

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

**Zytokinprofil regenerierender T-Zellen
nach Transplantation von
allogenen, CD34⁺ angereicherten, peripheren Blutstammzellen
im Kindesalter**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

**CHRISTINE GABRIELE LEILER
aus Nürtingen**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. P.-G. Schlegel

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Niethammer

Meinem Vater gewidmet

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Schlegel danke ich für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas, die erfahrenen Ratschläge und die wertvollen Denkanstöße.

Bei Dr. M. Eyrich möchte ich mich für die gute Einarbeitung in die Laborarbeit und die kompetente Beratung bedanken.

Herrn Dr. Vonthein gilt mein Dank für die engagierte, statistische Beratung.

Bei den vielen kleinen Fragen im Labor hatte Fr. Dr. Schilbach häufig die rettenden Ideen.

Die Schwestern und Ärzte der hämatologischen Tagesklinik und Ambulanz versorgten mich zuverlässig mit den nötigen Blutproben.

Ganz besonderen Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines Studiums nicht nur finanziell, sondern auch ideell und motivierend unterstützten.

Ebenso möchte ich mich bei der Studienstiftung des deutschen Volkes für die jahrelange finanzielle Unterstützung bedanken, die mir den Rücken für die Umsetzung meiner beruflichen Ziele freihielt.

Zudem sei hier allen nicht namentlich Erwähnten gedankt, wie den Mitdoktoranden, den Mitarbeitern anderer Arbeitsgruppen und des KMT-Labors, die auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christine Leiler,
geboren am 14.05.1976 in Nürtingen

Eltern: Erich und Gabriele Leiler

Schulischer und universitärer Werdegang

1982-1986 Grundschule in Nürtingen

1986-1995 Max-Planck-Gymnasium in Nürtingen

04/96 **Beginn des Medizinstudiums**, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Seit 03/97 Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

20.03.98 **Physikum**

23.03.99 **1. Staatsexamen**

10.09.01 **2. Staatsexamen**

10/01 – 09/02 **Praktisches Jahr**

1. Tertial: Chirurgie, Reutlingen

2. Tertial: Pädiatrie, Reutlingen

3. Tertial: Innere Medizin, Reutlingen und Bristol, Großbritannien

26.11.02 **3. Staatsexamen**

Seit 01/03 **AiP** an der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin St. Nikolaus des Krankenhauses St. Elisabeth, Ravensburg

Publikationen

- Eyrich, M., Croner, T., Leiler, C., Lang, P., Bader, P., Klingebiel, T., Niethammer, D. & Schlegel, P.G. (2002)
Distinct contributions of CD4⁺ and CD8⁺ naive and memory T-cell subsets to overall TCR-repertoire complexity following transplantation of T-cell depleted CD34 selected hematopoietic progenitor cells from unrelated donors
Blood 100, 1915-1918
- Eyrich, M., Leiler, C., Lang, P., Schilbach, K., Schumm, M., Bader, P., Greil, J., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Niethammer, D. & Schlegel, P.G. (2003)
A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of T-cell depleted CD34⁺ peripheral blood stem cells from unrelated donors versus recipients of unmanipulated bone marrow from related donors
Bone Marrow Transplantation 32 (4), 379-390
- Eyrich, M., Leiler, C., Croner, T., Lang, P., Schumm, M., Mascher, B., Schilbach, K., Bader, P., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Niethammer, D. & Schlegel, P.G. (2004)
Impaired T-cell activation and cytokine productivity after transplantation of positively selected CD34⁺ allogeneic hematopoietic stem cells.
The Hematology Journal, in press.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Stammzelltransplantation	1
1.2. Die lymphatische Ontogenese	3
1.3. Die Immunrekonstitution	5
1.4. Rolle der Zytokine und das TH1/TH2-Paradigma	7
1.5. Ziel der Arbeit	8
2. Material & Methoden	10
2.1. Patienten	10
2.1.1. Einschlusskriterien	10
2.1.2. Interne Kontrolle	10
2.2. Materialien	12
2.2.1. Reagenzien, Antikörper, Lösungen	12
2.2.2. Festmaterialien und Geräte	13
2.3. Methoden	15
2.3.1. Isolierung der PMNZ	15
2.3.2. ELISA	15
2.3.2.1. Stimulation der PMNZ	15
2.3.2.2. Prinzip des ELISA	16
2.3.2.3. Unterschiede in der Versuchsdurchführung	16
2.3.3. Durchflusszytometrie	17
2.3.3.1. Prinzip des FACSCalibur-Flowzytometers	17
2.3.3.2. Analyse der Oberflächenantigene	18
2.3.3.3. Intrazelluläre Zytokinfärbung	18
2.3.3.3.1. Stimulation	18
2.3.3.3.2. Färbung der Zellen	19
2.3.4. Statistik	20
2.3.4.1. Immunregeneration	20
2.3.4.2. ELISA	20
2.3.4.3. Intrazelluläre Färbung	21

3. Ergebnisse	22
3.1. Immunrekonstitution nach PBSZT	22
3.1.1. Regeneration der Lymphozytenuntereinheiten	22
3.1.2. T-Zell-Regeneration	23
3.1.3. Nähere Charakterisierung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Subpopulationen	28
3.2. ELISA	31
3.2.1. Titration zur Optimierung der Zellstimulation für ELISA	31
3.2.1.1. Stimulation	31
3.2.1.2. Ergebnisse	31
3.2.1.3. Zusammenfassung	32
3.2.2. Zytokinproduktion bei steigendem CD4 ⁺ CD45RA ⁺ Anteil.....	33
3.2.3. Statistische Analyse	35
3.2.4. Zeitlicher Verlauf der Zytokinproduktion	37
3.3. Ergebnisse IZF	38
3.3.1. Optimierung der IZF	38
3.3.2. Gruppeneinteilung	38
3.3.3. Zellaktivierung	39
3.3.4. Intrazelluläre Färbung der PMNZ	41
3.3.4.1. Zytokinprofil der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Lymphozyten	41
3.3.4.2. Zusammenfassung	44
3.3.4.3. Weitere phänotypische Charakterisierung der Zytokin-positiven Zellen	45
3.3.4.3.1. Zytokinproduktion der naiven und Gedächtnis-Zellen	45
3.3.4.3.2. Statistische Analyse	47
3.3.4.3.3. Zusammenfassung	49
3.4. Zytokinproduktion am Beispiel eines Patienten	50
3.4.1. Patientendaten	50
3.4.2. Zytokinproduktion des Patienten - Ergebnisse aus ELISA	50

Inhaltsverzeichnis

3.4.3. Zytokinproduktion des Patienten - Ergebnisse aus IZF	51
3.4.3.1. Zellaktivierung	51
3.4.3.2. Charakterisierung der zytokinproduzierenden T-Lymphozyten	52
4. Diskussion	55
4.1. Diskussion der Methodik	55
4.2. Diskussion der Ergebnisse	59
4.2.1. Immunrestitution	59
4.2.1.1. Regeneration der NK-, B- und T-Zellen	59
4.2.1.2. Einflussfaktoren auf die Regeneration der Lymphozyten ..	62
4.2.2. Zytokinsynthese und Messung mit ELISA	67
4.2.3. Intrazelluläre Zytokinfärbung	68
4.2.4. Ursachen der defizienten Zytokinproduktion	72
4.2.5. Vergleich der Ergebnisse aus IZF und ELISA	74
5. Zusammenfassung	76
6. Anhang	78
6.1. Abkürzungsverzeichnis	78
6.2. Tabellenverzeichnis	80
6.3. Abbildungsverzeichnis	81
6.4. Literaturverzeichnis	82

1. Einleitung

1.1. Stammzelltransplantation

Die Transplantation von Knochenmark oder CD34⁺ aufgereinigten, haematopoetischen Progenitorzellen bietet einen kurativen Therapieansatz für Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen wie Leukämien, malignen Lymphomen oder soliden Tumoren, aber auch für nicht maligne Erkrankungen, wie schwere aplastische Anämien und angeborene Immundefekte [8].

Bei dieser zusätzlichen Therapieoption wird durch eine Hochdosischemo- und Strahlentherapie eine Myeloablation erreicht. Diese irreversible Aplasie des Knochenmarks wird durch die Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen überwunden. Das Prinzip der Transplantation besteht also in einem kompletten Ersatz der Hämatopoese, das heißt der Myelo- und Lymphopoese eines Patienten.

Während die *Knochenmarkstransplantation (KMT)* lange Zeit die Therapie der Wahl darstellte, gilt heute die *Stammzelltransplantation aus peripherem Blut (PBSZT)* als bedeutende Alternative. Grenzen der allogenen KMT sind die mangelnde Verfügbarkeit an Spendern, das Risiko der Abstoßung einerseits und andererseits die Möglichkeit der Entwicklung einer Graft-versus-Host Erkrankung. Diesen Nachteilen versucht man mittels PBSZT zu begegnen.

Bei der PBSZT werden unter Gabe rekombinanter hämatopoetischer Wachstumsfaktoren, wie z. B. G-CSF und GM-CSF, die Stammzellen des Spenders aus dem Knochenmark in die Peripherie mobilisiert. Zur Zellgewinnung dienen die im Gegensatz zur Knochenmarkspunktion schmerzfreien Leukapheresen [15]. Hierbei wird ein extrakorporaler Kreislauf mit Zellseparator an den Spender angeschlossen. Danach werden die Leukozyten durch selektive Zentrifugation des Blutes isoliert.

Die *autologe* Transplantation besteht in einer Reinfusion isolierter Zellen des Patienten nach myeloablativer Hochdosischemotherapie. Sie steht bei soliden Tumoren als Therapieansatz im Vordergrund, birgt jedoch die Gefahr der Kontamination des Transplantats mit Tumorzellen in sich. Diesem Risiko begegnet die *allogene* Transplantation mit der Rekrutierung eines gesunden Zellspenders.

Entscheidend für die Toleranz des allogenen Transplantats ist eine weitgehende Übereinstimmung der HLA-Antigene (Humane-Leukozyten-Antigene), der sogenannten Histokompatibilitätsmerkmale, die auf dem Chromosom 6 kodiert werden, in unterschiedlichen Klassen auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden sind und einen ausgeprägten Polymorphismus aufweisen [14]. Es werden Klasse-I- und Klasse-II-Antigene unterschieden. Die für die Klasse-I-Antigene HLA-A, HLA-B und HLA-C kodierenden Gene bilden eine Einheit aus 3 benachbarten Genorten. Die Klasse-II-Antigene HLA-D unterteilt man in HLA-DR, -DQ, und DP. Je ein Allel aus HLA-Genen wird als „Haplotyp“ von einem Elternteil vererbt. Geschwister weisen somit eine 25 %ige Wahrscheinlichkeit auf, HLA-identisch, das heißt in beiden Allelen eines Locus identisch zu sein. Die Übereinstimmung nur eines HLA-Allels wird als „haploidenter HLA-Typ“ bezeichnet.

Transplantationen über HLA-Grenzen hinweg waren lange Zeit aufgrund des Graft-versus-Host-Effekts alloreaktiver T-Zellen des Transplantats einerseits sowie des hohen Abstoßungsrisikos andererseits erfolglos. Durch die Entwicklung des „Megadose“-Konzeptes [88], welches in einer Anreicherung von CD34⁺ Vorläuferzellen besteht, konnten diese Hindernisse weitgehend überwunden werden [8,15,52,71].

Unter Anwendung dieser Technik besteht seit kurzem die Möglichkeit, Familienmitglieder mit einem haploidenten HLA-Typs als Spender zu verwenden.

Sowohl die positive Selektion der CD34⁺ Zellen als auch die T-Zell-Depletion gelingen mit Hilfe des Magnetic-activated Cell Sorting, der sogenannten MACS-Anreicherung [40]. Die in der Leukapherese gewonnenen Zellen werden mit magnetischen Antikörpern gegen das entsprechende Oberflächenantigen markiert. Über eine Säule in einem starken Magnetfeld werden die markierten Zellen gebunden und damit von den nicht markierten separiert. Bei der T-Zell-Depletion werden die Zellen ebenfalls mit

Antikörpern markiert, und die gewonnene Fraktion eliminiert.

Zur phänotypischen Differenzierung der Zellen des Leukapheresats sowie des Transplantats eignet sich die Durchflusszytometrie. Sie bedient sich des Prinzips der Markierung charakteristischer „Cluster of Differentiation“, sogenannter CD-Moleküle, die als Epitope auf der Zelloberfläche exprimiert werden.

So lassen sich T-Zellen anhand ihrer Oberflächenmolekülgruppe CD3, welche eng mit dem T-Zell-Rezeptor (TZR) assoziiert ist, identifizieren. Die T-Zell-Subpopulationen unterteilen sich in CD4⁺-T-Helfer-Zellen, die von MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen aktiviert werden, und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, die mit MHC-Klasse-I/Peptidkomplexen reagieren.

B-Zellen exprimieren CD19, für NK-Zellen ist die Expression der Oberflächenmoleküle CD16 und CD56 charakteristisch.

CD34 ist ein charakteristisches Antigen hämatopoetischer Progenitorzellen. Mittels fluoreszenzmarkierter, monoklonaler Antikörper gegen Epitope dieses transmembranären Proteins lassen sich diese Zellen identifizieren und quantifizieren.

1.2. Die lymphatische Ontogenese

Alle zellulären Elemente des Blutes entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Diese teilen sich in einen lymphatischen Progenitorzelltyp, aus dem die NK-, B- und T-Zellen hervorgehen, sowie einen myeloetischen Progenitorzelltyp, aus dem sich Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten entwickeln. B- und T-Zellen werden durch ihren unterschiedlichen Differenzierungsort, für T-Zellen im Thymus und für B-Zellen im Knochenmark, durch ihre Antigenrezeptoren und ihre Funktion unterschieden.

T-Zellen unterteilt man bezüglich ihrer Funktion in zytotoxische T-Zellen, die durch ihre Granzyme und Perforine Zielzellen lysieren [6] und T-Helferzellen, welche mit weiteren Zellen interagieren. Neben direktem Zellkontakt gelingt dies auch über die Sekretion von Zytokinen. Diese Zytokine sind lösliche Proteine, die über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf Zielzellen und nachgeschaltete, intrazelluläre

Signaltransduktionswege auf das Verhalten dieser Zellen einwirken können [48].

Im Thymus findet das T-Zell-Rezeptor-Rearrangement der $CD2^+CD7^+CD3^-$ Thymozyten statt. Dabei handelt es sich um eine Neukombination der Genelemente, die die variablen Regionen der TZR-Ketten kodieren. Auf diese Weise wird eine Vielfalt an TZR generiert, um das Erkennen möglichst vieler verschiedener Antigene zu gewährleisten. Die frühen Thymozyten sind für CD4 und CD8 noch doppelt negativ. Mit der weiteren Heranreifung exprimieren die Vorläuferzellen jetzt neben dem T-Zell-Rezeptor und CD3 sowohl CD4 und CD8 auf ihrer Oberfläche. Nach der Ausbildung des TZR findet die T-Zell-Selektion im Thymus statt. Dabei kommt es zu einer Interaktion zwischen TZR und MHC-Molekülen der Thymusepithelzellen. Findet keine Bindung statt, ist die Bindung zu stark, oder reagiert die heranreifende Zelle mit Autoantigenen, so wird die Zelle apoptotisch [51,63,104]. Dies wird unter negativer Selektion subsumiert. Die positive Selektion findet während der Reifung von doppelt-positiven Thymozyten in CD4 oder CD8 einfach positive Zellen statt. Dabei gehen alle Thymozyten, die mittels ihres T-Zell-Rezeptors in einem Zeitraum von drei bis vier Tagen mit eigenen MHC-Komplexen interagieren, nicht in die Apoptose ein, sondern überleben.

Nach ihrer Reifung im Thymus werden die T-Lymphozyten in die Zirkulation entlassen. Dort findet eine weitere Differenzierung statt. Vor Antigenkontakt werden die reifen T-Zellen als naiv bezeichnet und tragen das Oberflächenantigen CD45RA. Bei der T-Zellaktivierung interagieren die T-Zellen mit Zellen des unspezifischen Immunsystems, den sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie z.B. dendritischen Zellen, B-Zellen oder Monozyten. Die APC erkennen und verarbeiten ein Fremdantigen, präsentieren es mit Hilfe ihres MHC-Klasse-II-Moleküls auf der Zelloberfläche und schaffen zusätzlich das geeignete Zytokinmilieu (v.a. IL-12). Eine spezifische T-Zelle erkennt nun mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors das gebundene Antigen. Dies führt zur Bildung eines trimolekularen Komplexes aus TZR, antigenem Peptid und MHC. Zusätzlich ist ein kostimulatorisches Signal zwischen dem B7-Molekül der APC und dem CD28-Molekül der T-Zelle erforderlich. Mittels intrazellulärer Signaltransduktion primär über Tyrosinkinase kommt es zu einer Gen-Aktivierung im Nukleus der Zelle. Der wichtigste Prozess dabei ist die Transkription des Interleukin-2-Gens [13]. Aus der

naiven T-Zelle entwickeln sich nun zytokinproduzierende Effektorzellen. Einige dieser Effektorzellen treten in einen Pool ruhender Gedächtniszellen ein, die durch das Antigen CD45RO charakterisiert werden [48]. Bei einem zweiten Antigenkontakt entstehen aus den Gedächtniszellen erneut Effektorzellen, die durch beschleunigte Proliferation und Zytokinproduktion eine Boosterung der Immunantwort bewirken. Gedächtniszellen zeichnen sich zudem durch die erhöhte Kapazität aus, auf Aktivitätsstimuli zu reagieren [2,96,108].

Im Gegensatz zu den $CD4^+$ T-Zellen unterscheidet die CD45RA/CD45RO-Expression bei den $CD8^+$ Zellen nicht ausreichend zwischen naiven und Gedächtnis-Zellen [75]. Bei den $CD8^+CD45RA^-$ Zellen handelt es sich um bereits gereifte T-Zellen, während die $CD8^+CD45RA^+$ Subpopulation weiter unterteilt wird in $CD27^+$ *naive* T-Zellen mit Suppressor-Funktion, jedoch *ohne* zytolytische Funktion und die $CD27^-$ *reifen* CTL im engeren Sinne mit ausgeprägter zytolytischer Wirkung mittels Perforin und Granzym B [39].

Anhand der phänotypischen Charakterisierung der Zellen durch ihre Oberflächenmoleküle lassen sich also nicht nur Aussagen über die Funktion, sondern auch über den Entwicklungs- und Aktivitätszustand der Zellen treffen [108].

1.3. Die Immunrekonstitution

Bei der Regeneration nach der Transplantation gibt es verglichen mit der lymphatischen Ontogenese Unterschiede [31]. Für die T-Zell-Rekonstitution existieren zwei Regulationswege – Thymus-abhängig oder Thymus-unabhängig [44,63,71,97].

Der *Thymus-abhängige* Weg ist durch eine Generation „neuer“ T-Zellen im Thymus gekennzeichnet. Dabei entsteht die Diversität des T-Zell-Repertoires durch ein Rearrangement der T-Zell-Rezeptor-Gene sowie durch positive und negative Selektion im Thymus. Dieser Prozess ähnelt der lymphatischen Ontogenese und wird deshalb als „Rekapitulation der Ontogenese“ bezeichnet. Die so entstandenen naiven T-Zellen exprimieren CD45RA mit Koexpression von CD62L [43,71,79]. Die Bedeutung des Thymus für die Generation „neuer“ T-Zellen wird deutlich an der Untersuchung

thymektomierter KM-Empfänger [45], bei denen die $CD4^+CD45RA^+$ Zellzahl im Gegensatz zu den thymustragenden Empfängern auch 24 Monate nach KMT nicht rekonstituiert war. Bei den $CD8^+$ Zellen hingegen wurde dieser Unterschied nicht festgestellt.

Außerdem existieren *Thymus-unabhängige* Wege der T-Zell-Regeneration, die eine extrathymische Differenzierung von Vorläuferzellen oder eine periphere Expansion reifer T-Zell-Populationen aus dem Transplantat beinhalten [31,45]. Zellpopulationen, die sich von diesen Wegen ableiten, sind typischerweise keine klassischen T-Zellen [63]. Bei athymischen Mäusen wurde nach KMT mit T-Zell-Depletion eine starke Expansion reifer T-Zellen festgestellt [63]. Es besteht also eine Abhängigkeit vom Funktionszustand des Thymus mit einer Zunahme der peripheren Expansion bei thymusdefizienten Empfängern und damit auch bei fortgeschrittenem Alter der Patienten. Nach Mackall et al [63] ist die periphere Expansion im Gegensatz zur Thymus-abhängigen Reifung weniger effizient. Durch die periphere Expansion werden T-Zellen mit Gedächtnis-Phänotyp vermehrt. Die Tatsache, dass diese Zellen das TZR-Rearrangement schon vollzogen haben, ist ein Grund für die eingeschränkte TZR-Diversität der peripheren Expansion. Diese ist außerdem abhängig vom Antigenmilieu des Empfängers zur Zeit der Expansion. Eine geringe TZR-Diversität mündet in die Unfähigkeit des Empfängers auf Neoantigen zu reagieren. Jedoch ist die periphere Expansion verantwortlich für die frühe schützende Immunität kurz nach Transplantation [71]. Sie verhindert zudem nicht die Thymus-abhängige T-Zell-Entwicklung [79].

Insbesondere $CD8^+$ Zellen regenerieren Thymus-unabhängig, jedoch mit ähnlichem $CD45RA/CD45RO$ -Muster [44].

Individuelle Unterschiede in der Immunrekonstitution treten in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren auf. Dazu zählen unter anderem die Transplantationsform, Alter und Grunderkrankung des Patienten, Konditionierungsregime, G-CSF-Gabe nach Transplantation, GVHD-Prophylaxe sowie das Auftreten einer GVHD.

Letztere stellt eine der wichtigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität nach Transplantation [15] dar. In der afferenten Phase der akuten GVHD werden vermehrt HLA- und Leukozytenadhäsionsmoleküle in den Zielorganen Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt exprimiert. Zusätzlich liegt ein Zytokinungleichgewicht durch die

Konditionierung, Infekte und andere Faktoren vor. Reife, immunkompetente T-Zellen des Spenders erkennen die Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigene des Empfängers als fremd und werden aktiviert. In der efferenten Phase kommt es zu einer Aktivierung inflammatorischer Effektorzellen wie zum Beispiel der Monozyten und NK-Zellen. Die MNZ produzieren vor allem TH1-Zytokine, wie IL-1, IFN- γ und TNF- α , die eine direkte Gewebszerstörung und Apoptose der Zellen bewirken [5,29].

Die chronische GVHD tritt nach Tag + 100 auf. Sie wird ebenfalls durch alloreaktive T-Zellen hervorgerufen, und ähnelt einer Autoimmunerkrankung mit zirkulierenden Autoantikörpern [61].

Gleichzeitig sind die Spender-T-Lymphozyten gegen restliche Tumorzellen gerichtet, was man sich als GVL(Graft-versus-Leukemia)-Effekt zunutze macht [53]. Zielantigene des GVL-Effektes sind dabei Major- und Minorhistokompatibilitätsantigene, die als Neoantigene auf Leukämiezellen exprimiert werden, oder als hämatopoesespezifische Antigene auf normalen und malignen hämatopoetischen Zellen auftreten [56]. Zu den Effektor-Zellen gehören die CD4⁺ Zellen über ihre Zytokinproduktion und die CD8⁺ T-Zellen, die überwiegend durch das Perforinsystem zytotoxisch wirken. Auch NK-Zellen werden als Effektor-Zellen diskutiert.

1.4. Rolle der Zytokine und das TH1/TH2-Paradigma

Neben der Antigenprozessierung und -präsentation haben die APC bei der Interaktion mit T-Zellen die Aufgabe, Zytokine (v. a. IL-12, IFN- γ und IL-4) zu sezernieren. Das jeweilige Zytokinmilieu, Kostimulatoren und die Art des Peptid-MHC-Komplexes bewirken nach Antigenstimulation eine Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Helfer-Zellen in TH1- und TH2-Zellen, wie von Mosmann et al [70] am murinen Modell erstmalig gezeigt wurde.

TH1-Zellen führen durch Sezernierung der Zytokine IL-2, IFN- γ , TNF- β und GM-CSF über eine Aktivierung zytotoxischer und phagozytischer Funktionen in Effektorzellen wie CTL, NK-Zellen und Makrophagen zu einer zellvermittelten Immunität, die eine Abtötung der Zielzelle sowie ausgeprägte Entzündungsvorgänge bewirken kann.

TH2-Zellen hingegen aktivieren durch Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 unter anderem die B-Zellen, die durch Produktion spezifischer Antikörper die humorale Immunantwort hervorrufen [75,95,107,114]. IL-10 inhibiert außerdem die Makrophagenaktivierung.

Das jeweilige Zytokinmilieu verstärkt die entsprechende TH-Antwort autokrin und ist gleichzeitig in der Lage, die jeweils andere TH-Zellpopulation zu inhibieren [12].

Von Firestein et al [30] wurde für murine CD4⁺ Zell-Klone erstmalig eine Untereinheit mit unbegrenztem Zytokinmuster beschrieben. Diese Subpopulation wurde als Vorläufer der TH1 und TH2-Lymphozyten „TH0-Zellen“ bezeichnet [26].

Neben ihrer zytotoxischen Funktion sezernieren auch CD8⁺ Zellen Zytokine. Vergleichbar mit dem TH1/TH2-Paradigma lassen sie sich in TC1- und TC2-Zellen unterteilen. Das jeweilige Zytokinmuster der T-Zell-Untereinheiten entspricht dabei dem für TH1- und TH2-Zellen geschilderten [4,19,32]. Zudem unterscheiden sich die beiden CD8⁺ Subpopulationen in verschiedenen Wegen der Zytotoxizität [32].

1.5. Ziel der Arbeit

Transplantationen von CD34⁺ angereicherten, peripheren Blutstammzellen mit nur partieller Übereinstimmung von HLA-Antigenen stellen eine neue und bahnbrechende Entwicklung in der hämatologischen und onkologischen Therapie dar. Sie erweitern die bisher eng gesetzten Grenzen der Spenderauswahl um ein Vielfaches.

Zur GvHD-Prophylaxe ist jedoch eine starke T-Zell-Depletion erforderlich. Es stellt sich deshalb die Frage, wie sich die Transplantation hochaufgereinigter, CD34⁺ hämatopoetischer Stammzellen auf die Regeneration des Immunsystems auswirkt. Deshalb wurde das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf die Rekonstitution des T-Zell-Kompartiments nach SZT gelegt.

Primäres Ziel war eine nähere Charakterisierung des regenerierenden T-Zell-Kompartiments durch eine detaillierte Analyse des Phänotyps der T-Zell-Subpopulationen.

Zur Beurteilung der Funktionalität der regenerierenden T-Zellen wurde in einem

zweiten Schritt das Zytokinprofil nach Stimulation der Zellen in Quantität und Qualität erfasst.

In einem weiteren Schritt sollte die Auswirkung der frühen peripheren Expansion der transplantierten T-Zellen, erkenntlich am Phänotyp CD45RO⁺, und der im weiteren Verlauf zunehmenden, Thymus-abhängigen Regeneration naiver CD45RA⁺ T-Zellen auf die Zytokinproduktion dargestellt werden.