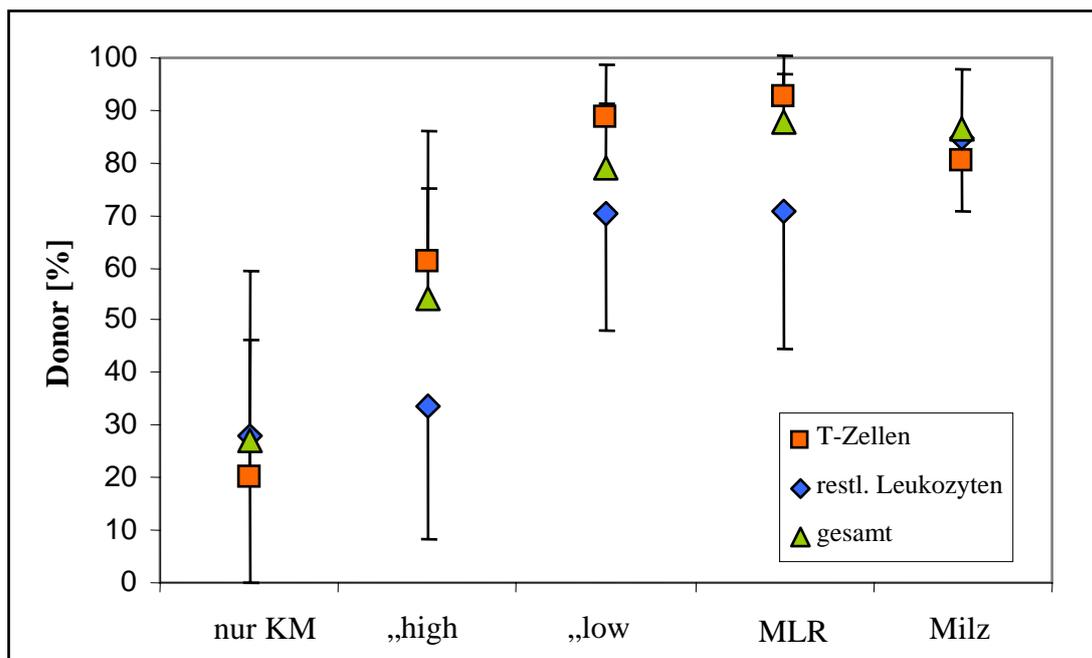


Abb.18: Engraftment nach Transplantation im MHC-disparaten Modell: Weitestgehend kompletter Donorchimärismus sowohl lymphytischer, als auch myeloischer Zellen nach Transplantation von Knochenmark zusammen mit den Zellen der „low“-Fraktion, unseparierter MLR oder Milzzellen. Nach Zugabe der „high“-Fraktion: gemischter Chimärismus der T-Lymphozyten, während myeloische Zellen überwiegend vom Rezipienten stammten. Nach Transplantation T-Zell-depletierter Knochenmarks waren nahezu ausschließlich Empfängerzellen nachweisbar. Hier sind zusammenfassend die Daten der durchflusszytometrischen Analyse vier unabhängiger Experimente dargestellt. Pro Gruppe wurden in jedem Versuch mindestens drei Tiere untersucht.

3.11.2. Durchflusszytometrische Analyse von Milz und Knochenmark nach KMT

Um die zelluläre Zusammensetzung der Leukozyten zu bestimmen wurden wiederum Milz- und Knochenmarkzellen der Empfängertiere isoliert und für eine Messung in der Durchflusszytometrie wie in 2.2.13. beschrieben gefärbt.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse von Milz und Knochenmark der Rezipienten zwischen Tag 7 und 10 nach Transfer wurden die in Abbildung 19 dargestellten Ergebnisse erhalten. Insgesamt wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt, in denen folgende Gruppen, von je 3-4 Tieren, gebildet wurden: transplantiert wurde T-Zell-depletierendes Knochenmark allein, oder zusammen mit den Zellen der „high“-Fraktion, der „low“-Fraktion, den Zellen der unsortierten MLR oder frisch isolierten Donorsplenozyten des Stammes C3H. Mit jeder der Fraktionen wurden 8×10^5 T-Lymphozyten übertragen.

In den einzelnen Darstellungen der Abbildung 19 ist jeweils der prozentuale Anteil positiv gefärbter Zellen, sowie die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe und die Anzahl der Tiere, die den dargestellten Phänotyp aufwiesen, angegeben.

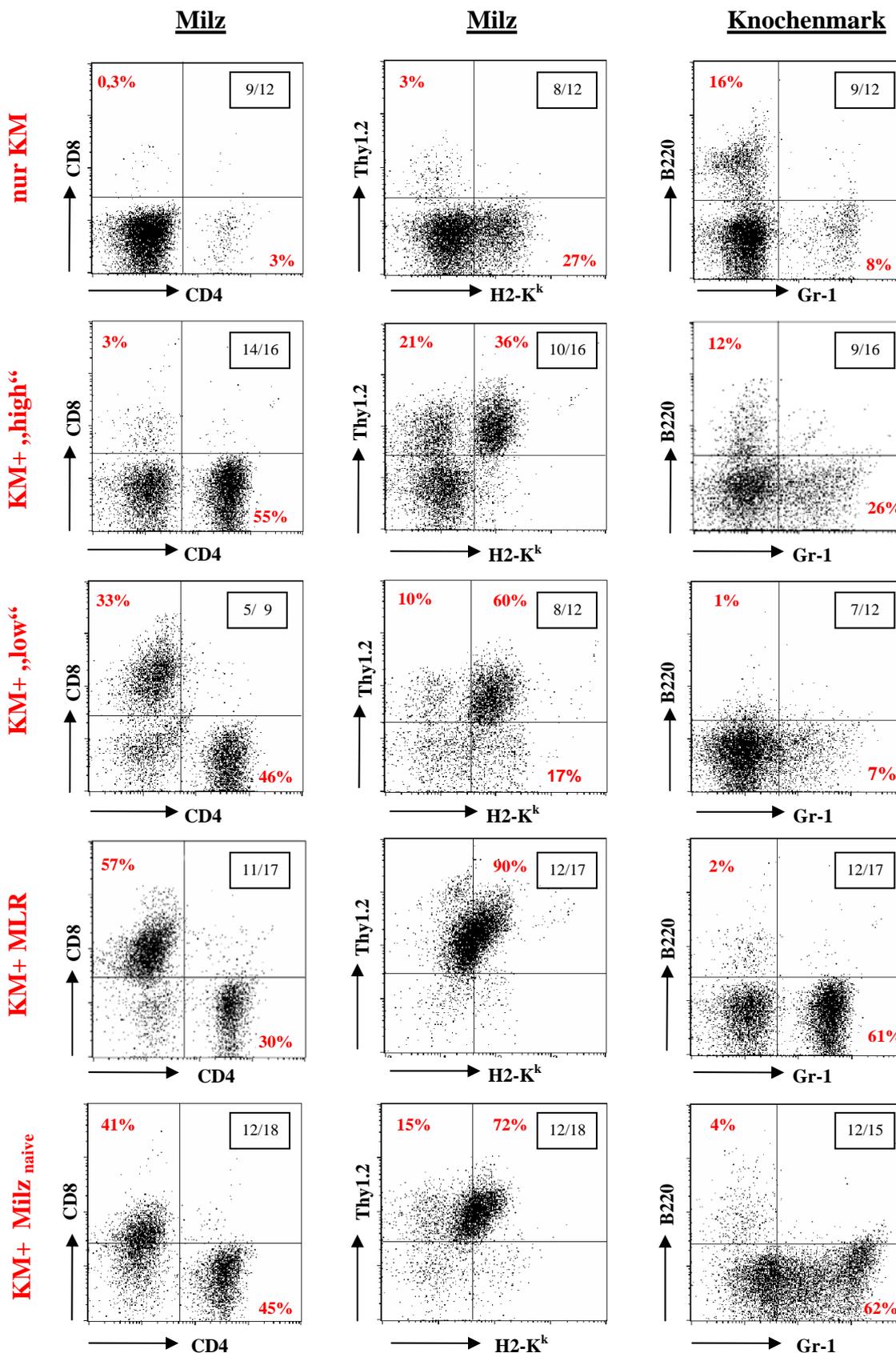


Abb.19: Expression leukozytärer Oberflächenmarker in Milz und Knochenmark von Rezipiententieren nach allogener Transplantation im MHC-diparaten Modellsystem (C3H → DBA/2): In Milzen der Empfänger von Knochenmark allein wurden keine Donor-T-Zellen gezeigt, jedoch sind vom Donor stammende Zellen (H2-K^k) nachweisbar. Rezipienten der „high“-Fraktion wiesen einen gemischten lymphatischen Chimärismus auf (CD4⁺ T-Zellen überwogen). Im

Knochenmark konnten B-Lymphozyten gezeigt werden, die das Fehlen einer GvHD dokumentieren. In den Milzen der Empfänger alloreaktiver Zellen („low“, unseparierte MLR, bzw. Donorsplenozyten) waren nahezu ausschließlich Donorlymphozyten präsent. Die CD4/CD8-Ratio war zugunsten der CD8⁺ Zellen verschoben. B220⁺ Zellen fehlen im Knochenmark dieser Behandlungsgruppen nahezu vollständig. Im Knochenmark der „low“-Rezipienten sind zudem kaum Gr-1⁺ Zellen nachweisbar. Dies dokumentiert eine schwere GvHD in Empfängern alloreaktiver Zellen. Die Analyse der Rezipienten erfolgte 7-10 Tage nach Transplantation. Die Anzahl der untersuchten Tiere sowie die Zahl derer, die den dargestellten Phänotyp aufwiesen, sind in der oberen rechten Ecke der Darstellung angegeben.

Tiere, die ausschließlich T-Zell-depletiertes Knochenmark erhalten hatten, zeigten residuelle, vom Rezipienten stammende CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (Thy1.2⁺) in der Milz. Daneben fand man Thy1.2⁻/H2-K^{k+} Donorzellen, die die beginnende Donorhämatoese repräsentieren. Im Knochenmark konnten bei Rezipienten, die nur Knochenmarkzellen erhalten haben, etwa 16 % B-Lymphozyten (B220⁺) nachgewiesen werden. Der Anteil myeloischer Zellen (Gr-1⁺) lag bei 8%, wobei es sich überwiegend um reife Granulozyten (Gr-1^{high}) handelte.

Empfänger der „high“-Fraktion zusammen mit Knochenmark zeigten eine große Anzahl CD4⁺ und Thy1.2⁺ Zellen in der Milz. Etwa 2/3 der T-Lymphozyten stammen vom Donor, 1/3 der T-Zellen waren residuelle Rezipientenzellen. Die Zellen der restlichen Lymphopoese in der Milz der „high“-Rezipienten sind H2-K^k-negativ. Sie stammen damit ebenfalls vom Empfänger. Im Knochenmark sind myeloische Zellen, dargestellt durch die Expression des Markers Gr-1, nachweisbar. Hier waren sowohl frühe (Gr-1^{low}) als auch ausreifende (Gr-1^{intermediate}) Zellen myeloischen Ursprungs vorhanden. Im Knochenmark der „high“-Rezipienten ließ sich eine Anzahl von B-Lymphozyten nachweisen (12%), die der in Empfängern von Knochenmark allein gezeigten entsprach.

Die analysierten Milzen von Rezipienten der „low“-Fraktion, unseparierter MLR oder Donorsplenozyten bestanden nahezu ausschließlich aus T-Lymphozyten (80-90%), wobei es sich im Wesentlichen um Donorzellen handelte. Im Gegensatz zu den Organen der Empfänger von T-Zell-depletiertem Knochenmark allein, bzw. nach Zugabe der „high“-Fraktion, überwogen in den Milzen der Tiere, die alloreaktive Zellen mit dem depletierten Knochenmark erhalten haben, CD8⁺ T-Zellen. Nach der Gabe unseparierter MLR kam es zu einer Umkehr der Ratio von CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren. Addierte man die Zellen der „low“-Fraktion oder naive Splenozyten zum Knochenmark, war das Verhältnis 1:1. Empfängerzellen waren in den Rezipienten dieser Gruppen nahezu komplett eliminiert. In den Milzen dieser Empfängertiere konnten nur sehr wenige H2-K^k-negative Zellen gezeigt werden. B-Lymphozyten waren im Knochenmark dieser drei

Rezipientengruppen praktisch nicht nachweisbar. Dieses wurde als ein Indiz für die Induktion einer GvHD gewertet.

3.11.3. Histologische Ergebnisse

Um das GvHD-induzierende Potential der einzelnen Fraktionen weiter zu untersuchen, wurden neben der Analyse von Milz und Knochenmark in der Durchflusszytometrie, Organe der transplantierten Tiere begutachtet.

Die makroskopische und die histologische Analyse der Milzen und Lebern transplantiert Tiere ergaben folgende Befunde: Makroskopisch zeigten die Lebern der „high“- und der Knochenmarkrezipienten keine Anzeichen einer GvHD. Die Milzen der Empfänger von MLR- und „low“-Zellen dagegen wiesen bereits makroskopisch Anzeichen einer GvHD auf (siehe Abb.20): Sie waren ödimatös verändert, mit gelblichem Kolorit (Ikterus).

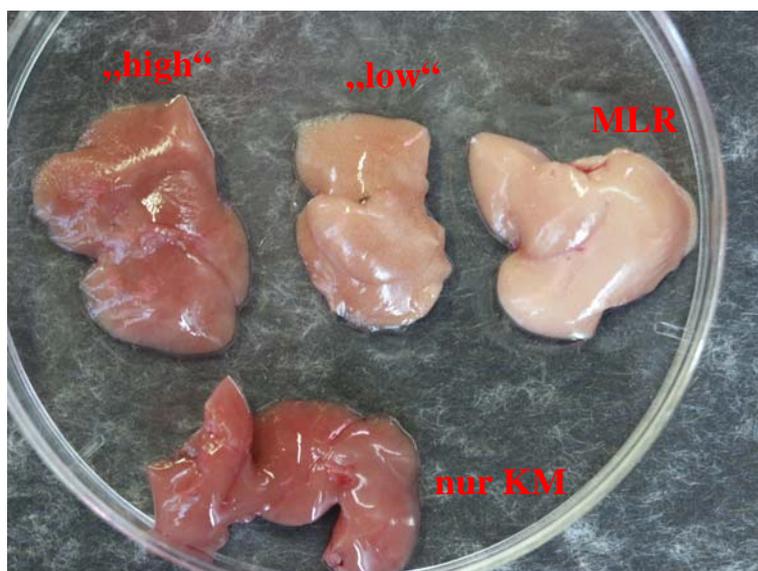


Abb.20: Makroskopische Aspekte der Lebern transplantiert Tiere (d10): Die Organe der Rezipienten von T-Zell-depletiertem Knochenmark und der „high“-Fraktion wiesen ein normales Aussehen auf, während die Lebern der Rezipienten alloreaktiver Zellen (MLR, „low“-Fraktion) eine deutlich hellere, leicht gelbliche Färbung zeigten.

Auch histologisch ließ sich die Destruktion der Leberzellen von Rezipienten alloreaktiver Zellen dokumentieren. Abbildung 21 stellt repräsentative Ergebnisse dieser Analysen dar. Die Hämalaun-Eosin (HE)-gefärbten Organschnitte der KM- und „high“-Rezipienten (A) zeigten eine intakte Struktur der Leberläppchen und der Zentralvenen, während die Lebern der Tiere, die die „low“-Fraktion erhalten haben, eine ausgeprägte Destruktion der Organstrukturen aufwiesen (B). Sie zeigten große Felder von Nekrosen (Pfeile) und lymphozytäre Infiltrationen.

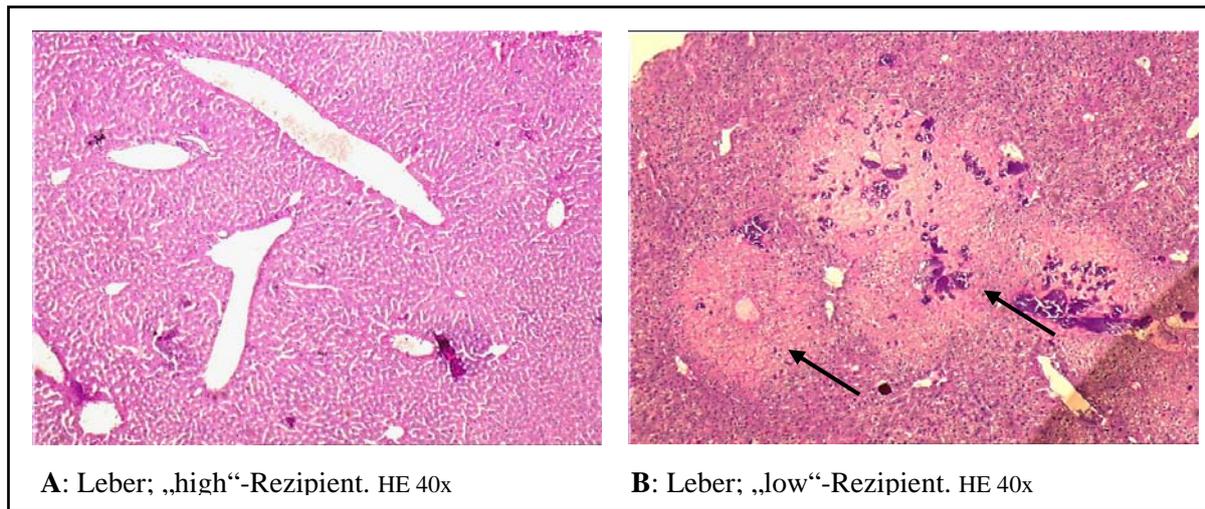


Abb.21: Mikroskopische Aspekte der Lebern allogren transplantierten Tiere: Lebern der „high“-Rezipienten weisen eine intakte Struktur der Leberläppchen auf (A), während Organe der Empfänger alloreaktiver Zellen (B) große Regionen von Nekrosen enthalten (Pfeile). Zudem sind Lymphozyteninfiltrate nachweisbar. Organschnitte Paraformaldehyd-fixierter Lebern allogren transplantierten Tiere (C3H → DBA). HE Färbung.

Ein ähnliches Bild zeigte sich, wenn man Schnittpräparate der Milzen analysierter Tiere mikroskopisch untersuchte. Abbildung 22 stellt die Ergebnisse der Analyse dar:

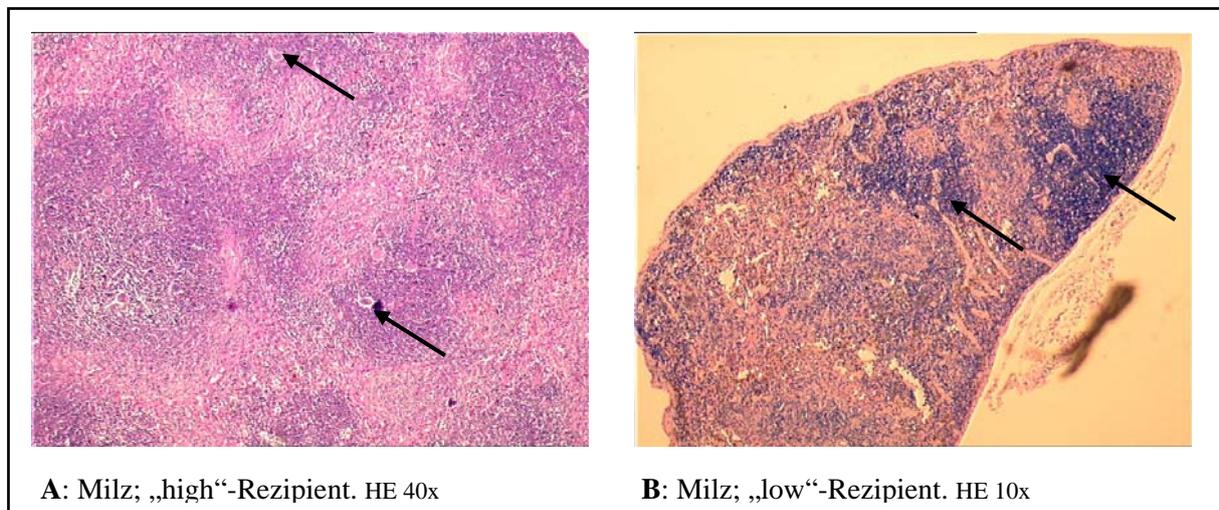


Abb.22: Mikroskopische Aspekte der Milzen allogren transplantierten Tiere: Milzen der „high“-Rezipienten (A) zeigen abgegrenzte Lymphozytenregionen sowie rekonstituierende Hämatopoese, wie zum Beispiel Megakaryozyten (Pfeile). Milz-Präparate der „low“-Rezipienten (B) dagegen weisen fibröse und nekrotische Regionen auf sowie vereinzelte Leukozyteninfiltrate (Pfeile). Organschnitte Paraformaldehyd-fixierter Milzen allogren transplantierten Tiere (C3H → DBA). HE Färbung.

Wie auch bei den Lebern wiesen die Milzen der KM- und „high“-Rezipienten keine Veränderungen der Struktur auf (A). Man erkannte deutlich abgegrenzte Lymphozytenregionen. Daneben sind Zellen rekonstituierender Hämatopoese, wie zum Beispiel Megakaryozyten (Pfeile) auszumachen. Dagegen wiesen die Milzen der „low“-Rezipienten

deutliche Merkmale einer Organdestruktion auf. Die Struktur der Milz war komplett zerstört, zudem zeigte sich eine massive Infiltration von Lymphozyten (Pfeile). Hierbei handelte es sich nahezu ausschließlich um Donor-T-Zellen, wie die durchflusszyto-metrische Analyse belegte (siehe Abb.19, low gefärbt mit α -H2-K^k/Thy1.2).

3.11.4. *Ex vivo* Restimulierbarkeit der übertragenen „high“-Fraktion

Zellen der „high“-Fraktion ließen sich direkt nach dem Sortieren *in vitro* nicht gegen *third-party Targets* (unverwandte Antigene) restimulieren. Dies kann mit verschiedenen Faktoren, wie den Kulturbedingungen, oder der Stimulatorpräparation in Zusammenhang stehen. Die Analysen der Rezipiententiere zeigen, aber dass die transferierten Zellen den Rezipienten repopulieren (siehe Abb.19). Um die *in vivo*-Potenz der transferierten „high“-T-Zellen zu evaluieren wurden die Splenozyten von „high“-Rezipienten reisoliert und in Kultur erneut stimuliert. Dabei sollte gezeigt werden, dass die transferierten T-Zellen in der Lage sind Immunreaktionen auszuführen. Nur dann ist ein Vorteil gegenüber der Transplantation von Knochenmark allein zu postulieren, für die Kontrolle möglicher Infektionen sowie für die Tumorkontrolle. Abbildung 23A zeigt, dass 2/3 der reisolierten T-Zellen (dargestellt durch die Expression von Thy1.2) vom Donor stammten. Die Zellen wurden erneut mit dem Farbstoff CFSE markiert und *in vitro* mit Splenozyten einer C57BL/6-Maus kokultiviert, bzw. restimuliert.

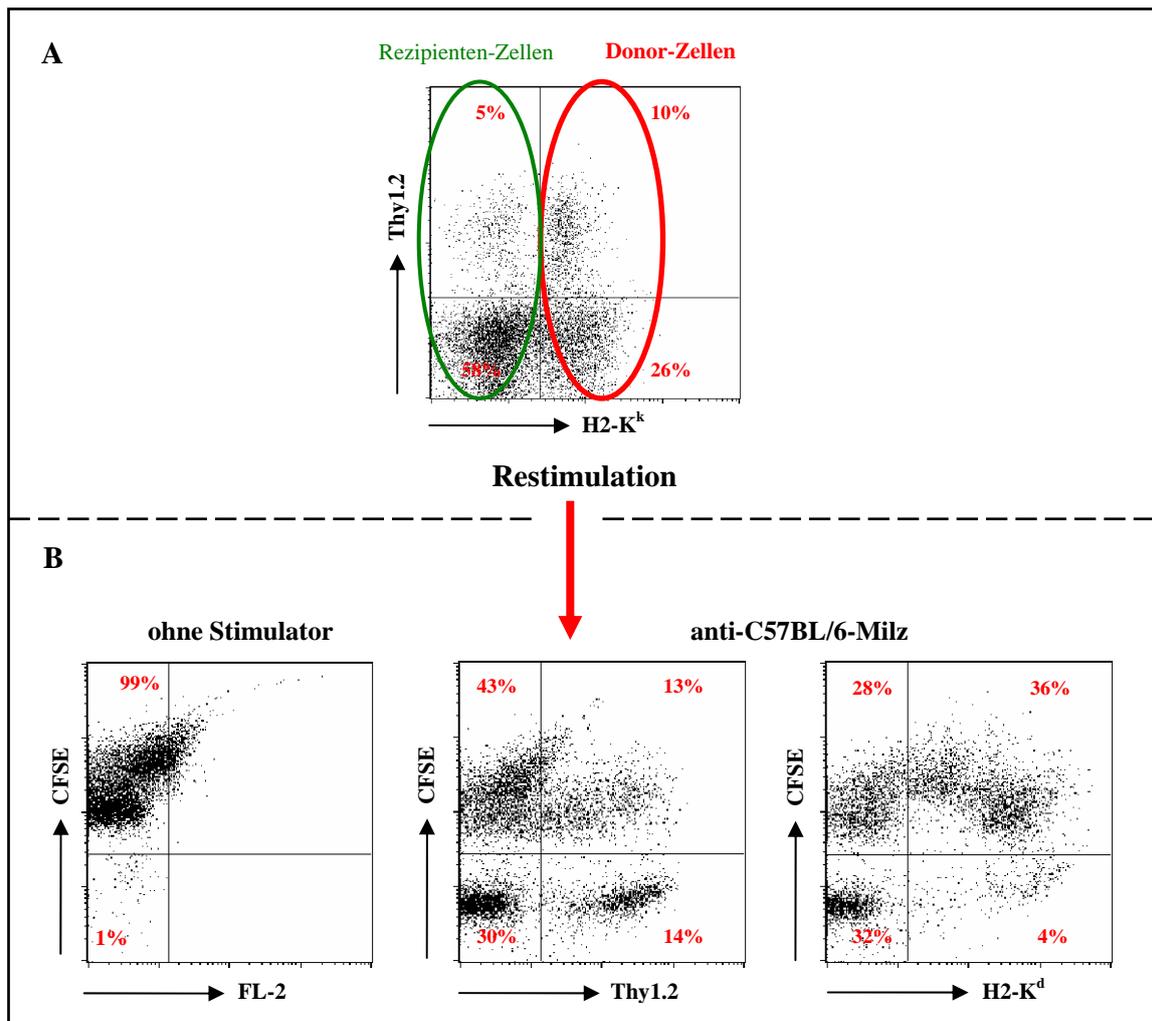


Abb.23: Reaktivierbarkeit allogener transplanteder „high“-Zellen (C3H → DBA/2) *ex vivo*: Nachweis eines gemischten Chimärismus mittels durchflusszytometrischer Analyse der Milzen von „high“-Rezipienten (A). Reisolation, CFSE-Markierung und *in vitro*-Restimulation gegen ein *third party target* (bestrahlte C57BL/6-Splenozyten)(B): Deutliche proliferative Immunantwort nach viertägiger Stimulation. Ein Drittel der „low“-Zellen waren Thy1.2⁺ (T-Lymphozyten). Dabei handelte es sich im Wesentlichen um Donorzellen. Rezipienten-T-Zellen (H2-Kd⁺) waren praktisch nicht nachweisbar.

Die FACS-Analyse der restimulierten Zellen an Tag 4 zeigte eine starke proliferative Antwort der Splenozyten gegen ein *third-party Target* (Abb.23B). Von den sich teilenden Zellen waren etwa ein Drittel T-Zellen (Thy1.2⁺). Ohne Stimulatoren proliferierten nur 1% der Zellen, d.h. durch die Kulturbedingungen alleine kam es zu keiner unspezifischen Aktivierung. Anhand einer Gegenfärbung der Zellen der MLR mit α H2-K^d (DBA/2-MHC-I) konnten wir zeigen, dass nur wenige der proliferierenden Zellen vom Rezipienten stammten. Dies demonstriert, dass die aus der Milz isolierten Splenozyten eines „high“-Rezipienten die Fähigkeit besitzen eine proliferative Immunantwort gegen im Transplantationsvorgang nicht vorkommende, unverwandte, Antigene aufzubauen.

3.12. Zusammenfassung der Ergebnisse im MHC-disparaten Transplantationsmodell

Zusammenfassend konnte im MHC-disparaten Modell (C3H → DBA/2) folgendes gezeigt werden: die Zellen der unseparierten MLR oder Milz bzw. Zellen der „low“-Fraktion induzierten in Rezipiententieren eine schwere GvHD, wenn sie zusammen mit T-Zell-depletiertem Knochenmark transplantiert wurden. Durch die alloreaktiven T-Zellen wurden nahezu alle residuellen Rezipientenzellen eliminiert. Zudem machten die T-Lymphozyten einen überwiegenden Teil der aus Empfängertieren isolierten Splenozyten aus. In den Milzen der „high“-Rezipienten wurde ein beträchtlicher Anteil residueller Empfängerzellen nachgewiesen, was auf eine Toleranz der übertragenen T-Zellen gegenüber den residuellen Rezipientenzellen hinweist. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse korrelierten mit der makroskopischen und histologischen Analyse der Organe von Rezipienten der unterschiedlichen Fraktionen. Leber und Milzen der Empfänger von Knochenmark allein oder den Zellen der „high“-Fraktion waren intakt, während die Organe der Rezipienten alloreaktiver Zellen deutliche Merkmale einer Destruktion aufwiesen (Lymphozyteninfiltrationen/Nekrosen). Eine verbleibende Restaktivität der „high“-Fraktion gegenüber bisher unbekanntem Antigenen (*third party*) konnte in diesem Modell *ex vivo*, nach Reisolation aus Rezipiententieren demonstriert werden, nicht jedoch direkt nach der Separation der MLR.

Trotz der fehlenden GvHD konnte ein längeres Überleben der Rezipienten der „high“-Fraktion in diesem Modell nicht gezeigt werden. Das ist aber in dieser Konstellation, MHC-disparat, nicht allein von den transferierten T-Zellen abhängig, sondern auch von natürlichen Killerzellen im Transplantat.

3.13. Etablierung des MHC-identen Transplantationsmodells

In der klinischen Anwendung werden Transplantationen von Knochenmark, bzw. peripheren Stammzellen üblicherweise zwischen Donoren und Empfängern durchgeführt, die in ihren Gewebemerkmale (MHC, bzw. HLA-Molekülen) möglichst genau übereinstimmen. So kann das GvHD-Risiko gesenkt werden. Da im MHC-disparaten Modell kein signifikanter Überlebensvorteil der „high“-Rezipienten gegenüber den Tieren, die die „low“-Fraktion oder unseparierte MLR erhalten hatten, gezeigt werden konnte, wurde ein klinisch relevanteres Modell etabliert. Spender und Empfänger sind in dieser Konstellation MHC-ident, d.h., sie stimmen in den MHC-Molekülen überein und unterscheiden sich nur in den so genannten Minorantigenen (im Kontext des MHC präsentierten körpereigenen Peptiden). Für eine Reihe von Konstellationen wurde in vergleichbaren Modellsystemen eine mildere GvHD gezeigt

(Drobyski *et al.* 1996; van Den Brink *et al.* 2000). So kann ein längeres Überleben der Rezipiententiere erreicht werden, was die Untersuchung des Einflusses der T-Zellen auf Überleben und Tumorkontrolle ermöglicht.

Auch in diesem Modell musste zunächst die Induzierbarkeit einer GvHD geprüft werden. Letal bestrahlte DBA/2-Tiere wurden mit 1×10^7 Zellen T-Zell-depletierten Knochenmarks von BALB/c-Spendertieren transplantiert. Dazu wurden $1-1,5 \times 10^7$ Splenozyten naiver oder präimmunisierter Donoren addiert. In diesem Modell wurde ein längeres Überleben der Tiere gezeigt. Bei Entstehen einer GvHD kam es zu den typischen Symptomen wie Gewichtsverlust struppigem Fell und reduzierter motorischer Aktivität. Mit Auftreten dieser Zeichen wurden die Tiere untersucht. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von Milz- und Knochenmarkzellen der Rezipiententiere an Tag 30 nach Transfer sind in Abbildung 24 dargestellt.

In allen Fällen konnte ein komplettes lymphozytäres *Engraftment* gezeigt werden. Dies wurde nachgewiesen durch die fehlende Expression des Oberflächenmoleküls CD5.1, das ausschließlich auf von DBA/2 stammenden Lymphozyten zu finden ist, nicht auf Zellen des Donorstammes BALB/c (Pierres *et al.* 1981). Bei Rezipienten naiver BALB/c-Milz oder Milz gegen P815/B7 immunisierter Donoren wurde ein Überwiegen $CD4^+$ T-Zellen in der Milz gezeigt. Die Ratio zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen betrug 3:1. Das entspricht dem in unbehandelten Kontrolltieren gezeigten Verhältnis. Im Gegensatz dazu wiesen die Rezipienten von Splenozyten gegen DBA/2-Milz immunisierter Donoren eine deutlich geringere Anzahl von T-Zellen in der Milz auf. Zudem kam es zu einer Verschiebung des Verhältnisses der Subpopulationen zueinander. Der Anteil $CD8^+$ T-Zellen lag deutlich höher, das Verhältnis war etwa 1:1. Im Knochenmark dieser Tiere konnte, wie im vorherigen Modellsystem, das Fehlen von B-Zellen nachgewiesen werden. Nicht jedoch bei Rezipienten naiver oder gegen P815/B7 immunisierter Milzen. Tiere dieser Gruppen wiesen B-Zellen im Knochenmark auf. Weitere Unterschiede zwischen Rezipienten gegen den Tumor immunisierter Splenozyten und den Empfängern gegen Milz stimulierter Zellen traten in der Population der $Gr-1^+$ Zellen im Knochenmark auf. Übertrug man gegen Milz immunisierte Donor-T-Zellen, so waren im Knochenmark der Empfänger zum Zeitpunkt der Analyse sowohl frühe ($Gr-1^{low}$) als auch reife ($Gr-1^{high}$) myeloische Zellen nachweisbar. Waren die Donorzellen hingegen mit Tumorzellen präaktiviert worden, so wurden in den Rezipiententieren ausschließlich frühe myeloische Zellen gezeigt.

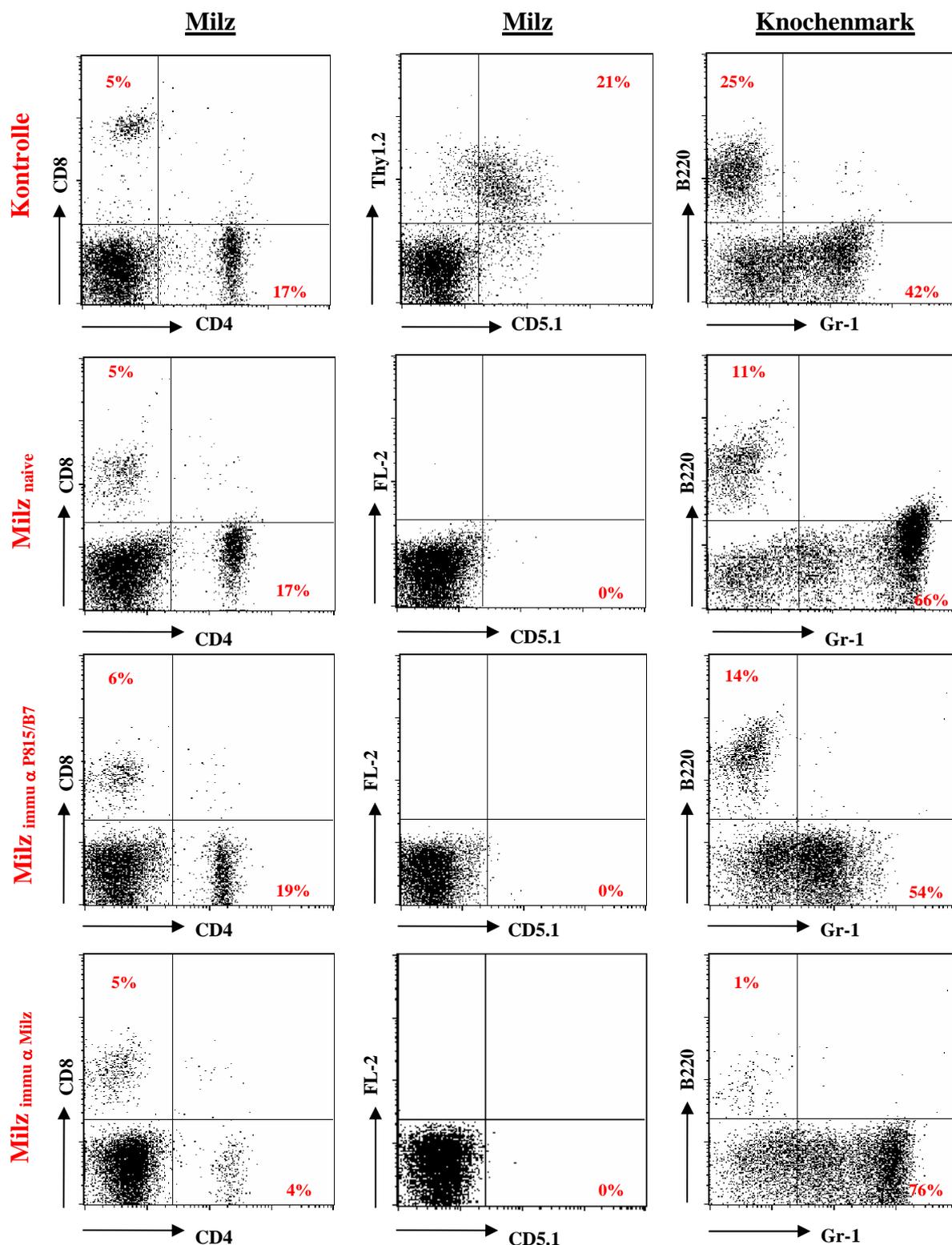


Abb.24: Leukozytäre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark MHC-ident transplantiert Tiere (d30): Analysiert wurde die Expression spezifischer Oberflächenmarker verschiedener Zellpopulationen (T- und B-Lymphozyten, myeloischer Zellen, residuelle Rezipientenzellen) mittels Durchflusszytometrie: Rezipienten gegen Milz aktivierter Splenozyten ($Milz_{immu} \alpha Milz$) zeigten eine Lymphopenie, zudem eine Verschiebung der CD4/CD8-Ratio zugunsten CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark fehlten B220⁺ Zellen. Nachweis einer GvHD-Induktion. Empfänger naiver bzw. gegen Tumorzellen aktivierter ($Milz_{immu} \alpha P815/B7$) Splenozyten wiesen keine Lymphopenie auf, CD4⁺ Zellen überwogen. Auch B-Zellen im Knochenmark waren nachweisbar. Bei Rezipienten gegen Tumorzellen aktivierter Splenozyten fehlten im Knochenmark reife Granulozyten (Gr-1^{high}). Die

Rezipienten aller drei transplantierten Gruppen zeigten einen kompletten lymphozytären Donochimärismus, dokumentiert durch das Fehlen CD5.1⁺ Zellen in der Milz. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente, in denen drei Tiere pro Gruppe untersucht wurden.

Aus diesen vorläufigen Experimenten zogen wir den Schluss, dass die Induktion einer GvHD in diesem Modellsystem möglich ist, jedoch eine Immunisierung der Donoren gegen DBA/2-Splenozyten voraussetzt.

Wie in dem zuvor beschriebenen MHC-disparaten Modell wurden nun im Folgenden die allostimulierten, *in vitro* proliferierenden, und die ruhenden T-Zellen separiert und zusammen mit T-Zell-depletierten Knochenmarkzellen transplantiert. In diesem Modell haben wir jedoch zwei unterschiedliche Strategien der Stimulation verfolgt: Zum einen wurden Splenozyten gegen DBA/2-Milz immunisierter Donoren in einer MLR mit Rezipientensplenozyten stimuliert. Alternativ wurden die Spendertiere mit Tumorzellen immunisiert und deren Milzzellen dann in der MLTC erneut mit Tumorzellen (P815/B7 behandelt mit MMC, siehe 2.2.7) stimuliert.

3.14. Übertragung gegen DBA/2-Milz präimmunisierter Zellen

Für die *in vitro* Stimulation in einer MLR wurden als Milzdonoren gegen Rezipientensplenozyten immunisierte BALB/c-Tiere verwendet. Durch den Einsatz von Milzzellen (30% T-Zellen, 60% B-Zellen, 3% myeloische Zellen) des Rezipienten als Stimulatoren in der MLR wurde so den Donorzellen ein auf die Lymphopoese fokussiertes Spektrum an Antigenen präsentiert, um eine Alloreaktion zu induzieren. An Tag 4 der Stimulation wurden die ruhenden und die proliferierenden Zellen separiert und jeweils 8×10^5 T-Zellen zusammen mit T-Zell-depletiertem Knochenmark (1×10^7 Zellen/Tier) übertragen. Als Kontrollen dienten auch in diesem Modell Tiere, die ausschließlich T-Zell-depletierte Knochenmarkzellen erhielten, sowie Rezipienten, die unseparierte MLR oder Splenozyten als DLI bekamen.

3.14.1. Entwicklung einer GvHD im MHC-identen Modell

Die GvHD im MHC-identen Transfermodell verläuft deutlich milder, als im MHC-disparaten Modell. Die Tiere überleben deutlich länger und die äußeren Anzeichen einer GvHD sind schwer auszumachen. Ein wesentliches Merkmal ist der Verlust von Gewicht mit dem Einsetzen der GvHD (siehe Abb.25). In unseren Untersuchungen nahmen die Rezipienten von T-Zell-depletiertem Knochenmark nach dem Transfer kontinuierlich an Gewicht zu. Ebenso die Tiere, die zusätzlich zum Knochenmark die Zellen der „high“-Fraktion erhalten hatten.

Addierte man jedoch Milzzellen immunisierter Donoren, unseparierte MLR oder die „low“-Fraktion zu den Knochenmarkszellen, so verloren die Tiere bei Einsetzen der GvHD zunehmend an Gewicht. Bei einem Gewichtsverlust von 20% nach beginnender Gewichtsabnahme wurden die Tiere untersucht.

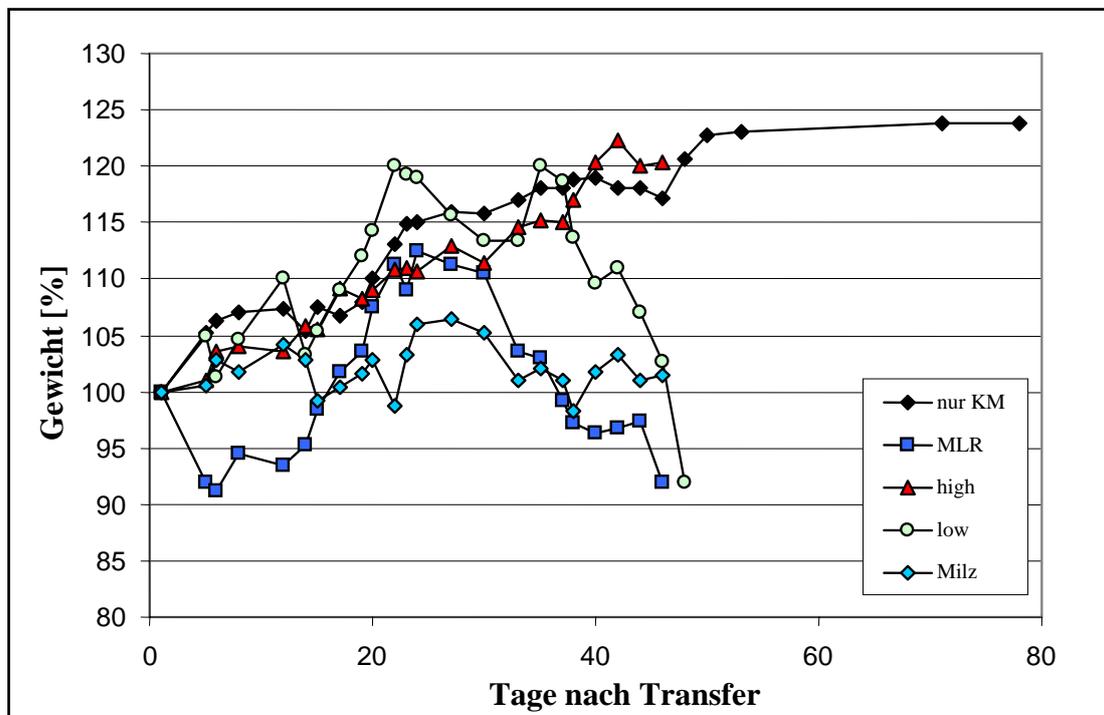


Abb.25: Gewichtsverlust mit beginnender GvHD im MHC-identen Transplantationsmodell: Empfänger alloreaktiver Zellen („low“, unseparierte MLR bzw. Splenozyten) verloren mit einsetzender GvHD stetig Gewicht, während Rezipienten T-Zell-depletierten Knochenmarks bzw. der „high“-Fraktion kontinuierlich zunahm. Zusammenfassend dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente, untersucht wurden pro Gruppe 3 Tiere. Aufgetragen ist der Gewichtsverlauf in Prozent ausgehend vom Initialgewicht (100%).

3.14.2. Leukopenie der Rezipiententiere bei GvHD

Im Verlauf der GvHD kommt es zu einer verzögerten Immunrestitution und dadurch zu einer verminderten Anzahl Leukozyten (Leukopenie) in den Empfängern (Noel *et al.* 1978; Paulin *et al.* 1987). Wir haben daher in diesem Transplantationsmodell als weiteres Kriterium einer GvHD eine Leukopenie der Rezipienten gewertet. Um diese festzustellen, wurde die Anzahl aus Milz und Knochenmark reisolierter Zellen bestimmt.

Abbildungen 26 und 27 stellen die gemittelten Zellzahlen reisolierter Zellen aus Milz und Knochenmark der untersuchten Tiere dar. Dabei wurden drei verschiedene Zeiträume nach Transfer unterschieden. Zwischen Tag 18-29 handelt es sich um ein noch relativ frühes Stadium, in dem die Reconstitution der Tiere stattfindet. Der Zeitraum zwischen dem 30. und dem 59. Tag nach der Transplantation ist als Analysezeitpunkt am besten geeignet, da sich in

dem Intervall die GvHD in den Rezipienten der alloreaktiven Zellen ausprägt. Untersucht man die Rezipienten hingegen zu einem späteren Zeitpunkt (d 60-133), so handelt es sich bei der hier festgestellten GvHD eher um eine chronische Form der Erkrankung, oder die Tiere überlebten ohne, dass es zur Induktion einer GvHD kam.

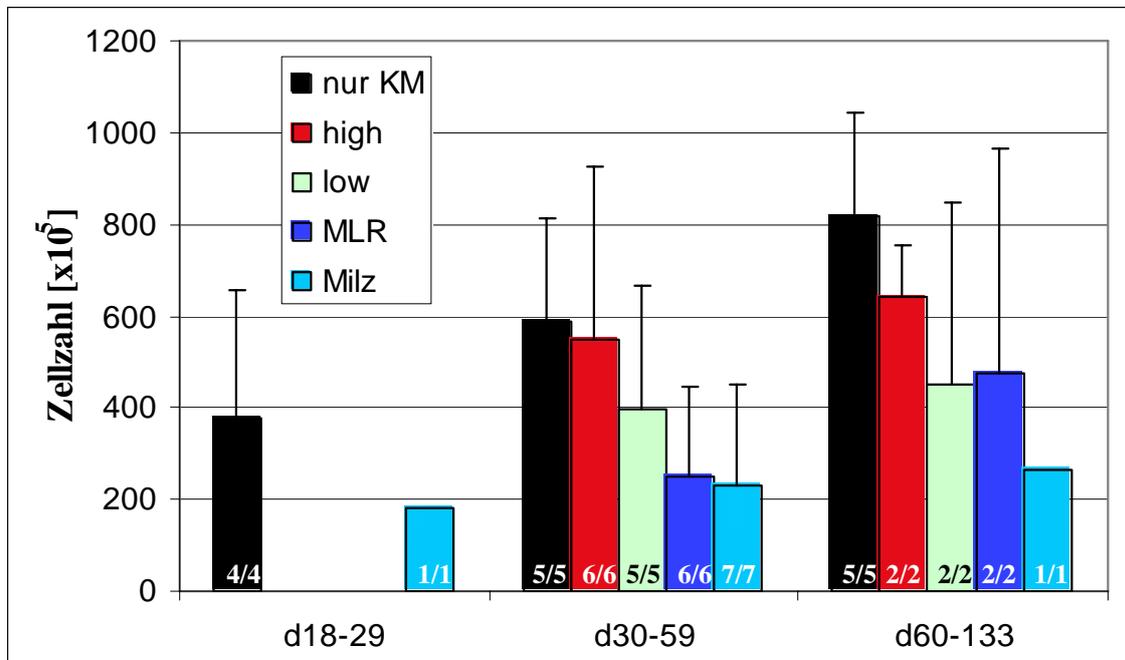


Abb.26: Leukopenie der Rezipiententiere bei GvHD: Die Anzahl aus der Milz reisolierter Leukozyten war bei Rezipienten alloreaktiver Zellen („low“, unseparierte MLR bzw. Splenozyten) deutlich geringer als bei Empfängern T-Zell-depletierter Knochenmarks bzw. der „high“-Fraktion. Unterschieden wurden hierbei drei Zeiträume nach Transplantation. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten, pro Gruppe wurden mindestens 2 Tiere analysiert.

Wie Abbildung 26 zeigt, wurden aus den Milzen der Tiere, die nur T-Zell-depletiertes Knochenmark erhalten haben, bereits drei Wochen nach dem Transfer im Mittel 4×10^7 Zellen reisoliert. 6 Wochen später entsprach die Anzahl der reisolierter Splenozyten der Zahl, die aus unbehandelten Kontrolltieren gewonnen wird ($7-10 \times 10^7$ Zellen). Bei Rezipienten der „high“-Fraktion, zeigte sich ein vergleichbares Bild. Untersuchte man die Tiere zwischen Tag 30 und 59 so wurden im Mittel $5-6 \times 10^7$ Zellen isoliert. Wurden zum Knochenmark alloreaktive Zellen in Form der „low“-Fraktion, der unseparierten MLR oder immunisierter Donorsplenozyten addiert, so enthielten die Milzen der untersuchten Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt im Vergleich nur etwa halb so viele Leukozyten. Die Tiere, die alloreaktive Zellen erhalten hatten und bei denen es zur Induktion einer GvHD kam, wiesen also in der Milz eine deutlich verminderte Anzahl Leukozyten auf.

Ähnlich verhielt es sich mit der aus dem Knochenmark reisolierter Anzahl Leukozyten (siehe Abbildung 27). Auch hier war bei den Empfängertieren mit GvHD die Zahl der Leukozyten

im Knochenmark deutlich vermindert im Vergleich zu Tieren ohne GVHD. Aus den Femora und Tibiae der Rezipienten von immunisierter Milz oder unseparierter MLR wurden zwischen Tag 30 und 59 im Mittel nur etwa halb so viele Zellen gewonnen wie aus denen der Rezipienten von T-Zell-depletiertem KM allein oder Knochenmarkzellen zusammen mit den Zellen der „high“-Fraktion. Bei Empfängern der „low“-Fraktion sogar nur etwa ein Drittel der Zellen.

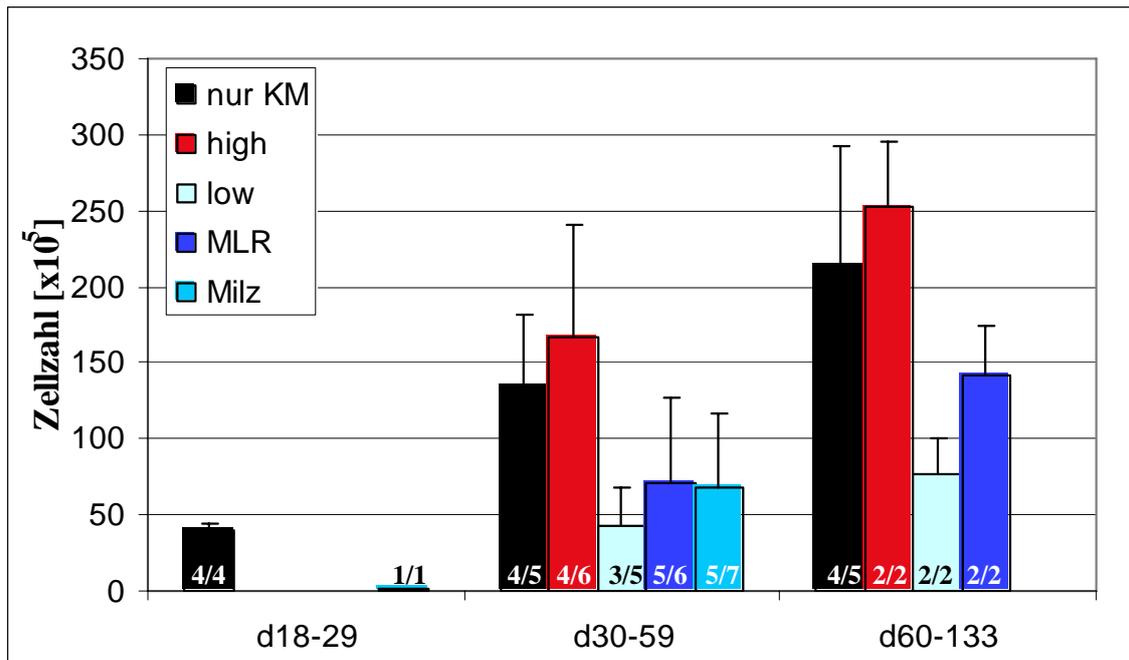


Abb.27: Gesamtzahl Leukozyten im Knochenmark nach Transplantation: Leukopenie im Knochenmark nach Transplantation der „low“-Fraktion, unseparierter MLR bzw. Splenozyten. Rekonstitution nach Transplantation der „high“-Fraktion bzw. Knochenmark allein vergleichbar. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten, pro Gruppe wurden 2-3 Tiere analysiert.

3.14.3. Anwachsen der transferierten Donorzellen

Da in diesem Modell Donoren und Rezipienten MHC-ident sind, konnte die Expression der MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche der isolierten Milz- und Knochenmarkzellen nicht herangezogen werden, um den Anteil der Donorzellen im Rezipienten zu bestimmen. Die Stämme DBA/2 und BALB/c unterscheiden sich jedoch durch die Expression von CD5.1, das nur auf T-Lymphozyten des Stammes DBA/2 exprimiert wird. Wachsen die transferierten Zellen an, so lassen sich in den Rezipienten keine CD5.1⁺-Zellen mehr nachweisen. Auf diese Weise konnte das T-lymphozytäre *Engraftment* nachgewiesen werden.

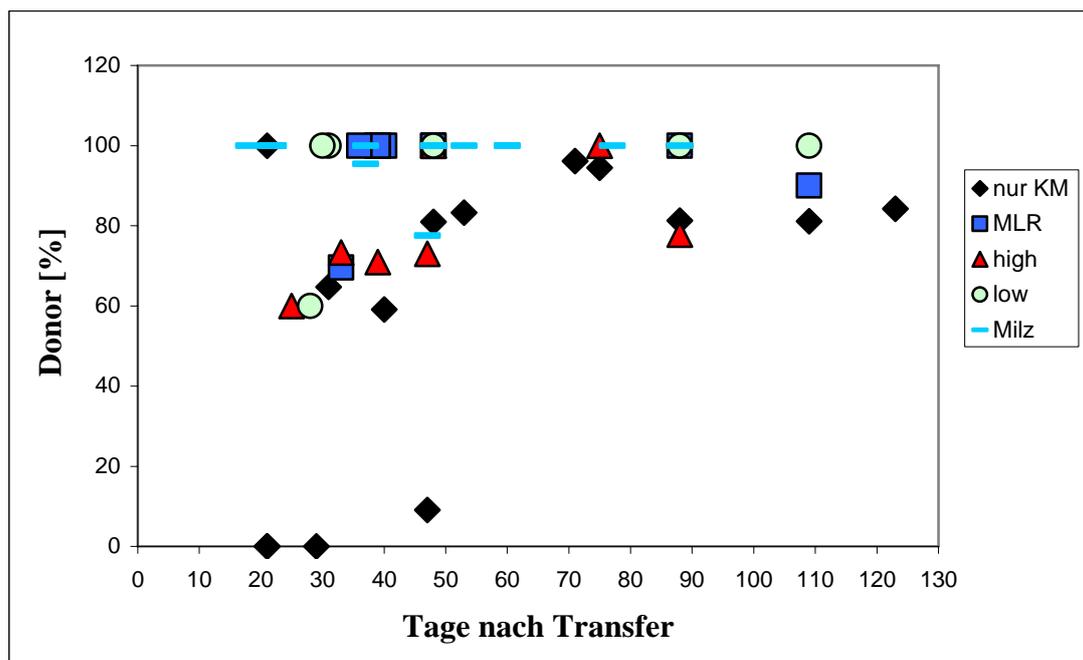


Abb.28: Engraftment nach MHC-identem Transfer: Rezipienten alloreaktiver Zellen („low“-Fraktion, unseparierte MLR oder Splenozyten) wiesen rasch nach der Transplantation einen kompletten lymphozytären Donorchimärismus auf. Nach Transfer T-Zell-depletierten Knochenmarks oder Zugabe der „high“-Fraktion war zumeist ein gemischter Chimärismus nachweisbar, nach einem längeren Beobachtungszeitraum ein zunehmender Anteil Donorzellen. Die Anzahl der Donor-T-Lymphozyten in der Milz der Rezipiententiere wurde durch Anfärben des Moleküls CD5.1 durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Donor-T-Lymphozyten an der Gesamtpopulation der T-Zellen in der Milz.

Abbildung 28 fasst das Anwachsen der übertragenen Zellen („engraften“) nach dem Transfer im MHC-identem Modell zusammen. Nach der Transplantation von T-Zell-depletiertem Knochenmark allein waren praktisch in allen Fällen noch Rezipientenlymphozyten nachzuweisen. Die Donorzellen vermögen es nicht, residuelle Empfängerzellen zu eliminieren. Addierte man zum Knochenmark die ruhenden Zellen der MLR („high“-Fraktion) hinzu, so kam es ebenfalls in der Mehrzahl der Tiere zu einem gemischten Chimärismus. Die übertragenen ruhenden T-Zellen waren tolerant gegenüber den residuellen Zellen des Empfängers. Über einen längeren Beobachtungszeitraum, oder durch eine höhere Anzahl übertragener Zellen kann der Chimärismus zu Gunsten der Donorzellen beeinflusst werden. Durch die Zugabe der „low“-Fraktion oder unseparierter MLR kam es in nahezu allen Rezipiententieren bereits kurze Zeit nach dem Transfer zu einem vollen Donorchimärismus. Die im Transplantat enthaltenen alloreaktiven T-Zellen erkennen residuelle Empfängerzellen als fremd und eliminieren sie vollständig. Gleiches wurde beobachtet, nach Zugabe von Donorsplenozyten zum T-Zell-depletierten Knochenmark.

3.14.4. Durchflusszytomertische Analyse von Milz und Knochenmark nach KMT

Auch in diesem Modellsystem wurde die zelluläre Zusammensetzung aus Milz und Knochenmark isolierter Leukozyten bestimmt. Durchgeführt wurden 3 unabhängige Experimente mit 2-3 Tieren pro Gruppe. Die Gruppen wurden wie im MHC-disparaten Modell gebildet.

Die durchflusszytomertische Analyse von Milz und Knochenmark der Empfängertiere im Zeitraum zwischen Tag 30-59 nach dem Transfer ergab folgendes (siehe Abb.29):

Nach dem Transfer von T-Zell-depletiertem Knochenmarkzellen stammten etwa 2/3 der reisolierten T-Lymphozyten vom Donor. Die Anzahl der gesamten T-Zellpopulation entsprach nach diesem Zeitraum schon nahezu der einer unbehandelten Kontrolle (siehe Abb.24). Die CD4⁺ T-Zellen überwogen. Im Knochenmark der analysierten Tiere konnten etwa 20% B-Zellen nachgewiesen werden.

Milz- und Knochenmarkzellen von Rezipienten der „high“-Fraktion wiesen eine vergleichbare Zusammensetzung auf. Auch hier waren noch etwa 1/3 T-Lymphozyten des Rezipienten, mit einem Überwiegen der CD4⁺ T-Zellen gegenüber den CD8⁺, nachweisbar. Im Knochenmark der „high“-Rezipienten konnten im Mittel 13% B-Zellen gezeigt werden. Dabei wies die Population der B-Zellen dieser Tiere wie bei den Empfängern von Knochenmark allein einen Anteil ausreifender B-Zellen auf, nachgewiesen durch die Expression von membrangebundenem Immunglobulin M (IgM).

Nach der Übertragung alloreaktiver T-Zellen in Form der „low“-Fraktion, der unseparierten MLR oder von Splenozyten waren keine residuellen Empfängerzellen nachzuweisen. Die Anzahl der T-Zellen lag in den Milzen der Empfänger von „low“- und MLR-Zellen deutlich niedriger als bei den Rezipienten von Knochenmark allein oder der „high“-Fraktion. Die CD4⁺/CD8⁺-Ratio der T-Zellen war leicht zu Gunsten der CD8⁺ Zellen verschoben. Die Anzahl der T-Lymphozyten war bei den Rezipienten der Splenozyten als DLI nicht so reduziert wie bei Empfängern der „low“-Fraktion oder MLR. Bei allen drei Gruppen konnten im Knochenmark praktisch keine B-Zellen nachgewiesen werden, ausreifende, IgM-positive B-Lymphozyten fehlten vollständig: ein zuverlässiges Indiz für die Induktion einer GvHD.

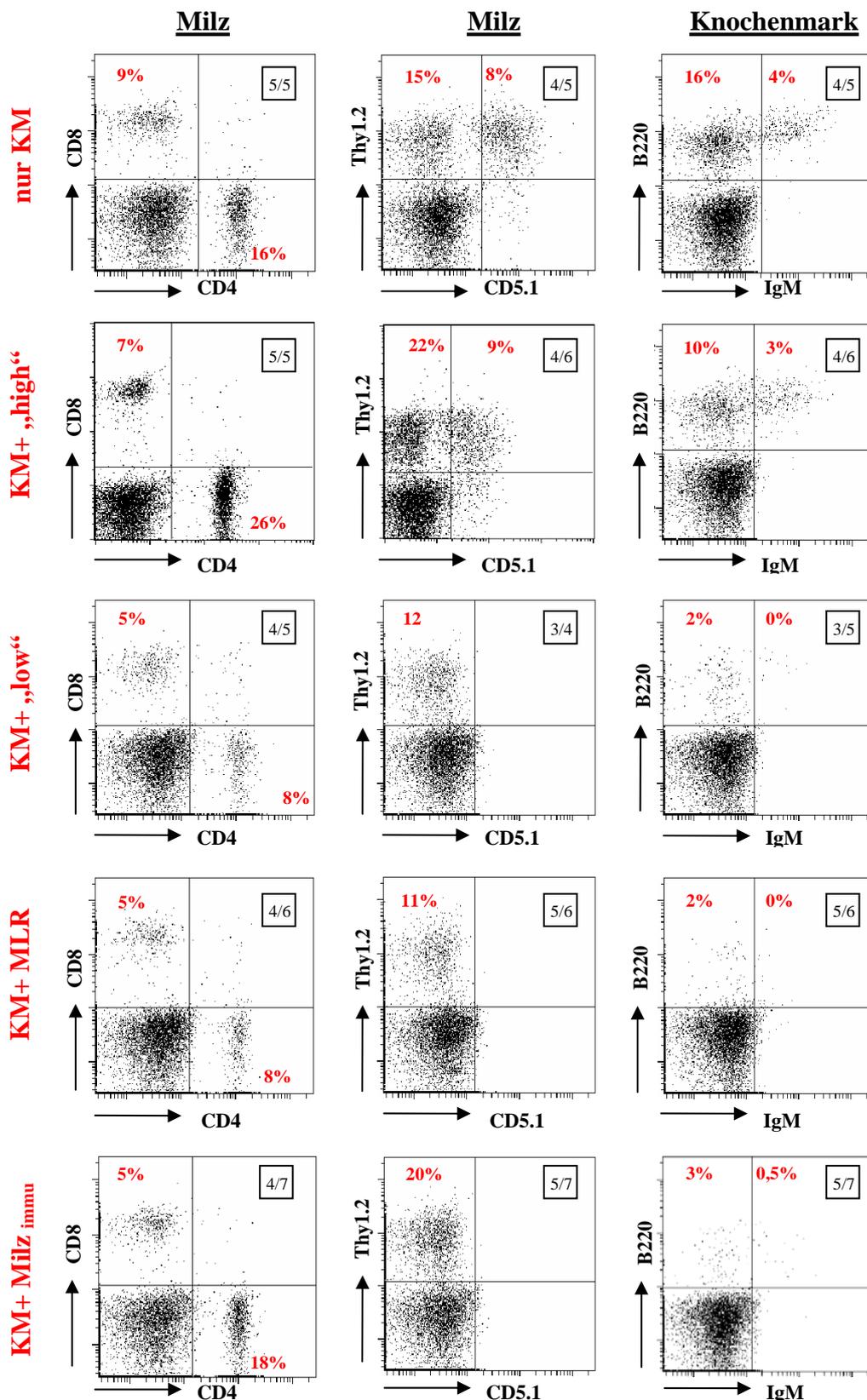


Abb.29: Expression leukozytärer Oberflächenmarker in Milz und Knochenmark der Rezipiententiere nach Transfer gegen Milz immunisierter Zellen (BALB/c → DBA/2): Rezipienten T-Zell-depletierten Knochenmarks sowie der „high“-Fraktion wiesen einen gemischten lymphatischen Chimarismus auf, Zellen der alloreaktiven Fraktionen („low“, MLR, Milz) eliminierten residuelle Rezipientenzellen vollständig (fehlende Expression von CD5.1). Die Empfänger der „low“-Fraktion bzw. unseparierter MLR waren lymphopen, die Ratio CD4/CD8 1:1 (in unbehandelten

Kontrolltieren 2:1). Im Knochenmark fehlten B220⁺ Zellen nahezu vollständig, reife B-Lymphozyten (IgM⁺) waren nicht nachweisbar. Dies dokumentiert eine GvHD in den Empfängern alloreaktiver Zellen. Die Analyse erfolgte in diesem Transplantationsmodell 30-59 Tage *post transplantationem*. Die Anzahl der analysierten Tiere sowie die Zahl der Tiere, die den dargestellten Phänotyp aufweisen, sind jeweils in der oberen rechten Ecke der Darstellung angegeben.

3.14.5. Anzahl T-Lymphozyten in der Milz der Rezipiententiere

In der durchflusszytometrischen Analyse wurde die Zusammensetzung der T-Lymphozytenpopulationen genauer bestimmt. Dazu wurden in der Milz die Oberflächenmoleküle Thy1.2 als Pan-T-Zellmarker, CD4 sowie CD8 für die Bestimmung der Subpopulationen der T-Helfer, bzw. zytotoxischer T-Zellen angefärbt. Die Abbildungen 30 und 31 stellen die Ergebnisse der Analysen zusammenfassend dar.

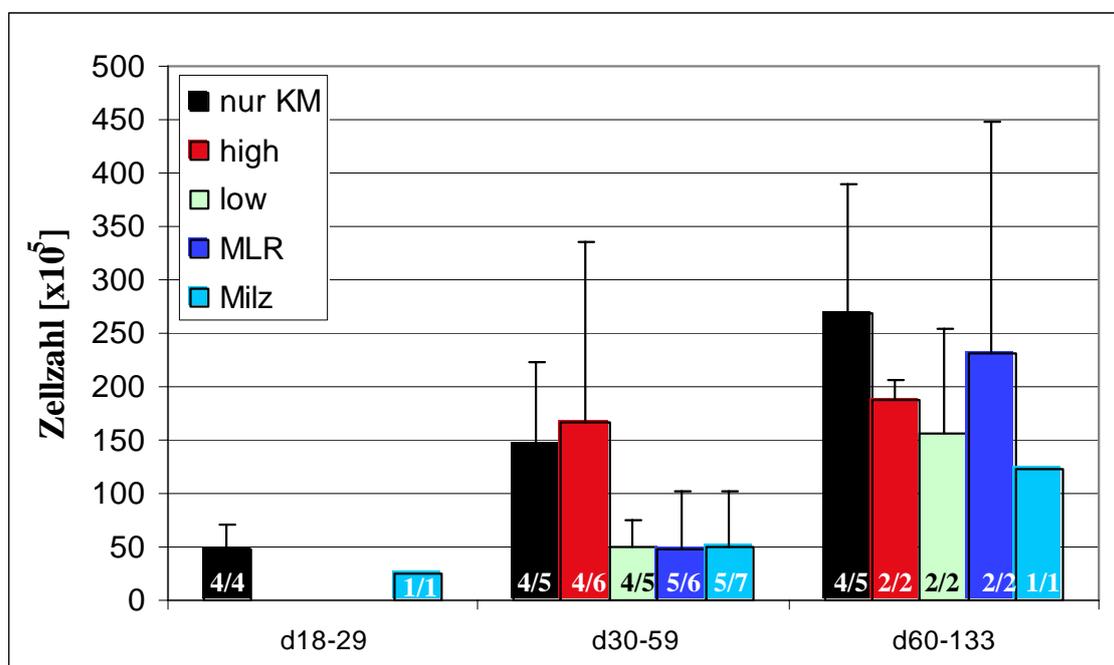


Abb.30: Gesamtzahl T-Lymphozyten in Rezipientenmilzen: Die Empfänger der alloreaktiven Zellen („low“-Fraktion, MLR bzw. Splenozyten) wiesen bei Auftreten einer GvHD (30-59 Tage nach der Transplantation) eine deutlich geringere Anzahl T-Lymphozyten auf als Rezipienten T-Zell-depletierter Knochenmarks oder nach Zugabe der „high“-Fraktion. Zu einem späteren Zeitpunkt sind nur geringe Unterschiede in der Anzahl reisolierter T-Zellen zwischen den Behandlungsgruppen nachweisbar. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten, pro Gruppe wurden mindestens 2 Tiere untersucht.

Auch bei der Analyse der Anzahl von T-Zellen in der Milz zeigte sich, dass Rezipienten der alloreaktiven Zellen zwischen Tag 30 und 59 eine deutlich niedrigere Zellzahl aufwiesen, als die Tiere, die nur Knochenmarkszellen bzw. zusätzlich Zellen der „high“-Fraktion erhalten hatten. Aus den Milzen der Empfänger unseparierter MLR, der „low“-Fraktion oder Donorsplenozyten wurde durchschnittlich nur ein Drittel der Anzahl an T-Lymphozyten im Vergleich zu Rezipienten der „high“-Fraktion reisoliert.

Untersuchte man die einzelnen Subpopulationen der T-Zellen, so zeigte sich jedoch nicht wie bei den Vorversuchen, in denen größere Zahlen Milzzellen zum Knochenmark addiert wurden, eine signifikante Verschiebung der CD4/CD8-Ratio (siehe Abb.31). Die Mehrzahl der T-Zellen war in allen Gruppen CD4⁺. Bei Rezipienten der „high“-Fraktion, sowie Knochenmarkzellen allein war das Verhältnis CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen etwa 3:1. In den Rezipienten der „low“-Zellen oder unseparierter MLR, waren im Mittel zweimal so viele CD4⁺ T-Zellen nachzuweisen, aber die Verschiebung der Ratio war nicht signifikant.

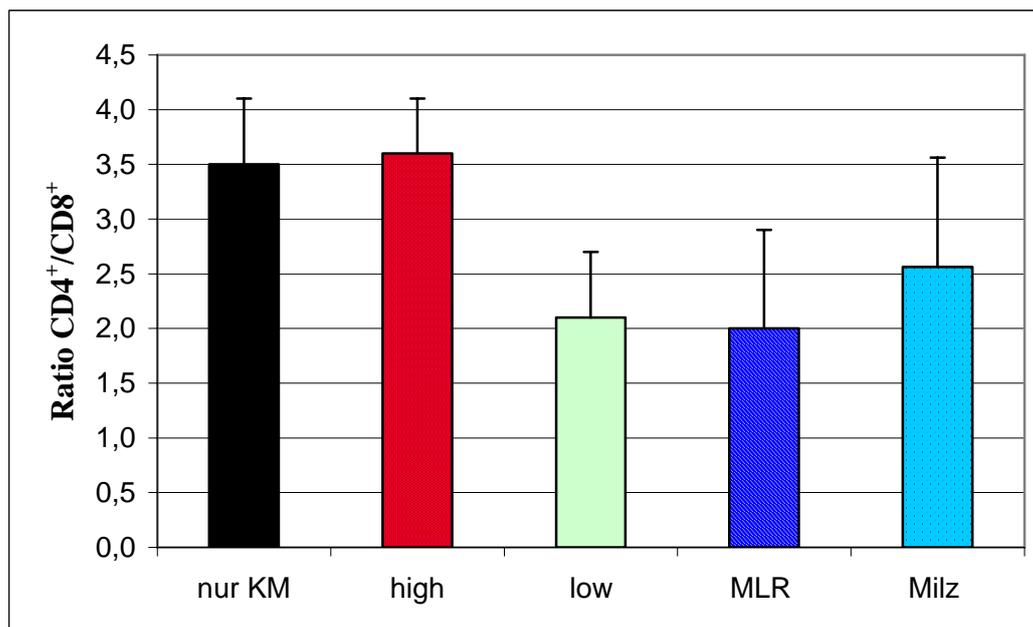


Abb.31: CD4⁺ /CD8⁺ Ratio in der Milz (Tag 30-59): Festgestellt wurde eine leichte Verschiebung der Ratio zugunsten CD8⁺ T-Zellen in Empfängern alloreaktiver Zellen im Vergleich mit den Behandlungsgruppen Knochenmark allein bzw. nach Zugabe der „high“-Fraktion. Dargestellt sind die Ergebnisse drei unabhängiger Experimente (mindestens 2 analysierte Tiere pro Gruppe).

3.14.6. Fehlen von B-Lymphozyten im Knochenmark bei GvHD

Auch in diesem Modell konnte das Fehlen von B-Lymphozyten im Knochenmark als Indikator für die Entwicklung einer GvHD herangezogen werden. Wie Abbildung 32 zeigt ließen sich im Knochenmark der Tiere, die 5-8 Wochen nach dem Transfer eine GvHD entwickelten (Empfänger von MLR, „low“ oder immunisierter Milz), so gut wie keine B-Lymphozyten nachweisen. Bei Rezipienten unseparierter MLR, sowie der „low“-Fraktion waren durchschnittlich 2×10^5 B-Zellen im Knochenmark enthalten, bei Empfängern von Donorsplenozyten waren es im Mittel 6×10^5 Zellen. Dagegen enthielten die zum gleichen Zeitpunkt aus dem Knochenmark isolierten Leukozyten der Rezipienten der „high“-Fraktion, oder nur KM im Durchschnitt etwa sieben- bzw. dreimal so viele B-Lymphozyten. Rezipienten der „low“-Zellen, die zwischen d30-59 keine GvHD entwickelten, wiesen nach

über 60 Tagen Beobachtungszeit ebenfalls ein Fehlen von B-Zellen im Knochenmark auf, was darauf hindeutet, dass sie eine chronische GvHD entwickelten.

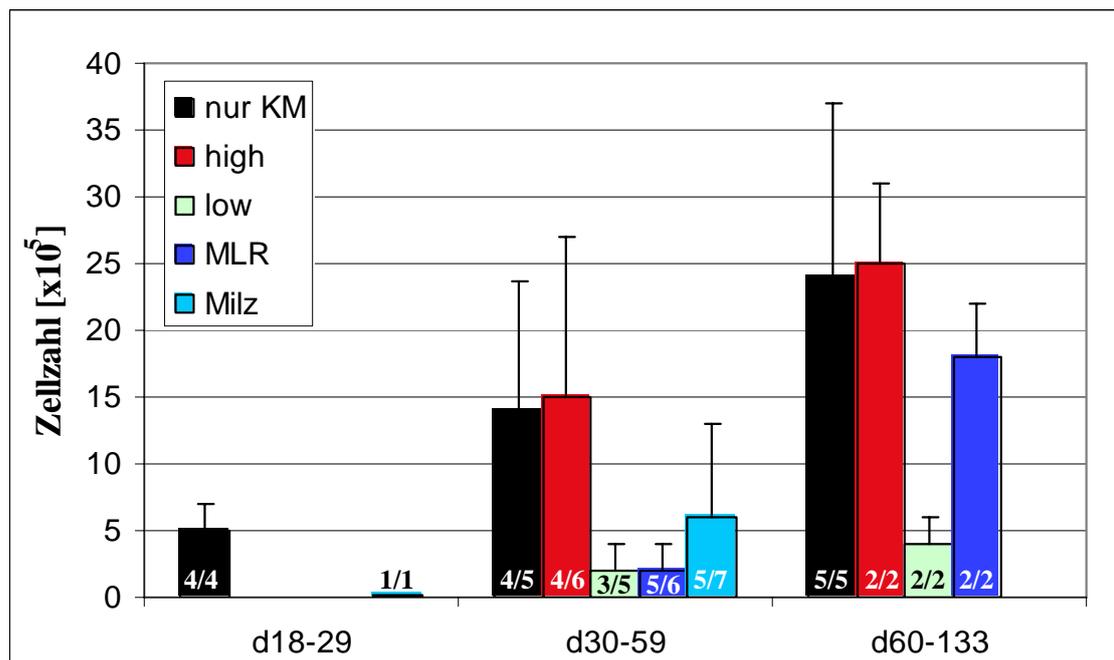


Abb.32: Anzahl aus dem Knochenmark reisolierter B-Lymphozyten: Im Knochenmark von Rezipienten der „low“-Fraktion, unseparierter MLR bzw. Splenozyten fehlten B-Lymphozyten 30-59 Tage nach der Transplantation nahezu vollständig, während Empfänger T-Zell-depletierten Knochenmarks bzw. der „high“-Fraktion über einen Zeitraum von bis zu 133 Tagen eine stetig zunehmende Anzahl B-Lymphozyten aufwiesen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten, pro Gruppe wurden 2-3 Tiere untersucht.

3.14.7. Tumorkontrolle nach allogener Transplantation

In dieser Stammkonstellation (BALB/c → DBA/2), in der Donor und Empfänger MHC-ident waren, war es nicht nachzuweisen, dass die in der MLR ruhenden („high“) Zellen nach dem Sortieren *in vitro* durch einen unverwandten Stimulator aktivierbar waren. Auch *ex vivo* konnten wir nicht zeigen, dass Splenozyten, die aus „high“-Rezipienten isoliert wurden, Reaktivität gegen ein fremdes *Target* aufweisen, obwohl die Zellen in der Lage sind den Organismus nach dem Transfer zu repopulieren. Um zu untersuchen, ob die Rezipienten eine mögliche vorliegende Tumorerkrankung, in der klinischen Situation eine Leukämie, wirksam bekämpfen können, wurde deshalb in den Empfängertieren vor dem Transfer eine als Tumor wachsende hämatopoetische Neoplasie (P815/B7) induziert. 5 Tage vor der Transplantation wurden 5×10^5 bzw. 2×10^6 Zellen P815/B7 subcutan injiziert und das Wachstum der Tumore regelmäßig gemessen. Abbildung 33 stellt die Ergebnisse der Untersuchungen graphisch dar.

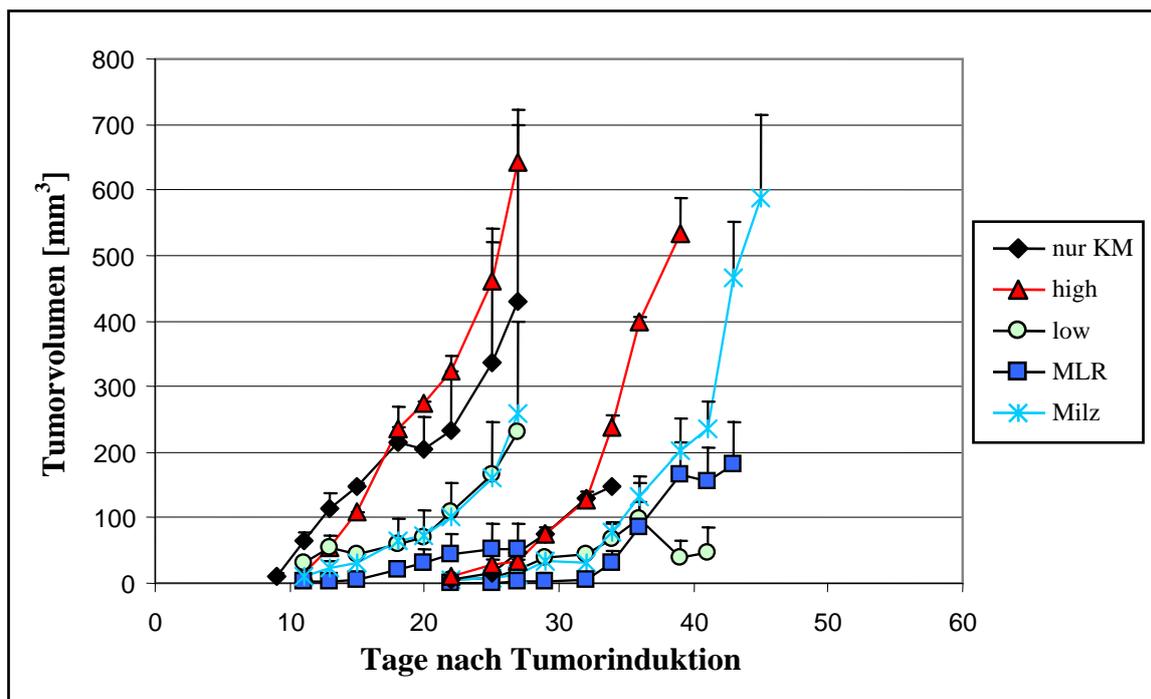


Abb.33: Tumorwachstum im MHC-identen Transplantationsmodell: 5 Tage vor dem Transfer wurden in den Rezipienten P815/B7-Tumore induziert. 2×10^6 Tumorzellen (linke Kurvenschar) oder 5×10^5 Tumorzellen (rechte Kurvenschar) wurden s.c. injiziert. In Empfängern T-Zell-depletierten Knochenmarks bzw. nach Zugabe der „high“-Fraktion wuchs der Tumor mit einer vergleichbaren Kinetik aus, während das Tumorwachstum in Rezipienten der alloreaktiven Fraktion demgegenüber deutlich verlangsamt war. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten, pro Gruppe wurden 3 Tiere untersucht.

Bei den Tieren, die ausschließlich T-Zell-depletiertes Knochenmark erhielten, kam es in jedem Fall zu einem Auswachsen des Tumors. Mit einer vergleichbaren Kinetik verlief das Wachstum der Tumore bei Empfängertieren, die zusätzlich zu den Knochenmarkszellen die ruhenden Zellen der „high“-Fraktion erhalten hatten. Die im Transplantat enthaltenen T-Zellen beeinflussten das Wachstum eines induzierten Tumors nicht. Die in der „low“-Fraktion enthaltenen T-Zellen bzw. die Zellen der unseparierten MLR konnten zwar keine komplette Abstoßung des Tumors vermitteln, jedoch das Tumorwachstum in diesen Empfängertieren deutlich (um etwa 10-14 Tage) verlangsamen. Als Vergleichsgruppen dienten hierbei „high“- und Knochenmarkrezipienten.

Um als Ursache für eine verminderte Tumorkontrolle eine zu hohe initiale Tumordosis (2×10^6 Zellen/Tier, linke Kurvenschar Abb.31,) auszuschließen, wurde in einem parallelen Experiment eine Zelldosis von 5×10^5 (rechte Kurvenschar, Abb.31) gewählt. Wie Abbildung 31 zeigt führt dies jedoch lediglich zu einer Verschiebung des Tumorwachstums entlang der Zeitachse. Die Kinetik des Auswachsens des Tumors ist in allen Transfergruppen identisch. In Rezipienten von Knochenmark allein, sowie Empfängern der „high“-Fraktion wächst der Tumor in jedem Falle aus, die in der MLR oder in der „low“-Fraktion enthaltenen T-Zellen

vermögen es nicht eine komplette Abstoßung zu vermitteln, verlangsamen das Wachstum aber deutlich.

3.15. Übertragung gegen den Tumor immunisierter Zellen im MHC-identen Transplantationsmodell

Wie die unter 3.13 vorgestellten Ergebnisse zeigen, konnte durch die Separation alloreaktiver Zellen nach Stimulation mit Splenozyten des Empfängers die Induktion einer GvHD verhindert werden. Es gelang jedoch im MHC-identen Modell nicht, eine verbleibende immunologische Reaktivität der übertragenen „high“-Zellen nach dem Transfer zu zeigen. Die Rezipienten dieser Fraktion waren nicht im Stande, das Wachstum eines induzierten Tumors zu beeinflussen. Daraus zogen wir den Schluss, dass die Übertragung der „high“-Zellen keinen Vorteil gegenüber dem Transfer von Knochenmark allein bedeutet. Aus diesem Grund wurden Zellen übertragen, die a priori reaktiv gegen den Tumor sind. Wie die unter 3.12 dargestellten Vorexperimente im MHC-identen Modell zeigen, konnte durch die Präimmunisierung der Donoren gegen den Tumor die Inzidenz einer GvHD vermieden werden. Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt zwischen Tieren, die gegen P815/B7 immunisierte Splenozyten oder naive Donormilzzellen erhalten hatten.

Für den Transfer wurden daher Donortiere im Vorfeld, wie unter 2.2.3 beschrieben, gegen den Tumor P815/B7 immunisiert. Die Splenozyten dieser Tiere wurden dann mit dem Farbstoff CFSE markiert und *in vitro* mit Mytomycin C (MMC)-behandelten Tumorzellen stimuliert. Dadurch wurde ein begrenzteres Spektrum an Antigenen für die T-Zellaktivierung eingesetzt und eine spezifischere Stimulation der Donorzellen erreicht. Die Separation der Zellen der MLTC erfolgte an Tag 4. Übertragen wurden wie zuvor 1×10^7 Zellen T-Zell-depletierten Knochenmarks allein oder zusammen mit den sortierten Fraktionen „low“ und „high, unsortierter MLTC oder Donorsplenozyten, wobei mit jeder Fraktion 8×10^5 T-Lymphozyten übertragen wurden.

3.15.1. Leukopenie in der Milz der Rezipiententiere bei GvHD

Auch nach der Separation und dem Transfer gegen den Tumor stimulierter Zellen eignete sich der Zeitraum zwischen Tag 30 und 59 nach der Transplantation am besten für eine Analyse der Rezipiententiere. Dies war wiederum der Zeitraum, in dem es zur Induktion einer GvHD kam. Zunächst wurde die Anzahl aus Milz und Knochenmark reisolierter Leukozyten bestimmt, um einen Anhaltspunkt dafür zu erhalten, ob es zur Induktion einer GvHD und damit zu einer Leukopenie kam, oder nicht. Wie Abbildung 34 zeigt, erhält man nach dem

Transfer gegen den Tumor stimulierter und separierter Zellen ein anderes Ergebnis als nach dem Transfer von Zellen, die gegen Rezipientensplenozyten aktiviert waren.

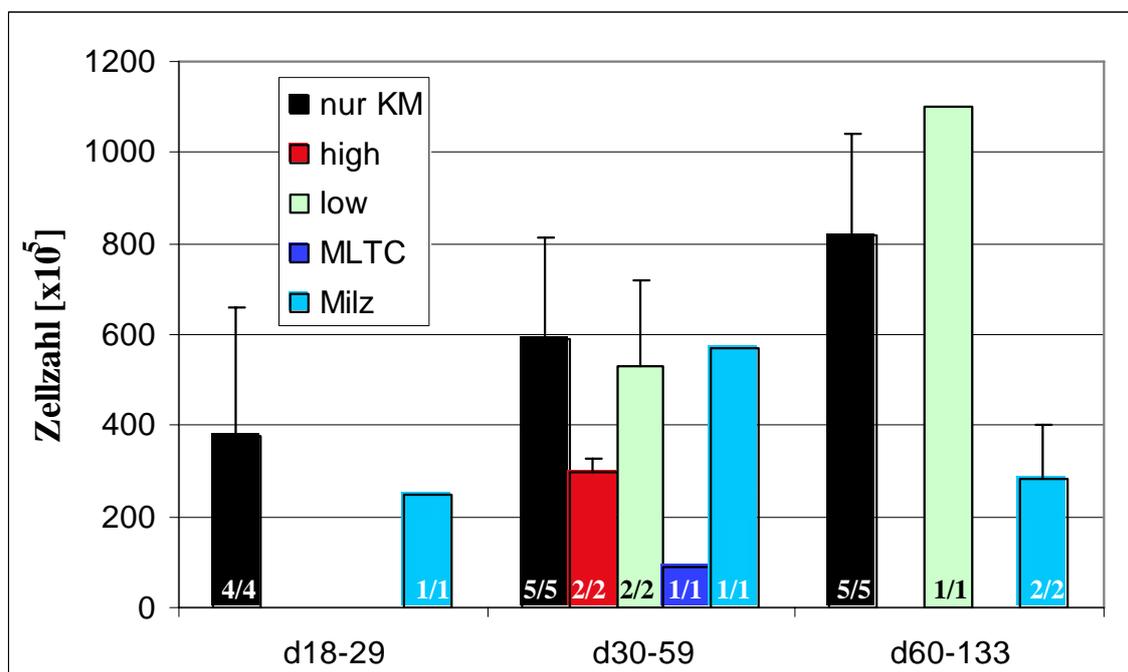


Abb.34: Gesamtzahl aus der Milz reisolierter Leukozyten: nach dem Transfer gegen den Tumor aktivierter Zellen wiesen Rezipienten der unseparierten MLR bzw. der „high“-Fraktion eine sehr geringe Anzahl Leukozyten auf, während Empfänger der „low“-Fraktion bzw. gegen den Tumor präaktivierter Splenozyten deutlich mehr Leukozyten enthielten. Die Anzahl war vergleichbar mit der von Rezipienten T-Zell-depletierten Knochenmarks. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten, pro Gruppe wurden 2 Tiere transplantiert.

Die Milzen der Rezipienten der „low“-Fraktion, oder gegen P815/B7 immunisierter Splenozyten wiesen 5-8 Wochen nach dem Transfer eine deutlich höhere Gesamtzellzahl auf als die Milzen von Tieren, die die „high“-Fraktion (etwa doppelt so viele Zellen) oder unseparierte MLTC (fünf Mal mehr) zusätzlich zu depletierem Knochenmarkzellen erhalten hatten. Sie entsprach der Anzahl Zellen, die aus den Milzen der Rezipienten von nur Knochenmark isoliert wurden. Auch die Empfänger gegen P815/B7 immunisierter Spendermilzzellen wiesen eine vergleichbare Zellzahl auf. 60 Tage nach allogener Transplantation konnten aus den Milzen der Rezipienten von Knochenmark eine Anzahl von Zellen isoliert werden, die der unbehandelten Kontrolltiere entsprach ($8-10 \times 10^7$ Zellen). Ebenso war es bei Rezipienten der „low“-Fraktion. Deutlich weniger Zellen enthielten nach diesem Beobachtungszeitraum die Milzen der Empfänger, die mit immunisierten Donorsplenozyten (gegen P815/B7) transplantiert wurden. Rezipienten der unseparierten MLTC oder der „high“-Fraktion überlebten einen so langen Zeitraum nicht.

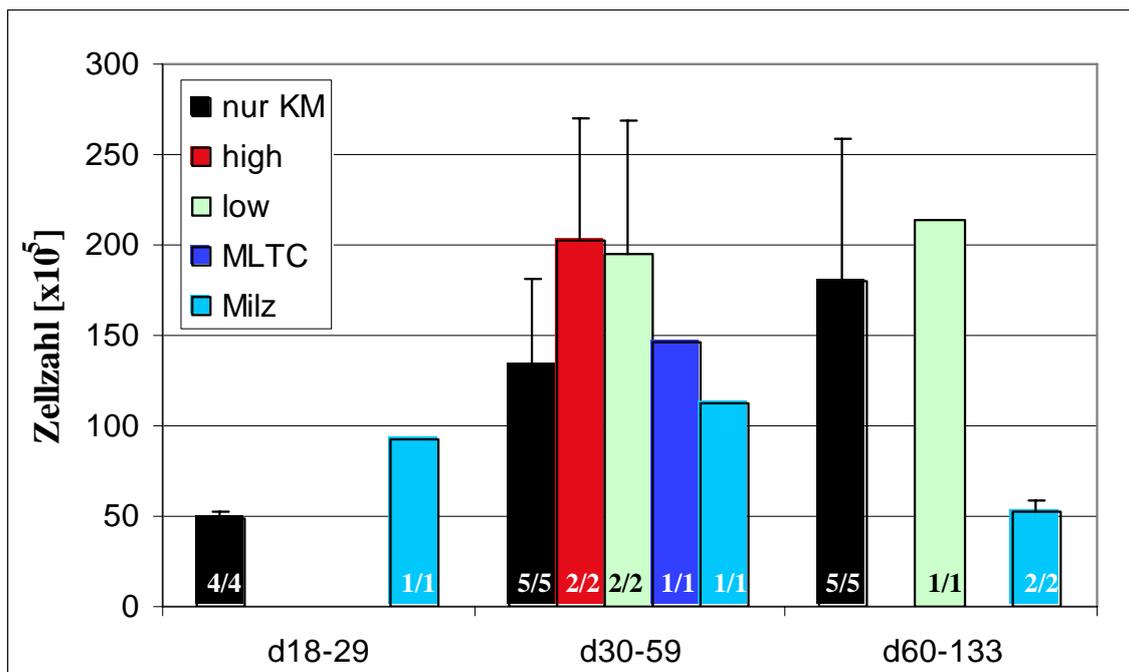


Abb.35: Gesamtzahl aus dem KM reisolierter Leukozyten: Bei der aus dem Knochenmark reisolierten Leukozytenzahl wurden im Zeitraum 30-59 Tage nach der Transplantation keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen festgestellt. Rezipienten gegen den Tumor aktivierter Milzzellen wiesen jedoch im Beobachtungszeitraum 60-133 Tage nach Transfer eine deutlich erniedrigte Anzahl Leukozyten auf. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten, pro Gruppe wurden 2 Tiere analysiert.

Die aus dem Knochenmark reisolierten Zellzahlen der einzelnen Behandlungsgruppen unterschieden sich deutlich weniger als die der Milz (siehe Abb.35). Die Femora und Tibiae von „low“- bzw. „high“-Rezipienten enthielten im Durchschnitt etwa vergleichbare Zellzahlen, wie eine unbehandelte Kontrolle (etwa 2×10^7 Zellen). Die Tiere der anderen Behandlungsgruppen wiesen im Schnitt eine etwas geringere Zellzahl ($1,5 \times 10^7$ Zellen) auf.

3.15.2. Durchflusszytometrische Analyse von Milz und Knochenmark nach KMT

Auch in diesem Modell wurde die Zusammensetzung der Zellen aus Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 36 fasst die Ergebnisse zusammen.

Untersuchte man die Tiere wiederum im Zeitraum 30-59 Tage nach dem Transfer, so waren nur die in der MLTC enthaltenen T-Zellen in der Lage, residuelle Empfängerzellen komplett zu eliminieren. Der Anteil T-Zellen an der Milz war in etwa bei allen analysierten Gruppen gleich. Das Verhältnis der T-Zellsubpopulationen untereinander entsprach dem einer unbehandelten Kontrolle. Lediglich in der Milz der MLTC-Rezipienten war das Verhältnis geringfügig zu Gunsten der $CD8^+$ Zellen verschoben. Sowohl bei Rezipienten der „low“-Fraktion als auch bei Empfängern der „high“-Fraktion oder Splenozyten eines immunisierten Donors waren Rezipienten T-Zellen in der Milz nachweisbar. Der Anteil $B220^+$ Zellen im

Knochenmark lag bei den Empfängern der unseparierten MLTC sowie der „high“-Fraktion deutlich niedriger als bei Rezipienten der „low“-Zellen oder Splenozyten. Dies wurde als Anzeichen der Induktion einer GvHD gewertet.

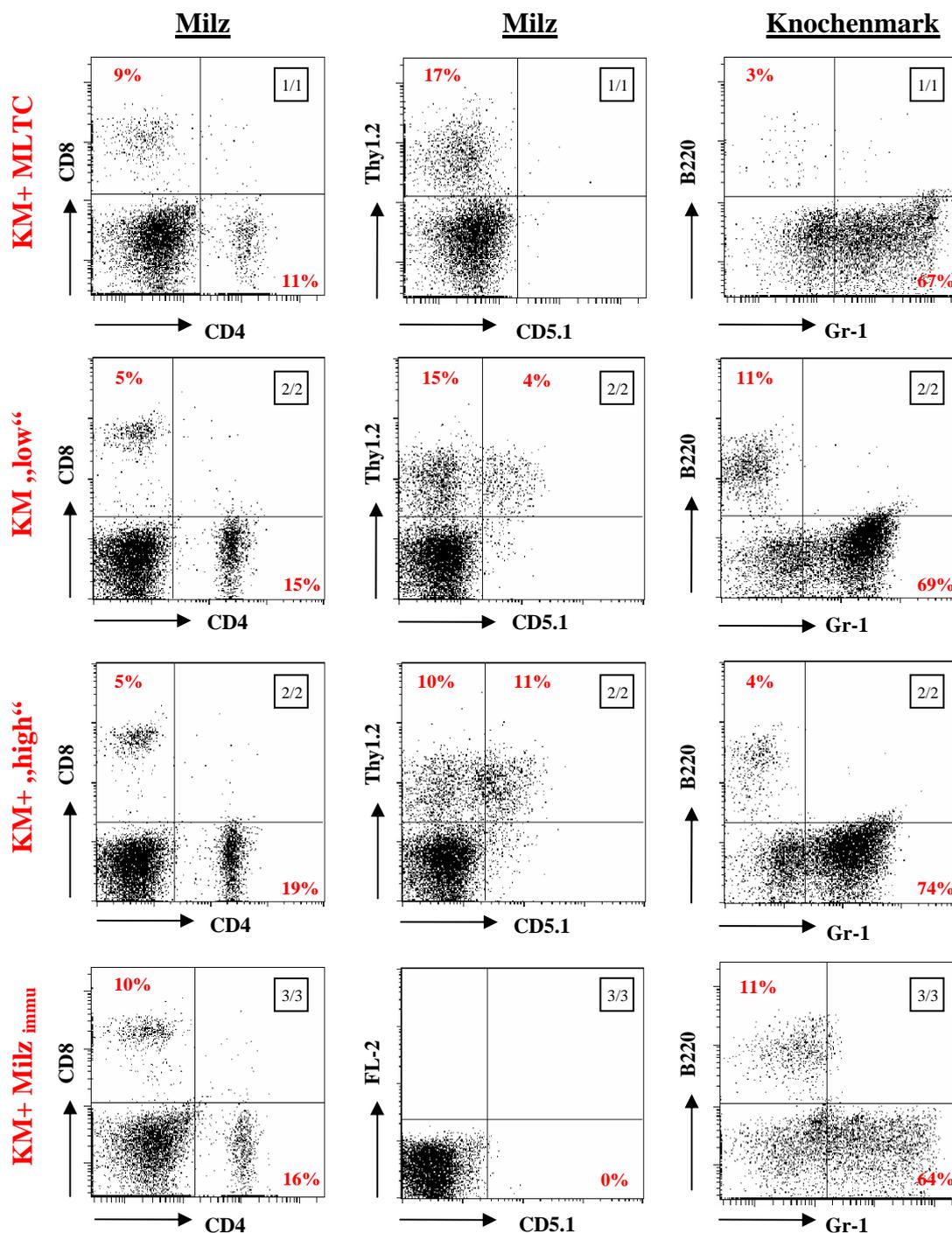


Abb.36: Expression leukozytärer Oberflächenmarker in Milz und Knochenmark 30 Tage nach Transplantation gegen den Tumor aktivierter Zellen (BALB/c → DBA/2): Rezipienten unseparierter MLTC wiesen in der Milz einen kompletten Donorchimärismus auf (fehlende Expression von CD5.1), während in Empfängern der „low“-Fraktion, bzw. der „high“-Fraktion ein gemischter Chimärismus nachgewiesen wurde. Die CD4/CD8-Ratio war nach Transfer unseparierter MLTC zugunsten der CD8⁺ T-Zellen verschoben (1:1), bei den Empfängern der anderen Behandlungsgruppen überwogen CD4⁺ T-Zellen. Im Knochenmark der „low“-Rezipienten waren nach dem Transfer gegen den Tumor aktivierter Zellen im Knochenmark B220⁺ Zellen nachweisbar, was

auf das Fehlen einer GvHD hinweist. Nach dem Transfer unseparierter MLTC, bzw. nach Zugabe der „high“-Fraktion war die Anzahl B-Lymphozyten im Knochenmark deutlich erniedrigt. Die Anzahl der analysierten Tiere sowie die Zahl der Tiere, die den dargestellten Phänotyp aufweisen, sind jeweils in der oberen rechten Ecke der Darstellung angegeben.

3.15.3. Anzahl B-Lymphozyten im Knochenmark

Wie die FACS-Analyse bereits zeigte, wiesen die Rezipienten der „low“-Fraktion 30-59 Tage nach dem Transfer gegen den Tumor aktivierter Zellen keine Anzeichen einer GvHD auf. So konnten im Knochenmark dieser Tiere B-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb.37). Deutlich geringer war die Menge B220⁺ Zellen in Empfängern der unseparierten MLTC. Auch die Rezipienten der „high“-Fraktion wiesen eine etwas geringere Anzahl B-Lymphozyten im Knochenmark auf. Im Vergleich zu Empfängern der „low“-Zellen waren im Knochenmark der „high“-Rezipienten nur etwa halb so viele B-Zellen enthalten.

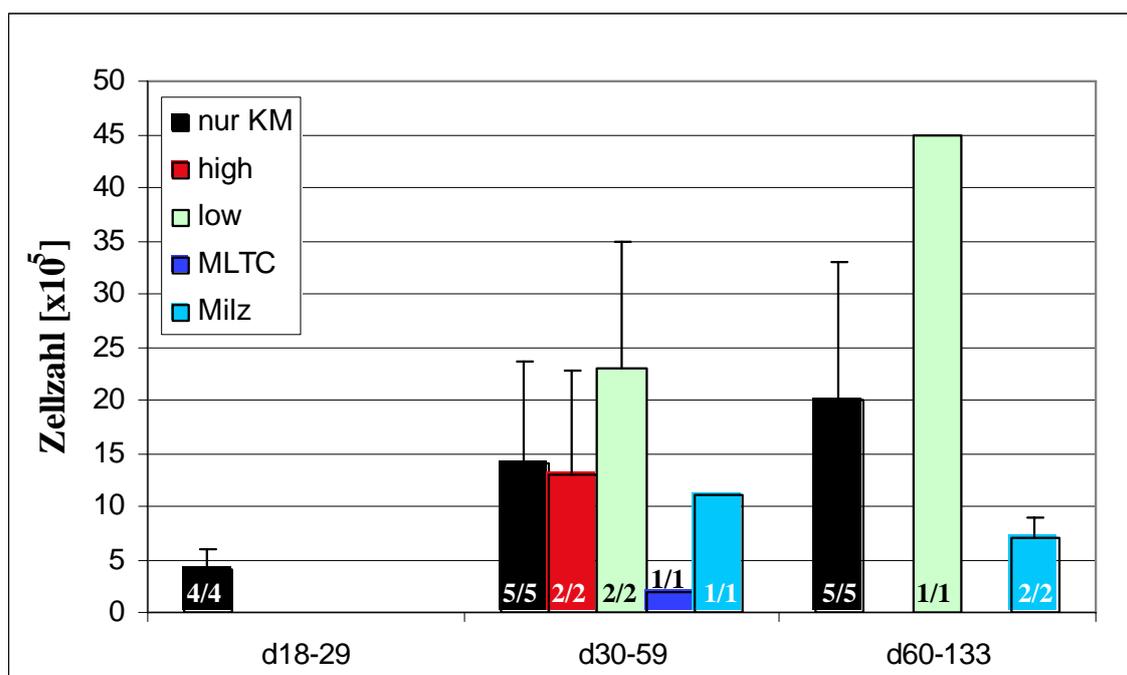


Abb.37: Anzahl aus dem Knochenmark reisolierter B-Lymphozyten: Bei Rezipienten der „low“-Fraktion waren 30 Tage nach Transplantation tumorreaktiver Zellen („low“-Fraktion) B-Lymphozyten im Knochenmark nachweisbar, ein Hinweis für das Fehlen einer GvHD. Im Knochenmark des MLTC-Empfängertieres fehlten B220⁺ Zellen fast vollständig, während Rezipienten von Knochenmark allein, bzw. nach Zugabe der „high“-Fraktion eine vergleichbare Anzahl B-Zellen im Knochenmark aufwiesen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten, pro Gruppe wurden 2 Tiere transplantiert.

3.16. Zusammenfassung der Ergebnisse im MHC-identen Transplantationsmodell

Zusammenfassend wurden im MHC-identen Transplantationsmodell die folgenden Ergebnisse erzielt: Wir haben in diesem Modell zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Die erste bestand darin gegen den Empfänger immunisierte Donorsplenozyten *in vitro* mit

Milzzellen des Empfängers zu stimulieren, zu separieren und zusammen mit T-Zell-depletiertem Knochenmark zu transplantieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die alloreaktiven Zellen, enthalten in der unseparierten MLR, der „low“-Fraktion und in der Fraktion präimmunisierter Donorsplenozyten, in den Rezipiententieren eine GvHD induzierten, nicht aber die *in vitro* ruhenden Zellen der „high“-Fraktion. Nachgewiesen wurde das Entstehen einer GvHD anhand eines deutlichen Gewichtsverlust, einer Lymphopenie der Rezipienten sowie dem Fehlen von B-Lymphozyten im Knochenmark der erkrankten Tiere. Die GvHD verlief jedoch deutlich milder als im MHC-disparaten System und es konnte ein längeres Überleben der Empfänger gezeigt werden. Die Zellen der „high“-Fraktion waren auch in diesem Transplantationsmodell tolerant gegenüber residuellen Rezipientenzellen. Lymphozyten sowohl des Donors als auch des Empfängers waren in der durchflusszytometrischen Analyse von Milz und Knochenmark nachweisbar. Die Zellen der alloreaktiven Fraktionen dagegen eliminierten die residuellen Empfängerzellen vollständig. Im MHC-identen Modell gelang es nicht, eine Restimulation der Zellen der „high“-Fraktion *in vitro* gegen unverwandte Antigene (*third party*) zu zeigen. *In vivo* konnten die ruhenden Zellen der „high“-Fraktion keine Tumorabstoßung vermitteln, während die Zellen der alloreaktiven Fraktionen das Wachstum eines induzierten Tumors deutlich verlangsamten gegenüber dem in Rezipienten von T-Zell-depletiertem Knochenmark allein.

Die zweite Strategie bestand darin, gegen einen Tumor (P815/B7) immunisierte, bzw. stimulierte Zellen zu separieren und zu transplantieren. Die Empfänger der „low“-Fraktion entwickelten in diesem Modellsystem keine GvHD, während Rezipienten der „high“-Fraktion sowie der unseparierten MLTC erkrankten. Die alloreaktiven Zellen der MLTC eliminierten residuelle Rezipientenzellen vollständig, während Empfänger der „low“- und auch der „high“-Fraktion einen gemischten Chimärismus aufwiesen. Unsere Interpretation ist, dass durch eine *in vitro* Stimulation mit Zellen der Tumorzelllinie das Spektrum der präsentierten und erkannten Antigene limitiert und die T-Zellantwort auf tumorspezifische Antigene fokussiert wird. Eine erhaltene Reaktivität der übertragenen Zellen der „low“-Fraktion gegen den Tumor *in vivo* bleibt zu zeigen.

3.17. Etablierung eines haploidenten Transplantationsmodells

Als weiteres Transplantationsmodell wurde eine haploidente Stammkonstellation gewählt. In einer so genannten *Parent-to-F1*-Konstellation werden Stammzellen und Lymphozyten eines homozygoten Elternteils auf heterozygote Kinder übertragen. Dafür wurden DBA/2-Männchen mit C3H-Weibchen gekreuzt, so dass die Tiere der F1-Generation die MHC-Moleküle beider Stämme tragen. Die so gewonnenen C3HxDBA/2-(C3D2) F1-Tiere wurden dann als Rezipienten eingesetzt, während C3H-Mäuse als Donoren dienten. In diesem Modell ist es im Gegensatz zum MHC-disparaten Modell (C3H → DBA) so, dass eine Abstoßungsreaktion nur von Seiten der Donorzellen gegen die Empfängerzellen, also in Richtung einer Transplantat-gegen-Wirt Reaktion, ablaufen kann. Die Zellen des Rezipienten sollten Donorzellen nicht als fremd erkennen, da die Empfängertiere die MHC-Moleküle beider Stämme tragen. So ist die Induktion einer GvHD möglich und eine Abstoßung des Transplantats durch residuelle Rezipientenzellen wird verhindert. In der klinischen Situation wäre die Möglichkeit einer solchen Transplantationskonstellation, ohne Induktion einer GvHD, von Vorteil, da so die Zahl der in Frage kommenden Spender deutlich ansteigen würde.

Auch in diesem Modell wurden zunächst Vorversuche unternommen, um die Induzierbarkeit einer GvHD zu prüfen. C3D2 F1-Tiere wurden letal bestrahlt und mit 1×10^7 Zellen T-Zell-depletiertem Knochenmark und 6×10^6 Splenozyten naiver C3H-Donoren transplantiert. 20 Tage nach dem Transfer wiesen die Tiere Anzeichen einer GvHD (Gewichtsverlust, struppiges Fell) auf und wurden der Analyse zugeführt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von Milz- und Knochenmarkzellen der Rezipiententiere sind in Abbildung 38 dargestellt.

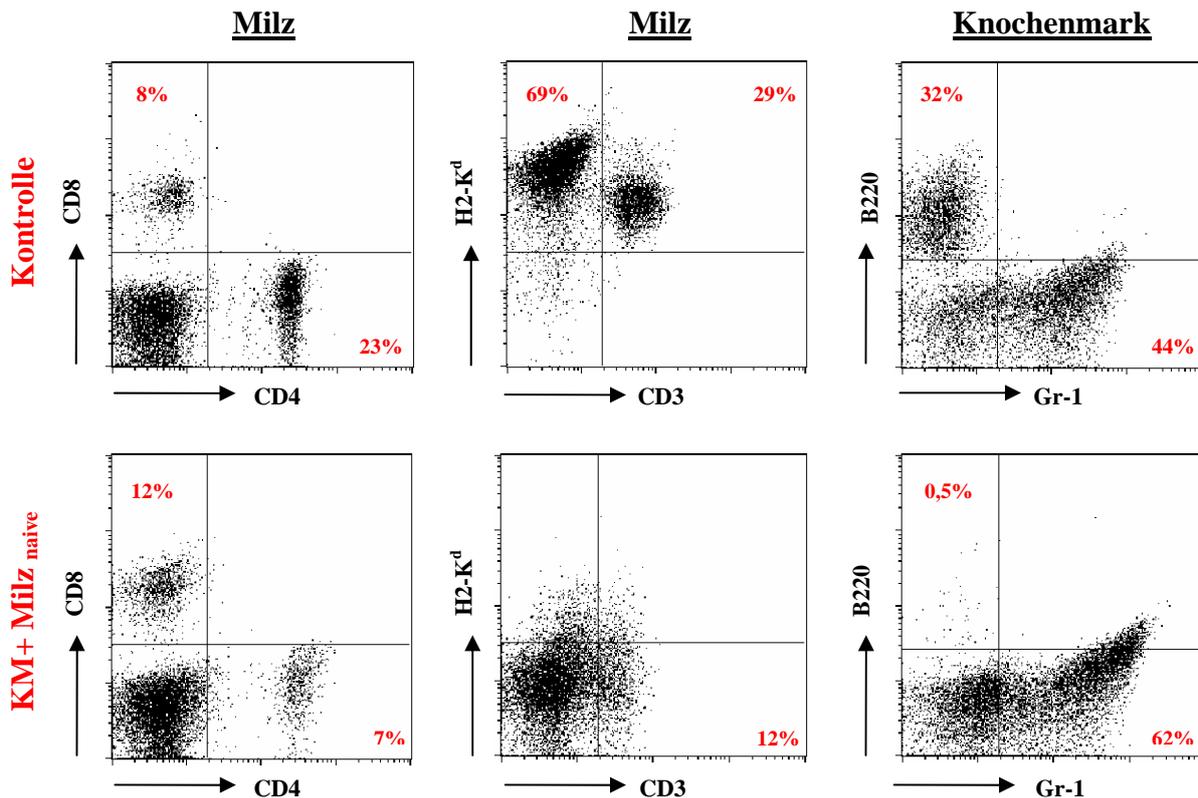


Abb.38: Expression leukozytärer Oberflächenmarker von Milz und Knochenmark nach dem Transfer haploidenter Zellen (C3H → C3D2 F1): 20 Tage nach Transplantation wiesen die Milzen von Rezipienten naiver Milz eine geringe Anzahl T-Lymphozyten auf, die CD4/CD8-Ratio war zugunsten der CD8⁺ T-Zellen verschoben. Es konnte ein kompletter Donorchimärismus nachgewiesen werden (fehlende Expression von H2-K^d). Im Knochenmark der Rezipienten fehlten B220⁺ Zellen vollständig. Diese Daten dokumentieren eine schwere GvHD. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils drei Rezipiententieren durchgeführt.

Um das Anwachsen der transplantierten Zellen in diesem Modell zu überprüfen, wurde der Verlust der Expression des MHC-Moleküls H2-K^d untersucht. Dieses ist spezifisch für den Stamm DBA/2. Die Tiere der F1-Generation exprimieren sowohl H2-K^d als auch H2-K^k (C3H) auf der Oberfläche der Leukozyten. Werden die Empfänger nun vor dem Transfer letal bestrahlt und wachsen die Donorzellen (H2-K^k) an, so sollte auf Rezipientenzellen das Molekül H2-K^d nicht länger nachweisbar sein.

Nach dem Transfer der C3H-Donorzellen ergab die Analyse, dass in den Rezipiententieren praktisch keine residuellen Empfängerzellen (H2-K^d-positiv) mehr nachweisbar waren. Das Verhältnis der T-Zellsubpopulationen zueinander war deutlich verschoben. Die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen überwog gegenüber den CD4⁺ Zellen. Weiteres Anzeichen einer schweren GvHD war auch in diesem Modell das Fehlen von B-Lymphozyten im Knochenmark. Es konnten keine B220⁺ Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse demonstrieren die Induzierbarkeit einer GvHD in dieser Transplantationskonstellation.

3.17.1. Transfer naiver Donorzellen

Daraufhin wurden naive C3H-Splenozyten mit CFSE markiert und *in vitro* mit bestrahlten C3D2 F1-Milzzellen stimuliert. Die Zellen der MLR wurden wie bereits in den anderen Konstellationen an Tag 4 nach Stimulation sortiert und zusammen mit T-Zell-depletiertem Knochenmark von C3H-Donoren in letal bestrahlte C3D2 F1-Empfängertiere übertragen. Als Kontrolle dienten wiederum Tiere, die ausschließlich T-Zell-depletiertes Knochenmark, unseparierte MLR oder Splenozyten erhielten. Pro Fraktion wurden 8×10^5 T-Lymphozyten übertragen.

Unerwarteter Weise kam es nach dem Transfer in diesem Modell in keiner der Transfergruppen, mit Ausnahme der Empfänger naiver C3H-Splenozyten, zur Induktion einer GvHD. Die Rezipiententiere wurden 90 Tage nach der Übertragung der Zellen analysiert. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gezeigt werden. Die Tiere wiesen in der Milz eine normale Zusammensetzung der Zellpopulationen auf, auch das Verhältnis der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zueinander war nicht verschoben. Ein Fehlen von B-Lymphozyten im Knochenmark konnte nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 39 stellt das *Engraftment* der Donorzellen graphisch dar. Dafür wurde durchflusszytometrisch der Anteil H2-K^d-negativer Zellen bestimmt. Wie bereits in den vorherigen Modellen kam es auch hier nach Transplantation von T-Zell-depletiertem Knochenmark allein zur Ausbildung eines gemischten Chimärismus. In den Rezipienten der „high“-Fraktion und der „low“-Fraktion stammten etwa 70% der aus der Milz reisolierten Zellen vom Donor, während bei den Rezipienten der unseparierten MLR $\frac{3}{4}$ der T-Zellen vom Donor waren. Der Anteil Rezipientenzellen an der restlichen Lymphopoese lag jedoch noch deutlich höher (60%). Bei Tieren, die zusätzlich zum Knochenmark naive Donorsplenozyten erhalten hatten, war ein volles *Engraftment* zu beobachten. Wie auch bei der Zusammensetzung der Zellpopulationen in der Milz war in der Engraftmentsituation kein signifikanter Unterschied zwischen den Rezipienten der „high“- und der „low“-Fraktion nachzuweisen.

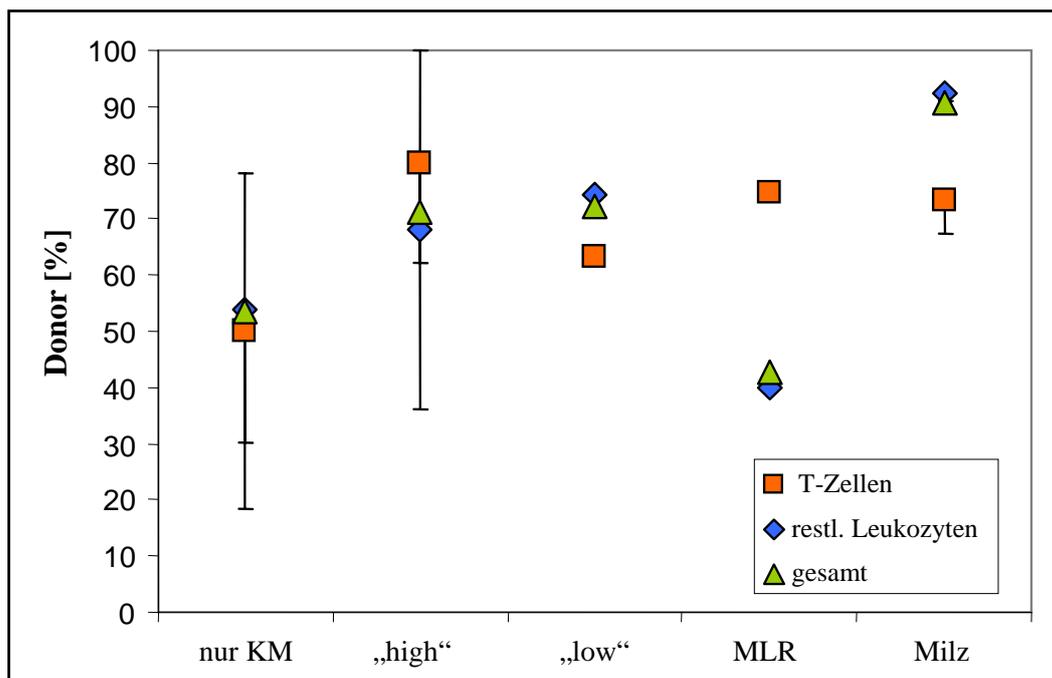


Abb.39: Anwachsen der transferierten Zellen nach dem Transfer naiver haploidenter Zellen: Rezipienten T-Zell-depletierten Knochenmarks wiesen einen gemischten Chimärismus auf. Nach Transplantation der „high“- und „low“-Fraktion stammten etwa 70% der Milzzellen vom Donor. Der Transfer naiver Donorsplenozyten induzierte einen vollen Donorchimärismus, während nach Transplantation unseparierter MLR $\frac{3}{4}$ der T-Zellen vom Donor stammten, 60% der restlichen Leukozyten waren Rezipientenzellen. Hier sind zusammenfassend die Daten zwei unabhängiger Experimente dargestellt. Pro Gruppe wurden je zwei Tiere untersucht.

3.17.2. Transfer präimmunisierter *in vitro* stimulierter Donorzellen

Durch den Transfer naiver Splenozyten zusammen mit T-Zell-depletiertem Knochenmark war es möglich im haploidenten Transplantationsmodell eine GvHD zu induzieren. Die Übertragung *in vitro* stimulierter und separierter Zellen führte jedoch in den Rezipienten alloreaktiver Zellen nicht zur Induktion einer GvHD. Daraufhin wurden C3H-Spendertiere mit DBA/2-Splenozyten immunisiert und die Milzzellen dieser Tiere in der MLR mit bestrahlten C3D2 F1-Zellen stimuliert. Wie zuvor wurden die Zellen an Tag 4 nach Stimulation in die „high“- und „low“-Fraktion sortiert und zusammen mit T-Zell-depletiertem Knochenmark in letal bestrahlte Rezipienten transferiert. Dabei wurden wiederum 8×10^5 T-Lymphozyten pro Fraktion übertragen. 30 Tage nach dem Transfer erfolgte die Analyse der Tiere.

Abbildung 41 stellt das Anwachsen der transferierten Zellen in den Rezipiententieren dar:

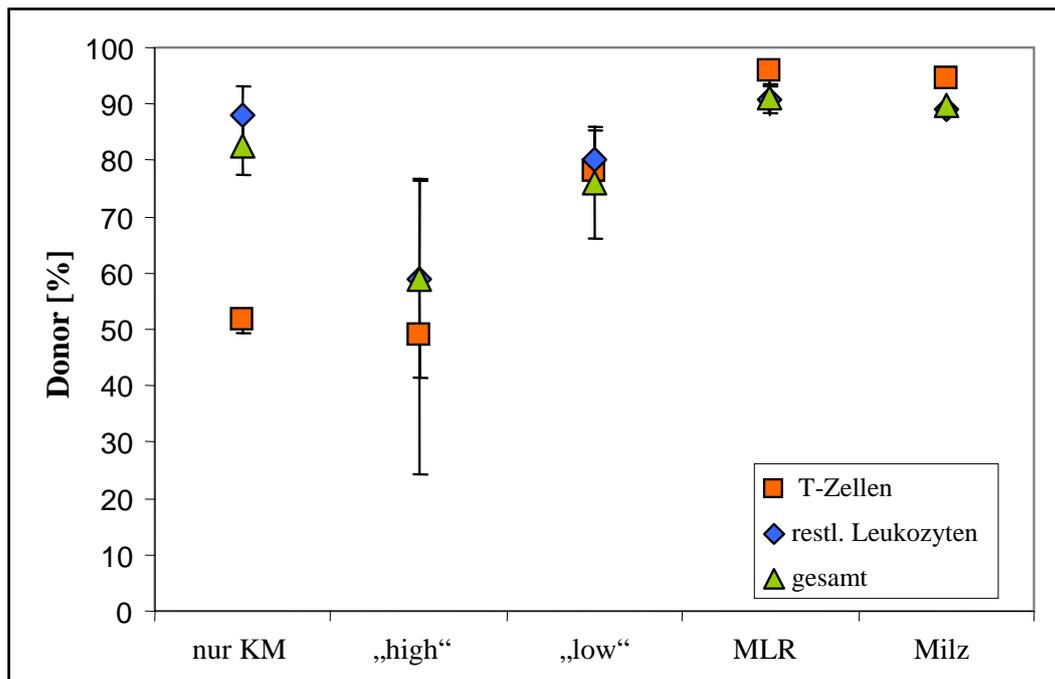


Abb.41: *Engraftment* nach dem Transfer haploidenter Zellen (Donoren präimmunisiert): Nach Transplantation alloreaktiver Zellen in Form unseparierter MLR bzw. Splenozyten wurde in Rezipientenmilzen ein kompletter lymphozytärer und myeloischer Donorchimärismus nachgewiesen, auch in Milzen der „low“-Rezipienten machten die Donorzellen 80% der Leukozyten aus. Milzen der „high“-Rezipienten wiesen dagegen einen gemischten Chimärismus auf. Durchgeführt wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils 2 Tieren pro Gruppe.

Empfänger der „high“-Fraktion wiesen wie in den anderen Modellsystemen einen gemischten Chimärismus auf. Etwa die Hälfte der aus der Milz reisolierten Zellen stammte jeweils vom Donor bzw. vom Rezipienten. Bei den Empfängern von Knochenmarkzellen allein wurde ein gemischter Chimärismus der T-Lymphozytenpopulation nachgewiesen, während der Anteil der Donorzellen an den restlichen Leukozytenpopulationen deutlich höher lag (80-90%). Tiere, die zum T-Zell-depletierten Knochenmark die Zellen der „low“-Fraktion, unseparierte MLR oder Splenozyten erhalten hatten, zeigten ein nahezu komplettes *Engraftment*. Mindestens 80% der reisolierten Zellen stammten vom Donor. Das Anwachsen der Zellen der „high“-Fraktion war nach dem Transfer präimmunisierter Donorzellen deutlich verschlechtert im Vergleich zur Übertragung naiver Donorzellen. In Rezipienten der alloreaktiven Zellfraktionen wurde zwar ein gutes Anwachsen der transplantierten Zellen erreicht, jedoch kam es auch hier nicht reproduzierbar zur Induktion einer GvHD. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Untersuchungen in diesem Modellsystem durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass auch in diesem Modellsystem die Zellen der alloreaktiven Fraktionen „low“, unseparierter MLR bzw. Splenozyten das Anwachsen des T-Zell-depletierten Knochenmark unterstützten, während die Zellen der „high“-Fraktion dies nicht vermochten.

3.18. Transfer alloreaktiver Zellen in Rag1^{-/-} Empfängertiere

Neben den zuvor beschriebenen Modellen, wurde in einem weiteren MHC-disparaten System gearbeitet. Dabei dienten Rag1^{-/-} Tiere auf C57BL/6-Hintergrund als Rezipienten, Donoren waren C3H-Mäuse. Den Rag1^{-/-} Mäusen fehlt das Rekombinations-aktivierende-Gen1 (Rag1) (Mombaerts *et al.* 1992). Dieses ist verantwortlich für das Rearrangement von Antigenrezeptoren während der Entwicklung von Lymphozyten. Daraus resultiert ein Stopp der Entwicklung und somit das komplette Fehlen von B- und T-Zellen. Diese Tatsache ermöglicht es in dieser Konstellation das Potential der „low“-Zellen in einem Rezipienten zu untersuchen, in dem die als Stimulatoren eingesetzten Antigene (Lymphozyten) nicht präsent sind.

Für Experimente in diesem Modellsystem wurden naive C3H-Splenozyten mit CFSE markiert und mit bestrahlten C57BL/6-Milzzellen stimuliert. Sortierung und Transplantation der Zellen der MLR erfolgten wiederum nach viertägiger Stimulation. Dabei erfolgte die Applikation der Zellen in diesem Modell intraperitoneal. Als Kontrollgruppen dienten Tiere, die unseparierte MLR oder Donorsplenozyten erhielten.

3.18.1. Überlebensdauer nach dem Transfer

Nach dem Transfer der aktivierten Zellen in diesem Modell konnte ein längeres Überleben der Tiere, die die „low“-Fraktion erhalten hatten, gezeigt werden. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Modellsystemen kam es hier in den Rezipienten der *in vitro* proliferierenden Zellpopulation („low“) nicht zur Induktion einer GvHD. Im MHC-disparaten System C3H → DBA/2 (siehe 3.11) erkrankten die Empfänger der „low“-Fraktion bereits 7-10 Tage nach der Transplantation schwer. Die Übertragung der Zellen vom Stamm C3H in Rag1^{-/-}-Empfänger führte dazu, dass 50% der Rezipienten unsortierter MLR oder Splenozyten innerhalb der ersten drei Wochen nach dem Transfer verstarben. Bis zum Tag 80 nach der Übertragung der Zellen waren alle Empfänger der unseparierten MLR oder Splenozyten verstorben. Die Tiere wiesen dabei die typischen Anzeichen einer GvHD, wie Gewichtsverlust, struppiges Fell und zusammengekauerte Haltung auf. Auch ein Großteil der Empfänger der „high“-Fraktion zeigte eine deutlich kürzere Überlebensdauer als die „low“-Rezipienten. 80% der Tiere verstarben im Zeitraum von 80 Tagen nach Transplantation. Die Empfänger der alloreaktiven Fraktion der MLR („low“-Fraktion) wiesen auch 100 Tage nachdem die Zellen übertragen wurden keine Anzeichen einer GvHD auf. Abbildung 42 stellt die Überlebensdauer der einzelnen Transfergruppen graphisch dar. Dabei sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente zusammengefasst.

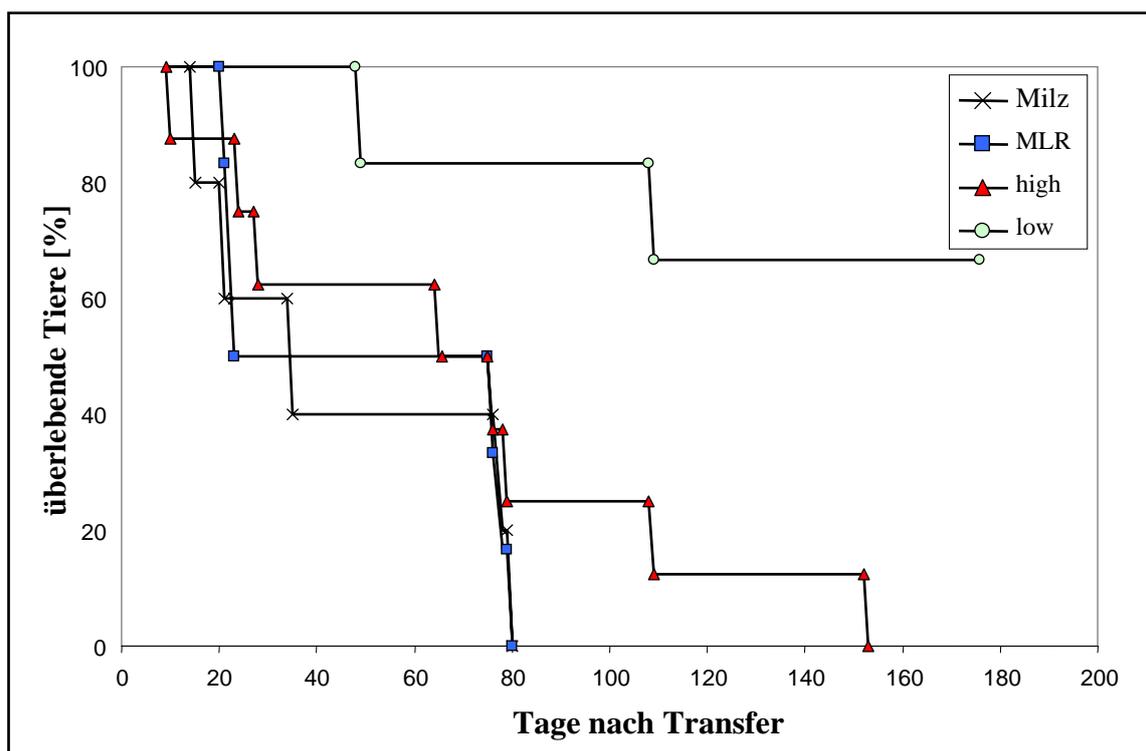


Abb.42: Überlebenskurven von C57BL/6-Rag¹^{-/-}-Tieren nach Transfer: Dargestellt ist das Überleben von Rag1^{-/-}-Tieren, nach dem Transfer gegen C57BL/6 stimulierter C3H-Splenozyten. Rezipienten der unseparierten MLR bzw. Splenozyten verstarben innerhalb 80 Tage nach Transplantation. Auch die Mehrzahl der Empfänger *in vitro* ruhender Zellen („high“-Fraktion) verstarb in diesem Zeitraum. Etwa 75% der Rezipienten der alloreaktiven „low“-Fraktion dagegen überlebten einen Beobachtungszeitraum von 180 Tagen.

3.18.2. *In vivo* Restimulation der alloreaktiven Zellen

Durch die Analyse von Blutproben der Rezipiententiere konnte gezeigt werden, dass die transferierten Donorzellen in den Empfängertieren auch drei Wochen nach dem Transfer nachweisbar waren. Die Rezipienten der alloreaktiven „low“-Fraktion wiesen jedoch, trotz MHC-Disparität, auch 80 Tage nach der Übertragung der Zellen keine Anzeichen einer GvHD auf. Es wurde daher versucht durch die nachträgliche Gabe bestrahlter C57BL/6-Milzzellen die transferierten Zellen *in vivo* zu reaktivieren und auf diese Weise eine GvHD zu induzieren. Die T-Zellen der „low“-Fraktion waren vor dem Transfer mit C57BL/6-Lymphozyten stimuliert worden. Im Rezipienten fehlen diese Zellen und somit die Antigene und der spezifische Stimulus der alloreaktiven Zellen. In zwei von vier „low“-Rezipienten wurden 1×10^7 bestrahlte C57BL/6-Milzzellen i.p. injiziert. Drei Wochen nach der Applikation wiesen die Tiere Anzeichen einer schweren GvHD (Gewichtsverlust, struppiges Fell, zusammengekauerte Haltung) auf und verstarben, während die Tiere, die keine C57BL/6-Splenozyten erhalten hatten, nach wie vor frei von derartigen Symptomen waren. Dies deutet darauf hin, dass die übertragenen, vom Donor stammenden, T-Zellen durch den erneuten

Antigenstimulus reaktiviert wurden und eine Immunantwort gegen die spezifischen Targetzellen ausführen, mit denen sie *in vitro* stimuliert wurden. Darüber hinaus führt die Restimulation wahrscheinlich dazu, dass auch nicht-lymphozytäre Antigene erkannt werden, was zur Induktion einer GvHD führt.

Die Ergebnisse zeigen, dass *in vitro* aktivierte T-Lymphozyten *in vivo* auch ohne weiteren Stimulus über einen langen Zeitraum persistieren. Durch eine erneute Gabe der zur Stimulation verwendeten Antigene sind die Zellen reaktivierbar, was zu der Annahme führt, dass tumorreaktive T-Zellen, die im Stadium der Remission transplantiert wurden, auch im Falle einer wiederkehrenden Erkrankung maligne Zellen erkennen und zerstören könnten.

4. Diskussion

Aufgrund genetischer Veränderungen kommt es bei einer Vielzahl von Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, insbesondere Leukämien, zu einer klonalen Proliferation undifferenzierter maligner Zellen. Dies führt zu einer Akkumulation neoplastischer Zellen primär im Knochenmark, im Blut und anderen Geweben. Daraus resultieren eine Verdrängung normaler Hämatopoese und eine erhebliche Beeinträchtigung des Immunsystems und anderer Organsysteme. Zur Behandlung solcher hämatopoetischer Erkrankungen stellen die allogene Knochenmarktransplantation (KMT), bzw. die Übertragung peripherer Blutstammzellen (PBSCT) heute etablierte Therapieverfahren dar. Dabei werden Stammzellen eines gesunden Spenders auf erkrankte Empfänger übertragen. Indikation für eine Transplantation sind alle Arten der Leukämie im Stadium der Remission und Lymphome, aber auch für nicht-maligne Erkrankungen stellt der Transfer von Stammzellen eine Therapieoption dar (Storb *et al.* 1974; Beutler *et al.* 1979; Lucarelli *et al.* 1984). Bei malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems ist die Knochenmarktransplantation in vielen Fällen die einzig kurative Behandlungsmöglichkeit. Zusätzlich zur Übertragung von Knochenmark, bzw. Stammzellen werden in einigen Situationen in zeitlichem Abstand oder bei Wiederkehren der Erkrankung nach KMT/PBSCT (im Folgenden unter dem Begriff KMT subsumiert) Donorlymphozyten transferiert (Donor-Lymphozyten-Infusion, DLI). Durch im Transplantat enthaltene immunkompetente Zellen, im Wesentlichen T-Zellen, wird der so genannte Graft-versus-Leukämie (GvL)-Effekt vermittelt, welcher in der Erkennung und Zerstörung der leukämischen Zellen des Empfängers besteht (Barnes *et al.* 1956; Mathe *et al.* 1965; Weiden *et al.* 1981; Horowitz *et al.* 1990). Dieses Phänomen stellt einen wesentlichen Aspekt der kurativen Wirkung dieser Therapie dar. Bisher ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen die Hauptmediatoren des GvL-Effektes sind. Auch für natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wird eine Beteiligung in der Vermittlung eines antileukämischen Effektes angenommen (Ruggeri *et al.* 2002).

Limitiert wird der Erfolg einer KMT wesentlich durch die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (*graft-versus-host disease*, GvHD). Diese wird ebenfalls hauptsächlich durch immunkompetente T-Zellen im Transplantat vermittelt (Appelbaum 2001; Ho *et al.* 2001). Bereits durch das Konditionierungsregime (Bestrahlung und Chemotherapie) kommt es zu einer Gewebeschädigung im Empfänger und damit zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und Interleukin (IL)-1, IL-6 und IL-8 (Mowat *et al.* 1990; Ferrara *et al.* 2003). Diese bewirken eine gesteigerte Expression von Adhäsions- und MHC-Molekülen und

fördern damit die Erkennung von Empfängergewebe durch Donor-T-Zellen, welche die Hauptmediatoren der GvHD sind. Daneben spielen möglicherweise auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine Rolle in der Vermittlung von GvH-Effekten (Davies *et al.* 2002).

4.1. Transplantatmodifikationen zur Vermeidung einer GvHD-Induktion

Um das Risiko der Inzidenz einer GvHD zu verringern erschien daher die T-Zelldepletion des Knochenmarks *ex vivo* eine effektive Methode. Bereits 1965 zeigten Dicke *et al.* im Mausmodell, dass Rezipienten T-Zell-depletierter Splenozyten ohne Anzeichen einer GvHD überlebten, während Empfänger von Milzzellen, die unterschiedliche Mengen T-Lymphozyten enthielten, eine schwere GvHD entwickelten und starben (van Dicke *et al.* 1968). Daraufhin wurde eine Vielzahl von Verfahren entwickelt, um T-Zellen aus dem Transplantat zu eliminieren (Trentin *et al.* 1973; Reisner *et al.* 1978). Dadurch konnte die Häufigkeit einer GvHD sowohl bei Transplantationen im MHC-identen-, als auch im MHC-disparaten Modell, deutlich vermindert bzw. teilweise vermieden werden (Rodt *et al.* 1974; Korngold *et al.* 1978; Kolb *et al.* 1979).

Aufgrund der Ergebnisse im Tiermodell wurden in den 80er Jahren auch beim Menschen vermehrt Donor-T-Zellen vor der Transplantation eliminiert. Dabei zeigte sich, dass durch das Entfernen der Zellen aus dem Transplantat die Inzidenz sowohl der akuten, als auch der chronischen GvHD deutlich gesenkt werden konnte (Rodt *et al.* 1981; Reinherz *et al.* 1982; Prentice *et al.* 1984; Hale *et al.* 1988). Die Depletion immunkompetenter Zellen aus dem übertragenen Knochenmark führte jedoch zu einem erhöhten Risiko des Transplantatversagens (Martin *et al.* 1985; Trigg *et al.* 1985; Patterson *et al.* 1986; Martin *et al.* 1988; Wagner *et al.* 1988), einer verlängerten Phase der Immundefizienz *post transplantationem* und damit verbunden zu einem erhöhten Risiko opportunistischer Infektionen (Parreira *et al.* 1987; Shapiro *et al.* 1988; Zutter *et al.* 1988; Engelhard *et al.* 1989; Keever *et al.* 1989; Couriel *et al.* 1996; Wu *et al.* 2000). Außerdem wurde ein erhöhtes Risiko eines Rezidivs, insbesondere bei CML Patienten beobachtet (Mitsuyasu *et al.* 1986; Martin *et al.* 1988; Marmont *et al.* 1991; Gratwohl *et al.* 1993). Dies zeigt, dass durch die Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat zwar das Risiko einer GvHD deutlich gesenkt werden kann, jedoch gleichzeitig der GvL-Effekt und damit die kurative Wirkung der KMT verloren geht.

Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren vermehrt Strategien entwickelt, die es ermöglichen sollen, alloreaktive, und damit GvHD-induzierende, T-Zellpopulationen ohne Verlust des GvL-Effektes zu eliminieren. Fälle, in denen bei Leukämie-Patienten durch

Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) eine komplette Remission erreicht werden konnte, ohne dass es zur Induktion einer GvHD kam (Kolb *et al.* 1995; Mackinnon *et al.* 1995), führten zu der Annahme, dass eine Trennung beider Effekte (GvL und GvH) voneinander prinzipiell möglich ist. In Tabelle 3 (siehe Anhang) sind die bisher entwickelten Verfahren zur Elimination alloreaktiver Zellen zusammenfassend dargestellt. Dazu zählen die Toleranzinduktion gegenüber allogenen Stimuli durch Blockade kostimulatorischer Signale der T-Zellaktivierung (Blazar *et al.* 1994; Gribben *et al.* 1996), die Elimination von T-Zellen aufgrund der Expression bestimmter Aktivierungsmarker (CD25, CD69) (Cavazzana-Calvo *et al.* 1994; Rencher *et al.* 1996; Fehse *et al.* 2000) oder die Induktion des Aktivierungsinduzierten Zelltods (AICD) (Hartwig *et al.* 2002). Auch die Möglichkeit aktivierte T-Lymphozyten *in vivo* mittels Modifikation mit einem Suizidgen (Herpes Simplex Thymidin-Kinase, HSV-TK) zu entfernen, wurde evaluiert (Tiberghien *et al.* 1994; Rettig *et al.* 2004). Darüber hinaus wurde im Tiermodell die Addition regulatorischer T-Zellen zum Transplantat als effektive Option zur Reduktion der GvHD beschrieben (Hoffmann *et al.* 2002; Taylor *et al.* 2002). In der Mehrzahl der Publikationen wurde das Potential zur GvHD-Induktion der gewonnenen Zellen *in vivo* im Mausmodell untersucht. Eine verbleibende Reaktivität der Zellen gegenüber unverwandten Antigenen wurde jedoch vielfach nur *in vitro* durch ³H-Thymidin-Inkorporation in Proliferationsassays analysiert. Sie ist erforderlich um eventuelle Infektionen nach der Transplantation erfolgreich zu bekämpfen. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Transplantation von Zellen, die keine GvHD induzieren, ist jedoch eine verbleibende Reaktivität der Zellen gegenüber einer zugrunde liegenden Leukämie (GvL-Effekt). Nur wenige der Arbeitsgruppen, die Verfahren zur Gewinnung toleranter Zellen entwickelten, haben jedoch untersucht, ob die transplantierten Zellpopulationen *in vivo* einen GvL-Effekt vermitteln können.

4.2. Entwicklung eines proliferationsbasierten Separationsverfahrens

Ziel der vorliegenden Arbeit war, es ein proliferationsbasiertes Separationsverfahren zu entwickeln, das die Trennung *in vitro* aktivierter von nicht-aktivierten T-Zellen erlaubt. *In vivo* sollten die Effekte der separierten Zellpopulationen im Rahmen der allogenen Knochenmarktransplantation bezüglich ihres Potentials zur GvHD-Induktion und zur Tumorabstoßung evaluiert werden.

Die Proliferation aktivierter T-Zellen stellt eines der sichersten Kriterien der T-Zellaktivierung dar. Mit Hilfe des Farbstoffes Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester (CFSE) kann die Zellteilung *in vitro* und *in vivo* durchflusszytometrisch gut erfasst werden

(Lyons 2000). Bei CFSE handelt es sich um ein an sich farbloses hydrophobes Molekül, das passiv in die Zellen diffundiert. Nach Spaltung durch intrazelluläre Esterasen entsteht ein fluoreszierendes Produkt, das kovalent an zytoplasmatische Proteine bindet. Mit jeder folgenden Zellteilung wird die Hälfte der Fluoreszenz an die jeweiligen Tochterzellen weitergegeben.

Maury et al. haben 2001 mit Hilfe einer CFSE-Markierung deutliche Unterschiede in der Proliferationskinetik syngen oder allogenen transplantierten T-Zellen gezeigt (Maury *et al.* 2001). Alloreaktive Zellen teilten sich innerhalb der ersten 40 Stunden nach Transfer mehrmals (mindestens 4 Zyklen). Nach 88 Stunden hatten die meisten der Donor-T-Zellen mindestens acht Teilungen durchlaufen, während syngen transplantierte (nicht-reaktive) Zellen lediglich ein bis zwei homöostatische Teilungen durchlaufen hatten.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde von uns ein Verfahren entwickelt, welches es erlaubt, *in vitro* aktivierte von nicht-aktivierten T-Zellen zu separieren. Es sollte untersucht werden, ob so alloreaktive T-Zellen im Vorfeld einer Transplantation oder Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) aus dem Transplantat entfernt werden können, um die Inzidenz einer GvHD *in vivo* zu vermeiden. Zur Untersuchung der *in vivo*-Effekte separierter Zellpopulationen wurde das Mausmodell gewählt.

Für die Untersuchung der *in vitro*-Aktivierung von T-Zellen stellt die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) ein wichtiges Modellsystem dar. Sie wurde ursprünglich entwickelt, um Abstoßungsreaktionen zwischen potentiellen Spendern und Empfängern im Vorfeld einer Transplantation zu untersuchen (Plate *et al.* 1970). Hierfür werden Lymphozyten des Donors mit bestrahlten Zellen des Empfängers kokultiviert. So kann *in vitro* eine allogene Reaktion generiert werden, ähnlich der, die *in vivo* während der GvHD abläuft (Maury *et al.* 2001). Die Färbung der Donorzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE erlaubt es, die Proliferation der alloreaktiven Zellen direkt in der Durchflusszytometrie zu verfolgen und ermöglicht durch die Zellsortierung eine einfache Separation der proliferierenden von ruhenden Zellen. Als Kontrolle dienten in unseren Experimenten unstimulierte, CFSE-markierte Donorzellen. Für diese konnte gezeigt werden, dass sie in Kultur nicht proliferieren, was eine wichtige Voraussetzung für die Anwendbarkeit eines solchen Verfahrens darstellt.

Eine Analyse im Zytotoxizitätstest ergab, dass nach der Separation der proliferierenden und ruhenden Populationen, die sich teilenden Zellen eine MHC-disparate Zielzelllinie in vergleichbarer Weise wie unseparierte T-Zellen lysierten. Die während der MLR ruhenden Zellen besaßen keine zytolytische Aktivität gegenüber Rezipientenzellen.

Um eine verbleibende immunologische Aktivität der *in vitro* ruhenden T-Lymphozyten nachzuweisen, wurden die Zellen dieser Zellfraktion nach der Separation mit unverwandten Antigenen *in vitro* restimuliert. Dabei war es jedoch nicht möglich in einem $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest eine Reaktivität der „high“-Zellen gegen *third-party* Antigene zu zeigen. Im Fall der unseparierten T-Zellen (MLR) war eine gewisse Reaktivität der restimulierten Zellen gegen *third-party* Antigene nachweisbar. Vermutlich ist die Sensitivität der Detektionsmethode nicht ausreichend, um eine verbleibende immunologische Aktivität der separierten Zellen nachzuweisen, oder der *in vitro*-Stimulus war nicht ausreichend, um eine Reaktivität der Zellen zu induzieren. *Ex vivo* gelang in unserem System jedoch der Nachweis einer erhaltenen Reaktivität der transplantierten „high“-Fraktion gegen *third-party* Antigene nach Restimulation. Nach dem Transfer reisolierte Splenozyten, transplantiert im MHC-disparaten Modell (C3H \rightarrow DBA/2), wurden erneut mit CFSE markiert und mit Splenozyten des Stammes C57BL/6 restimuliert. Dabei konnte eine Proliferation der vom Donor stammenden T-Zellen nachgewiesen werden (siehe 3.11.4, Abb.23), was einen Hinweis darauf liefert, dass die Zellen der ruhenden „high“-Fraktion *in vivo* einen protektiven Effekt gegen mögliche Infektionen bieten könnten.

Parallel zu unseren Arbeiten veröffentlichten Godfrey et al. die Untersuchung eines ähnlichen proliferationsbasierten Verfahrens im humanen System (Godfrey *et al.* 2004). In einer MLR wurden aufgereinigte CD4^+ T-Zellen mit CFSE markiert und allogan mit Zellen des peripheren Blutes oder dendritischen Zellen stimuliert. Auch hier konnte eine deutliche Trennung der ruhenden und proliferierenden Zellen erzielt werden. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zeigt auch diese Arbeitsgruppe, dass die Population der sich teilenden Zellen im Wesentlichen aus blastoiden aktivierten T-Zellen (CD25^+) besteht. In der Fraktion der ruhenden Zellen wurden ebenfalls kleine $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Zellen (etwa 5%) nachgewiesen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um regulatorische T-Zellen. Nach Separation und *in vitro* Restimulation konnte in dieser Publikation durch ^3H -Thymidin-Inkorporation in einem Proliferationstest für die ruhenden Zellen der Erhalt einer gewissen Reaktivität gegen *third-party*- und infektiöse Antigene (*candida*, Cytomegalie-Virus (CMV)) nachgewiesen werden.

4.3. Untersuchung der *in vivo* Effekte separierter Zellfraktionen im Kontext allogener Knochenmarktransplantation in murinen Systemen

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit bestand darin, die *in vivo*-Effekte der auf diese Weise separierten Zellen im murinen System bei allogener Knochenmarktransplantation zu untersuchen. Hierfür wurden unterschiedliche Transplantationsmodelle ausgewählt: im MHC-disparaten Modell wurden Tiere des Stammes C3H als Donoren und DBA/2-Tiere als Rezipienten gewählt, in einem MHC-identen Modell dienten BALB/c-Tiere als Donoren, Rezipienten waren wiederum Tiere des Stammes DBA/2. Des Weiteren wurden die Effekte in einem haploidenten Modellsystem untersucht, in dem Zellen einer homozygoten Elterngeneration auf Tiere der heterozygoten F1-Generation (C3H → C3HxDBA/2 F1) übertragen wurden. Vorversuche ergaben, dass es im MHC-disparaten Modell zur Induktion einer akuten GvHD kam, während es sich in den beiden anderen Modellsystemen um einen eher chronischen Verlauf der Krankheit handelt.

Der Einfluss der separierten Zellen wurde bezüglich verschiedener Faktoren untersucht: Zum einen sollte gezeigt werden, dass die Separation der CFSE-markierten Zellen nach *in vitro* Stimulation eine Depletion der alloreaktiven T-Zellen erlaubt und damit die Induktion einer GvHD vermieden werden kann. Der Erfolg einer T-Zell-basierten Therapie ist jedoch abhängig vom GvL-Effekt, vermittelt durch im Transplantat enthaltene leukämieaktive T-Zellpopulationen. Um einen Vorteil der übertragenen „high“-Zellen gegenüber dem Transfer von ausschließlich T-Zell-depletiertem Knochenmarkzellen zu zeigen, wurde daher im MHC-identen System zudem untersucht, ob die übertragenen Zellpopulationen einen GvL-Effekt ausüben können, d.h. ob sie in der Lage sind, einen etablierten Tumor abzustößeln.

Weiterhin wurde analysiert, ob die transferierten T-Zellen das Anwachsen des übertragenen T-Zell-depletierten Knochenmarks unterstützen.

4.3.1. Unterstützung des Transplantatanwachsens

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Zellen der „high“-Fraktion im MHC-disparaten sowie im MHC-identen System tolerant gegenüber residuellen Rezipientenzellen sind. Nach dem Transfer der ruhenden Zellen kommt es wie auch nach der Übertragung von Knochenmark allein zu einem gemischten Chimärismus. In den Rezipienten der ruhenden Zellpopulation („high“) persistieren neben den Donorzellen residuelle Empfängerzellen, die die Konditionierungstherapie (Bestrahlung) überleben, während die Rezipienten der „low“-Fraktion, bzw. der unsortierten MLR einen kompletten Donorchimärismus aufweisen. Alloreaktive T-Zellen im Transplantat sind in der Lage, verbliebene Empfängerzellen

komplett zu eliminieren. Die Zellen der alloreaktiven Fraktionen fördern somit das Anwachsen des transplantierten Knochenmarks. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Martin et al., welche zeigen, dass unter bestimmten Umständen alloreaktive, im Transplantat enthaltene Donor-T-Zellen eine Abstoßung des Transplantats verhindern (Martin 1993). Eine Reduktion der Intensität des Konditionierungsregimes verursacht eine höhere Abstoßungsrate T-Zell-depletierten Knochenmarks. Dies deutet auf eine aktive Beteiligung von Empfängerzellen bei der Abstoßung des Transplantats hin. Diese erfolgt durch Rezipientenzellen, die das Konditionierungsregime überleben, wobei $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in diesem Modell etwa die gleiche Potenz zur Transplantatabstoßung besaßen. Unterstützt wird diese These durch Untersuchungen von Murphy et al., die zeigen, dass durch die Gabe von CD8-spezifischen Antikörpern vor dem Transfer eine Abstoßung des Transplantats verhindert werden konnte (Murphy *et al.* 1987). Auch Xu et al. zeigen, dass $CD8^+$ T-Lymphozyten ($\alpha\beta TCR^+$ und $\gamma\delta TCR^+$) des Rezipienten eine wesentliche Rolle bei der Abstoßung transplantierte Zellen spielen (Xu *et al.* 2002).

Weitere Versuche von Martin et al. zeigten, dass ein Anwachsen übertragenen Knochenmarks und die Elimination von residuellen Rezipientenzellen im Wesentlichen von $CD8^+$ Donorzellen vermittelt wurden. Durch die Addition geringer Mengen $CD8^+$ Donor-T-Zellen konnte das *Engraftment* T-Zell-depletierten Knochenmarks, ohne das Entstehen einer GvHD verbessert werden (Martin 1993). Dabei ist die Zelldosis jedoch von großer Bedeutung, da eine höhere Anzahl von $CD8^+$ T-Zellen zur Induktion einer GvHD und damit zu einer verminderten hämatopoetischen Rekonstitution nach Transplantation führt. Eine Analyse der zytotoxischen Effektormechanismen, die an der Eliminierung von Empfängerzellen beteiligt sind, und somit die Abstoßung des Transplantats verhindern, zeigte, dass der wesentliche Mechanismus, der dabei zum Tragen kommt, die Perforin-vermittelte Lyse von Zielzellen ist (Martin *et al.* 1998). Die Defizienz von Perforin in Donorzellen führte zu einer Abstoßung von transplantierten Zellen in allen Fällen, während die Induktion von Apoptose durch das Fas-FasL-System für die Abstoßung eines Transplantats weniger relevant erscheint. Ein Defekt in diesem System hat einen deutlich weniger negativen Effekt auf die Abstoßung transferierter Zellen. Eine klinische Studie zeigt, dass auch im humanen System definierte Anzahlen zytotoxischer T-Zellen einen wesentlichen Beitrag zum Anwachsen transplantierte Knochenmarks leisten (Martin *et al.* 1999). Jedoch birgt die Anzahl der übertragenen $CD8^+$ Zellen, die nötig ist eine Abstoßung zu verhindern, immer noch ein zu hohes Risiko zur Induktion einer akuten oder chronischen GvHD.

Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen stehen jedoch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die darauf hindeuten, dass eine Alloreaktivität der übertragenen T-Zellen gegen den Rezipienten für das Anwachsen der transplantierten Zellen nicht erforderlich ist. So konnte in verschiedenen Systemen gezeigt werden, dass T-Zellen, die in einem murinen *Fl-to-parent* Modellsystem übertragen werden ebenfalls in der Lage sind das *Engraftment* zu verbessern (Sykes *et al.* 1988; Lapidot *et al.* 1992; Uharek *et al.* 1992). In einer solchen haploidenten Konstellation fehlt den transferierten T-Zellen aufgrund genetischer Faktoren das Potential zur Induktion einer GvHD.

Zudem ist eine aus dem Knochenmark stammende Zellen, die so genannte „*facilitating cell*“ (FC) beschrieben (Kaufman *et al.* 1994). Die Addition dieser Zellen unterstützt das Anwachsen transplantierte Stammzellen ohne die Induktion einer GvHD (Colson *et al.* 2004). Eine erhöhte Transkriptionsrate des transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β deutet darauf hin, dass die FCs die Entwicklung regulatorischer T-Zellen induzieren und somit möglicherweise die Induktion einer GvHD verhindern können.

Untersuchungen von Adams *et al.* zeigen, dass $CD8^+$ T-Zellen das „*homing*“ der $CD34^+$ Stammzellen ins Knochenmark der Empfängertiere begünstigen und so das *Engraftment* unterstützen (Adams *et al.* 2003). Vermittelt wird dies nicht durch einen von den T-Zellen sezernierten Faktor, sondern erfordert wahrscheinlich direkten Zellkontakt. Eine nähere Charakterisierung der $CD8^+$ Zellen wurde jedoch nicht vorgenommen und so ist nicht geklärt, ob es sich bei den hier identifizierten Zellen, um die zuvor beschriebenen FCs handelt.

Die aus dem Knochenmark isolierten FCs könnten sich in der Klinik als wertvoll erweisen, um das Anwachsen transferierter Stammzellen auch nach reduzierter Konditionierung der Empfänger zu verbessern. In den untersuchten murinen Systemen wurden sie zusammen mit hochreinen Stammzellpopulationen transplantiert. So könnte das Anwachsen T-Zell-depletierten Knochenmarks ohne das Risiko einer GvHD-Induktion deutlich verbessert werden. Das Fehlen der Donor-T-Zellen würde jedoch den Verlust des GvL-Effekts bedeuten. Damit geht der kurative Effekt einer solchen Transplantation verloren. Zudem tragen Donor-T-Zellen wesentlich zur Immunrestitution erwachsener Empfänger bei, da hier die Funktion des Thymus (Organ der T-Zellreifung) deutlich reduziert ist (Martin 2000).

Unsere Ergebnisse unterstützen jedoch die These, dass für das Anwachsen des transplantierten Knochenmarks alloreaktive Zellen vorhanden sein müssen. In drei Modellsystemen konnte gezeigt werden, dass die ruhenden Zellen der „high“-Fraktion ein *Engraftment* der Knochenmarkzellen nicht unterstützen, während die alloreaktiven Zellen der „low“-Fraktion und der unsortierten MLR rasch einen kompletten Donorchimärismus zu

induzieren vermögen. Dies deutet darauf hin, dass sich Alloreaktivität gegen die Rezipientenzellen und Unterstützung des *Engraftments* in unseren Modellsystemen nicht voneinander trennen lassen.

4.3.2. Potential der separierten Zellfraktionen zur GvHD-Induktion

Neben der Fähigkeit, das Anwachsen der transplantierten Knochenmarkzellen zu unterstützen, wurde in unseren Versuchen das Potential der transferierten T-Zellpopulationen eine GvHD zu induzieren untersucht. *In vitro* wurde gezeigt, dass die in der MLR proliferierenden Zellen im Zytotoxizitätstest nach Separation eine allogene Zielzelle lysieren, während die Zellen der „high“-Fraktion keine zytotoxische Aktivität gegenüber den Zielzellen aufwiesen. Wie das Vorhandensein des gemischten Chimärismus in den Rezipienten der „high“-Fraktion zeigt, sind die *in vitro* ruhenden Zellen tolerant gegenüber Empfängerzellen. Die Rezipienten dieser Zellen weisen eine hämatopoetische Rekonstitution auf, die der in Empfängern T-Zell-depletierten Knochenmarks vergleichbar ist. In der Milz der analysierten Tiere sind neben T-Zellen auch B-Lymphozyten und Zellen myeloischen Ursprungs nachzuweisen. Insbesondere im Knochenmark konnten B-Lymphozyten gezeigt werden. Diese fehlen bei Empfängern der alloreaktiven Zellen („low“, MLR) nahezu vollständig. Untersuchungen von Storek et al. ergaben, dass das Fehlen von B-Zellen im Knochenmark mit der Entwicklung einer GvHD korreliert (Storek *et al.* 1993; Storek 2002). Daher zogen wir dies als ein Kriterium für die Induktion einer GvHD in unseren Modellsystemen heran. Im MHC-disparaten System konnten wir in histologischen Untersuchungen eine Zerstörung der Organstrukturen von Leber und Milz bei Rezipienten alloreaktiver Zellen nachweisen, während die Organe der Empfänger ruhender Zellen keine pathologischen Veränderungen aufwiesen. Ein Überlebensvorteil der Rezipienten der „high“-Fraktion gegenüber den Empfängern alloreaktiver Zellen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Das ist aber diese Konstellation von multiplen Faktoren abhängig. Insbesondere NK-Zellen sind hierbei vermutlich von Bedeutung: Durch fehlende Expression der „selbst“-MHC-Moleküle und einer Inkompatibilität hemmender Rezeptoren (*killer immunoglobulin-like receptors*, KIRs) kommt es zu einer Aktivierung dieser Zellen und einer Schädigung von Rezipientengewebe (Trinchieri 1989; Ljunggren *et al.* 1990).

Godfrey et al. haben ebenfalls die Effekte *in vivo* stimulierter und separierter Zellen im murinen System untersucht (Godfrey *et al.* 2004). Dabei wurde ein CD4-abhängiges GvHD-Modell gewählt. Donor und Rezipient haben in diesem Modellsystem den gleichen genetischen Hintergrund und unterscheiden sich lediglich durch die Mutation von drei

Aminosäuren im MHC Klasse II-Molekül (bm-12). Bei Induktion einer GvHD kommt es zu einer Aplasie des Knochenmarks, sonst zu einer endogenen Rekonstitution. *In vitro* stimulierte und separierte CD4⁺ Zellen des Stammes C57BL/6 wurden in subletal bestrahlte bm-12 Rezipienten injiziert. Dabei konnte ein längeres Überleben der Rezipienten ruhender CD4⁺ T-Zellen gegenüber den Empfängern proliferierender T-Zellen nachgewiesen werden. Die Beurteilung der *in vivo*-Effekte der transferierten T-Zellen erfolgte hier lediglich aufgrund der Überlebensrate der transplantierten Tiere, da das gewählte Modell einen Nachweis der transferierten Donorzellen nicht erlaubt.

Das von uns untersuchte MHC-idente Transplantationsmodell (BALB/c → DBA/2) stellt eine der klinischen Situation vergleichbare Konstellation dar. Donor und Rezipient unterscheiden sich durch Minorantigene (im MHC präsentierte „selbst“-Peptide), die sowohl in MHC Klasse I- als auch Klasse II-Molekülen präsentiert werden und damit eine Immunantwort von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auslösen können. Beide Populationen sind wesentlich an der Induktion der GvHD und auch an der Vermittlung des GvL-Effektes beteiligt (Truitt *et al.* 1991). Zudem sind CD8⁺ T-Zellen wichtig für das Anwachsen der transferierten Zellen (Martin 1993) und bei der Kontrolle viraler Infektionen (Li *et al.* 1994), sowie der Tumorabstoßung (JP *et al.* 1991; Dubey *et al.* 1998).

Der Verlauf der GvHD in diesem Modell unterscheidet sich von dem im MHC-disparaten System. Die äußeren Anzeichen der GvHD sind weniger offensichtlich. Es konnte jedoch auch hier ein klarer Unterschied zwischen den Rezipienten der „high“- und der „low“-Fraktion nachgewiesen werden. Die Empfänger der alloreaktiven Zellen zeigten mit Beginn der GvHD einen deutlichen Gewichtsverlust auf. Rezipienten von T-Zell-depletiertem Knochenmark und ruhenden Zellen nahmen dagegen kontinuierlich an Gewicht zu. Im Knochenmark der analysierten „low“-Rezipienten ließen sich keine B-Lymphozyten nachweisen, während die Empfänger der „high“-Fraktion, wie auch die T-Zell-depletierten Knochenmarks normal rekonstituierten. Zudem wiesen die Rezipienten der alloreaktiven Zellfraktionen eine deutliche Lymphopenie auf, während Empfänger der „high“-Fraktion im Durchschnitt etwa so viele Lymphozyten hatten, wie Tiere, die mit T-Zell-depletiertem Knochenmark allein transplantiert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zellen der „high“-Fraktion in der Lage sind den Organismus der Rezipienten zu repopulieren, ohne eine GvHD zu induzieren, während die Empfänger der alloreaktiven Fraktionen („low“, unseparierter MLR) auch in diesem System eine GvHD entwickelten.

4.3.3. Tumorkontrolle nach Transplantation

Das längere Überleben der Empfängertiere im MHC-identen Modellsystem ermöglichte eine Untersuchung des GvL-Effektes. Das Potential der übertragenen Zellpopulationen, einen etablierten Tumor abzustoßen, wurde analysiert. Die Übertragung *in vitro* ruhender T-Zellen wäre nur dann sinnvoll, wenn diese einen GvL-Effekt ausüben und so einen Rückfall der Leukämie verhindern, bzw. bekämpfen könnten. In dem von uns untersuchten MHC-identen Transplantationsmodell, waren die Zellen der „high“-Fraktion nicht im Stande, den Tumor P815/B7 abzustoßen. Der Tumor wuchs in den Rezipienten der ruhenden Population mit der gleichen Kinetik aus, wie bei Tieren, die ausschließlich T-Zell-depletiertes Knochenmark erhalten hatten. Auch Empfänger der alloreaktiven Fraktionen waren nicht in der Lage, das Tumorstadium zu kontrollieren, jedoch war es in diesen Tieren deutlich verlangsamt.

Ein möglicher Grund für eine fehlende Tumorkontrolle durch die Zellen der „high“-Fraktion könnte sein, dass der Tumor P815/B7, aufgrund seiner Herkunft aus dem hämatopoetischen System, eine Anzahl von Antigenen exprimiert, die DBA/2-Splenozyten ebenfalls tragen. Dies hätte zur Folge, dass tumorreaktive T-Zellen bei Stimulation mit DBA/2-Lymphozyten in der gemischten Lymphozytenreaktion bereits proliferieren und sich daher in der Population der „low“-Zellen befinden. Durch eine anschließende Separation werden die tumorreaktiven Zellen dann eliminiert. Dass es zu so einer Überschneidung der Antigene zwischen Tumorzellen und DBA/2-Splenozyten kommt, wird demonstriert durch die Tatsache, dass *in vitro* mit DBA/2-Splenozyten stimulierte BALB/c-Milzzellen in der Lage sind, in einem ⁵¹Chrom-Freisetzungstest P815/B7-Zellen zu erkennen und zu lysieren. Auch im humanen System wurden solche „gemeinsamen“ („*shared*“) Antigene beschrieben (Oettel *et al.* 1994). Philadelphia Chromosom (Ph)-spezifische CTL waren in der Lage, Ph⁺-Zellen zu lysieren, erkennen aber nach Kultivierung ebenso Ph-negative Zellen.

Eine fehlende Tumorkontrolle durch die Zellen der „low“-Fraktion ließe sich damit erklären, dass die GvH-Reaktion von Zellen dominiert wird, die reaktiv gegen Rezipientenantigene sind, welche nicht mit den Tumorantigenen übereinstimmen („Immunodominanz“) (Rowley *et al.* 1993). Daher wird das Wachstum des Tumors in diesen Tieren zwar deutlich vermindert gegenüber dem in Rezipienten der „high“-Fraktion, bzw. von Knochenmark allein, jedoch nicht vollständig kontrolliert.

Ebenfalls von Bedeutung für eine fehlende Tumorabstoßung könnte die Toleranz der „high“-Zellen gegenüber residuellen Rezipientenzellen sein. Wie unsere Ergebnisse zeigen, kommt es bei den Empfängern der „high“-Fraktion in den von uns untersuchten Transplantationsmodellen zu einem gemischten Chimärismus, bei dem Donor- und

Rezipientenzellen nebeneinander persistieren. Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass eine Alloreaktivität der transplantierten Zellen gegen die Rezipientenzellen für das Anwachsen des übertragenen Knochenmarks von Bedeutung ist. So führt möglicherweise eine Toleranz der „high“-Zellen gegenüber dem Empfänger zu einem Verlust der gegen den Tumor gerichteten Aktivität.

Die Fraktion der „high“-Zellen besteht aus kleinen, wenig granulären Zellen, einem Merkmal der regulatorischen $CD4^+CD25^+$ Zellen. Diese regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) können sehr potent die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen unterdrücken und damit die Entwicklung von Autoimmunreaktionen verhindern (Sakaguchi *et al.* 1995). Untersuchungen von Shimizu *et al.* zeigen, dass durch die Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen CD25 im murinen System eine Aktivierung tumorspezifischer CTL induziert werden konnte, die zur Abstoßung eines Tumors führten, der in Kontrolltieren in jedem Fall auswuchs (Shimizu *et al.* 1999). Dies deutet darauf hin, dass die regulatorischen T-Zellen eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort unterdrücken. Woo *et al.* konnten in humanen Lungentumoren eine große Anzahl der T_{reg} nachweisen, die *in vitro* sehr potent die Proliferation von T-Zellen der Tumorpatienten supprimierten (Woo *et al.* 2002). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Arbeiten von Trenado *et al.*, sowie Edinger *et al.*, die zeigen, dass die Addition regulatorischer T-Zellen zum Transplantat das Risiko einer GvHD-Induktion ohne Verlust des GvL-Effektes deutlich mindert (Edinger *et al.* 2003; Trenado *et al.* 2003). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die in der „high“-Fraktion enthaltenen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen einen supprimierenden Effekt ausüben und so eine Tumorkontrolle verhindern.

Eine weitere Rolle bei der fehlenden Tumorkontrolle durch die Zellen der „high“-Fraktion spielt möglicherweise das Tumorstroma. Hierbei handelt es sich um Zellen, im Wesentlichen Fibroblasten und myeloische Zellen, die vom Tumor rekrutiert werden und dessen Entwicklung unterstützen (Bissell *et al.* 2001; Tlsty *et al.* 2001). Die Stromazellen versorgen den Tumor mit Wachstumsfaktoren, Blutzufuhr sowie extrazellulärer Matrix und unterstützen so die Tumorprogression. In dem von uns verwendeten Tumormodell wächst P815/B7 als solider Tumor aus und Stromazellen akkumulieren im Tumorgewebe. Da der Tumor in unseren Experimenten fünf Tage vor der Transplantation inokuliert wurde, ist anzunehmen, dass zumindest ein Teil der Stromazellen vom Rezipienten stammen. Singh *et al.* zeigten bereits 1992, dass das umgebende Stroma eine entscheidende Bedeutung für eine mögliche Abstoßung von soliden Tumoren hat (Singh *et al.* 1992), eine Beobachtung, die Spiotto *et al.* untermauert haben (Spiotto *et al.* 2002; Spiotto *et al.* 2004). Zum einen dienen Zellen des Stromas als antigenpräsentierende Zellen (APC) und präsentieren so Tumorantigene, um eine

T-Zellantwort zu stimulieren, zum anderen konnte gezeigt werden, dass gegen Stromazellen gerichtete CTL indirekt die Abstoßung von Tumorzellen bewirken können, die die Tumorantigene nicht mehr präsentieren. Diese Zellen würden dadurch einer direkten Erkennung durch spezifische CTL entgehen.

Aufgrund der Toleranz der aus der „high“-Fraktion stammenden T-Zellen gegenüber Rezipientenzellen, die einen Großteil des Tumorstroma ausmachen, kann möglicherweise in den Empfängertieren dieser Fraktion keine ausreichende CTL-vermittelte Immunantwort gegen den Tumor induziert werden.

Zusammenfassend zeigen die bisher diskutierten Ergebnisse, dass eine Selektion basierend auf Proliferation gegen einen allogenen Stimulus sowohl im MHC-disparaten wie auch im MHC-identen System für den Rezipienten nicht von Vorteil ist. Es wurde gezeigt, dass die *in vitro* ruhenden Zellen der „high“-Fraktion tolerant gegenüber den Rezipientenzellen sind, und so das Risiko der Inzidenz einer GvHD gemindert werden kann. Jedoch konnte für die ruhenden Zellen kein positiver Effekt hinsichtlich einer Unterstützung des *Engraftments* des transplantierten Knochenmarks und der Tumorabstoßung nachgewiesen werden.

4.4. Anwendung des Verfahrens zur Gewinnung tumorreaktiver T-Zellen

In Vorexperimenten im MHC-identen Transplantationsmodell konnte gezeigt werden, dass durch den Transfer gegen den Tumor (P815/B7) immunisierter Zellen die Inzidenz einer GvHD vermindert, bzw. verschoben war. Im Gegensatz zu Rezipienten gegen Empfängersplenozyten immunisierter Zellen, konnten im Knochenmark dieser Tiere B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Auch Zellen myeloischen Ursprungs waren nachweisbar, jedoch handelte es sich hierbei überwiegend um noch nicht ausgereifte Zellen (siehe 3.12, Abb.24). Aus diesem Grund wurde die initial verfolgte Strategie invers erprobt. Das Spektrum der, bei *in vitro*-Stimulation präsentierten, Antigene wurde durch eine *in vitro*-Stimulation mit Tumorzellen limitiert und die T-Zellantwort in Richtung tumorspezifischer Antigene fokussiert. Selektiert wurden dann bei der anschließenden Sortierung die reaktiven Zellen der „low“-Fraktion, und nicht wie bisher die ruhenden Zellen der „high“-Fraktion. So sollte eine Anreicherung tumorspezifischer T-Zellen erreicht werden, und gleichzeitig das Risiko einer GvHD-Inzidenz vermieden, bzw. gesenkt werden, während die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort (GvL-Effekt) dominiert.

Als Donoren für die *in vitro* Stimulation dienten gegen P815/B7 immunisierte Spendertiere, als Stimulatoren wurden MMC-behandelte Tumorzellen eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen der MLTC wie beschrieben in die Fraktionen der proliferierenden und ruhenden Zellen separiert und zusammen mit T-Zell-depletiertem Knochenmark transplantiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Rezipienten der „low“-Fraktion, der tumorreaktiven Zellen, 30 Tage nach der Transplantation *keine* GvHD entwickelten. Es wurden *keine* äußerlichen Merkmale einer Erkrankung nachgewiesen. Eine Lymphopenie trat nicht auf, und im Knochenmark waren B-Lymphozyten nachweisbar, deren Fehlen als sicheres Zeichen einer GvHD-Induktion gewertet wurde (Storek 2002). Rezipienten der unsortierten MLTC, ebenso wie Empfänger der „high“-Fraktion wiesen dagegen klinische Symptome einer GvHD auf. Hervorgerufen wurde dies vermutlich durch Zellen, die während der *in vitro* Stimulation mit Tumorzellen nicht aktiviert wurden, dann aber nach der Transplantation durch Rezipientenantigene stimuliert wurden.

Dies spiegeln auch die im Rag1^{-/-}-System erhaltenen Ergebnisse wieder. Hier wurden vom Stamm C3H stammende Splenozyten mit C57BL/6-Lymphozyten stimuliert, sortiert und in Rag1^{-/-}-Empfängertiere transferiert. Durch das Fehlen des Rag1-Gens kommt es in den Rag1^{-/-}-Tieren zu einem Fehlen von Lymphozyten. In den Empfängern der „low“-Fraktion fehlten damit die Zellen, die *in vitro* als Stimulatoren gedient haben. Auf diese Weise ergibt sich ein Modellsystem, das eine Situation darstellt, bei der leukämiespezifische T-Zellen in Empfänger übertragen werden, deren Erkrankung sich zum Zeitpunkt der Transplantation im Stadium der Remission befindet. *In vivo* fehlt der, während der Aktivierung gegenwärtige, Stimulus. Das Rag1^{-/-}-Modell erlaubt es, den Verbleib *in vitro* reaktiver Zellen und deren Spezifität, bzw. Aktivität im Falle eines Rezidivs zu untersuchen.

Während die Rezipienten der „high“-Fraktion und unsortierter MLR frühzeitig verstarben und Anzeichen einer GvHD aufwiesen, überlebten die Empfänger der alloreaktiven „low“-Fraktion langfristig (> 120 Tage) ohne Symptome. In allen Tieren konnten Donor-T-Zellen nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass in Rag1^{-/-}-Tieren Lymphozyten fehlen, führte zu der Annahme, dass somit den Zellen der „low“-Fraktion *in vivo* der spezifische Stimulus fehlt. Das bietet eine mögliche Erklärung dafür, dass es in diesen Empfängertieren, trotz MHC-Disparität, nicht zur Induktion einer GvHD kommt. Die transferierten T-Zellen starben jedoch nicht ab, sondern waren während des Beobachtungszeitraums im peripheren Blut nachweisbar. In der Fraktion der ruhenden Zellen („high“) und somit auch in der unsortierten MLTC sind jedoch Zellen enthalten, die wahrscheinlich in Kultur nicht ausreichend stimuliert

wurden. Sie wurden jedoch nach dem Transfer durch Antigene aktiviert, die in der Kultur nicht in ausreichender Menge oder gar nicht enthalten waren. Dadurch kam es in den Empfängern dieser Zellen zur Induktion einer GvHD. Die Ergebnisse erlauben die Annahme, dass in der „high“-Fraktion einer solchen MLR ruhende T-Zellen enthalten sind, die auch nach viertägiger *in vitro* Kultur aktivierbar sind. Das ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer, die zeigen, dass eine Elimination reaktiver T-Zellen basierend auf einer CFSE-Separationstechnik zum gewählten Zeitpunkt nicht vollständig ist (Godfrey *et al.* 2004).

Die Rag1^{-/-}-Rezipienten der „low“-Fraktion entwickelten nach der Injektion bestrahlter C57BL/6-Splenozyten ebenfalls Anzeichen einer GvHD. In der klinischen Situation würde das dem Zeitpunkt einer wiederkehrenden Tumorerkrankung entsprechen. Das beweist, dass die transferierten Zellen auch nach einem längeren Zeitraum ohne Stimulus immunkompetent bleiben und nach erneuter Stimulation *in vivo* dann eine GvHD induziert werden kann. Das deutet darauf hin, dass die T-Zellen der „low“-Fraktion nun auch Antigene des Empfängers erkennen und dagegen reagieren. Es kommt zu Kreuzreaktionen.

Aufgrund dieser Experimente lässt sich nicht ausschließen, dass es nach der Transplantation tumorreaktiver T-Zellen im Falle eines Rezidivs zu einer GvHD-Induktion kommt. Durch die wiederauftretende Tumorerkrankung treffen die transferierten T-Zellen vermehrt auf Antigene, gegen die sie selektioniert wurden, und werden reaktiviert. Dabei könnte es wie in den Rag1^{-/-}-Rezipienten der „low“-Fraktion auch in den Empfängern tumorreaktiver T-Zellen zu einer GvHD-Induktion kommen. Dies zeigen auch Untersuchungen von Falkenburg *et al.*, welche durch die Gabe leukämiespezifischer CTL bei einer Patientin eine komplette Remission erzielen konnten, jedoch nicht ohne Induktion einer GvHD (Falkenburg *et al.* 1999). Allerdings erlauben unsere Ergebnisse die Annahme, dass durch eine Selektion und die Transplantation tumorreaktiver CTL, eine Verringerung des Antigenspektrums der T-Zellen zu erreichen ist. Hierdurch ist dann eine deutliche Abschwächung der GvHD zu erwarten. Die Zellen der „high“-Fraktion eines gegen den Tumor gerichteten Ansatzes sind tolerant gegenüber leukämischen Zellen und werden durch die Trennung der Fraktionen aus der Kultur entfernt. Wie die Ergebnisse im Rag1^{-/-}-Modellsystem und auch im MHC-identen Modell zeigen, besitzen diese Zellen der „high“-Fraktion ein erhebliches Potential zu Induktion einer GvHD. Eine Elimination dieser Zellen vor dem Transfer sollte also zu einem verminderten Risiko der GvHD-Induktion führen.

Es gibt bereits verschiedene Ansätze zur Gewinnung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen: Zum einen wurden Proteine identifiziert, die in leukämischen Zellen im Vergleich zu

nicht entarteten Zellen überexprimiert sind, wie zum Beispiel die Serinprotease Proteinase 3 (Molldrem *et al.* 1996) oder das Wilms Tumorgen 1 (WT1) (Miwa *et al.* 1992; Menssen *et al.* 1995). Dabei wird der Überexpression dieser Proteine meist eine Rolle bei der Entstehung der Leukämie zugeschrieben.

Eine weitere Gruppe von „Ziel“-Proteinen für die Gewinnung leukämiespezifischer CTL bilden leukämieassoziierte Proteine, welche meist aus chromosomalen Translokationsereignissen resultieren. Eines der bekanntesten Beispiele hierfür ist die Translokation t(9; 22) (Philadelphia-Chromosom) bei der CML, welche zur Bildung des bcr-abl Gens führt (Shtivelman *et al.* 1985).

Zudem gibt es Versuche zytotoxische T-Zellen zu generieren, die gegen mH-Antigene gerichtet sind. Dabei werden solche gewählt die differentiell auf Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert werden (de Bueger *et al.* 1992; Warren *et al.* 1998). Auf diese Weise sollen CTL transferiert werden, deren Aktivität sich selektiv gegen hämatopoetische Zellen, inklusive der leukämischen Zellen, richtet, nicht jedoch gegen andere Gewebe des Empfängers. So sollte die GvHD-Induktion vermieden werden.

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen demonstrieren, dass es technisch möglich ist leukämie- bzw. antigenspezifische CTL zu generieren, jedoch ist das Verfahren zur Gewinnung solcher CTL in ausreichenden Mengen sehr aufwendig und zum jetzigen Zeitpunkt limitiert.

Basierend auf unseren Ergebnissen scheint eine Gewinnung tumorreaktiver CTL, mittels der CFSE-Farbstoffverdünnungsmethode mit anschließender Separation erfolgversprechend. Da das entwickelte Verfahren nicht die Identifizierung einzelner spezifischer Antigene erfordert, lassen sich im Gegensatz zu den oben angeführten Untersuchungen mit relativ geringem Aufwand tumorreaktive Zellen anreichern und das Risiko einer GvHD ohne Verlust des GvL-Effektes verringern.

4.5. Ausblick

Um definitiv zu klären, ob die Zellen der tumorreaktiven „low“-Fraktion *in vivo* eine Tumorabstoßung induzieren können, sind weitere Untersuchungen nötig. Zudem soll untersucht werden, ob es durch die übertragenen Zellen zur Induktion einer GvHD kommt. Dies wird im MHC-identen Transplantationsmodell derzeit, basierend auf dem Rag1^{-/-}-System, erprobt. Durch die Gabe Mitomycin C (MMC)-behandelter Tumorzellen (P815/B7) soll die Situation eines Rezidivs simuliert werden. Dabei verhindert eine Inaktivierung der

Tumorzellen, dass ein zu schnelles Tumorwachstum den Beobachtungszeitraum einschränkt. Eine Gabe der Tumorzellen erhöht im Rezipientenorganismus die Menge der zur *in vitro*-Stimulation verwendeten Antigene. Auf diese Weise sollen die transferierten T-Zellen reaktiviert werden.

Um eine mögliche klinische Anwendbarkeit des Separationsverfahrens zu evaluieren, werden zur Zeit *in vitro*-Versuche mit humanen T-Zellen durchgeführt.

5. Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Bei verschiedenen Dysfunktionen des hämatopoetischen Systems sind die Transplantation allogenen Knochenmarks, bzw. allogener peripherer Blutstammzellen etablierte Therapieverfahren. Ein kurativer Effekt in der Therapie maligner Erkrankungen, wie Leukämien und Lymphomen, besteht im so genannten *Graft-versus-Leukämie* (GvL)-Phänomen, das in der Elimination maligner Zellen durch im Transplantat enthaltene T- und NK-Zellen besteht. Hauptnebenwirkung stellt die Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (*graft-versus-host disease*, GvDH) dar, die ebenfalls durch immunkompetente Donorzellen, insbesondere T-Lymphozyten, induziert wird und einen schweren bis tödlichen Verlauf nehmen kann. Da die T-Zell-Depletion aus dem Transplantat die GvHD-Entwicklung zwar unterbindet, die Patienten aber opportunistische Infektionen und Leukämie-Rückfälle - bei ebenfalls eliminiertem GvL-Effekt - erleiden, wurde eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um selektiv alloreaktive T-Lymphozyten unter Erhaltung einer antileukämischen Aktivität sowie Infektabwehr aus dem Transplantat zu entfernen.

In dieser Arbeit wurde ein innovatives Verfahren geprüft, das *in vitro* die Trennung alloreaktiver und ruhender T-Lymphozyten nach Allostimulation, basierend auf einer Farbstoffverdünnungsmethode („CFSE“) erlaubt. In Zytotoxizitätsmessungen zeigten die Zellen der proliferierenden Zellfraktion („low“) im Gegensatz zur ruhenden Zellfraktion („high“) zytolytische Aktivität gegenüber Rezipientenzellen. Eine verbleibende Reaktivität der „high“-Fraktion gegenüber unverwandten Antigenen konnte aber demonstriert werden.

Die *in vivo*-Effekte der separierten Zellpopulationen wurden im Kontext einer allogenen Knochenmarktransplantation im Mausmodell untersucht: Transplantiert wurde sowohl in einem MHC-disparaten System, als auch in einer MHC-identen und einer haploidenten Konstellation. Dabei wurden das Potential der Zellen der „high“- und „low“-Fraktionen eine GvHD zu induzieren ebenso analysiert, wie deren Fähigkeit das Anwachsen des transplantierten Knochenmarks zu unterstützen. Im MHC-identen Modellsystem wurde zudem der Erhalt des GvL-Effekts nach einem solchen Separationsverfahren untersucht.

Unsere Ergebnisse im MHC-disparaten wie im MHC-identen Transplantationsmodell zeigen, dass die Zellen der „high“-Fraktion tolerant gegenüber Rezipientenzellen waren und damit keine GvHD induzierten. Die Empfänger der alloreaktiven Zellfraktionen in Form der unseparierten MLR, der „low“-Fraktion bzw. Donorsplenozyten wiesen in beiden Modellen äußerliche sowie in der histologischen und immunphänotypischen Analyse Zeichen einer GvHD auf. In drei verschiedenen Transplantationsmodellen unterstützten die Zellen der *in*

in vitro ruhenden Zellen („high“-Fraktion) das Anwachsen des transplantierten Knochenmarks nicht, während die alloreaktiven Zellfraktionen einen vollen Donorchimärismus induzierten.

Im MHC-identen Modellsystem wurde zudem untersucht, ob die transplantierten Zellen einen immunogenen Tumor in seinem Wachstum beeinflussen können. Die Zellen der „high“-Fraktion zeigten hierbei keinen Effekt, während alloreaktive Zellen der „low“-Fraktion bzw. unseparierter MLR das Tumorwachstum verlangsamen.

Durch Elimination *in vitro* proliferierender Zellen gelang es auf diese Weise die Inzidenz einer GvHD zu verringern, ohne dass sich jedoch Vorteile gegenüber der Transplantation T-Zell-depletierten Knochenmarks hinsichtlich einer Unterstützung des Transplantatanwachsens und der Tumorkontrolle demonstrieren ließen.

Unter der Vorstellung, mit gleicher Technik ein eingegrenztes Spektrum von T-Zellen mit Tumorreaktivität und verminderter Alloreaktivität zu generieren, wurden daraufhin die *in vivo*-Effekte mit Tumorzellen prästimulierter proliferierender („low“) T-Zellen untersucht. Der Transfer *in vitro* proliferierender, tumorreaktiver Zellen führte nicht zur Induktion einer GvHD, während Empfänger der unsortierten MLTC oder der „high“-Fraktion erkrankten. Auch Rag1^{-/-}-Rezipienten auf C57BL/6-Hintergrund erkrankten nicht nach Transplantation MHC-disparater C3H-Splenozyten, die zuvor *in vitro* mit B6-Lymphozyten allostimuliert wurden, während Empfänger ruhender Zellen, bzw. unseparierter MLR an einer GvHD verstarben. Dies legt nahe, dass proliferierende T-Zellen je nach Art der Stimulation und nachfolgender Separation vom ruhenden Anteil des MLR *in vitro* ein relativ enges Spektrum an Antigenen erkennen und so eine Trennung von GvHD und GvL möglich sein könnte. Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen, dass durch die Stimulation der Donorzellen mit einem breiten Spektrum von Rezipientenzellen, anschließende Separation und Transplantation der „high“-Fraktion die Induktion einer GvHD vermieden werden kann, sich jedoch keine Vorteile bezüglich des Anwachsens von transplantiertem Knochenmark und Tumorkontrolle gegenüber der von T-Zell-depletiertem Knochenmark allein ergeben. Limitiert man dagegen das Antigenpektrum *in vitro* durch eine Stimulation mit Tumorzellen des Rezipienten, so kann das Risiko einer GvHD-Induktion durch Übertragung tumorreaktiver Zellen deutlich reduziert werden. Die Experimente mit Rag1^{-/-}-Rezipienten zeigen, dass die Spezifität der Zellen der „low“-Fraktion *in vivo* erhalten bleibt, auch wenn der Stimulus fehlt. Im Falle eines Rezidivs einer Leukämie wären die übertragenen Zellen aber reaktivierbar und damit in der Lage eine wiederkehrende Tumorerkrankung zu bekämpfen. Diese Strategie erscheint derzeit sehr erfolgversprechend und soll in weiteren präklinischen Modellen mit dem Ziel einer klinischen Anwendung geprüft werden.

5.1 Summary

Allogeneic bone marrow transplantation as well as transplantation of peripheral stem cells are well established therapeutic options for the treatment of dysfunctions of the hematopoietic system. The curative effect of this therapy in the treatment of malignant diseases like leukemia and lymphoma lies within the so called graft-versus-leukemia (GvL)-phenomenon. It consists of the elimination of malignant cells through T- and NK-cells within the transplant. The graft-versus-host-disease (GvHD) represents the major side effect of the treatment. It is induced by immunocompetent cells within the graft as well and has a profound impact on quality of life and survival of the patients. The depletion of T-cells is a very efficient method to eliminate GvHD, but leads to a higher risk of opportunistic infections as well as an increased rate of relapse due to the loss of the GvL-effect. This led to the development of a number of strategies to selectively eliminate alloreactive T-cells from the transplant while preserving anti-leukemic activity and the ability to fight infections.

In this work an innovative technique allowing the *in vitro* separation of alloreactive and resting T-cells following allostimulation based on a dye dilution method ("CFSE") was assayed. In a cytotoxicity assay the proliferating cells ("low") as opposed to the resting cells ("high") showed cytolytic activity towards recipient cells. A remaining activity of the "high"-fraction towards third party antigens could be demonstrated.

The *in vivo*-effects of the separated cell fractions were analysed in context of allogeneic bone marrow transplantation in a MHC-disparat as well as in a MHC-ident and a haploident mouse model. The potential of the "high"- and "low"-fraction to induce GvHD was examined as well as their ability to support the engraftment of the transplanted bone marrow cells. Furthermore it was analysed in the MHC-ident modelsystem whether the GvL-effect was maintained after such a separation procedure.

Our results in the MHC-diparat as well as in the MHC-ident transplantation model show that the "high"-cells were tolerant towards recipient cells and did not induce GvHD. Recipients of unseparated MLR, "low"-cells or donor splenocytes showed signs of GvHD in outer appearance and also in histological and immunophenotypical analysis. In three modelsystems *in vitro* resting cells ("high") did not support the engraftment of transplanted bone marrow cells while alloreactive cells induced a complete donorchimerism.

In the MHC-ident transplantation model the ability of the transferred cells to influence the outgrowth of an immunogenic tumor was analysed. The "high"-cells showed no effect, cells of the "low"-fraction or unseparated MLR were able to slow down tumorgrowth

By eliminating *in vitro* proliferating cells we were able to reduce the incidence of GvHD, however it was not possible to demonstrate an advantage of transplanting the “high”-cells compared to the transplantation of T-cell depleted bone marrow concerning the facilitation of engraftment and tumorcontrol.

Using the same technique we tried to generate tumorreactive T-cells with diminished alloreactivity. To achieve this cells were *in vitro* stimulated with tumor cells. *In vivo* effects of proliferating cells (“low”) were then analysed in the MHC-ident modelsystem. The transfer of *in vitro* proliferating, tumorreactive cells did not lead to the induction of GvHD, while recipients of unseparated MLTC or “high”-cells came down with it. Rag1^{-/-} recipients on C57BL/6 background also did not develop GvHD following transplantation of MHC-disparat C3H-splenocytes which were previously stimulated *in vitro* with B6-Lymphocytes. Recipients of resting cells or unseparated MLR on the contrary died of GvHD. This suggests that proliferating cells according to the type of stimulation and following separation from the resting cells of the MLR recognize a relatively limited spectra of antigen which might allow the separation of GvL-effect and GvHD.

Taken together our analysis show that the induction of GvHD can be avoided by stimulation of donor cells with a broad spectra of recipient cells and following separation and transplantation of “high”-cells. But no advantage arises from the transplantation of these cells concerning engraftment and tumorcontrol compared to transplantation of T-cell depleted bone marrow only.

By limiting the antigen spectra *in vitro* through stimulation with recipient tumorcells the risk of GvHD-induction through tumorreactive cells could be clearly reduced. The Rag1^{-/-} experiments show, that the specificity of the “low” cells remains *in vivo*, even if the stimulus is missing. But the cells could be reactivated in case of a relapse and so would be able to battle against a recurrent malignancy. Right now this strategy seems promising and shall be examined in further preclinical models eventually leading to clinical application

6. Literaturverzeichnis

- Adams, G. B., K. T. Chabner, R. B. Foxall, K. W. Weibrecht, N. P. Rodrigues, D. Dombkowski, R. Fallon, M. C. Poznansky and D. T. Scadden (2003). "Heterologous cells cooperate to augment stem cell migration, homing, and engraftment." Blood **101**(1): 45-51.
- Andre-Schmutz, I., F. Le Deist, S. Hacein-Bey, Y. Hamel, E. Vitetta, J. Schindler, A. Fischer and M. Cavazzana-Calvo (2002). "Donor T lymphocyte infusion following ex vivo depletion of donor anti-host reactivity by a specific anti-interleukin-2 receptor P55 chain immunotoxin." Transplant Proc **34**(7): 2927-8.
- Andre-Schmutz, I., F. Le Deist, S. Hacein-Bey-Abina, E. Vitetta, J. Schindler, G. Chedeville, E. Vilmer, A. Fischer and M. Cavazzana-Calvo (2002). "Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study." Lancet **360**(9327): 130-7.
- Appelbaum, F. R. (2001). "Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy." Nature **411**(6835): 385-9.
- Apperley, J. F., F. R. Mauro, J. M. Goldman, W. Gregory, C. K. Arthur, J. Hows, W. Arcese, G. Papa, F. Mandelli, D. Wardle and et al. (1988). "Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: importance of a graft-versus-leukaemia effect." Br J Haematol **69**(2): 239-45.
- Arcese, W., F. R. Mauro, G. Alimena, F. LoCoco, M. R. De Cuia, M. Screnci, A. P. Iori, E. Montefusco and F. Mandelli (1990). "Interferon therapy for Ph positive CML patients after T-cell allogeneic bone marrow transplantation." Bone Marrow Transplant **5**: 309.
- Atkinson, K. (1990). "Chronic graft-versus-host disease." Bone Marrow Transplant **5**: 69-82.
- Atkinson, K., Ed. (2000). Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation, Cambridge University Press.
- Atkinson, K., V. Farewell, M. S. Tsoi and e. al. (1982). "Analysis of late infections after human bone marrow transplantation. Role of non-specific suppressor cells in patients with chronic graft-versus-host disease and genotypic non-identity between marrow donor and recipient." Blood **60**: 714-720.
- Atkinson, K., M. M. Horowitz, R. P. Gale and e. al. (1990). "Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation." Blood **75**: 2459-2464.
- Atkinson, K., R. Storb, R. L. Prentice and e. al. (1979). "Analysis of late infections in 89 long term survivors of bone marrow transplantation." Blood **53**: 720-731.
- Atkinson, K., P. Weller, W. Ryman and e. al. (1986). "PUVA therapy for drug-resistant graft-versus-host disease." Bone Marrow Transplant **1**: 227-36.
- Bacigalupo, A., A. Maiolino, M. T. Van Lint and e. al. (1990). "Cyclosporine A and chronic graft-versus-host disease." Bone Marrow Transplant **6**: 341-4.
- Barnes, D. W. H., M. J. Corp, J. F. Loutit and F. E. Neal (1956). "Treatment of murine leukemia with X-rays and homologous bone marrow. Preliminary communication." Br Med J **2**: 626-630.
- Beutler, E., K. G. Blume, K. J. Bross, R. K. Chillar, O. B. Ellington, J. L. Fahey, M. J. Farbstein, G. M. Schmidt, W. E. Spruce and M. A. Turner (1979). "Bone marrow transplantation as the treatment of choice for "good risk" adult patients with acute leukemia." Trans Assoc Am Physicians **92**: 189.
- Billingham, R. E. (1966). "The biology of graft-versus-host reactions." The Harvey Lectures Academic Press, New York **62**: 21-78.

- Billingham, R. E. and L. Brent (1959). "Quantitative studies on tissue transplantation immunity.IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **242**: 477.
- Bissell, M. J. and D. Radisky (2001). "Putting tumours in context." Nat Rev Cancer **1**(1): 46-54.
- Blazar, B. R., R. R. Quinones, K. J. Heinritz, E. A. Sevenich and A. H. Filipovich (1985). "Comparison of three techniques for the ex vivo elimination of T cells from human bone marrow." Exp Hematol **13**: 123-8.
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, M. W. Boyer, A. Panoskaltis-Mortari, J. P. Allison and D. A. Valleria (1997). "CD28/B7 interactions are required for sustaining the graft-versus-leukemia effect of delayed post-bone marrow transplantation splenocyte infusion in murine recipients of myeloid or lymphoid leukemia cells." J Immunol **159**(7): 3460-73.
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, P. S. Linsley and D. A. Valleria (1994). "In vivo blockade of CD28/CTLA4: B7/BB1 interaction with CTLA4-Ig reduces lethal murine graft-versus-host disease across the major histocompatibility complex barrier in mice." Blood **83**(12): 3815-25.
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, R. J. Noelle and D. A. Valleria (1998). "CD4(+) T cells tolerized ex vivo to host alloantigen by anti-CD40 ligand (CD40L:CD154) antibody lose their graft-versus-host disease lethality capacity but retain nominal antigen responses." J Clin Invest **102**(3): 473-82.
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, A. Panoskaltis-Mortari, G. S. Gray and D. A. Valleria (1995). "Coblockade of the LFA1:ICAM and CD28/CTLA4:B7 pathways is a highly effective means of preventing acute lethal graft-versus-host disease induced by fully major histocompatibility complex-disparate donor grafts." Blood **85**(9): 2607-18.
- Bocchia, M., T. Korontsvit, Q. Xu and e. al. (1996). "Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides." Blood **87**: 3587-3592.
- Bonini, C., G. Ferrari, S. Verzeletti and e. al. (1997). "HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia." Science **276**: 1719-1723.
- Cavazzana-Calvo, M., M. Fromont, F. Le Deist, M. Lusardi, L. Coulombel, J. M. Derocq, I. Gerota, C. Griscelli and A. Fischer (1990). "Specific elimination of alloreactive T cells by an anti-interleukin-2 receptor B chain-specific immunotoxin." Transplantation **50**: 1-7.
- Cavazzana-Calvo, M., J. L. Stephan, S. Sarnacki, S. Chevret, C. Fromont, C. de Coene, F. Le Deist, D. Guy-Grand and A. Fischer (1994). "Attenuation of graft-versus-host disease and graft rejection by ex vivo immunotoxin elimination of alloreactive T cells in an H-2 haplotype disparate mouse combination." Blood **83**(1): 288-298.
- Champlin, R. (1990). "T-cell depletion to prevent graft versus host disease after bone marrow transplantation." Hematol Oncol Clin North Am **4**: 687.
- Chen, B. J., X. Cui, C. Liu and N. J. Chao (2002). "Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process." Blood **99**(9): 3083-8.
- Chen, B. J., X. Cui, G. D. Sempowski, C. Liu and N. J. Chao (2004). "Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease." Blood **103**(4): 1534-41.
- Cohen, J. L., O. Boyer, B. Salomon, R. Onclercq, F. Charlotte, S. Bruel, G. Boisserie and D. Klatzmann (1997). "Prevention of graft-versus-host disease in mice using a suicide gene expressed in T lymphocytes." Blood **89**(12): 4636-45.
- Cohen, J. L., A. Trenado, D. Vasey, D. Klatzmann and B. L. Salomon (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease." J Exp Med **196**(3): 401-6.

- Colson, Y. L., K. Christopher, J. Glickman, K. N. Taylor, R. Wright and D. L. Perkins (2004). "Absence of clinical GVHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells." Blood **104**(12): 3829-35.
- Couriel, D., J. Canosa, H. Engler, A. Collins, C. Dunbar and A. J. Barrett (1996). "Early reactivation of cytomegalovirus and high risk of interstitial pneumonitis following T-depleted BMT for adults with hematological malignancies." Bone Marrow Transplant **18**(2): 347-53.
- Davies, S. M., L. Ruggieri, T. DeFor, J. E. Wagner, D. J. Weisdorf, J. S. Miller, A. Velardi and B. R. Blazar (2002). "Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor." Blood **100**(10): 3825-7.
- de Bueger, M., A. Bakker, M. Ponc, J. J. van Rood and E. Goulmy (1991). "Minor histocompatibility antigens, defined by GvHD derived CTLs, show variable expression on human skin cells." Eur J Immunol **21**: 2839-2844.
- de Bueger, M., A. Bakker, J. J. van Rood, F. van der Woude and E. Goulmy (1992). "Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue indicates heterogeneity among human cytotoxic T-lymphocytes defined non-MHC antigens." J Immunol **149**: 1788-1794.
- De Clerc, Y., V. Draper and R. Parkman (1986). "Clonal analysis of murine graft-versus-host disease. II. Leukokines that stimulate fibroblast proliferation and collagen synthesis in graft-versus-host disease." Journal of Immunology **136**: 3549-52.
- Diekmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger and G. Schuler (2001). "Ex vivo isolation and characterisation of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood." J Exp Med **193**: 1303-1310.
- Drobyski, W. R., M. Gendelman, S. Vodanovic-Jankovic and J. Gorski (2003). "Elimination of leukemia in the absence of lethal graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." J Immunol **170**(6): 3046-53.
- Drobyski, W. R. and D. Majewski (1996). "Treatment of donor mice with an alpha beta T-cell receptor monoclonal antibody induces prolonged T-cell nonresponsiveness and effectively prevents lethal graft-versus-host disease in murine recipients of major histocompatibility complex (MHC)-matched and MHC-mismatched donor marrow grafts." Blood **87**(12): 5355-69.
- Dubey, P., S. C. Meredith, C. T. Siegel and H. Schreiber (1998). "Tumor cells induce cytolytic T cells to a single immunodominant mutant peptide." J Immunother **21**(4): 277-82.
- Edinger, M., P. Hoffmann, J. Ermann, K. Drago, C. G. Fathman, S. Strober and R. S. Negrin (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation." Nat Med **9**(9): 1144-50.
- Eissner, G., F. Kohlhuber, M. Grell, M. Ueffing, P. Scheurich, A. Hieke, G. Multhoff, G. W. Bornkamm and E. Holler (1995). "Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-alpha in endothelial programmed cell death mediated by ionizing irradiation and bacterial endotoxin." Blood **86**: 4184.
- Engelhard, D., R. Or, N. Strauss, A. Morag, M. Aker, E. Naparstek, R. Breuer, Z. Ravid, I. Sarov, G. Lijovetzky and et al. (1989). "Cytomegalovirus infection and disease after T cell depleted allogeneic bone marrow transplantation for malignant hematologic diseases." Transplant Proc **21**(1 Pt 3): 3101-2.

- Falkenburg, J. H., A. R. Wafelman, P. Joosten, W. M. Smit, C. A. van Bergen, R. Bongaerts, E. Lurvink, M. van der Hoorn, P. Kluck, J. E. Landegent, H. C. Kluin-Nelemans, W. E. Fibbe and R. Willemze (1999). "Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes." Blood **94**(4): 1201-8.
- Fehse, B., O. Frerk, M. Goldman, M. Bulduk and A. R. Zander (2000). "Efficient depletion of alloreactive donor T lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69)." Br J Haematol **109**: 644.
- Ferrara, J. L., K. R. Cooke, L. Pan and W. Krenger (1996). "The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease." Stem Cells **14**: 473.
- Ferrara, J. L., K. R. Cooke and T. Teshima (2003). "The pathophysiology of acute graft-versus-host disease." Int J Hematol **78**(3): 181-7.
- Ferrara, J. L., F. J. Guillen, P. J. van Dijken, A. Marion, G. F. Murphy and S. J. Burakoff (1989). "Evidence that large granular lymphocytes of donor origin mediate acute graft-versus-host disease." Transplantation **47**: 50-4.
- Ferrara, J. L., R. Levy and N. J. Chao (1999). "Pathophysiologic mechanisms of acute graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **5**: 437-356.
- Fields, P. E., R. J. Finch, G. S. Gray, R. Zollner, J. L. Thomas, K. Sturmhoefel, K. Lee, S. Wolf, T. F. Gajewski and F. W. Fitch (1998). "B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells." J Immunol **161**(10): 5268-75.
- Ford, C. E., J. L. Hamerton, D. W. H. Barnes and J. F. Loutit (1956). "Cytological identification of radiation-chimeras." Nature **177**: 452-454.
- Gajewski, T. F., F. Fallarino, C. Uyttenhove and T. Boon (1996). "Tumor rejection requires a CTLA4 ligand provided by the host or expressed on the tumor: superiority of B7-1 over B7-2 for active tumor immunization." J Immunol **156**(8): 2909-17.
- Gale, R. P., M. Bortin, D. W. van Bekkum and e. al. (1987). "Risk factors for acute graft-versus-host disease." British Journal of Haematology **67**: 397-406.
- Gianni, A. M., S. Siena, M. Bregni, C. Tarella, A. C. Stern, A. Pileri and G. Bonadonna (1989). "Granulocyte-macrophage colonie-stimulating factor to harvest circulating haematopoietic stem cells for autotransplantation." Lancet **2**: 580.
- Godfrey, W. R., M. R. Krampf, P. A. Taylor and B. R. Blazar (2004). "Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation." Blood **103**: 1158-1165.
- Goldrath, A. W., C. J. Luckey, R. Park, C. Benoist and D. Mathis (2004). "The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 16885-16890.
- Gratwohl, A., J. Hermans, D. Niederwieser, F. Frassoni, W. Arcese, G. Gahrton, G. Bandini, E. Carreras, J. P. Vernant, A. Bosi and et al. (1993). "Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation." Bone Marrow Transplant **12**(5): 509-16.
- Gribben, J. G., E. C. Guinan, V. A. Boussiotis, X. Y. Ke, L. Linsley, C. Sieff, G. S. Gray, G. J. Freeman and L. M. Nadler (1996). "Complete blockade of B7 family-mediated costimulation is necessary to induce human alloantigen-specific anergy: a method to ameliorate graft-versus-host disease and extend the donor pool." Blood **87**(11): 4887-93.
- Guinan, E. C., V. A. Boussiotis, D. Neuberg, L. L. Brennan, N. Hirano, L. M. Nadler and J. G. Gribben (1999). "Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts." N Engl J Med **340**(22): 1704-14.

- Gulati, S. C. (1993). "Purging in bone marrow transplantation." R.G. Landers Company, Austin-Georgetown: 45-85.
- Hale, G., S. Cobbold and H. Waldmann (1988). "T cell depletion with CAMPATH-1 in allogeneic bone marrow transplantation." Transplantation **45**(4): 753-9.
- Hanash, A. M. and R. B. Levy (2005). "Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation." Blood **105**(4): 1828-36.
- Hartwig, U. F., M. Robbers, C. Wickenhauser and C. Huber (2002). "Murine acute graft-versus-host disease can be prevented by depletion of alloreactive T lymphocytes using activation-induced cell death." Blood **99**(8): 3041-9.
- Helg, C., E. Roux, P. Beris, C. Cabrol, P. Wacker, R. Darbellay, M. Wyss, M. Jeannet, B. Chapuis and E. Roosnek (1993). "Adoptive immunotherapy for recurrent CML after BMT." Bone Marrow Transplant **12**: 125.
- Hestdal, K., F. W. Ruscetti, J. N. Ihle, S. E. Jacobsen, C. M. Dubois, W. C. Kopp, D. L. Longo and J. R. Keller (1991). "Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells." J Immunol **147**(1): 22-8.
- Higano, C. S., W. H. Raskind and J. W. Singer (1992). "Use of Interferon alpha for the treatment of relapse of chronic myelogenous leukemia in chronic phase after allogeneic bone marrow transplantation." Blood **80**: 1437.
- Ho, V. T. and R. J. Soiffer (2001). "The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Blood **98**(12): 3192-204.
- Hoffmann, P., J. Ermann, M. Edinger, C. G. Fathman and S. Strober (2002). "Donor-type CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." J Exp Med **196**(3): 389-99.
- Holler, E., H. J. Kolb, J. Mittermuller and e. al. (1995). "Modulation of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) release in the course of pretransplant conditioning regimens and prophylactic application of a monoklonal antibody neutralizing TNF alpha (MAK 195F)." Blood **86**: 890-899.
- Horowitz, M. M., R. P. Gale, P. M. Sondel, J. M. Goldman, J. Kersey, H. J. Kolb, A. A. Rimm, O. Ringden, C. Rozman, B. Speck and et al. (1990). "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." Blood **75**(3): 555-62.
- Hsieh, M. H., A. E. Patterson and R. Korngold (2000). "T-cell subsets mediate graft-versus-myeloid leukemia responses via different cytotoxic mechanisms." Biol Blood Marrow Transplant **6**(3): 231-40.
- Jacobson, L. O., E. K. Marks, M. J. obson, E. O. Gaston and R. E. Zirkle (1949). "Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation." J Lab Clin Med **34**: 1538-1543.
- Jiang, Y. Z., J. O. Cullis, E. J. Kanfer, J. M. Goldman and A. J. Barrett (1993). "T-cell and NKK cell mediated graft-versus-leukemia reactivity following donor buffy coat transfusion to treat relapse after marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia." Bone Marrow Transplant **11**: 133.
- Johnson, F. L., A. T. Look, J. Gockermann, M. R. Ruggiero, L. Dalla-Pozza and F. T. Billings (1984). "Bone marrow Transplantation in a patient with sickle-cell anemia." N Engl J Med **311**: 780.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuetttenberg, J. Knop and A. H. Enk (2001). "Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." J Exp Med **193**: 1285-1294.

- JP, O. K., D. L. Kociban, L. L. Machen and M. J. Buffo (1991). "The role of CD4 and CD8 T cells in the graft-versus-leukemia response in Rauscher murine leukemia." Bone Marrow Transplant **8**(6): 445-52.
- June, C. H., J. A. Bluestone, L. M. Nadler and C. B. Thompson (1994). "The B7 and CD28 receptor families." Immunol Today **15**: 321-331.
- Juttner, C. A., L. B. To, D. N. Haylock, P. G. Dyson, K. F. Bradstock, B. M. Dale, A. Enno, R. E. Sage, J. Szer and I. R. Toogood (1990). "Approaches to blood stem cell mobilisation. Initial Australian clinical results." Bone Marrow Transplant **5 Suppl 1**: 22.
- Kaufman, C. L., Y. L. Colson, S. M. Wren, S. Watkins, R. L. Simmons and S. T. Ildstad (1994). "Phenotypic characterization of a novel bone marrow-derived cell that facilitates engraftment of allogeneic bone marrow stem cells." Blood **84**(8): 2436-46.
- Keever, C. A., T. N. Small, N. Flomenberg, G. Heller, K. Pekle, P. Black, A. Pecora, A. Gillio, N. A. Kernan and R. J. O'Reilly (1989). "Immune reconstitution following bone marrow transplantation: comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts." Blood **73**(5): 1340-50.
- Kingsley, C. I., M. Karim, A. R. Bushell and K. J. Wood (2002). "CD25(+)CD4(+) regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10 dependent immunoregulation of alloresponses." J Immunol **168**: 1080-1086.
- Koh, H. S., H. G. Prentice and M. W. Lowdell (1999). "Selective removal of alloreactive cells from haematopoietic stem cell grafts: graft engineering for GvHD prophylaxis." Bone Marrow Transplant **23**: 1071.
- Kolb, H. J., J. Mittermuller, C. Clemm, G. Ledderose, G. Brehm, M. Heim and W. Wilmanns (1990). "Donor leukocyte transfusions of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients." Blood **76**(12): 2462-2465.
- Kolb, H. J., I. Rieder, H. Rodt, B. Netzel, H. Grosse-Wilde, S. Scholz, E. Schaffer, H. Kolb and S. Thierfelder (1979). "Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VI. Graft-versus-host tolerance in DLA-incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with absorbed antithymocyte globulin." Transplantation **27**(4): 242-5.
- Kolb, H. J., A. Schattenberg, J. M. Goldman, B. Hertenstein, N. Jacobsen, W. Arcese, P. Ljungman, A. Ferrant, L. Verdonck, D. Niederwieser and et al. (1995). "Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia." Blood **86**(5): 2041-50.
- Korngold, B. and J. Sprent (1978). "Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow." J Exp Med **148**(6): 1687-98.
- Lapidot, T., Y. Faktorowich, I. Lubin and Y. Reisner (1992). "Enhancement of T-cell-depleted bone marrow allografts in the absence of graft-versus-host disease is mediated by CD8+ CD4- and not by CD8- CD4+ thymocytes." Blood **80**(9): 2406-11.
- Lenardo, M., K. M. Chan, F. Hornung and e. al. (1999). "Mature T lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment." Ann Rev Immunol **17**: 221-253.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, F. Galbiati, S. Squadrone, R. de Waal Malefyt and M. G. Roncarolo (2001). "IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells." J Immunol **166**(9): 5530-9.
- Levings, M. K., R. Sangregorio and M. G. Roncarolo (2001). "Human CD4+CD25+ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function." J Exp Med **193**: 1295-1302.

- Li, C. R., P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, J. M. Goodrich and S. R. Riddell (1994). "Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis." Blood **83**(7): 1971-9.
- Liem, L. M., W. E. Fibbe, H. C. van Houwelingen and E. Goulmy (1999). "Serum transforming growth factor beta-1 levels in bone marrow transplant recipients correlate with blood cell counts and chronic graft-versus-host disease." Transplantation **67**: 547-8.
- Litvinova, E., S. Maury, O. Boyer, S. Bruel, L. Benard, G. Boisserie, D. Klatzmann and J. L. Cohen (2002). "Graft-versus-leukemia effect after suicide-gene-mediated control of graft-versus-host disease." Blood **100**(6): 2020-5.
- Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-44.
- Lorenz, E., D. Uphoff, T. R. Reid and E. Shelton (1951). "Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections." J Natl Cancer Inst **12**: 197-201.
- Lowdell, M. W., F. Shamim, M. Hamon, I. D. Macdonald and H. G. Prentice (1995). "VLA-6 (CDw49f) is an important adhesion molecule in NK cell-mediated cytotoxicity following autologous or allogeneic bone marrow transplantation." Exp Hematol **23**: 1530-4.
- Lowenberg, B., G. Wagemaker, D. W. van Bekkum, W. Sizoo, K. Sintnicolass, W. H. D. Hendriks and A. Hagenbeek (1986). "Graft-versus-host disease following transplantation of "one log" versus "two log" T-lymphocyte-depleted bone marrow from HLA-identical donors." Bone Marrow Transplant **1**: 133.
- Lucarelli, G., P. Polchi, T. Izzi, M. Manna, F. Agostinelli, C. Delfini, A. Porcellini, M. Galimberti, L. Moretti and A. Manna (1984). "Allogeneic marrow transplantation for thalassemia." Exp Hematol **12**(8): 676-81.
- Lyons, A. B. (2000). "Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution." J Immunol Methods **243**(1-2): 147-54.
- Mackinnon, S., E. B. Papadopoulos, M. H. Carabasi, L. Reich, N. H. Collins, F. Boulad, H. Castro-Malaspina, B. H. Childs, A. P. Gillio, N. A. Kernan and et al. (1995). "Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease." Blood **86**(4): 1261-8.
- Maraninchi, D., E. Gluckman, D. Blaise, D. Guyotat, B. Rio, J. L. Pico, V. Leblond, M. Michallet, F. Dreyfus, N. Ifrah and e. al. (1987). "Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias." Lancet **25**: 175-8.
- Marijt, W. A., M. H. M. Heemserk, F. M. Kloosterboer and e. al. (2003). "Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1 or HA-2-specific T-cells can induce complete remissions of relapsed acute leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 2742-2747.
- Marmont, A. M., M. M. Horowitz, R. P. Gale, K. Sobocinski, R. C. Ash, D. W. van Bekkum, R. E. Champlin, K. A. Dicke, J. M. Goldman, R. A. Good and et al. (1991). "T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia." Blood **78**(8): 2120-30.
- Martin, P. J. (1993). "Donor CD8 cells prevent allogeneic marrow graft rejection in mice: potential implications for marrow transplantation in humans." J Exp Med **178**(2): 703-12.
- Martin, P. J. (2000). "Winning the battle of graft versus host." Nat Med **6**(1): 18-9.
- Martin, P. J., Y. Akatsuka, M. Hahne and G. Sale (1998). "Involvement of donor T-cell cytotoxic effector mechanisms in preventing allogeneic marrow graft rejection." Blood **92**(6): 2177-81.

- Martin, P. J., R. A. Clift, L. D. Fisher, C. D. Buckner, J. A. Hansen, F. R. Appelbaum, K. C. Doney, K. M. Sullivan, R. P. Witherspoon, R. Storb and et al. (1988). "HLA-identical marrow transplantation during accelerated-phase chronic myelogenous leukemia: analysis of survival and remission duration." Blood **72**(6): 1978-84.
- Martin, P. J., J. A. Hansen, C. D. Buckner, J. E. Sanders, H. J. Deeg, P. Stewart, F. R. Appelbaum, R. Clift, A. Fefer, R. P. Witherspoon and et al. (1985). "Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts." Blood **66**(3): 664-72.
- Martin, P. J., J. A. Hansen, B. Torok-Storb, D. Durnam, D. Przepiorka, J. O'Quigley, J. Sanders, K. M. Sullivan, R. P. Witherspoon, H. J. Deeg and et al. (1988). "Graft failure in patients receiving T cell-depleted HLA-identical allogeneic marrow transplants." Bone Marrow Transplant **3**(5): 445-56.
- Martin, P. J., S. D. Rowley, C. Anasetti, T. R. Chauncey, T. Gooley, E. W. Petersdorf, J. A. van Burik, M. E. Flowers, R. Storb, F. R. Appelbaum and J. A. Hansen (1999). "A phase I-II clinical trial to evaluate removal of CD4 cells and partial depletion of CD8 cells from donor marrow for HLA-mismatched unrelated recipients." Blood **94**(7): 2192-9.
- Mathe, G., J. L. Amiel, L. Schwarzenberg, A. Cattani, M. Schneider, M. J. Devries, M. Tubiana, C. Lalanne, J. L. Binet, M. Papiernik, G. Seman, M. Matsukura, A. M. Mery, V. Schwarzmann and A. Flaisler (1965). "Successful Allogenic Bone Marrow Transplantation in Man: Chimerism, Induced Specific Tolerance and Possible Anti-Leukemic Effects." Blood **25**: 179-96.
- Maury, S., B. Salomon, D. Klatzmann and J. L. Cohen (2001). "Division rate and phenotypic differences discriminate alloreactive and nonalloreactive T cells transferred in lethally irradiated mice." Blood **98**(10): 3156-8.
- Mehta, J., R. Powles, J. Treleaven, C. Horton, S. Meller, C. R. Pinkerton and S. Singhal (1997). "Outcome of acute leukemia relapsing after bone marrow transplantation: utility of second transplants and adoptive immunotherapy." Bone Marrow Transplant **19**: 709-719.
- Menssen, H. D., H. J. Renkl, U. Rodeck, J. Maurer, M. Notter, S. Schwartz, R. Reinhardt and E. Thiel (1995). "Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias." Leukemia **9**(6): 1060-7.
- Mitsuyasu, R. T., R. E. Champlin, R. P. Gale, W. G. Ho, C. Lenarsky, D. Winston, M. Selch, R. Elashoff, J. V. Giorgi, J. Wells and et al. (1986). "Treatment of donor bone marrow with monoclonal anti-T-cell antibody and complement for the prevention of graft-versus-host disease. A prospective, randomized, double-blind trial." Ann Intern Med **105**(1): 20-6.
- Miwa, H., M. Beran and G. F. Saunders (1992). "Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias." Leukemia **6**(5): 405-9.
- Molldrem, J., S. Dermime, K. Parker, Y. Z. Jiang, D. Mavroudis, N. Hensel, P. Fukushima and A. J. Barrett (1996). "Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells." Blood **88**(7): 2450-7.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa and V. E. Papaioannou (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." Cell **68**(5): 869-77.
- Montagna, D., E. Yvon, V. Calcaterra, P. Comoli, F. Locatelli, R. Maccario, A. Fisher and M. Cavazzana-Calvo (1999). "Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity." Blood **93**(10): 3550-7.

- Mowat, A. M. and M. V. Felstein (1990). "Experimental studies of immunologically mediated enteropathy. V. Destructive enteropathy during an acute graft-versus-host reaction in adult BDF1 mice." Clin Exp Immunol **79**(2): 279-84.
- Mrsic, M., M. M. Horowitz, K. Atkinson, J. C. Biggs, R. Champlin, G. Ehninger, J. Gajewski, R. P. Gale, R. H. Herzig, H. G. Prentice, C. Rozman, K. A. Sobocinski, B. Speck and M. Bortin (1992). "Second HLA-identical sibling transplants for leukemia recurrence." Bone Marrow Transplant **9**: 269.
- Murphy, W. J., V. Kumar and M. Bennett (1987). "Acute rejection of murine bone marrow allografts by natural killer cells and T cells. Differences in kinetics and target antigens recognized." J Exp Med **166**(5): 1499-509.
- Noel, D. R., R. P. Witherspoon, R. Storb, K. Atkinson, K. Doney, E. M. Mickelson, H. D. Ochs, R. P. Warren, P. L. Weiden and E. D. Thomas (1978). "Does graft-versus-host disease influence the tempo of immunologic recovery after allogeneic human marrow transplantation? An observation on 56 long-term survivors,." Blood **51**: 1078.
- Oettel, K. R., O. H. Wesly, M. R. Albertini, J. A. Hank, O. Iliopolis, J. A. Sosman, K. Voelkerding, S. Q. Wu, S. S. Clark and P. M. Sondel (1994). "Allogeneic T-cell clones able to selectively destroy Philadelphia chromosome-bearing (Ph1+) human leukemia lines can also recognize Ph1- cells from the same patient." Blood **83**(11): 3390-402.
- Papadopoulos, E. B., M. Ladanyi, D. Emanuel, S. MacKinnon, F. Boulad, M. H. Carabasi, H. Castro-Malaspina, B. H. Childs, A. Gillio and T. N. Small (1994). "Infusions of donor leukocytes to treat Eppstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation." N Engl J Med **330**: 1185.
- Parr, L. (1972). "Response of syngeneic murine lymphomata to immunotherapy in relation to the antigenicity of the tumour." Br J Cancer **26**: 174-177.
- Parreira, A., J. Smith, J. M. Hows, S. A. Smithers, J. Apperley, Y. Rombos, J. M. Goldman, E. C. Gordon-Smith and D. Catovsky (1987). "Immunological reconstitution after bone marrow transplant with Campath-1 treated bone marrow." Clin Exp Immunol **67**(1): 142-50.
- Patterson, J., H. G. Prentice, M. K. Brenner, M. Gilmore, G. Janossy, K. Ivory, D. Skeggs, H. Morgan, J. Lord, H. A. Blacklock and et al. (1986). "Graft rejection following HLA matched T-lymphocyte depleted bone marrow transplantation." Br J Haematol **63**(2): 221-30.
- Paulin, T., O. Ringden and B. Nilsson (1987). "Immunological recovery after bone marrow transplantation: role of age, graft-versus-host disease, prednisolone treatment and infections." Bone Marrow Transplant **1**(3): 317-28.
- Pierres, M., J. P. Rebouah, A. Liabeuf and M. Dosseto (1981). "Mouse monoclonal antibody against Lyt-1.1 alloantigen." J Immunogenet **8**(1): 67-71.
- Plate, J. M., F. E. Ward and D. B. Amos (1970). The mixed leukocyte culture response between HL-A identical siblings. In Histocompatibility Testing. Munskaard, Copenhagen, Scandinavian University Books.
- Porter, D. L. and J. H. Antin (1999). "The graft-versus-leukemia effects of allogeneic cell therapy." Annu Rev Med **50**: 369-386.
- Preijers, F. W., T. De Witte, G. P. Rijke-Schilder, W. J. Tax, J. M. Wessels, C. Haanen and P. J. Capel (1988). "Human T lymphocyte differentiation antigens as target for immunotoxins or complement-mediated cytotoxicity." Scand J Immunol **28**(185-94).
- Prentice, H. G., H. A. Blacklock, G. Janossy, M. J. Gilmore, L. Price-Jones, N. Tidman, L. K. Trejdosiewicz, D. B. Skeggs, D. Panjwani, S. Ball and et al. (1984). "Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients." Lancet **1**(8375): 472-6.

- Prlic, M., B. R. Blazar, A. Khoruts, T. Zell and S. C. Jameson (2001). "Homeostatic Expansion Occurs Independently of Costimulatory Signals." J Immunol **167**: 5664-5668.
- Radich, J. P., J. E. Sanders, C. D. Buckner, P. J. Martin, F. B. Petersen, W. Bensinger, M. G.B., M. Mori, G. Schoch and J. A. Hansen (1993). "Second allogeneic marrow transplantation for patients with recurrent leukemia after initial transplant with total body irradiation-containing regimens." J Clin Oncol **11**: 304.
- Reinherz, E. L., R. Geha, J. M. Rapoport, M. Wilson, A. C. Penta, R. E. Hussey, K. A. Fitzgerald, J. F. Daley, H. Levine, F. S. Rosen and S. F. Schlossman (1982). "Reconstitution after transplantation with T-lymphocyte-depleted HLA haplotype-mismatched bone marrow for severe combined immunodeficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(19): 6047-51.
- Reisner, Y., L. Itzicovitch, A. Meshorer and N. Sharon (1978). "Hemopoietic stem cell transplantation using mouse bone marrow and spleen cells fractionated by lectins." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(6): 2933-6.
- Rencher, S. D., J. A. Houston, T. D. Lockey and J. L. Hurwitz (1996). "Eliminating graft-versus-host potential from T cell immunotherapeutic populations." Bone Marrow Transplant **18**(2): 415-20.
- Rettig, M. P., J. K. Ritchey, J. L. Prior, J. S. Haug, D. Piwnica-Worms and J. F. DiPersio (2004). "Kinetics of in vivo elimination of suicide gene-expressing T cells affects engraftment, graft-versus-host disease, and graft-versus-leukemia after allogeneic bone marrow transplantation." J Immunol **173**(6): 3620-30.
- Rodt, H., H. J. Kolb, B. Netzel, R. J. Haas, K. Wilms, C. B. Gotze, H. Link and S. Thierfelder (1981). "Effect of anti-T-cell globulin on GVHD in leukemic patients treated with BMT." Transplant Proc **13**(1 Pt 1): 257-61.
- Rodt, H., S. Thierfelder and M. Eulitz (1974). "Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. IV. Comparison of the effects of antibody fragments directed against immunoglobulin or lymphocyte antigens on acute secondary disease." Exp Hematol **2**(4): 195-203.
- Rooney, C. M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. Loftin, C. Li, R. A. Krance, M. K. Brenner and H. E. Heslop (1995). "Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation." Lancet **345**: 9.
- Rowley, D. A. and R. M. Stach (1993). "A first or dominant immunization. I. Suppression of simultaneous cytolytic T cell responses to unrelated alloantigens." J Exp Med **178**(3): 835-40.
- Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W. D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frassoni, F. Aversa, M. F. Martelli and A. Velardi (2002). "Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants." Science **295**(5562): 2097-100.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (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**(3): 1151-64.
- Schultze, J. L., L. M. Nadler and J. G. Gribben (1996). "B7-mediated costimulation and the immun response." Blood Rev **10**: 111-127.
- Sette, A., J. Alexander and H. M. Grey (1995). "Interaction of antigenic peptides with MHC and TCR molecules." Clin Immunol Immunopathol **76**: 168-171.
- Shapiro, R. S., K. McClain, G. Frizzera, K. J. Gajl-Peczalska, J. H. Kersey, B. R. Blazar, D. C. Arthur, D. F. Patton, J. S. Greenberg, B. Burke and et al. (1988). "Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation." Blood **71**(5): 1234-43.

- Shimizu, J., S. Yamazaki and S. Sakaguchi (1999). "Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity." J Immunol **163**(10): 5211-8.
- Shtivelman, E., B. Lifshitz, R. P. Gale and E. Canaani (1985). "Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia." Nature **315**(6020): 550-4.
- Shulman, H. M., K. M. Sullivan, P. L. Weiden and e. al. (1980). "Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long term clinicopathological study of 20 Seattle patients." American Journal of Medicine **69**: 204-217.
- Singh, S., S. R. Ross, M. Acena, D. A. Rowley and H. Schreiber (1992). "Stroma is critical for preventing or permitting immunological destruction of antigenic cancer cells." J Exp Med **175**(1): 139-46.
- Slavin, S., Z. Fuks, H. S. Kaplan and S. Strober (1978). "Transplantation of allogeneic bone marrow without graft-versus-host disease using total lymphoid irradiation." J Exp Med **147**: 963.
- Soiffer, R. J., L. Bosserman, C. Murray, K. Cochran, John Daley and J. Ritz (1990). "Reconstitution of T-cell Function After CD6-Depleted Allogeneic Bone Marrow Transplantation." Blood **75**(10): 2076-2084.
- Spiotto, M. T., D. A. Rowley and H. Schreiber (2004). "Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors." Nat Med **10**(3): 294-8.
- Spiotto, M. T., P. Yu, D. A. Rowley, M. I. Nishimura, S. C. Meredith, T. F. Gajewski, Y. X. Fu and H. Schreiber (2002). "Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells." Immunity **17**(6): 737-47.
- Storb, R., E. D. Thomas, C. D. Buckner, R. Clift, F. L. Johnson, A. Fefer, H. Glucksberg, E. R. Giblett, K. G. Lerner and P. Neiman (1974). "Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia." Blood **43**: 157.
- Storek, J. (2002). "B-cell immunity after allogeneic hematopoietic cell transplantation." Cytotherapy **4**(5): 423-4.
- Storek, J., S. Ferrara, N. Ku, J. V. Giorgi, R. E. Champlin and A. Saxon (1993). "B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny?" Bone Marrow Transplant **12**(4): 387-98.
- Storek, J., T. Gooley, M. Siadek and e. al. (1997). "Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation may be associated with a high risk of chronic graft-versus-host disease." Blood **90**: 4705-4709.
- Sullivan, K. M., H. M. Shulman, R. Storb and e. al. (1981). "Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression." Blood **57**: 267-276.
- Sullivan, K. M., R. P. Witherspoon, R. Storb and e. al. (1988). "Alternating day cyclosporine and prednisolone for treatment of high risk chronic graft-versus-host disease." Blood **72**: 555-61.
- Sykes, M., M. Sheard and D. H. Sachs (1988). "Effects of T cell depletion in radiation bone marrow chimeras. I. Evidence for a donor cell population which increases allogeneic chimerism but which lacks the potential to produce GVHD." J Immunol **141**(7): 2282-8.
- Taylor, P. A., C. J. Lees and B. R. Blazar (2002). "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality." Blood **99**(10): 3493-3499.
- Taylor, P. A., R. J. Noelle and B. R. Blazar (2001). "CD4+CD25+ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade." J Exp Med **193**(11): 1311-1318.

- Thomas, E. D., C. D. Buckner, M. Banaji, R. Clift, A. Fefer, N. Flournoy, B. W. Goodell, R. O. Hickman, K. G. Lerner, P. E. Neiman, G. E. Sale, J. E. Sanders, J. Singer, M. Stevens, R. Storb and P. L. Weiden (1977). "One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation." Blood **49**(4): 511-533.
- Thomas, E. D., C. D. Buckner, R. Clift, A. Fefer, F. L. Johnson, P. E. Neiman, G. E. Sale, J. E. Sanders, J. W. Singer, H. Shulman, R. Storb and P. L. Weiden (1979). "Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission." N Engl J Med **301**: 597.
- Thomas, E. D., J. A. Collins, E. C. Herman, Jr. and J. W. Ferrebee (1962). "Marrow transplants in lethally irradiated dogs given methotrexate." Blood **19**: 217-28.
- Thomas, E. D., G. L. Plain, T. C. Graham and J. W. Ferrebee (1964). "Long-Term Survival of Lethally Irradiated Dogs Given Homografts of Bone Marrow." Blood **23**: 488-93.
- Thomas, E. D., R. Storb, A. Fefer, S. J. Slichter, J. I. Bryant, C. D. Buckner, P. E. Neiman, R. A. Clift, D. D. Funk and K. G. Lerner (1972). "Aplastic anemia treated by marrow transplantation." Lancet **1**: 284.
- Tiberghien, P., C. Ferrand, B. Lioure, N. Milpied, R. Angonin, E. Deconinck, J. M. Certoux, E. Robinet, P. Saas, B. Petracca, C. Juttner, C. W. Reynolds, D. L. Longo, P. Herve and J. Y. Cahn (2001). "Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft." Blood **97**(1): 63-72.
- Tiberghien, P., C. W. Reynolds, J. Keller, S. Spence, M. Deschaseaux, J. M. Certoux, E. Contassot, W. J. Murphy, R. Lyons, Y. Chiang and et al. (1994). "Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation?" Blood **84**(4): 1333-41.
- Tlsty, T. D. and P. W. Hein (2001). "Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals." Curr Opin Genet Dev **11**(1): 54-9.
- Trenado, A., F. Charlotte, S. Fisson, M. Yagello, D. Klatzmann, B. L. Salomon and J. L. Cohen (2003). "Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia." J Clin Invest **112**(11): 1688-96.
- Trentin, J. J. and K. P. Judd (1973). "Prevention of acute graft-versus-host (GVH) mortality with spleen-absorbed antithymocyte globulin (ATG)." Transplant Proc **5**(1): 865-8.
- Trigg, M. E., R. Billing, P. M. Sondel, R. Exten, R. Hong, M. J. Bozdech, S. D. Horowitz, J. L. Finlay, R. Moen, W. Longo and et al. (1985). "Clinical trial depleting T lymphocytes from donor marrow for matched and mismatched allogeneic bone marrow transplants." Cancer Treat Rep **69**(4): 377-86.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol **47**: 187-376.
- Truitt, R. L. and A. A. Atasoylu (1991). "Contribution of CD4+ and CD8+ T cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC-compatible bone marrow." Bone Marrow Transplant **8**(1): 51-8.
- Uharek, L., W. Gassmann, B. Glass, J. Steinmann, H. Loeffler and W. Mueller-Ruchholtz (1992). "Influence of cell dose and graft-versus-host reactivity on rejection rates after allogeneic bone marrow transplantation." Blood **79**(6): 1612-21.
- van Bekkum, D. W., H. Balner, K. A. Dicke, F. G. van den Berg, G. H. Prinsen and C. F. Hollander (1972). "The effect of pretreatment of allogeneic bone marrow graft recipients with antilymphocytic serum on the acute graft-versus-host reaction in monkeys." Transplantation **13**: 400.
- van Bekkum, D. W. and M. J. DeVries (1967). ""Radiation Chimeras"." N.Y. Academic Press, New York.

- van Den Brink, M. R., E. Moore, K. J. Horndasch, J. M. Crawford, J. Hoffman, G. F. Murphy and S. J. Burakoff (2000). "Fas-deficient lpr mice are more susceptible to graft-versus-host disease." J Immunol **164**(1): 469-80.
- van Dicke, K. A. H. J. I. and D. W. van Bekkum (1968). "The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures. II. Mouse spleen cell fractionation on a discontinuous albumin gradient." Transplantation **6**(4): 562-70.
- van Dijk, A. M., F. L. Kessler, S. A. Stadhouders-Keet, L. F. Verdonck, G. C. de Gast and H. G. Otten (1999). "Selective depletion of major and minor histocompatibility antigen reactive T cells: towards prevention of acute graft-versus-host disease." Br J Haematol **107**(1): 169-75.
- Vogelsang, G. B., E. R. Farmer, H. A.D. and e. al. (1992). "Thalidomide for the treatment of chronic graft-versus-host disease." N Engl J Med **326**: 1055-8.
- Vos, O. and W. W. H. Weyzen (1962). "'Killing effect" of injected lymph node cells in homologous radiation chimeras." Transplant Bulletin **30**: 501.
- Wagner, J. E., A. D. Donnenberg, S. J. Noga, C. A. Cremonesi, I. K. Gao, H. J. Yin, G. B. Vogelsang, S. Rowley, R. Saral and G. W. Santos (1988). "Lymphocyte depletion of donor bone marrow by counterflow centrifugal elutriation: results of a phase I clinical trial." Blood **72**(4): 1168-76.
- Ward, P. L., H. Koeppen, T. Hurteau and H. Schreiber (1989). "Tumor antigens defined by cloned immunological probes are highly polymorphic and are not detected on autologous normal cells." J Exp Med **170**: 217-232.
- Warren, E. H., P. D. Greenberg and S. R. Riddell (1998). "Cytotoxic T-lymphocyte-defined human minor histocompatibility antigens with a restricted tissue distribution." Blood **91**(6): 2197-207.
- Weiden, P. L., R. Storb, M. S. Tsoi, T. C. Graham, K. G. Lerner and D. Thomas (1976). "Infusion of donor lymphocytes into stable canine radiation chimeras: Implications for mechanism of transplantation tolerance." J Immunol **116**: 1212.
- Weiden, P. L., K. M. Sullivan, N. Flournoy, R. Storb and E. D. Thomas (1981). "Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation." N Engl J Med **304**(25): 1529-33.
- Weiss, A. R. (1998). T-lymphocyte activation. Fundamental Immunology. W. E. Paul, Lippincott-Raven, Philadelphia. **4th ed.**
- Wiesneth, M., B. Hertenstein, D. Bunjes, T. Schmeiser, R. Arnold, H. Heimpel and H. W. (1988). "T-cell depletion versus methotrexate as GvHD-prophylaxis in allogeneic bone marrow transplantation for leukaemia." Eur J Haematol **41**: 243-9.
- Woo, E. Y., H. Yeh, C. S. Chu, K. Schlienger, R. G. Carroll, J. L. Riley, L. R. Kaiser and C. H. June (2002). "Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation." J Immunol **168**(9): 4272-6.
- Wu, C. J., A. Chillemi, E. P. Alyea, E. Orsini, D. Neuberg, R. J. Soiffer and J. Ritz (2000). "Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism." Blood **95**(1): 352-9.
- Xu, H., B. G. Exner, D. E. Cramer, M. K. Tanner, Y. M. Mueller and S. T. Ildstad (2002). "CD8(+), alphabeta-TCR(+), and gammadelta-TCR(+) cells in the recipient hematopoietic environment mediate resistance to engraftment of allogeneic donor bone marrow." J Immunol **168**(4): 1636-43.
- Zeller, J. C., A. Panoskaltzis-Mortari, W. J. Murphy, F. W. Ruscetti, S. Narula, M. G. Roncarolo and B. R. Blazar (1999). "Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta." J Immunol **163**(7): 3684-91.

- Zorn, E., K. S. Wang, E. P. Hochberg and e. al. (2002). "Infusion of CD4+ donor lymphocytes induces the expansion of CD8+ donor T-cells with cytolytic activity directed against recipient hematopoietic cells." Clin Cancer Res **8**(2052-2060).
- Zutter, M. M., P. J. Martin, G. E. Sale, H. M. Shulman, L. Fisher, E. D. Thomas and D. M. Durnam (1988). "Epstein-Barr virus lymphoproliferation after bone marrow transplantation." Blood **72**(2): 520-9.

7. Anhang

Tabelle 3: Überblick über bisher publizierte Strategien zur Elimination alloreaktiver T-Zellen

Strategie	wie	Arbeitsgruppe	Modellsystem	GvHD	GvL-Effekt	verbleibende Reaktivität
Blockade der T-Zellaktivierung, Anergieinduktion	Gabe anti-CTLA-4-Ig Fusionsprotein <i>in vivo</i>	(Blazar <i>et al.</i> 1994)	Rezipient: B10.BR/SgSnJ (H2 ^k) Donor: C57BL/6 (H2 ^b)	reduziert	nicht untersucht	
Induktion von Anergie	Blockade CD28/CTLA-4:B7- und LFA1:ICAM-Interaktionen (mAb gegen CTLA-4 bzw. LFA1) <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	(Blazar <i>et al.</i> 1995)	Rezipient: B10.BR/SgSnJ (H2 ^k) Donor: C57BL/6 (H2 ^b)	keine Anzeichen einer GvHD <i>in vivo</i> nach Koblockade	nicht untersucht	Analyse von pHTL 5 Monate nach Transplantation → verminderte Anzahl von Vorläuferzellen
Blockade T-Zellaktivierung, Induktion von Anergie	DLI d21 post KMT und Gabe mAb gegen B7.1 bzw. B7.2	(Blazar <i>et al.</i> 1997)	Rezipient: C57BL/6 (H2 ^b) Donor: B10.BR/SgSnJ (H2 ^k)		blockiert durch Infusion eines anti-B7 Antikörpers	
Toleranzinduktion	Blockade CD40:CD40L-Interaktion mAb gegen CD40L <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	(Blazar <i>et al.</i> 1998)	Rezipient: B6.C-H2 ^{bm12} (bm12, H2 ^b) Donor: C57BL/6 (H2 ^b)	deutlich reduziert; längeres Überleben als Indikator; fehlende KM-Aplasia	nicht untersucht	OVA-spez. TCR-transgene Zellen ausgenommen von Toleranzinduktion
Blockade T-Zellaktivierung, Induktion von Anergie	monoklonaler Antikörper gegen B7.1 und B7.2 (CD80, CD86) <i>in vitro</i>	(Gribben <i>et al.</i> 1996)	MLR humaner PB oder KMMC	Zytokinfreisetzung unter Schwellenwert für γ -chain signaling; Anzahl pHTL niedriger als die zur Induktion einer GvHD vorausgesagte Mindestzahl		
Elimination aufgrund Expression bestimmter Aktivierungsmarker	anti-IL2R β -chain spez. Immunotoxin <i>in vitro</i>	(Cavazzana-Calvo <i>et al.</i> 1990)	humane Blut- oder Knochenmark T-Zellen	komplette Inhibition der Alloreaktivität <i>in vitro</i>	nicht untersucht	Alloreaktivität gegen <i>third party</i> Antigene (³ H-Thymidin-Inkorp.)

Strategie	wie	Arbeitsgruppe	Modellsystem	GvHD	GvL-Effekt	verbleibende Reaktivität
Elimination aufgrund Expression bestimmter Aktivierungsmarker	anti-IL2R β -chain spez. Immunotoxin <i>in vitro</i> <i>in vivo</i> -Effekte	(Cavazzana-Calvo <i>et al.</i> 1994)	Rezipient: C3HxDBA/2 F1 (H2 ^{kxd}) Donor: C3H (H2 ^k)	Abschwächung	nicht untersucht	Aktivität gegen <i>third party</i> im ⁵¹ Cr-Freisetz.-Test nach 6-tägiger Stimulation
Elimination aufgrund Expression bestimmter Aktivierungsmarker	anti-IL2R β -chain spez. Immunotoxin <i>in vitro</i>	(Montagna <i>et al.</i> 1999)	humane PBMC und KM-Zellen	komplette Inhibition der Alloreaktivität <i>in vitro</i>	Reaktivität gegen leukämische Blasten des Rezipienten <i>in vitro</i> (LDA, CTLp frequency)	Fähigkeit CML-infizierte Fibroblasten zu lysieren (<i>precursor frequency</i>)
Elimination aufgrund Expression bestimmter Aktivierungsmarker	klinische Studie Phase $\frac{1}{2}$ Allodepletion <i>in vitro</i> → Transfer	(Andre-Schmutz <i>et al.</i> 2002)	humane PBMC	vermindertes GvHD-Risiko, gute Rekonstitution	Relaps in 3 von 5 Patienten mit akuter Leukämie	zytotxische Aktivität gegen CML-infizierte PBMC (2 Patienten)
Elimination CD25, CD69, MHC II (Aktivierungsmarker)	FACS-Sortierung paramagnet. Beads <i>in vitro</i>	(Rencher <i>et al.</i> 1996) (Koh <i>et al.</i> 1999) (Fehse <i>et al.</i> 2000) (van Dijk <i>et al.</i> 1999)	humane T-Zellen	deutlich verminderte proliferative Kapazität		<i>third party</i> Reaktivität <i>in vitro</i>
Induktion von AICD alloreaktiver T-Zellen	<i>in vitro</i> Inkubation mit α CD95 mAb (vernetzt durch Ig) während Stimulation	(Hartwig <i>et al.</i> 2002)	C3H → B1c B1c gg. F1 (<i>in vitro</i> → OVA-spez.)	nein	nicht untersucht	OVA-spez. TCR-transgene T-Zellen nicht beeinträchtigt (<i>in vitro</i>)
<i>photodynamic purging</i> (TH9402)	Farbstoff in aktivierten Zellen gehalten, durch Licht 514nm getötet	(Chen <i>et al.</i> 2002)	Rezipient: BALB/c (H2 ^d) Donor: C57BL/6 (H2 ^b) <i>third party</i> -Rezipient: C3H (H2 ^k)	nein	ja BCL1 (BALB/c-Lymphomzelllinie) → Tumorabstoßung	GvHD in <i>third party</i> Tieren induziert
Elimination, naiver T-Zellen (CD62 ⁺)	Elimination CD62L ⁺ Zellen mittels paramagnetischer Beads	(Chen <i>et al.</i> 2004)	Rezipient: BALB/c (H2 ^d) C3H (H2 ^k) Donor: C57BL/6 (H2 ^b)	nein	nicht untersucht	Spezifität α BCL1-präaktiverter B6-Zellen bleibt erhalten in B6 SCID <i>host</i> ; keine GvHD-Indukt. in C3H-Tieren

Strategie	wie	Arbeitsgruppe	Modellsystem	GvHD	GvL-Effekt	verbleibende Reaktivität
<i>in vivo</i> -Elimination alloreaktiver T-Zellen mittels Suizidgen	Transfektion mit Herpes Simplex Thymidin-Kinase (HSV-TK), Gabe GCV <i>in vitro</i> -Untersuchungen → Neomycin-Selektion	(Tiberghien <i>et al.</i> 1994)	humane PBMC Stimulation mit: PHA; bestrahlten PBMC+ IL-2; mAb gg. CD3	deutliche Inhibition IL-2 induzierter Proliferation und der Alloreaktivität durch GCV; kein Effekt auf untransfiz. Zellen		
<i>in vivo</i> -Elimination alloreaktiver T-Zellen mittels Suizidgen	Transfektion mit HSV-TK, Gabe GCV → Selektion über kotranfiz. Oberflächenmarker, der normal nicht auf Lymphozyten (Δ LNDR)	(Bonini <i>et al.</i> 1997)	8 Patienten mit Relaps oder EBV-induz. Lymphom allogent transplantiert	3 Patienten entwickelten GvHD und konnten durch GCV-Gabe erfolgreich behandelt werden	GvL-Effekt in 5 Patienten, 3 davon in kompletter Remission	
<i>in vivo</i> -Elimination alloreaktiver T-Zellen mittels Suizidgen	Transfektion mit HSV-TK, Gabe GCV	(Tiberghien <i>et al.</i> 2001)	human, HLA-ident. Geschwistertransplantation TCD BM+ gene modified cells (GMCs)	Kontrolle der GvHD durch Gabe von GCV erreicht, auch danach low level of GMCs nachweisbar	komplette Remission möglich, auch nach Behandlung mit GCV	
<i>in vivo</i> -Elimination alloreaktiver T-Zellen mittels Suizidgen	Transfektion mit HSV-TK, Gabe GCV	(Litvinova <i>et al.</i> 2002)	Rezipient: B6x DBA/2 F1 (H2 ^{bx^d}) Donor: C57BL/6 (H2 ^b)	7-tägige Behandlung direkt nach Tx bietet guten Schutz vor GvHD-Induktion	frühe Gabe von GCV verhindert GvL-Effekt, spätere (d3 ½) Behandlung erhält den Effekt (allerdings nur in 3 von 10 Tieren-P815)	
<i>in vivo</i> -Elimination alloreaktiver T-Zellen mittels Suizidgen	Transfektion mit HSV-TK, Gabe GCV → Fusion der HSV-TK mit humanem Δ CD34	(Rettig <i>et al.</i> 2004)	Rezipient: BALB/c (H2 ^d) Donor: C57BL/6 (H2 ^b)	deutlich höhere Überlebensrate nach Gabe HSV-TK transf.-Zellen + GCV-Gabe → frühe Gabe von GCV verschlechtert engraftment bei RIC	frühe Behandlung mit GCV (d1-7 <i>post transplantationem</i>) verhindert GvL-Effekt, ab d10 in 8 von 10 Tieren erhalten	

Strategie	wie	Arbeitsgruppe	Modellsystem	GvHD	GvL-Effekt	verbleibende Reaktivität
<i>in vivo</i> -Elimination alloreaktiver T-Zellen mittels Suizidgen	Transfektion mit HSV-TK, Gabe GCV	(Drobyski <i>et al.</i> 2003)	Rezipient: AKR (H2 ^k) Donor: C57BL/6 (H2 ^b)	GvHD-Risiko vermieden bzw. gesenkt, abhängig vom Zeitpunkt der GCV-Behandlung	GvL-Effekt erhalten, wenn späte Gabe von GCV beide Effekte abhängig von Zeitpunkt der GCV-Gabe, T-Zelldosis und Leukämie-Burden	
Zugabe regulatorischer T-Zellen (T _{reg}) CD4 ⁺ CD25 ⁺ , Beitrag zur Toleranzinduktion bei Alloreaktivität	Addition <i>in vitro</i> , essentiell bei Toleranzinduktion CD4 ⁺	(Taylor <i>et al.</i> 2001)	Stimulator/Rezipient: B6.C-H2 ^{bm12} (bm12) Responder/Donor: C57BL/6 (H2 ^b) CD4 ⁺	<i>in vitro</i> : Toleranzinduktion erfordert CD4 ⁺ CD25 ⁺ <i>in vivo</i> : Protektion vor GvHD nach Transfer von T-Zellen nach Toleranzinduktion <i>in vitro</i> (nur in Anwesenheit von T _{reg})	nicht untersucht	
Infusion regulatorischer T-Zellen (T _{reg}) CD4 ⁺ CD25 ⁺	<i>ex vivo</i> aktivierte und expandierte T _{reg} transplantiert	(Taylor <i>et al.</i> 2002)	Rezipient: BALB/c (H2 ^b), B10BR (H2 ^k) Donor: C57BL/6 (H2 ^b)	Depletion T _{reg} (CD25 ⁺) verlangsamt Verlauf der GvHD, Addition expandierter, aktivierter T _{reg} verbessert GvHD-Risiko	nicht untersucht	
Addition regulatorischer T-Zellen (T _{reg}) CD4 ⁺ CD25 ⁺	frische oder <i>ex vivo</i> aktivierte und expandierte T _{reg} aus Milz	(Cohen <i>et al.</i> 2002)	Rezipient: B6xDBA/2 F1 (H2 ^{bx^d}), C3H (H2 ^k), BALB/c (H2 ^d) Donor: C57BL/6 (H2 ^b) oder BALB/c (H2 ^d)	Depletion CD25 ⁺ verschlimmert GvHD, Addition von T _{reg} verbessert Überlebensrate bzw. Verlauf der GvHD auch <i>ex vivo</i> expandierte T _{reg} , aber nicht so potent wie frisch isolierte	nicht untersucht	

Strategie	wie	Arbeitsgruppe	Modellsystem	GvHD	GvL-Effekt	verbleibende Reaktivität
CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen	Addition bei Transfer (aus Milz und KM)	(Hoffmann <i>et al.</i> 2002)	Rezipient: BALB/c (H2 ^d) Donor: C57BL/6 (H2 ^b)	bei Ratio 1:1 CD4 ⁺ CD25 ⁺ : CD4 ⁺ CD25-neg. keine akute GvHD (d49 milde Zeichen in Histologien), partiell IL-10 abhängig <i>in vivo</i> ; T _{reg} müssen vom Donor stammen	nicht untersucht	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen	Addition bei Transfer (aus Milz und Lymphknoten)	(Trenado <i>et al.</i> 2003)	Rezipient: BALB/cx3H F1 (H2 ^{dxk}) bzw. B6xDBA/2 F1 (H2 ^{bx^d}), BALB/c (H2 ^d) Donor: BALB/c (H2 ^d) bzw. C57BL/6 (H2 ^b)	verhindern GvHD-Induktion, verbesserte Immunrekonstitution	B6 → BALB/c: Tumor A20 (Mastozytm) in 4 von 5 Mäusen kontrolliert B6 → B6D2 F1: Tumor P815 keine Tu-Kontrolle	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen	Addition bei Transfer	(Hanash <i>et al.</i> 2005)	Rezipient: BALB/c (H2 ^d) Donor: C57BL/6 (H2 ^b), auch GFP-transgen	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen unterstützen Langzeit- <i>engraftment</i> ohne GvHD-Induktion	nicht untersucht	proliferative Immunantwort bei CD3- od. LPS-Stimulation, nicht gegenüber Donor- oder Rezipient in MLR; <i>third party</i> -Hauttransplantate (C3H, H2 ^k) abgestoßen
proliferationsbasierte Elimination alloreaktiver T-Zellen	CFSE-Markierung und Zellsortierung	(Godfrey <i>et al.</i> 2004)	humane PBMC Rezipient: B6.C-H2 ^{bm12} (H2 ^b) Donor: C57BL/6 (H2 ^b)	längere Überlebensrate bzw. fehlende Aplasie	nicht untersucht	proliferative Immunantwort <i>in vitro</i> gg. <i>Candida</i> -Antigene und CMV-Lysate (³ H-Thymidin-Inkorp.)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Paul Saftig für die Bereitstellung des Themas sowie die konstruktive und motivierende Betreuung bedanken.

Herrn Professor Thomas Bosch danke ich für die Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Großer Dank gilt auch Herrn Dr. Christian Beck. Seine ständige Diskussionsbereitschaft, sein immenser Erfahrungsschatz und sein unermüdlicher Einsatz, haben mir während der Durchführung der Arbeit wertvolle Hilfe geleistet. Auch für die stete Unterstützung in der Phase des Zusammenschreibens möchte ich mich herzlich bedanken.

Frau Sabine Gehrman und Frau Tina Steffen danke ich für die technische Unterstützung, Herrn Felix Schmidt für hilfreiche Computertipps und die nette „Bürogemeinschaft“. Ein Dankeschön geht auch an Herrn Dr. Sebastian Dietrich für zahlreiche, geduldig verbrachte Stunden am Zellsorter.

Bei allen Mitarbeitern der AG Saftig möchte ich mich für die überaus freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken, insbesondere bei der alltäglichen „Mittagsrunde“, die immer wieder für Aufmunterung gesorgt hat.

Mein Dank richtet sich auch an Herrn Dr. Christoph Schulte aus dem Institut für Pathologie des Uniklinikums für seine zahlreichen Stunden der Zellsortierung und die geduldige Einweisung in die Bedienung des Sortiergerätes.

Herrn Dr. Wolfram Klapper vom Institut für Pathologie des Uniklinikums danke ich für die Anfertigung und Färbung der histologischen Präparate.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie, die mich fortwährend und besonders in den letzten Monaten unterstützt hat.

Gefördert wurde diese Arbeit durch Drittmittel der Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung (DJCLS LR 01-07) an Herrn Dr. Christian Beck.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Annette Pachnio
Geburtsdatum/-ort	12.03.1975 in Kiel
Familienstand	ledig
Wohnort	Schauenburgerstraße 85 24118 Kiel

Schulbildung:

1981-1985	Besuch der Grundschule Strande
1985-1994	Besuch der Kieler Gelehrtenschule
1991-1992	Schüleraustausch in den USA
Juni 1994	Abitur
1994-1996	Berufsfindungsphase (Praktikum, Aushilfstätigkeit)

Hochschulbildung:

1996-2001	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität, Halle/Wittenberg
Juli 2001	Abschluss des Studiums mit Diplom Thema der Diplomarbeit: IL-17/IL-17-Rezeptor Komplex: Untersuchungen zur differentiellen Genexpression in IL-17-stimulierten Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten und zur Regulation der IL-17-Rezeptor-Expression
seit Januar 2002	Promotion am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität, Kiel