

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III  
Prof. Dr. Wolfgang Herr  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Auswirkungen einer GVHD auf das B-Zell-Kompartiment und die  
Bedeutung indirekter GVL-Effekte gegen B-Zell-Lymphome**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der

Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Martin Heidenreich

Jahr 2021



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III

Prof. Dr. Wolfgang Herr

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Auswirkungen einer GVHD auf das B-Zell-Kompartiment und die  
Bedeutung indirekter GVL-Effekte gegen B-Zell-Lymphome**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der

Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Martin Heidenreich

Jahr 2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Edinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2021

## Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
APC	Antigen-präsentierende Zelle (antigen-presenting cell)
ATG	Anti-Thymozyten-Immunglobuline
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor der TNF-Familie (B-cell-activating factor belonging to the TNF family)
BD	Becton Dickinson
BLI	Biolumineszenzmessung (bioluminescence imaging)
BSA	Bovines Serumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
CAR	CXCL12-hoch-exprimierende, retikuläre Zellen (CXCL12 abundant reticular cells)
CCD	Charge-coupled device
CCR7	C-C Motif Chemokine Receptor 7
CD	Cluster of differentiation
c-kit	Stammzellfaktor-Rezeptor; CD117
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CLP	Gemeinsame, lymphatische Progenitorzellen (common lymphoid progenitors)
CMP	Gemeinsame, myeloide Progenitorzellen (common myeloid progenitors)
CNS2	Konservierte, nicht kodierende Sequenz 2 (conserved noncoding sequence 2)
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4)
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Chemokin-Rezeptor 4
DAMP	Gewebeschädigungs-assoziierte molekulare Muster (damage-associated molecular patterns)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEREG (-Maus)	Depletion regulatorischer T-Zellen (depletion of regulatory T-cells)
DLBCL	Diffus großzelliges B-Non-Hodgkin-Lymphom (diffuse large B-cell lymphoma)
DLI	Infusion von Spender-Lymphozyten (donor lymphocyte infusion)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor

## Abkürzungsverzeichnis

EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (fluorescence-activated cell sorting)
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
Flt3	Fms like tyrosine kinase 3; CD135
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (granulocyte-colony stimulating factor)
GFP	Green fluorescent protein
GMP	Granulozytär-monozytäre Progenitorzellen (granulocyte-monocyte progenitor cells)
GVHD	Spender-gegen-Wirt-Krankheit (graft versus host disease)
GVL	Graft vs. Leukämie/Lymphom(-Effekt)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HLA	Humane Leukozyten-Antigene (human leukocyte antigen, HLA)
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (hematopoetic stem cell)
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (intercellular adhesion molecule 1)
IDO	Indolamin-2-3-Dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-7R	Interleukin-7 Rezeptor, CD127
KIR-Rezeptor	Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor (killer cell immunoglobuline-like receptor)
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
Lin <sup>-</sup>	Lineage-negative Fraktion
LS	large scale
LSA	Leukämie-spezifisches Antigen
LT-HSC	Inaktive, ruhende HSC (long-term HSC)
MACS	Magnetische Zellseparierung (magnetic cell separation)
MEP	Megakaryozytär-erythrozytäre Progenitorzellen (megakaryocyte-erythrocyte progenitor cells)

## Abkürzungsverzeichnis

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MiHAs	Minor-Histokompatibilitätsantigene (minor histocompatibility antigens)
MNZ	Mononukleäre Zellen
MPP	Multipotente Progenitor-Zellen (multipotent progenitors)
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
N.d.	Nicht detektierbar
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
pTreg	In der Peripherie entstandene Treg
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns)
Pax5	Paired Box 5
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
Ph	Photonen
RAG	Rekombinationsaktivierende Gene
ROI	Region of interest
Rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
Sca-1	Stammzellantigen-1 (stem cells antigen-1)
SCF	Stammzellefaktor (stem cell factor)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
SSC	Seitwärtsstreuung (side scatter)
ST-HSC	Aktivierte HSC (short-term HSC)
SZT	Stammzelltransplantation
tTreg	Thymus-stämmige Treg
TdT	Terminale Desoxynucleotidyltransferase
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
TZD	T-Zell-depletiert
TZR	T-Zell-Rezeptor
V(D)J	Variable- (variable, V), verbindende- (joining, J), Diversitäts- (diversity, D) Gen-Segmente

## Abkürzungsverzeichnis

VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
VLA-4	sehr spätes Antigen-4 (very late antigen-4)
Vs	Versus
WT	Wildtyp
YFP	Yellow fluorescent protein



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1	<i>Das adaptive Immunsystem</i> .....	7
1.1.1	Entwicklung lymphatischer Vorläuferzellen im Knochenmark .....	9
1.1.2	B-Zell-Reifung im Knochenmark und in sekundären lymphatischen Organen .....	12
1.2	<i>Allogene Stammzelltransplantation</i> .....	14
1.2.1	Pathophysiologie der GVHD .....	15
1.2.2	Prophylaxe und Therapie der GVHD .....	19
1.2.3	Treg und ihre Rolle in der GVHD .....	21
1.2.4	Störung der Immunrekonstitution durch die GVHD .....	23
1.2.5	GVL-Effekt .....	25
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
3.1	<i>Material</i> .....	30
3.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	30
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien .....	31
3.1.3	Geräte .....	32
3.1.4	Pufferlösungen .....	33
3.1.5	Zellmedien .....	33
3.1.6	Microbeads für die magnetische Zellseparation .....	33
3.1.7	Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse .....	34
3.1.8	Mausstämme .....	36
3.1.9	Zelllinien .....	36
3.2	<i>Methoden</i> .....	37
3.2.1	Durchflusszytometrie .....	37
3.2.1.1	Technische Grundlagen .....	37
3.2.1.2	Durchflusszytometrische Zellsortierung .....	38
3.2.1.3	Oberflächenfärbung für die durchflusszytometrische Untersuchung .....	38

---

3.2.1.4	Intrazelluläre Färbung von Foxp3 für die durchflusszytometrische Untersuchung .....	39
3.2.2	Zellisolierung.....	39
3.2.2.1	Präparation des Knochenmarks .....	39
3.2.2.2	Präparation der Milz .....	40
3.2.2.3	Vorbereitung von Blutproben zur durchflusszytometrischen Untersuchung .....	41
3.2.3	Zellzählung .....	41
3.2.4	Magnetische Zellseparation .....	42
3.2.4.1	T-Zell-Depletion des Knochenmarks .....	42
3.2.4.2	Anreicherung CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz .....	42
3.2.5	Allogene murine Knochenmarktransplantation .....	43
3.2.5.1	Konditionierung und Transplantation .....	43
3.2.5.2	MHC-differente Transplantation (C57BL/6 → BALB/c).....	43
3.2.5.3	Haploidente Transplantation mit Tumorzellgabe und GVHD-Induktion (BALB/c → CB6F1).....	44
3.2.5.4	Haploidente Transplantation mit Tumorzellgabe und DLI (BALB/c oder C57BL/6 → CB6F1).....	44
3.2.5.5	Klinischer GVHD-Score .....	44
3.2.6	A20-luc/yfp/neo und Bcl1-gfp/luc B-Zell-Lymphome .....	45
3.2.6.1	Auftauen kryokonservierter Tumorzellen .....	46
3.2.6.2	Ausgangsmaterial und Zellsortierung .....	46
3.2.6.3	A20-luc/yfp/neo Zellkultur .....	46
3.2.6.4	Bcl1-gfp/luc Zellpassage in vivo .....	47
3.2.6.5	Biolumineszenzmessung .....	47
3.2.7	Statistische Auswertung .....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
4.1	<i>GVHD-induzierte Blockierung der B-Zell-Lymphopoese im Knochenmark ....</i>	<i>50</i>
4.1.1	Analyse der lymphatischen Rekonstitution im peripheren Blut 22 Tage nach Transplantation .....	52
4.1.2	Untersuchung des Knochenmarks 28 Tage nach Transplantation .....	53

---

4.1.2.1	Analyse reifer B- und T-Zell-Populationen .....	54
4.1.2.2	Analyse hämatopoetischer Stammzellen und lymphatischer Progenitorzellen .....	57
4.2	<i>Auswirkungen einer in vivo Treg-Ablation auf B-Zellen und deren Vorläuferzellen im Knochenmark</i> .....	62
4.2.1	Untersuchung von B- und T-Zellen im peripheren Blut während der Treg-Ablation .....	63
4.2.2	Durchflusszytometrische Untersuchung der Milz .....	66
4.2.3	Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks .....	68
4.2.3.1	Analyse des reifen B- und T-Zell-Kompartiments .....	69
4.2.3.2	Untersuchung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen nach Treg-Ablation .....	71
4.3	<i>Untersuchung indirekter GVL-Effekte gegen B-Zell-Lymphome</i> .....	74
4.3.1	Haploidente Transplantation und zeitgleiche GVHD-Induktion .....	75
4.3.1.1	Erfassung des Tumorwachstums mittels BLI .....	76
4.3.1.2	Durchflusszytometrische Untersuchung: Knochenmark und Milz ....	79
4.3.1.3	A20-Modell: Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks .....	79
4.3.1.4	A20-Modell: Zelluläre Zusammensetzung der Milz .....	83
4.3.1.5	Bcl1-Modell: Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks .....	86
4.3.1.6	Bcl1-Modell: Zelluläre Zusammensetzung der Milz .....	89
4.3.2	Haploidente Transplantation und nachträgliche DLI .....	93
4.3.2.1	Beurteilung der des Therapieerfolges der DLI mittels BLI .....	95
4.3.2.2	Durchflusszytometrische Untersuchung: Knochenmark und Milz ....	98
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>101</b>
5.1	<i>Die akute GVHD blockiert die B-Zell-Lymphopoese vor der Stufe der CLP 2-Zellen im Knochenmark</i> .....	101
5.2	<i>Regulatorische T-Zellen schützen das supportive Knochenmarkstroma der B-Zell-Lymphopoese vor Effektor-T-Zellen</i> .....	105
5.3	<i>Indirekte GVL-Effekte können das Wachstum von B-Zell-Lymphomen verzögern</i> .....	112

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Danksagungen.....</b>	

# 1 Einleitung

## 1.1 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem basiert auf einer spezifischen Antigenerkennung durch die Rezeptoren von T- und B-Zellen (1). T-Zell-Rezeptoren (TZR) und B-Zell-Rezeptoren (BZR) besitzen mit über  $10^8$  bzw.  $10^{10}$  unterschiedlichen Spezifitäten ein außerordentlich großes Repertoire, um Antigene zu erkennen. Dieses beachtliche Repertoire wird durch zufällige Genumlagerungen mehrerer DNA-Segmente erreicht, die die Antigenbindungsstelle der Rezeptoren bilden. Der Umlagerungsprozess findet noch vor einem Antigenkontakt statt und spielt sich während der Entwicklung für T-Zellen im Thymus und für B-Zellen im Knochenmark (KM) ab (2,3). Insgesamt sind vier Gensegmente (V, D, J und C) an der Bildung der jeweiligen Rezeptoren beteiligt. Die somatische Rekombination dieser Gensegmente wird durch einen Komplex aus verschiedenen Enzymen, der V(D)J-Rekombinase, gesteuert. Die entsprechenden Proteine werden durch das Genpaar der rekombinationsaktivierenden Gene (RAG) 1 und 2 induziert. Durch Ungenauigkeiten beim Spleißen entsteht durch zufälliges Einfügen oder Entfernen von einzelnen Nucleotiden durch die lymphozytische terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) während der Rekombination zusätzlich eine junktionale Vielfalt (4). TZR sind ausschließlich Transmembranmoleküle und bestehen aus  $\alpha/\beta$ - oder  $\gamma/\delta$ - Heterodimeren, die zusammen mit CD3 und damit assoziierten Signalmolekülen einen Komplex bilden (5). Sie erkennen lineare Peptide mit einer Länge von ca. 9-30 Aminosäuren, welche hierfür innerhalb der peptidbindenden Furche von Haupthistokompatibilitätskomplexen (major histocompatibility complex, MHC) präsentiert werden müssen (MHC-Restriktion). MHC-Moleküle bzw. humane Leukozyten-Antigene (human leukocyte antigen, HLA) beim Menschen wurden erstmals im Rahmen von Gewebetransplantationsmodellen beschrieben. Sie vermitteln die Gewebeverträglichkeit (MHC bzw. HLA-Kompatibilität) zwischen Spender und Empfänger und sind daher maßgeblich an Abstoßungsreaktionen beteiligt. Ihr charakteristisches Merkmal ist ein ausgeprägter Polymorphismus. Eine T-Zelle

erkennt ein Peptid nur, wenn es von einer bestimmten allelischen Variante eines MHC präsentiert wird. Dabei unterscheidet man MHC-Klasse I- und Klasse II-Moleküle. MHC-Klasse I wird von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentiert intrazelluläre Proteine, die im Zytosol gebildet und über den Proteasomkomplex abgebaut werden. MHC Klasse II wird nur von antigen-präsentierenden Zellen (antigen-presenting cell, APC: dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen) exprimiert und präsentiert exogene Antigene, die über Endozytose aufgenommen und über Phagolysosomen prozessiert werden (6). Damit T-Zell-Vorläufer (Thymozyten) die Fähigkeit erhalten, einen Peptid-MHC-Komplex zu erkennen ohne gleichzeitig autoreaktiv zu sein, durchlaufen sie im Thymus eine positive und negative Selektion. Nach Bildung des TZR exprimieren die Zellen die Co-Rezeptoren CD4 und CD8. Doppelt positive ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ) Thymozyten interagieren mit MHC-Molekülen auf kortikalen, epithelialen Zellen. Durch diese positive Selektion werden vorprogrammierte Apoptosesignale beendet. Bis zu 95% aller Thymozyten erkennen bei diesem Schritt keinen MHC-Peptid-Komplex und gehen deshalb zugrunde. Je nachdem, ob die Selektion durch MHC I bzw. MHC II erfolgt, differenzieren sich die doppelt positiven Zellen zu einfach positiven  $CD8^+$  bzw.  $CD4^+$  T-Zellen. Im Thymusmark werden einfach positiven T-Zellen anschließend MHC-Moleküle von knochenmarksstämmigen dendritischen Zellen und Makrophagen präsentiert. Die Zellen, welche MHC-Moleküle mit hoher Affinität erkennen, werden negativ selektioniert und gehen in Apoptose. Durch diesen Vorgang werden selbst-tolerante und MHC-restringierte  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Zellen generiert (7). Auch in B-Zellen werden nach erfolgreicher Genumlagerung zunächst membrangebundene BZR in Form von Immunglobulin-M (IgM) bzw. IgD exprimiert. Immunglobuline sind bivalente Moleküle und bestehen aus einer schweren und leichten Kette, die jeweils aus einer konstanten und variablen Region aufgebaut sind. Die variablen Regionen bilden mithilfe von drei hypervariablen Regionen die Antigenbindungsstelle. Nach weiterer Differenzierung sezernieren B-Zellen Immunglobuline als lösliche Antikörper. Diese sind identisch aufgebaut mit Ausnahme der Transmembrandomäne, die den BZR normalerweise in der Zellmembran der Lymphozyten verankert (4).

Nach Bildung ihrer Antigenrezeptoren bezeichnet man T- und B-Zellen als naiv. Auf der Suche nach einem passenden Antigen zirkulieren sie durch sekundäre

lymphatische Organe wie Lymphknoten oder Milz. Diese bieten ein supportives Stroma und exprimieren lymphozyten-spezifische epitheliale Adhäsionsmoleküle wie z.B. das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) auf hoch-endothelialen Venolen, durch welche das „homing“ der Lymphozyten ermöglicht wird. APCs und Zytokine steuern hier die Reaktion der Lymphozyten auf ein Antigen und regulieren ihre Homöostase (8). Um eine T-Zelle zu aktivieren, ist neben der Antigenpräsentation über MHC-Moleküle zusätzlich eine Stimulation von Co-Rezeptoren auf APCs erforderlich. Ohne die Interaktion wichtiger Co-Rezeptoren wie CD80, CD86, CD40 mit ihren entsprechenden Liganden werden T-Zellen anerg oder gehen zugrunde (9). Nach erfolgreicher Aktivierung durchlaufen T-Zellen eine klonale Expansion und es entstehen langlebige Effektor- sowie Gedächtnis-T-Zellen, die sich vornehmlich in lymphatischen Organen aufhalten. CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen besitzen zytoplasmatische Granula mit Perforinen und Granzymen sowie Fas-Liganden, welche nach Aktivierung die Apoptose der Zielzelle induzieren. CD4<sup>+</sup> T-Zellen steuern die Immunantwort durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und B-Zellaktivierung. Anders als T-Zellen können B-Zellen ihre Antigene direkt in Form von Epitopen erkennen. Dabei lassen sich zwei verschiedene Arten der B-Zellaktivierung unterscheiden. Die T-Zell-unabhängige Aktivierung wird durch Antigene mit sich wiederholenden Epitopen, in erster Linie Polysaccharide, induziert. Diese binden an mehrere BZR gleichzeitig und stimulieren die Sezernierung von IgM. Die Bildung von Keimzentren und somit auch weitere Reifungsschritte sowie eine Gedächtnisfunktion bleiben bei dieser Art der Aktivierung aus. Für die T-Zell-abhängige Aktivierung wird das Antigen über den BZR internalisiert und über MHC II einer antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zelle präsentiert. Diese sezernieren wiederum B-Zell-stimulierende Zytokine und induzieren dadurch eine weitere B-Zellreifung innerhalb der Keimzentren der Lymphfollikel (10,11).

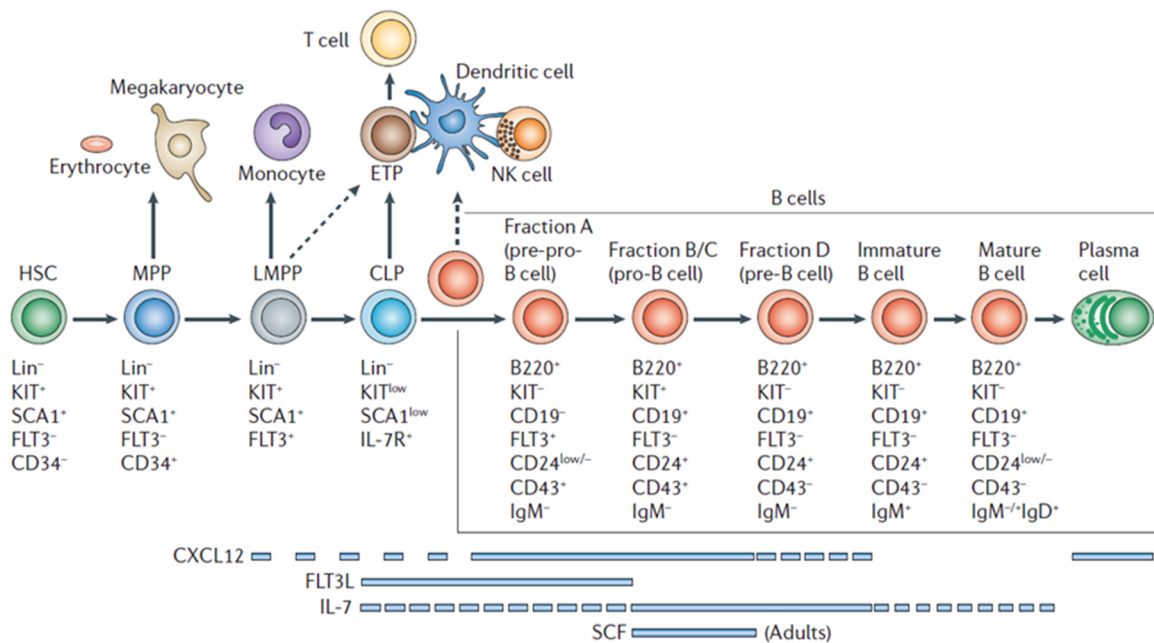
### **1.1.1 Entwicklung lymphatischer Vorläuferzellen im Knochenmark**

Im Knochenmark werden täglich über 100 Billionen reife Blutzellen gebildet. Neben den Zellen der Erythropoese, Megakaryopoese und Myelopoese sind darunter auch die Zellen des adaptiven Immunsystems (12). Bereits 1978 konnte Schofield zeigen, dass diese Zelllinien von hämatopoetischen Stammzellen (hematopoetic stem cells, HSC) abstammen. Außerdem gab es damals bereits erste Hinweise, dass

Knochenmarkstromazellen eine spezifische Nische für die Hämatopoese bilden (13,14). Dabei sind multipotente HSC in einer primär vaskulären Nische organisiert. Inaktive, ruhende HSC (long-term HSC, LT-HSC) befinden sich v.a. in der Nähe von Knochenmarkarteriolen. Hier sezernieren u.a. perivaskuläre, endotheliale Stromazellen lösliche Faktoren wie das CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12) und den Stammzellfaktor (stem cell factor, SCF) und regulieren damit die Stammzellhomöostase. Aktivierte HSCs (short-term HSC, ST-HSC) wandern in die Nähe der Sinusoide des Knochenmarks und werden dort zu Proliferation und Differenzierung in Vorläuferzellen angeregt. Es entwickeln sich heterogene, multipotente Progenitor-Zellen (multipotent progenitors, MPP), welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verlieren. Aus ihnen gehen die gemeinsamen myeloiden Progenitorzellen (common myeloid progenitors, CMP) und die gemeinsamen lymphatischen Progenitorzellen (common lymphoid progenitors, CLP) hervor. Aus CMP entwickeln sich zum einen megakaryozytär-erythrozytäre Progenitorzellen (megakaryocyte-erythrocyte progenitor cells, MEP) und zum anderen granulozytär-monozytäre Progenitorzellen (granulocyte-monocyte progenitor cells, GMP) (15,16).

T- und B-Zellen sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) entwickeln sich im KM aus der Population der CLP. Neben dem Interleukin-7 Rezeptor (IL-7R) (17) ist dabei auch die Expression der membrangebundenen Rezeptortyrosinkinase „fms like tyrosine kinase 3“ (Flt3) für die Linienzugehörigkeit der CLP notwendig. Außerdem können anhand der Flt3-Expression zwei verschiedene CLP-Populationen differenziert werden. Die IL-7R<sup>+</sup>, Flt3<sup>+</sup> Population (CLP 1) führt zu einer zuverlässigen Bildung von B-, T-, dendritischen und NK-Zellen, während die IL-7R<sup>+</sup>, Flt3<sup>-</sup> Population (CLP 2) lediglich noch B-Zell-Potential besitzt (18). Wie für HSC, sind auch für die Entwicklung lymphatischer und insbesondere der B-Zell-Vorläufer knochenmarkstämmige Stromazellen (retikuläre Stromazellen, Osteoblasten, endotheliale Zellen) und Überlebens- und Differenzierungsfaktoren wie CXCL12, Flt3-Ligand, IL-7 und SCF notwendig (**Abbildung 1.1**). Sie erschaffen eine B-Zell-spezifische KM-Nische (19).





**Abbildung 1.1 CLP entwickeln sich über verschiedene Entwicklungsstufen aus HSC und sind die ersten liniendeterminierten lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark.** KM-Stromazellen bilden eine linienspezifische Nische und exprimieren überlebenswichtige Faktoren (z.B. IL-7 oder CXCL12), welche die Differenzierung von CLP zu B-Zellen ermöglichen und steuern (19).

IL-7 ist das erste Zytokin für das gezeigt werden konnte, dass es B-Zell-Differenzierungspotential besitzt und essentiell für die Lymphopoese ist (20). Der IL-7R besteht aus der IL-7R  $\alpha$  und der Zytokin-Rezeptor- $\gamma$ -Kette, mit welcher die Januskinase 3 assoziiert ist (21,22). IL-7 sorgt v.a. auf Stufe der CLP für eine Aufrechterhaltung eines B-Zell-Differenzierungssignals durch Expression des frühen B-Zellfaktors (early B cell factor, EBF) (23) und wird dabei durch den Flt3-Ligand unterstützt (24). Die membranständige Isoform des SCF und die Interaktion mit seiner Rezeptortyrosinkinase c-kit spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle auf Stufe der CLP und unterstützt die Nische der Pro- und Prä-B-Zellen (25,26). B-Zell-Vorläufer sind in einem dreidimensionalen Netzwerk aus Zellfortsätzen retikulärer Stromazellen organisiert, welches ihnen eine Wanderung in Richtung der KM-Sinusoide während ihrer Entwicklung ermöglicht. Retikuläre Zellen und sinusoidal-epitheliale Zellen exprimieren hierzu Adhäsionsmoleküle wie das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1). Mithilfe des entsprechenden Liganden, dem  $\beta$ 1-Integrin „sehr spätes Antigen-4“ (very late antigen-4, VLA-4), können sich die Vorläuferzellen in ihren entsprechenden Nischen festhalten (27,28). Dabei präferiert die Population der CLP eine endostale Nische, während die Entwicklungsstufen ab der Pro-B-Zelle zu einer perivaskulären Nische wandern (29,30). CXCL12 wird von

---

perivaskulären Stromazellen, endothelialen Zellen und Osteoblasten sezerniert (31,32). Die Interaktion mit seinem CXC-Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4) bindet B-Zell-Vorläufer zusätzlich an ihre Nische (33) und ermöglicht ausdifferenzierten, langlebigen Plasmazellen ein „homing“ in das KM (34). Insbesondere Osteoblasten spielen eine zentrale Rolle für die gesamte Hämatopoese inklusive der B-Zell-Lymphopoese (35), da sie neben CXCL12 auch weitere entscheidende Faktoren wie IL-7 und VCAM-1 exprimieren (36). Eine Depletion von Osteoblasten *in vivo* verursacht daher schwere Schäden in der B-Zell-Lymphopoese (37). Die B-Zell-Entwicklung im KM wird durch ein Netzwerk verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert (38). Der Transkriptionsfaktor Ikaros supprimiert Schlüsselgene der Myelopoese (39) und induziert dafür die Gene *c-kit*- und *Flt3* (40), während PU.1 die  $\alpha$ -Kette des IL-7R aktiviert (41). Um eine vollständige B-Zell-Determinierung der lymphoiden Vorläuferzellen zu erreichen und aufrechtzuerhalten, ist das B-Zell-spezifische Aktivatorprotein „Paired Box 5“ (*Pax5*) notwendig (42). *Pax5* supprimiert die Expression linienfremder Proteine wie z.B. *Notch* (43) und induziert die Expression B-Zell-spezifischer Proteine wie CD19 und das Gerüstprotein „B cell linker Protein“ (*BLNK*) (44).

### **1.1.2 B-Zell-Reifung im Knochenmark und in sekundären lymphatischen Organen**

Die einzelnen Entwicklungsstadien der B-Zellen ausgehend von den CLP sind sowohl durch den Status ihrer Immunglobulin-Gen-Umlagerung als auch durch die Expression verschiedener Oberflächenmerkmale definiert (45,46). Zunächst entstehen aus CLP die Prä-Pro-B-Zellen. Die Möglichkeit zur Differenzierung in T- und B-Zellen bleibt in dieser Entwicklungsstufe noch erhalten. Erst auf der nachfolgenden Stufe der Pro-B-Zelle besteht eine vollständige B-Zell-Restriktion. Die beiden Zelltypen können durch die Expression der beiden B-Zell-assoziierten Oberflächenmoleküle B220 und CD19 unterschieden werden. Prä-Pro-B-Zellen exprimieren B220, aber noch kein CD19 (47). Das Stadium der Pro-B-Zelle beginnt mit der D-J-Umlagerung des Genlokus der schweren Kette. Anschließend kommt es zur V-DJ-Verknüpfung, wodurch die Zelle zur späten Pro-B-Zelle wird. In diesen Entwicklungsstufen sind RAG-1 und RAG-2 sowie die TdT aktiv (48). Nach einer erfolgreichen (produktiven) Umlagerung der schweren Kette wird diese zusammen mit einer sog. „surrogate light chain“ (Ersatz-leichte

Ketten) als Prä-BZR exprimiert. Die nun entstandene, große Prä-B-Zelle wird zur Proliferation angeregt. Ohne Expression des Prä-BZR erhält die Zelle kein Überlebenssignal und geht zugrunde (49,50). Die kleine prä-B-Zelle beendet die Proliferation und exprimiert erneut die RAG-Gene. Nach erfolgreicher Umlagerung der leichten Kette wird ein vollständiges IgM-Molekül an der Zelloberfläche exprimiert und die Zelle wird zur unreifen B-Zelle (51,52). Sie besitzt nach Assoziation der leichten und schweren Kette des IgM mit den Ketten Ig- $\alpha$  und Ig- $\beta$  einen funktionsfähigen BZR und wird nun das erste Mal einer Prüfung auf Autoreaktivität unterzogen (zentrale Toleranz). Die Bindung der BZR an einen multivalenten Liganden führt entweder zu einem Rezeptor-Editing und somit zu einer potentiellen „Rettung“ der Zelle oder zu einer klonalen Deletion. Weitere Toleranzmechanismen sind Anergie oder klonale Ignoranz (53,54).

Falls der BZR körpereigene Antigene nur schwach erkennt, setzt die unreife B-Zelle ihren Reifungsprozess fort und verlässt das Knochenmark über die Sinusoide. Anschließend gelangen die unreifen B-Zellen in den Blutkreislauf und werden als transitionale B-Zellen bezeichnet. Sie konkurrieren mit den bereits vorhandenen reifen B-Zellen um den Zugang zu den B-Zellfollikeln der Milz. Dabei werden langlebige, reife B-Zellen bevorzugt und ein Großteil der unreifen B-Zellen geht in der Peripherie zugrunde (55). Auch transitionale B-Zellen durchlaufen in der Milz eine Prüfung auf Autoreaktivität (periphere Toleranz). Falls der BZR durch ein körpereigenes, multivalentes Antigen stark aktiviert wird, stirbt die Zelle (56). Auch nach Aktivierung durch ein lösliches körpereigenes Molekül wird die B-Zelle anerg und stirbt wenige Tage später, da sie keinen Zugang zu den B-Zellfollikeln erhält (3). Nach Erkennung eines löslichen Antigens mit geringer Affinität wird eine klonale Ignoranz induziert und die Zelle kann sich weiterentwickeln (57). Nachdem die unreifen B-Zellen Zugang zu den B-Zellfollikeln der Milz erhalten haben, komplettieren sie dort ihre Reifung (58). Für die Reifung und das Überleben sind sowohl niedrigschwellige Signale des BZR, als auch die Expression des B-Zell-aktivierenden Faktors der TNF-Familie (B-cell-activating factor belonging to the TNF family, BAFF) notwendig. BAFF wird von dendritischen Follikelzellen exprimiert und fördert über Interaktion mit dem BAFF-Rezeptor auf transitionalen B-Zellen deren Überleben (59).

## 1.2 Allogene Stammzelltransplantation

Die allogene Stammzelltransplantation (SZT) ist eine etablierte Behandlungsmethode für maligne und nicht-maligne hämatologische Erkrankungen. Sie wird eingesetzt, wenn durch die Transplantation eine bessere Prognose als durch alternative Behandlungsoptionen erreicht wird. Dies bedeutet, dass für die Indikationsstellung nicht nur die Grunderkrankung, sondern auch patientenspezifische Faktoren wie Komorbiditäten und Alter sowie die Spenderkompatibilität eine wichtige Rolle spielen (60). Anders als eine konventionelle Chemotherapie verfolgt die allogene Transplantation zur Behandlung maligner Erkrankungen einen führend immunologischen Therapieansatz, welcher durch alloreaktive T-Zellen (graft versus Leukämie/Lymphom-Effekt; GVL-Effekt) vermittelt wird (61).

HSC werden aus dem Knochenmark, dem peripherem Blut oder aus Nabelschnurrestblut des Spenders gewonnen. Sie unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Quelle u.a. im Anwachsen (Engraftment) und in der transplantationsassoziierten Mortalität (62). Knochenmark des Spenders wird in Allgemeinanästhesie durch multiple Punktionen des hinteren Beckenkamms gewonnen. Nachdem das Knochenmark-Blut-Gemisch durch grobmaschige Filter von Rückständen befreit wurde, wird es direkt auf den Empfänger übertragen (63). Um HSC aus dem peripheren Blut des Spenders zu gewinnen, werden diese zunächst durch die Gabe von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) aus dem KM in das Blut mobilisiert und anschließend über Zytapherese über die Armvenen gesammelt. (64). Neben dem Verwandtschaftsgrad zwischen Spender und Empfänger, Geschlecht und Lebensalter, spielt in erster Linie die durch das HLA-System definierte Gewebeverträglichkeit für die Spenderauswahl eine entscheidende Rolle (65,66). HLA-identische Geschwisterspender sind weiterhin der Goldstandard. Für die Einstufung von verwandten oder unverwandten Spendern ist die hochauflösende, molekulare Typisierung von 10 transplantationsrelevanten HLA-Genorten (HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1-Allele) bei Spender und Empfänger entscheidend. Ein kompatibler Fremdspender liegt dann vor, wenn alle 10 HLA-Genorte übereinstimmen (10/10), vollständige Kompatibilität liegt bei 12/12 vor (HLA-DP eingeschlossen) (67). Falls Antigen- und Allel-Disparitäten in den transplantationsrelevanten HLA-Genorten

vorliegen, muss mit einer erhöhten Mortalität gerechnet werden (68). Steht kein HLA-identer Familien- oder Fremdspender zur Verfügung, wird bei Hochrisikoerkrankung zunehmend häufiger eine halb passende (haploidente) Transplantation durchgeführt (69).

Vor einer allogenen SZT erfolgt die Konditionierung des Empfängers. Ein Ziel dieser Behandlung ist es, durch Immunsuppression des Empfängers eine primäre Graft-Abstoßung zu verhindern. Außerdem wird zusätzlich ein anti-tumoröser Effekt vermittelt und durch die Myeloablation Raum für die transplantierten HSC im KM geschaffen (70). Eine myeloablative Konditionierung wird mit einer Kombination aus Alkylantien wie z.B. Cyclophosphamid oder Busulfan alleine oder zusammen mit einer Ganzkörperbestrahlung durchgeführt (71). Jedoch geht diese intensive Konditionierung mit einer hohen therapieassoziierten Toxizität einher, weshalb sie bei älteren oder vorerkrankten Patienten zu einer erhöhten therapieassoziierten Mortalität führt. Da die wesentliche, anti-leukämische Wirkung jedoch immunologisch durch den GVL-Effekt vermittelt wird und auch ohne vollständige Myeloablation ein Anwachsen der Stammzellen erreicht werden kann, finden zunehmend nicht-myeloablative und intensitätsreduzierte Konditionierungsregime Eingang in die klinische Praxis (72,73). Eine der entscheidenden akuten Komplikationen nach allogener SZT ist neben Infektionen mit Bakterien oder Pilzen, Virusreaktivierungen oder einem Rezidiv der Grunderkrankung v.a. die akute Spender-gegen-Wirt-Krankheit (graft versus host disease, GVHD) (74).

### **1.2.1 Pathophysiologie der GVHD**

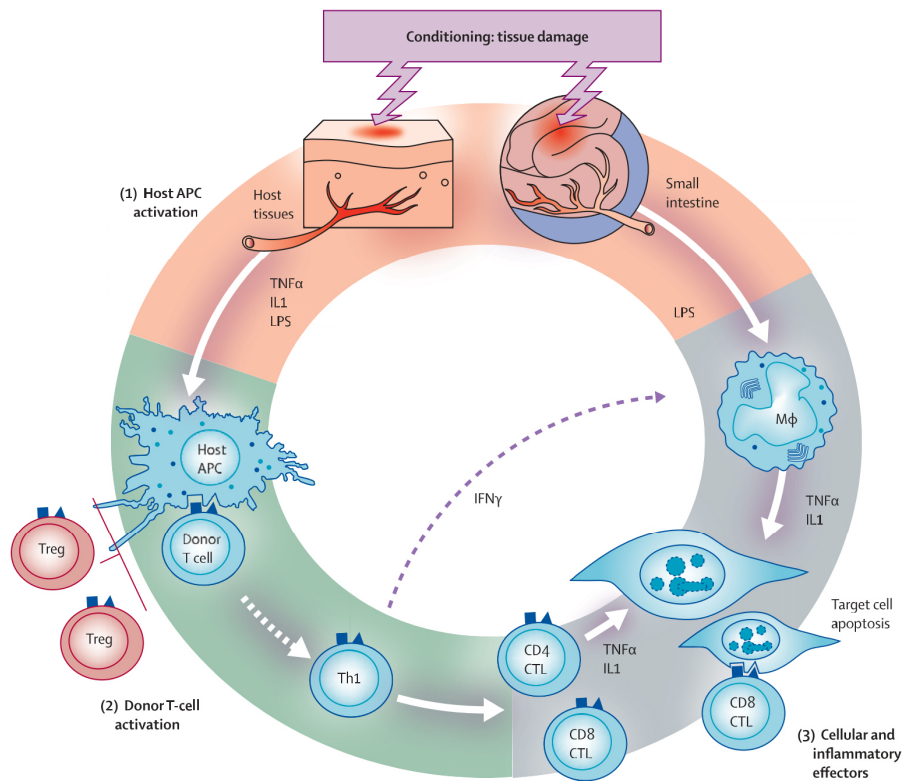
Die akute GVHD ist eine immunologisch bedingte, systemisch-inflammatorische Komplikation, welche nach dem Rezidiv der malignen Grunderkrankung die zweithäufigste Todesursache nach allogener SZT darstellt (75). Klinisch manifestiert sich die akute GVHD mit einem makulopapulösen Exanthem und Erythrodermie, Übelkeit, Erbrechen, wässrigen bzw. auch blutigen Diarrhoen begleitet von abdominalen Krämpfen sowie Ikterus durch den Anstieg von Bilirubin, der durch Cholestase in kleinen Gallengängen vermittelt wird (76). Die Diagnose fußt auf klinischen Parametern, Laborergebnissen und histologischen Untersuchungen bezüglich der Zielorgane Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber.

---

Der Gesamtschweregrad richtet sich nach dem Ausmaß der Schädigung der Zielorgane (Grad I-IV). Die kumulative Inzidenz einer mittel- bis sehr schweren (Grad II bis IV) akuten GVHD ist hoch und liegt bei 40-80% (77). Zusätzlich tritt bei ca. der Hälfte aller Patienten v.a. im ersten Jahr nach Transplantation (im Median nach 4 Monaten) eine chronische GVHD auf. Diese ist u.a. auf eine verzögerte Immunreaktion des Spenders gegen verschiedene Empfängergewebe aufgrund beeinträchtigter Toleranzmechanismen zurückzuführen (78). Die chronische GVHD kann multiple Organsysteme befallen und ähnelt klinisch einer Autoimmunerkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis, wie z.B. einer systemischen Sklerose oder einem Lupus erythematodes (79,80).

Billingham formulierte bereits 1966 die Voraussetzungen, die für die Entwicklung einer GVHD notwendig sind: Das Transplantat muss immunologisch kompetente Zellen enthalten, der Empfänger muss Gewebeantigene exprimieren, die beim Spender nicht vorhanden sind und der Empfänger ist aufgrund der Immunsuppression nicht in der Lage, die transplantierten Zellen zu zerstören (81). Verantwortlich für die Entwicklung einer GVHD sind immunkompetente, reife CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die bereits im Transplantat enthalten sind (82). Zwar vermitteln sie auch wichtige, positive Effekte, wie eine verbesserte T-Zell-Rekonstitution oder den GVL-Effekt (83), jedoch können sie auch eine überschießende Immunantwort gegen das für sie fremde Gewebe auslösen (GVHD) (84).

Dabei verläuft die akute GVHD typischerweise in drei Phasen (**Abbildung 1.2**). Zunächst werden die Organe des Empfängers durch die Konditionierung, die Grunderkrankung oder bereits bestehende Infektionen geschädigt. Dies führt zu einer Aktivierung potentiell alloreaktiver Spender-T-Zellen durch Empfänger-APCs und mündet zuletzt in einer inflammatorischen Effektorphase, in welcher die Apoptose der Zielgewebe des Empfängers induziert wird (85).



**Abbildung 1.2 Das Drei-Phasen-Modell der akuten GVHD nach Ferrara et al. (85).** Das Empfängergewebe wird durch die Konditionierung geschädigt. Dies bewirkt eine Aktivierung von Spender-T-Zellen durch APCs des Empfängers. In der anschließend Effektorphase werden die Zielgewebe der GVHD durch Spender-T-Zellen angegriffen und zerstört.

Der konditionierungsbedingte Epithelschaden führt insbesondere im Gastrointestinaltrakt zur Translokation bakterieller Antigene wie z.B. Lipopolysacchariden. Dadurch werden proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) durch Zellen des angeborenen Immunsystems (v.a. Makrophagen) ausgeschüttet (86). Die Erkennung von bakteriellen oder viralen, pathogen-assoziierten molekularen Mustern (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) erfolgt über verschiedene Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors), deren wichtigste Vertreter die membranständigen Toll-like-Rezeptoren und intrazytoplasmatische NOD-like-Rezeptoren sind (87). Im Rahmen der akuten GVHD wird durch die intestinale Inflammation oder vorbestehende Antibiotikatherapie eine Dysregulation des intestinalen Mikrobioms beobachtet. Dieser Verlust bakterieller Diversität, z.B. protektiver Clostridienstämme, verstärkt die Intensität der GVHD zusätzlich (88). Andererseits kann der protektive bakterielle Metabolit Butyrat als Histon-Deacetylase-Inhibitor die Indolamin-2-3-Dioxygenase (IDO) abhängigen

Funktionen des angeborenen Immunsystems und der allostimulierenden APCs hemmen und dadurch den Epithelschaden im Gastrointestinaltrakt und den Grad der Inflammation reduzieren (89). Neben PAMPs werden auch sterile Gefahrensignale, sog. DAMPs (damage-associated molecular patterns), aus dem geschädigten Gewebe freigesetzt. Zu DAMPs zählt man verschiedene Moleküle wie z.B. ATP, Harnsäure oder Interleukin-33 (90–92). Weiterhin induzieren proinflammatorische Interleukine eine gesteigerte Expression von Adhäsions- und HLA-Molekülen und verstärken somit die Fähigkeit der alloreaktiven T-Zellen zur Antigenerkennung (86).

Das pathophysiologische Schlüsselereignis der akuten GVHD ist die Aktivierung von Spender-T-Zellen durch APCs. Aktivierte APCs (vornehmlich dendritische Zellen) präsentieren die Antigene des Empfängers direkt, über Kreuzpräsentation oder nach Autophagie in der peptidbindenden Furche der HLA-Moleküle (93). Die Aktivierung der T-Zellen beruht vornehmlich auf der HLA-Differenz von Spender und Empfänger. Da nicht für jeden Empfänger ein voll kompatibler Spender zur Verfügung steht, ist die Suche nach einem permissiven „mismatch“ Ziel der aktuellen Forschung (94,95). Dass auch bei einer HLA-identer Geschwistertransplantation häufig eine akute GVHD auftritt, liegt an genetischen Differenzen in den Minor-Histokompatibilitätsantigenen (minor histocompatibility antigens, miHAs), welche außerhalb der HLA-Genorte kodiert werden (96). Die Immunantwort gegen Y-chromosomal kodierte Antigene führt beispielsweise in einer Konstellation weiblicher Spender - männlicher Empfänger zu einem erhöhten Risiko für eine GVHD (97). Auch Differenzen in autosomal kodierten miHAs, wie z.B. HA-8, führt zu einer erhöhten GVHD-Inzidenz. Differenzen in hämatopoetisch-restringierten miHAs erleichtern wiederum das Erkennen maligner und nicht-maligner hämatopoetischer Empfängerzellen und führen daher zu niedrigeren Rezidiv- und höheren Überlebensraten (98). APCs exprimieren die notwendigen Co-Rezeptoren, deren Interaktion mit dem entsprechenden Ligand (z.B. B7-CD28/CTLA4 oder CD40-CD40L) für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind (99). Als Antwort auf diese Stimulierung können alloreaktive T-Zellen proliferieren und schließlich Zielgewebe infiltrieren (Effektorphase) (100). Dabei spielt die Aktivierung verschiedener Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle (101,102). So wird beispielsweise unter dem Einfluss von CCR7 auf dendritischen Zellen in



mesenterialen Lymphknoten die Prägung eines Integrin-Musters induziert, welches das „homing“ der alloreaktiven T-Zellen in den Darm ermöglicht (103).

CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen sind die primären Effektor-Zellen der akuten GVHD, indem sie einen zielgerichteten Zelltod über Expression des Fas-Liganden oder Ausschüttung von Perforinen oder Granzymen induzieren (104). Alloreaktive T-Zellen im murinen Modell sind in erster Linie naive CD62L<sup>+</sup> bzw. CD44<sup>-</sup> T-Zellen. Dem gegenüber sind bereits ausdifferenzierte CD62L<sup>-</sup> oder CD44<sup>-</sup> Effektor- bzw. Effektor-Memory-T-Zellen schwächere GVHD-Induktoren (105). Auch NK-Zellen scheinen keine GVHD zu verursachen, sondern vermindern vielmehr das Risiko durch Elimination verbliebender APCs des Empfängers (106). Die Aktivierung der Effektor-Zellen wird von einem charakteristischen Zytokinsturm begleitet. Klassische Effektor-Zytokine sind TNF- $\alpha$ , Interleukin-1- $\beta$  und Interleukin-6. Durch sie wird die Aktivierung von APCs weiter verstärkt und die Differenzierung der naiven T-Zellen erleichtert (107). Außerdem wirken bestimmte Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  auch direkt zytotoxisch und induzieren u.a. Apoptose in Epithelzellen (108).

### 1.2.2 Prophylaxe und Therapie der GVHD

Ziel einer medikamentösen GVHD-Prophylaxe ist es, eine akute GVHD durch Suppression von alloreaktiven T-Zellen zu verhindern. In erster Linie werden dabei Calcineurininhibitoren wie Ciclosporin oder Tacrolimus eingesetzt, die sich in ihrem Wirkprinzip und unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie z.B. Nephrotoxizität und Hypertonie ähneln (109). Durch die Blockade der Phosphataseaktivität von Calcineurin wird der Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T cells) gehemmt und die Produktion von IL-2 in T-Zellen und somit ihre Proliferation und Aktivierung verhindert (110). Calcineurininhibitoren werden in der Regel mit anderen Immunsuppressiva wie z.B. Methotrexat kombiniert (111). Methotrexat ist ein Antimetabolit und hemmt als Folsäure-Antagonist reversibel die Dihydrofolat-Reduktase (112). Als gleichwertige Alternative kann Mycophenolat-Mofetil verabreicht werden, welches im Vergleich zu Methotrexat keine Mukositis hervorruft und zu einem rascheren Anwachsen der Stammzellen führt (113). Im Rahmen der haploidenten SZT wird hochdosiertes Cyclophosphamid als Ergänzung zu einer zweifachen Immunsuppression eingesetzt. Wenige Tage nach der Transplantation wird die

Infusion an zwei aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht und führt zu einer direkten, lytischen Depletion stark proliferierender alloreaktiver T-Zellen (114). Durch diese einfache *in vivo* Graft-Manipulation lassen sich ähnliche oder sogar niedrigere GVHD-Inzidenzen (v.a. für chronische GVHD) im Vergleich zu HLA-idente Transplantationen erreichen (115). Eine weitere Möglichkeit der Graft-Manipulation ist die direkte T-Zell-Depletion, z.B. Gabe von Anti-Thymozyten-Immunglobulinen (ATG). Zwar lässt sich dadurch das Auftreten einer GVHD reduzieren, jedoch besteht zeitgleich ein höheres Risiko für Transplantatversagen, EBV-assoziierte lymphoproliferative Neoplasien und Rezidive (116). Bei unverwandten Spendern oder Transplantationen mit erhöhtem GVHD-Risiko wird aktuell ATG regelhaft zur T-Zell-Depletion *in vivo* eingesetzt (117).

Trotz prophylaktischer Maßnahmen entwickeln viele Patienten nach wie vor eine akute GVHD. Corticosteroide besitzen potente anti-inflammatorische und lymphotoxische Eigenschaften und gelten als Goldstandard für die Primärtherapie einer akuten GVHD. Ein Ansprechen auf die Therapie lässt sich bei ca. 50% aller Patienten verzeichnen (118). Die Heilungschancen einer steroidrefraktären akuten GVHD sind mit einer Mortalität von bis zu 90% jedoch deutlich eingeschränkt (119). Bisher fußen alle Therapieoptionen für die Sekundärtherapie auf Phase-II-Studien oder retrospektiven Analysen (120). Eine Behandlungsoption stellen die T-Zell-depletierenden Antikörper ATG oder Alemtuzumab (monoklonaler Antikörper gegen CD52), dar (121,122). Eine TNF- $\alpha$ -Blockade durch Etanercept (löslicher TNF- $\alpha$  Rezeptor) oder Infliximab (chimärer monoklonaler Antikörper) ist v.a. für die Behandlung der Darm-GVHD geeignet (123,124). Die Anwendung der extrakorporalen Photophorese bietet im Vergleich zu den bereits genannten Therapiealternativen ein günstigeres Nebenwirkungs- und Interaktionsprofil. Mögliche immunsuppressive Mechanismen dieser Behandlung sind eine Modulation der APC-Aktivierung, Induktion regulatorischer T-Zellen und eine Modulation der Zytokinfreisetzung (125). Auch die Gabe mesenchymaler Stammzellen (MSC) von HLA-kompatiblen und haploidenten Spendern oder HLA-inkompatiblen Drittspendern kann für eine therapierefraktäre GVHD eine Behandlungsalternative darstellen (126,127). MSCs sind aufgrund fehlender Expression von HLA-DR und ko-stimulatorischer Moleküle kaum immunogen, verbessern das Anwachsen hämatopoetischer Stammzellen durch Interaktion mit ihrer KM-Nische und wirken immunmodulatorisch (128). Durch die die

Ausschüttung des transformierenden Wachstumsfaktors- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) oder der IDO werden CD4<sup>+</sup> T-Zell-Funktionen direkt gehemmt. Weiterhin fördern MSC die Produktion von IL-10 in plasmazytoiden dendritischen Zellen und induzieren somit indirekt die Bildung regulatorischer T-Zellen (129).

### 1.2.3 Treg und ihre Rolle in der GVHD

Ein zentraler Pathomechanismus der akuten und chronischen GVHD ist das Ungleichgewicht zwischen proinflammatorischen und regulatorischen Funktionen des Immunsystems (130). 1982 konnte die Arbeitsgruppe um Sakaguchi erstmalig beweisen, dass die immunologische Hämostase von verschiedenen Subpopulationen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufrechterhalten wird (131). CD25 (IL-2 Rezeptor) konstitutiv hoch exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind für die Steuerung der immunologischen Selbsttoleranz maßgeblich mit verantwortlich und können über das CD25-Expressionslevel von proinflammatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD 25 niedrig und nur transient exprimierend) prinzipiell unterschieden werden (132). Allerdings wird gerade in aktivierten T-Zellen die CD25 Expression hoch reguliert und macht daher ihre Abgrenzung nur mithilfe von CD25, z.B. während einer GVHD-assoziierten Inflammation, schwierig. Eine zuverlässige Unterscheidung dieser beiden T-Zell-Populationen gelang erst nach Entdeckung des Transkriptionsfaktors Foxp3, welcher zur Familie der Forkhead-Box-Proteine gehört (133). Foxp3 ist für die Entwicklung von Treg ebenso unentbehrlich wie für ihre immunsuppressiven Eigenschaften (134). Die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors wird offensichtlich, wenn durch Keimbahnmutationen im Foxp3-Gen keine funktionsfähigen Treg generiert werden können. Dies führt beim Menschen zu einem sehr schwer verlaufenden Autoimmunsyndrom, dem IPEX-Syndrom (Immudysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal), welches bereits im ersten Lebensjahr oft letal verläuft (135). Scurfy Mäuse, welche eine frame-shift Mutation im FoxP3-Gen aufweisen, entwickeln eine ähnlich schwere Erkrankung. Diese X-chromosomal rezessive Mausmutante zeigt eine überschießende Proliferation proinflammatorischer Zellen, welche multiple Organe infiltrieren und eine letal verlaufende Autoinflammation auslösen (136). Ein gleiches Krankheitsbild entsteht auch nach gezielter Depletion der Treg-Population in adulten Tieren (137).

Treg werden vornehmlich im Thymus als reife T-Zell-Subpopulation gebildet (tTreg, Thymus-stämmige Treg), können jedoch auch zu einem geringeren Anteil aus naiven T-Zellen in der Peripherie entstehen (pTreg, in der Peripherie entstandene Treg) (138). Der Stellenwert der pTreg ist noch nicht abschließend geklärt. Möglicherweise sind sie notwendig, um das immunologische Milieu des Gastrointestinaltrakts zu modulieren (139). Für die Selektion von Thymozyten für die tTreg-Population im Thymus ist, anders als für konventionelle CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die Erkennung von Selbst-Antigen/MHC-Komplexen durch autoreaktive TZR mit erhöhter Affinität notwendig (140). Daneben signalisiert eine CD28-Kostimulation den sich entwickelnden Thymozyten FoxP3 zu exprimieren (141).

Zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase supprimieren Treg Effektor-Lymphozyten v.a. verschiedene Subgruppen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (142,143), die den Selektionsmechanismen zur Prüfung auf Autoreaktivität im Thymus entgehen (144). Dazu stehen ihnen kontaktabhängige und kontaktunabhängige, immunsuppressive Funktionen zur Verfügung. An der kontaktabhängigen Suppression sind verschiedene inhibitorische Oberflächenmoleküle beteiligt (145). Das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4, CTLA-4) bindet und depletiert beispielsweise zell-extrinsisch die Liganden CD80 und CD86 auf APCs durch Trans-Endozytose und verhindert die Vermittlung eines ko-stimulatorischen Signals auf konventionellen T-Zellen (146). Das Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (lymphocyte activation gene-3, LAG-3) bindet MHC Klasse II auf unreifen, dendritischen Zellen und inhibiert damit ihre Reifung und immunstimulierenden Eigenschaften (147). Als kontaktunabhängiger Faktor spielt das immunmodulatorische IL-10 für die Kontrolle der Immunantwort auf intestinale Antigene eine wichtige Rolle (148). Gerade für die Suppression einer GVHD ist IL-10 daher von zentraler Bedeutung. So sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg von IL-10<sup>-/-</sup> Mäusen nicht in der Lage eine akute GVHD vollständig abzuschwächen (149). Die hohe Expression von CD25 ( $\alpha$ -Kette des hochaffinen IL-2 Rezeptors) erlaubt es Treg IL-2 effektiv aus der inflammatorischen Umgebung aufzunehmen. Dieser Zytokinentzug führt zu einer Apoptose von CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen (150). Durch die Freisetzung von Granzymen können Treg auch direkt die Apoptose von Effektor-T-Zellen induzieren (151). Außerdem exprimieren Treg die Ektoenzyme CD39/CD73, welche ATP zu Adenosin umwandeln.

Erhöhte Konzentrationen von Adenosin im entzündeten Gewebe inhibieren sowohl dendritische Zellen als auch Effektor-T-Zellen (152).

Dass Treg eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der GVHD einnehmen, konnte unsere Arbeitsgruppe bereits 2002 in einem murinen Transplantationsmodell (C57BL/6 → BALB/c) zeigen. Spender-Treg, die zum Zeitpunkt der Transplantation übertragen werden, können eine ansonsten letal verlaufende akute GVHD in BALB/c Empfängertieren verhindern (149). Auch wird dadurch die GVL-Aktivität von Effektor-T-Zellen nicht abgeschwächt. Dabei scheint gerade eine frühe Suppression der Expansion alloreaktiver Spender-T-Zellen eine akute GVHD zu limitieren (153). In neueren präklinischen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde allerdings nachgewiesen, dass auch eine bereits bestehende akute GVHD durch Treg effektiv behandelt werden kann. *In vitro* expandierte Spender Treg sind auch 11 Tage nach haploidenter Transplantation in der Lage Empfängertiere vor einer akuten GVHD zu retten, indem sie die Erholung der durch die GVHD geschädigten Organe und die Immunrekonstitution unterstützen (154).

Auch beim Menschen sind Spender-Treg entscheidend, um die Aktivität alloreaktiver T-Zellen zu regulieren (155). Da menschliche Treg aus dem peripheren Blut *in vitro* expandiert werden können und sie dabei ihre suppressiven Eigenschaften behalten, ist eine GVHD-Behandlung mit Treg auch beim Menschen ein vielversprechender Therapieansatz (156). Bisher wurden ein adoptiver Treg-Transfer nur in kleinen Patientengruppen, vornehmlich zur GVHD-Prophylaxe, untersucht. Teilweise konnte dadurch sogar ohne weitere Immunsuppression nach Transplantation eine akute GVHD effektiv verhindert werden. Wie in murinen Transplantationsmodellen schwächen auch humane Treg den GVL-Effekt nicht ab und verbessern die lymphatische Immunrekonstitution (157,158).

#### **1.2.4 Störung der Immunrekonstitution durch die GVHD**

Die verschiedenen Zellen des Immunsystems erholen sich nach allogener SZT unterschiedlich schnell. Insbesondere die kooperativen Funktionen des adaptiven Immunsystems können mehrere Jahre lang gestört sein (159). Im Anschluss an die Konditionierungstherapie wird zunächst eine allgemeine Knochenmarkaplasie beobachtet. Innerhalb von ca. zwei bis drei Wochen erfolgt die Rekonstitution der

Zellen des angeborenen Immunsystems. Infektiologische Komplikationen während der Aplasiephase sind daher in der Regel auf bakterielle Infektionen oder Pilzinfektionen zurückzuführen (160). Durch eine insuffiziente, zelluläre Immunantwort sind die Patienten in den folgenden drei Monaten zusätzlich durch virale Infektionen bzw. Virusreaktivierungen bedroht, bis sich schließlich das T-Zell-Kompartiment erholt (161). Diese T-Zell-Rekonstitution beruht anfänglich auf einer Expansion reifer Gedächtnis T-Zellen in der Peripherie (162), wohingegen die Rekonstitution naiver T-Zellen durch thymische Selektion erst nach einigen Monaten beginnt. Die Thymusfunktion wird dabei von seiner altersbedingten Involution und der direkten Toxizität durch die Konditionierung negativ beeinflusst. Dadurch steht anfangs nur ein eingeschränktes T-Zell-Repertoire zur Verfügung (163), wodurch sich das Risiko für Infektionen erhöht (164). Zusätzlich spielt die Interaktion von GVHD und Immunrekonstitution eine zentrale Rolle. Zum einen kompromittieren prophylaktisch oder therapeutisch verabreichte Immunsuppressiva die Funktion des Immunsystems (162). Zum anderen ist eine GVHD alleine bereits ausreichend, um die Immunrekonstitution der lymphatischen Zelllinien deutlich negativ zu beeinflussen (165,166). Es ist daher nicht verwunderlich, dass eine GVHD das Risiko für lebensbedrohliche Infektion zusätzlich erhöht (164). Eine entscheidende pathophysiologische Rolle spielt dabei eine GVHD-vermittelte direkte Alloreaktivität gegen lymphatische Gewebe, im Falle der T-Zellen gegen Thymusgewebe (Thymus-GVHD). Da das thymische Mikromilieu für eine qualitativ hochwertige T-Zell-Selektion notwendig ist, kann der Thymus nach Zerstörung dieser spezifischen Organarchitektur seiner Aufgabe (Entwicklung von T-Zellen mit hoher Diversität und Eliminierung autoreaktiver T-Zell-Klone) nicht mehr suffizient nachkommen (167). Dadurch ist neben der Immundefizienz auch die Entwicklung von Autoimmunsyndromen im Rahmen einer chronischen GVHD zu erklären (168). Zusätzlich wird durch eine Thymus-GVHD auch die Bildung von tTreg in Mitleidenschaft gezogen, wodurch die Suppression alloreaktiver T-Zellen zusätzlich erschwert wird (166).

Die Erholung des B-Zell-Kompartiments erfolgt wesentlich langsamer und kann unter Umständen mehrere Jahre in Anspruch nehmen. In den ersten Monaten entstehen aus lymphatischen Vorläuferzellen im KM zunächst transitionale B-Zellen, die im peripheren Blut erhöht nachzuweisen sind und sich anschließend in lymphatischen

Organen zu reiferen Formen differenzieren (169). Eine gestörte T-Zell-Rekonstitution kann die Erholung der B-Zellen zusätzlich verzögern, da für eine hochspezifische B-Zell-Aktivierung bzw. -Antwort auch die Interaktion mit T-Zellen notwendig ist (170). Durch Mangel an Gedächtnis B-Zellen, erniedrigte Immunglobulin-Spiegel und ein eingeschränktes BZR-Repertoire sind die betroffenen Patienten besonders anfällig für bekapselte Bakterien und Viren (171). Präklinische Experimente unserer und anderer Arbeitsgruppen sowie klinische Beobachtungen konnten zeigen, dass die GVHD der entscheidende Risikofaktor für eine gestörte B-Zell-Rekonstitution ist. Sowohl im Knochenmark als auch in peripheren lymphatischen Organen sind nach Auftreten einer GVHD kaum B-Zellen zu detektieren (172–175), weshalb eine Blockierung der B-Zell-Entwicklung bereits im KM zu vermuten ist. Ein Ziel dieser Dissertation ist es, diese Hypothese durch Analyse lymphatischer Vorläuferzellen im Knochenmark zu untersuchen.

### **1.2.5 GVL-Effekt**

T-Zellen und NK-Zellen des Spenders erkennen maligne Zellen des Empfängers als fremd und zerstören diese nach entsprechender Aktivierung. Dieser GVL-Effekt ist das entscheidende therapeutische Prinzip der allogenen SZT zur Behandlung maligner Erkrankungen (61). Spender-T-Zellen, die Antigene maligner Zellen erkennen können, sind vornehmlich naive T-Zellen (176) und müssen daher zunächst durch professionelle APCs aktiviert werden. In erster Linie vermitteln Empfänger-APCs anfangs einen starken GVL-Effekt über direkte Antigenpräsentation. Wenn die Tumorlast im weiteren Verlauf abnimmt, leisten auch zunehmend Spender-APCs durch indirekte Antigenpräsentation (Cross-Präsentation von Alloantigenen und Tumorantigenen) einen wichtigen Beitrag zum GVL-Effekt (177). Daneben können auch Leukämiezellen einen APC-Phänotyp entwickeln und damit direkt eine anti-leukämische T-Zell-Antwort auslösen (178). Neben der MHC-restringierten Antigenerkennung können T-Zellen auch MHC-unabhängige Antigene (miHAs, hämatopoetische restringierte miHAs und Leukämie-spezifische Antigene (LSAs)) auf malignen Zellen erkennen, weshalb auch bei HLA-identer Transplantation ein GVL-Effekt wirksam ist (179). MiHAs werden ubiquitär exprimiert und können sowohl einen GVL-Effekt als auch eine GVHD auslösen. Davon abzugrenzen sind gewebespezifische miHAs, die beispielsweise vorwiegend auf hämatopoetischen

Zellen exprimiert werden. Erkennen Spender-T-Zellen diese hämatopoetischen miHAs, können sie einen GVL-Effekt ohne das Auftreten einer GVHD induzieren (180). LSAs sind nicht-polymorphe, überexprimierte Selbstantigene oder Neoantigene wie z.B. die Proteinase-3 oder das Wilms-Tumor-Protein 1 (181). Nach ihrer Aktivierung nutzen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Effektor-T-Zellen zytolytische Mechanismen (Perforin/Granzym und Fas-Ligand), um maligne Zellen zu zerstören (182), wobei  $CD4^+$  T-Zellen vornehmlich als Helferzellen für zytotoxische Funktionen tätig sind (179).

Ob sich ein relevanter GVL-Effekt einstellt, hängt zu einem großen Teil von der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger ab. Je mehr Unterschiede in den transplantationsrelevanten HLA-Genorten vorliegen, umso stärker fällt der GVL-Effekt aus. Dies führt jedoch zeitgleich zu einer höheren Inzidenz einer schwer verlaufenden akuten GVHD, so dass weiterhin HLA-idente Spender bevorzugt werden. Besonders für Differenzen in HLA-C oder -DPB1 wurden niedrigere Rezidivraten festgestellt (183). Da sich GVL-Effekt und GVHD in Hinblick auf Antigenerkennung und Effektormechanismen sehr ähnlich sind, treten beide meist simultan auf (61). Dies erklärt auch, warum eine intensive GVHD-Therapie oder -Prophylaxe den GVL-Effekt abschwächen und sogar zu einem Rezidiv der malignen Grunderkrankung führen kann (184). Außerdem können maligne Zellen über negatives Feedback auf die T-Zell-Funktion, z.B. über CTLA4-Interaktion, oder die Induktion einer T-Zell-Erschöpfung den immunologischen Mechanismen des GVL-Effekts entgehen. Die Erschöpfung der T-Zellen wird durch eine chronische Antigenexposition ausgelöst, die eine dysfunktionale T-Zell-Antwort nach sich zieht (185). Durch die Gabe von Spenderlymphozyten (donor lymphocyte Infusion, DLI) kann diese T-Zell-Erschöpfung wieder aufgehoben und erneut ein GVL-Effekt induziert werden, z.B. indem übertragene  $CD4^+$  T-Zellen „schlafende“  $CD8^+$  T-Zellen mit anti-tumorösem Potential reaktivieren (186). Dieses therapeutische Prinzip findet als präemptive oder therapeutische DLI aktuell breite klinische Anwendung. Allerdings führt eine DLI häufig auch zu einer GVHD, weshalb verschiedene medikamentöse oder zelluläre Kombinationsverfahren (z.B. Kombination von Treg mit DLI) geprüft werden, die einen GVL-Effekt ohne GVHD ermöglichen (187).



---

NK-Zellen setzen, anders als T-Zellen, nicht die Erkennung eines Antigens im Kontext von MHC-Molekülen voraus. Sie erkennen vielmehr das Fehlen bestimmter Epitope von MHC Klasse I und können damit unterscheiden, ob eine Zelle gesund oder krank (z.B. maligne Zelle) ist („missing self“-Erkennung) (188). Unter physiologischen Bedingungen überwiegt eine hemmende Wirkung auf NK-Zellen, welche über inhibitorische Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (killer cell immunoglobuline-like receptors, KIR-Rezeptoren) vermittelt wird. Sind keine passenden MHC-Moleküle als Liganden vorhanden, wird diese Inhibition aufgehoben und die NK-Zellen werden aktiviert (189), wodurch eine Lyse der Zelle und Ausschüttung von Zytokinen verursacht wird (190). Auch für NK-Zellen fällt ihr Anteil am GVL-Effekt daher deutlicher aus, wenn HLA-Differenzen (bei Menschen v.a. für HLA-C) bestehen und die HLA Moleküle somit zu keinem KIR-Rezeptor passen (191). NK-Zellen erholen sich nach Transplantation deutlich schneller als das T-Zell-Kompartiment. Obwohl es sich hierbei anfangs überwiegend um eine CD56 hoch-exprimierende und gering zytotoxisch wirksame Population handelt, sind sie gerade für die Krankheitskontrolle in der Frühphase nach Transplantation entscheidend (192).

## 2 Zielsetzung

Die allogene SZT bietet für Patienten mit hämatologischen Erkrankungen oftmals die einzige kurative Therapieoption. Im Transplantat enthaltene, reife T-Zellen verbessern das Anwachsen der Stammzellen, schützen vor Infektionen und vermitteln den GVL-Effekt. Jedoch können alloreaktive Spender-T-Zellen auch eine GVHD gegen klassische Zielorgane des Empfängers (Haut, Leber und Darm) auslösen. Zudem wird durch eine GVHD die Rekonstitution des adaptiven Immunsystems, insbesondere des B-Zell-Kompartiments, negativ beeinflusst. Daher bleibt die GVHD weiterhin eine der entscheidenden Komplikationen, die zu einer hohen therapieassoziierten Morbidität und Mortalität führt. In tierexperimentellen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte in einem MHC-differenten (C57BL/6 → BALB/c) Transplantationsmodell zuverlässig gezeigt werden, dass die Anzahl reifer B-Zellen sowohl in der Peripherie als auch im KM bei Tieren mit GVHD sehr stark erniedrigt ist (175). Somit lässt sich eine Entwicklungsblockierung lymphatischer Vorläuferzellen bereits im KM vermuten. Ein Ziel dieser Dissertation ist es, diese Blockierung mittels durchflusszytometrischer Analyse der entsprechenden Progenitorzellen im KM zu untersuchen.

Weiterhin führt eine GVHD zu einem Verlust und einer teilweise ausbleibenden Regeneration von Treg-Zellen. Mit Hilfe von Spender-Treg kann die Schädigung lymphatischer Organe reduziert werden und es kommt zu einer verzögerten, aber schlussendlich kompletten B-Zell-Rekonstitution (154,175). Daher wird in einem murinen Modell untersucht, wie sich eine Treg-Ablation unter „steady state“ Bedingungen, d.h. ohne Transplantation, auf reife B-Zellen und deren Vorläuferzellen im KM auswirkt. Als Versuchstiere dienen transgene *Foxp3<sup>DTR</sup>* Mäuse, deren Treg durch die Koppelung des humanen DTR an den *Foxp3* Promotor nach Gabe von DT zielgerichtet depletiert werden können.

Der klassische GVL-Effekt beruht auf direkter Alloreaktivität gegen maligne Zellen, wobei GVL-Effekt und GVHD typischerweise simultan auftreten. Um zu untersuchen, ob für den GVL-Effekt gegen maligne B-Zellen auch indirekte, z.B. gegen das Tumorstroma gerichtete Mechanismen von Bedeutung sind, wurde ein haploidentes GVHD/GVL-Transplantationsmodell (C57BL/6 oder BALB/c → CB6F1) mit zwei verschiedenen B-Zell-Lymphomen aus BALB/c Mäusen (*A20-luc/yfp/neo* und

---

Bcl1-*gfp/luc*) etabliert. Direkte GVL-Effekte sind in diesem Transplantationsmodell nur in der Konstellation C57BL/6 → CB6F1 möglich. Hemmende Effekte auf das Tumorwachstum bei BALB/c → CB6F1 wären nur durch indirekte GVL-Effekte zu erklären. Das Wachstum der Tumorzellen kann dabei in Echtzeit im lebenden Tier beobachtet werden (mittels *in vivo* Biolumineszenzbildgebung, BLI). KM und Milz der Tiere werden am Versuchsende durchflusszytometrisch analysiert.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
5 ml FACS-Röhrchen steril oder unsteril	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ USA
96-well-Rundbodenplatten	Corning/Costar, NY, USA
Mikroreaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kanülen (0,4 und 0,9 mm)	BD Heidelberg, Deutschland
Kombitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	Corning, NY, USA
MACS-Separation Säulen (LS, LD)	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
MACS-Separation Siebe	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Petrischalen (100 x 15 mm)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning/Costar, NY, USA
Spritzen (1ml, 10 ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Costar, Cambridge, USA
Zellsiebe (70 µm)	Falcon/BD, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA

### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol (Lösung, 50 $\mu$ M)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Sternheim, Deutschland
DAPI (Lösung, 1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Sternheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA-Dinatriumsalz (0,1 mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FACSClean	BD Heidelberg, Deutschland
FACSflow	BD Heidelberg, Deutschland
FACSRinse	BD Heidelberg, Deutschland
Fixierungs- und Permeabilisierungskit	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
HEPES-Puffer (1M)	PAN, Aidenbach, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin (Lösung, 200 mM)	PAA, Pasching, Österreich
D-Luciferin Firefly	Biosynth AG, Staad, Schweiz
Diphtherietoxin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isofluran	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
MEM Nicht-essentielle Aminosäuren	PAN, Aidenbach, Deutschland
Natrium-Pyruvat (100 mM)	PAN, Aidenbach, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Pasching, Österreich

Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Permeabilisierungspuffer (10x)	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)	Lonza, Verviers, Belgien
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Türk'sche Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.3 Geräte

Produkt	Hersteller
BD FACSAria™ (Zellsorter)	BD, Heidelberg, Deutschland
BD LSR II™ Durchflusszytometer	BD, Heidelberg, Deutschland
CO2-Inkubatoren	Heraeus, Hanau, Deutschland
Gefrierschränke (-20, -80°C) Privileg	Bosch, Stuttgart, Deutschland
IVIS™ 50 bioluminescence imaging system (Xenogen)	Caliper Life Sciences, Inc., Hopkinton, Massachusetts, USA
Linearbeschleuniger Primus 2	Siemens, München, Deutschland
MACS™ Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
MidiMACS™ Separator (Magnet)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mikroskop	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen Deutschland
Sterilbank SH18, KS15	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage L1200S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge)	Heraeus, Hanau, Deutschland

### 3.1.4 Pufferlösungen

<b>ACK-Puffer (6x):</b>	0,155 M NH <sub>4</sub> CL; 0,1 M KHCO <sub>3</sub> ; 0,1 mM EDTA-Dinatriumsalz; pH 7,3, ad 500 ml aqua bidest, 0,2 µm sterilfiltriert. 1 x Gebrauchslösung wird durch Verdünnung mit aqua dest. hergestellt
<b>FACS-Puffer:</b>	PBS; 2 % FCS
<b>MACS-Puffer (entgast):</b>	PBS; 2 mM EDTA; 1 % FCS

### 3.1.5 Zellmedien

<b>Ausgangsmedium:</b>	RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)
<b>5 % RPMI-Medium:</b>	RPMI 1640 Medium; 5 % FCS; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin
<b>10 % RPMI-Medium:</b>	RPMI 1640 Medium; 10 % FCS; 100 U/ml; Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin
<b>Standard Kulturmedium:</b>	RPMI 1640 Medium; 2 mM L-Glutamin; 50 µM 2-Mercaptoethanol; 1 mM Natrium-Pyruvate; 1 % MEM Nicht-essentielle Aminosäuren; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 10 % FCS; 10 mM HEPES-Puffer

### 3.1.6 Microbeads für die magnetische Zellseparation

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
CD4 (L3T4) Microbeads, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD90.2 (Thy1.2) Microbeads, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

### 3.1.7 Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
Biotin (bio)*	IgG1	Bio3-18E7	Maus	APC	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD4	IgG2a	RM4-5	Ratte (DA)	FITC, Pacific Blue	BD, Heidelberg, Deutschland
CD8	IgG2a	53-6.7	Ratte (LOU)	PerCP, APC	BD, Heidelberg, Deutschland
CD11b	IgG2b	M1/70	Ratte (DA)	FITC, PE-Cy7, PE	BD, Heidelberg, Deutschland
CD16/CD32	IgG2a	93	Ratte	unmarkiert	BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland
CD19	IgG2a	1D3	Ratte (Lew)	FITC, PE-Cy7	BD, Heidelberg, Deutschland
CD19	IgG2a	6D5	Ratte	PE	BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland
CD25	IgG1	PC61	Ratte (OFA)	PE, APC, PE-Cy7	BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland
CD117 (c-kit)	IgG2b	2B8	Ratte (WI)	PE-Cy7	BD, Heidelberg, Deutschland
CD127/IL7-R	IgG2a	A7R34	Ratte	FITC	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
CD135 (Flt3)	IgG2a	A2F10	Ratte	PE	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland



FoxP3	IgG2a	FJK-16s	Ratte	PE, FITC	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
Gr1	IgG2b	RB6-8C5	Ratte	APC	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
H-2k <sup>b</sup>	IgG2a	AF6-88.5	Maus (BALB/c)	FITC, PE, APC (bio)*	BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland
H-2k <sup>d</sup>	IgG2a	SF1-1.1	Maus (SJL)	APC (bio)*	BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland
Ly-6A/E (Sca-1)	IgG2a	D7	Ratte	Pacific Blue	BioLegend/Biozol, Eching, Deutschland
TCR $\beta$	IgG2b	H57-597	Hamster	PE, APC	BD, Heidelberg, Deutschland
Lineage Cell Detection Cocktail, Maus: bestehend aus biotinylierten Antikörpern* gegen CD5, CD11b, CD45R, 7-4, Gr-1 (Ly6G/C) und Ter-119				APC (bio)*	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
*die entsprechenden Antikörper tragen Biotin. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt mit einem Sekundär-Antikörper gegen Biotin (anti-Biotin-APC).					

### 3.1.8 Mausstämme

Mausstamm	Herkunft
BALB/c	Charles River, Sulzbach, Deutschland
C57BL/6	Charles River, Sulzbach, Deutschland
CB6F1	Charles River, Sulzbach, Deutschland
Foxp3-DTR/EGFP-C57BL/6 (FoxP3 <sup>DTR</sup> )	Zur Verfügung gestellt von A. Rudensky; Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York (193). Eigenzucht an der Universitätsklinik Regensburg

### 3.1.9 Zelllinien

Murine Zelllinie	Eigenschaft	Herkunft
A20- <i>luc/yfp/neo</i>	B-Zell-Lymphom aus BALB/c Mäusen, retrovirale Transduktion mit MND- <i>luc/yfp/neo</i> -Plasmid. Zellpassage <i>in vitro</i> .	M. Edinger; Division of Bone Marrow Transplantation, Department of Medicine and Department of Pediatrics; Stanford University School of Medicine; Stanford, CA (194)
Bcl1- <i>gfp/luc</i>	B-Zell-Lymphom aus BALB/c Mäusen, retrovirale Transduktion mit <i>pGC-gfp/luc</i> -Plasmid. Zellpassage <i>in vivo</i> .	M. Edinger; Division of Bone Marrow Transplantation, Department of Medicine and Department of Pediatrics; Stanford University School of Medicine; Stanford, CA (194)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Durchflusszytometrie

#### 3.2.1.1 Technische Grundlagen

Mithilfe der Durchflusszytometrie können Zellen auf ihre Größe, Granularität und Expression von membranständigen und intrazellulären Markern hin untersucht werden. Nach Färbung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (vgl. 3.2.1.3) werden diese zunächst durch Überdruck aus einem FACS-Röhrchen in eine Messzelle überführt. Dort gelangen die Zellen in eine konisch zulaufende Messküvette und werden durch den laminaren Strom der Hüllflüssigkeit beschleunigt (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung). Dadurch wird eine Einzelzellsuspension erreicht, die anschließend perlschnurartig im rechten Winkel am Messbereich (gemeinsamer Fokus des Flüssigkeitsstroms und des Lasers) vorbeigeführt wird. Für die Messungen wird ein LSR II™ Durchflusszytometer von Becton Dickinson (BD) verwendet, welches mit vier luftgekühlten Lasern unterschiedlicher Anregungswellenlängen ausgestattet ist (409 nm, 488 nm, 633 nm und UV Laser). Wenn die fluoreszenzmarkierten Zellen den Laser passieren, werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes angeregt und auf ein höheres Energieniveau angehoben (Exzitation). Bei anschließendem Rückfall auf ein niedrigeres Niveau werden Photonen erzeugt, in diesem Fall ein abstrahlendes langwelliges Fluoreszenzlicht eines Farbstoffes (Emission). Die Helligkeit der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge gebundener Antikörper. Gleichzeitig wird auch die Lichtbeugung und -streuung erfasst. Zum einen wird die Beugung des Lichts im flachen Winkel als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) detektiert, welches ein Maß für das Volumen der Zelle ist, zum anderen zeigt das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) die Brechung des Lichts im rechten Winkel und somit die Granularität der Zelle an.

Die Lichtsignale werden von Photomultipliern detektiert und für jede einzelne Zelle durch die BD FACS DIVA™ Software digital gespeichert. Durch Verwendung von insgesamt 7 verschiedenen Farbstoffen mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren (APC, DAPI, FITC, PacificBlue, PE, PerCP, und PE-Cy7) können mehrere Oberflächenmerkmale gleichzeitig untersucht werden. Da sich bei Mehrfarbaufnahmen die Fluoreszenzspektren der einzelnen Farbstoffe teilweise

überlagern, wird eine Kompensation mit fluoreszenzmarkierten Partikeln durchgeführt, um die spektrale Überlappung zu korrigieren. Die Eigenfluoreszenz der Zellen wird durch Messung von ungefärbten Zellen berücksichtigt. Die gemessenen Zellcharakteristika werden als Dot- und Density-Plots oder als Konturdiagramme dargestellt und mit der Analysesoftware FlowJo™ (Tree Star Inc., Ashland) ausgewertet.

### **3.2.1.2 Durchflusszytometrische Zellsortierung**

Ein erweitertes Anwendungsgebiet der analytischen Durchflusszytometrie ist die fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting, FACS). Ziel dieser Methode ist es, eine spezifische Zellpopulation für *in vivo* oder *in vitro* Versuche aus einem heterogenen Zellisolat zu gewinnen und hochspezifisch aufzureinigen. Für das FACS wird der FACSria™ Zellsorter von BD verwendet. Die fluoreszenzmarkierten Zellen passieren die Messpunkte der Laserstrahlen und die entsprechenden Parameter werden erfasst (FSC, SSC und Fluoreszenz). Nach der Messung wird der elektrisch leitfähige Flüssigkeitsstrom durch piezoelektrische Modulation stabilisiert und in kleinste Tröpfchen zerlegt, die jeweils eine Zelle enthalten. Das Tröpfchen, das die Zelle mit den gewünschten Eigenschaften beinhaltet, erhält kurz vor dem Abrisspunkt eine elektrische Ladung und wird in einem von zwei Metallplatten erzeugten elektromagnetischen Feld abgelenkt und in einem FACS-Röhrchen aufgefangen. Die Geschwindigkeit der Zellsortierung beträgt maximal 20.000 Ereignisse/sec.

### **3.2.1.3 Oberflächenfärbung für die durchflusszytometrische Untersuchung**

Um die zu untersuchenden Zellen für die Durchflusszytometrie zu markieren, werden zunächst Aliquots entsprechend  $1 \times 10^6$  Zellen (bei Verwendung eines Lineage-cocktails:  $2 \times 10^6$  Zellen) in mit FACS-Puffer gefüllte 5 ml FACS-Röhrchen gegeben und 6 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer unter vorsichtigem Vortexen resuspendiert. Um unspezifische Bindungen von Färbeantikörpern zu verhindern, werden die Zellen zusammen mit anti-mouse CD16/CD32 (1 µl /  $1 \times 10^6$  Zellen / 50 µl FACS-Puffer) für 6 min bei 4 °C vorinkubiert. Anschließend werden die entsprechenden Maus-Antikörper

in weiteren 50 µl FACS-Puffer hinzugegeben und die Zellen für 20 min bei 4°C inkubiert. Die jeweils optimale Antikörpermenge wurde vorab durch Titrationsreihen ermittelt. Nach der Färbung werden die FACS-Röhrchen mit 4 ml FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert und die Zellen zuletzt in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Direkt vor der Messung im Durchflusszytometer werden die Zellen mit DAPI (1 ng/ml) versetzt und gevortext. DAPI überwindet rasch die durchlässige Zellmembran von toten Zellen, bindet an die DNA und bietet somit die Möglichkeit für eine zuverlässige Lebend-Tot-Diskriminierung.

#### ***3.2.1.4 Intrazelluläre Färbung von Foxp3 für die durchflusszytometrische Untersuchung***

Vor der intrazellulären Färbung werden die gewünschten Oberflächenfärbungen durchgeführt (vgl. 3.2.1.1). Danach werden Aliquots von  $1 \times 10^6$  Zellen in kaltem FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 5 min). Die Resuspension erfolgt unter tröpfchenweiser Zugabe von 1 ml Fixierungs- und Permeabilisierungslösung auf dem Vortexer. Anschließend werden die Zellen bei 4°C für 30 min im Dunklen inkubiert und mit je 2 ml Permeabilisationspuffer gewaschen. Nach Zugabe des Foxp3-Antikörpers (1 µg /  $1 \times 10^6$  Zellen) in 100 µl Permeabilisationspuffer erfolgt eine weitere Inkubation bei 4°C für 30 min im Dunklen. Nun werden die Zellen erneut zweimal mit je 2 ml Permeabilisationspuffer gewaschen und abschließend in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen.

### **3.2.2 Zellisolierung**

#### ***3.2.2.1 Präparation des Knochenmarks***

Die tierschutzgemäße Tötung der Mäuse erfolgt durch zervikale Dislokation. Nach oberflächlicher Desinfektion mit 70 % Ethanol werden die Hinterläufe (Femur und Tibia) im Tierstall freipräpariert, im geschlossenen Zustand entnommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 5 % RPMI Medium überführt. Im weiteren Verlauf wird stets auf eine ausreichende Kühlung der Zellen geachtet, indem die entsprechenden Gefäße auf Eis gelegt werden. Unter der Sterilbank werden die Knochen zunächst in einer Petrischale von restlichem Gewebe befreit und proximal sowie distal mit einer feinen Schere eröffnet. Mit einer 0,4 mm Kanüle wird anschließend das Knochenmark

mit 5 % RPMI Medium herausgespült. Mit einer 5 ml Pipette wird durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einer Petrischale eine homogene Zellsuspension erzeugt. Diese wird über einen 70 µm Filter in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Petrischale wird zweimal mit je 10 ml 5 % RPMI-Medium nachgespült, welche ebenfalls über den Filter dem 50 ml Falcon-Röhrchen zugeführt werden. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm und 4°C. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet wird mit 2 ml 5 % RPMI Medium resuspendiert. Zur Lyse der Erythrozyten werden 3 ml ACK-Lösung zugefügt und die Zellsuspension wird für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das Röhrchen mit 10 % RPMI Medium auf 50 ml aufgefüllt und es erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 4°C, 10 min). Nun werden die Zellen mit 2 ml 10 % RPMI Medium resuspendiert und über einen 70 µm Filter in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert, welches mit 10 % RPMI Medium aufgefüllt wird. Nach der letzten Zentrifugation (1200 rpm, 4°C, 10 min) werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Nach Verdünnung mit Türk'scher Lösung erfolgt die Bestimmung der Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer.

### **3.2.2.2 Präparation der Milz**

Analog zur KM-Entnahme wird auf eine konsequente Kühlung geachtet, weshalb die Milzen nach der Entnahme im Tierstall zunächst in eisgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen mit 5 % RPMI Medium überführt werden. Anschließend werden diese unter einer Sterilbank zusammen mit 7 ml 5 % RPMI Medium in vorgekühlte Petrischalen gelegt, von restlichem Bindegewebe befreit und mit einer gebogenen Pinzette ausgestrichen. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml Pipette wird eine Zellvereinzellung erreicht. Die Zellsuspension wird nun über einen 70 µm Filter in ein 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Die Petrischalen werden zweimal mit je 10 ml 5 % RPMI Medium gespült, welche ebenfalls über den Filter in das Falcon-Röhrchen gegeben werden. Nach Auffüllen der Röhrchen auf 50 ml mit 5 % RPMI Medium erfolgt eine Zentrifugation (1200 rpm, 4°C, 10 min). Die Resuspension wird mit 2 ml 5 % RPMI Medium durchgeführt. Zur Erythrozytenlyse werden 3 ml ACK-Lösung hinzugegeben und die Zellen bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion und Waschen der Zellen wird das Röhrchen auf 50 ml mit 10 % RPMI

Medium aufgefüllt und zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet mit 2 ml 10 % RPMI Medium resuspendiert, erneut über einen 70 µm Filter in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und mit 10 % RPMI Medium aufgefüllt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgt nach Zugabe von Türk'scher Lösung in einer Neubauer Zählkammer.

### **3.2.2.3 Vorbereitung von Blutproben zur durchflusszytometrischen Untersuchung**

Die Blutentnahme erfolgt aus der lateralen Schwanzvene. Dazu wird das Blut in einem 5 ml FACS Röhrchen mit 10 µl Heparin / 4 ml PBS aufgefangen. Nach einer Zentrifugation (1200 rpm, 4°C, 6 min) werden die Zellen in 1 ml ACK Lösung auf dem Vortexer resuspendiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend werden die Röhrchen mit PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 6 min). Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Resuspension in 50 µl FACS-Puffer und die entsprechende Oberflächenfärbung für die durchflusszytometrische Untersuchung.

### **3.2.3 Zellzählung**

Um die Zellzahlen zu ermitteln wird eine Neubauer Zählkammer eingesetzt. Durch Zugabe von 0,4 % Trypanblaulösung bzw. von Türk'scher Lösung kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden, da das Anion von Trypanblau defekte Zellmembranen überwinden kann und nach Anlagerung an intrazelluläre Proteine die Zelle tiefblau färbt. Die Zellsuspension wird in die Zählkammer pipettiert und bei 10-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch untersucht. Die Zellzahl wird anschließend mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 (\text{Kammerfaktor}) = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

Wenn die Zellsuspension Erythrozyten enthalten kann, wird die Türk'sche Lösung eingesetzt. Die darin enthaltene Essigsäure bewirkt eine Hämolyse, während der Farbstoff die toten Leukozyten anfärbt.

### 3.2.4 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation (magnetic cell separation, MACS) ermöglicht eine Depletion bzw. Anreicherung entsprechend markierter Zellen in einem magnetischen Feld für die weitere Anwendung *in vivo* Experimenten. Die Matrix der verwendeten „large scale“ (LS) Säulen besteht aus ferromagnetischen Kugeln. Nach Einbringen der Säulen in das Magnetfeld des MidiMACS™ Separators, verstärken die Kugeln das Magnetfeld um das Zehntausendfache. Da der Raum zwischen den Kugeln größer ist als die verwendeten Zellen, können unmarkierte Zellen die Matrix der Säule ungehindert passieren. Die magnetisch markierten Zellen verbleiben als Suspension ohne direkte Bindung an die Matrix in der Säule und können anschließend zellschonend und steril von der Säule eluiert werden.

#### 3.2.4.1 T-Zell-Depletion des Knochenmarks

Neben Gesamt-KM kommt bei einigen Experimenten auch T-Zell-depletiertes (TZD) KM zum Einsatz. Nach Gewinnung des KM-Zellisolats (vgl. 3.2.2.1) wird zunächst ein Fc-Block durchgeführt (1 µl anti-CD16/CD32 /  $1 \times 10^7$  Zellen / 90 µl FACS-Puffer) und die Zellen für 5 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend werden anti-CD90.2 „MACS microbeads“ (10 µl Beads /  $1 \times 10^7$  Zellen / 90 µl FACS-Puffer) hinzugefügt und die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert. Die magnetisch markierten Zellen werden nun mit MACS-Puffer (steril und entgast) aufgefüllt, filtriert (70 µm Filter) und zentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 10 min). In der Zwischenzeit wird die LS MACS-Säule mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert und das Eluat verworfen. Das Zellpellet wird möglichst luftblasenfrei in MACS-Puffer aufgenommen (maximal  $1 \times 10^8$  Zellen / 500 µl MACS-Puffer) und auf die Säule aufgetragen. Anschließend wird die Säule dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer nachgespült. Die Säulen werden verworfen (T-Zell-angereicherte Fraktion). Das gewonnene Eluat repräsentiert die unmarkierte, TZD-Zellfraktion. Abschließend werden die Zellen einmal mit 10 % RPMI Medium gewaschen und mit Trypanblau gezählt. Die Einstellung auf die gewünschte Zellzahl erfolgt in 5 % RPMI Medium.

#### 3.2.4.2 Anreicherung CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz

Zunächst werden Milzzellen unter sterilen Bedingungen isoliert (vgl. 3.2.2.2.). Analog zur T-Zell-Depletion des KM (vgl. 3.2.4.1) wird anschließend ein Fc-Block durchgeführt



und die Zellen werden auf die LS MACS-Säule aufgetragen. Im Unterschied zur T-Zell-Depletion werden zur magnetischen Markierung anti-CD4 „MACS microbeads“ (10 µl Beads /  $1 \times 10^7$  Zellen / 90 µl FACS-Puffer) verwendet, um eine Anreicherung CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu erreichen. Das Eluat repräsentiert die CD4-negative Fraktion und wird verworfen. Um die CD4-angereicherte Fraktion zu extrahieren, wird die Säule aus dem Separator entfernt und auf ein 15 ml Röhrchen gesetzt. Nach Zugabe von 5 ml MACS-Puffer werden die Zellen mit Hilfe des Stempels vorsichtig aus der Säule in das Röhrchen gedrückt. Die Zellen werden abschließend einmal mit 10 % RPMI-Medium gewaschen, gezählt und auf die gewünschte Zellzahl in 5 % RPMI-Medium eingestellt.

### **3.2.5 Allogene murine Knochenmarktransplantation**

#### **3.2.5.1 Konditionierung und Transplantation**

Um eine immunologische Abstoßungsreaktion des Transplantats zu verhindern, werden die Empfängermäuse am Tag der Transplantation radiotherapeutisch vorbehandelt. Die Bestrahlung der Tiere erfolgt durch die Abteilung für Strahlenmedizin der Universitätsklinik Regensburg mit dem Linearbeschleuniger Primus 2 (100 cGy / min). Die zur Transplantation vorgesehenen Zellpopulationen werden gezählt und in 5 % RPMI Medium vereinigt. Anschließend wird das Transplantat in die laterale Schwanzvene der Empfängertiere injiziert. (300µl pro Injektion). Zur Untersuchung der GVHD-induzierten Blockierung der B-Zell-Lymphopoese wurde ein etabliertes, MHC-differentes Transplantationsmodell gewählt. Indirekte GVL-Effekte gegen die B-Zell-Lymphome *A20-luc/yfp/neo* und *Bcl1-gfp/luc* wurden in zwei unterschiedlich aufgebauten, haploidenten Transplantationsmodellen untersucht.

#### **3.2.5.2 MHC-differente Transplantation (C57BL/6 → BALB/c)**

Nach letaler Bestrahlung mit einer Einmaldosis von 9 Gy am Tag der Transplantation wurden weibliche, 10-11 Wochen alte BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Empfängermäuse mit  $2,5 \times 10^6$  Knochenmarkzellen aus C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) Mäusen transplantiert. Zur Induktion einer akuten GVHD wurden zeitgleich mit dem Transplantat  $1 \times 10^6$  Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen verabreicht.

### **3.2.5.3 Haploidente Transplantation mit Tumorzellgabe und GVHD-Induktion (BALB/c → CB6F1)**

Weibliche CB6F1 (H-2<sup>bd</sup>) Empfängermäuse wurden in einem Alter von 9-13 Wochen mit einer letalen Dosis von 13 Gy, welche in zwei Einzeldosen (jeweils 6,5 Gy) in einem Abstand von vier Stunden verabreicht wurde, letal bestrahlt. Am gleichen Tag wurden alle Tiere mit  $2,5 \times 10^6$  Zellen Gesamt-KM aus BALB/c (H-2<sup>d</sup>) alleine oder zusammen mit  $5 \times 10^6$  Milzzellen (GVHD-Induktion) aus BALB/c (H-2<sup>d</sup>) transplantiert. Allen Tieren wurden zeitgleich  $1 \times 10^4$  A20-*luc/yfp/neo* (H-2<sup>d</sup>) oder  $1 \times 10^4$  Bcl1-*gfp/luc* (H-2<sup>d</sup>) Tumorzellen übertragen.

### **3.2.5.4 Haploidente Transplantation mit Tumorzellgabe und DLI (BALB/c oder C57BL/6 → CB6F1)**

Weibliche CB6F1 (H-2<sup>bd</sup>) Mäuse (Alter: 9 Wochen) wurden mit 13 Gy (Aufteilung auf 2 Einzeldosen à 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) am Tag der Transplantation letal bestrahlt. Anschließend wurden die Empfängertiere mit  $5 \times 10^6$  TZD-KM-Zellen aus C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) oder BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Mäusen transplantiert. Außerdem wurden allen Empfängertieren zeitgleich  $1 \times 10^4$  A20-*luc/yfp/neo* (H-2<sup>d</sup>) Tumorzellen injiziert. An Tag 16 nach Transplantation wurden in der DLI-Behandlungsgruppe nachträglich  $20 \times 10^6$  mithilfe von MACS aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) oder BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Mäusen (jeweils syngene zum vorher transplantierten KM) verabreicht.

### **3.2.5.5 Klinischer GVHD-Score**

Der Schweregrad der murinen GVHD wurde nach Cooke et al. (195) bewertet. Dieses klinische Scoring-System basiert auf fünf klinischen Parametern: Gewichtsverlust, Körperhaltung (Kyphose), Aktivität, und Beschaffenheit des Fells sowie der Haut. Für jeden Parameter können 0 bis 2 Punkte vergeben werden (**Tabelle 3.1**). Der Gesamtgrad wird anschließend aus der Summe der einzelnen Parameter errechnet (Maximaler Grad: 10). Je höher der Gesamtgrad ausfällt, umso schwerer verläuft die GVHD. Wenn die Versuchstiere einen GVHD-Gesamtgrad von 6 oder mehr erreichen oder sie einen Gewichtsverlust von über 25% erleiden, erfolgt ihre tierschutzgerechte Tötung.

	Haut	Fell	Körperhaltung	Aktivität	Gewicht
0,5	Schuppung an Pfote und Ohren	Struppiges Fell ventral	Leichte Kyphose, nur in Ruhe	Aktivität reduziert	-
1	Erythem an Schwanz und Anus	Ventrale Querlinien, leicht struppiges Fell dorsal	Leichte Kyphose, auch bei Bewegung	> 50% des Beobachtungszeitraums keine Bewegung	10-25% Gewichtsverlust
1,5	Offene Läsionen	Struppiges Fell > 50% der Oberfläche	Kyphose	Bewegung nur nach Stimulation	-
2	Multiple offene Läsionen	Gesamtes Fell betroffen, Fellverlust	Starke Kyphose, eingeschränkte Beweglichkeit	Keine Bewegung, auch nach Stimulation	> 25 % Gewichtsverlust

**Tabelle 3.1** Klinischer Score zur Bewertung des Schweregrades der murinen GVHD nach Cooke et al. (195).

### 3.2.6 A20-luc/yfp/neo und Bcl1-gfp/luc B-Zell-Lymphome

Die verwendeten A20-luc/yfp/neo und Bcl1-gfp/luc B-Zell-Lymphome stammen aus BALB/c Mäusen und wurden mit Reporter genen retroviral transduziert (194). Diese Reporter gene haben eine duale Funktion. Sie kodieren für das Enzym Luciferase und ermöglichen somit die Biolumineszenzmessung (bioluminescence imaging, BLI) *in vivo*. Außerdem kodieren sie für die Fluoreszenzmarker „green fluorescent protein“ (GFP) oder „yellow fluorescent protein“ (YFP), wodurch eine durchflusszytometrische Zellsortierung und Analyse *ex vivo* durchführbar sind. Für die durchflusszytometrische Zellsortierung und Analyse der GFP- oder YFP-Expression wurde der FITC-Kanal verwendet.

Bcl1-gfp/luc Tumorzellen haben initial einen Tropismus für Leber und Milz (ab Tag 5 nach Injektion). In einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium finden sich eine ausgeprägte Hepatosplenomegalie, pulmonaler Befall, KM-Infiltration und eine leukämische Ausschwemmung. A20-luc/yfp/neo siedeln sich anfangs (innerhalb von 7 Tagen) im Knochenmark (Humerus, Femur, Sternum, Wirbelkörper) an. Ein fortgeschrittenes Tumorstadium äußert sich klinisch u.a. mit einer Lähmung der Hinterläufe (15 – 25 Tage nach Transplantation), welche auf einen meningealen Befall

und eine damit verbundene Myelonkompression zurückzuführen ist. Die klinischen Symptome dieses fortgeschrittenen Tumorstadiums werden engmaschig überwacht. Wenn die Mäuse Lähmungserscheinungen zeigen, erfolgt die umgehende Tötung der Tiere aus tierschutzrechtlichen Gründen.

### **3.2.6.1 Auftauen kryokonservierter Tumorzellen**

Vor der ersten Aussaat in der Kulturflasche von *A20-luc/yfp/neo* bzw. der ersten Zellpassage von *Bcl1-gfp/luc in vivo* werden die kryokonservierten Tumorzellen aufgetaut. Das für die Kryokonservierung angewandte Gefrierschutzmittel DMSO ist unter Raumtemperatur zytotoxisch und muss daher vor weiterer Verwendung der Zellen entfernt werden. Dazu werden die Zellen zunächst im Wasserbad (ca. 37 °C) angetaut und anschließend vorsichtig in ein 50 ml Tube überführt und mit Standard Kulturmedium (*A20-luc/yfp/neo*) oder 5% RPMI Medium (*Bcl1-gfp/luc*) aufgefüllt. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 4 °C, 10 min) wird das Pellet in Standard Kulturmedium oder 5% RPMI Medium aufgenommen und die Zellen mit Trypanblau gefärbt und gezählt.

### **3.2.6.2 Ausgangsmaterial und Zellsortierung**

Die B-Zell-Lymphome *A20-luc/yfp/neo* und *Bcl1-gfp/luc* werden für die Experimente mittels FACS aufgereinigt (vgl. 3.2.1.2.). Nach Gewinnung des Ausgangsmaterials - *A20-luc/yfp/neo*: Zellkultur (vgl. 3.2.6.2) und *Bcl1-gfp/luc*: Milzzellen (vgl. 3.2.2.2) von BALB/c oder CB6F1 Mäusen - wird zunächst eine Oberflächenfärbung gegen CD19 durchgeführt (vgl. 3.2.1.3). Anschließend werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in einer Konzentration von  $20 \times 10^6$  Zellen/ml in FACS-Puffer aufgenommen. Im Anschluss an die Zellsortierung nach CD19<sup>+</sup> und YFP<sup>+</sup> (*A20-luc/yfp/neo*) oder CD19<sup>+</sup> und GFP<sup>+</sup> (*Bcl1-gfp/luc*) Zellen werden die sortierten Zellen in FACS-Tubes mit 200 µl vorgelegtem FCS aufgefangen.

### **3.2.6.3 *A20-luc/yfp/neo* Zellkultur**

Nach Auftauen von kryokonservierten (vgl. 3.2.6.1) und FACS sortierten (vgl. 3.2.1.2) CD19<sup>+</sup> YFP<sup>+</sup> *A20-luc/yfp/neo* Zellen erfolgt die weitere Zellpassage *in vitro*. Der Reinheitsgehalt der Tumorzellen liegt nach Zellsortierung bei über 98%. Die Zellen werden in einer 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / 30 ml

Standard Kulturmedium angesetzt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellpassage der Suspensionszellen erfolgt alle 5 Tage. Hierzu wird zunächst das verbrauchte Medium abpipettiert und verworfen. Nach Spülen der Kulturflasche mit 10 ml Standard Kulturmedium werden die adhärenen Zellen in 10 ml Standard Kulturmedium durch vorsichtiges Beklopfen der Kulturflasche in Suspension gebracht und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, welches auf 30 ml mit Standard Kulturmedium aufgefüllt wird. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 4 °C, 10 min) wird das Zellpellet mit Standard Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl unter Verwendung von Trypanblau ermittelt. Anschließend werden  $0,5 \times 10^6$  Zellen / 30 ml Standardmedium / 75 cm<sup>2</sup> in eine neue Zellkulturflasche eingesetzt.

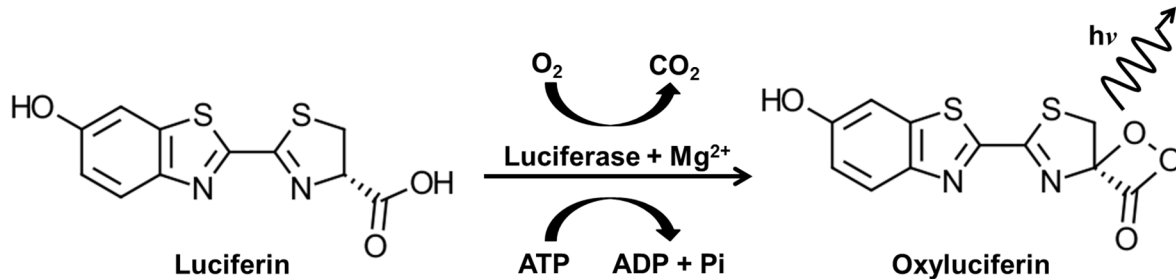
#### **3.2.6.4 *Bcl1-gfp/luc* Zellpassage in vivo**

Kryokonservierte und durchflusszytometrisch sortierte (vgl. 3.2.1.2, Reinheitsgrad über 98%) CD19<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> *Bcl1-gfp/luc* Zellen werden aufgetaut (vgl. 3.2.6.1) und initial in BALB/c Mäusen passagiert, da *Bcl1-gfp/luc* Zellen *in vitro* nicht aufrechterhalten werden können. Durch dreimalige Passage in CB6F1 Mäuse werden die *Bcl1-gfp/luc* Zellen für die Versuche in CB6F1 Tieren adaptiert. Die Zellpassage erfolgte anschließend in nicht letal bestrahlten (6,5 Gy) und nicht-transplantierten CB6F1 Mäusen, die im Anschluss an die Bestrahlung  $1 \times 10^4$  durchflusszytometrisch sortierte Tumorzellen (gewonnen aus der Milz) erhielten.

#### **3.2.6.5 *Biolumineszenzmessung***

Das zugrundeliegende Prinzip der BLI basiert auf einer chemischen Reaktion, bei der durch enzymatische Umwandlung spezifischer Substrate Licht erzeugt wird. Für das Enzym Luciferase, das in unseren Experimenten eingesetzt wird, dient ATP als Energieträger und Magnesium als Kofaktor. Nach Zugabe des Ausgangssubstrats Luciferin spielt sich die entscheidende Reaktion in zwei Teilschritten ab. Zunächst wird durch die Adenylierung von Luciferin der Enzym-Adenyl-Luciferin-Komplexes aktiviert. Im zweiten Teilschritt wirkt die Luciferase als Oxygenase auf den Adenyl-Luciferin-Komplex und bewirkt in Anwesenheit von O<sub>2</sub> die Bildung von Oxyluciferin und CO<sub>2</sub>. Bei Rückfall von Oxyluciferin auf ein niedrigeres Energieniveau werden schließlich

Photonen freigesetzt, die in einem geringen Maße Gewebe penetrieren können (**Abbildung 3.1**).



**Abbildung 3.1** Darstellung der chemischen Strukturformel der Luciferase Reaktion.

Das erzeugte Lumineszenzsignal wird mit einem Xenogen IVIS 50 Imaging System gemessen. Dieses System besteht aus einer lichtundurchlässigen Messkammer mit einer 0,5 Zoll „Charge-coupled device“ (CCD)-Kamera, die mit einem Computer verbunden ist, über welchen die Messungen gesteuert und die erzeugten Bilder digital gespeichert werden. Um Störfaktoren wie Dunkelstrom und Ausleserauschen zu minimieren, wird die CCD-Kamera auf  $-70\text{ °C}$  gekühlt. Die Grundlage für die Messung mit CCD-Bildsensoren liefern lichtempfindliche Fotodioden. Die erzeugten Photonen übertragen über den inneren photoelektrischen Effekt ihre Energie auf die Elektronen eines Halbleiters. Dadurch bilden sich freie Elektronen und Ladungslöcher. Durch Anlegen einer Spannung können diese voneinander getrennt und anschließend in einer Speicherzelle (Potentialtopf) gesammelt werden. Über eine schrittweise Verschiebung via Eimerkettenschaltung erreichen die Ladungspakete schließlich den Ausleseverstärker. Dieser detektiert abhängig von der Ladung, also der gemessenen Lichtmenge, eine elektrische Spannung. Diese Information wird auf die Pixel des erzeugten Bildes übertragen. Die Zusammenfassung von vier Pixeln zu einer Messeinheit ermöglicht eine hohe Lichtsensitivität, während eine ausreichende, biologische Spezifität erhalten bleibt.

Die Mäuse, welche die Luciferase-positiven Tumorzellen tragen, werden mithilfe eines integrierten Narkosesystems 5 min vor der Messung mit dem volatilen Anästhetikum Desfluran in Kurzzeinnarkose versetzt. Nach oberflächlicher Desinfektion mit 70% Ethanol erhalten die Mäuse eine intraperitoneale (i.p.) Luciferininjektion ( $0,15\ \mu\text{g} / \text{g}$  Körpergewicht) mit einer 0,4 mm Kanüle auf einer 1 ml Spritze. Die wässrige Luciferinlösung wird unter ständigem Lichtschutz im gefrorenen Zustand in einem 0,5

ml Eppendorfröhrchen aufbewahrt und erst zur Messung aufgetaut. Anschließend werden die narkotisierten Tiere in die lichtdichte und beheizte Messkammer gelegt, in der für jede Maus eine Narkosemaske zur Aufrechterhaltung der Narkose integriert ist. Vor der Lumineszenzmessung wird zunächst unter Schwachlicht ein Referenzbild der Tiere in Graustufen angefertigt. Im nächsten Schritt werden alle Lichtquellen ausgeschaltet und die durch das Gewebe dringenden und auf die CCD-Kamera auftreffenden Photonen werden durch das „Igor Pro“-Betriebsprogramm über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Das ermittelte Photonensignal wird mit dem Referenzbild abgeglichen und ermöglicht somit eine anatomische Zuordnung der zu untersuchenden Zellen. Mit der auf Igor Pro (Wavemetrics, Seattle, WA) basierenden Analysesoftware - living imaging Software (Xenogen) - kann das gemessene Signal anschließend quantifiziert werden. Dazu wird die Methode der „region of interest“ (ROI) angewendet, bei der manuell ein Messbereich bestimmt und ausgelesen wird. Da *A20-luc/yfp/neo* und *Bcl1-gfp/luc* das Enzym Luciferase konstant exprimieren, korreliert das gemessene BLI-Signal positiv mit ihrer Zellzahl. Dies ermöglicht eine quantitative, nicht-invasive *in vivo* Beobachtung von Tumorzellvermehrung oder Tumorzellverlust während des Experimentes.

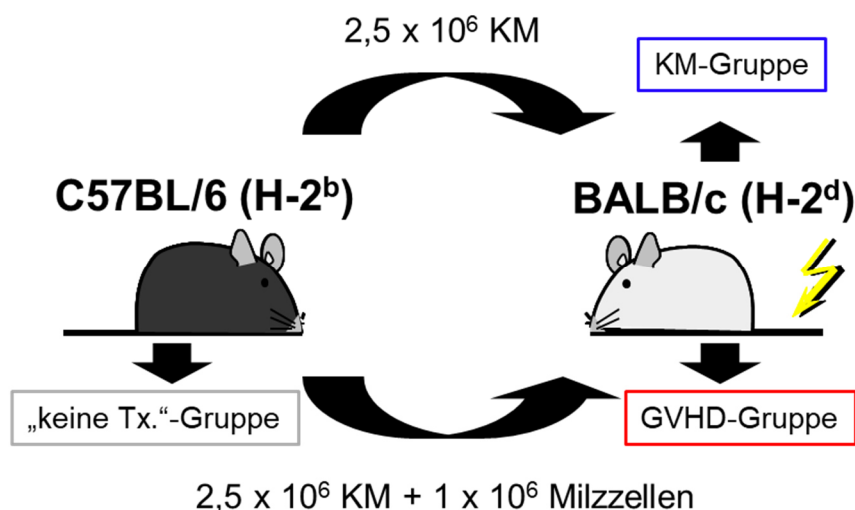
### 3.2.7 Statistische Auswertung

Für die graphische Darstellung und die statistische Auswertung der Ergebnisse wird die Software GraphPad Prism 7.0 (Graphpad Software, Inc.) eingesetzt. Ergebnisse werden als Mittelwert (MW) mit Standardfehler („standard error of the mean“; SEM) dargestellt. Zwei Gruppen werden mithilfe eines Student-t-Tests unter Annahme gleicher Varianzen miteinander verglichen. Werden drei Gruppen untereinander verglichen, wird stattdessen ein ein-faktorieller ANOVA-Test mit einem Tukey-Kramer post-hoc Test durchgeführt. Für Überlebenskurven wird der log-rank Test verwendet. Unterschiede zwischen den Gruppen werden bei Annahme eines Konfidenzintervalls von 95% bei einem p-Wert von  $\leq 0,05$  als signifikant bewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 GVHD-induzierte Blockierung der B-Zell-Lymphopoese im Knochenmark

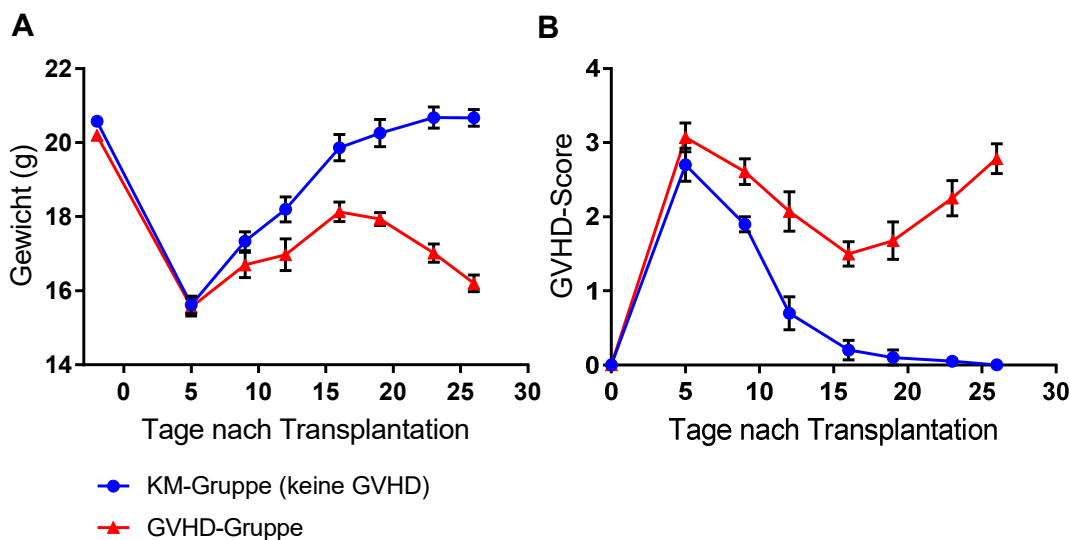
Die allogene SZT ist eine etablierte Methode zur Behandlung maligner und nicht-maligner hämatologischer Erkrankungen. Eine der häufigsten Komplikationen ist die GVHD, welche neben der immunologischen Zerstörung klassischer Zielorgane (Haut, Darm, Leber) gravierende Auswirkungen auf die Rekonstitution des adaptiven Immunsystems hat. Besonders im Bereich des B-Zell-Kompartiments sind diese Effekte so schwerwiegend, dass Patienten mit GVHD eine stark verminderte oder sogar ausbleibende B-Zell-Rekonstitution aufweisen. Tierexperimentelle Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (175) konnten auf Grundlage eines MHC-differenten Transplantationsmodells (C57BL/6 → BALB/c) zuverlässig zeigen, dass BALB/c Mäuse, die nur mit C57BL/6 Gesamt-KM transplantiert wurden (GVHD-freie KM-Gruppe), eine schnelle und vollständige B-Zell-Rekonstitution in KM, Milz und peripherem Blut (PB) aufwiesen. BALB/c Mäuse, die zusätzlich zu den KM-Zellen noch C57BL/6 Milzzellen erhielten (GVHD-Gruppe), entwickelten dagegen eine schwere und letal verlaufende GVHD.



**Abbildung 4.1: MHC-differentes, murines GVHD-Transplantationsmodell.** BALB/c Mäuse wurden an Tag 0 letal bestrahlt (9 Gy) und entweder mit  $2,5 \times 10^6$  KM-Zellen aus C57BL/6 Mäusen alleine (KM-Gruppe) oder zusätzlich mit  $1 \times 10^6$  Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen (GVHD-Gruppe) transplantiert. An Tag 22 wurde das PB und an Tag 28 nach Transplantation das KM der Mäuse analysiert. Unbehandelte C57BL/6 Mäuse dienten als Kontrollgruppe („keine Tx.“-Gruppe).



Über den gesamten Beobachtungszeitraum konnten in diesen Empfängertieren nur vereinzelt B-Zellen in den untersuchten Organen detektiert werden. Da selbst im primären lymphatischen Organ der B-Zell-Lymphopoese, dem Knochenmark, die Anzahl reifer B-Zellen stark vermindert war, ist eine GVHD-induzierte Blockierung der B-Zell-Entwicklung bereits im Knochenmark zu vermuten. Diese anzunehmende Entwicklungsblockierung wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse von Stammzellen und lymphatischen Progenitorzellen in o.g. Transplantationsmodell (**Abbildung 4.1**) untersucht. Hierfür wurden mit 9 Gy letal bestrahlte (Tag 0) BALB/c Mäuse (H-2<sup>d</sup>) entweder mit  $2,5 \times 10^6$  Knochenmarkszellen aus C57BL/6 Mäusen (H-2<sup>b</sup>) alleine oder zusammen mit  $1 \times 10^6$  Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen transplantiert. Die Tiere wurden bis Tag 28 nach Transplantation regelmäßig gewogen und ein klinischer GVHD-Score (vgl. 3.2.5.5) erhoben (**Abbildung 4.2**).



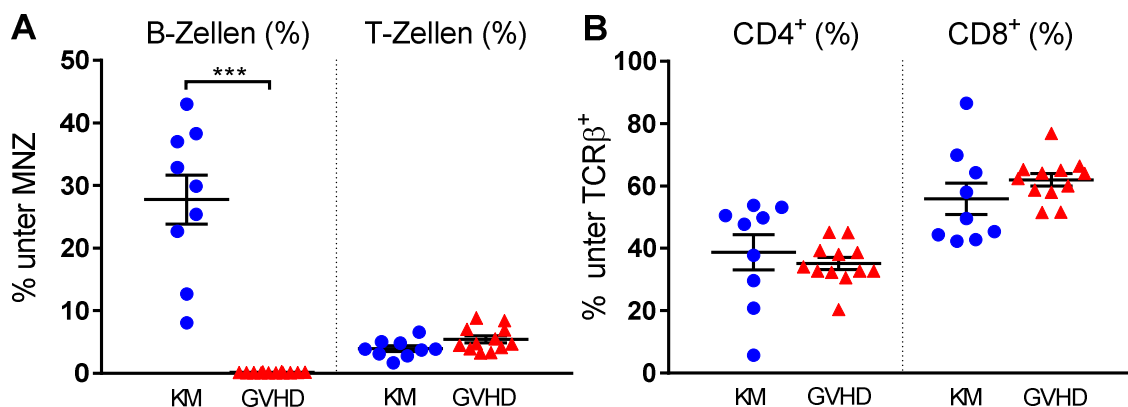
**Abbildung 4.2 Gewichtsverlauf (A) und klinischer Score (B) nach MHC-differenter KM-Transplantation.** An Tag 0 wurden BALB/c Mäuse letal bestrahlt (9 Gy) und entweder mit  $2,5 \times 10^6$  KM-Zellen aus C57BL/6 Mäusen alleine (KM-Gruppe, n=9) oder zusätzlich mit  $1 \times 10^6$  Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen (GVHD-Gruppe, n=12) transplantiert.

Beide Gruppen zeigten initial einen deutlichen Gewichtsverlust nach Transplantation und einen hohen klinischen Score, was typische Befunde nach Bestrahlung darstellen. Anschließend erholten sich die Tiere der KM-Gruppe kontinuierlich, was sich in einem ansteigenden Gewicht und einem sinkenden GVHD-Score widerspiegelte. Das Gewicht der GVHD-Tiere erholte sich zunächst ebenfalls leicht, lag aber dauerhaft unter dem der KM-Gruppe. Auch der GVHD-Score in der GVHD-Gruppe nahm bis einschließlich Tag 16 erst leicht ab, war aber durchgehend

höher als in der KM-Gruppe und stieg ab Tag 19 wieder an, zeitgleich mit einem erneuten Gewichtsabfall.

#### 4.1.1 Analyse der lymphatischen Rekonstitution im peripheren Blut 22 Tage nach Transplantation

Um die Immunrekonstitution und das Anwachsen des Transplantats während des Versuchs zu kontrollieren, wurde an Tag 22 nach Transplantation das PB der Empfängertiere durchflusszytometrisch untersucht (**Abbildung 4.3**). Dabei wurden die verschiedenen Zellpopulationen anhand ihrer charakteristischen Oberflächenproteine identifiziert. B-Zellen wurden als CD19<sup>+</sup>, T-Zellen als TCRβ<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T-Zellen als TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen als TCRβ<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen definiert. Um den Spenderanteil (Chimärismus) der T-Zellen zu bestimmen, wurden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bezüglich ihres Haplotyps H-2k<sup>b</sup> (Spender) oder H-2k<sup>d</sup> (Empfänger) charakterisiert.



**Abbildung 4.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der lymphatischen Rekonstitution im PB an Tag 22 nach MHC-differenter Transplantation und GVHD-Induktion.** BALB/c Mäusen wurden nach letaler Bestrahlung (9 Gy an Tag 0) mit  $2,5 \times 10^6$  C57BL/6 KM alleine (KM-Gruppe ●, n=9) oder zusätzlich mit  $1 \times 10^6$  C57BL/6 Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, n=12) transplantiert. **A** zeigt den prozentualen Anteil der B- und Gesamt-T-Zellen an MNZ und **B** den prozentualen Anteil CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an TCRβ<sup>+</sup> Zellen. Dargestellt werden die MW des Zellgehalts  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

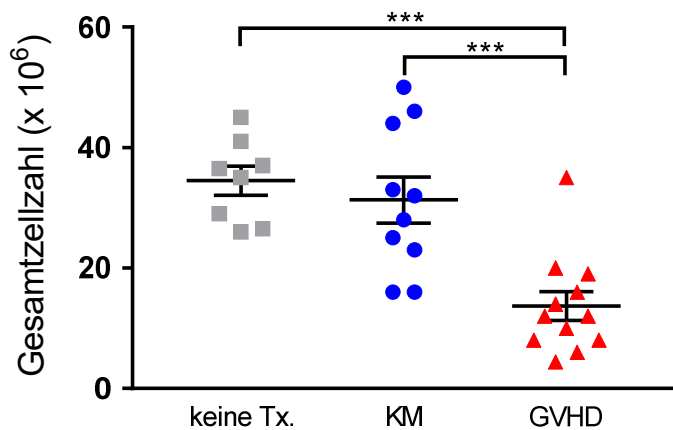
Zum Untersuchungszeitpunkt zeigte die KM-Gruppe im Mittel einen Anteil von  $27,8 \pm 3,9$  % reifen B-Zellen an allen mononukleären Zellen (MNZ) im PB, während in der GVHD-Gruppe mit  $0,1 \pm 0,02$  % praktisch keine ( $p < 0,001$ ) CD19<sup>+</sup> Zellen nachweisbar waren. Der prozentuale T-Zellgehalt war in der GVHD-Gruppe mit  $5,4 \pm 0,6$  % gegenüber  $3,9 \pm 0,5$  % in der KM-Gruppe leicht erhöht. Unter den T-Zellen waren in der KM-Gruppe mit  $38,8 \pm 5,6$  % und in der GVHD-Gruppe mit  $35,1 \pm 1,9$  %

ähnlich viele CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Wie für das pro-inflammatorische Milieu in der GVHD-Gruppe zu erwarten, ließ sich mit  $61,9 \pm 1,9$  % ein erhöhter prozentualer CD8<sup>+</sup> T-Zellgehalt im Vergleich zur KM-Gruppe ( $55,9 \pm 5,1$  %) nachweisen. Das Verhältnis CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen verschob sich durch die GVHD leicht zu Gunsten CD8<sup>+</sup> T-Zellen (0,57 vs. 0,69). In beiden Gruppen zeigten sowohl CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit  $98,1 \pm 1,5$  % (KM-Gruppe) und  $99 \pm 0,1$  % (GVHD-Gruppe) als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit  $99,5 \pm 0,2$  % (KM-Gruppe) und  $99,2 \pm 0,1$  % (GVHD-Gruppe) H-2k<sup>b</sup> positiven Zellen einen nahezu vollständigen Spenderchimärismus.

Zusammenfassend konnte an Tag 22 ein erfolgreiches Anwachsen des Transplantats dokumentiert werden. Transplantierte Tiere ohne GVHD rekonstituierten sowohl ihr reifes T- als auch B-Zellkompartiment. In Mäusen mit GVHD erholte sich nur das T-Zellkompartiment, wobei eine GVHD-typische Verschiebung des Verhältnisses CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu Gunsten CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachzuweisen war. Wie für dieses Transplantationsmodell zu erwarten, erholte sich das reife B-Zell-Kompartiment in Tieren mit GVHD nicht.

#### 4.1.2 Untersuchung des Knochenmarks 28 Tage nach Transplantation

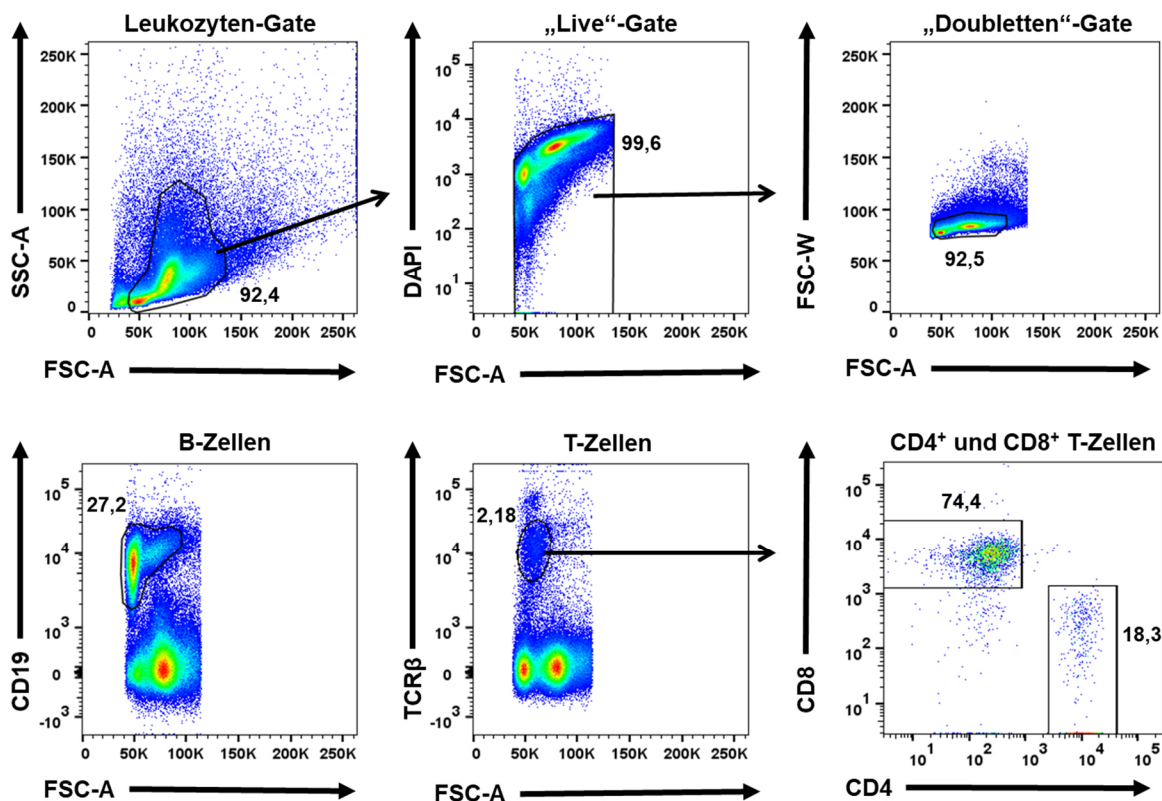
An Tag 28 erfolgte die tierschutzgerechte Tötung aller Versuchstiere und die Entnahme des KM. Als Kontrolle diente KM aus nicht-transplantierten und unbehandelten C57BL/6-Mäusen („keine Tx.“-Gruppe). Das KM-Isolat wurde hinsichtlich reifer B- und T-Zellen, hämatopoetischer Stammzellen sowie myeloider und lymphoider Progenitorzellen inklusive der B-Zell-Vorläuferzellen untersucht. Die Analyse der Gesamtzellzahlen aus 2 Hinterläufen zeigte keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der KM-Gruppe ( $31,5 \pm 3,8 \times 10^6$ ) und der unbehandelten Kontroll-Gruppe ( $34,3 \pm 2,4 \times 10^6$ ) (**Abbildung 4.4**). Beide Werte differierten deutlich ( $p < 0,001$ ) von denen der GVHD-Gruppe mit lediglich  $14 \pm 2,2 \times 10^6$  Zellen.



**Abbildung 4.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl des KM 28 Tage nach MHC-differenter Transplantation und GVHD-Induktion.** BALB/c Mäuse wurden nach letaler Bestrahlung mit 9 Gy an Tag 0 mit  $2,5 \times 10^6$  C57BL/6 KM-Zellen alleine (KM-Gruppe ●, n=10) oder zusätzlich mit  $1 \times 10^6$  C57BL/6 Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, n=12) transplantiert. Unbehandelte C57BL/6 Mäuse („keine Tx.“-Gruppe ■, n=8) dienen als zusätzliche Vergleichsgruppe. Dargestellt werden die MW der Zellzahlen aus zwei Hinterläufen (Femur und Tibia)  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

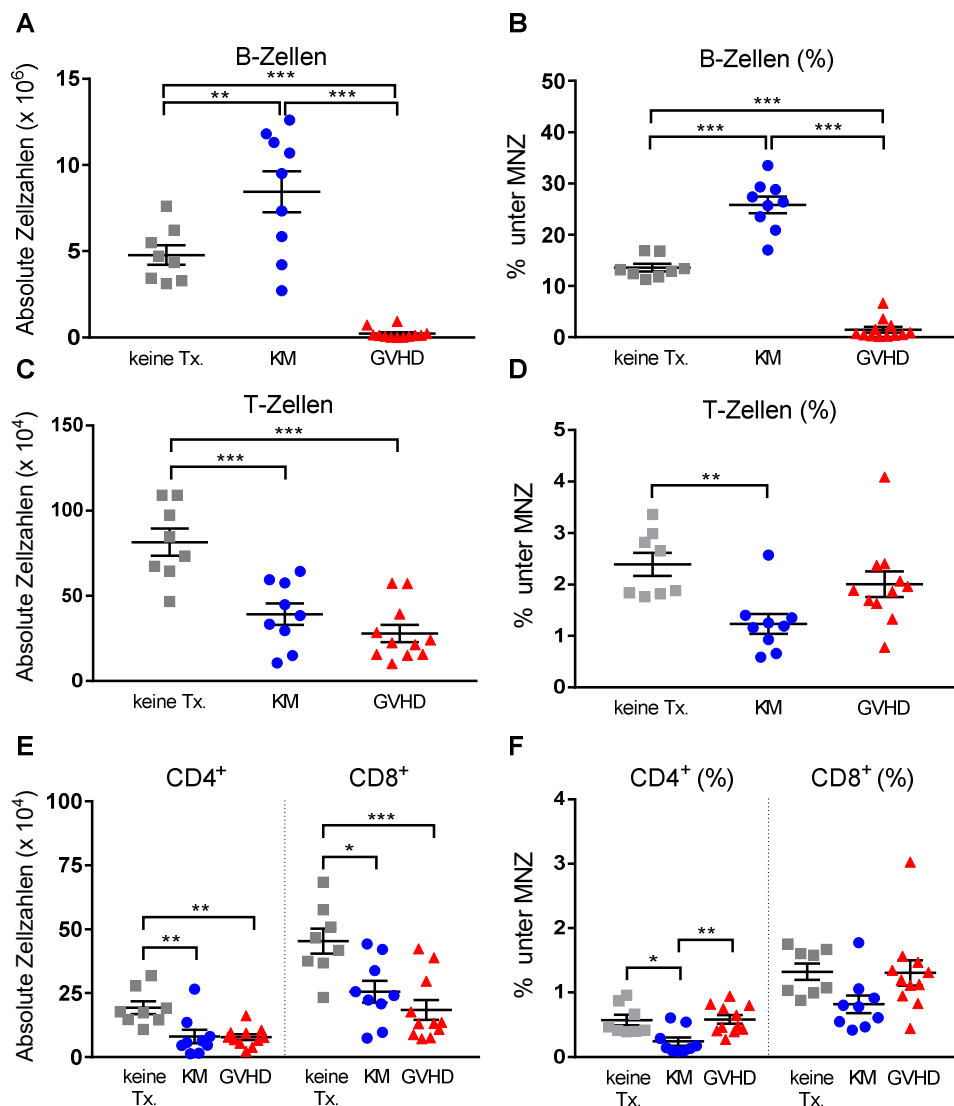
#### 4.1.2.1 Analyse reifer B- und T-Zell-Populationen

B- und T-Zellen wurden analog zu der durchflusszytometrischen Untersuchung des PB (vgl. 4.1.1) analysiert. In **Abbildung 4.5** wird die Gating-Strategie für reife B- und T-Zellen anhand einer Maus der KM-Gruppe dargestellt.



**Abbildung 4.5 Gating-Strategie für reife B- und T-Zellen im Knochenmark.** Nach Gating auf Leukozyten werden zunächst tote Zellen („Live“-Gate, DAPI-) und Doubletten von der Auswertung ausgeschlossen. Reife B-Zellen werden als CD19<sup>+</sup> und T-Zellen durch TCRβ<sup>+</sup> Zellen definiert. Weiterhin werden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert (TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> bzw. TCRβ<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>). Dargestellt ist die durchflusszytometrische Auswertung einer Maus der KM-Gruppe.

In der KM-Gruppe konnten  $8,4 \pm 1,2 \times 10^6$  (absolute Zellzahlen) und  $25,8 \pm 1,6 \%$  (unter MNZ) B-Zellen detektiert werden. Dies waren sowohl absolut ( $p = 0,004$ ) als auch prozentual ( $p < 0,001$ ) signifikant mehr B-Zellen als in der unbehandelten Kontrollgruppe ( $4,8 \pm 0,6 \times 10^6$  bzw.  $13,6 \pm 0,8 \%$  B-Zellen). Die GVHD-Gruppe zeigte dagegen im Vergleich zur KM- und Kontrollgruppe einen dramatisch ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ) reduzierten absoluten ( $0,2 \pm 0,09 \times 10^6$ ) und prozentualen ( $1,5 \pm 0,6 \%$ ) B-Zellgehalt.



**Abbildung 4.6** Durchflusszytometrische Analyse reifer B- und T-Zellen im KM an Tag 28 nach MHC-differenter KM-Transplantation und GVHD-Induktion. BALB/c Mäuse wurden nach letaler Bestrahlung mit 9 Gy (an Tag 0) mit  $2,5 \times 10^6$  C57BL/6 KM-Zellen alleine (KM-Gruppe ●, n=9) oder zusätzlich mit  $1 \times 10^6$  C57BL/6 Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, n=12) transplantiert. Als Kontrolle diente KM aus nicht-transplantierten und unbehandelten C57BL/6-Mäusen („keine Tx.“-Gruppe ■, n=8). **A** und **B** zeigen das reife B-Zell-Kompartiment mit absoluten Zellzahlen und prozentualem Zellgehalt unter allen MNZ. In **C** und **D** werden der absolute und prozentuale T-Zellgehalt und in **E** und **F** der absolute und prozentuale Zellgehalt ihrer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Subpopulationen unter allen MNZ dargestellt. Gezeigt werden die MW der Zellzahlen aus zwei Hinterläufen (Femur und Tibia)  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Der T-Zellgehalt lag in der KM-Gruppe bei  $39,2 \pm 6,4 \times 10^4$  (absolute Zellzahlen) bzw.  $1,2 \pm 0,2 \%$  (unter MNZ), während in der unbehandelten Kontrollgruppe mit  $81,4 \pm 7,9 \times 10^4$  und  $2,4 \pm 0,2 \%$  sowohl absolut ( $p < 0,001$ ) als auch prozentual ( $p = 0,006$ ) signifikant mehr T-Zellen nachweisbar waren. In der GVHD-Gruppe zeigten sich  $27,8 \pm 4,9 \times 10^4$  bzw.  $2 \pm 0,3 \%$  T-Zellen. Nur die absolute T-Zellzahl der GVHD-Gruppe war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant ( $p < 0,001$ ) erniedrigt, während der prozentuale T-Zellgehalt leicht höher als in der KM-Gruppe war. Die Analyse der T-Zell-Subpopulation zeigte in der KM-Gruppe  $8,0 \pm 2,6 \times 10^4$  und  $0,2 \pm 0,07 \%$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dies waren signifikant ( $p = 0,003$ ) weniger absolute CD4<sup>+</sup> T-Zellen als in der unbehandelten Kontrollgruppe, welche  $19,3 \pm 2,5 \times 10^4$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufwies. Auch der prozentuale CD4<sup>+</sup> T-Zellgehalt lag unterhalb der Kontrollgruppe ( $0,6 \pm 0,08 \%$ ). In der GVHD-Gruppe konnten  $7,7 \pm 1,1 \times 10^4$  und  $0,6 \pm 0,07 \%$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden. Damit war die absolute CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl in der GVHD-Gruppe signifikant ( $p = 0,002$ ) niedriger als in der unbehandelten Kontrollgruppe, während sich der prozentuale CD4<sup>+</sup> T-Zellgehalt annähernd gleich verhielt. Im Gegensatz dazu war der prozentuale CD4<sup>+</sup> T-Zellgehalt in der GVHD-Gruppe im Vergleich zur KM-Gruppe signifikant ( $p = 0,004$ ) erhöht und die absoluten CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen sehr ähnlich.

In der KM-Gruppe wurden  $25,6 \pm 4,3 \times 10^4$  und  $0,8 \pm 0,1 \%$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert. Der absolute ( $45,3 \pm 4,9 \times 10^4$ ), aber nicht der prozentuale ( $1,3 \pm 0,1 \%$ ) CD8<sup>+</sup> T-Zellgehalt des KM unbehandelter Tiere differierte hierzu signifikant ( $p = 0,01$ ). Die GVHD-Gruppe zeigte  $18,4 \pm 3,8 \times 10^4$  und  $1,3 \pm 0,2 \%$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Somit waren in der GVHD-Gruppe signifikant ( $p < 0,001$ ) weniger absolute CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar, während der prozentuale CD8<sup>+</sup> T-Zellgehalt im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe annähernd gleich blieb. Die GVHD-Gruppe hatte im Vergleich mit der KM-Gruppe absolut gesehen etwas weniger CD8<sup>+</sup> T-Zellen, während der prozentuale CD8<sup>+</sup> T-Zellgehalt in der GVHD-Gruppe höher war. Das Verhältnis CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen lag in der KM-Gruppe bei 0,31 und verschob sich somit leicht zu Gunsten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (0,43). Für die GVHD-Gruppe wurde ebenfalls ein CD4/CD8-Verhältnis von 0,43 berechnet.

Zusammenfassend (**Abbildung 4.6**) konnten wir im Knochenmark der KM-Gruppe ein leicht reduziertes T-Zell-Kompartiment ohne eindeutige Verschiebung des

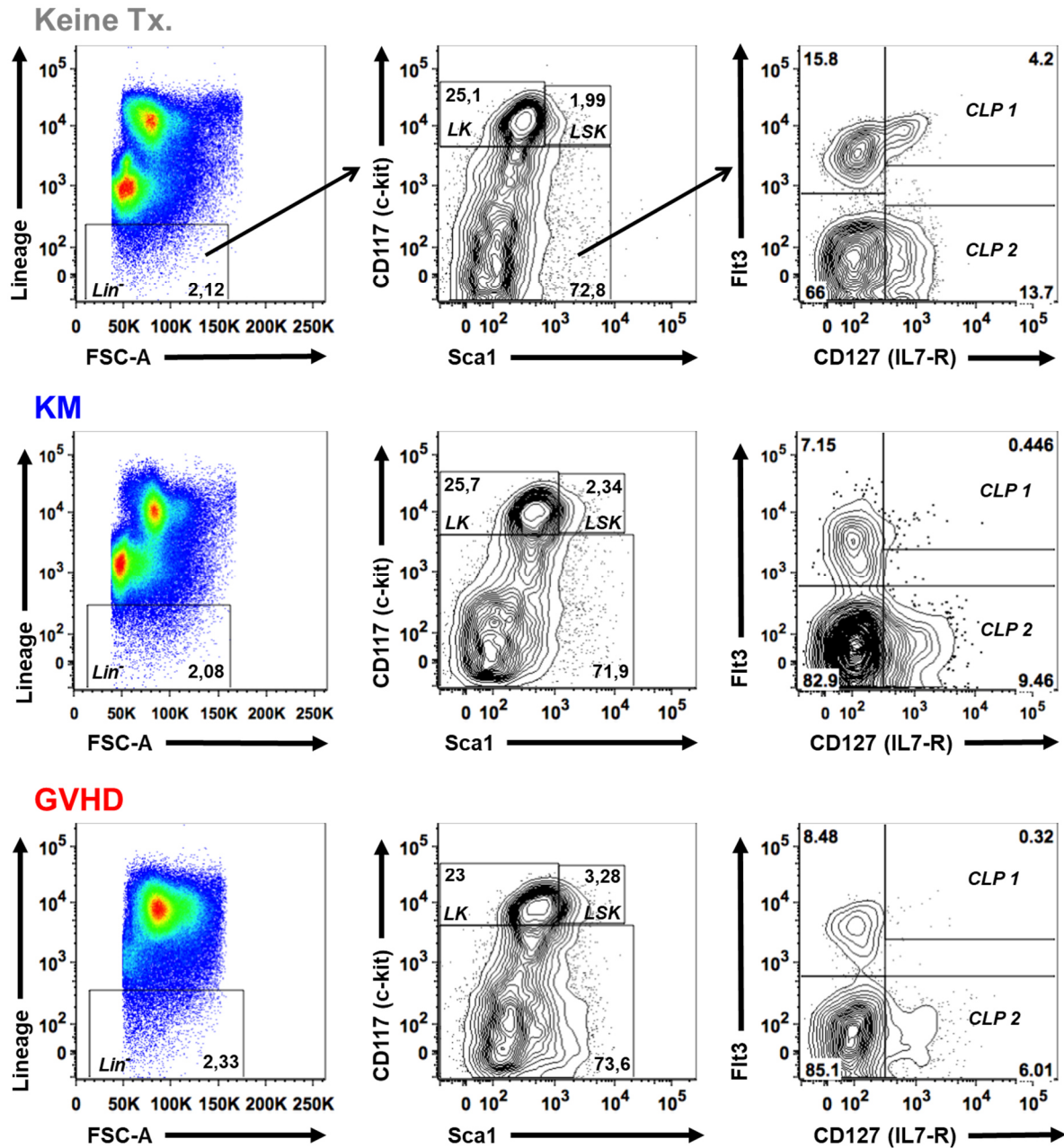
Verhältnisses CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe feststellen. Unter Berücksichtigung der deutlich reduzierten KM-Gesamtzellzahl der GVHD-Gruppe zeigte sich ein leicht erhöhter T-Zellgehalt inklusive ihrer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Subpopulationen im KM der GVHD-Tiere im Vergleich zur KM- und unbehandelten Kontrollgruppe. Der B-Zell-Gehalt im Knochenmark der KM-Gruppe war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erhöht, während nach GVHD-Induktion erwartungsgemäß eine B-Zell-Aplasie zu beobachten war.

#### **4.1.2.2 Analyse hämatopoetischer Stammzellen und lymphatischer Progenitorzellen**

Anschließend wurde untersucht, wie sich eine akute GVHD auf hämatopoetische Stammzellen und frühe Vorläuferzellen der Erythro-, Megakaryo-, Myelo- und insbesondere auch der Lymphopoese auswirkt. Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen stellen auch unter physiologischen Bedingungen in Bezug auf die Gesamtzellularität des KM einen kleinen Prozentsatz dar. Um eine adäquate, durchflusszytometrische Analyse zu ermöglichen, wurden daher reife Knochenmarkzellen (B- und T-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen) mithilfe eines Antikörpercocktails gegen linienspezifische Oberflächenmoleküle (vgl. 3.1.7) angefärbt und im Anschluss durch Gating von der weiteren Analyse ausgeschlossen (lineage-negative Fraktion, lin<sup>-</sup>). **Abbildung 4.7** verdeutlicht die Gating-Strategie und zeigt die untersuchten Vorläuferzellen.

Die Population der lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>high</sup> c-kit<sup>high</sup> Zellen („LSK“-Zellen) beinhaltet aktivierte HSC mit kurzfristigem Engraftmentpotential (ST-HSC) und ruhende, inaktive HSC mit längerfristigem Engraftmentpotential (LT-HSC) sowie multipotente Progenitor-Zellen (MPP). Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>high</sup> Sca-1<sup>low</sup> Zellen („LK“-Zellen) bilden eine heterogene Population aus gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CMP), granulozytär-monozytären Vorläuferzellen (GMP) und megakaryozytär-erythrozytären Vorläuferzellen (MEP). Für die Lymphopoese (T-, B- und NK-Zellen) im Knochenmark ist die Population der gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) entscheidend. Die CLP-Population selbst ist heterogen und kann über ihre Flt3-Expression weiter differenziert werden. Sie gliedert sich auf in oligopotente (Entwicklungspotential für T-, B- und NK-Zellen)

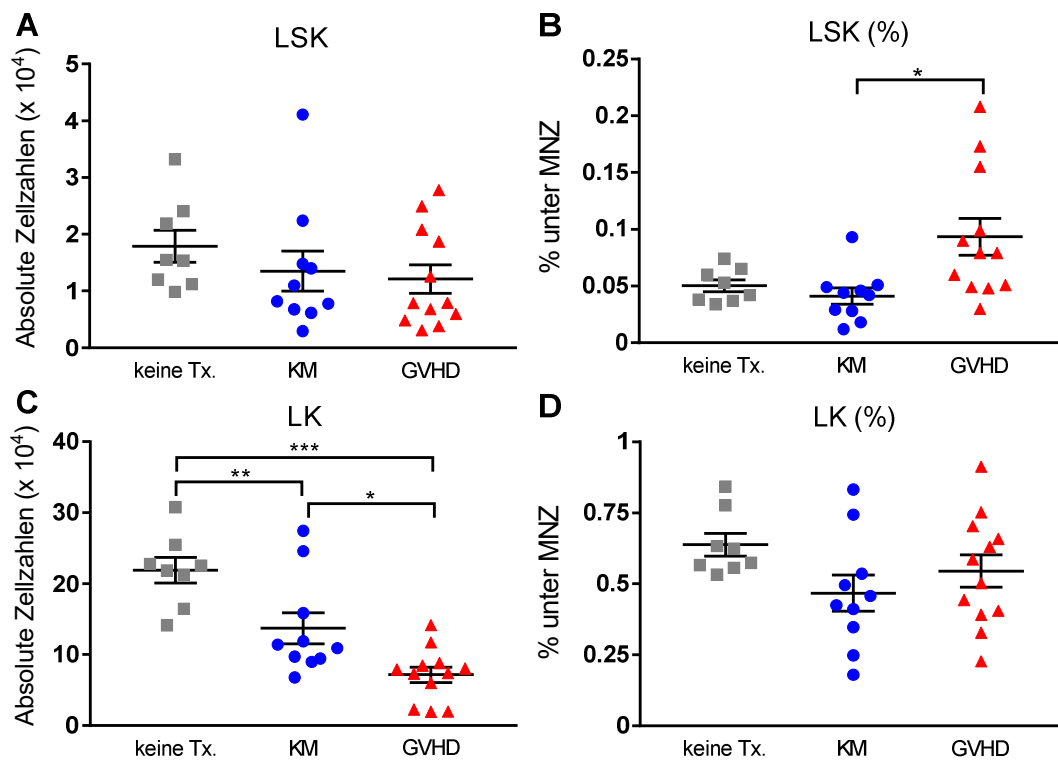
$lin^- c-kit^{low} Sca-1^{low} CD127^+ Flt3^+$  Zellen (CLP 1) und bereits B-Zell-restringierte  $lin^- c-kit^{low} Sca-1^{low} CD127^+ Flt3^-$  Zellen (CLP 2).



**Abbildung 4.7 Gating-Strategie und repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse von HSC und Progenitorzellen im KM an Tag 28 nach MHC-differenter SZT alleine oder mit GVHD-Induktion.** BALB/c Mäuse wurden nach letaler Bestrahlung (9 Gy) mit  $2,5 \times 10^6$  C57BL/6 KM alleine (KM-Gruppe) oder zusätzlich mit  $1 \times 10^6$  C57BL/6 Milzzellen (GVHD-Gruppe) transplantiert. Als Kontrolle diente KM aus nicht-transplantierten und unbehandelten C57BL/6 Mäusen („keine Tx.“-Gruppe). Nach Ausschluss von linienrestringierten, reifen Zellen durch Gating auf lineage negative Zellen ( $lin^-$ ), wurden zunächst LSK-Zellen (ST-HSC, LT-HSC und MPP) und LK-Zellen (CMP, GMP und MEP) analysiert. Anschließend wurden diese ebenfalls ausgeschlossen und die CLP 1- (oligopotente lymphoide Vorläuferzellen) und CLP 2- (B-Zell-restringierte lymphoide Vorläuferzellen) Populationen bestimmt.



In der KM-Gruppe zeigten sich  $1,4 \pm 0,3 \times 10^4$  (absolute Zellzahlen) und  $0,041 \pm 0,007$  % (unter MNZ) LSK-Zellen. Im Vergleich dazu ließ sich ein vergleichbarer absoluter ( $1,8 \pm 0,3 \times 10^4$ ) und prozentualer ( $0,051 \pm 0,005$  %) LSK-Zellgehalt in der unbehandelten Kontrollgruppe detektieren (**Abbildung 4.8**). Die GVHD-Gruppe wies mit  $1,2 \pm 0,3 \times 10^4$  keine signifikanten Unterschiede für die absolute Zellzahl der LSK-Population im Vergleich zur KM- und unbehandelten Kontrollgruppe auf, jedoch waren prozentual gesehen ( $0,093 \pm 0,016$  %) mehr LSK-Zellen in der GVHD-Gruppe vorhanden (im Vergleich zur KM-Gruppe:  $p = 0,01$ ).

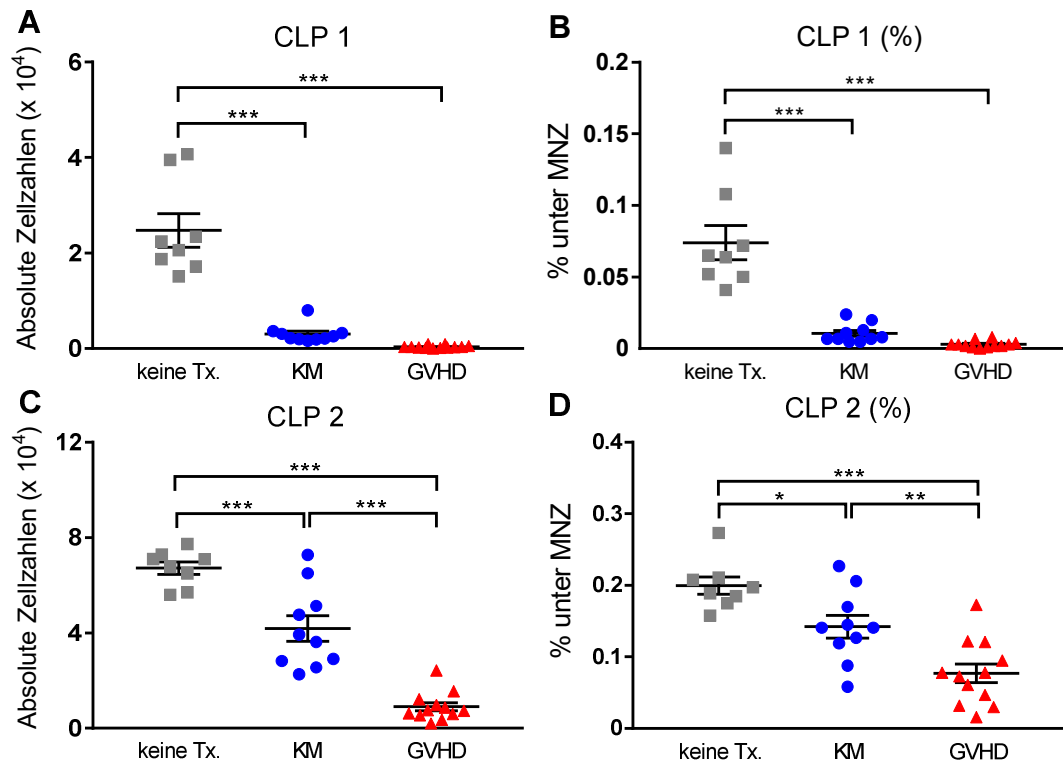


**Abbildung 4.8** Durchflusszytometrische Analyse von LSK- und LK-Zellen im KM an Tag 28 nach MHC-differenter KM-Transplantation und GVHD-Induktion. BALB/c Mäuse wurden nach letaler Bestrahlung mit 9 Gy (an Tag 0) mit  $2,5 \times 10^6$  C57BL/6 KM-Zellen alleine (KM-Gruppe ●,  $n=10$ ) oder zusätzlich mit  $1 \times 10^6$  C57BL/6 Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲,  $n=12$ ) transplantiert. Als Kontrolle diente KM aus nicht-transplantierten, unbehandelten C57BL/6-Mäusen („keine Tx.“-Gruppe ■,  $n=8$ ). **A** und **B** zeigen die LSK-Populationen (ST-HSC, LT-HSC und MPP) mit absolutem und prozentualem Zellgehalt unter allen MNZ. In **C** und **D** werden der absolute und prozentuale LK-Zellgehalt (CMP, GMP und MEP) unter allen MNZ dargestellt. Gezeigt werden die MW der Zellzahlen aus zwei Hinterläufen (Femur und Tibia)  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Die KM-Gruppe hatte  $13,7 \pm 2,2 \times 10^4$  bzw.  $0,467 \pm 0,064$  % LK-Zellen. Dies unterschied sich signifikant ( $p = 0,009$ ) nur von dem absoluten ( $21,9 \pm 1,8 \times 10^4$ ), aber nicht dem prozentualen ( $0,638 \pm 0,04$  %) LK-Zellgehalt der unbehandelten

Kontrollgruppe. In der GVHD-Gruppe waren  $7,2 \pm 1,1 \times 10^4$  bzw.  $0,545 \pm 0,057$  % LK-Zellen nachweisbar. Im Vergleich zur KM- und unbehandelten Kontrollgruppe war dies ein signifikant niedrigerer absoluter ( $p = 0,02$  und  $p < 0,001$ ), aber nicht prozentualer LK-Zellgehalt. Insgesamt konnten wir also keine Unterschiede bezüglich der LK-Populationen zwischen den einzelnen Gruppen detektieren. Der LSK-Zellgehalt waren in der KM- und unbehandelten Kontrollgruppe sehr ähnlich, während sich in der GVHD-Gruppe ein erhöhter LSK-Zellgehalt zeigte.

In der KM-Gruppe wurden  $0,3 \pm 0,06 \times 10^4$  (absolute Zellzahlen) bzw.  $0,011 \pm 0,002$  % (unter MNZ) CLP 1-Zellen im KM nachgewiesen. Im Vergleich dazu lag der absolute ( $2,47 \pm 0,35 \times 10^4$ ) und prozentuale CLP 1-Zellgehalt ( $0,074 \pm 0,012$  %) in der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ) höher. Die GVHD-Gruppe hatte mit  $0,04 \pm 0,01 \times 10^4$  bzw.  $0,003 \pm 0,001$  % am wenigsten CLP 1-Zellen ( $p$  jeweils  $< 0,001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe). Zwischen KM- und GVHD-Gruppe bestand bezüglich der CLP 1-Population kein signifikanter Unterschied. In der KM-Gruppe lag der CLP 2-Zellgehalt bei  $4,18 \pm 0,54 \times 10^4$  (absolute Zellzahl) bzw.  $0,142 \pm 0,016$  % (unter MNZ). Dies war im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe ( $6,72 \pm 0,27 \times 10^4$  bzw.  $0,2 \pm 0,012$  % CLP 2-Zellen) ein bereits signifikant ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,03$ ) niedrigerer CLP 2-Zellgehalt. Allerdings war die CLP 2-Population in der GVHD-Gruppe mit  $0,91 \pm 0,17 \times 10^4$  Zellen und  $0,077 \pm 0,013$  % unter MNZ noch deutlicher reduziert. Damit waren sowohl der absolute als auch der prozentuale CLP 2-Zellgehalt der GVHD-Gruppe im Vergleich zur KM- und zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ) erniedrigt (**Abbildung 4.9**).



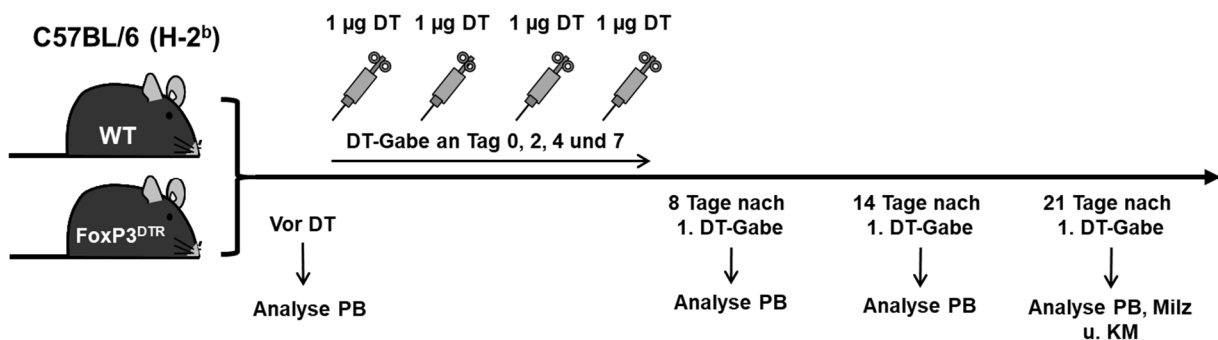
**Abbildung 4.9** Durchflusszytometrische Analyse lymphatischer Progenitorzellen im KM an Tag 28 nach MHC-differenter KM-Transplantation und GVHD-Induktion. BALB/c Mäuse wurden nach letaler Bestrahlung mit 9 Gy (an Tag 0) mit  $2,5 \times 10^6$  C57BL/6 KM-Zellen alleine (KM-Gruppe ●, n=10) oder zusätzlich mit  $1 \times 10^6$  C57BL/6 Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, n=12) transplantiert. Als Kontrolle diente KM aus nicht-transplantierten, unbehandelten C57BL/6-Mäusen („keine Tx.“-Gruppe ■, n=8). **A** und **B** zeigen die CLP 1-Populationen (oligopotente, lymphoide Vorläuferzellen) mit absolutem und prozentualem Zellgehalt unter allen MNZ. In **C** und **D** werden der absolute und prozentuale CLP 2-Zellgehalt (B-Zell-restringierte Vorläuferzellen) unter allen MNZ dargestellt. Gezeigt werden die MW der Zellzahlen aus zwei Hinterläufen (Femur und Tibia)  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Während eine KM-Transplantation in dieser Konstellation also per se bereits zu einem signifikanten Rückgang oligopotenter (CLP 1) und B-Zell-restringierter (CLP 2) lymphatischer Vorläuferzellen führt, kommt es bei Auftreten einer zusätzlichen GVHD zu einer noch deutlicheren Abnahme B-Zell-restringierter CLP 2-Zellen. Dies untermauert die Vermutung einer GVHD-induzierten Blockierung der B-Zell-Lymphopoese im Knochenmark.

## 4.2 Auswirkungen einer *in vivo* Treg-Ablation auf B-Zellen und deren Vorläuferzellen im Knochenmark

Ein weiterer typischer Effekt einer akuten GVHD auf die Immunrekonstitution ist eine verzögerte Regeneration von Treg-Zellen (196). Die Ko-Transplantation einer unphysiologisch hohen Anzahl an Spender-Treg-Zellen schützt wiederum lymphatische und andere Zielorgane vor einer Schädigung durch eine akute GVHD und ermöglicht dadurch auch eine verzögerte, aber schlussendlich vollständige B-Zell-Rekonstitution. Wir untersuchten daher, welche Rolle Treg unter physiologischen Bedingungen – also ohne Transplantation – für die Hämatopoese und speziell für die B-Zell-Entwicklung im KM spielen. Zu diesem Zweck nutzten wir ein von Rudensky et al. (193) etabliertes murines Treg-Ablationsmodell und analysierten durchflusszytometrisch die Folgen einer Treg-Ablation auf reife B-Zellen und deren Vorläuferzellen im KM.

Die Grundlage des Modells bilden genetisch modifizierte Foxp3-DTR/EGFP-C57BL/6 (FoxP3<sup>DTR</sup>) Mäuse. Unter normalen Umständen sind murine Zellen aufgrund von fehlenden Rezeptoren gegen Diphtherietoxin (DT) resistent. FoxP3<sup>DTR</sup> Mäuse exprimieren allerdings den humanen DT-Rezeptoren (DTR) und EGFP unter der Kontrolle des FoxP3 Promotors. Dadurch können Treg einerseits über EGFP nachgewiesen werden. Andererseits werden FoxP3-exprimierende Zellen (=Treg) selektiv empfindlich für DT und können so gezielt eliminiert werden. Die Gabe des DT erfolgte durch i.p. Injektion an Tag 0, 2, 4 und 7 in einer Dosis von jeweils 1 µg DT pro FoxP3<sup>DTR</sup> Maus (Treg-Ablationsgruppe).



**Abbildung 4.10 Behandlungsschema und Kontrolle der Treg-Ablation.** FoxP3<sup>DTR</sup> Mäuse (Treg-Ablationsgruppe) exprimieren den humanen DTR unter der Kontrolle des FoxP3 Promotors. Ihre FoxP3-exprimierende Zellen (= Treg) können daher mittels DT gezielt ablatiert werden. Die Ablation erfolgte durch 4-malige DT-Gabe (1 µg DT) an Tag 0, 2, 4 und 7 mittels i.p. Injektion. Als Kontrollgruppe dienten wt. C57BL/6 Mäuse (B6\_WT-Gruppe). An Tag 0 (vor DT-Injektion) Tag 8, 14 und 21 nach der 1. DT-Gabe wurde das PB und an Tag 21 zusätzlich KM und Milz der Tiere durchflusszytometrisch untersucht.

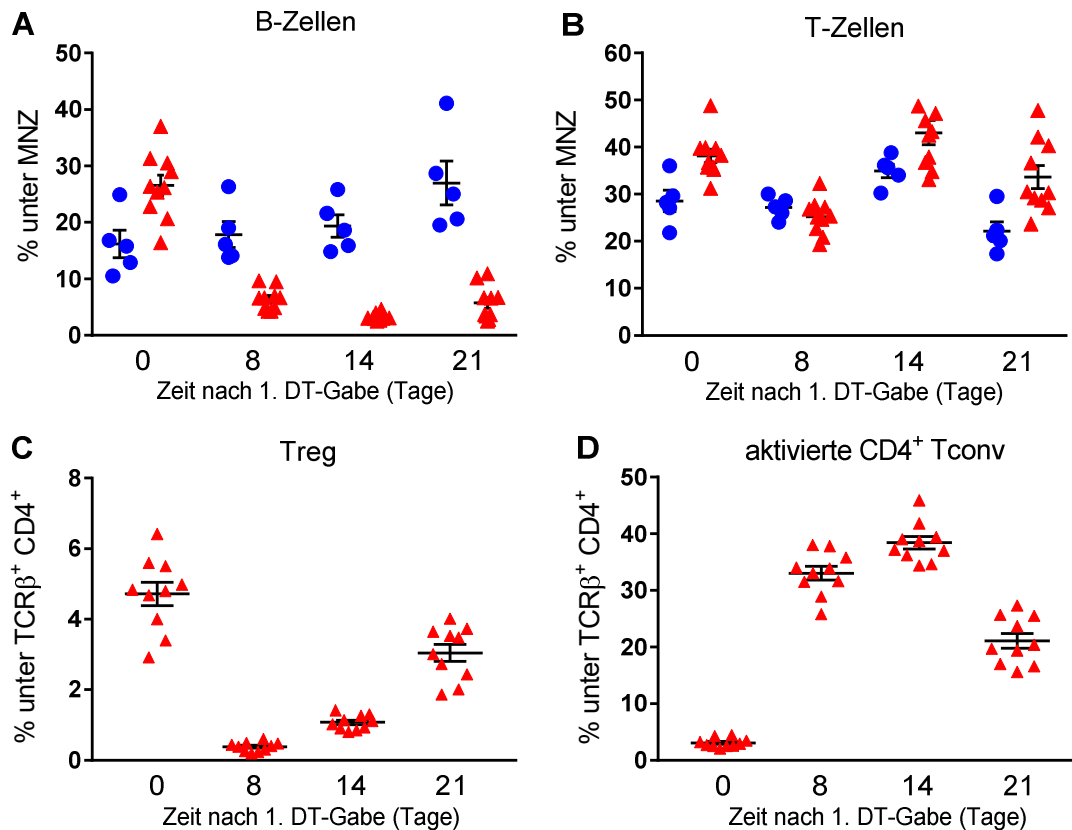
Als Kontrollgruppe dienten parallel mit je 1 µg DT behandelte Wildtyp C57BL/6 Mäuse (B6\_WT-Gruppe). An Tag 8, 14 und 21 nach der 1. DT-Gabe wurde das PB der Mäuse durchflusszytometrisch untersucht. Zusätzlich wurden am Versuchsende (Tag 21) auch Milz und KM durchflusszytometrisch analysiert und die Werte zusätzlich mit denen unbehandelter FoxP3<sup>DTR</sup> Tiere verglichen (**Abbildung 4.10**).

#### **4.2.1 Untersuchung von B- und T-Zellen im peripheren Blut während der Treg-Ablation**

Gesamt T-Zellen wurden als TCRβ<sup>+</sup> und B-Zellen als CD19<sup>+</sup> Zellen definiert. Die Identifizierung der Treg gelang mithilfe der Oberflächenmoleküle TCRβ, CD4, CD25 und zusätzlich EGFP bzw. FoxP3. In früheren Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Rudensky et al. wurde nach Treg-Depletion eine gestörte Immunhämostase und eine Aktivierung von Effektor-T-Zellen nachgewiesen. Daher analysierten wir zusätzlich die Expression von CD25 als Aktivierungsmarker auf CD4<sup>+</sup> konventionellen T-Zellen (CD4<sup>+</sup> Tconv, definiert als TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> EGFP<sup>-</sup> bzw. FoxP3<sup>-</sup>).

Vor der ersten DT-Gabe zeigte sich im Blut der FoxP3<sup>DTR</sup> Mäuse mit  $4,7 \pm 0,3$  % unter CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine normale Treg-Zahl. Die Anzahl aktivierter CD4<sup>+</sup> Tconv war mit  $3,1 \pm 0,2$  % unter CD4<sup>+</sup> T-Zellen noch sehr niedrig. Einen Tag nach der letzten DT-Gabe sank die Treg-Zahl auf ein Minimum von  $0,4 \pm 0,04$  % stark ab. Parallel dazu sahen wir eine starke Aktivierung von CD4<sup>+</sup> Tconv, welche  $33 \pm 1,2$  % aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausmachten. Nach weiteren 7 Tagen Beobachtungszeitraum ohne weitere DT-Gabe stieg die Treg-Zahl auf  $1,1 \pm 0,07$  % langsam wieder an. Trotzdem nahm die Anzahl aktivierter CD4<sup>+</sup> Tconv nochmals zu und erreichte mit  $38,4 \pm 1,1$  % ihr Maximum. Die Anzahl der Treg erholte sich anschließend weiter und erreichte am Ende des Versuchs  $3,1 \pm 0,2$  % (21 Tage nach der ersten bzw. 14 Tage nach der letzten DT-Gabe). Ihr Ausgangsniveau vor DT-Gabe wurde damit dennoch nicht erreicht. Zeitgleich nahm die Anzahl aktivierter CD4<sup>+</sup> Tconv mit  $21,1 \pm 1,3$  % erstmalig wieder ab, womit jedoch weiterhin deutlich mehr aktivierte CD4<sup>+</sup> Tconv als vor DT-Gabe detektiert wurden.

Direkt nach dem Ende der Treg-Ablation sank die Anzahl der T-Zellen im PB von FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen von  $38,1 \pm 1,5$  % unter MNZ auf  $25,2 \pm 1,2$  %. 7 Tage nach der letzten DT-Gabe erholte sich die T-Zellzahl auf  $43,1 \pm 2,6$  % und zeigte bis zum Versuchsende nur einen leichten Rückgang auf  $33,6 \pm 2,4$  %. Die T-Zellzahlen der parallel mit DT behandelten C57BL/6 Mäuse zeigten keine relevanten Veränderungen.

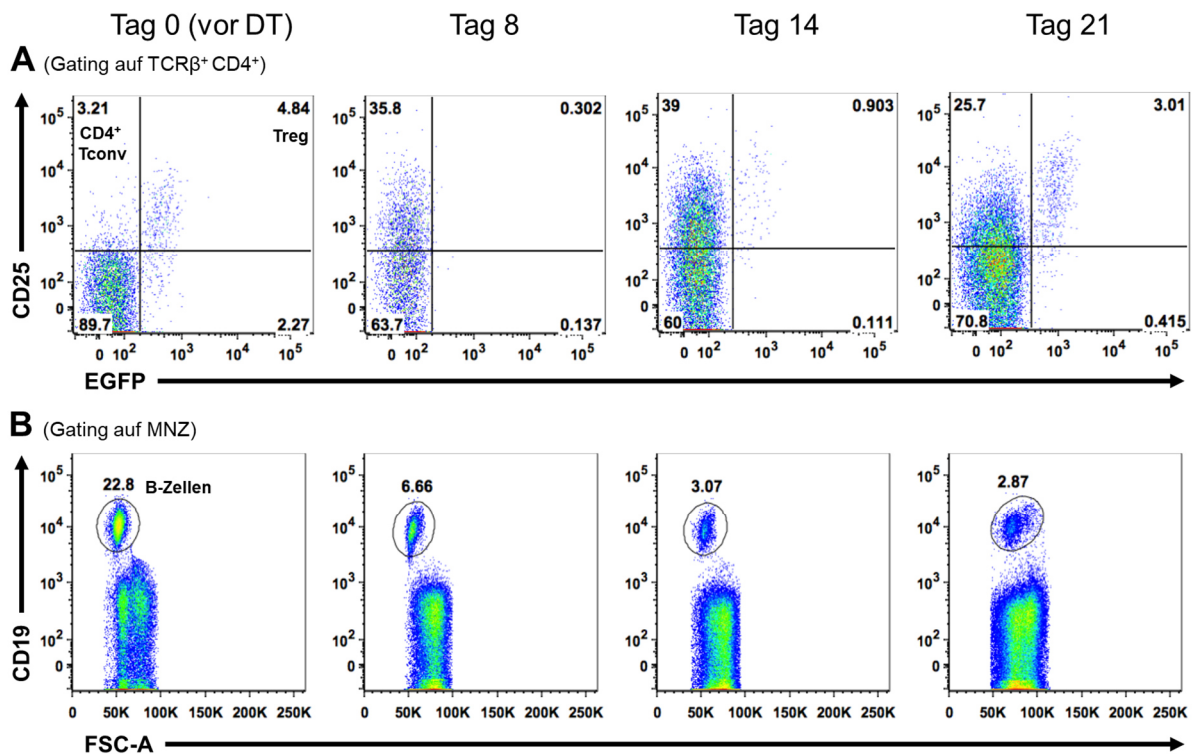


**Abbildung 4.11 Durchflusszytometrische Untersuchung des reifen B- und T-Zell-Kompartiments im PB vor und nach (ab Tag 8) Treg-Ablation.** Treg von FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen können mittels DT gezielt ablatiert werden. Die Ablation erfolgte durch 4-malige DT-Gabe ( $1 \mu\text{g}$  DT) an Tag 0, 2, 4 und 7 mittels i.p. Injektion (FoxP3<sup>DTR</sup> ▲,  $n=10$ ). Unbehandelte C57BL/6 Mäuse (B6 ●,  $n=5$ ) dienten als Kontrollgruppe. Gezeigt werden der prozentuale B- (A) und T-Zellgehalt (B) an MNZ und der prozentuale Zellgehalt von Treg (C) und aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv (D) an CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dargestellt werden MW  $\pm$  SEM der prozentualen Zellzahlen.

Vor DT-Gabe zeigte sich mit  $26,6 \pm 1,8$  % in FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen eine normale Anzahl reifer B-Zellen unter MNZ. Jedoch sank die B-Zellzahl bereits direkt nach Ende der Treg-Ablation dramatisch ab und lag nur noch bei  $6,4 \pm 0,6$  %. Trotz sich erholender Treg-Zahlen blieb die Anzahl reifer B-Zellen in FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen auf einem sehr niedrigen Niveau (Tag 14:  $3,6 \pm 0,20$  %, Tag 21:  $6,6 \pm 1,1$  %) und erholte sich bis zum Versuchsende nicht. C57BL/6 Mäuse hatten mit  $16,2 \pm 2,6$  % vor DT-Gabe zwar etwas

weniger reife B-Zellen als FoxP3<sup>DTR</sup> Mäuse, jedoch blieb die Anzahl ihrer B-Zellen nach Treg-Ablation während des gesamten Untersuchungszeitraums konstant. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Untersuchungen des PB sind in **Abbildung 4.11** dargestellt.

Zusammenfassend konnten wir mit dem hier verwendeten Behandlungsschema eine effektive Treg-Ablation in FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen erreichen. Die Treg-Zahl erholte sich im Anschluss daran nur langsam und erreichte auch 14 Tage nach der letzten DT-Gabe noch nicht vollständig ihr Ausgangsniveau. Parallel zur Treg-Ablation ließ sich eine deutliche Aktivierung CD4<sup>+</sup> Tconv beobachten, die trotz Erholung der Treg nur langsam zurückging und bis zum Versuchsende persistierte.



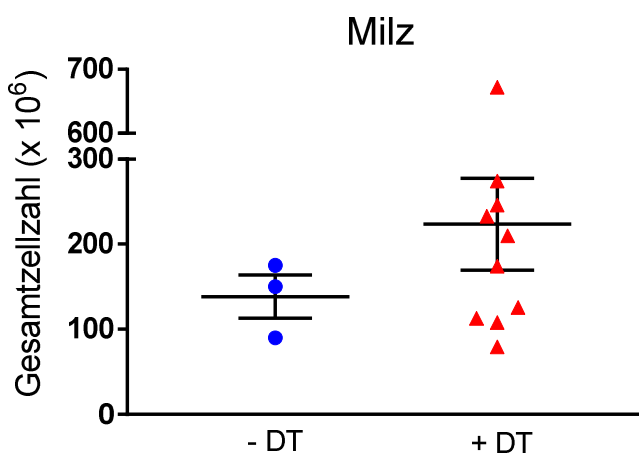
**Abbildung 4.12 Repräsentative Dot-plots der durchflusszytometrischen Analyse des PB vor und nach (ab Tag 8) Treg-Ablation in FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen.** Treg von FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen können mittels DT gezielt ablatiert werden. Die Ablation erfolgte durch 4-malige DT-Gabe (1 µg DT) an Tag 0, 2, 4 und 7 mittels i.p. Injektion. Gezeigt wird das Gating auf TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen (**A**). Dieser Plot verdeutlicht, dass die Treg-Ablation erfolgreich verlaufen war und sich die Treg (CD25<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup>) nach Beendigung der DT-Gabe langsam wieder erholten. Parallel zur Treg-Ablation fand sich eine stark erhöhte Anzahl aktivierter CD4<sup>+</sup> Tconv (CD25<sup>+</sup> GFP<sup>-</sup>), die auch mit Treg-Regeneration nur leicht zurückging und bis zum Versuchsende persistierte. Die Anzahl reifer B-Zellen (**B**, CD 19<sup>+</sup>, Gating auf MNZ) ging nach Treg-Ablation stark zurück und erholte sich trotz Treg-Regeneration bis zum Versuchsende nicht.

Die Treg-Ablation hatte einen eindrucklichen Effekt auf das reife B-Zell-Kompartiment. Direkt im Anschluss an die letzte DT-Gabe war die B-Zellzahl in FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen

dramatisch reduziert und erholte sich trotz einsetzender Treg-Regeneration bis zum Versuchsende nicht. In repräsentativen Dot-plots (**Abbildung 4.12**) lassen sich diese Beobachtungen durch Gegenüberstellung von Treg (CD25<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup>), aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv (CD25<sup>+</sup> GFP<sup>-</sup>) und reifen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) im zeitlichen Verlauf eindrücklich darstellen.

#### 4.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Milz

21 Tage nach der ersten DT-Gabe erfolgte die tierschutzkonforme Tötung der Mäuse und die durchflusszytometrische Untersuchung von Milz und KM. Als Kontrollgruppe für die Untersuchungen wurden unbehandelte FoxP3<sup>DTR</sup> Tiere (-DT) untersucht. Neben B- und T-Zellen inklusive Treg und aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv (vgl. 4.2.1) wurden CD4<sup>+</sup> (TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) und CD8<sup>+</sup> (TCRβ<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) T-Zellzahlen ermittelt. Die Milzen der Treg-Ablationsgruppe (+DT) waren bereits makroskopisch deutlich vergrößert und wiesen eine schwammige Konsistenz auf. Außerdem war auch die Gesamtzellzahl mit  $223,6 \pm 54,0 \times 10^6$  Zellen / Milz gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe ( $138,2 \pm 25,1 \times 10^6$  Zellen) fast verdoppelt (**Abbildung 4.13**).



**Abbildung 4.13 Bestimmung der Gesamtzellzahl der Milz nach Treg-Ablation (21 Tage nach der 1. DT-Gabe).** Treg von FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen können mittels DT gezielt ablatiert werden. Die Ablation erfolgte durch 4-malige DT-Gabe (1 µg DT) an Tag 0, 2, 4 und 7 mittels i.p. Injektion (+DT ▲, n=10). Unbehandelte FoxP3<sup>DTR</sup> Mäuse (-DT ●, n=3) dienen als Kontrollgruppe. Gezeigt werden die MW der Zellzahlen pro Organ ± SEM.

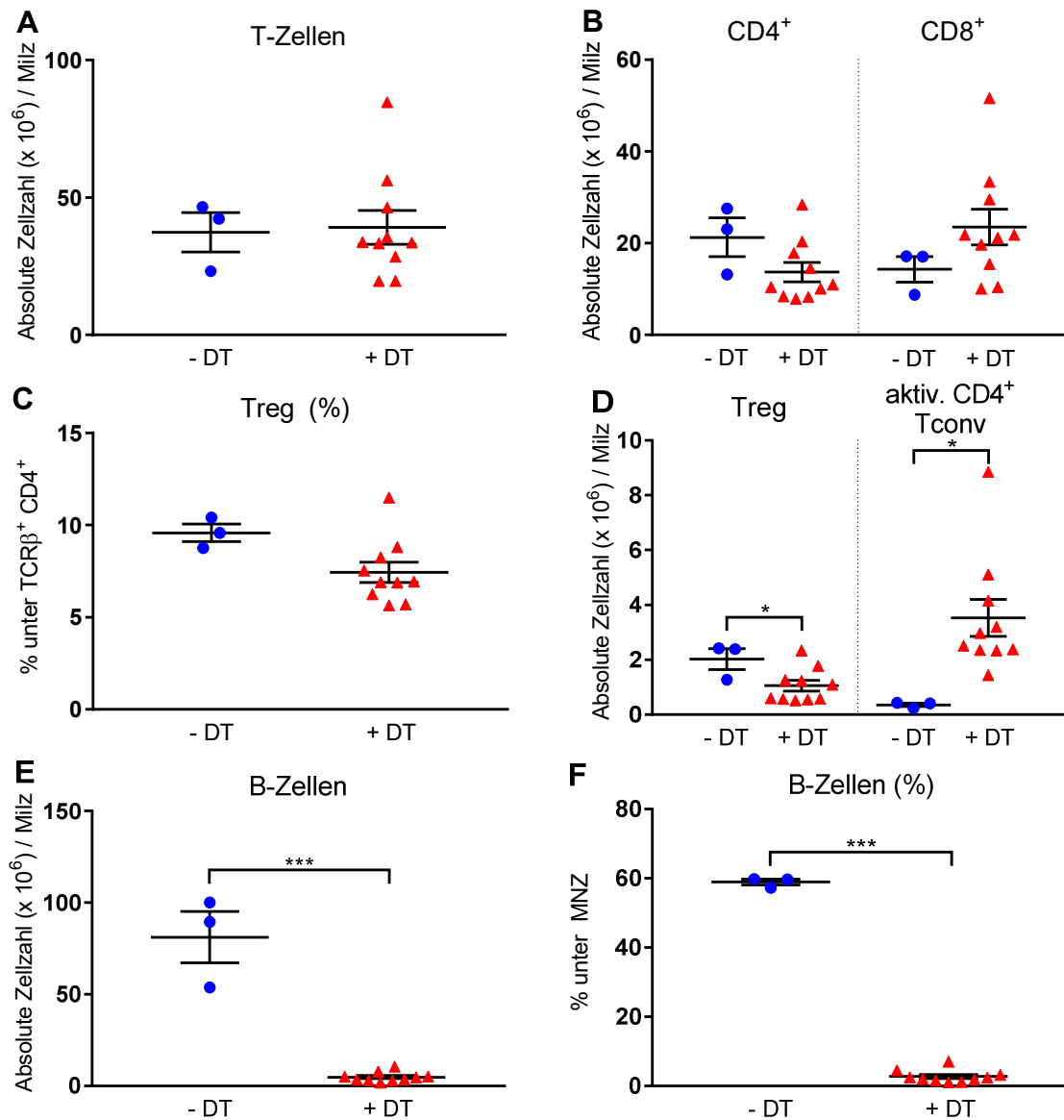
In der Treg-Ablationsgruppe konnten insgesamt  $39,1 \pm 6,1 \times 10^6$  T-Zellen / Milz (Organ) nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigten sich mit  $37,4 \pm 7,2 \times 10^6$  ähnlich viele T-Zellen in unbehandelten FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen. Nach Analyse der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Subpopulationen lagen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Treg-Ablation bei  $13,7 \pm 2,1 \times 10^6$  Zellen, während in der unbehandelten Kontrollgruppe mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $21,3 \pm 4,2 \times 10^6$ ) nachweisbar waren. Umgekehrt verhielten sich CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Es fanden sich in der Treg-Ablationsgruppe  $23,5 \pm 3,9 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen und damit mehr CD8<sup>+</sup> T-



Zellen als in der unbehandelten Kontrollgruppe ( $14,3 \pm 2,8 \times 10^6$ ). Das Verhältnis  $CD4^+$  zu  $CD8^+$  T-Zellen verschob sich durch die Treg-Ablation als Hinweis für ein proinflammatorisches Milieu deutlich zu Gunsten  $CD8^+$  T-Zellen (-DT: 1,49 vs. +DT: 0,58).

Trotz erhöhter Gesamtzellzahl waren in der Treg-Ablationsgruppe mit  $1,1 \pm 0,2 \times 10^6$  Zellen signifikant ( $p = 0,04$ ) weniger Treg als in der unbehandelten Kontrollgruppe ( $2,0 \pm 0,5 \times 10^6$  Treg) nachweisbar. Der prozentuale Anteil von Treg an  $CD4^+$  T-Zellen war mit  $7,4 \pm 0,6 \%$  in der Treg-Ablationsgruppe im Vergleich zu unbehandelten FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen ( $9,6 \pm 0,5 \%$ ) leicht erniedrigt. In der Treg-Ablationsgruppe zeigten sich mit  $3,5 \pm 0,7 \times 10^6$  sehr viele, aktivierte  $CD4^+$  Tconv und damit deutlich mehr ( $p = 0,03$ ) als in der unbehandelten Kontrollgruppe ( $0,4 \pm 0,1 \times 10^6$ ). Der B-Zellgehalt in der Treg-Ablationsgruppe war mit  $4,8 \pm 0,8 \times 10^6$  (absolute Zellzahlen) und  $2,7 \pm 0,6 \%$  (unter MNZ) B-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $81,1 \pm 14 \times 10^6$  bzw.  $58,9 \pm 0,8 \%$ ) dramatisch ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ) vermindert. Insgesamt zeigte sich in der Milz 21 Tage nach der 1. DT-Gabe weiterhin ein eingeschränkter Treg-Gehalt begleitet von einem aktivierten T-Zell-Kompartiment (mehr  $CD8^+$  T-Zellen, starke Aktivierung von  $CD4^+$  Tconv). Parallel dazu ließ sich wie im PB auch eine deutliche Reduktion reifer B-Zellen beobachten (**Abbildung 4.14**).

Die durchflusszytometrische Untersuchung o.g. Zellpopulationen wurde parallel auch für die nach gleichem Schema behandelte B6\_WT-Gruppe durchgeführt. Für keine der untersuchten zellulären Kompartimente in der Milz konnten hierbei signifikante Veränderungen durch die DT-Gabe festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

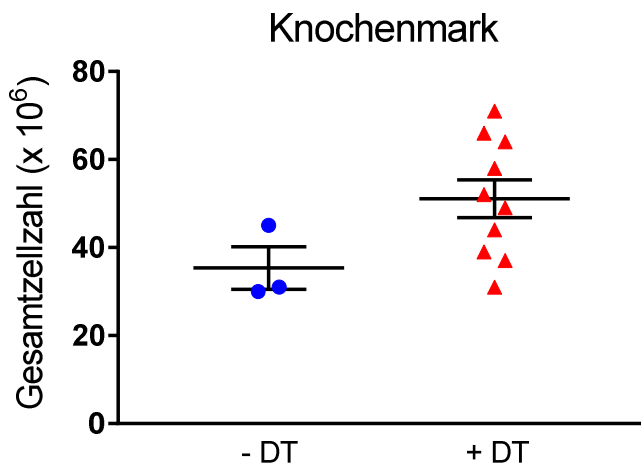


**Abbildung 4.14 Durchflusszytometrische Untersuchung des reifen T- und B-Zell-Kompartiments der Milz nach Treg-Ablation (21 Tage nach der 1. DT-Gabe).** Treg von FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen können mittels DT gezielt ablatiert werden. Die Ablation erfolgte durch 4-malige DT-Gabe (1  $\mu$ g DT) an Tag 0, 2, 4 und 7 mittels i.p. Injektion (+DT  $\blacktriangle$ , n=10). Unbehandelte FoxP3<sup>DTR</sup> Mäuse (-DT  $\bullet$ , n=3) dienen als Kontrollgruppe. Gezeigt werden die absoluten Zellzahlen der T-Zellen (**A**) und ihrer CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen (**B**), der prozentuale Anteil von Treg unter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (**C**) sowie die absoluten Zellzahlen der Treg im Vergleich zu aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv (**D**). Weiterhin wird der absolute (**E**) und prozentuale (**F**) B-Zellgehalt dargestellt. Zu sehen sind die MW der Zellzahlen pro Organ  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau (\* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

#### 4.2.3 Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks

Um die Auswirkungen der Treg-Ablation auf das reife T- und B-Zell-Kompartiment sowie lymphatische Vorläuferzellen im KM zu untersuchen, wurden auch hier die entsprechenden Zellpopulationen inklusive Treg und aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv analysiert

(analog zu 4.2.2.). Die Gesamtzellzahl des Knochenmarks (**Abbildung 4.15**) war 14 Tage nach Ende der Treg-Ablation mit  $51,1 \pm 4,3 \times 10^6$  Zellen / 2 Hinterläufen leicht höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe ( $35,3 \pm 4,8 \times 10^6$ ).



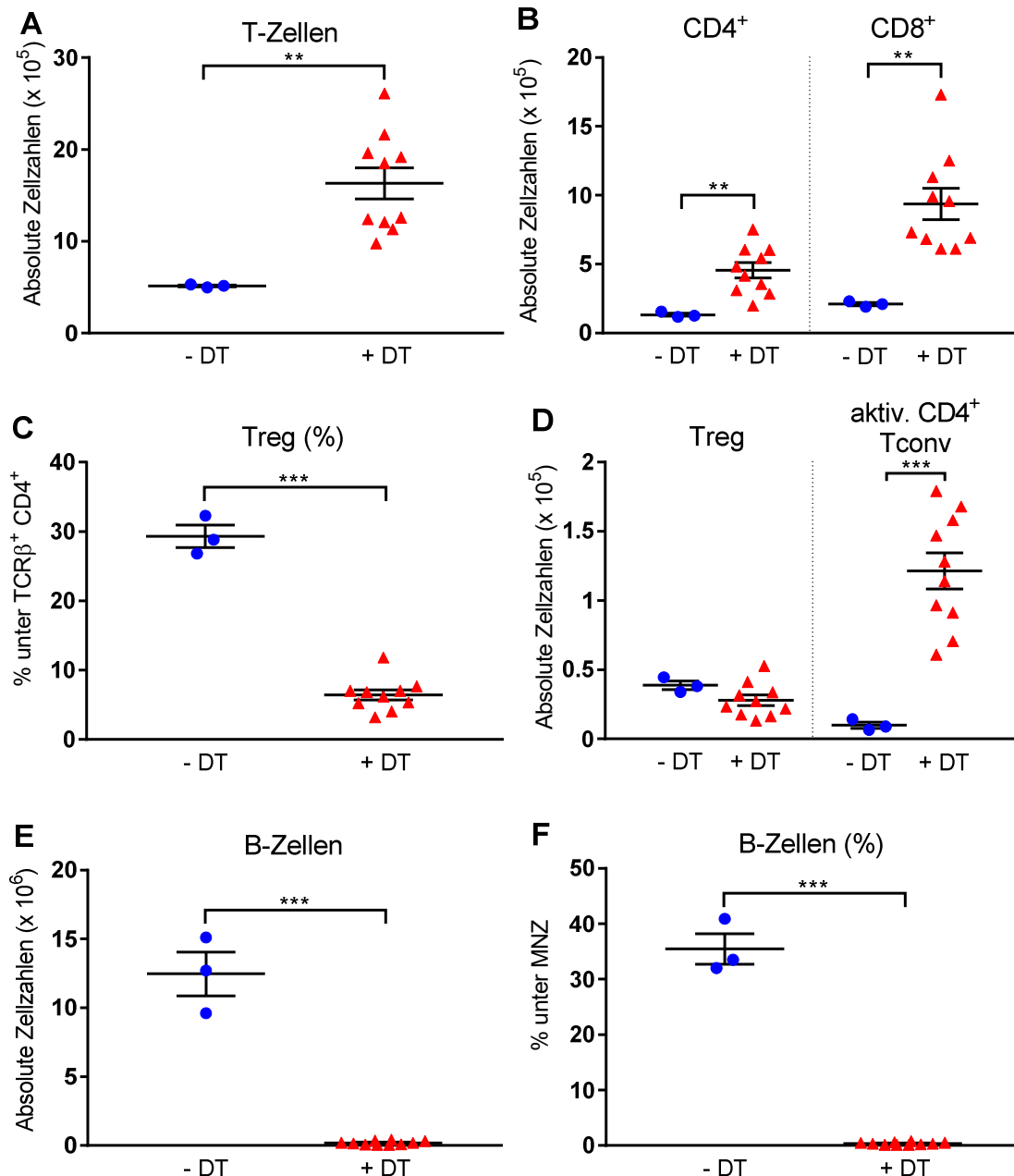
**Abbildung 4.15 Bestimmung der Gesamtzellzahl des KM nach Treg-Ablation (21 Tage nach der 1. DT-Gabe).** Treg von FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen können mittels DT gezielt ablatiert werden. Die Ablation erfolgte durch 4-malige DT-Gabe (1 µg DT) an Tag 0, 2, 4 und 7 mittels i.p. Injektion (+DT ▲, n=10). Unbehandelte FoxP3<sup>DTR</sup> Mäuse (-DT ●, n=3) dienen als Kontrollgruppe. Gezeigt werden MW ± SEM der Gesamtzellzahl aus den zwei Hinterläufen (Femur und Tibia).

#### 4.2.3.1 Analyse des reifen B- und T-Zell-Kompartiments

Im Unterschied zur Milz zeigten sich im KM mit  $16,3 \pm 1,7 \times 10^5$  signifikant ( $p = 0,005$ ) erhöhte T-Zell-Zahlen nach Treg-Ablation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $5,2 \pm 0,09 \times 10^5$ ). Die Anzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen war in der Treg-Ablationsgruppe mit  $4,6 \pm 0,5 \times 10^5$  signifikant ( $p = 0,01$ ) höher als in unbehandelten FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen ( $1,3 \pm 0,1 \times 10^5$ ). Auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen ließen sich signifikant ( $p = 0,006$ ) höhere Zellzahlen nach Treg-Ablation ( $9,4 \pm 1,1 \times 10^5$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $2,1 \pm 0,1 \times 10^5$ ) detektieren. Das Verhältnis CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen verschob sich damit nach Treg-Ablation – anders als in der Milz – nur leicht zu Gunsten CD8<sup>+</sup> T-Zellen (-DT: 0,63 vs. +DT: 0,49).

Ähnlich wie in der Milz war auch im KM 21 Tage nach der ersten DT-Gabe die Anzahl von Treg mit  $0,27 \pm 0,04 \times 10^5$  Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $0,39 \pm 0,03 \times 10^5$ ) vermindert. Der prozentuale Anteil von Treg an CD4<sup>+</sup> T-Zellen lag in der Treg-Ablationsgruppe bei lediglich  $6,42 \pm 0,8 \%$  und damit signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger als in unbehandelten FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen ( $29,3 \pm 1,6 \%$ ). Zeitgleich fand sich eine deutliche ( $p < 0,001$ ) Expansion aktivierter CD4<sup>+</sup> Tconv nach Treg-Ablation (-DT:  $0,1 \pm 0,02 \times 10^5$  vs. +DT:  $1,2 \pm 0,13 \times 10^5$ ). Auch im KM zeigte sich mit  $0,19 \pm 0,04 \times 10^6$  bzw.  $0,37 \pm 0,07 \%$  (unter MNZ) ein deutlich ( $p$  jeweils  $< 0,001$ )

reduzierter B-Zellgehalt in der Treg-Ablationsgruppe im Vergleich zu unbehandelten FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen ( $12,5 \pm 1,6 \times 10^6$  bzw.  $35,5 \pm 2,8 \%$ ).

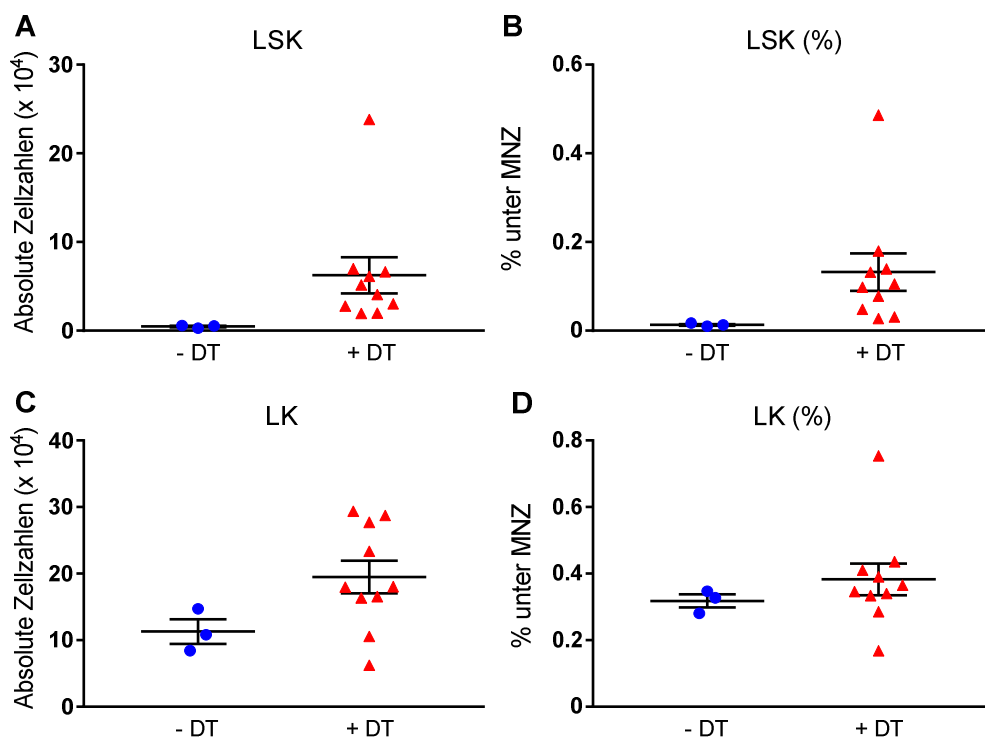


**Abbildung 4.16** Durchflusszytometrische Untersuchung des reifen T- und B-Zell-Kompartiments des KM nach Treg-Ablation (21 Tage nach der 1. DT-Gabe). Treg von FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen können mittels DT gezielt ablatiert werden. Die Ablation erfolgte durch 4-malige DT-Gabe (1  $\mu$ g DT) an Tag 0, 2, 4 und 7 mittels i.p. Injektion (+DT  $\blacktriangle$ , n=10). Unbehandelte FoxP3<sup>DTR</sup> Mäuse (-DT  $\bullet$ , n=3) dienen als Kontrollgruppe. Gezeigt werden die absoluten Zellzahlen der T-Zellen (**A**) und ihrer CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen (**B**), der prozentuale Anteil von Treg unter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (**C**) sowie die absoluten Zellzahlen der Treg im Vergleich mit aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv (**D**). Weiterhin wird der absolute (**E**) und prozentuale (**F**) B-Zellgehalt dargestellt. Zu sehen sind der  $MW \pm SEM$  der Zellzahlen aus den zwei Hinterläufen und das Signifikanzniveau (\*\*p  $\leq$  0,01, \*\*\*p  $\leq$  0,001).

21 Tage nach der ersten DT-Gabe war das Treg-Kompartiment also auch im KM noch nicht vollständig wiederhergestellt. Zeitgleich sahen wir, ähnlich wie in der Milz, eine deutliche Expansion aktivierter  $CD4^+$  Tconv und eine ausgeprägte Reduktion reifer B-Zellen (**Abbildung 4.16**). Relevante Veränderungen in den untersuchten Zellkompartimenten konnten in mit DT behandelten B6\_WT Mäusen auch im KM nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

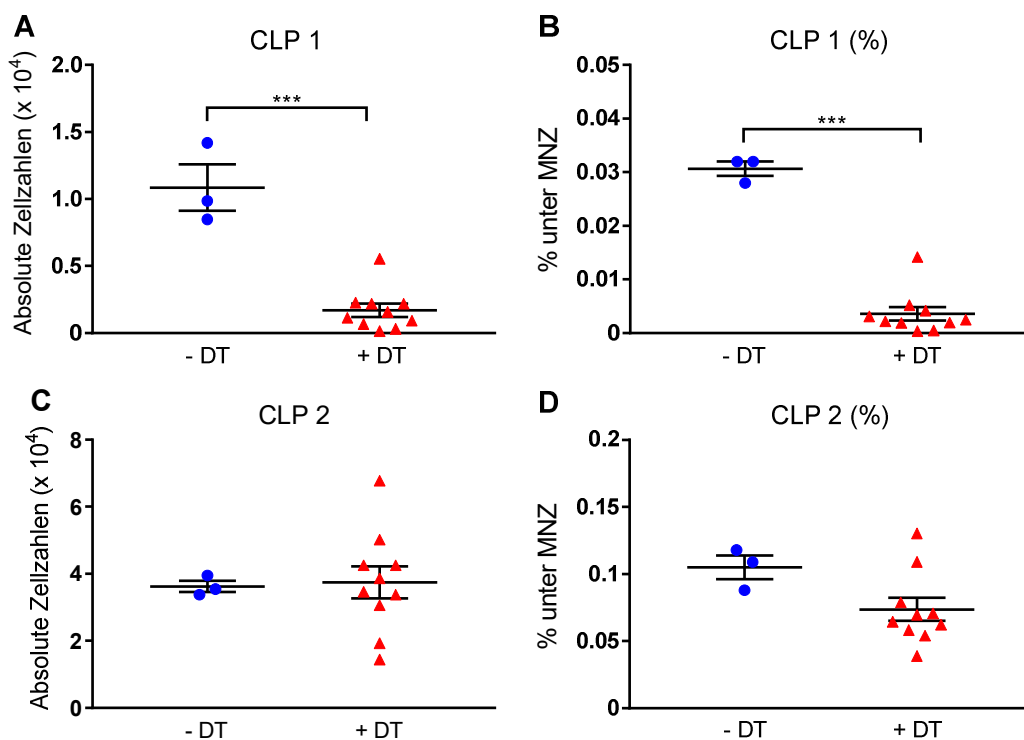
#### 4.2.3.2 Untersuchung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen nach Treg-Ablation

Da sich bereits im KM eine deutliche Reduktion reifer B-Zellen feststellen ließ, lag ein besonderer Fokus auf der durchflusszytometrischen Analyse hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen („LSK“ und „LK“) inklusive lymphatischer Vorläuferzellen (CLP 1 und CLP 2) (vgl. 4.1.2.2).



**Abbildung 4.17** Durchflusszytometrische Analyse hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (LSK und LK-Zellen) im KM nach Treg-Ablation (21 Tage nach der 1. DT-Gabe). Treg von FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen können mittels DT gezielt ablatiert werden. Die Ablation erfolgte durch 4-malige DT-Gabe (1 µg DT) an Tag 0, 2, 4 und 7 mittels i.p. Injektion (+DT ▲, n=10). Unbehandelte FoxP3<sup>DTR</sup> Mäuse (-DT ●, n=3) dienten als Kontrollgruppe. **A** und **B** zeigen den absoluten und prozentualen LSK-Zellgehalt (ST-HSC, LT-HSC und MPP). **C** und **D** zeigen die absoluten und prozentualen Zellzahlen der LK-Population (CMP, GMP und MEP). Dargestellt sind der MW ± SEM der Zellzahlen aus den zwei Hinterläufen.

Der LSK-Zellgehalt war sowohl prozentual (+DT:  $0,133 \pm 0,042$  vs. -DT:  $0,013 \pm 0,002$  % unter MNZ) als auch absolut (+DT:  $6,3 \pm 2,0 \times 10^4$  vs. -DT:  $0,5 \pm 0,1 \times 10^4$  Zellen) gesehen nach Treg-Ablation deutlich erhöht (**Abbildung 4.17**). Auch die absoluten LK-Zellzahlen waren nach Treg-Ablation ( $19,5 \pm 2,5 \times 10^4$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $11,3 \pm 1,8 \times 10^4$ ) leicht erhöht nachzuweisen. Dieser Unterschied ließ sich jedoch nicht für den prozentualen LK-Zellgehalt nachvollziehen (+DT:  $0,383 \pm 0,047$  % vs. -DT:  $0,318 \pm 0,02$  %).



**Abbildung 4.18 Durchflusszytometrische Analyse lymphatisch determinierter Progenitorzellen (CLP 1 und CLP 2) im KM nach Treg-Ablation (21 Tage nach der 1. DT-Gabe).** Treg von FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen können mittels DT gezielt ablatiert werden. Die Ablation erfolgte durch 4-malige DT-Gabe (1 µg DT) an Tag 0, 2, 4 und 7 mittels i.p. Injektion (+DT ▲, n=10). Unbehandelte FoxP3<sup>DTR</sup> Mäuse (-DT ●, n=3) dienten als Kontrollgruppe. **A** und **B** zeigen den absoluten und prozentualen CLP 1-Zellgehalt (oligopotente lymphoide Vorläuferzellen). **C** und **D** zeigen die absoluten und prozentualen Zellzahlen der CLP 2-Population (B-Zell-restringierte Vorläuferzellen). Dargestellt sind MW ± SEM der Zellzahlen aus den zwei Hinterläufen und das Signifikanzniveau (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

Der prozentuale Zellgehalt oligopotenter CLP 1-Zellen unter MNZ lag in der Treg-Ablationsgruppe bei lediglich  $0,004 \pm 0,001$  %. Unbehandelte FoxP3<sup>DTR</sup> Tiere hatten demgegenüber prozentual signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr CLP 1-Zellen ( $0,03 \pm 0,001$  %). Dieser Unterschied ließ sich mit  $0,2 \pm 0,05 \times 10^4$  in der Treg-Ablationsgruppe und  $1,1 \pm 0,2 \times 10^4$  CLP 1-Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe auch für die absoluten

---

Zellzahlen bestätigen ( $p < 0,001$ ). Auch der prozentuale Zellgehalt der B-Zell-restringierten CLP 2-Population war nach Treg-Ablation mit  $0,07 \pm 0,009$  % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe verringert ( $0,1 \pm 0,009$  %). Jedoch wird dieser Unterschied durch eine erhöhte Gesamtzellzahl des KM der Treg-Ablationsgruppe ausgeglichen. Daher waren die absoluten CLP 2-Zellzahlen in beiden Gruppen sehr ähnlich (+DT:  $3,7 \pm 0,5 \times 10^4$  vs. -DT:  $3,6 \pm 0,2 \times 10^4$ ) (**Abbildung 4.18**).

Zusammenfassend konnten wir nach Treg-Ablation (21 Tage nach der 1. DT-Gabe) eine Expansion von LSK-Zellen (hämatopoetische Stammzellen und sehr frühe, multipotente Progenitorzellen) im KM nachweisen. Weiterhin zeigte sich ein Rückgang lymphatisch determinierter Vorläuferzellen. In erster Linie waren oligopotente, lymphatische Progenitorzellen (CLP 1) stark vermindert nachzuweisen, während B-Zell-restringierte CLP 2-Zellen weniger stark betroffen waren. Die untersuchten Zellpopulationen von B6\_WT Mäusen blieben von der DT-Gabe unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt).

### 4.3 Untersuchung indirekter GVL-Effekte gegen B-Zell-Lymphome

Der GVL-Effekt ist für die Eliminierung maligner Zellen nach allogener SZT von zentraler Bedeutung. Hierbei treten GVL-Effekt und GVHD typischerweise zeitgleich auf. Bisher konnten wir zeigen, dass die Rekonstitution gesunder B-Zellen vermutlich durch eine immunologisch-induzierte Schädigung ihrer KM-Nische bei Tieren mit GVHD stark beeinträchtigt ist. Für die immunologische Schädigung der B-Zelle-Nische könnte eine GVHD-vermittelte Treg-Dysbalance mit verantwortlich sein. Wir untersuchten daher, ob diese Mechanismen Teil des GVL-Effekts sind bzw. dazu beitragen (z.B. Störung der Tumorzell-Nische), sofern es sich bei den malignen Erkrankungen um B-Zell-Neoplasien handelt.

Zu diesem Zweck nutzten wir ein kombiniertes haploidentisches GVHD/GVL-Transplantationsmodell, bei dem die aus BALB/c Mäusen stammenden B-Zell-Lymphome *A20-luc/yfp/neo* (H-2<sup>d</sup>) und *Bcl1-gfp/luc* (H-2<sup>d</sup>) eingesetzt werden. *A20-luc/yfp/neo* Tumorzellen wachsen initial v.a. im KM, führen im weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium zu einer Kompression des Myelons durch Infiltration der Meningen und daher bei besonders schweren Verläufen gelegentlich zu einer Paraparese der Hinterläufe. *Bcl1-gfp/luc* Tumorzellen haben anfangs einen Tropismus für Milz und Leber und nehmen später einen leukämischen Verlauf mit Befall des KM und der Lungen. Beide Tumorzelllinien exprimieren nach retroviraler Transduktion das Enzym Luciferase, welches nach i.p. Gabe des Substrats Luciferin ein Lumineszenzsignal erzeugt, das mit Hilfe einer CCD-Kamera (IVIS-System) im lebenden Tier gemessen werden kann (*in vivo* BLI, vgl. 3.2.6.5). Dadurch kann das Ausmaß des Tumorwachstums bzw. der Tumorregression in ein und demselben Versuchstier zeitlich und räumlich verfolgt werden. Durch die gleichzeitige Expression der Markergene YFP bzw. GFP können die Tumorzellen durchflusszytometrisch eindeutig identifiziert und von normalen CD19<sup>+</sup> B-Zellen unterschieden werden.

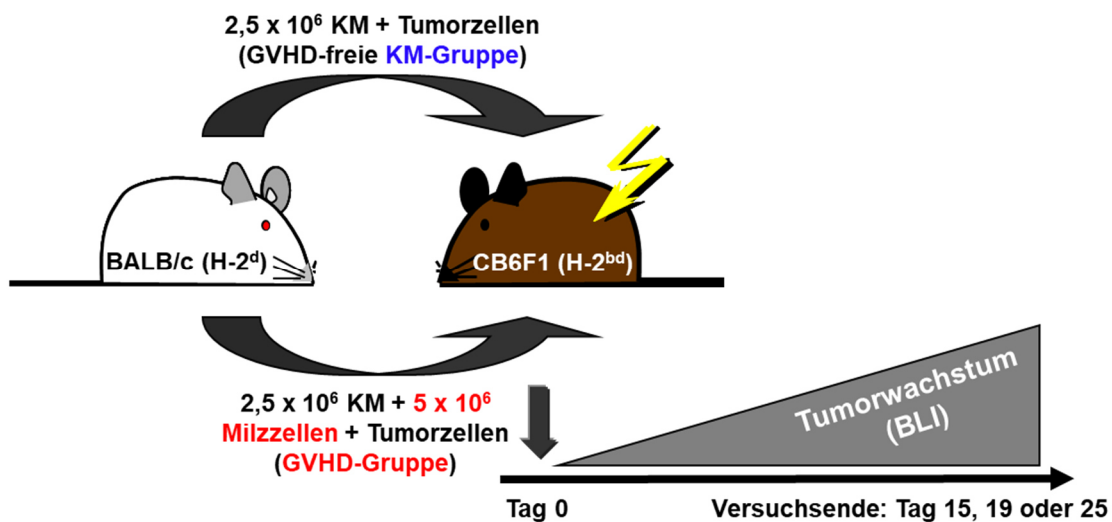
Als Empfängertiere dienten CB6F1 Mäuse (H-2<sup>bd</sup>). Eine akute GVHD kann in diesen Tieren durch T-Zellen aus beiden Elternstämmen (BALB/c (H-2<sup>d</sup>) und C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)) induziert werden. Jedoch haben nur C57BL/6 T-Zellen die Möglichkeit die Tumorzellen über direkte Alloreaktivität zu erkennen und zu zerstören, da beide Tumorzelllinien aufgrund ihres BALB/c Hintergrunds von BALB/c T-Zellen nicht als „fremd“ erkannt



werden. Ein evtl. auftretender GVL-Effekt durch BALB/c T-Zellen kann in diesem Modell also nur durch indirekte Mechanismen (z.B. Schädigung des CB6F1 KM-Stromas) erklärt werden.

#### 4.3.1 Haploidente Transplantation und zeitgleiche GVHD-Induktion

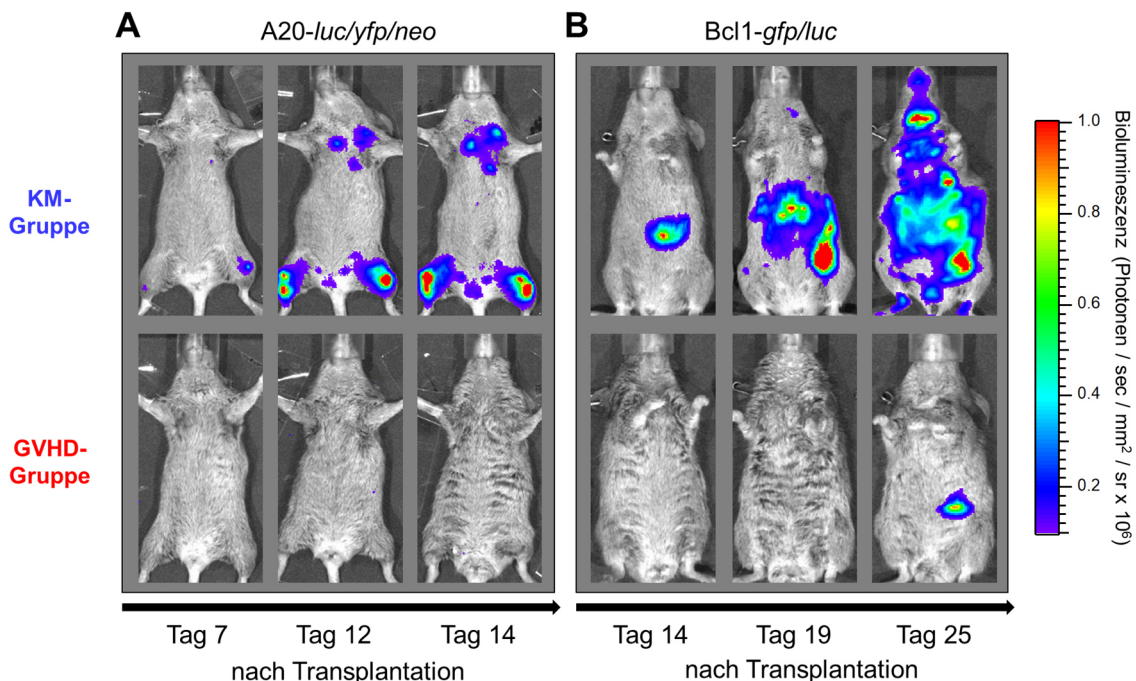
CB6F1 Mäuse (H-2<sup>bd</sup>) wurden an Tag 0 mit 13 Gy (Aufteilung auf 2 Einzeldosen à 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) letal bestrahlt und mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c (H-2<sup>d</sup>) KM-Zellen alleine (GVHD-freie KM-Gruppe) oder zusätzlich mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe) transplantiert. Allen Versuchstieren wurden zeitgleich zur Transplantation  $1 \times 10^4$  Tumorzellen übertragen, wobei für das erste Modell A20-*luc/yfp/neo* (H-2<sup>d</sup>) und für das zweite Modell *Bcl1-gfp/luc* (H-2<sup>d</sup>) Zellen eingesetzt wurden (**Abbildung 4.19**). Im Verlauf des Experiments wurden die Mäuse regelmäßig gewogen und auf äußere Zeichen einer Tumormanifestation (Lähmung der Hinterläufe bei A20-Modell) hin untersucht. Bei Auftreten von Lähmungserscheinungen erfolgte umgehend die tierschutzgerechte Tötung der betroffenen Mäuse.



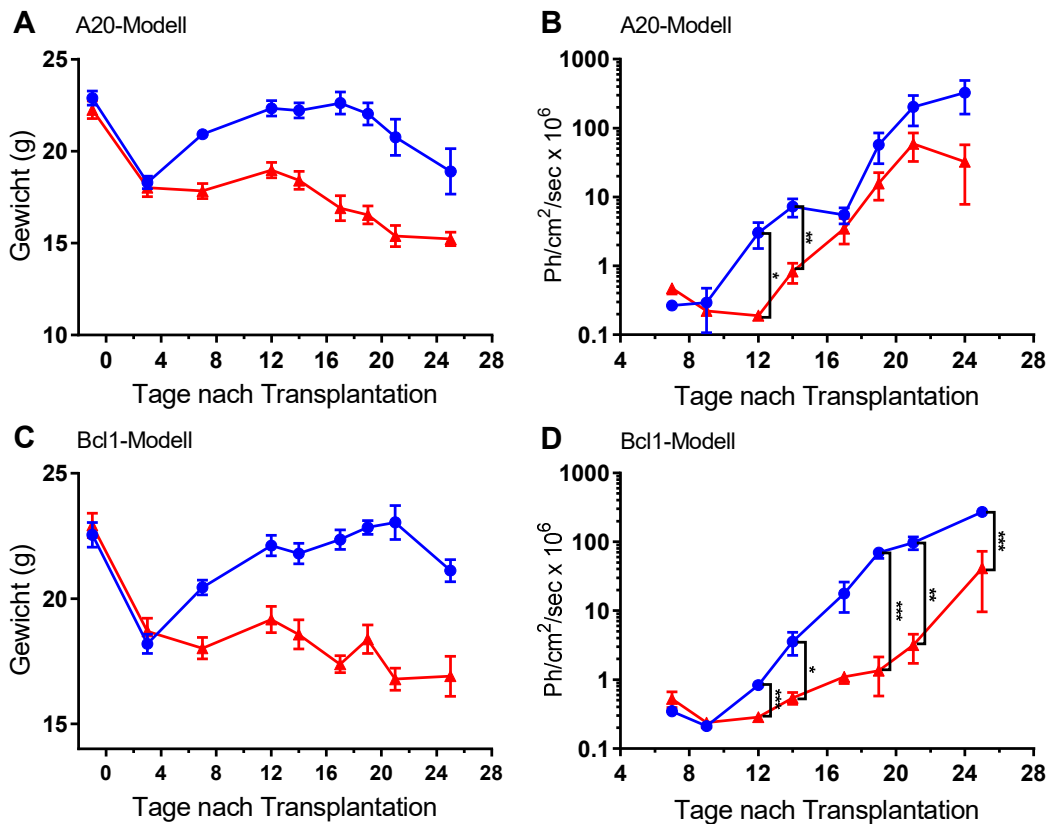
**Abbildung 4.19 Haploidenten GVHD/GVL-Transplantationsmodell mit zeitgleicher GVHD-Induktion.** Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 (H-2<sup>bd</sup>) Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c (H-2<sup>b</sup>) KM alleine (KM-Gruppe) oder zusätzlich mit  $5 \times 10^6$  BALB/c (H-2<sup>b</sup>) Milzzellen (GVHD-Gruppe) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c (H-2<sup>b</sup>) stammende A20-*luc/yfp/neo* oder *Bcl1-gfp/luc* Tumorzellen. Das Tumorwachstum wurde im Anschluss mithilfe von *in vivo* BLI und am Versuchsende (Tag 15, 19 oder 25) zusätzlich durchflusszytometrisch analysiert.

#### 4.3.1.1 Erfassung des Tumorwachstums mittels BLI

In regelmäßigen Abständen wurde das Anwachsen der malignen B-Zellen mittels *in vivo* BLI untersucht. Dazu wurden die Mäuse in Kurzzeitnarkose versetzt und erhielten anschließend eine i.p. Luciferininjektion. Die Messdauer pro Tier betrug jeweils 5 min und die ROI umfasste das gesamte Tier. Mäuse, die *A20-luc/yfp/neo* Tumorzellen trugen, wurden auf dem Rücken liegend von ventral gemessen. Für die Messung der *Bcl1-gfp/luc* Tumorzellen wurden die Tiere jeweils 5 min von ventral und von links lateral aufgenommen (Aufnahme der Milz) und ein MW berechnet. Um Hintergrundphotonenstrahlung auszuschließen, wurde jeweils am Ende der Messungen das Photonensignal einer unbehandelten CB6F1 Maus gemessen und von den Ergebnissen subtrahiert. In **Abbildung 4.20** sind die IVIS-Kameraaufnahmen eines Tieres pro Gruppe und Tumorzelllinie exemplarisch dargestellt. Sie zeigen die primäre Lokalisation von *A20-luc/yfp/neo* im KM (v.a. Femur, Tibia und Sternum) und von *Bcl1-gfp/luc* in Leber und Milz der jeweiligen KM-Kontroll-Tiere.



**Abbildung 4.20** IVIS Kameraaufnahmen des BLI-Signals der B-Zell-Lymphome *A20-luc/yfp/neo* und *Bcl1-gfp/luc* in CB6F1 Mäusen nach haploidenter Transplantation alleine oder zeitgleicher GVHD-Induktion. Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe) oder zusätzlich mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende *A20-luc/yfp/neo* oder *Bcl1-gfp/luc* Tumorzellen. Gezeigt werden exemplarisch Lokalisation und zeitlicher Verlauf des primären Tumorwachstums von *A20-luc/yfp/neo* im KM (**A**; Femur, Tibia und Sternum) und von *Bcl1-gfp/luc* (**B**; Milz und Leber) je einer Maus pro Gruppe und Tumorzelllinie nach i.p. Injektion von Luciferin und einer Messdauer von 5 min.



**Abbildung 4.21** Gewichtsverlauf von CB6F1 Empfängertieren (A und C) und BLI-Signalverlauf von *A20-luc/yfp/neo* und *Bcl1-gfp/luc* Tumorzellen (B und D) nach haploidenter Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion. Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe ●, n=15 je Tumormodell) oder zusätzlich mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, n=15 je Tumormodell) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende *A20-luc/yfp/neo* oder *Bcl1-gfp/luc* Tumorzellen. Dargestellt sind MW  $\pm$  SEM des Gewichts und der BLI-Messung nach i.p. Injektion von Luciferin und einer Messdauer von 5 min pro Tier sowie das Signifikanzniveau ( $p^* \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$ ).

Die BLI-Messungen für *A20-luc/yfp/neo* zeigten bis einschließlich Tag 9 nach Transplantation ein langsames Anwachsen des Tumors ohne signifikante Unterschiede zwischen der GVHD freien KM-Gruppe und Empfängertieren mit GVHD (**Abbildung 4.21 B**). An Tag 12 und 14 ließen sich in der GVHD-Gruppe signifikant ( $p = 0,03$  und  $p = 0,07$ ) niedrigere BLI-Signale im Vergleich zur KM-Gruppe nachweisen. Anschließend zeigte sich in beiden Gruppen als Ausdruck einer steigenden Tumorlast eine Zunahme des BLI-Signals. Die Höhe des Signals der GVHD-Tiere blieb dabei zu allen Messzeitpunkten unterhalb des BLI-Signals der KM-Gruppe. Die Tumorlast erreichte in der GVHD Gruppe an Tag 21 ihr Maximum und fiel bis zum Versuchsende sogar wieder etwas ab, während das BLI-Signal der Mäuse ohne GVHD bis zum Versuchsende stetig zunahm.

Auch *Bcl1-gfp/luc* Tumorzellen zeigten bis einschließlich Tag 9 ein schwaches BLI-Signal ohne Unterschiede zwischen GVHD- und Kontrollgruppe (**Abbildung 4.21 D**). In der GVHD-Gruppe konnte auch an Tag 12 noch kein steigendes BLI-Signal detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt nahm die Tumorlast der Kontrollgruppe bereits signifikant ( $p < 0,001$ ) zu. Erst ab Tag 14 konnte auch in der GVHD-Gruppe ein nur langsam steigendes BLI-Signal gesehen werden. Das Signal der GVHD-freien Kontrollgruppe stieg dagegen signifikant (Tag 14:  $p = 0,03$ , Tag 19:  $p < 0,001$ , Tag 21:  $p = 0,002$ , Tag 25:  $p < 0,001$ ) schneller an und lag zu allen Zeitpunkten deutlich über dem Signal der GVHD-Gruppe. Der Unterschied des BLI-Signals zwischen GVHD- und KM-Gruppe fiel für das *Bcl1*-Modell insgesamt deutlicher aus als für das *A20*-Modell. Auch der Anstieg der Tumorlast für *Bcl1-gfp/luc* verlief in der GVHD-Gruppe zumindest bis Tag 21 langsamer als für *A20-luc/yfp/neo*, wobei ein Abfall des BLI-Signals am Versuchsende nicht beobachtet wurde.

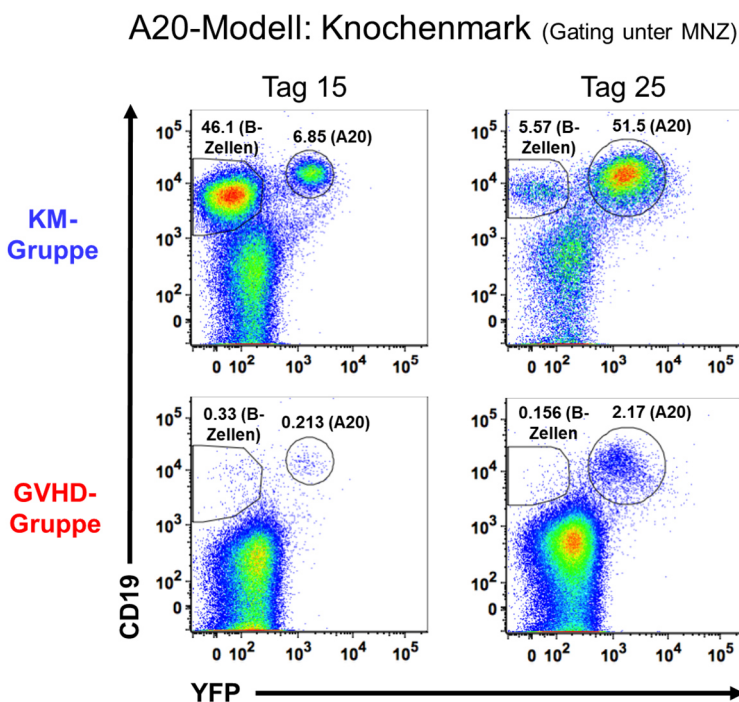
Der Gewichtsverlauf zeigt für alle Gruppen den typischen Abfall wenige Tage nach Bestrahlung (**Abbildung 4.21 A und C**). Anschließend erholten sich die Tiere der KM-Gruppe bis ca. Tag 12 kontinuierlich, während sich das Gewicht und der Allgemeinzustand der Tiere in der GVHD-Gruppe erwartungsgemäß kaum verbesserten. Aufgrund des Tumorprogresses kam es im späteren Verlauf auch in der KM-Gruppe zu einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes und einem Gewichtsverlust, wobei 4 von 5 der verbleibenden Mäuse der *A20-luc/yfp/neo* KM-Gruppe zwischen Tag 21 und Tag 25 eine Lähmung der Hinterläufe entwickelten und daher umgehend tierschutzgemäß getötet wurden. In der GVHD-Gruppe waren für das *A20*-Modell über den gesamten Zeitraum keine Lähmungserscheinungen zu beobachten. Insgesamt führte die zeitgleiche Induktion einer GVHD in diesem haploidenten GVHD/GVL-Transplantationsmodell zu einem signifikant langsameren Anstieg des BLI-Signals und damit trotz fehlender Fremderkennung durch die transplantierten T-Zellen zu einem deutlich verzögerten Tumorwachstum der B-Zell-Lymphome *A20-luc/yfp/neo* und *Bcl1-gfp/luc*.

#### 4.3.1.2 Durchflusszytometrische Untersuchung: Knochenmark und Milz

An Tag 15 und an Tag 25 (A20-Modell) bzw. Tag 15, 19 und 25 (Bcl1-Modell) erfolgte die Tötung einer festgelegten Anzahl von Versuchstieren (A20: Tag 15 n=9, Tag 25: n=4 pro Gruppe; Bcl1: Tag 15, 19 und 25: n=3-5 pro Gruppe) und die durchflusszytometrische Untersuchung von KM und Milz. Die Identifizierung der Tumorzellen erfolgte mithilfe ihrer Expression von YFP und CD19 (A20-*luc/yfp/neo*) bzw. GFP und CD19 (Bcl1-*gfp/luc*). Als B-Zellen wurden YFP<sup>-</sup> bzw. GFP<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> Zellen definiert. In der BLI-Messung zeigte sich ein deutlich verzögerter Progress beider B-Zell-Lymphome in Tieren mit GVHD. Um den Beitrag des T-Zell-Kompartiments zu diesem indirekten GVL-Effekt näher zu charakterisieren, erfolgte an Tag 15 zusätzlich eine durchflusszytometrische Analyse entscheidender T-Zell-Populationen: Gesamt T-Zellen (YFP<sup>-</sup> bzw. GFP<sup>-</sup> und TCRβ<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> (YFP<sup>-</sup> bzw. GFP<sup>-</sup> und TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (YFP<sup>-</sup> bzw. GFP<sup>-</sup> und TCRβ<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>), aktivierte CD4<sup>+</sup> Tconv (YFP<sup>-</sup> bzw. GFP<sup>-</sup> und TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup>) und Treg (YFP<sup>-</sup> bzw. GFP<sup>-</sup> und TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>).

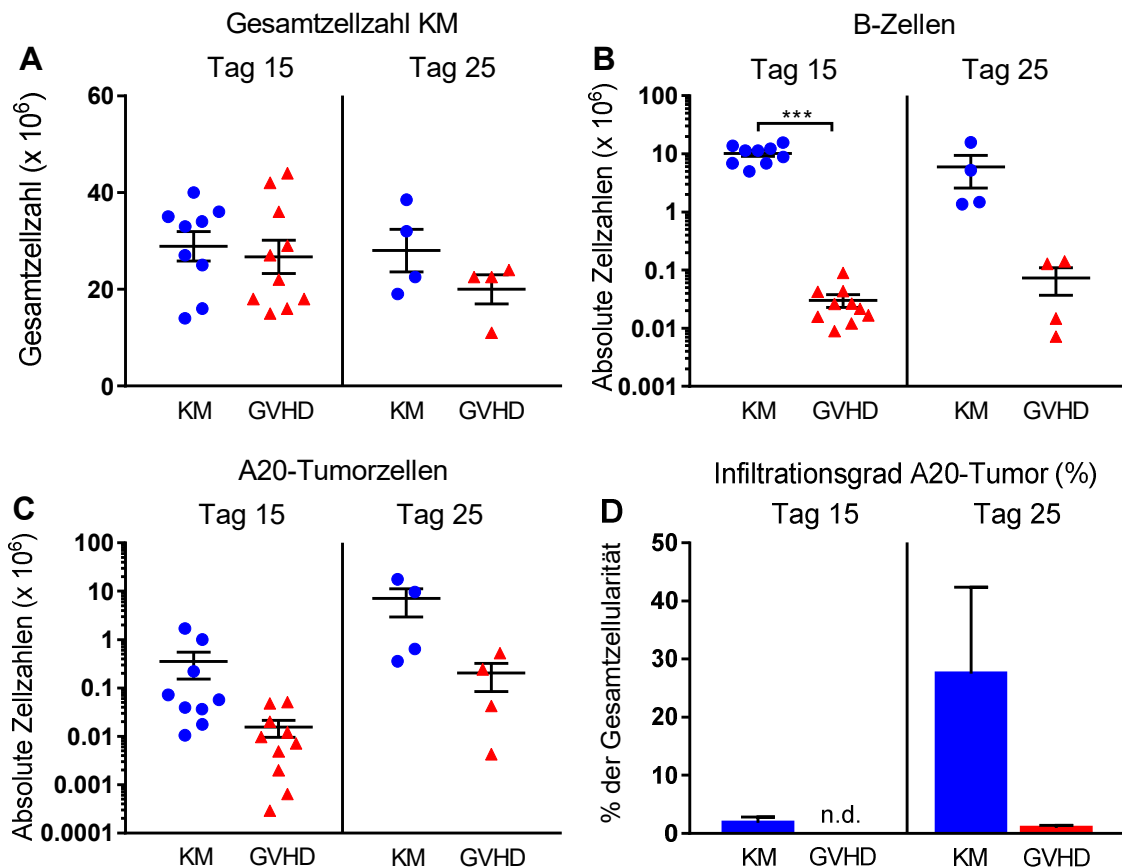
#### 4.3.1.3 A20-Modell: Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks

A20-*luc/yfp/neo* Tumorzellen wachsen üblicherweise zuerst im KM an. **Abbildung 4.22** zeigt daher repräsentative Dot-Plots der durchflusszytometrischen Analyse des KM mit seinem Gehalt an normalen (YFP<sup>-</sup>) und malignen (YFP<sup>+</sup>) B-Zellen (CD19<sup>+</sup>).



**Abbildung 4.22 Repräsentative Dot-Plots der durchflusszytometrischen Analyse von normalen B-Zellen (CD19<sup>+</sup> YFP<sup>-</sup>) und malignen B-Zellen (CD19<sup>+</sup> YFP<sup>+</sup>) im KM an Tag 15 und 25 nach haploidenter Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion.** Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit 2,5 x 10<sup>6</sup> BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe) oder zusätzlich mit 5 x 10<sup>6</sup> BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich 1 x 10<sup>4</sup> aus BALB/c stammende A20-*luc/yfp/neo* Tumor-B-Zellen. Gezeigt wird das Gating unter allen MNZ.

Die Gesamtzellzahl des KM / 2 Hinterläufe war an Tag 15 in beiden Gruppen sehr ähnlich (GVHD-Gruppe:  $26,7 \pm 3,4 \times 10^6$  vs. KM-Gruppe:  $28,9 \pm 3,0 \times 10^6$  Zellen). Auch an Tag 25 bestand mit  $20,6 \pm 2,4 \times 10^6$  in der GVHD- und  $28 \pm 4,4 \times 10^6$  Zellen in der KM-Gruppe kein signifikanter Unterschied.

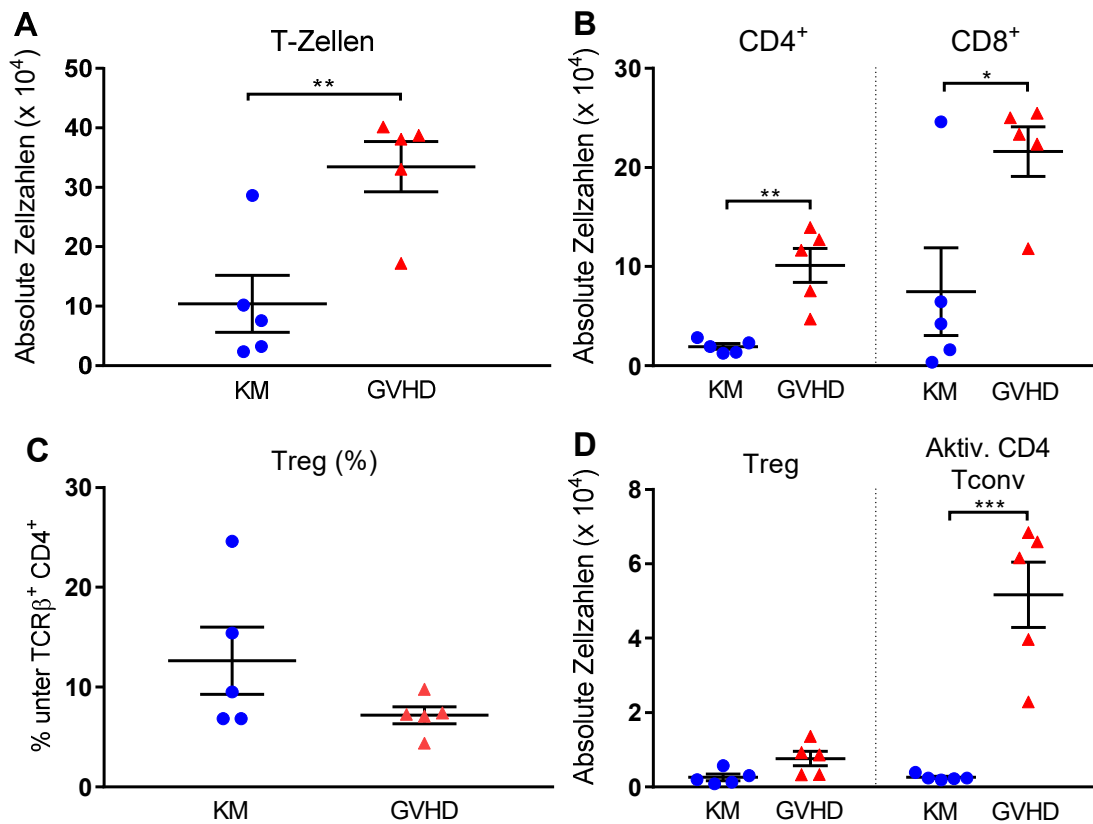


**Abbildung 4.23 Gesamtzellzahl des KM (A) und durchflusszytometrische Untersuchung normaler B-Zellen (B) und maligner A20-*luc/yfp/neo* B-Zellen (C) sowie Tumorinfiltrationsgrad des KM (D) an Tag 15 oder Tag 25 nach haploidenter Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion (A20-Modell).** Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe ●, Tag 15: n=9, Tag 25: n=4) oder zusätzlich mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, Tag 15: n=10, Tag 25: n=4) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende A20-*luc/yfp/neo* Tumor-B-Zellen. Dargestellt werden die MW der Zellzahlen aus zwei Hinterläufen (Femur und Tibia)  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ . Die Balken in D verdeutlichen den Infiltrationsgrad des Tumors (% unter Gesamtzellen).

In der GVHD-freien KM-Gruppe zeigte sich an Tag 15 eine hohe Zahl gesunder B-Zellen ( $10,2 \pm 1,2 \times 10^6$ ). Die Anzahl der A20-*luc/yfp/neo* Tumorzellen betrug  $35,3 \pm 20 \times 10^4$ , was einem durchschnittlichen Infiltrationsgrad von  $1,79 \pm 1$  % bezogen auf die Gesamtzellularität entspricht. An Tag 25 nahm die Tumorinfiltration in der KM-Gruppe mit  $27,5 \pm 14,9$  % deutlich zu ( $7,1 \pm 4,1 \times 10^6$  A20-*luc/yfp/neo* Tumorzellen).

Als Folge der Tumordinfiltration sank die Anzahl gesunder B-Zellen auf  $6,0 \pm 3,4 \times 10^6$ . Im Gegensatz dazu konnten in der GVHD-Gruppe an Tag 15 erwartungsgemäß (vgl. 4.1: GVHD-induzierte Blockierung der B-Zell-Lymphopoese im Knochenmark) kaum gesunde B-Zellen detektiert werden ( $0,3 \pm 0,8 \times 10^4$ ,  $p < 0,001$ ). Jedoch zeigten sich zeitgleich auch weniger *A20-luc/yfp/neo* Tumorzellen ( $1,6 \pm 0,6 \times 10^4$ ) und damit eine deutlich geringere Tumordinfiltration ( $0,08 \pm 0,04$  %) als in der KM-Gruppe. Auch an Tag 25 war der B-Zellgehalt mit  $7,3 \pm 3,6 \times 10^4$  nach GVHD-Induktion stark reduziert. Die Anzahl der Tumorzellen stieg an Tag 25 leicht an, lag mit  $0,2 \pm 0,1 \times 10^6$  jedoch immer noch ca. 1,5 log-Stufen unterhalb derjenigen der KM-Gruppe. Mit einem Infiltrationsgrad von lediglich  $0,9 \pm 0,5$  % war die Tumormast damit auch zu diesem Zeitpunkt deutlich niedriger als in der KM-Gruppe (**Abbildung 4.23**).

Zusätzlich wurde an Tag 15 das T-Zell-Kompartiment des KM analysiert, um dessen Beitrag zu den vermuteten, indirekten GVL-Effekten zu untersuchen (**Abbildung 4.24**). Die absolute T-Zellzahl der GVHD-Gruppe lag zu diesem Zeitpunkt bei  $33,5 \pm 4,2 \times 10^4$ . Damit waren signifikant ( $p = 0,007$ ) mehr T-Zellen im Vergleich zur KM-Gruppe ( $10,4 \pm 4,8 \times 10^4$ ) nachzuweisen. In der GVHD-Gruppe wurden mit  $10,1 \pm 1,7 \times 10^4$  signifikant ( $p = 0,002$ ) mehr  $CD4^+$  T-Zellen als in der KM-Gruppe ( $1,9 \pm 0,3 \times 10^4$ ) detektiert. Auch die Anzahl  $CD8^+$  T-Zellen war in der GVHD-Gruppe signifikant ( $p = 0,02$ ) erhöht (GVHD:  $21,6 \pm 2,5 \times 10^4$  vs. KM:  $7,5 \pm 4,4 \times 10^4$ ). Interessanterweise verschob sich das Verhältnis  $CD4^+$  zu  $CD8^+$  T-Zellen in der GVHD-Gruppe allerdings nicht zu Gunsten der  $CD8^+$  T-Zellen (KM: 0,26 vs. GVHD: 0,47). Zwar war die absolute Treg-Zellzahl mit  $0,3 \pm 0,1 \times 10^4$  in der KM-Gruppe niedriger als in der GVHD-Gruppe ( $0,8 \pm 0,2 \times 10^4$ ), jedoch konnte in der KM-Gruppe mit  $12,6 \pm 3,4$  % ein fast doppelt so hoher prozentualer Treg-Zellgehalt unter  $CD4^+$  T-Zellen im Vergleich zur GVHD-Gruppe ( $7,2 \pm 0,9$  %) detektiert werden. Als Ausdruck einer deutlichen Inflammation war die Anzahl aktivierter  $CD4^+$  Tconv mit  $5,2 \pm 0,9 \times 10^4$  in der GVHD-Gruppe um ca. 1,5 log-Stufen ( $p < 0,001$ ) höher als in der KM-Gruppe ( $0,3 \pm 0,03 \times 10^4$ ).



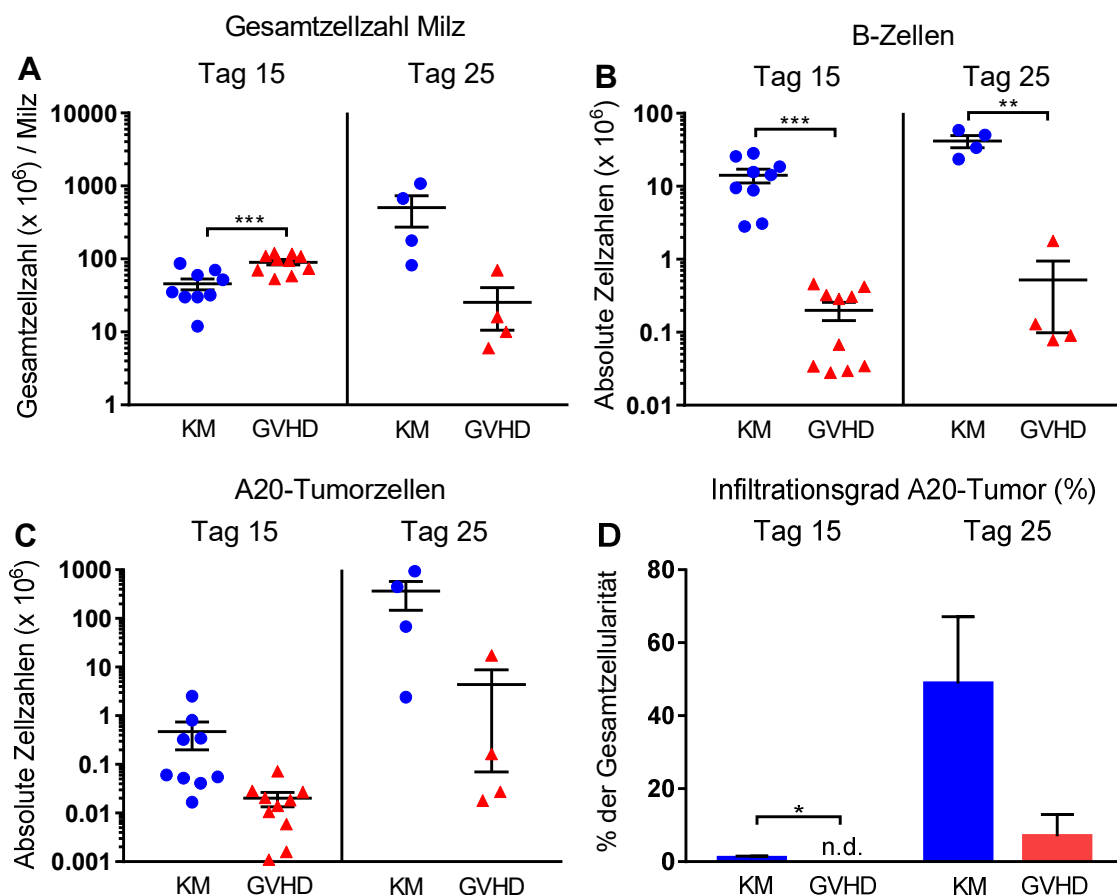
**Abbildung 4.24 Durchflusszytometrische Untersuchung des T-Zell-Kompartiments im KM an Tag 15 nach haploidenter Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion (A20-Modell).** Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe ●, n=5) oder zusammen mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, n=5) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende A20-*luc/yfp/neo* Tumor-B-Zellen. Gezeigt werden die absoluten T-Zellzahlen (A) und ihrer CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen (B), der prozentuale Anteil von Treg unter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (C) sowie die absoluten Zellzahlen von Treg im Vergleich mit aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv (D). Zu sehen sind die MW der Zellzahlen ± SEM aus zwei Hinterläufen (Femur und Tibia) und das Signifikanzniveau ( $p^* \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$ ).

Zusammenfassend konnte in Mäusen mit GVHD sowohl an Tag 15 als auch an Tag 25 eine im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich reduzierte KM-Infiltration durch A20-*luc/yfp/neo* Tumor-B-Zellen festgestellt werden. Parallel dazu ließ sich in diesen GVHD-Tieren zu beiden Zeitpunkten eine stark reduzierte Zahl gesunder B-Zellen detektieren. Das T-Zell-Kompartiment zeigte an Tag 15 GVHD-assoziierte pro-inflammatorische Veränderungen (erniedrigte Treg, mehr aktivierte CD4<sup>+</sup> Tconv).



#### 4.3.1.4 A20-Modell: Zelluläre Zusammensetzung der Milz

An Tag 15 nach KMT (Knochenmarktransplantation) lag die Gesamtzellzahl der Milz in der KM-Gruppe bei  $44,9 \pm 7,1 \times 10^6$ . Dabei zeigte sich, ähnlich wie im KM, eine hohe Anzahl normaler B-Zellen ( $14,1 \pm 3,0 \times 10^6$ ). Der Tumorbefall der Milz war in der KM-Gruppe mit  $47,1 \pm 27,2 \times 10^4$  A20-*luc/yfp/neo* Zellen und einem Infiltrationsgrad von  $1,0 \pm 0,4 \%$  zu diesem Zeitpunkt noch gering ausgeprägt (**Abbildung 4.25**).



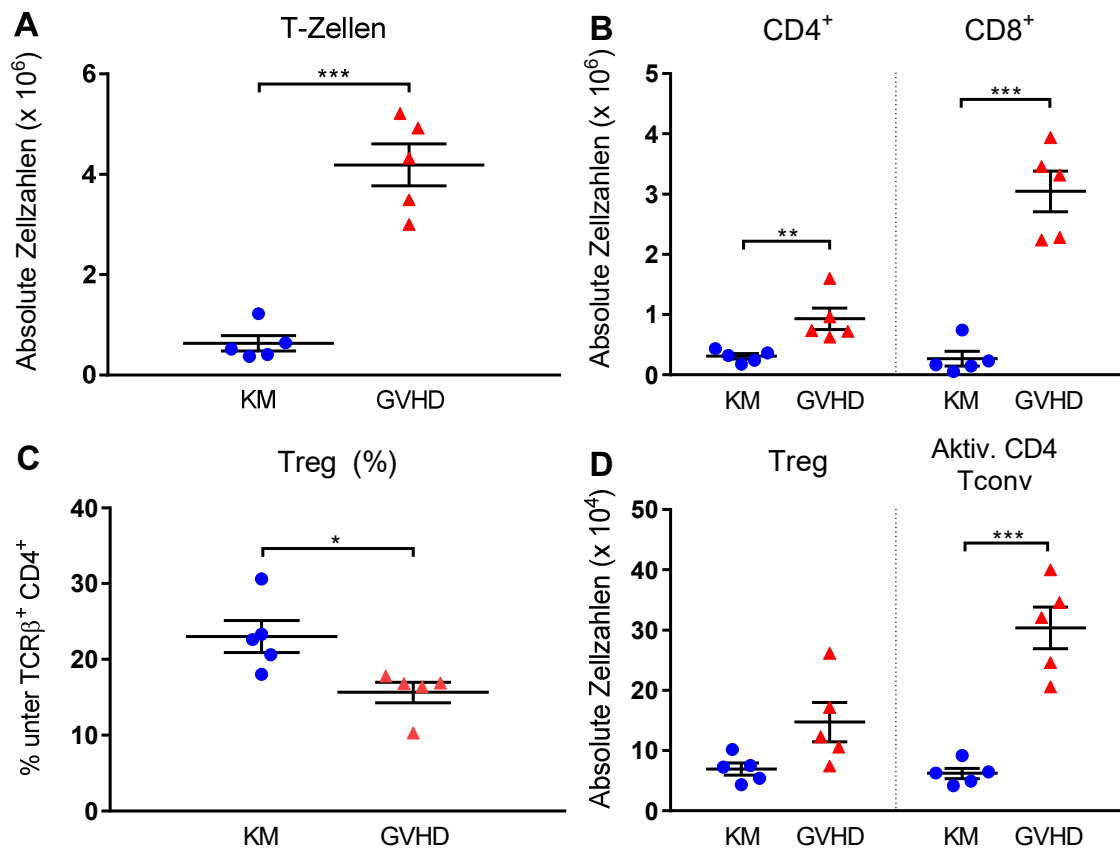
**Abbildung 4.25** Gesamtzellzahl der Milz (A) und durchflusszytometrische Untersuchung normaler B-Zellen (B) und maligner A20-*luc/yfp/neo* B-Zellen (C) sowie Tumordinfiltrationsgrad der Milz (D) an Tag 15 oder Tag 25 nach haploidenter Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion (A20-Modell). Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe ●, Tag 15: n=9, Tag 25: n=4) oder zusammen mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, Tag 15: n=10, Tag 25: n=4) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende A20-*luc/yfp/neo* Tumor-B-Zellen. Dargestellt werden die MW der Zellzahlen pro Milz  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau (\*\*p  $\leq 0,01$ , \*\*\*p  $\leq 0,001$ ). Die Balken in D verdeutlichen den Infiltrationsgrad des Tumors (% unter Gesamtzellen).

An Tag 25 stieg die Gesamtzellzahl der Milz in der KM-Gruppe stark an und belief sich auf  $502,9 \pm 230,7 \times 10^6$  Zellen. Dabei nahm auch die Anzahl normaler B-Zellen um ca.

das 3-fache auf  $41,6 \pm 7,9 \times 10^6$  zu. Parallel wurde eine dramatische Zunahme maligner B-Zellen beobachtet. Mit einer Anzahl von  $365,6 \pm 216,1 \times 10^6$  A20-*luc/yfp/neo* Tumorzellen stieg die absolute Tumor-Zellzahl um fast 3 log-Stufen. Die deutliche Zunahme der Gesamtzellzahl der KM-Gruppe lässt sich somit auch durch die sehr hohe Tumordinfiltration ( $48,8 \pm 18,3$  %) der Milz an Tag 25 erklären.

Anders als im KM war an Tag 15 die Gesamtzellzahl der Milz in der GVHD-Gruppe mit  $90,4 \pm 7,8 \times 10^6$  im Vergleich zur KM-Gruppe signifikant ( $p < 0,001$ ) erhöht. Als Ausdruck der GVHD-induzierten Fibrosierung der Milz (Kontraktionsphase der GVHD) nahm sie danach bis Tag 25 jedoch wieder deutlich ab ( $25,5 \pm 15,0 \times 10^6$ ). Die Anzahl normaler B-Zellen war auch in der Milz zu beiden Untersuchungszeitpunkten mit  $0,2 \pm 0,1 \times 10^6$  (Tag 15) bzw.  $0,5 \pm 0,4 \times 10^6$  (Tag 25) Zellen in der GVHD-Gruppe signifikant erniedrigt ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ). Jedoch ließen sich mit  $2,0 \pm 0,7 \times 10^4$  an Tag 15 auch fast keine Tumorzellen nachweisen (Infiltrationsgrad:  $0,02 \pm 0,007$  %). Erst an Tag 25 nahm auch in der GVHD-Gruppe die Tumordinfiltration zu ( $6,9 \pm 5,9$  %). Allerdings lag die Anzahl der A20-*luc/yfp/neo* Tumorzellen mit  $4,4 \pm 4,3 \times 10^6$  weiterhin um ca. 2 log-Stufen niedriger als in der KM-Gruppe

An Tag 15 waren mit  $4,2 \pm 0,4 \times 10^6$  signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr T-Zellen in der Milz der GVHD-Tiere nachzuweisen als in der GVHD-freien KM-Gruppe ( $0,6 \pm 0,2 \times 10^6$ ) (**Abbildung 4.26**). Auch für ihre Subpopulationen konnten mit  $0,9 \pm 0,2 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> und  $3,0 \pm 0,3 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der GVHD-Gruppe signifikant ( $p = 0,009$  bzw.  $p < 0,001$ ) erhöhte Zellzahlen im Vergleich zur KM-Gruppe (CD4<sup>+</sup>:  $0,3 \pm 0,1 \times 10^6$  und CD8<sup>+</sup> T-Zellen:  $0,3 \pm 0,1 \times 10^6$ ) detektiert werden. Anders als im KM zeigte sich hier jedoch als Ausdruck der Inflammation die GVHD-typische Verschiebung des Verhältnisses CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen zugunsten CD8<sup>+</sup> T-Zellen (GVHD: 0,3 vs. KM: 1,15). Dies wird durch den Nachweis einer deutlich ( $p < 0,001$ ) erhöhten Anzahl aktivierter CD4 Tconv<sup>+</sup> zusätzlich unterstrichen (GVHD:  $30,4 \pm 3,5 \times 10^4$  vs. KM:  $6,2 \pm 0,9 \times 10^4$ ). Die absolute Treg-Zellzahl war mit  $14,8 \pm 3,3 \times 10^4$  Zellen in der GVHD-Gruppe etwa doppelt so hoch wie in der KM-Gruppe ( $6,9 \pm 1,0 \times 10^4$ ). Allerdings führte die gleichzeitig auftretende Erhöhung der aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv letztendlich zu einem ungünstigeren Treg/CD4<sup>+</sup>Tconv-Verhältnis als in den KM-Kontrolltieren. Der prozentuale Treg-Gehalt unter CD4<sup>+</sup> T-Zellen war in der GVHD-Gruppe ( $15,6 \pm 1,6$  %) im Vergleich zur KM-Gruppe ( $20,5 \pm 1,0$  %) signifikant ( $p = 0,02$ ) reduziert.

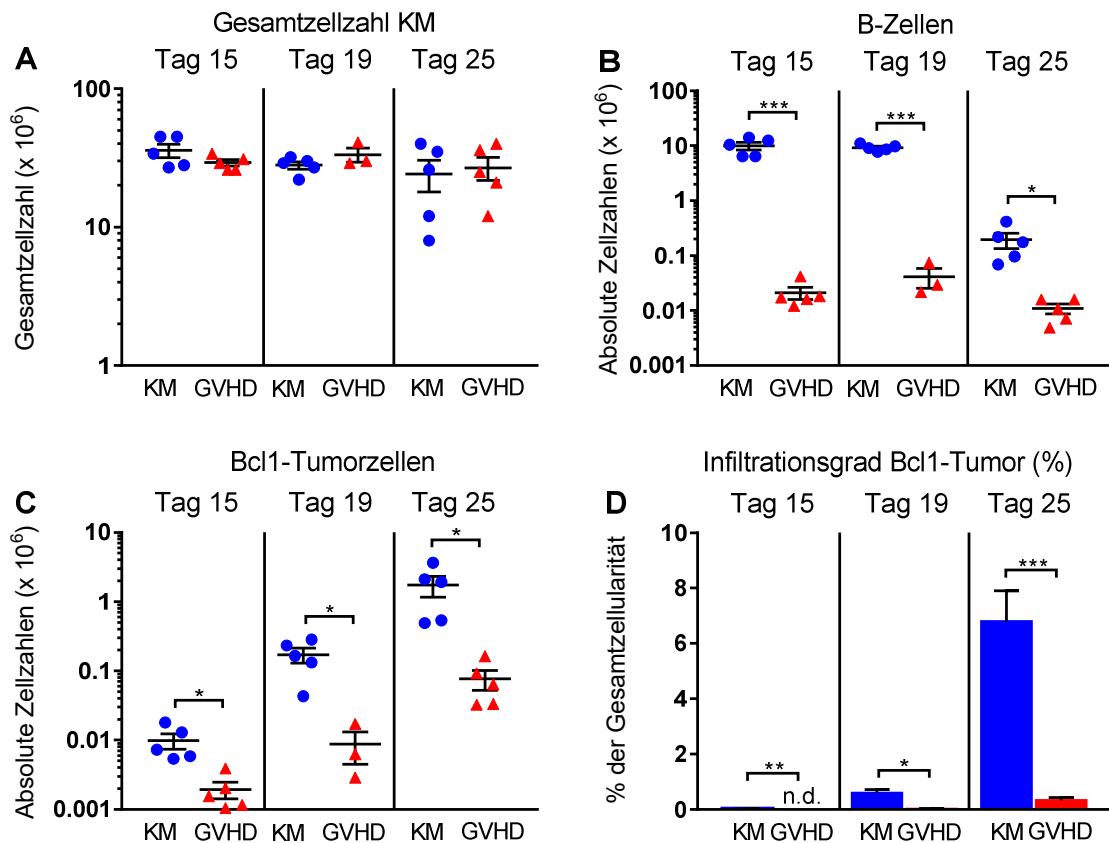


**Abbildung 4.26** Durchflusszytometrische Untersuchung der T-Zell-Populationen in der Milz an Tag 15 nach haploidentener Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion (A20-Modell). Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe ●, n=5) oder zusammen mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, n=5) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende A20-*luc/yfp/neo* Tumor-B-Zellen. Gezeigt werden die absoluten Zellzahlen der T-Zellen (A) und ihrer CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen (B), der prozentuale Anteil von Treg unter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (C) sowie die absoluten Zellzahlen der Treg im Vergleich mit aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv (D). Zu sehen sind die MW der Zellzahlen pro Milz ± SEM und das Signifikanzniveau ( $p^* \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$ ).

Insgesamt zeigte sich auch in der Milz ein eindeutig reduziertes Wachstum des B-Zell-Tumors A20-*luc/yfp/neo* und parallel eine deutlich reduzierte Anzahl normaler B-Zellen durch eine GVHD-Induktion am Tag der Transplantation. Begleitet wurde dieser Effekt auch in der Milz von einem aktivierten T-Zell-Kompartiment.

#### 4.3.1.5 *Bcl1*-Modell: Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks

Zu allen Analysezeitpunkten (Tag 15, 19 und 25) wurden in beiden Untersuchungsgruppen (KM- und GVHD-Gruppe) konstante und ähnlich hohe Gesamtzellzahlen des KM (zwischen  $25$  und  $35 \times 10^6$  Zellen) festgestellt (**Abbildung 4.27**).

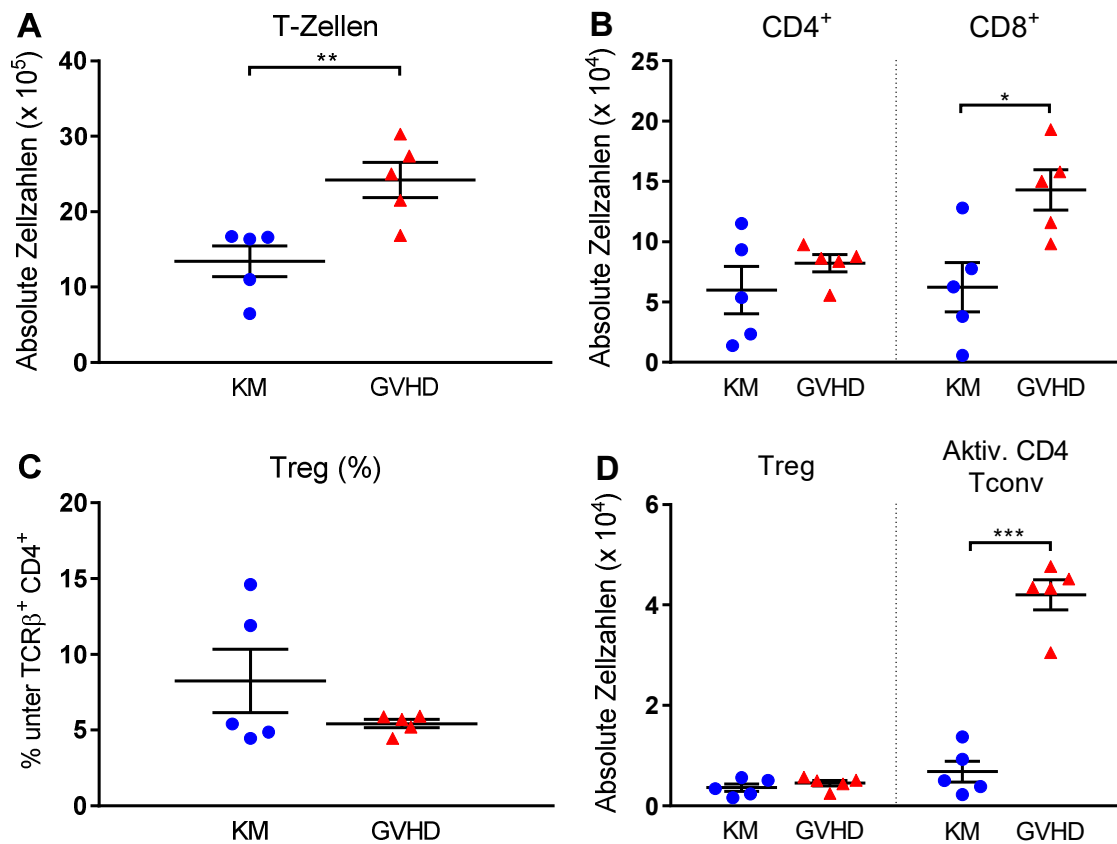


**Abbildung 4.27 Gesamtzellzahl des KM (A) und durchflusszytometrische Untersuchung normaler B-Zellen (B) und maligner *Bcl1-gfp/luc* B-Zellen (C) sowie Tumorinfiltrationsgrad des KM (D) an Tag 15, 19 und Tag 25 nach haploidenter Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion (*Bcl1*-Modell).** Nach letaler Bestrahlung ( $13 \text{ Gy}$  à  $2 \times 6,5 \text{ Gy}$  in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe ●, Tag 15, 19 und 25:  $n=5$ ) oder zusammen mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, Tag 15 und 25:  $n=5$ , Tag 19:  $n=3$ ) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende *Bcl1-gfp/luc* Tumor-B-Zellen. Dargestellt werden die Zellzahlen der MW aus zwei Hinterläufen (Femur und Tibia)  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau ( $p^* \leq 0,05$ ,  $***p \leq 0,001$ ). Die Balken in **D** verdeutlichen den Infiltrationsgrad des Tumors (% unter Gesamtzellen).

Sowohl an Tag 15 als auch an Tag 19 zeigte sich mit  $9,9 \pm 1,1 \times 10^6$  bzw.  $9,3 \pm 0,6 \times 10^6$  eine gleichbleibend hohe Zahl gesunder B-Zellen im KM der KM-Gruppe. Die Anzahl der *Bcl1-gfp/luc* Tumorzellen war dagegen mit  $1,0 \pm 0,2 \times 10^4$  an Tag 15 noch sehr niedrig (Tumorinfiltrationsgrad:  $0,03 \pm 0,005 \%$ ), stieg bis Tag 19

jedoch um das ca. 17-fache an ( $17,1 \pm 4,1 \times 10^4$  Tumorzellen bzw. Infiltrationsgrad:  $0,6 \pm 0,1 \%$ ) und bis Tag 25 sogar um das 170-fache auf  $1,7 \pm 0,6 \times 10^6$  Bcl1-*gfp/luc* Tumorzellen (Infiltrationsgrad:  $6,8 \pm 1,1 \%$ ). Als Folge der progredienten KM-Infiltration fiel zu diesem Zeitpunkt die Anzahl normaler B-Zellen in der KM-Gruppe auf  $19,5 \pm 6,1 \times 10^4$  stark ab. Wie für die GVHD-Gruppe zu erwarten, zeigten sich zu allen Untersuchungszeitpunkten dramatisch reduzierte B-Zell-Zahlen (Tag 15:  $2,1 \pm 0,4 \times 10^4$ , Tag 19:  $4,2 \pm 1,6 \times 10^4$ , Tag 25:  $1,1 \pm 0,1 \times 10^4$ ) im Vergleich zur KM-Gruppe (Tag 15 und Tag 19:  $p < 0,001$ , Tag 25:  $p = 0,02$ ). Allerdings fand sich zeitgleich mit  $0,2 \pm 0,04 \times 10^4$  an Tag 15 ( $p = 0,01$ ) und mit  $0,9 \pm 0,4 \times 10^4$  Bcl1-*gfp/luc* Tumorzellen an Tag 19 ( $p = 0,03$ ) eine kaum detektierbare Tumorlast (Infiltrationsgrad Tag 15:  $0,007 \pm 0,002 \%$ ,  $p = 0,006$  und Tag 19:  $0,02 \pm 0,009 \%$ ,  $p = 0,01$ ). Erst an Tag 25 nahm die KM-Infiltration durch die malignen B-Zellen auch in der GVHD-Gruppe leicht zu (Infiltrationsgrad Tag 25:  $0,3 \pm 0,1 \%$ ,  $p < 0,001$ ). Jedoch befanden sich an Tag 25 insgesamt lediglich  $7,7 \pm 2,4 \times 10^4$  Bcl1-*gfp/luc* Tumorzellen im KM und damit ca. 1,5 log-Stufen weniger ( $p = 0,02$ ) als in der KM-Gruppe.

An Tag 15 konnten in der GVHD-Gruppe mit  $24,2 \pm 1,8 \times 10^4$  signifikant ( $p = 0,008$ ) mehr T-Zellen als in der KM-Gruppe ( $13,4 \pm 1,4 \times 10^4$ ) detektiert werden. Die Anzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen war in der GVHD-Gruppe nur leicht erhöht (GVHD:  $8,2 \pm 0,6 \times 10^4$  vs. KM:  $6,0 \pm 1,4 \times 10^4$ ), die der CD8<sup>+</sup> T-Zellen dagegen mit  $14,3 \pm 1,3 \times 10^4$  signifikant ( $p = 0,02$ ) gegenüber  $6,2 \pm 1,4 \times 10^4$  in der KM-Gruppe. Daher war erneut die für die GVHD charakteristische Verschiebung des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnisses zu Gunsten CD8<sup>+</sup> T-Zellen (GVHD: 0,47 vs. KM: 0,96) zu beobachten. Als weiterer Hinweis für eine Inflammation zeigte sich eine deutliche ( $p < 0,001$ ) Expansion aktivierter CD4<sup>+</sup> Tconv im KM der GVHD-Tiere im Vergleich zur GVHD-freien KM-Gruppe (GVHD:  $4,2 \pm 0,2 \times 10^4$  vs. KM:  $0,7 \pm 0,1 \times 10^4$ ). Die absolute Zellzahl der Treg war in beiden Gruppen annähernd gleich (KM-Gruppe:  $0,4 \pm 0,1 \times 10^4$  vs. GVHD-Gruppe:  $0,5 \pm 0,04 \times 10^4$ ), jedoch lag der prozentuale Treg-Zellgehalt unter CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit  $8,2 \pm 2,1 \%$  in der KM-Gruppe höher als in der GVHD-Gruppe ( $5,4 \pm 0,3 \%$ ). Zusammen mit der stark erhöhten Anzahl CD4<sup>+</sup> Tconv bedingt dies, ähnlich wie im A20-Modell, ein nachteiliges Treg/CD4<sup>+</sup>Tconv-Verhältnis im KM der GVHD-Tiere (**Abbildung 4.28**).



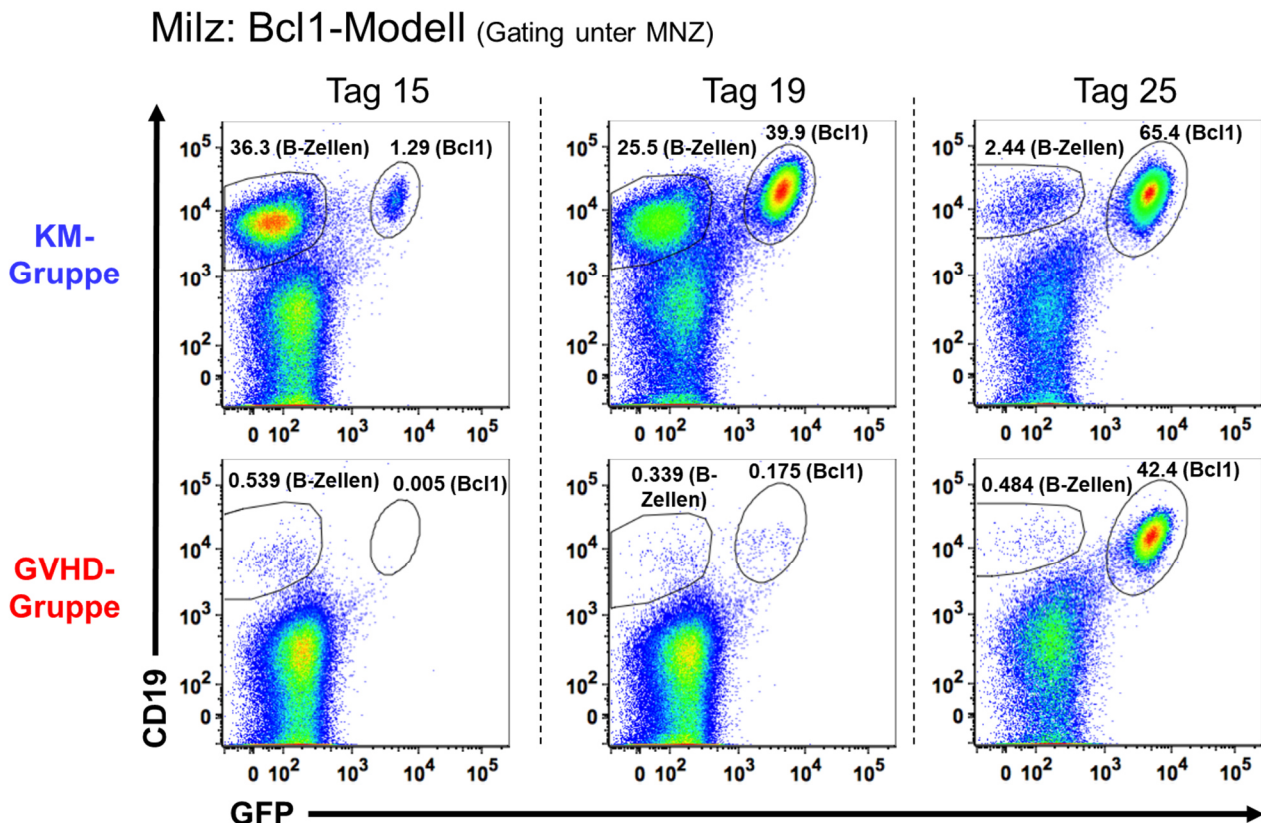
**Abbildung 4.28 Durchflusszytometrische Untersuchung der T-Zell-Populationen im KM an Tag 15 nach haploidenter Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion (Bcl1-Modell).** Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe ●, n=5) oder zusammen mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, n=5) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende Bcl1-*gfp-luc* Tumor-B-Zellen. Gezeigt werden die absoluten Zellzahlen der T-Zellen (A) und ihrer CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen (B), der prozentuale Anteil von Treg unter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (C) sowie die absoluten Zellzahlen der Treg im Vergleich mit aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv (D). Zu sehen sind die MW der Zellzahlen aus den zwei Hinterläufen (Femur und Tibia) ± SEM und das Signifikanzniveau (p\* ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001).

Wie für das A20-Modell konnten wir auch im Bcl1-Modell zeigen, dass nach GVHD-Induktion zum Zeitpunkt der Transplantation nicht nur das gesunde B-Zellkompartiment drastisch reduziert war, sondern auch das Wachstum der MHC-identen malignen B-Zellen deutlich verzögert wurde. Parallel dazu zeigten sich an Tag 15 GVHD-typische (proinflammatorische) Veränderungen der untersuchten T-Zellpopulationen.

#### 4.3.1.6 Bcl1-Modell: Zelluläre Zusammensetzung der Milz

Bcl1-*gfp/luc* Tumorzellen haben einen Tropismus für sekundäre lymphatische Organe.

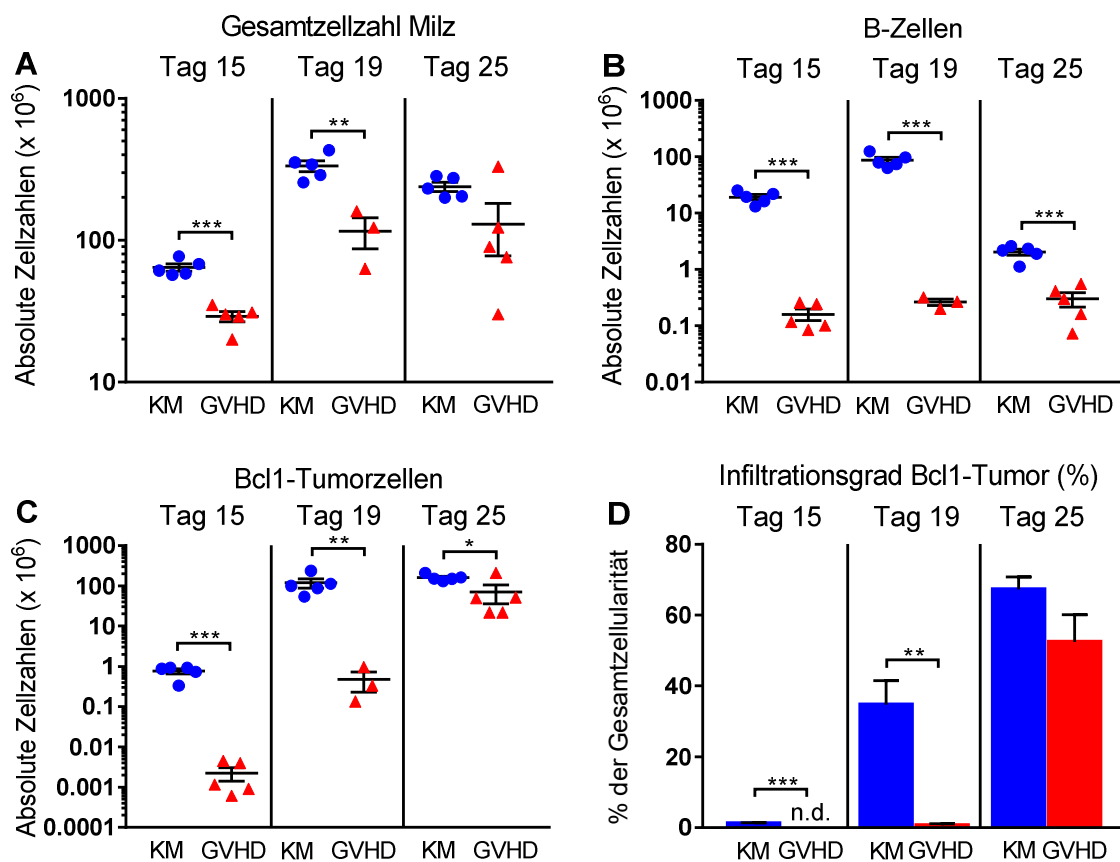
**Abbildung 4.29** zeigt daher repräsentative Dot-Plots der durchflusszytometrischen Analyse normaler (GFP<sup>-</sup>) und maligner (GFP<sup>+</sup>) B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) in der Milz.



**Abbildung 4.29** Repräsentative Dot-Plots der durchflusszytometrischen Analyse normaler B-Zellen (CD19<sup>+</sup> GFP<sup>-</sup>) und maligner B-Zellen (CD19<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup>) an Tag 15, 19 und 25 nach haploidenter Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion. Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe) oder zusätzlich mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende Bcl1-*gfp/luc* Tumor-B-Zellen. Gezeigt wird das Gating unter allen MNZ.

Im Vergleich zum A20-Modell konnte im Bcl1-Modell mit  $64,2 \pm 2,6 \times 10^6$  eine höhere Gesamtzellzahl der Milz in der KM-Gruppe an Tag 15 festgestellt werden. Die Anzahl gesunder B-Zellen war mit  $19,1 \pm 1,5 \times 10^6$  normal. Wie für das primäre Anwachsen der Bcl1-*gfp/luc* Zellen in der Milz zu erwarten war, konnte an Tag 15 bereits eine deutlich höhere Tumorstärke als im KM detektiert werden ( $0,8 \pm 0,1 \times 10^6$  Tumorzellen bzw. Infiltrationsgrad von  $1,2 \pm 0,2 \%$ ). An Tag 19 nahm die Gesamtzellzahl der Milz der KM-Gruppe um das 5-fache zu ( $334,00 \pm 29,90 \times 10^6$ ), wobei ein ähnlich großer Anstieg mit  $87,0 \pm 10,8 \times 10^6$  Zellen auch für das normale B-Zell-Kompartiment

festgestellt werden konnte. Die Anzahl maligner B-Zellen stieg von Tag 15 auf Tag 19 um ca. 2 log-Stufen auf  $118,1 \pm 31,2 \times 10^6$  stark an. Somit zeigte sich für das Bcl1-Modell in der Milz (Tumordinfiltrationsgrad:  $34,8 \pm 6,8 \%$ ) ein deutlich schnellerer Tumorprogress als im KM. Bis Tag 25 nahm die Gesamtzellzahl der Milz wieder leicht ab und betrug  $238,8 \pm 17,5 \times 10^6$ , während die Zahl normaler B-Zellen im Gegensatz zum A20-Modell aufgrund einer rasch zunehmenden Tumordinfiltration ( $67,3 \pm 3,5 \%$ ) deutlich abfiel ( $2,0 \pm 0,3 \times 10^6$ ). Die Tumorzellzahl der KM-Gruppe erreichte mit  $160,2 \pm 13,4 \times 10^6$  Bcl1-*gfp/luc* an Tag 25 ihr Maximum (**Abbildung 4.30**).



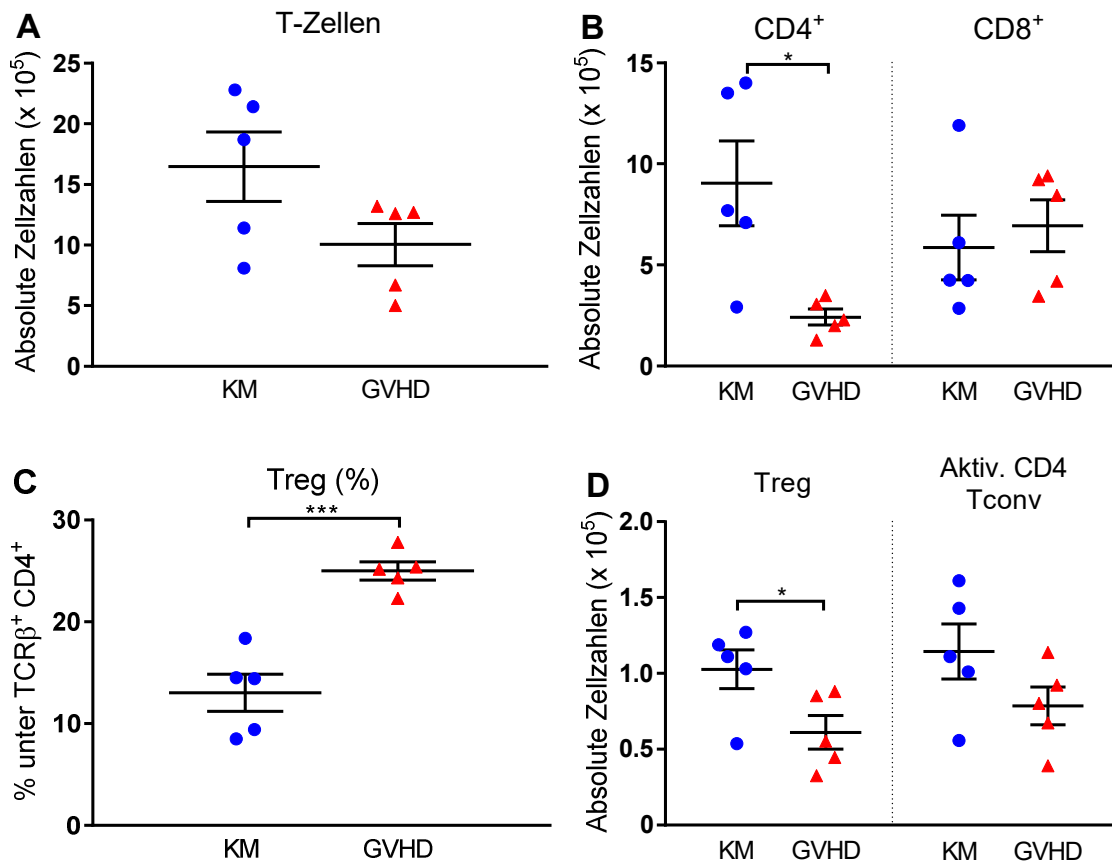
**Abbildung 4.30 Gesamtzellzahl der Milz (A) und durchflusszytometrische Untersuchung normaler B-Zellen (B) und maligner Bcl1-*gfp/luc* B-Zellen (C) sowie Tumordinfiltrationsgrad der Milz (D) an Tag 15, 19 und Tag 25 nach haploidenter Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion (Bcl1-Modell).** Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe ●, Tag 15, 19 und 25: n=5) oder zusammen mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, Tag 15 und 25: n=5, Tag 19: n=3) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende Bcl1-*gfp/luc* Tumor-B-Zellen. Dargestellt werden die MW der Zellzahlen pro Milz  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau ( $p^* \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ ,  $***p \leq 0,001$ ). Die Balken in **D** verdeutlichen den Infiltrationsgrad des Tumors (% unter Gesamtzellen).



Im Unterschied zum A20-Modell war die Gesamtzellzahl der Milz mit  $29,0 \pm 2,0 \times 10^6$  in der GVHD-Gruppe an Tag 15 niedriger ( $p < 0,001$ ) als in der KM-Gruppe. An Tag 19 stieg die Gesamtzellzahl in der GVHD-Gruppe auf  $115,3 \pm 28,3 \times 10^6$  an, lag aber damit immer noch unterhalb der KM-Gruppe ( $p = 0,002$ ). Bis Tag 25 stagnierte die Gesamtzellzahl der GVHD-Gruppe ( $129,8 \pm 52,2 \times 10^6$ ) und fiel damit im Gegensatz zum A20-Modell nicht ab. Trotzdem war die Gesamtzellzahl auch an Tag 25 niedriger als in der KM-Gruppe, so dass insgesamt eine Fibrosierung der Milz im Rahmen der Kontraktionsphase der GVHD zu vermuten ist. Auch in der Milz konnten, ähnlich wie im KM, zu allen Untersuchungszeitpunkten deutlich ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ) weniger normale B-Zellen in Tieren mit GVHD (Tag 15:  $16,0 \pm 2,9 \times 10^4$ , Tag 19:  $26,2 \pm 3,5 \times 10^4$ , Tag 25:  $26,2 \pm 3,5 \times 10^4$ ) im Vergleich zu Tieren ohne GVHD nachgewiesen werden. Jedoch war an Tag 15 mit  $0,2 \pm 0,1 \times 10^4$  Bcl1-*gfp/luc* Tumorzellen und einem Infiltrationsgrad von lediglich  $0,008 \pm 0,004$  % eine erneut signifikant ( $p < 0,001$ ) niedrigere Tumorlast in der GVHD-Gruppe detektierbar. Auch an Tag 19 nahm die Tumorlast in der GVHD-Gruppe (Infiltrationsgrad:  $0,6 \pm 0,5$  %) nur minimal ( $p = 0,009$ ) zu und mit  $47,4 \pm 24,8 \times 10^4$  waren um mehr als 2 log-Stufen ( $p = 0,03$ ) weniger Tumorzellen als in Tieren ohne GVHD nachzuweisen. An Tag 25 stieg die Bcl1-*gfp/luc* Tumorzellzahl nun auch in der GVHD-Gruppe sprunghaft an und lag bei  $70,8 \pm 35,1 \times 10^6$  (Infiltrationsgrad:  $52,4 \pm 7,8$  %). Damit war sie jedoch immer noch signifikant ( $p = 0,04$ ) niedriger als in der KM-Gruppe.

Anders als im A20-Modell zeigte sich an Tag 15 mit  $16,5 \pm 2,9 \times 10^5$  eine leicht erhöhte T-Zell-Zahl in der Milz der KM-Gruppe im Vergleich zur GVHD-Gruppe ( $10 \pm 1,7 \times 10^5$ ) (**Abbildung 4.31**). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl der KM-Gruppe war mit  $9 \pm 2,1 \times 10^5$  deutlich ( $p = 0,01$ ) höher als in der GVHD-Gruppe ( $2,4 \pm 0,4 \times 10^5$ ). Die Anzahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen war in beiden Gruppen sehr ähnlich (KM:  $5,9 \pm 1,6 \times 10^5$  vs. GVHD-Gruppe:  $6,9 \pm 1,3 \times 10^5$ ). Das Verhältnis CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen verschob sich dadurch GVHD-typisch zu Gunsten CD8<sup>+</sup> T-Zellen (GVHD: 0,35 vs. KM: 1,54). Im Unterschied zum A20-Modell war der prozentuale Anteil von Treg an CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit  $25,0 \pm 0,9$  % in der GVHD Gruppe ungewöhnlicherweise höher ( $p < 0,001$ ) als in der KM-Gruppe ( $13,0 \pm 1,8$  %). Die absolute Treg-Zahl der GVHD-Gruppe ( $0,6 \pm 0,1 \times 10^5$ ) war jedoch niedriger ( $p = 0,04$ ) als in der KM-Gruppe ( $1,0 \pm 0,1 \times 10^5$ ), so dass der Treg-Gehalt in beiden Gruppen insgesamt gleich war. Passend dazu fiel auch die Expansion aktivierter

CD4<sup>+</sup> Tconv in der Milz der GVHD-Gruppe ( $0,8 \pm 0,1 \times 10^5$ ) deutlich geringer als im A20-Modell. Ihre Zellzahl war im Vergleich zur KM-Gruppe mit  $1,1 \pm 0,2 \times 10^5$  aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv sogar leicht erniedrigt.



**Abbildung 4.31 Durchflusszytometrische Untersuchung der T-Zell-Populationen in der Milz an Tag 15 nach haploidenter Transplantation alleine oder mit zeitgleicher GVHD-Induktion (Bcl1-Modell).** Nach letaler Bestrahlung (13 Gy à 2x 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) an Tag 0 wurden CB6F1 Empfängertiere mit  $2,5 \times 10^6$  BALB/c KM- alleine (KM-Gruppe ●, n=5) oder zusammen mit  $5 \times 10^6$  BALB/c Milzzellen (GVHD-Gruppe ▲, n=5) transplantiert. Alle Tiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  aus BALB/c stammende Bcl1-*gfp-luc* Tumor-B-Zellen. Gezeigt werden die absoluten Zellzahlen der T-Zellen (A) und ihrer CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen (B), der prozentuale Anteil von Treg unter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (C) sowie die absoluten Zellzahlen der Treg im Vergleich mit aktivierten CD4<sup>+</sup> Tconv (D). Zu sehen sind die MW der Zellzahlen pro Milz  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau ( $p^* \leq 0,05$ ,  $***p \leq 0,001$ ).

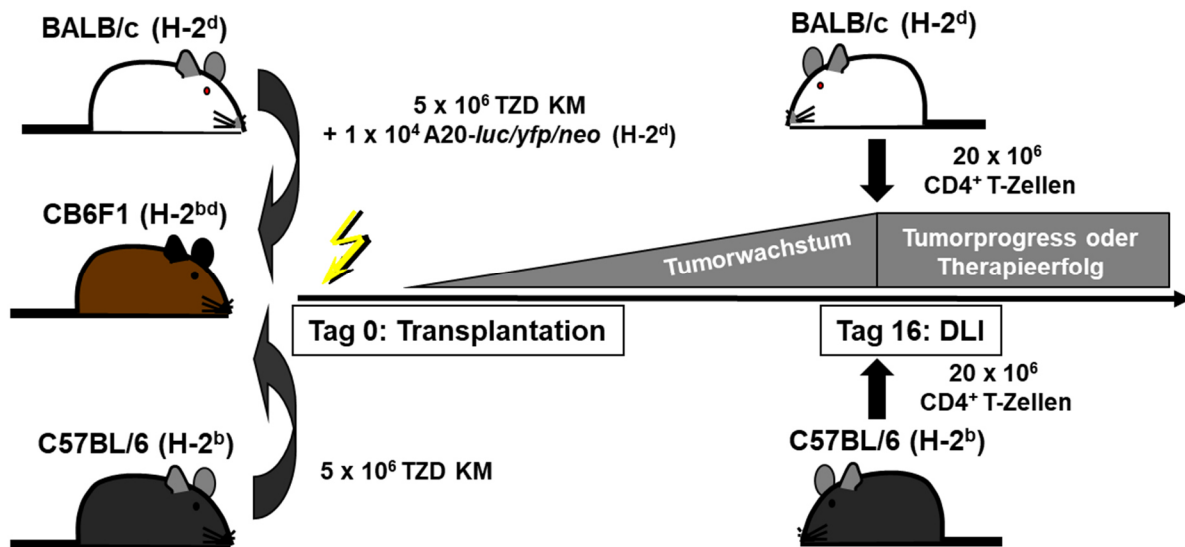
Zusammenfassend konnten wir zu allen Untersuchungszeitpunkten auch in der Milz der GVHD-Gruppe eine deutliche Verlangsamung der Infiltration durch maligne B-Zellen nachweisen, während gleichzeitig auch fast keine normalen B-Zellen gesehen wurden. Erwartungsgemäß nahm aufgrund des Tropismus der Bcl1-*gfp-luc* Tumorzellen für die Milz das Tumorstadium dort am schnellsten zu. Da sich an Tag 25 auch in der Milz der GVHD-Tiere ein massiver Tumorstadium zeigte, ist

anzunehmen, dass zu diesem Zeitpunkt der vermutete indirekte GVL-Effekt nicht mehr ausreichend ist, um das Tumorwachstum in der Milz zu begrenzen. Erstaunlicherweise war das T-Zell-Kompartiment, anders als im A20-Modell, zum Untersuchungszeitpunkt an Tag 15 nicht so deutlich zu Gunsten einer Inflammation ausgelenkt (weniger aktivierte CD4<sup>+</sup> Tconv, ähnliche Treg im Vergleich zur KM-Gruppe).

#### 4.3.2 Haploidente Transplantation und nachträgliche DLI

Durch eine GVHD-Induktion am Tag der haploidenten Transplantation wurde ein signifikant verzögertes Anwachsen von *A20-luc/yfp/neo* Tumorzellen durch indirekt vermittelte GVL-Effekte beobachtet. Im klinischen Kontext wird bedauerlicherweise auch nach anfänglicher Remission einer malignen Grunderkrankung im weiteren Verlauf nach KMT nicht selten ein Verlust der immunologischen Kontrolle und damit ein Rezidiv beobachtet. Die Gabe einer DLI stellt für diese Situation eine effektive Behandlungsmethode dar, indem sie bspw. eine T-Zell-Erschöpfung wieder aufhebt und dadurch in vielen Fällen erneut längerfristige Remissionen ermöglicht. Wir wollten daher untersuchen, ob indirekte GVL-Effekte auch bei der Behandlung einer bereits bestehenden Tumorerkrankung mit einer DLI eine Rolle spielen.

Hierzu wurden CB6F1 Mäuse (H-2<sup>bd</sup>) an Tag 0 mit 13 Gy (Aufteilung auf 2 Einzeldosen à 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) letal bestrahlt und mit  $5 \times 10^6$  durch MACS aufgereinigten TZD KM-Zellen aus C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) oder BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Mäusen transplantiert. Alle Empfängertiere erhielten zeitgleich  $1 \times 10^4$  *A20-luc/yfp/neo* Tumorzellen (H-2<sup>d</sup>). Aufgrund der T-Zell-Depletion des KM wird das Auftreten einer GVHD verhindert und daher ist vorerst auch kein relevanter GVL-Effekt zu erwarten. An Tag 16 erfolgte die Therapie des angewachsenen B-Zell-Lymphoms durch Gabe einer DLI ( $20 \times 10^6$  MACS angereicherte CD4<sup>+</sup> T-Zellen). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren jeweils identischer Herkunft (syngen) wie das zuvor transplantierte KM (Behandlungsgruppen: BALB/c + DLI und B6 + DLI). Als Kontrollgruppen (BALB/c - DLI und B6 - DLI) dienten transplantierte Mäuse, die keine DLI erhielten (**Abbildung 4.32**).

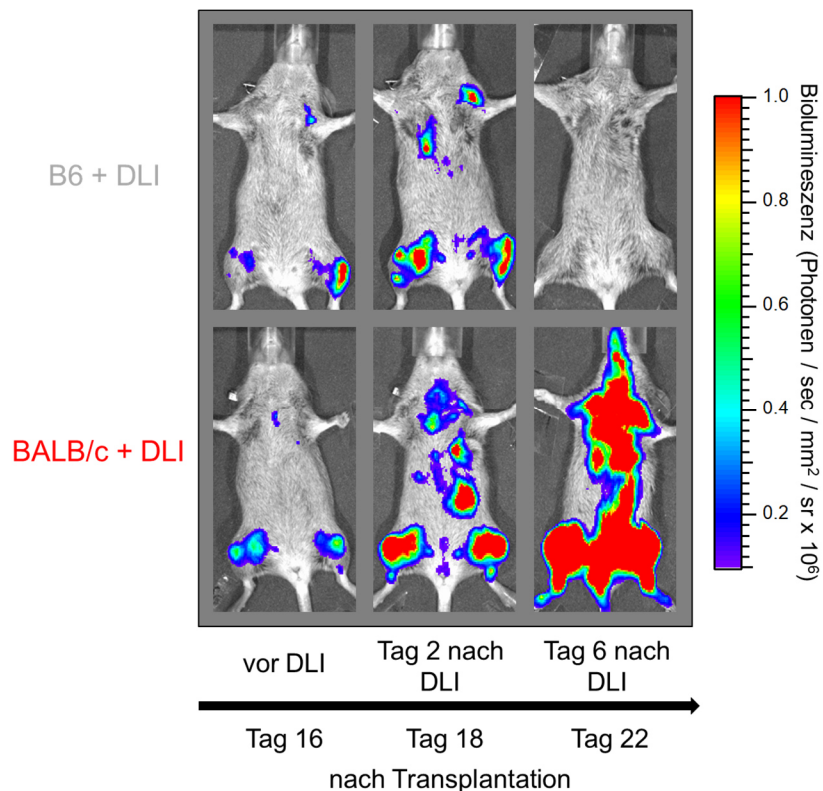


**Abbildung 4.32 Haploidenten GVHD/GVL-Transplantationsmodell mit DLI an Tag 16 nach KMT.** An Tag 0 wurden CB6F1 (H-2<sup>bd</sup>) Mäuse letal (13 Gy, 2 Einzeldosen à 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) bestrahlt und mit  $5 \times 10^6$  TZD KM aus C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) oder BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Mäusen transplantiert. Zeitgleich wurden  $1 \times 10^4$  A20-luc-yfp/neo Tumorzellen (H-2<sup>d</sup>) verabreicht. An Tag 16 erfolgte eine Behandlung der Tumorerkrankung durch Gabe einer DLI ( $20 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen, identische (syngene) Herkunft wie das KM). Der Therapieerfolg der DLI wurde mithilfe von *in vivo* BLI beobachtet.

Nach Gabe von C57BL/6 CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist ein rascher Rückgang der aus BALB/c-Tieren stammenden malignen B-Zellen durch direkte Alloreaktivität zu erwarten, während ein Ansprechen des Tumors auf BALB/c CD4<sup>+</sup> T-Zellen wiederum nur über indirekte GVL-Mechanismen erklärbar wäre. Das BLI-Signal der Tumorzellen wurde, wie in 4.3.1.1 beschrieben, erfasst und ausgewertet. Außerdem wurden die Tiere regelmäßig gewogen und auf äußere Zeichen eines Tumorstadiums (Lähmung der Hinterläufe und Verschlechterung des Allgemeinzustandes) hin untersucht. Sobald die Mäuse Anzeichen einer Lähmungserscheinung zeigten, erfolgte umgehend ihre tierschutzgerechte Tötung.

#### 4.3.2.1 Beurteilung der des Therapieerfolges der DLI mittels BLI

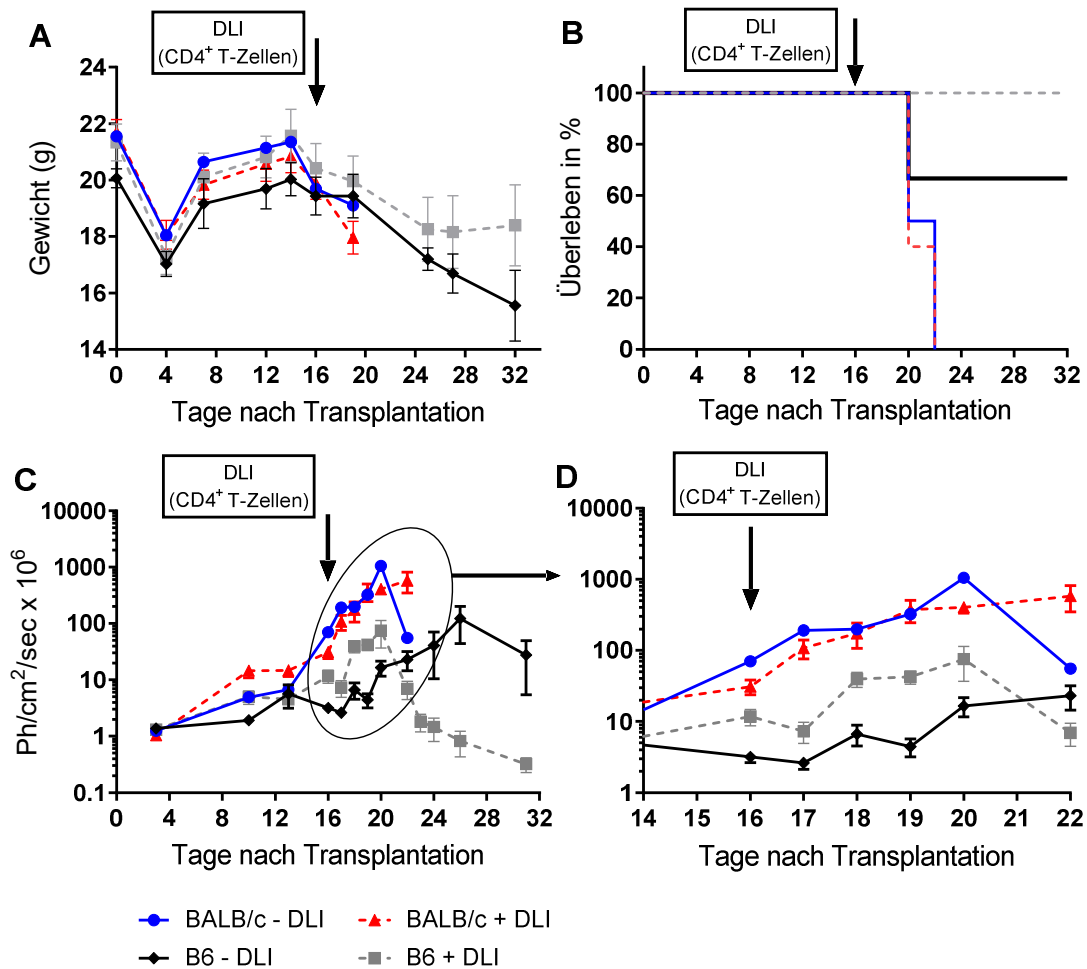
In allen Gruppen sahen wir den typischen Gewichtsverlust wenige Tage nach Bestrahlung. Die Erholung des Allgemeinzustandes und des Körpergewichts verlief erwartungsgemäß für alle Versuchstiere bis zur DLI ähnlich. Das BLI-Signal stieg in Mäusen, die mit TZD BALB/c KM transplantiert wurden, etwas stärker an als in Tieren, die TZD B6 KM erhielten. Die Signalintensität an Tag 16 (vor DLI) war allerdings zwischen den Tieren, die eine BALB/c DLI erhalten sollten und denen, die eine B6 DLI erhalten sollten, nicht signifikant unterschiedlich, so dass von einer ähnlichen Tumorlast in den Behandlungsgruppen vor DLI-Gabe ausgegangen werden kann. In **Abbildung 4.33** wird die Lokalisation und der zeitliche Verlauf des Tumorwachstums exemplarisch an einer Maus pro Behandlungsgruppe direkt vor und kurz nach DLI dargestellt.



**Abbildung 4.33** IVIS Kameraaufnahmen des BLI-Signals von malignen *A20-luc/yfp/neo* B-Zellen in CB6F1 Mäusen nach haploidentener Transplantation und DLI an Tag 16. An Tag 0 wurden CB6F1 (H-2<sup>bd</sup>) Mäuse letal (13 Gy, 2 Einzeldosen à 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) bestrahlt und mit  $5 \times 10^6$  TZD KM aus C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) oder BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Mäusen transplantiert. Zeitgleich wurden  $1 \times 10^4$  *A20-luc-yfp/neo* Tumorzellen (H-2<sup>d</sup>) verabreicht. An Tag 16 erfolgte die Behandlung der Tumorerkrankung durch Gabe einer DLI ( $20 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen, identische (syngene) Herkunft wie das KM). Die IVIS Kamerabilder zeigen dieselbe Maus pro Behandlungsgruppe nach i.p. Gabe von Luciferin und einer Messdauer von 5 Min.

Die Tumorlast stieg sowohl in der unbehandelten als auch behandelten BALB/c Gruppe im Anschluss an die DLI sprunghaft an. Bis einschließlich Tag 20 nach Transplantation bzw. Tag 4 nach DLI bestand kein relevanter Unterschied zwischen der BALB/c Kontroll- und Behandlungsgruppe unabhängig davon, ob die Tiere eine DLI erhalten hatten oder nicht. Im kurzfristigen Verlauf nahm das Tumorstadium in Mäusen der BALB/c + DLI-Gruppe deutlich zu, während die letzte überlebende Maus der unbehandelten BALB/c Kontrollgruppe präfinal einen BLI-Signalabfall zeigte. Aufgrund einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinzustands, Abnahme des Körpergewichts sowie des starken Tumorprogresses mussten alle Tiere der BALB/c Gruppen (DLI-Gruppe und Kontrollgruppe) spätestens 22 Tage nach Transplantation bzw. 6 Tage nach DLI tierschutzgemäß getötet werden.

Im Gegensatz dazu war die Zunahme des BLI-Signals in der B6 + DLI-Gruppe kurz nach DLI eindeutig verzögert. An Tag 22 nach Transplantation bzw. 6 Tage nach DLI machte sich die erwartete direkte Alloreaktivität der C57BL/6 CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegen die aus BALB/c Mäusen stammenden Tumorzellen noch deutlicher bemerkbar. Das Tumorsignal sank stark ab und lag zu diesem Zeitpunkt erstmalig unterhalb des Signals der unbehandelten B6 Gruppe. In der Folge nahm die Tumorlast in der behandelten B6 Gruppe rasch weiter ab und lag am Ende des Experiments unterhalb des Ausgangsniveaus, während das BLI-Signal der B6-Gruppe ohne DLI weiter anstieg. Auch der Allgemeinzustand und das Körpergewicht der B6 + DLI-Gruppe erholte sich zum Versuchsende leicht, während in der unbehandelten B6 Gruppe ein zunehmender - tumorbedingter - körperlicher Verfall zu beobachten war. **Abbildung 4.34** zeigt den BLI-Verlauf der A20-*luc/yfp/neo* Tumorzellen und das Überleben sowie das Gewicht der Empfängertiere.



**Abbildung 4.34 Gewichtsverlauf (A) und Überlebenskurve (B) von CB6F1 Empfängertieren sowie BLI-Signalverlauf von A20-*luc/yfp/neo* Tumorzellen (C und D) nach haploidenter Transplantation und verzögerter DLI an Tag 16.** An Tag 0 wurden CB6F1 (H-2<sup>bd</sup>) Mäuse letal (13 Gy, 2 Einzeldosen à 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) bestrahlt und mit 5 x 10<sup>6</sup> TZD KM aus C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) oder BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Mäusen transplantiert. Zeitgleich wurden 1 x 10<sup>4</sup> A20-*luc-yfp/neo* Tumorzellen (H-2<sup>d</sup>) verabreicht. An Tag 16 erfolgte in den Behandlungsgruppen (BALB/c + DLI-Gruppe ▲, n=5 und B6 + DLI-Gruppe ■, n=5) eine DLI (20 x 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen) mit identischer (syngener) Herkunft wie das KM. Als Kontrollgruppen dienen transplantierte CB6F1 Mäuse, die keine DLI erhielten (BALB/c - DLI-Gruppe ●, n=2 und B6 - DLI-Gruppe ◆, n=3). Dargestellt sind die MW ± SEM des Gewichts und des Photonensignals der BLI-Messung (nach i.p. Injektion von Luciferin und einer Messdauer von 5 min pro Tier).

Zusammenfassend konnten wir in diesem haploidenten Transplantationsmodell in der B6 Gruppe nach DLI an Tag 16 nach KMT eine rasche Bekämpfung der MHC-differenten malignen B-Zellen und einen damit verbundenen Rückgang des BLI-Signals beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Behandlung mit einer DLI aus BALB/c Mäusen ein deutlicher Progress des dazu MHC-identen B-Zell-Lymphoms und als Folge davon ein tumorbedingt letaler Verlauf in allen Tieren der Behandlungsgruppe.

#### 4.3.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchung: Knochenmark und Milz

Am Versuchsende (Tag 45 nach Transplantation bzw. Tag 29 nach DLI) erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung von KM und Milz der B6 + DLI-Gruppe. Nachdem die BLI-Messung eine rasch progrediente Tumorerkrankung in der BALB/c + DLI-Gruppe gezeigt hatte, musste ihre durchflusszytometrische Analyse bereits an Tag 20 nach Transplantation bzw. Tag 4 nach DLI durchgeführt werden. Die Identifizierung gesunder B-Zellen und maligner A20 Tumor B-Zellen wurde analog zu 4.3.1.2 durchgeführt.

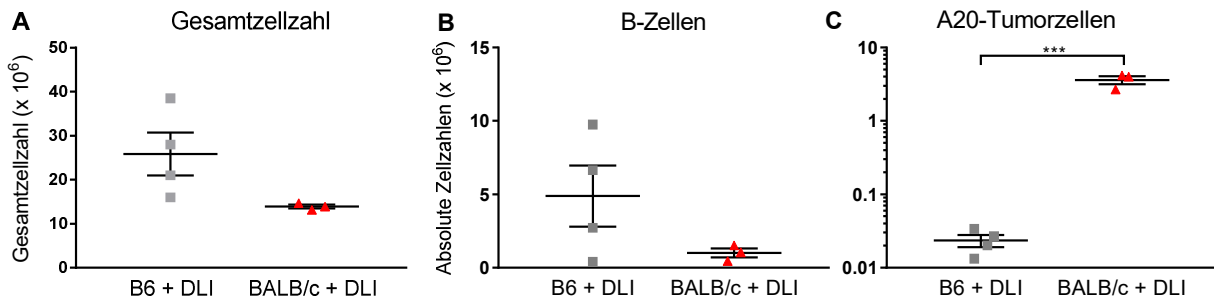
In der B6 + DLI-Gruppe lag zu diesem Zeitpunkt (Tag 45 nach KMT) die Gesamtzellzahl des KM bei  $25,9 \pm 4,9 \times 10^6$  und der Milz bei  $58,1 \pm 22,8 \times 10^6$  Zellen. Der absolute B-Zellzahl des KM war  $4,9 \pm 2,1 \times 10^6$  und der Milz  $25,1 \pm 10,8 \times 10^6$  Zellen. Im Vergleich zu CB6F1-Empfängertieren, die keine DLI erhielten und bei denen keine GVHD induziert wurde (vgl. 4.3.1.3 und 4.3.1.4), war der B-Zellgehalt in beiden Organen nur leicht vermindert (B-Zellgehalt rein KM-transplantierte CB6F1-Empfängertiere an Tag 25 nach KMT:  $6,0 \pm 3,4 \times 10^6$  im KM und  $41,6 \pm 7,9 \times 10^6$  in der Milz). Somit lag in der B6 Gruppe nach DLI keine B-Zell-Aplasie vor, wie sie normalerweise in Mäusen mit GVHD auftritt, sondern es bestand ein fast normaler B-Zellgehalt in KM und Milz. Erwartungsgemäß waren in der B6 + DLI-Gruppe (MHC-different zum B-Zell-Lymphom) mit  $2,4 \pm 0,4 \times 10^4$  A20-*luc/yfp/neo* im KM und  $10,2 \pm 2,8 \times 10^4$  A20-*luc/yfp/neo* in der Milz fast keine Tumorzellen nachweisbar (**Abbildung 4.35**).

Die Gesamtzellzahl des KM der BALB/c + DLI-Gruppe war an Tag 20 nach KMT bzw. Tag 4 nach DLI mit  $13,9 \pm 0,4 \times 10^6$  um die Hälfte niedriger als in der B6 + DLI-Gruppe, während die Gesamtzellzahl der Milz (BALB/c + DLI:  $59,0 \pm 3,8 \times 10^6$  Zellen) in beiden Gruppen ähnlich hoch war. Auch die Anzahl gesunder B-Zellen im KM der BALB/c + DLI-Gruppe war mit  $1,0 \pm 0,3 \times 10^6$  niedriger als in der B6 + DLI Gruppe. In der Milz zeigte sich wiederum ein ähnlicher B-Zellgehalt (BALB/c + DLI:  $19,4 \pm 2,8 \times 10^6$ ) im Vergleich zur B6 + DLI-Gruppe. Während in der B6 + DLI-Gruppe sowohl im KM als auch in der Milz kaum Tumorzellen vorhanden waren, zeigten die Tiere der BALB/c + DLI-Gruppe im KM ( $p < 0,001$ ) mit  $3,6 \pm 0,5 \times 10^6$  A20-*luc/yfp/neo* und in der

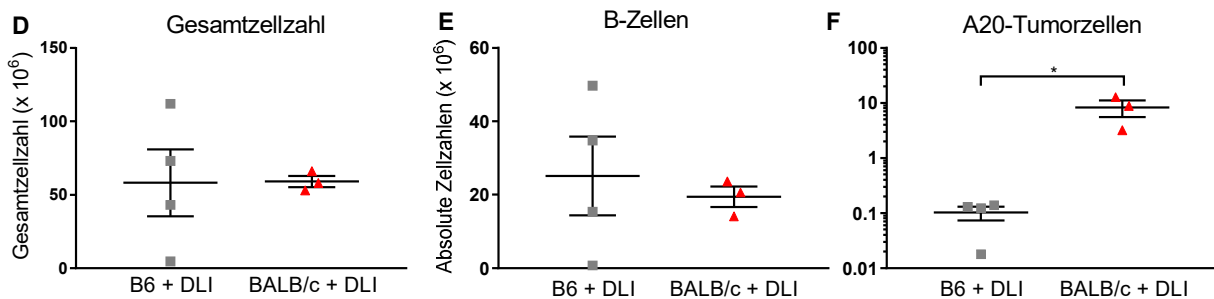


Milz ( $p = 0,02$ ) mit  $8,3 \pm 2,8 \times 10^6$  *A20-luc/yfp/neo* eine um ca. 2 log-Stufen höhere Tumormast in beiden Organen (**Abbildung 4.35**).

### Knochenmark



### Milz



**Abbildung 4.35** Gesamtzellzahl von KM (A) und Milz (D). Durchflusszytometrische Untersuchung normaler B-Zellen (B und E) und maligner *A20-luc/yfp/neo* B-Zellen (C und F) in KM und Milz nach haploidenter Transplantation und 29 (B6 + DLI) bzw. 4 (BALB/c + DLI) Tage nach DLI. An Tag 0 wurden CB6F1 (H-2<sup>bd</sup>) Mäuse letal (13 Gy, 2 Einzeldosen à 6,5 Gy in einem Abstand von vier Stunden) bestrahlt und mit  $5 \times 10^6$  TZD KM aus C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) oder BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Mäusen transplantiert. Zeitgleich wurden  $1 \times 10^4$  *A20-luc-yfp/neo* Tumorzellen (H-2<sup>d</sup>) verabreicht. An Tag 16 wurde eine DLI ( $20 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen) mit identischer (syngener) Herkunft wie das KM (BALB/c + DLI-Gruppe ▲,  $n=3$  und B6 + DLI-Gruppe ■,  $n=4$ ) verabreicht. Dargestellt sind die MW der Zellzahlen aus zwei Hinterläufen (KM; Femur und Tibia) bzw. pro Milz  $\pm$  SEM und das Signifikanzniveau ( $p^* \leq 0,05$ ,  $***p \leq 0,001$ ).

Insgesamt konnten die Ergebnisse der BLI auch durchflusszytometrisch nachvollzogen werden. In der B6 + DLI-Gruppe konnten wir praktisch keine Tumor-B-Zellen in KM und Milz detektieren, während in der BALB/c + DLI-Gruppe eine deutliche Tumorerfiltration in beiden Organen nachweisbar war. Bemerkenswert war, dass nach DLI eine annähernd normale Anzahl gesunder B-Zellen im KM und Milz der B6 + DLI-Gruppe vorhanden war und damit keine B-Zell-Aplasie vorlag, wie sie in gleichen Empfängermäusen nach einer haploidenten KMT mit GVHD-Induktion am Tag der Transplantation auftrat (vgl. 4.3.1.3 und 4.3.1.4). Nach einer DLI aus C57BL/6 Mäusen (MHC-different zum Tumor) war erwartungsgemäß eine effektive Eliminierung der Tumorzellen über direkte Alloreaktivität zu beobachten. Eine DLI aus BALB/c

Mäusen (MHC-ident zum Tumor) konnte das bereits stark fortgeschrittene Wachstum der malignen B-Zellen nicht mehr bremsen. Die bisher beschriebenen, indirekten GVL-Effekte (vgl. 4.3.1) sind in diesem Experiment also nicht mehr in der Lage, das Wachstum und den klinischen Verlauf eines fortgeschrittenen B-Zell-Lymphoms zu beeinflussen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die akute GVHD blockiert die B-Zell-Lymphopoese vor der Stufe der CLP 2-Zellen im Knochenmark

Die allogene SZT hat sich als Standardtherapie für bestimmte gutartige und v.a. bösartige hämatologische Erkrankungen etabliert. Nach einer Konditionierungstherapie des Empfängers (i. d. R. eine Kombination aus Alkylantien mit oder ohne Bestrahlung) werden die Stammzellen des Spenders, welche entweder aus dem Knochenmark, dem Nabelschnurblut oder nach Mobilisierung aus dem peripheren Blut gewonnen werden, übertragen. Im Gegensatz zu einer konventionellen Chemotherapie verfolgt die allogene Transplantation zur Behandlung von Neoplasien einen führend immunologischen Therapieansatz, welcher durch Spender-T-Zellen (GVL-Effekt) vermittelt wird. Jedoch sind diese Spender-T-Zellen auch für das Auftreten einer GVHD verantwortlich und führen zu einer immunologischen Zerstörung von gesunden Empfängerorganen. Da T-Zellen ihre Zielantigene vornehmlich nach Präsentation durch APCs im Kontext von HLA-Molekülen erkennen können, steigt das Risiko für eine GVHD, je mehr HLA-Differenzen zwischen Spender und Empfänger vorhanden sind. Aufgrund des initialen Gewebeschadens durch die Konditionierungstherapie wird ein inflammatorisches Milieu geschaffen, welches die Aktivierung von T-Zellen durch APCs erleichtert. In der anschließenden Effektorphase wird durch alloreaktive T-Zellen nicht nur die Apoptose von Darmepithel, Haut und Leber (klassische Ziel-Organen der akuten GVHD), sondern auch lymphatischer Gewebe induziert. Nur durch den Einsatz einer prophylaktischen Immunsuppression lässt sich das Risiko für das Auftreten einer schweren GVHD reduzieren. Eine T-Zell-Depletion des Transplantats reduziert zwar ebenfalls die Inzidenz einer GVHD, führt aber zu einer erhöhten Rate von Transplantatversagen und Rezidiven. Die Prophylaxe und Behandlung einer GVHD, beispielsweise mit Corticosteroiden, verzögert die Rekonstitution des Immunsystems und erhöht die Gefahr für lebensbedrohliche Infektionen (197). Die Rekonstitution des Immunsystems verläuft nach Transplantation dabei für die verschiedenen zellulären Kompartimente unterschiedlich schnell. Wenige Tage nach der Konditionierungstherapie folgt eine aplastische Phase, die bis zur Regeneration der neutrophilen Granulozyten andauert.

In den ersten 100 Tagen nach Transplantation ist die zelluläre Immunantwort aufgrund einer reduzierten Anzahl von NK-Zellen und T-Zellen gestört. Dies hat eine erhöhte Anfälligkeit für Pilz- und Virusinfektionen zur Folge. Die anfängliche T-Zell-Rekonstitution basiert auf einer Expansion reifer Gedächtnis T-Zellen des Spenders in der Peripherie. Erst einige Monate später beginnt die thymusbasierte Rekonstitution von naiven T-Zellen. Da gerade die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population auf die thymusbasierte Regeneration angewiesen ist, erklärt sich u.a. dadurch die Verschiebung des Verhältnisses CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen zugunsten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wie es auch in unseren Experimenten beobachtet wurde (160). Die altersbedingte Thymusinvolution und direkte Toxizität der Konditionierung auf das Thymusepithel stören die thymische Funktion. Dies führt zu einem Mangel an naiven T-Zellen und damit zu einem eingeschränkten TZR-Repertoire. Dadurch kommt es zu einem erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen und einer höheren Rezidivrate. Das Auftreten einer GVHD verstärkt diesen negativen Effekt zusätzlich, indem sie eine immunologische Zerstörung des thymischen Milieus verursacht (Thymus-GVHD) (163). Dadurch hat die Thymus-GVHD auch direkte Auswirkungen auf die B-Zell-Immunität, da für B-Zell-Effektor und -Gedächtnisfunktionen eine Interaktion dieser Zellen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen unabdingbar ist (198).

Das B-Zell-Kompartiment erholt sich insgesamt am langsamsten und kann unter Umständen mehrere Jahre lang eingeschränkt sein. Die ersten B-Zellen, die im PB detektiert werden können, sind transitionale CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> B-Zellen. Ihre Zahl geht im weiteren Verlauf zu Gunsten von stärker ausdifferenzierten B-Zell-Populationen zurück. Durch den zusätzlich auftretenden Mangel an Gedächtnis B-Zellen sowie die qualitative und quantitative Störung der Antikörperproduktion sind Patienten nach einer allogenen SZT besonders durch Viruserkrankungen oder kapselbildende Bakterien, wie z.B. Pneumokokken, bedroht (160). Präklinische Experimente unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten zuverlässig zeigen, dass das Auftreten einer GVHD die B-Zell-Rekonstitution besonders negativ beeinflusst (172,173,175,199,200). Da das B-Zell-Kompartiment bereits im KM zahlenmäßig reduziert ist, lässt sich vermuten, dass eine Schädigung der lymphatischen Vorläuferzellen vorliegt. Ein Ziel dieser Dissertation war es, mittels eines etablierten, MHC-differenten murinen Transplantationsmodells diese vermutete GVHD-assoziierte

Blockierung der B-Zell-Lymphopoese durch durchflusszytometrische KM-Analysen zu bestätigen und näher einzugrenzen. Hierfür wurden BALB/c Mäuse letal bestrahlt und mit Knochenmark aus C57BL/6 Mäusen transplantiert. Eine GVHD wurde durch zusätzliche Gabe von C57BL/6 Milzzellen ausgelöst. Da in diesem Transplantationsmodell keine Immunsuppressiva eingesetzt werden, sind negative Effekte auf das B-Zell-Kompartiment auf rein immunologische Mechanismen zurückzuführen. In unseren Experimenten zeigte sich am ausgewählten Untersuchungszeitpunkt unerwarteterweise in der GVHD-Gruppe eine gegenüber der KM-Kontrollgruppe signifikante Erniedrigung der Gesamtzellzahl im KM, was keinen typischen Befund für dieses Transplantationsmodell darstellt und möglicherweise eher durch methodische Probleme im Rahmen der Aufarbeitung und Zellzählung zu begründen ist. Der B-Zellgehalt in transplantierten Tieren ohne GVHD lag 4 Wochen nach KMT höher als bei nicht transplantierten Spendertieren, was auf eine überschießende Rekonstitution zurückzuführen ist (160). Sowohl im PB (3 Wochen nach KMT) als auch im KM (4 Wochen nach KMT) konnten, wie für dieses Transplantationsmodell zu erwarten, nach GVHD-Induktion nur sehr wenige reife B-Zellen detektiert werden.

Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen inklusive lymphatischer Vorläuferzellen machen auch unter physiologischen Bedingungen nur einen Bruchteil der Gesamtzellularität des KM aus. Um diese Populationen durchflusszytometrisch genauer beurteilen zu können, schlossen wir in einem ersten Schritt alle reifen, hämatopoetischen Zellen nach Färbung mit einem sog. „lineage cocktail“ (enthält Antikörper gegen linienspezifische Oberflächenantigene auf B- und T-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen) aus. In unseren Versuchen lag die verbleibende „lineage-negative“ Zielpopulation dann bei ca. 2% aller kernhaltigen KM-Zellen. Darunter zeigte die Population der LK-Zellen (CMP, GMP und MEP) einen ähnlichen prozentualen Zellgehalt in nicht transplantierten Spendertieren und transplantierten Tieren ohne und mit GVHD. Der absolute LK-Zellgehalt war hingegen in transplantierten Tieren ohne GVHD um ca. die Hälfte und mit GVHD um ca. ein Drittel niedriger als in nicht transplantierten Spendertieren. Die prozentuale Zellgehalt der LSK-Population (ST-HSC, LT-HSC und MPP) war in Mäusen mit GVHD im Vergleich zu unbehandelten und rein KM-transplantierten Tieren dagegen erhöht.

---

Dies könnte in Zusammenhang mit einer T-Zell-vermittelten Störung der Stammzellquieszenz stehen (201), auf welche im weiteren Verlauf der Diskussion (siehe **5.2**) noch näher eingegangen wird. Der besondere Fokus der Arbeit lag aber auf der Analyse lymphatischer Progenitorzellen (CLP). Oligopotente CLP 1-Zellen haben dabei noch das Potential, sich in B-, T-, dendritische und NK-Zellen zu differenzieren, während CLP 2-Zellen bereits B-Zell-restringiert sind. Wir konnten feststellen, dass eine KMT alleine (ohne GVHD) bereits zu einem signifikanten Rückgang der CLP 1-Populationen führt (Reduktion des prozentualen CLP 1-Zellgehalts um 85% in der KM-Gruppe und 96% in der GVHD-Gruppe im Vergleich mit nicht transplantierten Spendertieren). Wird zusätzlich eine GVHD induziert, so lässt sich ein deutlicher Rückgang der CLP 2-Population (Reduktion des prozentualen CLP 2-Zellgehalts um 29% in der KM-Gruppe und 61% in der GVHD-Gruppe im Vergleich mit nicht transplantierten Spendertieren) beobachten. Der Rückgang beider CLP Populationen in der GVHD-freien KM-Gruppe ist am ehesten mit einem gesteigerten Umsatz im Rahmen der lymphatischen Rekonstitution nach KMT zu erklären, da die Anzahl reifer B-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Spendertieren sogar erhöht war. Dagegen ist der weitaus deutlichere Abfall des CLP 2-Zellgehalts in der GVHD-Gruppe ein Anzeichen dafür, dass die Blockierung der B-Zell-Lymphopoese im KM vor der Stufe der CLP 2-Population stattfindet. Shono et al. (199) konnten in einem MHC-differenten murinen Transplantationsmodell bereits zeigen, dass durch die GVHD nicht-hämatopoetische Stroma-Zellen im KM angegriffen und zerstört werden, wodurch das Anwachsen des Transplantats empfindlich gestört wird (Knochenmark-GVHD). Infiltrierende alloreaktive Spender-T-Zellen sind dabei für die Zerstörung verschiedener Nischenzellen (vornehmlich Osteoblasten und sinusoidale vaskulär-endotheliale Zellen) und damit des spezifischen Mikromilieus der Hämatopoese hauptverantwortlich (202). Verschiedene Mechanismen sorgen dafür, dass gerade diese wichtigen Stroma-Zellen besonders anfällig für eine immunologische Schädigung sind. Im Vergleich zu hämatopoetischen Zellen und ihren Progenitorzellen sind mesenchymale Stromazellen und endotheliale Zellen gegenüber der Konditionierungstherapie resistenter (203) und die Rekonstitution mesenchymaler Zellen des Spenders nach SZT verläuft zunächst verzögert. Daher stammt auch nach hämatopoetischer Regeneration die Mehrzahl der nischenformenden Stromazellen

vom Empfänger und exprimiert folglich kontinuierlich Empfänger-Antigene, die Spender-T-Zellen aktivieren können (204). Dabei präsentieren Osteoblasten Antigene nicht nur über MHC Klasse I, sondern reagieren auf inflammatorische Signale mit einer erhöhten Expression von MHC Klasse II, CD40 und Fas und sind daher besonders anfällig für alloreaktive T-Zellen (205,206). Gerade die B-Zell-Entwicklung im KM ist auf eine komplexe Interaktion mit mehreren nischenbildenden Stromazellen angewiesen, insbesondere Osteoblasten und perivaskuläre endotheliale Stromazellen, sowie auf die von ihnen sezernierten Überlebens- und Wachstumsfaktoren wie IL7 oder CXCL12 (19). Wir konnten zeigen, dass eine akute GVHD in einem murinen MHC-differenten Transplantationsmodell eine Blockierung der B-Zell-Rekonstitution vor der Stufe der CLP 2-Population induziert und damit zu einer B-Zell-Aplasie führt. Der zugrundeliegende, Pathomechanismus hierfür scheint eine T-Zell-vermittelte inflammatorische Zerstörung der B-Zell-Nische im Knochenmark und der damit verbundene Verlust von entscheidenden Überlebens- und Differenzierungssignalen der B-Zell-Lymphopoese zu sein. In Analogie zu tierexperimentellen Beobachtungen konnte auch im Menschen eine GVHD-induzierte Zerstörung von Osteoblasten durch alloreaktive T-Zellen festgestellt werden, die ebenfalls zu einer gestörten B-Zell-Rekonstitution führt (174). Daher ist auch bei Menschen die Zerstörung des supportiven KM-Stromas der B-Zell-Lymphopoese durch die GVHD als eine der zentralen Ursachen für eine verzögerte oder ausbleibende B-Zell-Rekonstitution nach allogener SZT anzunehmen.

## **5.2 Regulatorische T-Zellen schützen das supportive Knochenmarkstroma der B-Zell-Lymphopoese vor Effektor-T-Zellen**

Auch die Treg-Rekonstitution nach allogener SZT wird durch das Auftreten einer akuten GVHD verzögert, was zu einem Ungleichgewicht zwischen Effektor-T-Zellen und Treg führt (207). Der adoptive Transfer von Treg in einer supraphysiologischen Zelldosis schützt im murinen Modell vor einer ansonsten letal verlaufenden, akuten GVHD und verbessert die Immunrekonstitution nach allogener SZT (149,208,209). Neuere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten in einem haploidenten murinen Transplantationsmodell auch zeigen, dass eine bereits bestehende, akute GVHD durch eine nachträglich Gabe von Treg erfolgreich behandelt und die lymphatische

Rekonstitution deutlich verbessert werden kann (154). Umgekehrt ist auch unter „steady state“ Bedingungen (ohne eine vorhergehende SZT) eine Störung der immunologischen Hämostase und insbesondere eine Proliferation sowie unkontrollierte Aktivierung von Effektor-T-Zellen ähnlich wie bei einer GVHD zu erwarten, falls nicht ausreichend Treg zu Verfügung stehen (134). Außerdem zeigen FoxP3- und damit auch Treg-defiziente Mäuse deutliche Veränderungen ihrer B-Zell-Entwicklung (210). Wir nutzten daher ein von Rudensky et al. (193) beschriebenes, murines Treg-Zellablationsmodell, um zu untersuchen, wie sich eine isolierte Ablation von Treg ohne eine SZT auf das reife B-Zell-Kompartiment und dessen Vorläuferzellen im KM auswirkt. Unter normalen Umständen besitzen murine Zellen keine Rezeptoren für DT. Erst nach „knock-in“ des DTR in den endogenen FoxP3-Lokus, exprimieren Treg von FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen den DTR unter Kontrolle des FoxP3-Promotors. Dies macht sie isoliert empfindlich für DT und sie können nach Gabe des Toxins zielgerichtet ablatiert werden. In diesem Modell führt die Treg-Ablation in neugeborenen und erwachsenen Mäusen zu einer letal verlaufenden Autoimmunerkrankung, die FoxP3-defizienten Scurfy Mäusen ähnelt und sich durch eine unkontrollierte Autoinflammation und Lymphoproliferation auszeichnet. Im Gegensatz dazu wird von anderen Forschungsgruppen ein alternatives Treg-Ablationsmodell genutzt, in welchem der DTR in ein künstliches, bakterielles Chromosom eingebracht wird, das für den FoxP3-Promotor kodiert, sog. DEREK-Mäuse („depletion of regulatory T cells“, DEREK). Eine Treg-Ablation in DEREK-Mäusen führt ebenfalls zu einer effizienten Treg-Ablation, jedoch kommt es, im Unterschied zu FoxP3<sup>DTR</sup> Mäusen, nur in neugeborenen und nicht in adulten Mäusen zu einer schwer verlaufenden Autoinflammation wie in Scurfy Mäusen (137).

In unserem Treg-Depletionsschema wurden FoxP3<sup>DTR</sup> C57BL/6 Mäusen je 1 µg DT an Tag 0, 2, 4 und 7 i.p. verabreicht. Während des anschließenden Beobachtungszeitraums wurden das PB und am Versuchsende (21 Tage nach der ersten DT-Gabe) das PB, KM und Milz unserer Versuchstiere durchflusszytometrisch untersucht. Parallel nach gleichem Schema behandelte C57BL/6 wt Mäuse zeigten keine Veränderungen ihrer zellulären Kompartimente in allen drei untersuchten Organen, so dass unspezifische DT-Wirkungen auszuschließen sind.



Die Untersuchung des PB unserer Tiere an Tag 8 nach der ersten DT-Gabe bestätigte, dass die Treg-Depletion erfolgreich verlaufen war (Reduktion um 92%). Im Anschluss daran erholte sich die Treg-Population im PB langsam, erreichte am Versuchsende (21 Tage nach der ersten DT-Gabe) jedoch in keinem der untersuchten Organen (PB, Milz und KM) ihr Ausgangsniveau. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen sahen Rudensky et al. (193) in der Milz bereits zwischen Tag 10 und 15 nach der ersten DT-Gabe eine vollständige Erholung der Treg. Jedoch verabreichten sie zur Untersuchung der Treg-Erholung lediglich zweimal DT an Tag 0 und 1 in vergleichbarer Dosierung wie unseren Experimenten (50 µg / kg Körpergewicht DT, entsprechend ca. 1,25 µg bei 25 mg Körpergewicht). In einem anderen Treg-Ablationsmodell von Nyström et al. (211) mit FoxP3<sup>DTR</sup> BALB/c Mäusen zur Untersuchung einer Autoimmungastritis zeigte sich ebenfalls an Tag 10 eine vollständige Erholung des Treg-Kompartiments in der Milz, wobei erneut nur zweimal DT an Tag 0 und 1 in einer noch niedrigeren Dosierung (je 0,5 µg) verabreicht wurden. Daher hängt die Dauer bis zu Erholung der Treg nach DT-Ablation sowohl mit der DT-Dosis als auch dem Ablationszeitraum bzw. der Anzahl der Gaben zusammen (212) und muss daher für die Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Diese Beobachtungen konnten auch Tian et al. (213) machen. Sie untersuchten in Titrationsreihen, wie sich die DT-Dosierung (jeweils 4 Gaben an Tag 0,1,3 und 6) auf die Treg-Population und die Stärke der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung (Aktivierungsmarker: CD44 Expression) in der Milz 9 Tage nach der ersten DT-Gabe auswirkte. Sie konnten bestätigen, dass höhere DT-Dosierungen zu einer effektiveren Treg-Ablation und einer damit verbundenen, stärkeren Aktivierung CD4<sup>+</sup> Tconv führt. Auch in unseren Experimenten ließ sich im Anschluss an die Ablationsperiode (Tag 8 nach 1. DT-Gabe) eine deutlich erhöhte Anzahl aktivierter CD4<sup>+</sup> Tconv (Aktivierungsmarker: CD25 Expression) im PB feststellen, die trotz ausbleibender, weiterer DT-Gaben persistierte und erst mit fortschreitender Erholung der Treg leicht zurückging. Im Gegensatz dazu war der T-Zellgehalt im PB direkt nach Ablation leicht erniedrigt und erholte sich anschließend rasch. Dies könnte auf eine transiente, tiefe T-Zell-Lymphopenie zurückzuführen sein, die sehr früh (2 Tage nach DT-Gabe) nach einer einmaligen Gabe von 50 mg/kg DT sowohl im PB als auch in lymphatischen Organen auftritt und der Expansion autoreaktiver T-Zellen vorangeht (214).

In unseren Experimenten zeigten sich als Ausdruck einer zellulären Infiltration eine erhöhte Gesamtzellzahl der Milz inklusive makroskopischer Veränderungen (Splénomegalie, schwammige Konsistenz des Organs). Parallel ließ sich trotz einer sich erholenden Treg-Population eine deutliche und persistierende Aktivierung CD4<sup>+</sup> Tconv nachweisen. Diese Beobachtungen wurden auch von Rudensky et al. (193) gemacht. Sie konnten feststellen, dass potentiell autoreaktive T-Zellen durch Treg kontinuierlich supprimiert werden. Im Anschluss an die Treg-Ablation wird diese T-Zell-Population aktiviert und induziert durch Zytokine die Reifung und Aktivierung von APC (in diesem Fall dendritische Zellen), wodurch die Inflammation weiter verstärkt und aufrechterhalten wird. Auch Nyström et al. (211) sahen trotz Treg-Erholung eine persistierende, antigenabhängige und autoreaktive T-Zell-Antwort sowie einen erhöhten CD4<sup>+</sup> T-Zellgehalt in lymphatischen Organen. Die andauernde T-Zell-Aktivierung wurde von den Autoren auf ein verändertes Verhältnis von tTreg zu pTreg nach Treg-Depletion zurückgeführt. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen sahen wir allerdings keine Proliferation von CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz. Dies könnte mit einem längeren Beobachtungszeitraum für unsere Experimente (Analyse erst 21 Tage nach der ersten DT-Gabe) zusammenhängen, da Rudensky et al. (193) die Treg-Ablation zwar nach einem ähnlichen Schema durchführten (DT-Dosierung 50 µg / kg Körpergewicht, über einen Zeitraum von 7 Tagen), aber die Analyse direkt im Anschluss an die Ablation und Nyström et al. (211) nach 10-14 Tagen nach der ersten DT-Gabe durchführten. Daher ist denkbar, dass zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt aufgrund des sich erholenden Treg-Kompartiments und rückläufiger Inflammation auch die T-Zell-Proliferation in der Milz zurückgeht.

Wie in der Milz, war auch die Gesamtzellzahl des KM in unseren Experimenten nach Treg-Ablation erhöht und es konnten sehr viele aktivierte CD4<sup>+</sup> Tconv detektiert werden. Im Gegensatz zur Milz konnten wir zum gleichen Untersuchungszeitpunkt nun eine deutliche Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im KM nachweisen. Dies könnte damit zu erklären sein, dass das KM unter physiologischen Bedingungen mehr Treg aufweist (Treg-Reservoir) als sekundäre lymphatische Organe und daher schwerer von einer Treg-Depletion betroffen ist (215). Pierini et al. (201) untersuchten das KM von FoxP3<sup>DTR</sup> C57BL/6 Mäusen nach 5 Gaben DT (1 µg) über einen Zeitraum von 10 Tagen. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen konnten sie fast noch keine

Treg im KM detektieren, da die Analyse bereits 2 Tage nach der letzten DT-Gabe durchgeführt wurde und daher nicht genug Zeit für die Treg-Regeneration blieb. Allerdings zeigte sich in Einklang mit unseren Ergebnissen ebenfalls eine erhöhte KM-Gesamtzellzahl und eine gesteigerte Expression von Aktivierungsmarkern (z.B. CD69) in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Bereits direkt nach der Treg-Ablation beobachteten wir einen deutlich reduzierten B-Zellgehalt im PB, der sich trotz Treg-Regeneration am Versuchsende in keinem der untersuchten Organe (PB, Milz und KM) erholte. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Rudensky et al. (193), die eine erhöhte Anzahl reifer B-Zellen in Lymphknoten und der Milz nach Treg-Ablation detektierten. Ihre Analyse wurde jedoch im Gegensatz zu unseren Experimenten nicht 21 Tage, sondern bereits 7 Tage nach der ersten DT-Gabe durchgeführt. Diese anfängliche B-Zell-Proliferation könnte auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein. Erstens erleichtert die aktivierte und expandierte Population autoreaktiver T-Zellen nach Treg-Ablation auch eine T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung und -Proliferation. Zweitens wurde u.a. in einem murinen Modell für systemischen Lupus erythematoses gezeigt, dass Treg auch autoreaktive B-Zellen supprimieren (216). Diese Beobachtung wird dadurch untermauert, dass in Scurfy Mäuse das Fehlen von Treg zu einem Verlust der B-Zell-Anergie und zu einer gesteigerten Produktion autoreaktive Antikörper führt (210). Ist diese wichtige immunologische B-Zell-Kontrolle also nicht vorhanden, sind auch autoreaktive B-Zellen in der Lage zu expandieren. Daher könnte eine verstärkte T-Zell-abhängige Aktivierung von teilweise autoreaktiven B-Zellen erklären, warum früh nach Treg-Ablation (193) zunächst ein erhöhter B-Zellgehalt in sekundären lymphatischen Organen wie der Milz zu finden ist. Da sich in unseren Untersuchungen jedoch zu einem späteren Zeitpunkt sowohl in der Milz (Reduktion um 95%), als auch im KM (Reduktion um 98%) nur sehr wenige B-Zellen zeigten, ist anzunehmen, dass die Bildung naiver B-Zellen im KM nach Treg-Ablation blockiert wird und dies zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt auch zu einem Rückgang des B-Zellgehalts in anderen lymphatischen Organen führt. Pierini et al. (201) konnten bereits 10 Tage nach der ersten DT-Gabe ebenfalls eine signifikante Reduktion des B-Zellgehalts im KM feststellen und bestätigten somit unsere Beobachtungen. Passend zu unserer vermuteten Störung bzw. Blockierung der B-Zell-Lymphopoese im KM zeigte sich in

---

unseren Untersuchungen eine deutliche Reduktion von oligopotenten CLP 1- (Reduktion des prozentualen Zellgehalts um 87 %) und zu einem geringeren Maße auch B-Zell-restringierten CLP 2-Zellen (Reduktion des prozentualen Zellgehalts um 30 %) nach Treg-Ablation. Weiterhin zeigte sich ein deutlich gesteigerter LSK-Zellgehalt (Steigerung um das 10-fache), während für die LK-Population keine relevanten Veränderungen zu sehen waren. Auch im Treg-Ablationsmodell von Pierini et al. (201) wurde eine signifikant erhöhte Anzahl von LSK- aber auch LMPP-Zellen (Flt3<sup>high</sup>LSK, lymphatisch geprimte multipotente Progenitorzellen) nach Treg-Ablation festgestellt. Somit stehen ihre Ergebnisse bzgl. einer Expansion der LSK-Population im Einklang mit unseren Befunden, während eine Erhöhung der von ihnen untersuchten lymphatischen Vorläuferzellen zunächst im Widerspruch mit unseren Ergebnissen steht. Allerdings ist zu beachten, dass diesbezüglich unterschiedlich definierte lymphatische Vorläuferzellen untersucht wurden. Die von uns untersuchte Population der CLP entwickelt sich aus LMPP und ist erst danach vollständig lymphatisch restringiert. Daher bietet die Untersuchung der CLP die Möglichkeit einer genaueren Differenzierung, auf welcher Entwicklungsstufe eine Blockierung der B-Zell-Lymphopoese stattfindet. LMPP wären in unseren Experimenten der LSK-Population zuzuordnen (18,217). Da wir einen erhöhten LSK-Zellgehalt nachweisen konnten, bestätigen Pierini et al. (201) daher unter Berücksichtigung dieser Definition der Vorläuferpopulationen unsere Ergebnisse. Die Arbeitsgruppe um Fischer et al. (218) untersuchte ebenfalls die Auswirkung einer akuten Treg-Ablation nach DT-Gabe an 3 aufeinanderfolgenden Tagen mit Analyse des KM 6 Tage nach der ersten DT-Gabe. Im Unterschied zu unseren Experimenten und den bisher beschriebenen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen nutzten sie jedoch NOD.Foxp3<sup>DTR-GFP</sup> Mäuse (DEREG). Sie konnten unsere Ergebnisse bzgl. eines erhöhten LSK-Zellgehalts nach Treg-Ablation bestätigen. Anders als wir stellten sie jedoch nur eine partielle Blockierung der B-Zell-Lymphopoese fest. Dies führen die Autoren u.a. darauf zurück, dass in dem von uns verwendeten Depletionsmodell eine schwerer verlaufende Autoimmunität in adulten Tieren auftritt als in DEREG-Mäusen. Möglicherweise fallen damit auch die negativen Auswirkungen auf B-Zell-System schwächer aus. Auch Treg-defiziente Scurfy Mäuse zeigen deutlich reduzierte B-Zellzahlen inklusive ihrer CLP-Population. Daneben weisen sie eine Expansion von ST-HSC und LT-HSC (in unseren

Experimenten durch die LSK-Population abgebildet) auf, was auf eine Störung der HSC-Homöostase und -Quieszenz zurückzuführen ist (219). Sato et al. (196) konnten zeigen, dass proinflammatorische Zytokine, wie sie im Rahmen der schweren Autoinflammation nach Treg-Ablation freigesetzt werden, für die Störung der HSC-Quieszenz mitverantwortlich sind und eine Stammzellproliferation induzieren. Weiterhin schützen HSC-nischenspezifische Treg (CD150<sup>high</sup>) HSC vor oxidativem Stress und helfen damit ihre Quieszenz aufrechtzuerhalten (u.a. durch Bildung von Adenosin) (220). Dies sind mögliche Erklärungen für die expandierte LSK-Population nach Treg-Ablation. Daneben sind CXCL12-hoch-exprimierende, sogenannte CAR-Zellen im KM-Stroma (CAR = CXCL12 abundant reticular cells) für die Bildung von CXCL12 verantwortlich. Über CXCL12-CXCR4-Signalwege halten sie die HSC-Quieszenz aufrecht und haben damit eine Schlüsselposition für die HSC-Nische im KM (221). Auch Treg nutzen die CXCR4-CXCL12-Interaktion, um in das Knochenmark einzuwandern und sich dort festzuhalten (215). Pierini et al. (201) konnten zeigen, dass nach Treg-Ablation aktivierte autoreaktive T-Zellen linienspezifische KM-Stromazellen angreifen (vergleichbar mit einer Knochenmark-GVHD durch allogene T-Zellen). Dies führt nicht nur zu einer reduzierten Bildung von CXCL12, was damit eine weitere Erklärung für die expandierte LSK-Population bietet, sondern auch von IL-7. Wie bereits gezeigt wurde, ist gerade die Entwicklung der CLP von Überlebens- und Differenzierungssignalen wie CXCL12 und v.a. IL-7 abhängig, die von KM-Stromazellen sezerniert werden (19). Neben Osteoblasten bilden auch ICAM-1<sup>+</sup> perivaskuläre Stromazellen maßgebliche Mengen an IL-7 (201), weshalb nach deren Zerstörung die B-Zell-Lymphopoese empfindlich gestört bzw. blockiert wird und die Bildung neuer B-Zellen zum Erliegen kommt. Wir konnten zeigen, dass diese Blockierung vor der Stufe der CLP stattfindet.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Ablation von Treg-Zellen im autologen System zur autoimmunen Inflammation führt, die massive Auswirkungen auf die B-Zell-Nische hat und die B-Zell-Entwicklung auf der Stufe der CLP blockiert. Die Parallelen zur B-Zell-Defizienz bei akuter GVHD weisen darauf hin, dass ähnliche Schädigungsmechanismen aktiv sind und vermutlich inflammatorische Wirkungen auf das KM-Stroma in der GVHD von größerer Bedeutung sind als die allo-spezifische Immunantwort nach KMT.

### **5.3 Indirekte GVL-Effekte können das Wachstum von B-Zell-Lymphomen verzögern**

Allogene T-Zellen vermitteln nach hämatopoetischer SZT über immunologische Mechanismen einen GVL-Effekt gegen hämatologische Neoplasien. Dieser positive Effekt wird jedoch meist von einer GVHD begleitet und dadurch limitiert (61). 1991 wurde erstmalig gezeigt, dass der GVL-Effekt auch für die Eradikation von B-Zell-Lymphomen verantwortlich ist (222). B-Zell-Lymphome können potentiell aus allen Entwicklungsstufen der gesunden B-Zell-Lymphopoese z.B. auch aus CLP entstehen. Durch Fehler im physiologischen Prozess der Immunglobulin-Gen-Umlagerung während der B-Zell-Reifung entstehen zunächst chromosomale Translokationen der Immunglobulin-Gene. Diese führen zu einer Aktivierung von Protoonkogenen. Sekundär reprogrammierende Mutationen induzieren schließlich einen Stammzell-Phänotyp und ermöglichen erst danach eine Selbsterneuerung und Aufrechterhaltung des Lymphoms (223). Längerfristige Remissionen setzen daher die Elimination der malignen Stammzellen oder eine persistierende Kontrolle der sich daraus entwickelnden Lymphomzellen voraus (61). Das Lymphom selbst besteht nicht nur aus malignen Zellen, sondern beinhaltet eine Vielzahl an nicht malignen Immunzellen, Stromazellen und extrazellulärer Matrix. Dieses Tumormikromilieu ist für das Tumorwachstum maßgeblich mit verantwortlich (224) und unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung deutlich zwischen den einzelnen Lymphomentitäten (225). Die Beschaffenheit dieses Tumormikromilieus wird u.a. vom Grad der Abhängigkeit der Tumorzellen von externen Überlebenssignalen und der inflammatorischen Antwort des Empfängers bestimmt. Für die Expansion und das Überleben von B-Zell-Lymphomen sind verschiedene Faktoren notwendig, die durch Immun- und Stromazellen produziert werden. Ähnlich wie gesunde B-Zellen profitieren auch B-Zell-Lymphome bspw. von einer CD40-basierten Interaktion mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen und ihrer IL-4-Sekretion (226). Die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren, wie z.B. CCR7 oder CXCR4, erlaubt den malignen Zellen ein „homing“ zu Organen, die ein supportives Stroma aufweisen. Dort beeinflussen sie ihr Mikromilieu selbst durch Rekrutierung weiterer, nicht maligner Zellen (225). Sie induzieren z.B. die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Treg und schwächen somit die T-Zell-vermittelte Immunantwort ab (227). Außerdem können sie eine lymphatische

Differenzierung in mesenchymalen Stromazellen hervorrufen und tumor-assoziierte Makrophagen rekrutieren, wodurch sie ihr Wachstum selbst fördern (228).

Der GVL-Effekt im MHC-differenten KMT-Modell wird in erster Linie durch eine direkte Alloreaktivität von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen des Spenders gegen Tumorzellen hervorgerufen. Die Erkennung der Tumorzellen wird dabei v.a. über Differenzen in den MHC-Molekülen zwischen Spender und Empfänger vermittelt, z.T. auch durch die darin gebundenen Peptide polymorpher Zellbestandteile (miHAs) (179). Aktivierte T-Zellen nach allogener SZT (GVHD) oder nach *in vivo* Treg-Ablation infiltrieren lymphatische Organe wie z.B. das KM und stören dort das supportive Stroma und Mikromilieu für gesunde CLP und B-Zell-Vorläufer. Wir untersuchten daher, ob für den GVL-Effekt gegen B-Zell-Lymphome neben den bekannten, direkt-zytotoxischen auch indirekte Mechanismen (z.B. Störung des supportiven Tumorstromas) von Bedeutung sind. Dazu analysierten wir das Wachstum der BALB/c-stämmigen *A20-luc/yfp/neo* (H-2<sup>d</sup>) und *Bcl1-luc/gfp* (H-2<sup>d</sup>) B-Zell-Lymphome in CB6F1 (H-2<sup>bd</sup>) Mäusen nach haploidenter Transplantation mit und ohne GVHD-Induktion. Dies ist insofern von zunehmender Relevanz, da auch beim Menschen in den letzten Jahren vermehrt haploidente Transplantationen durchgeführt werden (69). Sowohl T-Zellen aus BALB/c (H-2<sup>d</sup>) als auch aus C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) Tieren können in dieser Transplantationskonstellation eine GVHD auslösen. Allerdings sind nur C57BL/6 T-Zellen in der Lage, die malignen Zellen aufgrund ihrer MHC-Differenz über direkte Mechanismen zu erkennen und zu zerstören, während T-Zellen aus BALB/c Mäusen den Tumor nur über indirekte Mechanismen bekämpfen können, da sie zu beiden B-Zell-Tumoren MHC-ident sind. Wie bereits beschrieben (194) wurde auch in unseren Experimenten für *A20-luc/yfp/neo* ein primäres Anwachsen im KM und für *Bcl1-luc/gfp* in Leber und Milz festgestellt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung an verschiedenen Tagen korrelierten dabei bezüglich des Tumorzellgehalts mit den gemessenen BLI-Signalen.

Wir untersuchten zunächst, ob indirekte GVL-Effekte ab dem Zeitpunkt der Transplantation das Anwachsen der Tumorzellen beeinflussen können. Dazu wurden CB6F1 Empfängertiere an Tag 0 letal bestrahlt und mit Gesamt-KM aus BALB/c alleine (KM-Gruppe) oder zusammen mit Milzzellen aus BALB/c (GVHD-Gruppe) haploident transplantiert. Allen Tieren wurden zeitgleich *A20-luc/yfp/neo* oder *Bcl1-luc/gfp*

---

Tumorzellen übertragen. Das Tumorwachstum beider B-Zell-Lymphome verlief bis einschließlich Tag 9 Tag nach Transplantation mit und ohne GVHD ähnlich. Anschließend ließ sich für das A20-Modell ein deutlich verzögerter Lymphomprogress von Tag 9 bis 14 in der GVHD-Gruppe beobachten. Im Anschluss daran nahm das Tumorwachstum in Tieren mit GVHD ähnlich stark zu wie in Tieren ohne GVHD. Die Verzögerung des Tumorwachstums in der GVHD-Gruppe war für das Bcl1-Modell noch deutlicher und vor allem längerfristiger, da über einen Beobachtungszeitraum von Tag 12 bis einschließlich Tag 25 nach Transplantation ein signifikant reduzierter Lymphomprogress durch indirekte GVL-Effekte festgestellt werden konnte. Da die A20-Zelllinie bzgl. ihres biologischen Verhaltens *in vivo* a.e. dem humanen diffus großzelligen B-Non-Hodgkin-Lymphom (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) (229), einem aggressiv und rasch wachsendem Lymphom, entspricht, könnte dies erklären, warum die Wirksamkeit indirekter GVL-Effekte kürzer als für das Bcl1-Modell beobachtet wurden. Im Gegensatz dazu ist die Bcl1-Tumorzelllinie das Pendant der humanen chronisch lymphatischen Leukämie (CLL, langsam wachsendes, indolentes B-Zell-Lymphom) (230). Die Abhängigkeit von einem spezifischen Mikromilieu konnte für Bcl1 bereits 1981 gezeigt werden, da der Entzug eines primär supportiven Stromas durch Splenektomie das Tumorwachstum deutlich verzögerte (231). Während Bcl1-Zellen *in vitro* rasch durch Apoptose zugrunde gehen, überleben sie *in vivo* sehr lange, indem sie durch Kontakt zu KM-Stromazellen vor Apoptose geschützt werden (232). Dabei nutzen CLL-Zellen für das „homing“ zu einem supportiven Mikromilieu u.a. CXCL12-CXCR4-Signalwege, die erst durch Stromazellen ermöglicht werden (233). Es konnte gezeigt werden, dass Knochenmarkstromazellen den B-zellspezifischen Überlebensfaktor BAFF sezernieren und damit die Zellen eines DLBCL vor spontaner Apoptose schützen (234). Zu allen Untersuchungszeitpunkten konnten wir in beiden Tumormodellen eine Aplasie gesunder B-Zellen in KM und Milz der Tiere mit GVHD nachweisen. In Mäusen ohne GVHD wurde erst in der Spätphase des Experiments (Tag 25) ein Rückgang der B-Zellen in KM und Milz beobachtet, was allerdings auf eine fortgeschrittene Tumordinfiltration der Organe zurückzuführen war. Die B-Zell-Aplasie in der GVHD-Gruppe ist erneut mit der Zerstörung des protektiven Knochenmarkstromas (H-2<sup>bd</sup>) der B-Zell-Lymphopoese durch alloreaktive T-Zellen (H-2<sup>d</sup>) zu erklären (Knochenmark-GVHD) (199). Parallel dazu beobachteten wir für



beide Tumormodelle v.a. in der Spätphase des Experiments eine Abnahme der Gesamtzellzahl der Milz von GVHD-Tieren. Dies ist auf eine Fibrosierung sekundärer lymphatischer Organe (Kontraktionsphase der GVHD) zurückzuführen und bedingt dadurch eine Zerstörung des Mikromilieus der Milz (175). B-Zell-Lymphome und ihre Stammzellen sind ebenso wie gesunde B-Zellen und deren Vorläuferzellen auf die bereits genannten und verschiedene weitere Wachstums- und Überlebensfaktoren des supportiven Mikromilieus angewiesen (225). Daher ist die immunologische Schädigung der CB6F1-Stromazellen (in unseren Experimenten für KM und Milz gezeigt) vermutlich der wichtigste Mechanismus, der den Progress indolenter, aber auch aggressiver B-Zell-Lymphome zumindest in der Frühphase nach KMT und GVHD-Induktion verzögert.

Weiterhin konnten wir in unseren Experimenten 15 Tage nach KMT eine erhöhte Anzahl CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in KM und Milz der Tiere mit GVHD feststellen. Die CD4<sup>+</sup> Tconv Population hatte in beiden Organen einen eindeutig aktivierten Phänotyp (Aktivierungsmarker: CD25). Zwar sind *A20-luc/yfp/neo* und *Bcl1-luc/gfp* zu BALB/c T-Zellen MHC-ident, jedoch vermittelt auch die Erkennung von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen miHAs, wie z.B. H60 (235) oder LSAs einen GVL-Effekt (179). Daher könnte zusätzlich zu den Anti-Tumorstroma-Mechanismen auch die verbesserte Erkennung dieser Antigene durch ein aktiviertes und expandiertes T-Zell-Kompartiment im Kontext des proinflammatorischen Milieus der GVHD die Verzögerung des Tumorwachstums erklären. Es wäre denkbar, dass intratumorale Treg die Aktivierung dieser T-Zell-Populationen hemmen könnten (227). Allerdings fanden wir für das *Bcl1*-Modell, in welchem sich die effektivste Verzögerung des Tumorwachstums zeigte, keinen reduzierten Treg-Gehalt in Milz und KM, sondern nur für das *A20*-Modell. Daher ist nicht anzunehmen, dass Treg in diesem Transplantationsmodell einen entscheidenden Beitrag zu indirekten GVL-Effekten leisten. Auch wäre eine potentiell pro-immunogene Wirkung der Reportergene GFP und YFP denkbar (236). Jedoch wurde zumindest für GFP im *Bcl1*-Modell bisher keine verstärkte Immunerkennung festgestellt (194).

Da wir in den vorangegangenen Experimenten eine Beteiligung indirekter Effekte auf das KM- (und Milz-) Stroma am GVL-Effekt nachweisen konnten, interessierte uns, ob solche Effekte auch bei einer nachträglich verabreichten DLI (bei bereits

fortgeschrittener Lymphom-/Leukämieerkrankung) eine Rolle spielen. Dazu wurden CB6F1 Mäuse letal bestrahlt und mit TZD KM aus BALB/c oder C57BL/6 transplantiert. 16 Tage nach Transplantation und Übertragung der Tumorzellen erfolgte die Gabe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (jeweils identisch zum vorher transplantierten KM) analog einer DLI. Die Verwendung von TZD KM macht das Auftreten eines GVL-Effekts vor DLI unwahrscheinlich (116). In beiden Gruppen sahen wir ein vergleichbares und zuverlässiges Anwachsen von *A20-luc/yfp/neo* bis einschließlich Tag 16 nach Transplantation. Trotz einer hohen Dosis von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $20 \times 10^6$ ) zeigte sich bei Transfer aus BALB/c Mäusen ein sehr schnelles Tumorwachstum, das genauso rasch verlief wie in Vergleichstieren, die keine DLI erhalten hatten. Folglich starben alle Mäuse, die mit BALB/c KM transplantiert wurden, spätestens 6 Tage nach der DLI aufgrund der Lymphomerkrankung. Demgegenüber sahen wir nach Gabe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen (MHC-different zum Lymphom) einen raschen Rückgang des tumorassoziierten BLI-Signals. Alle Tiere erholten sich rasch und überlebten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 45 Tagen nach KMT bzw. 29 Tagen nach DLI. Durchflusszytometrisch ließ sich zu diesem Zeitpunkt weder in ihrem KM noch in der Milz eine relevante Infiltration von Tumorzellen nachweisen. Wie zu vermuten, vermittelt eine nachträgliche Gabe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die zum B-Zell-Lymphom MHC-different sind, damit analog zu einer klinischen DLI einen effektiven und direkten GVL-Effekt (61). Anders als nach zeitgleicher GVHD-Induktion am Tag der KMT (vgl. 4.3.1 Haploidente Transplantation und zeitgleiche GVHD-Induktion) konnte im Anschluss an die nachträgliche C57BL/6 CD4<sup>+</sup> T-Zell-Gabe keine Aplasie gesunder B-Zellen, sondern ein ähnlich hoher B-Zellgehalt wie in CB6F1 Empfängertieren ohne GVHD an Tag 25 nach KMT in KM und Milz festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass der GVHD-assoziierte destruktive Effekt der nachträglich transferierten reinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die haploidenten Zellen des Empfängers und damit auch auf das B-Zellstroma in KM (und Milz) schwächer ausfällt als der durch eine GVHD, die durch Milzzellen an Tag 0 induziert wird. Damit könnte einhergehen, dass auch die T-Zell-vermittelte Störung des Tumormikromilieus durch BALB/c CD4<sup>+</sup> T-Zellen schwächer ausfällt. In der Summe sind in dieser Konstellation indirekte GVL-Effekte insuffizient, um eine fortgeschrittene Erkrankung mit *A20-luc/yfp/neo* zu beeinflussen.

---

Zusammenfassend können indirekte GVL-Effekte das Anwachsen von B-Zell-Lymphomen nach haploidenter KMT verzögern. Der dafür verantwortliche Hauptmechanismus scheint eine Störung des supportiven Lymphom-Stromas in KM (und Milz) zu sein. Daneben könnte auch eine Verbesserung der Immunerkennung von miHAs oder möglicherweise auch LSAs im Rahmen des inflammatorischen Milieus der GVHD eine Rolle spielen. Indirekte GVL-Effekte, die im Rahmen einer verzögerten Gabe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (DLI) auftreten, können den Progress des fortgeschrittenen *A20-luc/yfp/neo* B-Zell-Lymphoms allerdings nicht mehr aufhalten, während die direkte Alloreaktion durch C57BL/6 T-Zellen therapeutisch wirksam bleibt.

## 6 Zusammenfassung

Die allogene SZT bleibt v.a. für Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen oftmals die einzige kurative Therapieoption. Dabei sind reife T-Zellen des Spenders für die Bekämpfung der Neoplasie von zentraler Bedeutung (GVL-Effekt). Allerdings können alloreaktive Spender-T-Zellen zeitgleich auch gesundes Spendergewebe angreifen und zerstören (GVHD). Neben den klassischen Zielgeweben wird auch das supportive Stroma primärer lymphatischer Organe (Thymus und Knochenmark) immunologisch geschädigt. Dies führt sowohl beim Menschen als auch in Mausmodell zu einer verzögerten Erholung des adaptiven Immunsystems, wobei die B-Zell-Rekonstitution in besonderem Maße kompromittiert ist. Wir konnten zeigen, dass eine MHC-differente (C57BL/6 → BALB/c, H-2<sup>b</sup> → H-2<sup>d</sup>) KMT alleine bereits zu einem deutlichen Rückgang oligopotenter (CLP 1) und zu einem geringeren Anteil auch B-Zell-restringierter (CLP 2), lymphatischer Vorläuferzellen im KM führt. Dies ist auf einen gesteigerten Umsatz im Rahmen der normalen Rekonstitution nach KMT zurückzuführen, da in der GVHD-freien Kontrollgruppe sogar ein erhöhter B-Zellgehalt im KM zu finden war. Wurde allerdings zusätzlich eine GVHD ausgelöst, so sank der CLP 2-Zellgehalt bei gleichzeitig vorliegender B-Zell-Aplasie noch tiefer ab. Dies bestätigt unsere Vermutung, dass eine Knochenmark-GVHD die B-Zell-Lymphopoese vor Stufe der CLP 2 durch Schädigung der B-Zell-Nische blockiert.

Treg spielen sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch nach KMT eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase. Sie können das Stroma lymphatischer Organe vor einer Schädigung durch eine akute GVHD schützen und ermöglichen dadurch eine vollständige B-Zell-Rekonstitution. Andererseits führt das Fehlen von Treg, z.B. in FoxP3-defizienten Scurfy Mäusen, zu einer deutlich veränderten B-Zell-Entwicklung. Mithilfe eines Treg-Ablationsmodells untersuchten wir deshalb, welche Rolle Treg für die B-Zell-Lymphopoese ohne eine KMT spielen. Unter Verwendung des Foxp3-DTR Modells konnten wir zeigen, dass die Inflammation nach Treg-Depletion auch unabhängig von der KMT zur Störung der B-Zell-Lymphopoese im KM führt. Dies ist vermutlich auf eine inflammatorische Zerstörung nischenspezifischer KM-Stromazellen durch autoreaktive Effektor-T-Zellen

zurückzuführen (vergleichbar mit der Inflammation durch alloreaktive T-Zellen in der GVHD).

Um zu untersuchen, ob die Schädigung des supportiven Stromas lymphatischer Organe oder die Störung der Immunhämostase auch Teil des GVL-Effekts gegen B-Zell-Neoplasien sind, wurde ein haploidenten GVHD/GVL-Transplantationsmodell (BALB/c → CB6F1 oder C57BL/6 → CB6F1) entwickelt. Direkte GVL-Effekte über MHC-Differenzen sind nur in der Konstellation C57BL/6 → CB6F1 (H-2<sup>b</sup> → H-2<sup>bd</sup>) möglich, da die eingesetzten B-Zell-Lymphome *A20-luc/yfp/neo* und *Bcl1-gfp/luc* aus BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Mäusen stammen. Bei der Konstellation BALB/c → CB6F1 (H-2<sup>d</sup> → H-2<sup>bd</sup>) kann eine Bekämpfung der Tumorzellen nur über indirekte GVL-Effekte erklärt werden. Wir konnten zeigen, dass in der Konstellation BALB/c → CB6F1 eine GVHD-Induktion am Tag der KMT die B-Zell-Regeneration verhindert und das Tumorzellwachstum für beide B-Zell-Lymphome deutlich verzögert. Bei fortgeschrittener Erkrankung scheinen diese indirekten anti-B-Zell-Effekte aber nicht therapeutisch wirksam zu sein, da eine verzögerte DLI-Therapie an Tag 16 nach haploidenter KMT nur bei MHC-differenten Spender-T-Zellen wirksam war, während Spender-T-Zellen mit Lymphom-identem MHC unwirksam blieben.

---

## 7 Literaturverzeichnis

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777–89.
2. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P. A direct estimate of the human alpha beta T cell receptor diversity. *Science*. 1999;286(5441):958–61.
3. Cyster JG, Hartley SB, Goodnow CC. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature*. 1994;371(6496):389–95.
4. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(1):37–49.
5. Clevers H. The T Cell Receptor/Cd3 Complex: A Dynamic Protein Ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629–62.
6. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 1994;76(2):287–99.
7. Boehmer H v. The Developmental Biology Of T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:309–26.
8. Eugene CB, Louis JP. Lymphocyte Homing and Homeostasis. *Science*. 1996;272(5258):60–6.
9. Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*. 1998;10(5):351–3.
10. Lumsden JM, Williams JA, Hodes RJ. Differential Requirements for Expression of CD80/86 and CD40 on B Cells for T-Dependent Antibody Responses In Vivo. *J Immunol*. 2003;170(2):781–7.
11. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(2):108–17.
12. Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980;77(8):4756–9.

13. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7–25.
14. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*. 1977;91(3):335–44.
15. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(6):640–53.
16. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*. 2015;125(17):2621–9.
17. Miller JP, Izon D, DeMuth W, Gerstein R, Bhandoola A, Allman D. The Earliest Step in B Lineage Differentiation from Common Lymphoid Progenitors Is Critically Dependent upon Interleukin 7. *J Exp Med*. 2002;196(5):705–11.
18. Karsunky H, Inlay MA, Serwold T, Bhattacharya D, Weissman IL. Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood*. 2008;111(12):5562–70.
19. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):107–16.
20. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med*. 1994;180(5):1955–60.
21. Thomis DC, Gurniak CB, Tivol E, Sharpe AH, Berg LJ. Defects in B Lymphocyte Maturation and T Lymphocyte Activation in Mice Lacking Jak3. *Science*. 1995;270(5237):794–7.
22. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsall BL, Russell SM, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*. 1995;2(3):223–38.
23. Dias S, Silva H, Cumano A, Vieira P. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med*. 2005;201(6):971–9.

- 
24. Sitnicka E, Brakebusch C, Martensson I-L, Svensson M, Agace WW, Sigvardsson M, et al. Complementary signaling through flt3 and interleukin-7 receptor alpha is indispensable for fetal and adult B cell genesis. *J Exp Med*. 2003;198(10):1495–506.
  25. Driessen RL, Johnston HM, Nilsson SK. Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp Hematol*. 2003;31(12):1284–91.
  26. Waskow C, Paul S, Haller C, Gassmann M, Rodewald H-R. Viable c-Kit(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity*. 2002;17(3):277–88.
  27. Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med*. 1991;173(3):599–607.
  28. Jacobsen K, Kravitz J, Kincade PW, Osmond DG. Adhesion receptors on bone-marrow stromal cells—in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood*. 1996;87(1):73–82.
  29. Greenbaum A, Hsu Y-MS, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*. 2013;495(7440):227–30.
  30. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 2013;495(7440):231–5.
  31. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest*. 2000;106(11):1331–9.
  32. Dar A, Goichberg P, Shinder V, Kalinkovich A, Kollet O, Netzer N, et al. Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol*. 2005;6(10):1038–46.



- 
33. Ma Q, Jones D, Springer TA. The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for the Retention of B Lineage and Granulocytic Precursors within the Bone Marrow Microenvironment. *Immunity*. 1999;10(4):463–71.
  34. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, et al. A Coordinated Change in Chemokine Responsiveness Guides Plasma Cell Movements. *J Exp Med*. 2001;194(1):45–56.
  35. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*. 2004;103(9):3258–64.
  36. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1195–201.
  37. Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J, et al. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood*. 2007;109(9):3706–12.
  38. Kee BL, Murre C. Transcription factor regulation of B lineage commitment. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(2):180–5.
  39. Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med*. 1999;190(9):1201–14.
  40. Kirstetter P, Thomas M, Dierich A, Kastner P, Chan S. Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur. J. Immunol*. 2002;32(3):720–30.
  41. DeKoter RP, Lee H-J, Singh H. PU.1 Regulates Expression of the Interleukin-7 Receptor in Lymphoid Progenitors. *Immunity*. 2002;16(2):297–309.
  42. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*. 1999;401(6753):556–62.
  43. Souabni A, Cobaleda C, Schebesta M, Busslinger M. Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity*. 2002;17(6):781–93.

44. Schebesta M, Pfeffer PL, Busslinger M. Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity*. 2002;17(4):473–85.
45. Rolink AG, Boekel E ten, Yamagami T, Ceredig R, Andersson J, Melchers F. B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells. *Immunol Lett*. 1999;68(1):89–93.
46. Mojica MP, Perry SS, Searles AE, Elenitoba-Johnson KSJ, Pierce LJ, Wiesmann A, et al. Phenotypic Distinction and Functional Characterization of Pro-B Cells in Adult Mouse Bone Marrow. *J Immunol*. 2001;166(5):3042–51.
47. Rumpfelt LL, Zhou Y, Rowley BM, Shinton SA, Hardy RR. Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J Exp Med*. 2006;203(3):675–87.
48. Rolink AG, Melchers F. B-cell development in the mouse. *Immunol Lett*. 1996;54(2-3):157–61.
49. Monroe JG. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):283–94.
50. Melchers F, Boekel E ten, Seidl T, Kong XC, Yamagami T, Onishi K, et al. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol Rev*. 2000;175:33–46.
51. Arakawa H, Shimizu T, Takeda S. Re-evaluation of the probabilities for productive arrangements on the kappa and lambda loci. *Int Immunol*. 1996;8(1):91–9.
52. Engel H, Rolink AG, Weiss S. B cells are programmed to activate kappa and lambda for rearrangement at consecutive developmental stages. *Eur. J. Immunol*. 1999;29(7):2167–76.
53. Benschop RJ CJ. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr Opin Immunol*. 1999;11(2):143–51.
54. Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol*. 2007;7(8):633–43.

- 
55. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, et al. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med*. 1999;190(1):75–89.
  56. Russell DM, Dembić Z, Morahan G, Miller JF, Bürki K, Nemazee D. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature*. 1991;354(6351):308–11.
  57. Goodnow CC, Crosbie J, Jorgensen H, Brink RA, Basten A. Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature*. 1989;342(6248):385–91.
  58. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol*. 2003;24(6):343–9.
  59. Stadanlick JE, Cancro MP. BAFF and the plasticity of peripheral B cell tolerance. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(2):158–61.
  60. Majhail NS, Farnia SH, Carpenter PA, Champlin RE, Crawford S, Marks DI, et al. Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(11):1863–9.
  61. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112(12):4371–83.
  62. Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood*. 2014;124(3):334–43.
  63. Pruszczyk K, Skwierawska K, Król M, Moskowicz A, Jabłoński D, Torosian T, et al. Bone marrow harvest from unrelated donors-up-to-date methodology. *Eur J Haematol*. 2017;99(4):357–65.
  64. Hölig K, Kramer M, Kroschinsky F, Bornhäuser M, Mengling T, Schmidt AH, et al. Safety and efficacy of hematopoietic stem cell collection from mobilized peripheral blood in unrelated volunteers: 12 years of single-center experience in 3928 donors. *Blood*. 2009;114(18):3757–63.
  65. Ljungman P, Brand R, Hoek J, La Camara R de, Cordonnier C, Einsele H, et al. Donor cytomegalovirus status influences the outcome of allogeneic stem cell

- transplant: a study by the European group for blood and marrow transplantation. *Clin Infect Dis*. 2014;59(4):473–81.
66. Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, Arcese W, Carreras E, Devergie A, et al. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. *Lancet*. 1998;352(9134):1087–92.
67. Fleischhauer K, Shaw BE. HLA-DP in unrelated hematopoietic cell transplantation revisited: challenges and opportunities. *Blood*. 2017;130(9):1089–96.
68. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood*. 2004;104(7):1923–30.
69. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Duarte RF, Dufour C, et al. Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(6):811–7.
70. Vriesendorp HM. Aims of conditioning. *Exp Hematol*. 2003;31(10):844–54.
71. Nagler A, Rocha V, Labopin M, Unal A, Ben Othman T, Campos A, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for acute myeloid leukemia in remission: comparison of intravenous busulfan plus cyclophosphamide (Cy) versus total-body irradiation plus Cy as conditioning regimen--a report from the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 2013;31(28):3549–56.
72. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(12):1628–33.
73. Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondon G, Anderlini P, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-

- containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood*. 1997;89(12):4531–6.
74. Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch Intern Med*. 2002;162(14):1558–66.
75. Pasquini MC, Wang Z, Horowitz MM, Gale RP. 2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clin Transpl*. 2010;:87–105.
76. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18(4):295–304.
77. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, et al. International, multi-center standardization of acute graft-versus-host disease clinical data collection: a report from the MAGIC consortium. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(1):4–10.
78. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers MED. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9(4):215–33.
79. Graze PR, Gale RP. Chronic graft versus host disease: A syndrome of disordered immunity. *Am J Med*. 1979;66(4):611–20.
80. Tyndall A, Dazzi F. Chronic GVHD as an autoimmune disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21(2):281–9.
81. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966;62:21–78.
82. Korngold R, Sprent J. T-cell subsets and graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1987;44(3):335–9.
83. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):340–52.

- 
84. Ferrara JLM, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1999;5(6):347–56.
  85. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009;373(9674):1550–61.
  86. Hill GR, Ferrara JLM. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 2000;95(9):2754–9.
  87. Penack O, Holler E, van den Brink MRM. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood.* 2010;115(10):1865–72.
  88. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2012;209(5):903–11.
  89. Mathewson ND, Jenq R, Mathew AV, Koenigsnecht M, Hanash A, Toubai T, et al. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat Immunol.* 2016;17(5):505–13.
  90. Jankovic D, Ganesan J, Bscheider M, Stickel N, Weber FC, Guarda G, et al. The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. *J Exp Med.* 2013;210(10):1899–910.
  91. Wilhelm K, Ganesan J, Müller T, Dürr C, Grimm M, Beilhack A, et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med.* 2010;16(12):1434–8.
  92. Reichenbach DK, Schwarze V, Matta BM, Tkachev V, Lieberknecht E, Liu Q, et al. The IL-33/ST2 axis augments effector T-cell responses during acute GVHD. *Blood.* 2015;125(20):3183–92.
  93. Paczesny S, Hanauer D, Sun Y, Reddy P. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(1):1–11.

- 
94. Tiercy J-M. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica*. 2016;101(6):680–7.
  95. Petersdorf EW. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *Blood*. 2013;122(11):1863–72.
  96. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1996;334(5):281–5.
  97. Stern M, Brand R, Witte T de, Sureda A, Rocha V, Passweg J, et al. Female-Versus-Male Alloreactivity as a Model for Minor Histocompatibility Antigens in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8(10):2149–57.
  98. Spierings E, Kim Y-H, Hendriks M, Borst E, Sergeant R, Canossi A, et al. Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(8):1244–53.
  99. Briones J, Novelli S, Sierra J. T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus host disease: therapeutic implications. *Bone Marrow Res*. 2011;2011:976793.
  100. Chakraverty R, Côté D, Buchli J, Cotter P, Hsu R, Zhao G, et al. An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med*. 2006;203(8):2021–31.
  101. Kittan NA, Hildebrandt GC. The chemokine system: a possible therapeutic target in acute graft versus host disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;341:97–120.
  102. Terwey TH, Kim TD, Kochman AA, Hubbard VM, Lu S, Zakrzewski JL, et al. CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106(9):3322–30.

- 
103. Koyama M, Cheong M, Markey KA, Gartlan KH, Kuns RD, Locke KR, et al. Donor colonic CD103+ dendritic cells determine the severity of acute graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 2015;212(8):1303–21.
  104. Graubert TA, DiPersio JF, Russell JH, Ley TJ. Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 1997;100(4):904–11.
  105. Chen BJ, Cui X, Sempowski GD, Liu C, Chao NJ. Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease. *Blood*. 2004;103(4):1534–41.
  106. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097–100.
  107. Henden AS, Hill GR. Cytokines in Graft-versus-Host Disease. *J Immunol*. 2015;194(10):4604–12.
  108. Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J Exp Med*. 1987;166(5):1280–9.
  109. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 1998;92(7):2303–14.
  110. Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, et al. The T-cell transcription factor NFAT p is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*. 1993;365(6444):352–5.
  111. Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2000;96(6):2062–8.



- 
112. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med.* 1983;309(18):1094–104.
  113. Bolwell B, Sobecks R, Pohlman B, Andresen S, Rybicki L, Kuczkowski E, et al. A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004;34(7):621–5.
  114. Ganguly S, Ross DB, Panoskaltsis-Mortari A, Kanakry CG, Blazar BR, Levy RB, et al. Donor CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are necessary for posttransplantation cyclophosphamide-mediated protection against GVHD in mice. *Blood.* 2014;124(13):2131–41.
  115. Bashey A, Zhang X, Sizemore CA, Manion K, Brown S, Holland HK, et al. T-cell-replete HLA-haploidentical hematopoietic transplantation for hematologic malignancies using post-transplantation cyclophosphamide results in outcomes equivalent to those of contemporaneous HLA-matched related and unrelated donor transplantation. *J Clin Oncol.* 2013;31(10):1310–6.
  116. Ho VT. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2001;98(12):3192–204.
  117. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncology.* 2009;10(9):855–64.
  118. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NKC, et al. Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(7):387–94.

- 
119. Westin JR, Saliba RM, Lima M de, Alousi A, Hosing C, Qazilbash MH, et al. Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Adv Hematol.* 2011;2011:601953.
  120. Wolff D, Ayuk F, Elmaagacli A, Bertz H, Lawitschka A, Schleuning M, et al. Current practice in diagnosis and treatment of acute graft-versus-host disease: results from a survey among German-Austrian-Swiss hematopoietic stem cell transplant centers. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(5):767–76.
  121. van Lint MT, Milone G, Leotta S, Uderzo C, Scimè R, Dallorso S, et al. Treatment of acute graft-versus-host disease with prednisolone: significant survival advantage for day +5 responders and no advantage for nonresponders receiving anti-thymocyte globulin. *Blood.* 2006;107(10):4177–81.
  122. Martínez C, Solano C, Ferrá C, Sampol A, Valcárcel D, Pérez-Simón JA. Alemtuzumab as Treatment of Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease: Results of a Phase II Study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(5):639–42.
  123. Busca A, Locatelli F, Marmont F, Ceretto C, Falda M. Recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein as treatment for steroid refractory graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol.* 2007;82(1):45–52.
  124. Couriel D, Saliba R, Hicks K, Ippoliti C, Lima M de, Hosing C, et al. Tumor necrosis factor-alpha blockade for the treatment of acute GVHD. *Blood.* 2004;104(3):649–54.
  125. Perfetti P, Carlier P, Strada P, Gualandi F, Occhini D, van Lint MT, et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid refractory acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42(9):609–17.
  126. Ringden O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24(1):65–72.

- 
127. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579–86.
  128. Bieback K, Wuchter P, Besser D, Franke W, Becker M, Ott M, et al. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(7):773–82.
  129. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726–36.
  130. Chen X, Das R, Komorowski R, Beres A, Hessner MJ, Mihara M, et al. Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;114(4):891–900.
  131. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med*. 1982;156(6):1577–86.
  132. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*. 1998;10(12):1969–80.
  133. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330–6.
  134. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490–500.
  135. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol*. 2003;15(4):430–5.

- 
136. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001;27(1):68–73.
  137. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, et al. Selective depletion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med.* 2007;204(1):57–63.
  138. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol.* 2013;14(4):307–8.
  139. Curotto de Lafaille, Maria A., Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009;30(5):626–35.
  140. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol.* 2001;2(4):301–6.
  141. Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol.* 2005;6(2):152–62.
  142. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science.* 2009;326(5955):986–91.
  143. Koch MA, Tucker-Heard G's, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol.* 2009;10(6):595–602.
  144. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775–87.
  145. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med.* 2007;13(3):108–16.

- 
146. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science*. 2011;332(6029):600–3.
  147. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J Immunol*. 2008;180(9):5916–26.
  148. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *J Exp Med*. 1999;190(7):995–1004.
  149. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Exp Med*. 2002;196(3):389–99.
  150. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1353.
  151. Gondek DC, Lu L-F, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J Immunol*. 2005;174(4):1783–6.
  152. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much Ado about Adenosine: Adenosine Synthesis and Function in Regulatory T Cell Biology. *J Immunol*. 2010;185(4):1993–8.
  153. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9(9):1144–50.
  154. Riegel C, Boeld TJ, Doser K, Huber E, Hoffmann P, Edinger M. Efficient treatment of murine acute GvHD by in vitro expanded donor regulatory T cells. *Leukemia*. 2020;34(3):895–908.

- 
155. Wolf D, Wolf AM, Fong D, Rumpold H, Strasak A, Clausen J, et al. Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2007;83(8):1107–13.
  156. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo M-G. Human CD25+ CD4+ t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*. 2001;193(11):1295–302.
  157. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011;117(3):1061–70.
  158. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921–8.
  159. Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood*. 1987;69(2):369–80.
  160. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016;7:507.
  161. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(1):9–20.
  162. Fry TJ, Mackall CL. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:53-57.
  163. Weinberg K. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97(5):1458–66.
  164. Jantunen E, Ruutu P, Niskanen L, Volin L, Parkkali T, Koukila-Kähkölä P, et al. Incidence and risk factors for invasive fungal infections in allogeneic BMT recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19(8):801–8.

- 
165. Milone G, Camuglia MG, Avola G, Di Marco A, Leotta S, Cupri A, et al. Acute GVHD after allogeneic hematopoietic transplantation affects early marrow reconstitution and speed of engraftment. *Exp Hematol*. 2015;43(6):430-438.
  166. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2012;19(4):324-35.
  167. Toubert A, Glauzy S, Douay C, Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens*. 2012;79(2):83-9.
  168. Holländer GA, Widmer B, Burakoff SJ. Loss of normal thymic repertoire selection and persistence of autoreactive T cells in graft vs host disease. *J Immunol*. 1994;152(4):1609-17.
  169. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, et al. Transitional B cells in humans: Characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol*. 2008;127(1):14-25.
  170. Williams KM, Gress RE. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21(3):579-96.
  171. Hilgendorf I, Mueller-Hilke B, Kundt G, Holler E, Hoffmann P, Edinger M, et al. The lack of memory B cells including T cell independent IgM+ IgD+ memory B cells in chronic graft-versus host disease is associated with susceptibility to infection. *Transpl Int*. 2012;25(1):87-96.
  172. Storek J, Wells D, Dawson MA, Storer B, Maloney DG. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2001;98(2):489-91.
  173. Baker MB, Riley RL, Podack ER, Levy RB. Graft-versus-host-disease-associated lymphoid hypoplasia and B cell dysfunction is dependent upon donor T cell-mediated Fas-ligand function, but not perforin function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(4):1366-71.

- 
174. Mensen A, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Demski S, Oey M, Stroux A, et al. Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT. *Blood*. 2014;124(6):963-72.
  175. Doser K. Untersuchungen zur B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation. Dissertation, Universität Regensburg. 2012. Epub 2012/01/19
  176. Bleakley M, Otterud BE, Richardt JL, Mollerup AD, Hudecek M, Nishida T, et al. Leukemia-associated minor histocompatibility antigen discovery using T-cell clones isolated by in vitro stimulation of naive CD8+ T cells. *Blood*. 2010;115(23):4923–33.
  177. Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JLM. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med*. 2005;11(11):1244–9.
  178. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CA, Bongaerts R, et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 1999;94(4):1201–8.
  179. Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood*. 2004;103(3):767–76.
  180. Spaapen R, Mutis T. Targeting haematopoietic-specific minor histocompatibility antigens to distinguish graft-versus-tumour effects from graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21(3):543–57.
  181. Barrett AJ, Rezvani K. Translational mini-review series on vaccines: Peptide vaccines for myeloid leukaemias. *Clin Exp Immunol*. 2007;148(2):189–98.
  182. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555–62.
  183. Petersdorf EW. HLA mismatching in transplantation. *Blood*. 2015;125(7):1058–9.



- 
184. Inamoto Y, Flowers MED, Lee SJ, Carpenter PA, Warren EH, Deeg HJ, et al. Influence of immunosuppressive treatment on risk of recurrent malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2011;118(2):456–63.
  185. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12(6):492–9.
  186. Nikiforow S, Alyea EP. Maximizing GVL in allogeneic transplantation: role of donor lymphocyte infusions. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):570–5.
  187. Yun HD, Waller EK. Finding the sweet spot for donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(4):507–8.
  188. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006;25(2):331–42.
  189. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*. 2006;20(3):123–37.
  190. Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science*. 2004;306(5701):1517–9.
  191. Colonna M, Borsellino G, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(24):12000–4.
  192. Palmer JM, Rajasekaran K, Thakar MS, Malarkannan S. Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. *J Cancer*. 2013;4(1):25–35.
  193. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*. 2007;8(2):191–7.
  194. Edinger M, Cao Y-A, Verneris MR, Bachmann MH, Contag CH, Negrin RS. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood*. 2003;101(2):640–8.
  195. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Crawford JM, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow

- transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood*. 1996;88(8):3230–9.
196. Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T. Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon–dependent exhaustion. *Nat Med*. 2009;15(6):696–700.
197. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1813–26.
198. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4<sup>+</sup> T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):136–48.
199. Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010;115(26):5401–11.
200. Müller AMS, Linderman JA, Florek M, Miklos D, Shizuru JA. Allogeneic T cells impair engraftment and hematopoiesis after stem cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14721–6.
201. Pierini A, Nishikii H, Baker J, Kimura T, Kwon H-S, Pan Y, et al. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells maintain the bone marrow microenvironment for B cell lymphopoiesis. *Nat Commun*. 2017;8:15068.
202. Yao Y, Song X, Cheng H, Tang G, Hu X, Zhou H, et al. Dysfunction of Bone Marrow Vascular Niche in Acute Graft-Versus-Host Disease after MHC-Haploidentical Bone Marrow Transplantation. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e104607.
203. Sugrue T, Lowndes NF, Ceredig R. Mesenchymal stromal cells: radio-resistant members of the bone marrow. *Immunol Cell Biol*. 2013;91(1):5–11.
204. Awaya N, Rupert K, Bryant E, Torok-Storb B. Failure of adult marrow-derived stem cells to generate marrow stroma after successful hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2002;30(8):937–42.

- 
205. Schrum LW, Bost KL, Hudson MC, Marriott I. Bacterial infection induces expression of functional MHC class II molecules in murine and human osteoblasts. *Bone*. 2003;33(5):812–21.
206. Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, Matsuoka N, Urayama S, Kawabe Y, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *J Lab Clin Med*. 1999;134(3):222–31.
207. Xhaard A, Moins-Teisserenc H, Busson M, Robin M, Ribaud P, Dhedin N, et al. Reconstitution of regulatory T-cell subsets after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(8):1089–92.
208. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, et al. 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*. 2003;112(11):1688–96.
209. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2002;99(10):3493–9.
210. Leonardo SM, Josephson JA, Hartog NL, Gauld SB. Altered B cell development and anergy in the absence of Foxp3. *J Immunol*. 2010;185(4):2147–56.
211. Nyström SN, Bourges D, Garry S, Ross EM, van Driel IR, Gleeson PA. Transient Treg-cell depletion in adult mice results in persistent self-reactive CD4(+) T-cell responses. *Eur J Immunol*. 2014;44(12):3621–31.
212. Buch T, Heppner FL, Tertilt C, Heinen TJAJ, Kremer M, Wunderlich FT, et al. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods*. 2005;2(6):419–26.
213. Tian L, Altin JA, Makaroff LE, Franckaert D, Cook MC, Goodnow CC, et al. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells exert asymmetric control over murine helper responses by inducing Th2 cell apoptosis. *Blood*. 2011;118(7):1845–53.
214. Moltedo B, Hemmers S, Rudensky AY. Regulatory T cell ablation causes acute T cell lymphopenia. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86762.

- 
215. Zou L, Barnett B, Safah H, Larussa VF, Evdemon-Hogan M, Mottram P, et al. Bone marrow is a reservoir for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res.* 2004;64(22):8451–5.
216. Iikuni N, Lourenço EV, Hahn BH, La Cava A. Cutting edge: Regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2009;183(3):1518–22.
217. Welner RS, Pelayo R, Kincade PW. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(2):95–106.
218. Fischer L, Herkner C, Kitte R, Dohnke S, Riewaldt J, Kretschmer K, et al. Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Bone and Hematopoietic Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:578.
219. Kim S, Park K, Choi J, Jang E, Paik D-J, Seong RH, et al. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells ensure B lymphopoiesis by inhibiting the granulopoietic activity of effector T cells in mouse bone marrow. *Eur J Immunol.* 2015;45(1):167–79.
220. Hirata Y, Furuhashi K, Ishii H, Li H-W, Pinho S, Ding L, et al. CD150<sup>high</sup> bone marrow Tregs maintain hematopoietic stem cell quiescence and immune privilege via adenosine. *Cell Stem Cell.* 2018;22(3):445-453.e5.
221. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 2006;25(6):977–88.
222. Jones RJ, Ambinder RF, Piantadosi S, Santos GW. Evidence of a graft-versus-lymphoma effect associated with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1991;77(3):649–53.
223. Martinez-Climent JA, Fontan L, Gascoyne RD, Siebert R, Prosper F. Lymphoma stem cells: enough evidence to support their existence? *Haematologica.* 2010;95(2):293–302.
224. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.

- 
225. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(8):517–34.
226. Umetsu DT, Esserman L, Donlon TA, DeKruyff RH, Levy R. Induction of proliferation of human follicular (B type) lymphoma cells by cognate interaction with CD4+ T cell clones. *J Immunol*. 1990;144(7):2550–7.
227. Ai WZ, Hou J-Z, Zeiser R, Czerwinski D, Negrin RS, Levy R. Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Int J Cancer*. 2009;124(1):239–44.
228. Guilloton F, Caron G, Ménard C, Pangault C, Amé-Thomas P, Dulong J, et al. Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood*. 2012;119(11):2556–67.
229. Donnou S, Galand C, Touitou V, Sautès-Fridman C, Fabry Z, Fisson S. Murine models of B-cell lymphomas: promising tools for designing cancer therapies. *Adv Hematol*. 2012;2012:701704.
230. Slavin S, Strober S. Spontaneous murine B-cell leukaemia. *Nature*. 1978;272(5654):624–6.
231. Muirhead MJ, Isakson PC, Krolick KA, Uhr JW, Vitetta ES. BCL1, a murine model of prolymphocytic leukemia. I. Effect of splenectomy on growth kinetics and organ distribution. *Am J Pathol*. 1981;105(3):295–305.
232. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, Bruyn C de, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998;91(7):2387–96.
233. Möhle R, Failenschmid C, Bautz F, Kanz L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia*. 1999;13(12):1954–9.
234. Lwin T, Crespo LA, Wu A, Dessureault S, Shu HB, Moscinski LC, et al. Lymphoma cell adhesion-induced expression of B cell-activating factor of the

- 
- TNF family in bone marrow stromal cells protects non-Hodgkin's B lymphoma cells from apoptosis. *Leukemia*. 2009;23(1):170–7.
235. Choi EY, Choi K, Nam G, Kim W, Chung M. H60: A Unique Murine Hematopoietic Cell-Restricted Minor Histocompatibility Antigen for Graft-versus-Leukemia Effect. *Front Immunol*. 2020;11:1163.
236. Gambotto A, Dworacki G, Cicinnati V, Kenniston T, Steitz J, Tuting T, et al. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther*. 2000;7(23):2036–40.

## 8 Danksagungen

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen hätte ich meine Doktorarbeit nicht realisieren können. Ich möchte daher diese Stelle nutzen, um mich für die vielfältige Hilfe sehr herzlich zu bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst PD Dr. Petra Hoffmann und Prof. Dr. Matthias Edinger für die Vergabe meines Dissertationsthemas und die exzellente Unterstützung während der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Auch Herrn Prof. Dr. Uwe Ritter möchte ich für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit als zweiter Gutachter danken. Ebenso bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Herr und Herrn Prof. Dr. Reinhard Andreesen für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Lehrstuhl für Innere Medizin III schreiben zu können.

Besonders danken möchte ich auch Dr. Kristina Doser für das Bereitstellen der Vorarbeiten zur B-Zell-Rekonstitution und ihr großes Engagement sowie fachlichen Hinweise während der Mitbetreuung meiner Arbeit. Ein großes Dankeschön an die gesamte Arbeitsgruppe-Edinger/Hoffmann und insbesondere an Rüdiger für die erstklassige Zellsortierung sowie an Anna, Evi und Jacky für Eure großartige Hilfe während meiner Experimente.

Natürlich danke ich neben meinen Freunden auch meinen Eltern, die meine Arbeit mit viel Geduld und Ermutigung unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner liebsten Jana bedanken, die mir nicht nur jederzeit zur Seite stand, sondern mir auch mit der Geburt unserer Tochter das größte Geschenk meines Lebens gemacht hat.