

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung I (Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie,
Hämatologie/Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Generierung nicht-alloreaktiver T - Zellen zur
adoptiven Immuntherapie
im klinischen Maßstab**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Kristina Sabine Schüle
aus
Stuttgart - Bad Cannstatt

2008

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. h.c. D. Niethammer

2. Berichterstatter:

Professor Dr. L. Kanz

**Meinen lieben Eltern,
die mich stets meinen Weg gehen ließen,
in großer Dankbarkeit gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Die Knochenmarktransplantation (KMT).....	9
1.1.1	Allgemeine Grundlagen	9
1.1.2	Die Entdeckung von Knochenmarkzellen mit protektiver Potenz.....	9
1.1.3	Das Phänomen der Zweiterkrankung (Secondary disease).....	10
1.1.4	Die Entdeckung des Haupthistokompatibilitätsantigens (HLA, MHC-Komplex)	11
1.2	Die Stammzelltransplantation (HSCT) als Weiterentwicklung der Knochenmarktransplantation (KMT)	12
1.2.1	Grundlagen der HSCT	12
1.2.2	Die Indikation zur HSCT	14
1.2.3	Die haploidentische allogene HSCT	16
1.2.4	Die Rolle der T-Zelle.....	17
1.2.5	In vitro Analyse alloreaktiver T-Zellen.....	17
1.2.5.1	Die CD 4+ T-Zellen (T-Helferzellen)	17
1.2.5.2	Die CD 8+ T-Zellen (Cytotoxische T-Zellen, CTL)	19
1.3	Die Alloreaktivität.....	20
1.3.1	Die Allogenerkennung	21
1.3.1.1	Die direkte Allogenerkennung.....	21
1.3.1.2	Die indirekte Allogenerkennung.....	22
1.3.2	Die MHC-Moleküle: Haupthistokompatibilitätsantigene (HLA).....	24
1.3.2.1	HLA I.....	25
1.3.2.2	HLA II.....	26
1.3.3	Die Nebenantigene (miHA).....	27
1.3.4	Die Graft versus Host Reaktion (GVHR).....	29
1.3.5	Die Host versus Graft Reaktion: Abstoßungsreaktion	30
1.4	Prävention	32
1.4.1	Matching	32
1.4.2	Die CD 34+ Stammzellanreicherung	33
1.4.3	Die Konditionierungstherapie.....	34
1.4.4	Supportive Maßnahmen	34
1.5	Immunologische Toleranz.....	35
1.5.1	CD 4+/CD 25+ T-Zellen	35
1.5.2	Der Graft versus Leukemia Effekt (GVL Effekt).....	35
1.6	Die Donor Lymphozyten Infusion (DLI) als Adoptive Immuntherapie.....	36
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	37

2	Material und Methoden.....	40
2.1	Material.....	40
2.1.1	Allgemeine Technische Geräte, Materialien und Reagenzien	40
2.1.2	Materialien und Reagenzien für die Zellseparation.....	42
2.1.3	Material und Reagenzien für die Zellkultur	43
2.1.3.1	Zusätze zum Kulturmedium	43
2.1.3.2	Zusammensetzung des Kulturmediums.....	43
2.1.3.3	Einfríermedium	44
2.1.3.4	Wachstumsfaktoren und Antigene	44
2.1.4	Material zur selektiven Zellseparation auf Basis der Magnet-aktivierten Zellseparation (MACS) am CliniMACS®	46
2.1.4.1	Maus-konjugierte Super-paramagnetische MicroBeads	46
2.1.4.2	Weitere Materialien zur magnetisch aktivierten Zellseparation.....	46
2.1.5	Material und Reagenzien für die Durchflußzytometrie	47
2.1.5.1	Materialien, Puffer und Lösungen.....	47
2.1.5.2	Allgemein benötigte Kontroll-Antikörper	48
2.1.5.3	Antikörper zur Differenzierung von Zellpopulationen auf Grund unterschiedlicher Oberflächenmarker	49
2.1.6	Material und Reagenzien für den Elispot-Assay	51
2.1.7	Material und Reagenzien für den Thymidin [6-H ₃]-Proliferations-Assay.....	53
2.1.8	Material für den BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridin) Proliferations-Assay.....	54
2.2	Methoden.....	54
2.2.1	Zellisolierung	54
2.2.1.1	Zur Verfügung stehende Blutproben.....	54
2.2.1.1.1	Blutproben von Probanden	54
2.2.1.1.2	Klinische Blutproben und Zellmaterial	54
2.2.1.1.3	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PMNC).....	55
2.2.2	Zellkultivierung.....	56
2.2.2.1	Zellzahlbestimmung.....	56
2.2.2.2	Kultursystem für Stimulatorzellen	57
2.2.2.2.1	Kultivierung der Stimulatorzellen in serumhaltigem Medium	57
2.2.2.2.2	Kultivierung von Dendritischen Zellen	57
2.2.2.3	Verarbeitung der Patientenzellen	59
2.2.2.3.1	Einfríeren von Dendritischen Zellen.....	59
2.2.2.3.2	Auftauen von Dendritischen Zellen.....	60
2.2.2.3.3	Expansion der T-Zellfraktion.....	60
2.2.2.4	Lymphozytenmischkultur: MLC (mixed lymphocyte culture).....	61
2.2.3	Magnet-aktivierte Zellsortierung : MACS (magnet-activated cellsorter/ing) am CliniMACS®	62
2.2.3.1	Grundlagen der MACS Methode	62
2.2.3.2	Die CliniMACS® Methode	63
2.2.3.3	Vorbereitung der Zellen	63
2.2.3.4	Depletion am CliniMACS®	64
2.2.3.5	Behandlung der erhaltenen Zellfraktionen.....	64

2.2.4	Zellanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)	65
2.2.4.1	Grundlagen.....	65
2.2.4.2	Messung der Lichtstreuung	65
2.2.4.3	Messung der Fluoreszenz	66
2.2.4.4	Durchführung.....	67
2.2.4.5	Auswertung.....	67
2.2.5	EliSPOT Assay (Enzyme linked immunospot Assay)	68
2.2.5.1	Grundlagen.....	68
2.2.5.2	Durchführung.....	68
2.2.6	[6-H ₃] Thymidin Proliferationsassay.....	71
2.2.7	Die Durchflußzytometrische BrdU Proliferationsanalyse	73
2.2.7.1	Grundlagen.....	73
2.2.7.2	Durchführung der Durchflußzytometrischen BrdU (5-Bromo-2`- deoxyuridin) Proliferationsanalyse	74
2.2.7.3	Auswertung.....	76
2.2.8	[6-H ₃] Thymidin Proliferationsassay.....	76
2.2.9	Der durchflußzytometrische BrdU-Proliferationsassay als Restimulationsversuch.....	77
2.2.10	Statistische Analyse der Ergebnisse	78
3	Ergebnisse	79
3.1	Quantifizierung von T-Lymphozytenpopulationen.....	79
3.1.1	Zellausbeute	79
3.1.1.1	Anteile einzelner Zellfraktionen.....	79
3.1.1.2	Recovery Rate.....	79
3.1.1.3	Anteil nicht-alloreaktiver Zellen pro Milliliter Vollblut	80
3.1.1.4	Anteil nicht-alloreaktiver Zellen pro Milliliter Leukapheresat	80
3.1.2	Zellverluste	80
3.1.2.1	Zellverluste nach Isolation aus Vollblut.....	80
3.1.2.2	Zellverluste nach Isolation aus Leukapheresat.....	81
3.2	Charakterisierung von T-Lymphozytenpopulationen	82
3.2.1	Oberflächenantigenanalyse	82
3.2.1.1	Oberflächenantigenanalyse als Nachweis der Aktivierbarkeit beziehungsweise Alloreaktivität der eingesetzten Zellpopulation ..	83
3.2.1.2	Oberflächenantigenanalyse als Nachweis der Effektivität der magnetisch-aktivierten Zellseparation am klinischen System (CliniMACS®)	84
3.2.1.2.1	Oberflächenantigenanalyse der Zellfraktionen nach Depletion (CliniMACS®)	85
3.2.1.2.2	Reinheiten der Zellfraktionen nach Depletion im Vergleich zur Ausgangspopulation	90
3.2.2	Aktivierungsfähigkeit.....	92
3.2.3	Proliferationsfähigkeit	97
3.2.4	Vergleich der eingesetzten Versuchsmethoden	99
3.2.4.1	Alloreaktivität im Methodenvergleich	99
3.2.4.2	Aktivität gegen autologe Zellen im Methodenvergleich.....	100

3.3	Dendritische Zellen als Stimulatorquelle.....	100
3.3.1	Quantifizierung der eingesetzten Zellfraktionen.....	101
3.3.1.1	Dendritische Zellen.....	102
3.3.1.2	Periphere Mononukleäre Zellen.....	102
3.3.1.2.1	Anteile einzelner Zellfraktionen.....	102
3.3.1.2.2	Recovery Rate.....	102
3.3.1.2.3	Zellverluste nach Isolation.....	103
3.3.1.2.4	Expansion der Negativfraktion.....	103
3.3.2	Charakterisierung der eingesetzten Lymphozytenpopulationen ..	104
3.3.2.1	Oberflächenantigenanalyse.....	104
3.3.2.1.1	Dendritische Zellen.....	104
3.3.2.1.2	Oberflächenantigenanalyse der T-Zellpopulationen.....	105
3.3.2.1.3	Reinheiten der Zellfraktionen nach Depletion im Vergleich zur Ausgangspopulation.....	110
3.3.2.1.4	Reinheiten im Methodenvergleich.....	112
3.3.2.1.4.1	Alloreaktivität.....	113
3.4	Aktivierungsfähigkeit.....	115
3.4.1	Aktivierungsfähigkeit der Zellfraktionen nach Depletion.....	117
3.4.2	Aktivierungsfähigkeit der expandierten Negativfraktion.....	119
3.4.2.1	Vergleich der Aktivierungsfähigkeit der Negativfraktion zur Aktivierungsfähigkeit der Expansionsfraktion.....	122
3.4.3	Vergleich der Aktivierungsfähigkeit der Versuchsreihen mit unterschiedlichen Stimulatorzellen.....	123
3.5	Proliferationsfähigkeit.....	125
3.5.1	Proliferationsfähigkeit der Zellen nach Depletion.....	125
3.5.2	Proliferationsfähigkeit der expandierten Negativfraktion.....	127
3.5.3	Proliferationsfähigkeit der Negativfraktion im Vergleich zur expandierten Negativfraktion.....	128
3.5.4	Proliferationsfähigkeit der Zellfraktionen mit unterschiedlichen primären Stimulatorzellen.....	130
3.6	Proliferationsfähigkeit auf Einzelebene: Durchflußzytometrische BrdU (5-Bromo-2`-deoxyuridin)-Proliferationsanalyse.....	131
3.6.1	Vergleich Durchflußzytometrische BrdU (5-Bromo-2`- deoxyuridin)- Proliferationsanalyse und [6-H ₃] Thymidin- Proliferationsassay.....	131
3.6.2	Proliferationsanalyse auf Einzelzellebene mit Dendritischen Zellen als Stimulatoren.....	137
3.6.2.1	Proliferationsanalyse der Negativfraktion.....	137
3.6.2.2	Proliferationsanalyse der Expansionsfraktion.....	138
3.6.2.3	Die BrdU-Proliferationsanalyse im Methodenvergleich.....	140
3.7	Versuchsreihe mit Patientenzellen.....	146
3.7.1	Anteile einzelner Zellfraktionen.....	146
3.7.2	Recovery Rate.....	147
3.7.3	Anteil nicht-alloreaktiver Zellen pro Milliliter Leukapheresat.....	147

3.7.4	Zellverluste	147
3.7.5	Charakterisierung von T-Lymphozytenpopulationen	148
3.7.5.1	Oberflächenantigenanalyse	148
3.7.5.2	Oberflächenantigenanalyse als Nachweis der Aktivierbarkeit beziehungsweise Alloreaktivität der eingesetzten Zellpopulation	148
3.7.5.3	Oberflächenantigenanalyse der Zellfraktionen nach Depletion (CliniMACS®)	149
3.7.5.4	Reinheiten der Negativfraktion nach Depletion.....	150
3.7.6	Aktivierungsfähigkeit.....	152
3.7.7	Proliferationsfähigkeit	154
4	Diskussion	157
4.1	Die haploidentische Stammzelltransplantation	157
4.2	Geeignete Depletionsverfahren	157
4.2.1	Das immunomagnetische Depletionsverfahren	159
4.2.2	Die immunologische Depletion mittels CliniMACS®	162
4.3	Nachweis der Effektivität der Depletionsmethode durch Oberflächenantigenanalyse	162
4.4	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen (T _{reg}).....	165
4.5	Sekundäre Nachweisverfahren zur Bestimmung der Alloreaktivität	168
4.5.1	Oberflächenantigenanalyse	168
4.5.2	[H ³] Thymidineinbaurate	170
4.6	Depletion alloreaktiver Patientenzellen.....	171
4.7	Der BrdU-Assay als Methode zur Zellanalyse auf Einzelzellebene	173
5	Zusammenfassung	177
6	Verzeichnis der Abkürzungen	179
7	Tabellenverzeichnis	184
8	Abbildungsverzeichnis	194
9	Literaturverzeichnis.....	198
10	Danksagung	212
11	Lebenslauf.....	213

1 Einleitung

1.1 Die Knochenmarktransplantation (KMT)

1.1.1 Allgemeine Grundlagen

Die Knochenmarktransplantation beziehungsweise Stammzelltransplantation (HSCT, hämatopoetische Stammzelltransplantation) als moderneres Verfahren hat sich als erfolgreiche Therapiemaßnahme bei zahlreichen malignen und nichtmalignen Erkrankungen bewährt. Dabei werden autologe, also vom Empfänger selbst generierte oder allogene, das heißt von einem Individuum gleicher Spezies gewonnene Immunzellen auf einen Empfänger parenteral übertragen. Unter der Vorstellung, dass dieses neue Immunsystem ins Knochenmark gelangt und dort anwächst, sollen die übertragenen Zellen das insuffiziente Knochenmark im Empfänger als immunologisches Organ ersetzen.

1.1.2 Die Entdeckung von Knochenmarkzellen mit protektiver Potenz

Die Knochenmarktransplantation, also die Überführung von potenten hämatopoetischen Zellen eines Spender zum Ersatz des insuffizienten Immunsystems des Empfängers gleicher Spezies, nahm ihren Anfang in Experimenten in den späten 40er und 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts. So entdeckten Jacobson et al. 1949 die murine Milz als zur Protektion beziehungsweise Regeneration des Organismus befähigtes Organ, welches, durch Abschirmung geschützt, trotz applizierter letaler Strahlendosis ein Überleben der Versuchstiere ermöglichte [82]. Zwei Jahre später zeigte die Gruppe um Lorenz im Tiermodell, dass durch parenteral verabreichte Knochenmarkszellen bestrahlte Mäuse vor dem Strahlentod bewahrt wurden [102]. Auch Cole et al. konnten dies in Versuchen mit Milzzellen in seiner 1952 veröffentlichten Arbeit zeigen [36]. 1955 bestätigte Cole seine Ergebnisse in Versuchen an Ratten mit entsprechenden Knochenmarkszellen [37]. In den Anfängen war noch nicht klar, ob die beschriebenen schützenden Faktoren humoraler oder zellulärer Natur waren. So schrieben Jacobson et al. 1951 [83]: „Die allgemeine Schlussfolgerung ist entweder, dass (i) die abgeschirmten Gewebe eine Substanz nicht zellulärer Natur produzieren, die einen günstigen

Effekt auf die Erholung im bestrahlten Tier ausüben, oder dass (ii) Zellen aus dem abgeschirmten Gewebe auswandern und so die Regeneration des bestrahlten Gewebes ermöglichen“. Weiter kamen Jacobson et al. zu dem Schluss, dass „die Beweise eher für die erste Annahme sprechen, aber beide (Annahmen) falsch sein können“. In der Tat wurde zu Beginn der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts die humorale Hypothese gegenüber der zellulären Hypothese favorisiert [84]. Einige Jahre später jedoch bewiesen verschiedene Arbeitsgruppen, dass die protektive Wirkung von transplantierten hämatopoetischen Stammzellen ausging. So zeigten Main und Prehn [104] im Jahre 1955, dass Hauttransplantate vom vormaligen Knochenmarkspender im allogenen Empfänger überlebten. Dies bestätigte die Vermutung, dass sich Immunzellen des Spenders im Empfänger etabliert hatten und so eine Toleranz gegenüber dem Gewebstransplantat aufwiesen. 10 Jahre vorher waren Owen et al. [127] Experimente mit nicht monozygoten Kälberzwillingen gelungen, die schon damals für die zelluläre Theorie sprachen. Weitere Versuche von Vos et al. [185] und Ford et al. [55] bestätigten Main und Prehns Ergebnisse. In der letztgenannten Arbeit von Ford et al. führten die Autoren den Begriff „radiation chimera“ - Strahlenchimäre - ein. Sie zeigten, dass nach erfolgter hochdosierter Ganzkörperbestrahlung und anschließender Knochenmarksgabe das hämatopoetische System des Spendertieres im Empfänger dauerhaft vorhanden ist. Somit war der Grundstein für die erfolgreiche Transplantation von Immunzellen gelegt.

1.1.3 Das Phänomen der Zweiterkrankung (Secondary disease)

Obwohl die ersten experimentellen Anordnungen viel versprechend waren, traten bei einigen Versuchen trotz anfänglichen Anwachsens der infundierten Zellen Krankheitssymptome auf, die auch als „secondary disease“ [181] oder „wasting disease“ bezeichnet wurden. Einen großen Beitrag zum Verständnis, wie es zu diesem sekundären Krankheitsphänomen kommt, leistete Van Bekkum [181] mit seiner Arbeitsgruppe. Was er damals beschrieb, kennen wir heute als Abstoßungsreaktion des Transplantats durch nicht zerstörte Immunzellen des Empfängers beziehungsweise als Graft-versus Host Reaktion

(GVHR) oder Graft-versus Host Erkrankung (GVHD), also eine Reaktion der im Transplantat erhaltenen kompetenten Immunzellen gegen den Empfänger. Zur theoretischen Grundlage dieser Immunreaktion postulierte Billingham 1966 [16], dass an deren Entstehung verschiedene, nachfolgend aufgeführte Bedingungen geknüpft sind: das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten, der Empfänger darf nicht in der Lage sein, diese zu zerstören und er muss Gewebsantigene exprimieren, die im Spenderorganismus nicht vorkommen. Diese Gewebsantigene sind heute als Haupt- und Nebenantigene bekannt.

1.1.4 Die Entdeckung des Haupthistokompatibilitätsantigens (HLA, MHC-Komplex)

Erste Versuche der klinischen Anwendung der neuen Erkenntnisse, ein zerstörtes hämatopoetisches System durch Gabe von Knochenmark zu behandeln, stellten sich als nicht erfolgreich heraus. Ausgehend von 203 Patienten, die zwischen 1950 und 1962 transplantiert wurden, war in 11 Fällen ein Chimärismus, eine Etablierung von Spenderimmunzellen im Empfänger, erreicht worden, bei 125 Patienten kam es nicht zu einem Anwachsen des Transplantats, und 152 Patienten erlebten den jeweiligen Fallbericht nicht mehr [23]. Selbst der Einsatz blutgruppenkompatibler Spender brachte keine besseren Ergebnisse, weder hinsichtlich des Anwachsens oder in der Ausbildung eines persistierenden Chimärismus noch im Überleben [153]. Erst die Charakterisierung der Leukozytenantigene durch Dausset [40] und Rood et al. [142] auf Grundlage der von Miescher und Fauconnet [120] beschriebenen Antikörper, die nach Transfusion entstanden waren, machte es möglich, gezielt Spender zu suchen, die mit dem jeweiligen Empfänger immunologisch übereinstimmten und so der damals als „wasting disease“ bezeichneten GVHR beziehungsweise einer Abstoßungsreaktion vorzubeugen. Die Leukozytenantigene, auch HLA-Antigene (Haupthistokompatibilitätsantigene) oder MHC-Moleküle (major histocompatibility Complex) genannt, sind Gewebemerkmale auf kernhaltigen Zellen, die durch zahlreiche Phänotypen sehr spezifisch für ein Individuum sind. Nach Entdeckung dieser Merkmale und

ihrer klinischen Relevanz wurden mit Hilfe entsprechender zytotoxischer Antikörper Gewebstypisierungen vorgenommen. Die moderne Ära der Knochenmarktransplantation konnte beginnen.

1.2 Die Stammzelltransplantation (HSCT) als Weiterentwicklung der Knochenmarktransplantation (KMT)

1.2.1 Grundlagen der HSCT

Die Stammzelltransplantation (HSCT, hämatopoetische Stammzelltransplantation) stellt eine elegante Variante der Knochenmarktransplantation dar. Dabei werden Stammzellen entweder autolog, das heißt Spender und Empfänger sind identisch, oder allogene, was einer Übertragung innerhalb einer Spezies zwischen unterschiedlichen Individuen entspricht, transplantiert. Die HSCT hat sich im Lauf der Zeit als vorteilhaft gegenüber der Knochenmarktransplantation (KMT) herausgestellt. Im autologen System werden ihr eine schnellere Erholung des hämatopoetischen Systems, eine geringere Morbidität, kürzere Krankenhausaufenthalte und geringere Gesamtkosten der Behandlung zugeschrieben [143]. Ein weiterer großer Vorteil gegenüber der konventionellen Knochenmarksverpflanzung besteht in der für den freiwilligen Spender schonenderen Methode der Gewinnung von Transplantatzellen. Diese liegen nach Mobilisierung durch subkutane Hormongabe in großer Anzahl im peripheren Blut vor. Als stimulierender Faktor wird der Granulozytenkoloniestimulierende Faktor, G-CSF, subkutan für mehrere Tage appliziert.

G-CSF hat eine spezifische Wirkung auf die myeloische Zellreihe, die durch diesen Wachstumsfaktor zur Proliferation und Differenzierung angeregt wird [79].

Die durch G-CSF Gabe im Spender mobilisierten Stammzellen können nach einigen Tagen mittels Leukapherese abgesammelt und weiterverarbeitet werden. Unter Leukapherese versteht man die selektive Entfernung von Leukozyten aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders mittels Zellseparator oder reversibler Adhäsion an Nylonfasern. Letzteres Verfahren bezeichnet man als Filtrationsleukapherese. Das Plasma und die Erythrozyten werden dem

Spender zurückgeführt. Neben der Gewinnung immunkompetenter Zellen zur Transplantation wird dieses Verfahren bei chronischen Leukämieformen zur Senkung der Leukozytenzahlen beziehungsweise atypischer Zellklone angewendet.

Da dies im Gegensatz zur Knochenmarkzellentnahme ein nahezu schmerzloses Entnahmeverfahren darstellt, ist eine allgemeine Anästhesie nicht notwendig, die Komplikationsrate ist geringer, der Eingriff für den freiwilligen Spender risikoärmer. Auch eine Narbenbildung, wie sie bei der älteren Verfahrensweise durch mechanische Reizung im Entnahmegebiet regelmäßig auftritt und die Materialgewinnung im Falle einer erneuten Spende deutlich einschränkt, ist nicht zu befürchten. Im Hinblick auf die Verträglichkeit und Nebenwirkungen einer G-CSF Gabe ist zu bemerken, dass keine abschließende Aussage über die Unbedenklichkeit getroffen werden kann. Majolino et al. [106] untersuchten 1997 in einer retrospektiven Multicenter Studie die Auswirkungen der Gabe von G-CSF und anschließender Leukapherese auf gesunde Stammzellspender. Dabei wurden 76 gesunde Probanden im Hinblick auf akute Nebenwirkungen und klinische Parameter während der G-CSF Applikation und nach der Spende beurteilt. Als häufigste Nebenwirkung während der Mobilisierungsphase wurden Knochenschmerzen genannt. Die durchschnittlichen maximalen Leukozyten- beziehungsweise Lymphozytenzahlen betragen $48,1(+/-15,6) \times 10^9/l$ beziehungsweise $4,2(+/-1,5) \times 10^9/l$. Die Thrombozytenkonzentrationen sanken bis Tag 8 nach Leukapherese auf minimal $77(+/-26) \times 10^9/l$ und zeigten sich drei Tage später im Normbereich. Subjektive Beschwerden traten nach erfolgter Spende beziehungsweise Spenden nicht auf. Potentielle akute Störungen, wie thromboembolische Ereignisse, wurden nicht diagnostiziert. Es ist allerdings zu bedenken, dass mögliche Langzeitkomplikationen, die durch G-CSF ausgelöst werden könnten, hier sei vor allem an Störungen im Bereich der Hämatogenese, wie an Leukämien, gedacht, erst zu einem nicht mehr beobachteten Zeitpunkt auftreten könnten. Eine frühere Studie untersuchte die Auswirkungen auf Spender von mononukleären Zellen durch Lymphozytapherese und Monozytapherese. Es wurden innerhalb des

Untersuchungszeitraums von 15 Monaten insgesamt 609 Apheresen erfolgreich, das heißt mit ausreichend hoher Zellzahl, durchgeführt. Dabei traten nur geringe Nebenwirkungen auf. Die Blutbilder der Spender normalisierten sich rasch [48]. Weitere mögliche Nebenwirkungen und deren prozentuale Häufigkeit wurden in einer neueren Studie [38] während der Gabe von G-CSF, Filgrastim™, über fünf bis sechs Tage, untersucht. Häufig traten neben Knochenschmerzen (85 Prozent), Kopfschmerzen (40-70 Prozent), Myalgien (20 Prozent), Abgeschlagenheit (15 Prozent) auch Übelkeit und Erbrechen (10 Prozent) auf. Dabei wirkte sich die Gabe von Analgetika sowie eine Dosisreduzierung hinsichtlich des Filgrastim™, positiv auf die beklagten Symptome aus. In seltenen Fällen (1-3 Prozent) waren die subjektiven Beschwerden so beträchtlich, dass die Gabe von G-CSF vollständig eingestellt werden musste. Bemerkenswert ist, dass auch schwere Komplikationen, wie Anaphylaxie, arterielle Thrombose, Apoplex und Milzruptur, wenn auch selten, auftreten können [38].

Für die Sicherheit der freiwilligen Spender und damit auch für das Konzept der allogenen Stammzellspende ist es zwingend notwendig, subjektive und objektive Nebenwirkungen engmaschig zu beobachten und zeitnah zu behandeln. Zur Vermeidung von thrombo-embolischen Komplikationen sollte die Hormondosis reduziert werden, wenn der Grenzwert von 70 bis 75 x 10⁹ Leukozyten/l im peripheren Blut überschritten wird [4].

1.2.2 Die Indikation zur HSCT

Im Jahr 1986 wurden erstmals Leukaphereseprodukte als Alternative zur Knochenmarktransplantation eingesetzt. Zunächst wurden akute Leukämien mit autologen Zellen behandelt [134]. Dabei wurden nach Applikation einer intensivierten Chemotherapie (DAT Schema) zur Remissionsinduktion bei einem Patienten mit akuter nichtlymphozytischer Leukämie (ANLL) hämatopoetische Vorläuferzellen per Leukapherese insgesamt sieben mal abgesammelt und bis zum erneuten Ausbruch der Krankheit kryokonserviert. Die Krankheit rezidierte und der Patient wurde mit einer supraletalen Chemoradiotherapiedosis bestehend aus Etoposid, Cyclophosphamid und

einer Ganzkörperbestrahlung behandelt, um möglichst alle Tumorzellen zu vernichten. Das zu einem früheren Zeitpunkt entnommene Leukapheresat wurde reinfundiert, am Tag 16 betrug die Anzahl an Granulozyten $0,5 \times 10^9$ Zellen/l. Bis zum Tag 35 regenerierten sich die Thrombozyten auf 50×10^9 Zellen/l. Die im peripheren Blut befindlichen Progenitorzellen konnten also erfolgreich zur Immunrekonstitution eingesetzt werden.

Eine große Anzahl an malignen und nichtmalignen Erkrankungen werden heutzutage mit immunologischen Vorläuferzellen therapiert. Dabei stellen nicht nur akute und chronische Leukämien und Lymphome eine Indikation dar, sondern auch Myelodysplastische Syndrome, diverse Stammzellkrankheiten wie Aplastische Anämie, Fanconi Anämie und die PNH (paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie), myelo- und lymphoproliferative Syndrome, genetisch determinierte Stoffwechselkrankheiten wie MPS (Mukopolysaccharidose) und Leukodystrophien, angeborene Störungen des Immunsystems, beispielsweise SCID (Schwere kombinierte Immundefizienz) und hämatologische Erkrankungen wie die Thalassämia major und die Sichelzellanämie. Auch andere genetische Erkrankungen wie Osteopetrosis und Plasmazellfunktionsstörungen gehören zu den mit Stammzellen therapierten Erkrankungen [178]. Darüber hinaus ist eine Stammzelltherapie auch bei soliden Tumoren, hier sei das vor allem in der pädiatrischen Onkologie vorkommende und einer konventionellen Radiochemotherapie, vor allem in fortgeschrittenen Stadien, nur schwer zugängliche Neuroblastom genannt, indiziert [168].

Während die allogene Transplantation keinen Vorteil gegenüber der schlecht wirksamen konventionellen Therapie zeigte, überzeugten die Ergebnisse von Seeger et al. [156]. Seeger et al. unterzogen pädiatrischen Neuroblastompatienten einer allogenen Transplantation und verglichen diese mit Patienten unter konventioneller Therapie. Die Studienergebnisse ergaben einen Vorteil der Stammzelltherapie gegenüber der Radiochemotherapie. Das autologe Transplantat galt fortan als Standardtherapie für Neuroblastome [178].

1.2.3 Die haploidentische allogene HSCT

Die Knochenmarktransplantation oder, als neueres Verfahren, die Stammzelltransplantation (HSCT, Hämatopoetische Stammzelltransplantation) wird vor allem in der Therapie von akuten und chronischen malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems erfolgreich eingesetzt. Sie ist jedoch in ihrer Anwendung eingeschränkt. Der als ideal angesehene Spender stimmt in den für die Transplantation wesentlichen HLA Merkmalen HLA A, -B und -DR zu einhundert Prozent überein. In weniger als 1/3 der Fälle (30 Prozent) kann so ein Familienspender gefunden werden. Nichtverwandte MHC-identische Spender, weltweit sind zurzeit mehr als zehn Millionen potentielle Spender registriert (Stand: 28. November 2006) [19], werden über die entsprechenden Knochenmarksdateien in 30 bis 60 Prozent der Fälle ermittelt. Gehört der Patient einer in den Dateien schlecht repräsentierten ethnischen Gruppe an, sinkt die Chance auf eine erfolgreiche Vermittlung erheblich; in nur einem von zehn Fällen kann dann eine Transplantation erfolgen. Weitere Einschränkungen ergeben sich aus der langen Wartezeit, bis ein passender Spender ermittelt und vorbereitet werden kann. Viele Patienten befinden sich dann in einer fortgeschrittenen Phase ihrer Erkrankung, sie erleiden in der Zwischenzeit ein Rezidiv oder erkranken an Komplikationen der Grundkrankheit.

Eine Alternative zur HLA-identischen Transplantation stellt die so genannte haploidentische, in zwei bis drei HLA Klassen nicht-identische Transplantation dar. Fast jeder Patient hat einen solchen Spender in der Familie zur Verfügung. Vorteile ergeben sich aus der schnellen und mehrmaligen Verfügbarkeit des benötigten Leukapheresats. Diese allogene Transplantation stellt das Mittel der Wahl für eine Reihe von malignen und nichtmalignen Erkrankungen dar [174]. Zur Vermeidung einer allogenen Reaktion im Körper des Patienten post transplantationem, die sich in einer Abstoßung des Transplantats und/oder einer Graft-versus Host Reaktion (GVHR) zeigen kann, sind besondere Bedingungen an das Transplantat geknüpft; gleichzeitig muss der Patient konditioniert, das heißt nach einem vorgegebenen Schema vorbereitet werden.

1.2.4 Die Rolle der T-Zelle

Die T-Zelle, auch auf Grund ihres charakteristischen Oberflächenmarkers als CD 3+ Zelle bezeichnet, spielt eine entscheidende Effektorrolle in der Immunabwehr. Durch sie werden Antigene intra- und extrazellulärer Art eliminiert, sie zeigt sich jedoch durch ihre alloreaktive Potenz auch verantwortlich für die Entstehung der GVHD (Graft-versus Host disease) und spielt bei der Abstoßungsreaktion eine große Rolle.

1.2.5 In vitro Analyse alloreaktiver T-Zellen

Seit mehr als 25 Jahren gilt die Lymphozytenmischkultur (MLC) neben dem Test zur zellvermittelten Lympholyse (CML) als Nachweisverfahren zur Bestimmung der Alloreaktivität bei Nichtübereinstimmung im HLA Klasse I und HLA II System [35]. Die Ergebnisse der MLC und der CML hinsichtlich der Zellaktivierung in vitro korrelieren positiv mit dem Langzeitüberleben des Transplantats in vivo [63]. Diese Tests jedoch sind nicht quantitativ. Ein quantitativer Nachweis gelingt mit der limiting dilution analysis (LDA). Dieser Test ermittelt die Frequenz an T-Zell Vorläuferzellen der CD 4+ T-Helferzellen und der CD 8+ Cytotoxischen T-Zellen [97], [173]. Nachweisreaktionen, bei denen eine T-Zellantwort auf minore Antigene beobachtet werden soll, gelingen nur nach vorheriger in vivo Immunisierung der zu untersuchenden Zellen mit diesen Peptiden. Dadurch werden erhöhte Vorläuferzellfrequenzen erzielt, die ausreichen, um in vitro Antworten zu erhalten, die sowohl CD 4+ als auch CD 8+ Zellpopulationen einbeziehen.

1.2.5.1 Die CD 4+ T-Zellen (T-Helferzellen)

CD 4+ Zellen stellen eine Subpopulation von T-Zellen dar die, im Gegensatz zu den CD 8+ Zellen, durch MHC Klasse II Moleküle aktiviert werden. Sie werden in der Literatur auf Grund ihrer Funktion auch als T-Helferzellen bezeichnet. Es sind zwei wichtige Subpopulationen bekannt: Th1 und Th2 Zellen, die beide von gemeinsamen Vorläuferzellen abstammen. Die Regulierung, in welche Richtung die Differenzierung der Vorläuferzellen abläuft, hängt stark von Zytokinen und einer Reihe von kostimulatorischen Proteinen, hier sei beispielhaft B7 genannt,

ab. Gemeinsame Aufgabe von CD 4+ Zellen ist es, die Aktivierung anderer Immunzellen durch Sekretion bestimmter Zytokine zu bewirken. Eine Einteilung in Untergruppen ist durchaus sinnvoll, da sie innerhalb der Immunantwort unterschiedliche Aufgaben übernehmen und durch ihre Eigenschaften, wie die divergente Synthese von Zellfaktoren, voneinander abgegrenzt und in vitro Tests unterschieden werden können. Th1 Zellen stimulieren vor allem starke zelluläre Immunantworten und werden hauptsächlich durch intrazelluläre Pathogene aktiviert. So produzieren Th1 innerhalb der T Zellpopulation als spezifisch anzusehende Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon-gamma (IFN-gamma), Interleukin-12 (IL-12) und Tumornekrosefaktor-beta (TNF-beta). Im Gegensatz dazu bewirken Zellen der Th2 Subpopulation spezifische Antikörperantworten und eher geringe zelluläre Aktivitäten. Sie werden eher von extrazellulären Bakterien und Parasiten stimuliert. Th2 Zytokine sind vor allem Interleukine: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13.

Eine weitere Untergruppe, die Th3 T-Zellsubpopulation, wird auch als regulatorische T-Zelluntergruppe bezeichnet. Sie sind in immunologische Mechanismen der oralen Toleranz gegenüber Antigenen involviert. Charakteristisch für diese Zellen ist die Sekretion von Tumor growth factor-beta (TGF-beta). Sie besitzen gegenüber Th1 und Th2 Zellen suppressorische Eigenschaften.

Th1 und Th2 Zellen beeinflussen sich antagonistisch. Das von Th1 Zellen sekretierte IFN-gamma bewirkt die Proliferation der Th2 Fraktion, während diese durch IL-10 die Zytokinproduktion der Th1 Subpopulation hemmen können. Darüber hinaus wird durch das Th2 Zytokin IL-4 die Expansion von Th1 Zellen unterdrückt. Durch diese gegenseitige Hemmung werden überschießende inflammatorische Reaktionen verhindert. Ungleichgewichte innerhalb der CD 4+ Population führen demzufolge zu pathologischen Reaktionen; zu hohe Aktivitäten an Th1 scheinen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle zu spielen, während als Ursache von allergischen Reaktionen, die eine überschießende Immunantwort darstellen, eine Überexpression der Th2 Subpopulation ursächlich beteiligt zu sein scheint.

CD 4+ T-Zellen unterscheiden sich auch durch ihre unterschiedlichen Zytokinrezeptoren [20]. Während Th1 Zellen vorzugsweise den Chemokinrezeptor CXCR3 und CCR5 exprimieren, befinden sich auf Th2 T-Zellen vor allem Rezeptoren vom CCR4- und CCR3 Typ. Agonisten zu Rezeptoren der einen T-Zell Subpopulation verhalten sich zu Rezeptoren der Gegengruppe antagonistisch [99]. Dies ist ebenfalls als Hemmmechanismus gegenüber einer zu starken Aktivierung von immunologischen Zellen und somit als Mäßigung der immunologischen Antwort zu sehen.

Eine andere Unterteilung der einzelnen Zellfraktionen innerhalb der CD 4+ Population liegt in ihren charakteristischen Oberflächenmarkern. Insbesondere der CD4/CD25 doppelt positiven T-Zellfraktion wird eine regulatorische Funktion zugeschrieben. Ihr immunsuppressorisches Potential hinsichtlich einer Toleranzinduktion gegenüber dem Transplantat und der Verhinderung einer GVH Reaktion durch Unterdrückung alloreaktiver immunkompetenter Zellen ist in verschiedenen Studien beschrieben und von Shevach 2002 zusammengefasst worden [158].

1.2.5.2 Die CD 8+ T-Zellen (Cytotoxische T-Zellen, CTL)

Die, auf Grund ihrer Funktion auch als zytotoxische T-Zellen bezeichneten CD 8+ Zellen werden durch MHC Klasse I Moleküle aktiviert. Diese präsentieren Peptide, die innerhalb der Zelle prozessiert werden und stellen so die Schnittstelle zwischen autologen Körperzellen und dem Immunsystem dar [166]. Ihr kennzeichnender und von anderen T-Zellpopulationen divergenter Oberflächenmarker ist das CD 8 Molekül. Es gehört zur Immunoglobulinsuperfamilie, gilt als Effektormolekül für die intrazelluläre Signaltransduktion und ist mit der Tyrosinkinase assoziiert, die eine Reihe von anderen Oberflächenantigenen, hier sei das CD 3 erwähnt, phosphoryliert.

CD 8 scheint bei der Transduktion des intrazellulären Signals beteiligt zu sein, wenn diese Proteine an ihre entsprechenden Rezeptoren gebunden werden. CD 8 ist für die Entwicklung zur zytotoxischen T-Zelle zwingend erforderlich. Es wirkt als ein an Klasse I MHC-Moleküle bindendes Adhäsionsmolekül. Durch diese Adhäsion gelingt es der zytotoxischen Zelle, Zielzellen durch Lysierung

und direkten Zellkontakt zu eliminieren. Dadurch können virusinfizierte Zellen genauso wie Tumorzellen, jedoch auch Zellen des Transplantats, im Rahmen einer Abstoßungsreaktion aus dem Organismus entfernt werden [128], [98].

1.3 Die Alloreaktivität

Alloreaktivität, das heißt das Erkennen von Fremd, bezieht sich in der Immunologie auf die Fähigkeit CD 3 positiver T-Zellen und ihrer Subpopulationen, genetisch codierte Polymorphismen innerhalb einer Spezies zu erkennen. Diese allogene Antwort kann in zwei unterschiedliche Komponenten aufgeteilt werden. Nach Erkennen der den eigenen Oberflächenantigenen fremden Molekülen kommt es zu so genannten Effektormechanismen, ausgelöst durch den vorher erfolgten Erkennungsprozess [74]. Die Hauptziele dieser Immunantwort auf allogene Gewebe sind die MHC-Moleküle, (MHC, main histocompatibility antigen), auch Hauptleukozytenantigene (HLA) genannt. Sie kommen auf allen kernhaltigen Zellen vor und befinden sich auch auf Spender- und Empfängerzellen. Der Ausdruck MHC, also Haupthistokompatibilitätsantigen, spiegelt die Tatsache wider, dass dieses Antigen im Rahmen einer Gewebstransplantation zwischen inkompatiblen Individuen beschrieben wurde [59]. Die Erkennung von allogenen MHC-Molekülen gilt als das Erstereignis, welches schließlich zur Abstoßungsreaktion oder zur GVH-Reaktion führt, je nachdem, ob Spenderzellen als fremd erkannt werden oder transplantierte T-Zellen das Empfängergewebe als allogenen erkennen. Die T-Zell Antwort auf allogene Oberflächenmarker ist nicht nur in vivo sehr stark, sie kann auch in vitro mittels MLC (mixed lymphocyte culture, Lymphozytenmischkultur) simuliert werden [157]. Stimmen Spender und Empfänger in ihren Hauptgewebemerkmale überein, kann es dennoch zu einer allogenen Reaktion kommen. Dies liegt an den Nebenhistokompatibilitätsantigenen (miHAs, minor histocompatibility antigens) des Empfängers. Minor Antigene sind Peptide, die von einer Vielzahl endogener Proteine, die einen genetischen Polymorphismus zwischen Individuen aufweisen, abstammen und nicht zu den MHC-Molekülen gehören [59]. Als Beispiel seien Ferritin und Myoglobin genannt. Zur T-Zell Aktivierung

kommt es, wenn MHC I oder II Moleküle auf autologen antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Monozyten, Dendritische Zellen oder Makrophagen [31] diese miHAs präsentieren [32].

1.3.1 Die Allogenerkennung

T-Zellen erkennen Fremdantigene entweder direkt oder indirekt. In ersterem Fall fungieren allogene antigenpräsentierende Zellen (APC) als direkte Stimulatoren auf CD 8 positive Zellen, auch zytotoxische Zellen (Tc oder CTL) genannt (über MHC Klasse I), und auf CD 4 positive Zellen (über Klasse II Oberflächenantigene), den so genannten T-Helferzellen (Th). Die zweite Möglichkeit besteht in der Erkennung nach Prozessierung dieser Fremdantigene durch antigenpräsentierende Zellen (APC) des Empfängers. Letzteres wird auch als indirekte Fremderkennung bezeichnet [74], [59]. Zur Aktivierung von zytotoxischen Zellen kommt es, wenn CD 4+ Zellen über den entsprechenden T-Zellrezeptor (TcR) an den MHC-Peptidkomplex binden und dadurch aktiviert, IL-2 sezernieren [59].

1.3.1.1 Die direkte Allogenerkennung

Die Hypothese, dass die direkte Reaktion durch Kreuzreaktion von T-Zellen, die eine hohe Spezifität für Selbstantigene aufweisen, auch durch Fremdantigene ausgelöst werden kann, wurde durch die Beobachtung, dass die meisten daran beteiligten T-Zellen zum Subtyp der Memory T-Zelle gehören, bestätigt. Diese immunkompetenten Memory Zellen wurden zu einem früheren Zeitpunkt gegen diese allo-genen Moleküle durch autologe, also Selbst-MHC-Moleküle, aktiviert [101], [117]. Es existieren zwei unterschiedliche Modelle, die die hohe Frequenz an direkt agierenden alloreaktiven T-Zellen zu erklären versuchen. Der ersten Theorie zufolge ist für die Aktivierung der Zelle nicht das durch ein fremdes MHC-Molekül präsentierte Peptid, sondern vielmehr Aminosäurepolymorphismen des allo-genen MHC-Komplexes für die Aktivierung verantwortlich [186]. Jedes nicht autologe MHC-Molekül kann als Ligand für eine bestimmte alloreaktive T-Zelle dienen. Dabei entsteht eine hohe Ligandendichte. Die T-Zell Rezeptoraffinität kann hierbei sehr viel geringer sein

als es für eine Peptid-Selbst MHC-Bindung notwendig wäre, und es entstehen innerhalb des alloreaktiven T-Zell Repertoires Zellen mit hoher, mittlerer und niedriger Affinität und somit eine hohe Anzahl an Vorläuferzellen [94].

Das multiple Binärkomplexmodell hingegen erklärt die allogene Reaktion mit der Spezifität bestimmter T-Zellrezeptoren für bestimmte Peptide, die von autologen Zell- oder Serumproteinen abstammen. Diese Peptide können durch Fremd-MHC-Moleküle, die eine den autologen MHC-Molekülen differente Bindungsgrube aufweisen, präsentiert werden [59]. Bemerkenswert hierbei ist, dass beide beschriebenen Theorien die Gesetzmäßigkeiten der positiven Selektion für die Selbst-MHC-Restriktion durchbrechen. Diese Selbstrestriktion bedeutet, dass nach Kontakt mit Autoantigenen im Thymus neu synthetisierte Thymozyten je nach ihrer Eigenschaft bezüglich der Bindung mit Selbst-MHC-Molekülen und der Autoantigenerkennung negativ oder positiv selektiert werden. Positiv selektierte Zellen haben eine mittelstarke Bindung, eine Autoantigenerkennung fehlt. Nur diese überleben und reifen zu immunkompetenten T-Zellen heran. Erkennen Thymozyten autologe Antigene oder ist die Bindung zu stark oder zu schwach, werden Apoptosemechanismen aktiviert und die Zelle geht zugrunde [26]. Dadurch wird gewährleistet, dass die Immunzellen mit den eigenen MHC-Molekülen zusammenarbeiten und gleichzeitig eine Alloreaktion gegen autologe Zellen verhindert wird.

Dennoch sind diese Vorgänge im Rahmen der positiven Selektion durch strukturelle Ähnlichkeit im Bereich der Kontaktfläche von MHC-Molekülen zum T-Zellrezeptor teilweise erklärbar. Treten diese strukturellen Übereinstimmungen zwischen Stimulator und Responder auf, imitiert die T-Zellreaktion die Selbst-MHC-Restriktion; diese ist dann gegen neue Peptide, die ausschließlich auf allogenen MHC-Molekülen präsentiert werden, gerichtet [100].

1.3.1.2 Die indirekte Allogenerkennung

Die indirekte Alloreaktion beschreibt die Präsentation fremder MHC-Moleküle in Form von Peptiden innerhalb der MHC-Grube auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Empfängers nach erfolgter intrazellulärer Prozessierung [159].

Dass MHC Moleküle befähigt sind, von MHC Komplexen abstammende Peptide zu präsentieren, konnte im Thymus an Dendritischen Zellen (DC), die zu den antigenpräsentierenden Zellen gehören, gezeigt werden. Der Thymus gilt als wichtiges Organ zur Entwicklung von zentraler Toleranz durch negative Selektion. [86].

Erreichen zirkulierende Dendritische Zellen (DC) des Spenders einen Lymphknoten, werden diese von ansässigen Empfängerzellen phagozytiert, prozessiert und schließlich auf deren Oberfläche präsentiert [8].

Damit eine direkte oder eine indirekte Fremderkennung stattfindet, muss ein Umfeld mit entsprechenden Kostimulatoren wie Oberflächenmoleküle und Zytokine, zum Beispiel Interleukin 2 (IL-2), vorhanden sein.

Zu bedenken ist auch, dass sich beide Wege der Alloerkennung ergänzen und gegenseitig beeinflussen können. So können CD 4+ T-Zellen mit indirekter Anti-Donor (gegen den Spender gerichteter) Wirkung Einfluss auf zytotoxische CD 8+ T-Zellen nehmen und so den direkten Pfad aktivieren [59].

Das Zytokin IL-2, das unter anderem auch als T-Zell Wachstumsfaktor bezeichnet wird und hauptsächlich von CD 4+ T-Zellen und nur nach deren Aktivierung sezerniert wird, ist ein Protein aus 133 Aminosäuren. Seine korrespondierenden Rezeptoren befinden sich zu einem hohen Prozentsatz auf aktivierten T-Zellen, seltener auf ruhenden mononukleären Lymphozyten und aktivierten B-Zellen.

Der hochaffine IL-2 Rezeptorkomplex ist zusammengesetzt aus den beiden Untereinheiten TAC Antigen (T-cell activation antigen) und IL2R (entspricht CD 122; p75); sie dienen als Ligandenbindungsdomänen, während eine γ -Kette als Signalkomponente dient. CD 122 befindet sich nur auf Zellen nach vorausgegangener Aktivierung.

Da IL-2 vornehmlich von CD 4+ Zellen sezerniert wird und umgebende T-Zellen zur Proliferation und Aktivierung anregt und somit eine Transformation von Zellen aus der G0- in die G1-Phase des Zellzyklus bewirkt wird [79], stellt dieses Zytokin eine Verbindung zwischen CD 4+ und CD 8+ Zellen und somit zwischen indirektem und direktem Weg dar.

1.3.2 Die MHC-Moleküle: Haupthistokompatibilitätsantigene (HLA)

Die Haupthistokompatibilitätsantigene oder auch humanen Leukozytenantigene (HLA) sind die Hauptziele alloreaktiver T-Zellen. T-Zellen erkennen Fremdantigene und werden dadurch aktiviert. Hauptfunktion der Histokompatibilitätsantigene ist die Präsentation von Peptiden. Sie läuft intrazellulär auf zwei unterschiedlichen Wegen ab und ist davon abhängig, ob es sich um endogene oder um exogen gespleiste Proteinabkömmlinge handelt [131]. Die drei Hauptklassen von MHC-Molekülen sind bekannt. HLA Klasse I Moleküle interagieren mit CD 8+ Zellen durch Präsentation von endogenen Antigenen, während HLA Klasse II Moleküle, mit exogenen Antigenen beladen, für die CD 4+ Zellaktivierung zuständig sind. Innerhalb der HLA II Genregion werden auch Transportproteine kodiert. Sie sind für die Antigenpräsentation notwendig.

Zu der evolutionsbiologisch ältesten MHC-Klasse zählen das Hitzeschockprotein (heat shock protein), auch bezeichnet als HSP 70 [131], der Tumor Nekrose Faktor (TNF) und die Komplementproteine. Diese heterogene Gruppe wird auch als HLA-Klasse III Proteine zusammengefasst.

Genetisch lokalisiert ist die HLA-Region auf dem kurzen Arm des Chromosom 6. Alle drei Genregionen für HLA I, II und III liegen eng nebeneinander, sind multigen, multiallel und zeichnen sich durch einen hohen Polymorphismus aus. Sie werden nach den Mendelschen Gesetzen kodominant vererbt [32].

Zwei unterschiedliche Mechanismen tragen zur immunogenetischen Variabilität bei. Zum einen die molekulare Diversität des Individuums durch Genrearrangement, zum anderen die durch die Vererbung entstehenden Polimorphismen innerhalb der Population. Dadurch entsteht eine Variabilität, bezogen auf das Individuum und die Population, von je circa 10^9 [131]. Die dargestellte Komplexität der MHC-Gene ist von großer funktioneller Bedeutung. Sie gewährleistet eine große interindividuelle Verschiedenheit durch Heterogenität und somit eine Unterscheidung zwischen autolog (selbst) und allogene (fremd), die dem Schutz des Individuums dient. Allerdings ist die Existenz interindividuell unterschiedlicher Gewebemerkmale auch als Ursache für die Entstehung von schweren Nebenwirkungen wie GVHR, GVHD und der

Abstoßungsreaktion im Rahmen der Transplantation von immunkompetenten Zellen zu sehen.

Zur Unterdrückung dieser Allogenität, die einer physiologischen Immunreaktion entspricht, müssen unterschiedliche Maßnahmen vor, während und nach Transplantation ergriffen werden.

1.3.2.1 HLA I

Zur HLA-Klasse I gehören die HLA A, -B und -C Moleküle.

Kernhaltige Zellen exprimieren in etwa eine halbe Million HLA-Klasse I Moleküle [165] und präsentieren 10^4 verschiedene Peptide [166]. So ist sichergestellt, dass jedes einzelne in der Zelle prozessierte Protein als Peptid innerhalb des MHC-Komplexes präsentiert wird. Jedoch wird nicht jedes Peptid zu jeder Zeit in gleicher Anzahl an der Oberfläche der jeweiligen Zelle gebunden.

Die Anzahl der HLA I Peptidkomplexe ist von vier Faktoren abhängig:

1. Dynamischer Zustand des Proteins innerhalb der Zelle

Dieser hängt von der Anzahl an synthetisiertem Protein ab, da in großer Anzahl vorhandene Proteine eine große Anzahl an Peptidfragmenten zur Folge haben. Des Weiteren spielt die intrazelluläre Proteindegradationsrate eine Rolle [18]. Die Spaltung von Proteinen generiert auf direktem Weg HLA Liganden; hohe Spaltungsraten liefern viele gleiche HLA-Peptidkomplexe.

2. Aktivität und Spezifität der Proteosomen

Proteosomen sind im Zytosol befindliche Multiproteinkomplexe, die für die Abspaltung von Peptiden und somit für die Generierung von Peptidliganden für MHC I Moleküle und den korrekten C-Terminus für CTL Epitope verantwortlich sind. Die Effektivität dieses Proteasekomplexes variiert. Vorzugsweise werden Peptide am C-terminalen Ende von basischen, sauren und hydrophoben Resten gespalten. Wird die Zelle dem Zytokin IFN-gamma ausgesetzt, werden die katalytisch aktiven Untereinheiten durch drei durch IFN-gamma induzierbare ersetzt. Dies führt zu einer Verschiebung der Spezifität der Aufspaltung in Richtung hydrophober Aminosäuren, während saure Aminosäuren in geringerem Maße abgespalten werden [176].

3. Intrazelluläre Bindung, Transport und Abspaltung

Damit die abgespaltenen Peptide in das endoplasmatische Retikulum gelangen und dort an die neu synthetisierten MHC-Moleküle gebunden werden können, müssen sie in gebundener Form vorliegen.

Die abgespaltenen Peptide werden mit Hilfe des Peptidtranslokators TAP [164] in das endoplasmatische Retikulum geschleust und treffen dort auf neu synthetisierte HLA-Klasse I Moleküle. Dieser Translokator hat eine geringe Spezifität [122], dennoch bevorzugt er bestimmte Peptidsequenzen. Eine Spleisung kann sowohl im Zytosol [161], für die Anpassung an den TAP-Translokator, oder intraendoplasmatisch [129], um eine optimale Struktur für die Bindung an das entsprechende HLA zu erzielen, erfolgen.

4. Bindung an HLA-Moleküle

Durch in vitro Bindungsstudien [123] konnten Affinitäten einzelner Peptide zu ihrem entsprechenden HLA-Pendant miteinander verglichen werden. Hoch affine Liganden binden noch auf nanomolarer Ebene, während Peptide mit geringer Affinität eine Konzentration im Mikromolarbereich erfordern. Die Präsentation von Peptiden wird durch bestimmte Peptideitmotive, die bestimmte Aminosäuresequenzen beinhalten, gesteuert [51]. Um auf der Oberfläche durch den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I präsentiert werden zu können, benötigen intrazelluläre Peptide zwei allelspezifische Kontaktaminosäuren, die so genannten "anchor residues" (Verankerungsreste). Das Gegenstück auf MHC-Seite wird als „specificity pocket“ (spezifische Bindungstasche) bezeichnet [151]. Dahinter verbergen sich besondere, aus Aminosäuren bestehende Bindungsstellen innerhalb der Peptidbindungsgrube des MHC-Moleküls. Dabei üben sowohl die Größe der Bindungstasche als auch die umgebenden Aminosäuren Einfluss auf die präferierte Bindung aus [166].

1.3.2.2 HLA II

Zur HLA Klasse II gehören die Untergruppen HLA DQ, -DR und -DP. Diese Moleküle sind vor allem auf für die Immunantwort zuständigen Zellen, zu denen die B-Lymphozyten und die Antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Monozyten, Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen [31] gehören,

exprimiert. Werden bestimmte Zytokine während der Aktivierungsphase von Lymphozyten oder Monozyten sezerniert, kommt es zu einer Zunahme von Klasse II Molekülen, und zwar auch auf Zellen, die diese unter normalen Bedingungen nur in geringer Anzahl oder gar nicht auf ihrer Oberfläche ausweisen.

Zur Feststellung, ob transplantierte Zellen eine GVHR auslösen können, sind neben HLA DR die beiden zur Klasse I gehörenden HLA A und -B Antigene am aussagekräftigsten [71], [10].

1.3.3 Die Nebenantigene (miHA)

Neben den Haupthistokompatibilitätsantigenen (MHC) spielen die Nebenantigene (miHA) bei der Fremdartigenerkennung und somit bei der Auslösung von GVHR, GVHD und Abstoßungsreaktion eine große Rolle. Diese Antigene sind Peptide des Empfängers, die von polymorphen multiallelen Proteinen abstammen, nicht zur Gruppe der MHC-Moleküle gehören, jedoch von diesen in ihrer Grube auf antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden. Durch MHC II präsentierte miHAs aktivieren CD 4+ Spender T-Zellen, während MHC-Klasse I gebundene Peptide eine CD 8+ vermittelte Zellantwort hervorrufen. Kodiert sind die miHAs nicht nur auf Autosomen, sondern auch auf den Sex-Chromosomen und in mitochondrialer DNA [59]. Minorantigene zeigen sich für das Auftreten von GVHR beziehungsweise GVHD im HLA-identischen System verantwortlich. Die Identifizierung dieser Strukturen erwies sich als schwierig. Klar war jedoch schon in frühen Studien am Mausmodell, dass reife Spender T-Zellen, sowohl CD 4+ als auch CD 8+, die gegen diese miHAs gerichtet sind, eine letale GVHD vermitteln können [88], [89]. Die Lokalisation der durch minore Antigene vermittelten GVHD ist abhängig von der Verteilung dieser im Gewebe. Während einige von ihnen ubiquitär im Organismus vorkommen, sind andere auf spezifische histologische Linien beschränkt [32]. Die Identifizierung von Nebenantigenen gelang durch Klonierung von T-Zellen aus dem Empfängerorganismus nach Transplantation, die eine Graft versus Host Erkrankung entwickelt hatten. Diese Zellen erlauben eine Charakterisierung HLA-Klasse I restriktierter miHAs. Ursprünglich wurden die

Peptide charakterisiert, indem sie von ihren Trägermolekülen befreit, durch Chromatographie aufgetrennt und durch Massenspektroskopie analysiert wurden [45], [46]. Auf diese Weise konnten die miHAs HA 1, HA 2 und HA 8 und ein für männliche Merkmalsträger spezifisches Minorantigen identifiziert werden, wobei HA 2 als erstes identifiziertes miHA gilt. Es wird durch das Hauptantigen HLA A2 restriktiert und gehört höchstwahrscheinlich zur Klasse I Myosinfamilie [59]. Eine weitere elegante Nachweismethode ist die Klonierung komplementärer DNA (cDNA), wobei messenger-RNA von miHA-positiven EBV-transformierten Lymphozyten isoliert und daraus eine cDNA-Genbibliothek erstellt wurde [22], [47]. Diese wiederum wurde mit der cDNA des restriktierten HLA-Moleküls kotransfiziert und in so genannte COS-1 Zellen überführt. Nach intrazellulärer Prozessierung und Präsentation des eingeschleusten Materials auf der Oberfläche der Wirtszelle wurden die für das jeweilige Antigen spezifischen zytotoxische Lymphozyten (CTL) aktiviert, diese Aktivierung durch TNF-alpha Produktion nachgewiesen und somit eine Charakterisierung des vormals eingeschleusten unbekanntes Minorantigens durch die entsprechenden T-Zellen ermöglicht. Durch dieses Verfahren gelang der Nachweis des HB-1 Nebenantigens.

Alle oben beschriebenen Verfahren dienen dem Nachweis MHC-Klasse I gebundener miHAs. Die Charakterisierung von durch Klasse II präsentierten Nebenantigenen stellte sich schwieriger dar. Deren Prozessierung beinhaltet verschiedene andere Moleküle, wobei sich neben der invarianten Kette, die für die Stabilität des HLA-Moleküls und den Transport des Peptids von großer Bedeutung ist, auch HLA DM für die Peptidprozessierung verantwortlich zeigt. Scott et al. [155] gelang es im Jahr 2000, das erste MHC-Klasse II assoziierte miHA zu identifizieren.

Es existiert eine Vielzahl an Nebenantigenen, welche und wie viele davon jedoch eine Rolle in der Ausbildung einer GVH-Reaktion oder Erkrankung beziehungsweise bei der Abstoßungsreaktion eine Rolle spielen, ist nicht geklärt. So scheint zum Beispiel das spezifisch für humane männliche Merkmalsträger charakteristische HY-Antigen für die Abstoßungsreaktion des Spenders gegenüber Transplantaten weiblichen Geschlechts verantwortlich zu

sein. Dabei konnte eine GVHR, durch HY vermittelt, jedoch nicht nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die Nebenantigenwirkung auch durch deren Lokalisation im Organismus beeinflusst wird. Diese Vermutung lassen auch verschiedene Mausmodelle zu. In diesen wurde gezeigt, dass die Fähigkeit immundominanter Nebenantigene zur CTL-Aktivierung nicht mit deren potentieller Fähigkeit zur Induktion einer GVHD korreliert [90], [17], [91]. Minorantigene scheinen nicht nur eine Rolle bei der Vermittlung von GVHR und GVHD, sondern zusätzlich auch an der Induktion von immunologischer Toleranz beteiligt zu sein, wenn CD 8+ Zellen ohne Hilfe von CD 4+ Zellen diese erkennen. Antoniou et al. [6] zeigten am transgenen Mausmodell, dass zytotoxische T-Zellen alleine nicht in der Lage sind, nach Kontakt mit einem spezifischen Tumorantigen eine adäquate Immunantwort hervorzubringen. Vielmehr wurde eine Toleranz gegenüber diesem Antigen beobachtet.

1.3.4 Die Graft versus Host Reaktion (GVHR)

Bei der Graft versus Host Reaktion, wie auch der Abstoßungsreaktion, handelt es sich um eine Fremdreaktion von aktivierten, immunkompetenten Zellen des Abwehrsystems. Diese, auch als allogene Reaktion bezeichnet, gilt als T-Zell vermittelt und ist gegen fremde HLA-Moleküle [125], [119] und Nebenantigene [130] gerichtet.

Die GVHD ist das direkte Ergebnis einer der Hauptfunktionen des Immunsystems, nämlich der Unterscheidung zwischen Selbst und nicht Selbst [32]. Werden T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert, werden ihnen also Fremdartigene präsentiert, die an spezifische MHC I (für CD 8+ T-Zellen) oder MHC II (für die CD 4+ Zellaktivierung) Moleküle gebunden sind, kommt es zu einer T-Helfer- beziehungsweise zu einer zytotoxischen T-Zell-spezifischen Antwort. Sie proliferieren und schütten spezifische Zytokine aus, die entweder andere Zellen aktivieren oder, wie bei CD 8+ zytotoxischen Zellen, direkt die befallene Zelle lysieren. Im Falle der GVHR kommt es zu lokalen Gewebsreaktionen, und zwar in allen Geweben und Organen, die mit diesem von Spender T-Zellen als fremd erkannten Histokompatibilitätsantigenen ausgestattet sind. Dazu gehören die Haut und Schleimhaut sowie Zellen des

hämatopoetischen Systems und die Leber. Kommt es zu pathologischen Veränderungen an diesen Organen, spricht man von einer Graft versus Host Krankheit (GVHD). Sie wird je nach klinischem Bild und Ausmaß in unterschiedliche Stadien eingeteilt. [31], [170]. Außerdem unterscheidet man je nach Ausbreitungszeitpunkt und Dauer der Erkrankung eine akute von einer chronischen GVHD.

Für die Entstehung einer GVHR bedarf es zwingend eines Transfers von genetisch disparaten Spender T-Zellen in den zur Abstoßung dieser Zellen nicht befähigten Empfängerorganismus [31], [16].

Bereits im Jahr 1966 stellte Billingham [16] in seinem als Harvey Rede bezeichnetem Vortrag die drei Faktoren vor, die für das Auftreten einer GVHR verantwortlich sind. Seiner Harvey Rede zu folge bedarf es einer ausreichenden Anzahl an immunologisch kompetenten Zellen im Transplantat. Darüber hinaus forderte er vom Empfänger wichtige Transplantationsisoantigene, die das Transplantat nicht aufweist, sodass der Empfänger dem Transplantat fremd erscheint und so Spenderzellen stimulieren kann. Als dritte notwendige Voraussetzung nannte Billingham die Unfähigkeit des Empfängerorganismus, eine effektive Immunantwort gegen das Transplantat aufzubauen.

Die Graft versus Host Erkrankung stellt einen der Haupt-, wenn nicht sogar den Hauptrisikofaktor nach allogener Stammzelltransplantation dar [32].

Die drei wichtigsten HLA-Merkmale zur Prognostizierung des Schweregrads einer durch Spenderzellen initiierten GVHR sind HLA A, -B und -DR [71], [10]. Wurden in den HLA-Merkmalen übereinstimmende Spenderzellen transplantiert, konnte ein verbessertes Anwachsen und eine verminderte Schwere der GVHD beobachtet werden [109]. Allerdings konnte ein Auftreten der GVH nicht gänzlich verhindert werden, da eine Übereinstimmung in den Minorantigenen (miHAs) unterblieb.

1.3.5 Die Host versus Graft Reaktion: Abstoßungsreaktion

Das Nichtanwachsen transplantiertener immunkompetenter Spenderzellen im Empfängerorganismus wird auch als Abstoßungsreaktion bezeichnet. Sie kann akut, subakut oder nach einer Latenzzeit auftreten. Diese letztgenannte Form

der chronischen Abstoßungsreaktion spielt vor allem eine große Rolle in der Transplantation von soliden Organen wie Leber, Niere und Herz. Die Ursache für diesen im Empfängerorganismus ablaufenden Prozess war Gegenstand einiger Arbeiten. Schon längere Zeit war vermutet worden, dass die akute Transplantatabstoßung *in vivo* mit der Reaktion *in vitro*, der Lymphozytenmischkultur (MLC), korreliert. Ein tatsächlicher Beweis für diese Vermutung gelang jedoch erst durch die Arbeit von Pietra et al. [132], die zeigte, dass in Mäusen, die keine CD 8+ Zellen besaßen, MHC II exprimierende Herztransplantate abgestoßen wurden. Somit mussten CD 4+ T-Zellen mit direkter Allospezifität für die Abstoßungsreaktion verantwortlich sein.

Aber auch die indirekte allogene Reaktion spielt bei der Abstoßungsreaktion eine Rolle. Auchincloss et al. [8] zeigten dies im Jahr 1993 an Mäusen. Empfängerindividuen, die ohne MHC-Klasse I Moleküle ausgestattet waren (so genannte MHC class I knock out Mäuse) stießen Hauttransplantate ab, die keine MHC-Klasse II Oberflächenantigene aufwiesen. Der Empfängerorganismus besaß keine CD 8+ zytotoxischen T-Zellen. Dennoch trat eine allogene Stimulation und eine entsprechende Reaktion auf. Dies gelang durch indirekte Stimulation der im Organismus lokalisierten CD 4+ Zellen, und zwar durch Prozessierung und Präsentation von HLA-Klasse I Molekülen des Spenders innerhalb des autologen MHC II Komplexes des Empfängers. Eine Reihe weiterer Experimente bestätigten diese Ergebnisse. In einer Versuchsreihe wurde am murinen allogenen Hauttransplantatmodell demonstriert, dass der indirekte Pfad in Abwesenheit des direkten Weges ausreicht, um eine effiziente Abstoßungsreaktion hervorzurufen [54].

Die direkte Alloerkennung scheint eher für die akute Abstoßungsreaktion verantwortlich zu sein. So zeigte sich, dass die Frequenz der gegen transplantierte Gewebe gerichteten Immunzellen mit der Anzahl der Tage nach Transplantation abnimmt [78]. Ein Vergleich von CD 45RO, also Memory T-Zellen, mit CD 45RA, den so genannten naiven T-Zellen, vier Monate nach Nierentransplantation zeigte einen signifikanten Abfall der RO Fraktion, nicht jedoch der RA Fraktion post transplantationem [12]. Somit kam

es im Laufe der Zeit, induziert durch allogenes Parenchym, zu einer Verminderung der Immunantwort.

Für die indirekte Erkennung verantwortliche Zellen bewirken eher chronische Verläufe der Abstoßungsreaktion. Beispielhaft kann hier die Arbeit von Womer aus dem Jahr 2000 [190] herangezogen werden. Sie wies bei Patienten mit klinischen Zeichen einer chronischen Abstoßungsreaktion eine deutlich erhöhte Frequenz an für die indirekte allogene Reaktion verantwortlichen T-Zellen nach, während sich bei Patienten ohne chronische Reaktion Normwerte zeigten.

1.4 Prävention

Zur Vermeidung der oben ausführlich beschriebenen Komplikationen einer Knochenmarktransplantation werden verschiedene therapeutische Maßnahmen vor, während und nach Transplantation sowohl beim Transplantat als auch beim Empfänger eingesetzt. Ziel ist eine optimale Verträglichkeit bei möglichst schneller Immunrestitution ohne GVH und unter Eliminierung aller Tumorzellen zur Verhinderung eines Rezidivs. Im Folgenden werden diese klinischen Maßnahmen näher erläutert.

1.4.1 Matching

Die Suche nach einem geeigneten Spender von Stammzellen zur Therapie maligner und nicht maligner Erkrankungen gestaltet sich in vielen Fällen schwierig, vor allem dann, wenn eine 100prozentige Übereinstimmung im HLA-Genlocus von Spender und Empfänger gefordert wird. Dieser Vorgang, auch als „matching“ bezeichnet, dient der Prävention von allogenen T-Zell Reaktionen im Spenderorganismus. Je höher die Übereinstimmung im MHC-System, hier sind vor allem die HLA A, -B und -DR Moleküle von Bedeutung, desto geringer die Wahrscheinlichkeit des Auftretens unerwünschter Immunreaktionen wie GVHR beziehungsweise GVHD und Abstoßungsreaktion [71], [10].

1.4.2 Die CD 34+ Stammzellenanreicherung

Eine alternative Möglichkeit zur konventionellen übereinstimmenden Transplantation liegt in der haploidentischen HSCT. Spender und Empfänger zeigen ein beziehungsweise zwei so genannte „mismatches“, sie stimmen in einem gewissen Teil des HLA-Systems nicht überein. Möglich wird diese Art der Transplantation durch selektive Anreicherung von hämatopoetischen Stammzellen im Transplantat unter gleichzeitiger Eliminierung alloreaktiver Spender T-Zellen, was auch als „purging“ bezeichnet wird. CD 34 positive Zellen werden durch Wachstumsfaktorgabe aus dem Knochenmark mobilisiert und können durch Leukapherese abgesammelt werden.

CD 34+ Knochenmarkstammzellen gelten als Vorläuferzellen des gesamten lymphohämatopoetischen Zellsystems [13]. Wurden Patienten nach myeloablativer Therapie autologe CD 34+ Stammzellen reinfundiert, konnte eine hämatopoetische Rekonstitution beobachtet werden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese Stammzellen eine langfristige dauerhafte vom Spender ausgehende lymphohämatopoetische Regeneration ermöglichen. Knochenmarkstammzellen haben die Potenz zur Selbsterneuerung. Darüber hinaus sind sie auch zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien befähigt. Sie genügen somit den Ansprüchen, die an eine Stammzelle gestellt werden [92].

Entdeckt wurde die CD 34 positive Immunzelle, deren Anteil an der Gesamtzahl der Knochenmarkszellen circa 1,5 Prozent beträgt [92] und die deshalb in konzentrierter Form verabreicht werden sollte, im Jahr 1984 von Civin et al. [34]. Es sollten Antikörper entwickelt werden, die selektiv kleine Untergruppen von Knochenmarkszellen erkennen, ohne dass diese eine Bindung mit reifen Blutzellen oder Zellen des lymphatischen Systems eingehen [34].

Der erste derartige Antikörper, My10, war ein Produkt eines Hybridomas, einer Hybrid-Myelom Zelle, die aus einer Maus, die zuvor mit einer bestimmten Myelomzelllinie (KG1a myeloische Leukämiezelllinie) immunisiert worden war, generiert wurde.

1.4.3 Die Konditionierungstherapie

Bei nichtidentischen Transplantationen muss eine alloreaktive Reaktion vermieden werden. Diese kann immer dann auftreten, wenn Spender und Empfänger im HLA-System oder in den minor Antigenen nicht zu einhundert Prozent übereinstimmen. Diese Voraussetzung ist nur im seltenen Fall einer Spende zwischen identischen Individuen, also zwischen monozygoten Zwillingen, der Fall [35]. In allen anderen Fällen bedarf es einer immunsuppressiven Therapie des Patienten pre transplantationem. Folgendes Protokoll wird an der Universitätskinderklinik in Tübingen aktuell im Rahmen einer haploidentischen Megadosistransplantation am Patienten angewendet (Stand: Februar 2004): Ganzkörperbestrahlung (2 x 6Gy), Fludarabine (4 x 40mg/Körperoberfläche in m²), VP-16 (60mg/kg) bei ALL zusätzlich Applikation von ATG Fresenius (3 x 20mg/kg).

Das in früheren Konditionierungsprotokollen verwendete G-CSF wird auf Grund seiner nachgewiesenen immunsuppressiven Wirkung nicht mehr appliziert. Es trug durch Erhöhung des auf Th1 Zellen inhibitorisch wirkenden IL-10 zur verzögerten Entwicklung der antigenspezifischen Immunität bei [184].

Auf eine Immunsuppression nach Transplantation wird gänzlich verzichtet.

1.4.4 Supportive Maßnahmen

Zur Keimabschirmung während und nach Transplantation werden die Patienten an der Universitätskinderklinik Tübingen in speziellen, mit einem laminaren Luftstrom ausgestatteten Räumen behandelt. Als weitere antiinfektiöse Prophylaxe werden allen Patienten neben Aciclovir und Fluconazol, beides Antifungizide, auch die beiden Antibiotika Cotrimoxazol, zur Verhinderung einer Pneumocystis carinii Infektion, und Metronidazol verabreicht. Immunglobulin wird bis zum Tag 100 nach Transplantation einmal wöchentlich, danach bis zum Tag 200 alle drei Wochen verabreicht. CMV-IgG positive Merkmalsträger oder Patienten mit CMV-positivem Spender erhalten eine Hochdosisaciclovirtherapie. Seit 2002 wird auch eine mögliche Adenovirusinfektion schon im Voraus durch Ribavirin zu verhindern versucht. Schlägt eine Triple-Antibiotikatherapie bei Fieber unklarer Genese nicht an, so

wird Ambisome appliziert. Wöchentliche Laboruntersuchungen mittels PCR auf CMV, HSV, HHV 6 und EBV werden zur frühzeitigen Erkennung von Infektionen durchgeführt. ADV wird im Stuhl und bei positivem Befund auch im Blut nachgewiesen. Nach positivem viralem Befund wird eine sofortige antivirale Therapie eingeleitet [93].

1.5 Immunologische Toleranz

Die immunologische Toleranz ist für eine erfolgreiche Transplantation essentiell notwendig. Eine immunologische Toleranz auf Seiten der Transplantatzellen verhindert eine GVHR beziehungsweise konsekutiv eine GVRD, entsprechend ausgestattete Empfängerzellen verhindern eine Abstoßungsreaktion. Die immunologische Toleranz stellt demzufolge die Abwesenheit von Alloreaktivität und somit das Nichtvorhandensein eines immunologischen Angriffs dar.

1.5.1 CD 4+/CD 25+ T-Zellen

Eine spezielle Untergruppe, die CD 4+/CD 25+ Zellen treten mehr und mehr als so genannte regulatorische T-Zellen hervor [145]. So lieferten Versuche am Mausmodell Erkenntnisse über deren immunsuppressorische Wirksamkeit in vivo, wobei die Entfernung doppelt positiver T-Zellen eine hohe Spontanrate autoimmunologischer Krankheiten bewirkte [59].

1.5.2 Der Graft versus Leukemia Effekt (GVL Effekt)

Der Graft versus Leukemia Effekt beschreibt die potentielle Wirkung transplanteder Immunzellen mit antileukämischer Eigenschaft. Durch diesen Effekt wird den Zellen im Transplantat eine direkte Wirkung gegen im Empfängerorganismus trotz Konditionierungstherapie nicht eradizierte verbliebene Tumorzellen zugeschrieben. Welche Zelluntergruppen sich dafür verantwortlich zeigen, ist Gegenstand intensivster Forschung.

Ging man in früherer Zeit davon aus, dass ein Graft versus Leukemia Effekt vor allem in Verbindung mit einer GVHR auftreten kann [188], [189], [140], weil durch die selben Subpopulationen vermittelt, so gewann man in neuerer Zeit immer deutlichere Erkenntnisse, dass diese beiden in ihrer Wirkung konträren

Mechanismen durch divergente Zellpopulationen vermittelt werden und somit einer gezielten Therapie zugänglich sind [118]. Zu beachten ist, dass die Korrelation von GVHD und GVL vornehmlich bei nicht T-Zell depletierten Transplantaten zu beobachten war und ist. Beinhaltet das Aphereseprodukt keine T-Zellen, so reduziert sich die Frequenz beider Effekte deutlich [58].

Ein experimenteller Ansatz, um eine Toleranz und somit ein verbessertes Überleben des Transplantats zu erzielen, liegt in der Administration von Spender MHC-Peptiden. Dabei wird die Toleranzinduktion über die indirekte Alloreaktion angestrebt. Im Vergleich zeigten Tiere, denen diese Fremdpeptide vor der eigentlichen Transplantation entweder durch intrathymische Gabe [152], durch orale Applikation [193] oder durch Peptid gepulste antigenpräsentierende Zellen des Empfängers [124] appliziert wurden, ein deutlich längeres Überleben des Transplantats im Organismus. Letztere Methode, die Präsentation von Fremdpeptid auf autologen APCs nämlich, beweist, dass diese beschriebene Toleranzinduktion auf indirektem alloreaktivem Weg abläuft.

Andere Ansätze, eine GVL ohne GVHR zu erzielen, liegen in der Bestimmung einzelner, doppelt positiver CD 4+/CD 25+ Zellklone mit antileukämischer Eigenschaft. Michalek et al. [118] postulierten 2003 die Existenz von drei unterschiedlichen CD 4+ Zellklonen. Einen alloreaktiven, einen antileukämischen und einen, der beide Eigenschaften besitzt. Die drei Zellgruppen unterschieden sich auf Grund divergenter TCR β CDR3 Sequenzen.

1.6 Die Donor Lymphozyten Infusion (DLI) als Adoptive Immuntherapie

Um der verzögerten Immunrekonstitution, einer der Hauptkomplikationen nach HSCT, entgegenzuwirken, werden gezielt Spender T-Zellen eingesetzt. Werden diese, zuvor auf ihre Nichtallogenität überprüft, in definierter Zellzahl appliziert, können die positiven T-Zelleigenschaften im Rahmen einer so genannten adoptiven Immuntherapie ausgenutzt werden. Angestrebt wird neben einem antileukämischen und antipathogenen Effekt auch die Konversion in einen vollständigen Chimärismus und somit die Verhinderung eines Rezidivs.

Letzteres zeigt die Etablierung des Spendersystems im Empfänger an. Bisher sind die Einsatzmöglichkeiten und die Effektivität einer DLI (Donor Lymphozyten Infusion), vor allem auf Grund der noch nicht vollständig eliminierten Gefahr einer spenderzellvermittelten GVHR, limitiert [15]. Einige Studien neuerer Zeit zeigen jedoch deutliche positive Effekte [49], [107]. Spenderlymphozyten werden, unter Vorbehalt der potentiellen Gefahr der Alloreaktivität, als effiziente Therapieoption gehandelt, weil sie (i) nicht durch immunsuppressive Medikamente beeinträchtigt werden und sie (ii) noch nicht durch den „Immune escape“ Mechanismus, durch den ein Rezidiv vermittelt wird, inaktiviert wurden [160]. Eine Immunsuppression ist deshalb nicht notwendig, weil die in der DLI enthaltenen Spender T-Zellen als autolog vom im Empfänger etablierten neuen Immunsystem angesehen werden. Am Beispiel der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) bewies sich die DLI als bemerkenswert effektive Methode zur Behandlung eines Rezidivs nach initialer, durch Knochenmarktransplantation erzielter Remission. Je früher nach Transplantation behandelt wurde, desto bessere Ergebnisse wurden erreicht [42]. Im Vergleich zur Einmalgabe hoher T-Zelldosen wird zunehmend eine Mehrfachgabe mit steigenden Zellgaben favorisiert. Bei vergleichbaren Therapieergebnissen zeigten Dazzi et al. [43], dass in der Gruppe der Patienten, die mehrfache DLI Gaben erhielten, deutlich weniger akute und chronische GVHD auftrat.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Unter haploidentischen HSCT Bedingungen gelingt es durch T-Zell depletierte Transplantate, das Auftreten einer GVHR beziehungsweise einer GVHD signifikant zu reduzieren. Ein großer Nachteil dieser Depletion von immunkompetenten T-Zellen und deshalb häufige Ursache von Morbidität und Mortalität stellt nach Transplantation die immuninkompetente Phase bis zum Anwachsen des Transplantats, das heißt bis zur Synthese von T-Zellen im Empfänger, dar. In dieser Zeit kommen gehäuft schwere opportunistische Infektionen vor, wie etwa die CMV-Infektion oder deren Reaktivierung und die Aspergillus fumigatus Pneumonie, deren Gemeinsamkeit die schwere

Behandelbarkeit darstellt. Eine Therapieoption ist neben der Umkehrisolation und der prophylaktischen Gabe diverser Chemotherapeutika, die allerdings mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen, zum Teil myelotoxischer Natur, behaftet ist, die Applikation immunkompetenter T-Zellen des Spenders. Sie sollen den Zeitraum der Immuninkompetenz des Patienten überbrücken.

An diese T-Zellen sind spezifische Forderungen zu stellen. Zum einen sollten sie den Empfänger vor Infektionen viraler, bakterieller und toxischer Art schützen und entsprechende Immunreaktionen im Patientenorganismus auslösen. Zum anderen sollten sie durch eventuell verbliebene leukämische Zellen, wie Tumorblasten, aktiviert werden können, diese eradizieren und so ihre antileukämische Eigenschaft unter Beweis stellen. Darüber hinaus darf von ihnen jedoch keinerlei allogene Potenz ausgehen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten immunkompetente T-Zellpopulationen zur adoptiven Immuntherapie generiert werden. Hierbei sollten Vorarbeiten *in vitro* zur Generierung von nicht-alloreaktiven T-Zellen mit antiinfektiöser Potenz [138] zuerst an freiwilligen Probanden unter Zuhilfenahme verschiedener Nachweisverfahren bestätigt, an ein klinisches System angepasst und in einem dritten Schritt an pädiatrischen Patienten und deren haploidentischen Spendern *in vitro* nachvollzogen werden.

Ein weiteres viel beachtetes Thema in der Immunologie stellen die unterschiedlichen Nachweisverfahren dar. Ein seit langer Zeit etabliertes System für den Nachweis aktivierter T-Zellpopulationen stellt der Proliferationsassay mittels radioaktiv markiertem Thymidin ([^3H -Thymidin Proliferationsassay) dar. Das Isotope Material wird in das Genom in die durch Proliferation neu entstandenen T-Zellen eingebaut, anschließend in Counts (Anzahl der gemessenen Ausschläge) pro Minute dargestellt und dadurch der Grad der Zellaktivierung ermittelt. Ein großer Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass keine quantitative Aussage, das heißt keine Aussage über absolute Zellzahlen, getroffen werden kann. Differenziertere Aussagen, zum

Beispiel über Eigenschaften diverser Subpopulationen und deren Aktivitätszustand, sind ebenfalls nicht möglich.

Reichert man proliferierende Zellen mit BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridin) an, das ins Genom an Stelle von Thymidin eingebaut wird, und markiert man dieses Thymidinanalogon anschließend mit einem entsprechenden FACS-Antikörper, können quantitative Aussagen auf Einzelzellebene getroffen werden. Darüber hinaus kann der Aktivitätsgrad verschiedener Untergruppen, wie CD 4+ oder CD 8+ Zellen, und in Kombination weitere Aktivitätsmarker beziehungsweise deren Zytokinproduktion dargestellt werden. Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollte dieser quantitative Test auf seine Aussagekräftigkeit gegenüber dem altbewährten [^3H] Thymidin Proliferationsassay untersucht und bei entsprechender Korrelation der Ergebnisse als gleichwertiger Test etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Technische Geräte, Materialien und Reagenzien

Sterile Werkbank *Hera Safe*

Heraeus Instruments GmbH, Hanau

CO₂ Begasungsbrutschrank *Hera cell*

Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Zweigniederlassung Stuttgart

Laborzentrifuge *Rotixa 50 RS*

Hettich, Tuttlingen

Drehschüttler

Snijders

Vortexer *VF 2*

Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik

Magnetischer Zellseparator *CliniMACS®* und dazugehörige Software

CliniMACS^{plus}

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

Bestrahlungsanlage *GammaCell 1000 Elite CEO120* (22 x 10¹²Bq 607 Ci, Caesium 137)

MDS Nordion, Science Advancing Health, Ontario, Kanada

Durchflußzytometer *FACSCalibur*

Becton Dickinson, Heidelberg

Computergesteuertes Elispot-Messgerät *A.EL.VIS 3.2, automated elisa-spot assay video analysis systems®* sowie

Software *Eli.analyse*

A.EL.VIS GmbH, Hannover

Automatisches Zellzählgerät *ADVIA 120*

Bayer, Leverkusen

Lichtmikroskope *Olympus CX40LF200* und *Olympus IX50*

Olympus, Japan

Zellkulturmikroskop *Olympus IM*

Olympus, Japan

Trypanblau *Trypan blue solution 0,4%*

Sigma, Chemical Co., Deisenhofen

Neubauer Zählkammer *Neubauer improved Assistent-Bright Line*

Kästner, München

Wasserbad *WB 22*

Memmert, Schwabach

Pipettiergerät *Pipettboy plus*

Integra Bioscience, Schweiz

Pipettierhilfe bis 200 μ l *Pipetman*

Gilson, SA.Villiers-le-Bel, Frankreich

Transferpipette *Transferpipette-8, 20-200 μ l*

Brand, Wertheim

Pipettenspitzen *10 μ l, 100 μ l und 1000 μ l*

Eppendorf, Hamburg und Gilson SA.Villiers-le-Bel, Frankreich

Sterile Plastikpipetten *2-25 ml*

Greiner, Sollingen/Frickenhausen

Plastikröhrchen *14ml und 50ml*

Greiner, Sollingen/Frickenhausen

Reaktionsgefäß *1,5 ml*
Eppendorf, Hamburg

Einfrierröhrchen *1,8ml*
Nunc, Wiesbaden

PBS DULBECO`S *Phosphat-gepufferte Saline (nach Sörensen) einfach konzentriert ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}*
GIBCO BRL, Eggenstein

BSA *Bovines Serum Albumin 30 %*
Sigma, Deisenhofen

HSA *Humanes Serumalbumin 20 %*
Blutspendedienst Baden-Württemberg

AB-Serum *Humanes Serum* gepoolt aus männlichen Spendern der Blutgruppe AB
Blutbank der Universität Tübingen und
Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Seinheim

EDTA-Puffer *0,20 Mol/l, Ethylendiamintetraessigsäure*
Universitätsapotheke Tübingen

2.1.2 Materialien und Reagenzien für die Zellseparation

Entnahmesystem *Butterfly-21*
Abbott, Irland

Einmal-Injektionskanüle *Mikrolance 3*
Becton Dickinson Fraga, Espana

Einmal-Injektionskanüle *Braun Sterican*
B. Mehlungen AG, Melsungen

Einmalspritze *1ml, 2ml, 5ml, 20ml*

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Heparin-Natrium *Liquemin® N 5 ml*

Roche, Grenzach Whylen

Kombi Stopper

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Ficoll *Biocoll Separating Solution*

Biochrom AG, Berlin

2.1.3 Material und Reagenzien für die Zellkultur

Polystyrenkulturflaschen steril

Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA

Sechs-Loch-Kulturplatten flach, steril

Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA

Zellrechen *Cellscraper*

Costar, Corning NY, USA

Zellkulturmedium *X VIVO 15*

BioWhittaker, Maryland, USA

2.1.3.1 Zusätze zum Kulturmedium

Serum

Humanes Serum Typ AB

Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Seinheim und

Blutbank der Universitätsklinik Tübingen

2.1.3.2 Zusammensetzung des Kulturmediums

X-VIVO-15 (BioWhittaker, Maryland, USA) mit

10 % *hAB-Serum* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinsheim beziehungsweise

Blutbank Tübingen), hitzeinaktiviert

2.1.3.3 Einfriermedium

50ml HSA *Humanes Serumalbumin 5 %*

Blutspendedienst Baden-Württemberg

V/V20 %

DMSO *KryoShure-Dimethylsulfoxid*

WAK-CM

Das Einfriermedium (20 % DMSO in auf Eis gestelltes HSA) wurde in 14ml Plastikröhrchen (Greiner, Sollingen/Frickenhäusen) aliquoutiert, bei -20°C gelagert und portionsweise verwendet. Reste wurden verworfen.

2.1.3.4 Wachstumsfaktoren und Antigene

Alle eingesetzten Wachstumsfaktoren sind rekombinant human.

Interleukin 4 (IL-4), *Herstellerkonzentration 10µg/ml*

R&D Systems Inc., Minneapolis, USA

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor (GM-CSF)

Leucomax

Herstellerkonzentration 50µg/ml

Novartis Pharma, Österreich

Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) *Herstellerkonzentration 10µg/ml*

R&D Systems Inc., Minneapolis, USA

Interferon gamma (IFN- γ) *Herstellerkonzentration 10µg/ml*

R&D Systems Inc., Minneapolis, USA

Phythämaglutinin (PHA M) *Herstellerkonzentration 1µg/ml*

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim

Staphylokokkus Enterotoxin B *SEB*

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Die Stammlösung (0,5mg SEB/ml PBS) wurde bei 4°C gelagert.

Zytomegalievirus Antigen (CMV-Ag) und Zytomegalievirus Kontrolle (CMV-K)

In 1ml X Vivo 15

Dade Behring Marburg GmbH, Marburg

Adenovirus Group und Adenovirus Kontrolle

In 1ml X Vivo 15

Bio Whittaker, Maryland, USA

Tetanus-Toxoid ohne Konservierungsstoffe

Herstellerkonzentration 4300Lf/ml

Stammlösung verdünnt 1: 40

Chiron Behring GmbH und Co., Marburg

Aspergillus fumigatus

Hyphen: *Aspergillus fumigatus* Hyphen aus 1×10^6 Conidien/ml in einer Konzentration von 1×10^6 Hyphen/ml.

Freundlicherweise überlassen von Dr. Hebarth, Medizinische Universitätsklinik Tübingen

Aspergillus fumigatus

ASPppsap: Überstand aus auf Saproaggar gewachsenen *Aspergillus fumigatus*, in 70 % Alkohol gefällt.

Freundlicherweise überlassen von Dr. Hebarth, Medizinische Universitätsklinik Tübingen

Die Wachstumsfaktoren wurden aliquotiert und in entsprechend großen Aliquots bei minus 20°C gelagert. Um einem Aktivitätsverlust der Wachstumsfaktoren vorzubeugen wurden Restbestandteile der einmal aufgetauten Aliquots verworfen.

CD 3/CD 28 Expansionsbeads *Dynabeads*®

4×10^6 Polystyrene Kugeln/ml mit monoklonalen Antikörpern gegen CD 3 und CD 28 in PBS V/V 0,1 % HSA

Dynal Biotech, Hamburg

2.1.4 Material zur selektiven Zellseparation auf Basis der Magnet-aktivierten Zellseparation (MACS) am CliniMACS®

2.1.4.1 Maus-konjugierte Super-paramagnetische MicroBeads

Tabelle 1:

Verwendete maus-konjugierte Super-paramagnetische MicroBeads zur selektiven Zellseparation (MACS)

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller
CD 25	Anti-IL-2R	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Rat anti Mouse IgG1	RαM IgG1	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
HLA DR	MHC II Antigen	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach

CD 69 pure Antikörper *Leu-23*: Nicht fluoreszierender Antikörper für die selektive Zellseparation (MACS) am CliniMACS®

Becton Dickinson, CA, USA

2.1.4.2 Weitere Materialien zur magnetisch aktivierten Zellseparation

Waschpuffer für MACS:

500ml PBS (*PBS DULBECO`S*, GIBCO BRL, Eggenstein) + 10ml HSA 20% (*Humanes Serum Albumin Typ A/B*, Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Seinheim und Blutbank der Universitätsklinik Tübingen)

Tubing Set *Mini Macs Tubing Set 150*

Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach

MACS-Puffer *CliniMacs PBS/EDTA Puffer 1000 ml*

Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach

Einfrierbeutel *Cryocyte Freezing Container 250 ml*

Nexell, Irvine, CA, USA

Transferbeutel *Transfer Pack 400 ml*

Baxter Healthcare Corporation

Fenwal Division, IL, USA

Perfusor Spritze *Plastipak 50ml*

Becton Dickinson, Drogheda, Irland

Avon Kwill Filling Tube 5"

Avon, England

Verbindungsstern

Baxter S.A., Belgien

Kanüle *BD Microlance™3*

Becton Dickinson, Drogheda, Irland

Handabschweißgerät *Composeal Mobilea*

Fresenius HemoCare GmbH, Bad Homburg

2.1.5 Material und Reagenzien für die Durchflußzytometrie

2.1.5.1 Materialien, Puffer und Lösungen

FACS-Röhrchen *5ml Polystyren-Rundbodenröhrchen*

Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Natrium-Azid-FACS-Puffer

Zusammensetzung:

- 493,4 ml PBS
- 1,6 ml 0,1% BSA (Bovines Serumalbumin) (30%)
- 5 ml 0,1% Natrium-Azid (10%)

Pro FACS-Röhrchen wurden 10µl Puffer zugegeben

FACS Lysierungslösung *FACS Lysing Solution*

Becton Dickinson, Heidelberg

FACS Permeabilisierungslösung *FACS Permeabilizing Solution*

Becton Dickinson, Heidelberg

FACS Quantifizierungsbeads *TruCountBeads*

Becton Dickinson, Heidelberg

Paraformaldehydlösung (PBS DULBECO`S V/V 1% Paraformaldehyd)

Freundlicherweise überlassen von Frau Dr. Karin Schilbach,

Universitätskinderklinik Tübingen

Software:

CellQuest

Becton Dickinson, Heidelberg

Win MDI(1993-200), Version 2.8

Joseph Trotter

2.1.5.2 Allgemein benötigte Kontroll-Antikörper

Folgende in Tabelle 2 aufgeführte Antikörper wurden vor jeder durchflußzytometrischen Messung als Kontroll-Analysate eingesetzt.

Tabelle 2:

Als Kontrollanalyse eingesetzte FACS-Antikörper (Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg)

Antikörper	Subtyp	Bezeichnung	Markierung
Simultest™ Control IgG ₁ /IgG _{2a}	Klon X40 bzw. Klon X39	Monoklonale Mausantikörper der Subklassen IgG ₁ und IgG _{2a}	FITC und PE
Fastimmune™ IgG _{2a}	-	Monoklonale Mausantikörper der Subklassen IgG _{2a}	PE
Mouse IgG _{2a}	-	Monoklonale Mausantikörper der Subklassen IgG _{2a} Klon: G155-178	PerCP
Mouse IgG ₁	-	Monoklonale Mausantikörper der Subklassen IgG ₁ Klon: MOPC-21	APC

2.1.5.3 Antikörper zur Differenzierung von Zellpopulationen auf Grund unterschiedlicher Oberflächenmarker

Hersteller aller in nachfolgender Tabelle aufgeführten Antikörper: Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 3:

Antikörper zur Expressionsanalyse von Zellpopulationen (Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg)

Antikörper	Bezeichnung	Subtyp	Markierung
CD 3	Leu™ 4	Maus IgG ₁ , κ Klon: UCHT1	FITC, PE, PerCP, APC
CD 4	Leu™ 3a	Maus IgG ₁ , κ Klon: SK3	FITC, APC
CD 8	Leu™ 2a Lyt3	Maus IgG ₁ , κ Klon: HIT8a	FITC, APC
CD 25	IL-2R Tac Antigen	Maus IgG ₁ , κ Klon: M-A251	FITC, PE, APC
CD 69	AIM EA-1 MLR3 Gp34/28 VEA	Maus IgG ₁ , κ Klon: FN50	PE, APC
HLA-DR	MHC Klasse II Antigen	Maus IgG _{2a} , κ Klon: G46-6 (L243)	PE, PerCP

Tabelle 4:

Antikörper zur Expressionsanalyse Dendritischer Zellen (Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg)

Antikörper	Bezeichnung	Subtyp	Markierung
CD 3	Leu™ 4	Maus IgG ₁ , κ Klon: UCHT1	FITC
CD 14	Monozyt	-	FITC
CD 19	B- Zelle	-	FITC
CD 56	NK-Zelle	N-CAM	FITC
CD 80	Aktivierte B-Zelle	B7-1	PE
CD 83	DC Aktiviert. Lympho.	HB-15	PE
CD 86	Monozyt, B-Zelle	B7-2	PE
HLA DR	MHC-Klasse II Antigen	Maus IgG _{2a} , κ Klon: G46-6	APC

Tabelle 5:

Antikörper zur Expressions- und Sekretionsanalyse von Zellen im BrdU-Proliferationsassay (Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg).

Antikörper	Bezeichnung	Subtyp	Markierung
FastImmune™ Anti-BrdU mit DNase	BrdU mit DNase	Maus IgG ₁ , κ Klon: B44	FITC
Anti-IFN-gamma	Anti-IFN-gamma	Maus IgG ₁ Klon: 45-15	PE
CD 3	Leu™ 4	Maus IgG ₁ , κ Klon: UCHT1	PERCP
CD 25	IL-2R Tac antigen	Maus IgG ₁ , κ Klon: M-A251	APC
CD 69	AIM EA-1 MLR3 Gp34/28 VEA	Maus IgG ₁ , κ Klon: FN50	APC
HLA-DR	MHC Klasse II Antigen	Maus IgG _{2a} , κ Klon: G46-6 (L243)	APC

2.1.6 Material und Reagenzien für den Elispot-Assay

Multiscreen-HA Platten *MAHA S4510*

Millipore SA., Molsheim, Frankreich

Anti-human IFN-gamma Antikörper *Clone 1-D1K*, Stock: 1mg/ml

Mabtech AB Nacka, Schweden

Anti-human IFN-gamma Antikörper *Clone 7B 6-1*, Stock: 1mg/ml

Mabtech AB Nacka, Schweden

Avidin-Peroxidase-Komplex

Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim

Vectastain Elite Kit *ABC-Kit*

Vector Laboratories, Burlingame

3-Amino-9-Ethylcarbazole-Substrat *AEC-Substrat*

Sigma-Aldrich, Steinheim

Tween 20

Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA

0,1N Essigsäurelösung $C_2H_4O_2$ (*Eisessig*), $M=60,05g/mol$, $1l = 1,05 kg$
1,33ml Essigsäure (100%) auf ein Liter auffüllen

0,1N Natrium-Acetat $C_2H_3NaO_2$ (99% H_2O frei), $M=82,03 g/mol$
16,4 g Na-Acetat auf einen Liter auffüllen

Acetatpuffer

- 46,9 ml H_2O (Millipore)
- 4,6 ml 0,1N Essigsäurelösung
- 11 ml 0,1N Na-Acetat-Lösung

N,N-Dimethylformamid C_5H_7NO , $M=73,10g/mol$, $1l = 0,95 kg$

Merck, Darmstadt

H_2O *Millipore*

Milliporeanlage

Wasserstoffsuperoxid H_2O_2 (30%)

Merck, Darmstadt

Spritzenfilter *Minisart® 0,20 μm*

Sartorius AG, Göttingen

2.1.7 Material und Reagenzien für den Thymidin [6-H₃]-Proliferations-Assay

96-Loch-Mikrotiterplatten Rundboden *Cellstar*

Greiner, Frickenhausen

96-Loch-Mikrotiterplatten Rundboden *Costar*

Cambridge, MA, USA

Tritium Thymidin [6-H₃] *1mCi/ml*

Amersham Pharmacia, Biotech, UK

Szintillationslösung *1205-440 Betaplate Scint, scintillation cocktail*

Wallac, Turku, Finnland

Harvester *Tomtac*

Wallac, Turku, Finnland

Filterpapier *1450-241 Printed Filtermate A, Tomtec*

Wallac, Turku, Finnland

Mikrowelle 800W

Siemens AG, München

Einschweißgerät *1295-012 Heat Sealer*

Wallac, Turku, Finnland

Einschweißfolie *1450-432 Sample Bag*

Perkin Elmer, life science, Finnland

Kassetten *1450-Filtermate Cassette*

Wallac, Turku, Finnland

Zählgerät *1450 MicroBeta Trilux, liquid scintillation and luminescence counter*

Wallac, Turku, Finnland

Software *MicroBeta Windows Workstation*

2.1.8 Material für den BrdU (5-Bromo-2`-deoxyuridin) Proliferations-Assay

5-Bromo-2`-deoxyuridin *BrdU* min. 99% Reinheit

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Stammlösung: 60mM (5,42ml 1N NaOH in 100mg BrdU) 1:10 mit PBS verdünnt.

Brefeldin A *BFA*

Sigma Aldrich, Steinheim

Stammlösung: 5mg BFA + 1ml DMSO (KryoShure-Dimethylsulfoxid, WAK-CM)

Beide Stammlösungen wurden jeweils in Aliquots zu 100µl (BrdU) beziehungsweise 20µl (BFA) aliquotiert und bei -20°C verwahrt.

DNase *FastImmune™ Anti-BrdU FITC mit DNase*

Becton Dickinson, Heidelberg

96-Loch-Mikrotiterplatten Rundboden *Cellstar*

Greiner, Frickenhausen

96-Loch-Mikrotiterplatten Rundboden *Costar*

Cambridge, MA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolierung

2.2.1.1 Zur Verfügung stehende Blutproben

2.2.1.1.1 Blutproben von Probanden

Für die einzelnen Zellfraktionen (Responder- und bestrahlte Stimulatorzellen) der Lymphozytenmischkultur (MLC) stand periphervenöses heparinisieretes Vollblut von gesunden, nicht HLA-identischen erwachsenen Spendern mit schriftlicher Einverständniserklärung zur Verfügung.

2.2.1.1.2 Klinische Blutproben und Zellmaterial

Es stand in drei Fällen periphervenöses Patientenblut als Stimulatorzellquelle und Leukapheresat vom zugehörigen haploidentischen Familienspender als Responder bereit (Votum der Ethikkommission 14/2001 vom 27.2.01).

Tabelle 6:

Anonymisierte Patientenprobe und Spenderleukapheresat zur Generierung von nicht-alloreaktiven T-Zellen

Patient ID/Alter = Stimulator	Erkrankung Patient
B.M.C., 5 J	Juvenile Myelo-Monozytäre Leukämie (JMML)
S.F., 7 J	Akute Lymphoblastische Leukämie (cB-ALL)
B.M., 6 J	Juvenile Myelo-Monozytäre Leukämie (JMML)

2.2.1.1.3 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PMNC)

Die peripheren mononukleären Zellen (PMNC) wurden mit Hilfe der Dichtezentrifugation aus heparinisiertem Vollblut (50 I.E./ml) von gesunden Probanden nach dem von Böyum [25] im Jahre 1968 beschriebenen Verfahren in abgewandelter Form isoliert. Ebenso wurden das heparinisierte Patientenblut und das Leukapheresat behandelt.

In ein steriles 50 ml Plastikröhrchen (Falcon, Becton Dickinson) wurden 15 ml Ficoll (Biocoll Separating Solution, Biochrom KG, Berlin), ein nichtionisches synthetisches Polymer aus Saccharose mit einer Dichte von 1,077, vorgelegt. Heparinisiertes Vollblut oder Leukapherat wurde mit PBS Dulbecco's (GIBCO BRL, Paisley Scotland) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Danach wurden 35 ml des so verdünnten Blutes oder Leukapherats, möglichst ohne Vermischung der Grenzschichten, auf die Ficollphase geschichtet. Zur Ausbildung eines Dichtegradienten wurde das Röhrchen bei 20 °C, einer Umdrehungszahl von 400g und einem mäßigen Auslauf (Bremse, Stufe 2) für 30 Minuten zentrifugiert (Rotixa 50 RS, Hettich). Nach erfolgter Zentrifugation wurde an der ursprünglichen Grenzschicht zwischen Ficoll und verdünntem periphervenösem Blut beziehungsweise Leukapherat ein weißer Ring sichtbar. Bei dieser so genannten Interphase handelt es sich um eine Schicht bestehend aus

angereicherten mononukleären Zellen, zu denen vor allem B- und T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und mononukleäre Vorläuferzellen zählen. Dieser Interphasering wurde großzügig abpipettiert und in ein steriles 50 ml Plastikröhrchen überführt, das anschließend mit PBS bis zur 50 ml Marke aufgefüllt wurde. Nach Zentrifugation (20 °C, 500g, Auslauf mit starker Bremse, Stufe 9) wurde das erhaltene Zellsediment in PBS resuspendiert und abermals gewaschen. Vor der zweiten Wäsche wurden 500 µl gut resuspendierte Zellsuspension entnommen, um so die Zellzahl am Zellzählgerät (ADVIA120, Bayer, Leverkusen) beziehungsweise am Lichtmikroskop (Olympus, CX40LF200, Japan und Olympus IX50, Japan) mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer (Neubauer improved Assistent-bright-line, Kästner, München) zu bestimmen.

2.2.2 Zellkultivierung

2.2.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Zählkammer nach Neubauer (Gesamtfläche 0,025 mm², Tiefe 0,100 mm, 4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten). Die einzelnen Zellsuspensionen wurden mit Trypanblau (trypan blue solution 0,4 %, Sigma Chemical Co.) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Da Zellen nach dem Zelltod ihre zuvor intakte Membranbarriere verloren hatten, konnten sie mit Hilfe des Farbstoffs Trypanblau angefärbt werden und imponierten bei mikroskopischer Betrachtung als schwarz-blaue unregelmäßig begrenzte Punkte. Unter Zuhilfenahme des Lichtmikroskops wurden die vitalen Zellen in allen vier Großquadraten ausgezählt.

Darüber hinaus wurde die Zellzahl auch mittels eines vollautomatischen Zählgerätes bestimmt. Durch die Messung des von jeder einzelnen Zelle ausgesandten Streulichts und der Peroxidaseaktivität war hierbei neben einer quantitativen Bestimmung auch eine Differenzierung in einzelne Zellsubpopulationen möglich.

Verzichtet wurde auf die vollautomatische Zählung immer dann, wenn sich Zellen bereits in Kultur befunden hatten. Einige Zellen wiesen hierbei

morphologische Veränderungen auf und wurden so vom Gerät nicht mehr erfasst.

2.2.2.2 Kultursystem für Stimulatorzellen

2.2.2.2.1 Kultivierung der Stimulatorzellen in serumhaltigem Medium

Nach dem Isolierungsverfahren und der Zellzahlbestimmung lagen die PMNC zunächst resuspendiert in PBS vor. Um eine Zelldichte von 2×10^6 PMNC/ml in den jeweiligen Zellkulturen zu erreichen, wurde das Volumen des Kulturmediums (X-VIVO 15, BioWhittaker, Maryland, USA versetzt mit 10 % hAB-Serum) an die einzelnen Ausgangszellzahlen angepasst. Die Kultivierung erfolgte in Polystyrenkulturflaschen, Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank (Hera Cell, Heraeus Instruments GmbH, Zweigniederlassung Stuttgart). Die Kultur wurde über Nacht inkubiert.

Während dieser fünfzehnstündigen Kulturphase wurden zu den Stimulatorzellen Zytokine (Rekombinanter humaner Tumor Nekrose Faktor alpha und Interferon gamma, R&D SYSTEMS) in einer Konzentration von 1000 U/ml zugegeben.

2.2.2.2.2 Kultivierung von Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems [167].

Sie nehmen eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von naiven T-Zellen ein [80]. Ihre Generierung in vitro gelingt sowohl aus Knochenmarkstammzellen (CD 34+ Zellen) als auch aus Vorläuferzellen der peripheren Blutzellen und aus im peripheren Blut vorkommenden Monozyten (CD 14+) [195]. Werden Monozyten als Ausgangszellen verwendet, kann die Kultur als reine Monozytenmonokultur, als T-Zell depletierte knochenmarksangereicherte Kultur oder als Mischkultur aus peripheren mononukleären Zellen (PBMC) bestehen. Dabei unterscheiden sich die aus unterschiedlichen Ausgangspopulationen generierten Dendritischen Zellen (DC) nicht in ihrer Funktion [27].

Die Generierung von Dendritischen Zellen erfolgte in einer Monozytenmonokultur. Zum einen, weil möglichst reine Endprodukte entstehen sollten und zum anderen, weil die in den peripheren mononukleären Zellen (PBMC) enthaltenen T-Zellen für Restimulationsversuche verwendet wurden.

Die Kultur wurde nach dem von Romani & Gruner [141] 1994 erstmalig beschriebenen Verfahren in abgewandelter Form angelegt [149].

Alle beschriebenen Kultur- und Aufbereitungsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Als Ausgangsmaterial wurde heparinisiertes Vollblut freiwilliger gesunder Probanden (20 ml) und heparinisiertes Vollblut pädiatrischer Patienten verwendet. Da jeweils nur wenige Milliliter zur Blutabnahme zur Verfügung standen, wurden mehrfach Blutproben gewonnen, aufbereitet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach der Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut wurden diese auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und in einer Konzentration von 1 ml Zellsuspension/Loch auf eine Sechs-Loch Flachbodenplatte (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) gebracht. Durch Zugabe von 2 ml Zellkulturmedium X VIVO 15 (BioWhittaker, Maryland, USA) ergab sich eine Konzentration von $3,3 \times 10^6$ Zellen/ml. Monozyten unterscheiden sich von anderen Blutzellen durch ihre Adhärenz an Plastik [194]. So wurde, um eine möglichst reine Monozytenkultur zu erzielen, die Platte für 2 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Durch dreimaliges Spülen jedes einzelnen Lochs mit PBS (GIBCO BRL, Eggenstein) und einer 10 ml Plastikpipette wurden alle nicht adhärennten Zellen abgesammelt und für spätere Restimulationsversuche zusammen mit dem vorher zugegebenen Kulturmedium X Vivo 15 aufbereitet. Die nach der Inkubationszeit plastikadhärennten Monozyten wurden mit einem Zytokincocktail aus IL-4 (60 ng/ml), GM-CSF (100 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml) versorgt. Es wurden pro Loch 2 ml Kulturmedium X Vivo 15 vorgelegt und jeweils 1 ml Zytokincocktail hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für sieben Tage unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert und jeden zweiten Tag mit jeweils 1 ml des Zytokincocktails versorgt. Eine lichtmikroskopische Kontrolle (Zellkulturmikroskop *Olympus IM* Olympus, Japan) auf Vitalität erfolgte alle drei Tage.

Um die entstandenen Dendritischen Zellen für die Lymphozytenmischkultur zur Verfügung zu stellen und mittels Durchflußzytometrie (FACS) den Nachweis von entsprechenden Oberflächenantigenen durchführen zu können, wurden die

adhärenten Zellen mittels Zellrechen (Cellscraper Costar, Corning NY, USA) vom Boden gelöst, mit 3 ml PBS gespült, in eine 10 ml Plastikpipette aufgenommen und in ein 50 ml Plastikröhrchen (Greiner, Sollingen/Frickhausen) überführt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis sich lichtmikroskopisch keine Zellen mehr in der Kulturplatte befanden. Das Plastikröhrchen wurde mit PBS bis zur 50 ml Marke aufgefüllt und zentrifugiert (Rotixa 50 RS, Hettich: 10 min, 20 °C, 500g, Auslauf mit starker Bremse, Stufe 9). Das erhaltene Zellsediment wurde mit X Vivo 15 resuspendiert, auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt, in ein entsprechend großes Zellkulturfläschen überführt und bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert.

2.2.2.3 Verarbeitung der Patientenzellen

Um möglichst viele Zellen zur Verfügung zu stellen, wurden zum einen die aus einer Blutprobe hergestellten Dendritischen Zellen bei minus 80 °C so lange zwischengelagert, bis für die große Anzahl an Versuchen eine ausreichende Anzahl an Blutproben verarbeitet war. Zum anderen wurden die bei der Herstellung von Dendritischen Zellen entstandenen und nicht weiter verwendeten autologen T-Zellen expandiert.

2.2.2.3.1 Einfrieren von Dendritischen Zellen

Frisch generierte Dendritische Zellen wurden nach der von Waymouth und Varnum etablierten Methode der Kryokonservierung in abgewandelter Form haltbar gemacht [187].

Dimethylsulfoxid (DMSO) dient hierbei als Stabilisator und verhindert die unerwünschte Kristallbildung. Durch die Ausbildung von Kristallen werden Zellen zerstört und sind somit für weitere Versuche unbrauchbar.

Nach Zentrifugation der Zellen im 14 ml Plastikröhrchen und Lagerung des entstandenen Zellsediments für zehn Minuten auf Eis wurde das entstandene Zellpellet aus maximal 2×10^8 Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein 1,8 ml Einfriereröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Diese Resuspension wurde zunächst für 15 Minuten bei minus 20°C aufbewahrt.

Danach konnten die Röhrrchen bei minus 80 °C gelagert werden. Ein zu hoher plötzlicher Temperaturabfall hätte sonst zur Zerstörung der Zellen geführt.

2.2.2.3.2 Auftauen von Dendritischen Zellen

Die benötigte Anzahl an kryokonservierten Zellen wurde im Einfrierröhrrchen im Wasserbad (Memmert) so lange belassen, bis die Zellen fast vollständig aufgetaut waren (knapp unter Null-Grad Grenze). Nach sofortiger Aufnahme der Zellen in 10 ml kaltem Medium (X Vivo 15) und Überführung in ein 14 ml Plastikröhrrchen wurden diese zentrifugiert (Rotixa 50 RS, Hettich: 5 min, 10 °C, 200g, Auslauf mit Bremse, Stufe 7) und nochmals gewaschen. Es schloss sich die lichtmikroskopische Bestimmung der Anzahl an vitalen Zellen an. Nach Einstellung der vitalen Zellen auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml wurden diese in entsprechend große Kulturflaschen überführt. Die Dendritischen Zellen standen nun für die Lymphozytenmischkultur zur Verfügung.

2.2.2.3.3 Expansion der T-Zellfraktion

Expandiert wurden die bei der Generierung von Dendritischen Zellen (DC) angefallenen autologen T-Zellen der freiwilligen gesunden Probanden beziehungsweise der pädiatrischen Patienten und die nach Depletion entstandene nicht-alloreaktive T-Zellfraktion (Negativfraktion).

Dafür wurden 2,5 μ l CD 3/CD 28 Expansionsbeads (Dynabeads, Dynal Biotech) pro 1×10^6 Zellen/ml zur entsprechenden Zellkultur gegeben und für sieben Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Die Zählung der vitalen Zellen am Lichtmikroskop (Lichtmikroskope *Olympus CX40LF200* und *Olympus IX50* Olympus, Japan) vor und nach Expansion ergab die Anzahl an hinzugewonnenen T-Zellklonen. Auf die benötigte Zellkonzentration eingestellt, konnten diese anschließend eingesetzt werden.

Das mit monoklonalen Antikörpern gegen CD 3 und CD 28 beschichtete Polystyrenkügelchen imitiert die Aktivierung von T-Zellen durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) in vivo. T-Zellen werden durch die gleichzeitige Aktivierung ihres T-Zellrezeptors zusammen mit dem Co-Stimulationssignal an CD 28 zur Proliferation und Expansion stimuliert [14].

2.2.2.4 Lymphozytenmischkultur: MLC (mixed lymphocyte culture)

Präsentieren allogene MHC-Moleküle einen Peptidliganden, wird dieser MHC-Peptidkomplex erkannt und es resultiert daraus eine starke primäre Lymphozytenreaktion (MLR) gegen die Haupthistokompatibilitätsantigene. Das in vitro Modell dieser Alloimmunität stellt die Lymphozytenmischkultur (MLC) dar. Nebenhistokompatibilitätsantigene allerdings sind unter Standardbedingungen nicht in der Lage, eine erkennbare T-Zellproliferation in einer herkömmlichen MLC zu induzieren. Unter diesem Gesichtspunkt wurden periphere mononukleäre Responderzellen mit bestrahlten „first party“ Stimulatorzellen in einer „one way primary mixed lymphocyte culture“ (MLC) eingesetzt. Als experimentelles System der allogenen T-Zellaktivierung wurde eine modifizierte Lymphozytenmischkultur (MLC) aus Responder- und bestrahlten Stimulatorzellen nicht HLA-identischer Spender angesetzt.

Als Responderzellen dienten in diesem Zusammenhang PMNC unmittelbar nach Ficollseparation. Auch die Stimulatorzellen wurden zunächst mittels Ficollseparation gewonnen, anschließend aber in einem Inkubationsschritt modifiziert, um so mit Hilfe einer verstärkten zellspezifischen Antigenexpression die Sensitivität der MLC zu erhöhen. Dabei wurden, wie bereits erwähnt, PMNC direkt nach Ficollseparation mit jeweils 1000 U/ml Zytokinen (TNF- α und IFN- γ) über Nacht inkubiert.

Bei denjenigen Versuchen, in denen Patientenzellen in der Lymphozytenmischkultur verwendet wurden, kamen als Stimulatorzellen aus Monozyten und Makrophagen generierte Dendritische Zellen zum Einsatz, die, wie alle Stimulatorzellen, bestrahlt wurden. Die Bestrahlung erfolgte jeweils direkt vor dem Kulturansatz mit einer Zentraldosis von 3 000 cGy (30 Gy; 3000 Rad) in einem Bestrahlungsgerät (Gammacell 1000 EliteCEO120, MDS Nordion), wobei als Strahlenquelle ^{137}Cs mit einer Halbwertszeit von 30 Jahren diente.

Responder- und Stimulatorzellen wurden für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultur genommen. Dabei betrug die Zellkonzentration 5 x 10⁶ PMNC/ml serumhaltiges Medium (X-VIVO 15 + 10 % hAB-Serum). Zu diesem Zweck erfolgte direkt vor der Herstellung der primären einseitigen

Lymphozytenmischkultur ein Abzentrifugieren der vorinkubierten Stimulatorzellen mit nachfolgender Zellzahlbestimmung und Einstellung auf 5×10^6 Zellen/ml.

2.2.3 Magnet-aktivierte Zellsortierung : MACS (magnet-activated cellsorter/ing) am CliniMACS®

2.2.3.1 Grundlagen der MACS Methode

Das Verfahren der magnet-aktivierten Zellsortierung (MACS) wird heute regelmäßig zur Separation von Zellpopulationen eingesetzt. Seit deren Einführung [121] auf Grundlage der von Melville [116] im Jahre 1975 beschriebenen Methode setzte sie sich gegen andere Methoden wie die Separation durch Zentrifugation, Separation durch unterschiedliche Dichtegradienten oder die Depletion von T-Zellen durch Schafserythrozyten durch. Ihre Vorteile bestehen in der zu erzielenden hohen Reinheit, der geringen Anzahl an Zellverlusten, der Verarbeitung sowohl sehr kleiner als auch sehr großer Zellmengen und in der unveränderten Funktionsfähigkeit der Zellen nach Auftrennung. Eine weitere Möglichkeit der Zellsortierung ist die durchflußzytometrische Separation, wobei nur kleinere Zellmengen verwendet werden können und deren Trennung längere Zeit in Anspruch nimmt [2]. Darüber hinaus eignen sich die markierten Zellen nach Sortierung nicht mehr zur Weiterverarbeitung, auch nicht zum Einsatz in Restimulationsversuchen. Im Folgenden wird die MACS Methode näher beschrieben.

Einzelne Subpopulationen immunologischer Zellen unterscheiden sich durch ihre Oberflächenmoleküle (Cluster of differentiation „CD“). Werden periphere mononukleäre Zellen (PMNC) mit superparamagnetischen Partikeln, die mit hochspezifischen monoklonalen Antikörpern gegen diese CD Antigene gekoppelt sind, inkubiert und anschließend über eine Säule durch ein starkes permanentes Magnetfeld geleitet, verbleiben die magnetisch markierten Zellen in der Säule. Alle nicht markierten Zellen werden am Ende der Säule aufgefangen. Die Zellsortierung kann sowohl als Anreicherung als auch als Depletion durchgeführt werden. Werden diejenigen Subpopulationen, die vom Rest der Zellen abgetrennt werden sollen, markiert, handelt es sich um eine

Anreicherung. Von einer Depletion spricht man, wenn nur die nicht magnetisch markierte Fraktion weiter verarbeitet wird.

2.2.3.2 Die CliniMACS® Methode

Auf Grundlage der oben beschriebenen MACS Methode wurde ein geschlossenes, steriles und automatisiertes System entwickelt, welches alle Voraussetzungen für den klinischen Einsatz erfüllt. Das CliniMACS® Gerät besteht aus einem Computer, der alle Komponenten des Systems und alle Schritte der Separation kontrolliert und standardisiert ablaufen lässt, einer abnehmbaren magnetischen Separationseinheit, einer peristaltischen Pumpe für optimale Flussraten und elf Ventilen, durch die der Fluß von Puffer und Zellsuspension gesteuert wird.

2.2.3.3 Vorbereitung der Zellen

Am Tag 3 nach Ansatz der Lymphozytenmischkultur erfolgte die Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten. Um später Aussagen über die Ausgangssituation vor Depletion machen zu können, wurden aus dem Kulturansatz mindestens $2,5 \times 10^7$ Zellen entnommen und bis zur späteren Verwendung unter Standardbedingungen im Brutschrank aufbewahrt. Der restliche Teil der Zellen wurde zentrifugiert (Rotexa 50RS, Hettich; 400g, 10 min, 4 °C), der Überstand dekantiert und die Zellen in maximal 1 ml MACS Puffer (PBS + HSA 20 %) sorgfältig resuspendiert. Da für den Oberflächenmarker CD 69 keine Superparamagnetischen MicroBeads zur Verfügung standen, mussten die Zellen in einem Zwischenschritt zuerst mit 200 µl CD 69 pure Antikörper für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert werden. Um alle überschüssigen Antikörper zu entfernen, folgte ein Waschschriff mit MACS Puffer (Rotexa 50RS, Hettich; 400g, 10 min, 10 °C). Dekantieren und sorgfältige Resuspension der Zellen in minimalem Restpuffer schloss sich an. Nach Hinzugabe von je 200 µl superparamagnetischen CD 25, HLA DR und RαM MicroBeads, wobei sich letztere im Gegensatz zu ersteren nicht direkt an die Zelle, sondern an die vorher zugesetzten CD 69 pure Antikörper anlagerten, folgte eine 15 minütige Inkubationszeit bei 4 °C. Überschüssige magnetische Kügelchen wurden in einem nachfolgenden Waschschriff entfernt. Die nach drei tägiger

Lymphozytenmischkultur aktivierten T-Zellen waren nun für die Depletion magnetisch markiert.

Es folgte eine äußerst sorgfältige Resuspension in mindestens 40ml MACS Puffer, um Zellkonglomerate zu verhindern. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe einer 50 ml Spritze (Perfusor Spritze Plastipak 50 ml, Becton Dickinson, Drogheda, Irland), eines Plastikschlauchs (Avon Kwill Filling Tube 5", Avon, England) und einer Kanüle (Kanüle BD Microlance™ 3, Becton Dickinson, Drogheda, Irland) in einen sterilen Zellbeutel (Transferbeutel Transfer Pack 400 ml Baxter Healthcare Corporation, Fenwal Division, IL,USA) überführt und über einen Dorn (Verbindungsorn, Baxter S.A., Belgien) mit dem Schlauchsystem des CliniMACS® Geräts verbunden. Nebst einem Beutel (Einfrierbeutel Cryocyte Freezing Container 250 ml Nexell, Irvine, CA, USA) zum Auffangen der depletierten Zellfraktion wurden 1000 ml MACS Puffer (PBS + EDTA, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) unter Zugabe von 20 ml HSA 20 % angeschlossen. Es folgte die eigentliche Depletion am CliniMACS®.

2.2.3.4 Depletion am CliniMACS®

Nach drei Tagen Lymphozytenmischkultur wurden die vorbereiteten Zellen nach dem CliniMACS^{plus}® Softwareprogramm 1.2 depletiert. Jeder einzelne Schritt der Auftrennung wie Waschen, Spülen, Einbringen der Zellen ins magnetische Feld und Überführung der separierten Zellfraktionen in zugewiesene Zellbeutel erfolgte im geschlossenen System und softwaregesteuert. Nach Abschluss der Depletion wurden die aufgetrennten Zellen für Restimulationsversuche vorbereitet.

2.2.3.5 Behandlung der erhaltenen Zellfraktionen

Die zwei erhaltenen Zellfraktionen „Negativ“ und „Positiv“ wurden in 50 ml Plastikröhrchen (Greiner, Sollingen/Frickenhausen) überführt, gewaschen (Rotexa 50RS, Hettich; 400g, 10 min, 20 °C, leichte Bremse 4/R4) (um die vorher zugegebenen Antikörper wieder abzulösen), die Zellzahl bestimmt und anschließend mit X Vivo 15 Kulturmedium auf 5×10^6 Zellen/ml (Positive Zellen)

beziehungsweise auf 15×10^6 Zellen/ml (Negativfraktion) eingestellt. Die so behandelten Zellen wurden sodann in Restimulationsversuchen eingesetzt.

2.2.4 Zellanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)

2.2.4.1 Grundlagen

Die Durchflußzytometrie (FACS, Fluorescent activated cellsorter) ermöglichte eine Charakterisierung und Quantifizierung einzelner Zellen und Zellpopulationen anhand zellspezifischer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der zuvor mit geeigneten Antikörpern markierten Zellen.

Zur Analyse wurden die jeweiligen Zellsuspensionen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in eine Meßküvette eingebracht. Beim Eintreten in die Messkammer wurden die Zellen durch eine sie umgebende Trägersubstanz stark beschleunigt, wodurch Einzelzellen aneinander gereiht sequentiell den Analysepunkt erreichten (hydrodynamische Focussierung). Dort wurden sie von einem Laser erfasst, analysiert und klassifiziert. In der analytischen Durchflußzytometrie wurden ein luftgekühlter Argon-Ionenlaser verwendet, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm und 523 nm erzeugte sowie ein He-Ne Laser, der Licht mit einer Wellenlänge von 635 nm erzeugte.

2.2.4.2 Messung der Lichtstreuung

Streulicht entstand immer dann, wenn eine Zelle von dem Laser getroffen wurde und es zu einer Brechung, Beugung oder Streuung des ausgesandten Lichtstrahls kam. In erster Linie spielten bei diesem Phänomen Faktoren wie Zellgröße, Oberflächenbeschaffenheit und intrazelluläre Struktur einzelner Zellen die entscheidende Rolle. Die Messung der Lichtstreuung erfolgte dabei mit Hilfe von Photodetektoren, den so genannten Photomultipliern.

Die ermittelten Werte wurden als so genannte „events“, die für das vorwärts- (Forward scatter (FSC); x-Achse) und seitwärtsgerichtete (Sideward Scatter (SSC); y-Achse) Streulicht verantwortlich waren, in einem zweidimensionalen Diagramm wiedergegeben.

Forward Scatter (FSC):

Die Vorwärtsstreuung entlang des einfallenden Lichts stellte ein Maß für die Zellgröße dar (Querschnittsfläche).

Sideward Scatter (SSC):

Dieses im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht entsprach der intrazellulären Granularität, der Membranfaltung und der Oberflächenmorphologie der analysierten Einzelzelle (Refraktionsindex).

2.2.4.3 Messung der Fluoreszenz

Darüber hinaus war es möglich, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen genauer zu analysieren, was eine exakte Zuordnung der Einzelzelle zu bestimmten Zellpopulationen und Subpopulationen erlaubte. Hierfür wurden Antikörper, die gegen zellspezifische Oberflächenantigene gerichtet und mit einem Farbstoffmolekül gekoppelt waren, eingesetzt. Da abhängig vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff lediglich Licht eines definierten Wellenlängenbereichs emittiert wurde, war es möglich, einzelne Zellen mit bis zu vier unterschiedlichen Fluoreszenzantikörpern zu markieren.

Fluoreszenz 1 (FI-1):

Fluoreszinoisothiocyanat (FITC) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der angeregt durch einen Argon-Ionen Laser im Wellenlängenbereich von 488 nm, Fluoreszenzen von maximal 520 nm emittieren kann. Unter Verwendung eines Filters, der Farbstoffe mit einer Emissionswellenlänge von 530 ± 15 nm erfasste, konnte dieser Farbstoff erkannt werden.

Fluoreszenz 2 (FI-2):

Phycoerythrin (PE) mit einem Emissionsmaximum bei 576 nm konnte mit Hilfe eines Filters, der alle Farbstoffe im Wellenlängenbereich von 575 ± 13 nm erfasste, erkannt werden.

Fluoreszenz 3 (FI-3):

Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) wurde mittels eines weiteren Filters erfasst.

Fluoreszenz 4 (FI-4):

Allophycocyanin (APC), angeregt mit einem He-Ne Laser bei 635 nm, dessen Absorptionsmaximum bei 650 nm lag und ein Emissionsmaximum im Bereich von 660 nm aufwies, wurde durch einen Filter mit einer Absorption im Wellenlängenbereich von 660 ± 10 nm, erfasst.

2.2.4.4 Durchführung

Die zu analysierenden Zellsuspensionen, bestehend aus überwiegend mononukleären Zellen nach Kultivierung und Depletion, wurden in Polystyren-Rundboden-Plastikröhrchen überführt und mit 2 ml FACS-Puffer (PBS mit 0,1 % BSA und 0,1 % Natriumazid) gewaschen (Hettich, Rotexa 50 RS; 4 °C, 400g, 5 min). Nach anschließendem Dekantieren des Überstands und Resuspendieren der Zellen erfolgte die Antikörperzugabe (je 10 µl/Röhrchen, APC 4 µl/Röhrchen entsprechend den Angaben des Herstellers). Nach gründlicher Resuspendierung der Zellen erfolgte eine Inkubation bei 4 °C unter Lichtabschluß im Kühlschrank für 30 min. Freie, nichtgebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper wurden durch erneutes Waschen mit FACS Puffer entfernt. Nach Dekantieren des Überstands wurden zu jeder Zellfraktion vier Tropfen FACS Puffer gegeben und gründlich resuspendiert. Die Einstellung des Bezugspunktes im FACSscan (Fluorescence Activated Cell Analyser, Becton Dickinson) wurde immer mit den entsprechenden Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt, da es sich bei den Fluoreszenzsignalen um Relativ- und nicht um Absolutwerte handelte.

2.2.4.5 Auswertung

Zur computergestützten Datenverarbeitung wurden die Softwareprogramme CellQuest(Becton Dickinson, Heidelberg) und WinMDI (Joseph Trotter, 1993 – 2000) eingesetzt.

Die Klassifizierung einzelner mononukleärer Zellen erfolgte mit Hilfe der „dotplot“- und „densityplot“-Darstellung von Streulichtsignalen im Vorwärts- (FSC, forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward scatter). Demzufolge wurden alle analysierten Zellen entsprechend ihrer Größe und Granularität graphisch dargestellt. Anhand des so erhaltenen zweidimensionalen Diagramms wurde die Lymphozytenpopulation als Zielgruppe weiterer Analysen ausgewählt. Dabei konnten die Responderlymphozyten von den Stimulatorzellen sehr leicht differenziert werden, indem eine so genannte „gate“ auf die vitale Lymphozytenpopulation gesetzt wurde. Nach 72-stündiger Zellkultivierung hatten sich die bestrahlten Stimulatorzellen durch Apoptosevorgänge aus diesem „gate“ herausbewegt und konnten anschließend zur vitalen Responderzellpopulation abgegrenzt werden. Bei der Verwendung von zwei oder mehr Antikörpern mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung erschienen die Daten ebenfalls als zweidimensionales Streudiagramm. Dabei wurde die Fluoreszenz des einen Antikörpers zur Fluoreszenz des anderen Antikörpers aufgetragen. Zur statistischen Datenerfassung wurde das erhaltene Diagramm in vier Quadranten unterteilt und mit Hilfe der Quadrantenstatistik ausgewertet. So konnte der prozentuale Anteil der jeweiligen Fluoreszenzsignale in den einzelnen Quadranten ermittelt werden.

2.2.5 ELISPOT Assay (Enzyme linked immunospot Assay)

2.2.5.1 Grundlagen

Im Elispot Assay werden zytokinsezernierende Zellen auf einer antikörperbeschichteten Membran kultiviert. Die dabei freigesetzten Zytokine werden von den Antikörpern abgefangen und durch eine enzymatische Reaktion als farbige Flecken sichtbar gemacht. Dabei entspricht jeder Fleck einer Zellpopulation, die in der Lage ist, Interferon gamma zu produzieren.

2.2.5.2 Durchführung

Am Vortag der Depletion wurde die 96-Loch Millipore Nitrocellulose HA-Platte (MAHA S4510, Millipore) mit 50 µl/well des primären Antikörpers (mAb 1-D1K-

monoklonaler Antikörper gegen IFN- γ ; Stock: 1 mg/ml, Mabtech), der zuvor 1:100 mit PBS verdünnt worden war, also in einer Endkonzentration von 0,5 μ l/well, beschichtet. Dabei wurde besonders darauf geachtet, den Antikörper möglichst gleichmäßig auf die Nitrocellulosemembran aufzutragen. In der anschließenden 12-stündigen Inkubationsphase unter Lichtabschluss und bei einer Temperatur von 4 °C im Kühlschrank banden die Antikörper mit ihrem Fc-Fragment an die Membran der Kulturplatte. Am Tag der Depletion wurden die antikörperbeschichteten HA-Platten zunächst vier Mal mit 200 μ l PBS/well gewaschen. Dabei wurde das PBS nach jeweils 5 min Inkubationszeit steril dekantiert. Überschüssige, nichtgebundene Antikörper wurden so aus der Platte entfernt.

Um eine unspezifische Interferonbindung zu vermeiden, erfolgte die Zugabe von 100 μ l/well Blockiermedium (X-VIVO 15 mit 10 % hAB-Serum) und die Inkubation für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurde das Blockiermedium steril dekantiert und von jeder der zu analysierenden Zellfraktionen 50 μ l Responderzellen (bei einer Einstellung von 5×10^6 Zellen/ml je 250 000 Zellen) pro Loch pipettiert. Nach 15-minütiger Kultivierung der Platte bei 37 °C im Brutschrank wurden die kurz zuvor präparierten Stimulatorzellen (eingestellt auf 5×10^6 Zellen/ml und mit 30 Gy bestrahlt) mit einem Volumen von 50 μ l/well im Verhältnis 1:2 zu den vorgelegten Responderzellen auf die Platte gegeben. Weitere stimulatorisch wirkende Reagenzien (jeweils 50 μ l/well) wurden der Platte zugeführt. Danach wurde jedes well mit Medium (X-VIVO 15 mit 10 % hAB) auf genau 200 μ l aufgefüllt. Die so erhaltene sekundäre Mikro MLC wurde für genau 20 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die eingesetzten Zellfraktionen und die zugegebenen Antigene sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tabelle 7:

Eingesetzte Zellfraktionen, Restimulatoren und Antigene im ELISPOT-Restimulationsversuch

A/B* v.D.:	Primäre MLC vor Depletion (Ausgangspopulation)
A/B* N.:	Primäre MLC Negativfraktion nach Depletion
A/B* P.:	Primäre MLC Positivfraktion nach Depletion
A:	Responderzellen in pr.MLC
B:	Stimulatorzellen in pr. MLC
A*:	Restimulation mit autologen bestrahlten PMNC
B*:	Restimulation mit allogenen bestrahlten PMNC
C* :	Restimulation mit bestrahlten "third party"-Zellen
Tetanus Toxoid:	Formalinisiertes Toxin des Bakteriums Clostridium tetani
CMV-Antigen + CMV-MOCK	Zytomegalie-Virus-Antigen und Kontrolle
PHA (Phytohämagglutinin):	Mitogen aus der Gartenbohne (Phaseolus vulgaris)
SEB (Staphylococcus enterotoxin β):	Bakterientoxin mit Wirkung als Superantigen
ASP <i>hyphen</i> (Aspergillus fumigatus):	Hyphen aus 1×10^6 Conidien/ml
ASP <i>ppsap</i> (Aspergillus fumigatus):	Überstand aus auf Saproaggar gewachsenen Asp.fum. in 70% Alkohol gefällt
ADV (Adenovirus) + ADV-Mock	Adenovirus Antigen und Kontrolle

Nach 20 stündiger Inkubation wurde die Platte sechs mal mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen und so für die Zugabe von 100 μ l Sekundärantikörper (7-B6-1-Biotin-Antikörper, Mabtech) pro well, was bei einer Verdünnung von 1:500 mit PBS/0,5 % BSA, also 2 μ l Antikörper mit 1 ml PBS/0,5 % BSA einer Endkonzentration von 0,2 μ l Sekundärantikörper/well entspricht, vorbereitet.

Es folgte eine zweistündige Inkubation im Brutschrank unter Standardbedingungen. Erneutes sechsmaliges Waschen mit PBS/0,05 % Tween 20 schloss sich an. Danach wurden 100 μ l/well des Avidin-Peroxidase-Komplexes (Vectastain Elite Kit, Vector) hinzupipettiert. Während der einstündigen Inkubationsperiode bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß wurde die AEC-Substrat-Lösung hergestellt.

Dazu wurde eine Tablette AEC (Sigma) in 2,5 ml Dimethylformamid vollständig gelöst und anschließend 47,5 ml Acetatpuffer hinzugegeben. Dieser wurde zuvor aus 46,9 ml H₂O (Millipore), 4,6 ml 0,1N Essigsäurelösung und 11 ml 0,1N Na-Acetatlösung zusammengestellt. Zu den resultierenden 50 ml wurden im Anschluss 25 µl 30-prozentiges H₂O₂ hinzupipettiert. Die Lösung wurde gemischt und anschließend über einen 45 µm Spritzenfilter filtriert.

Nach Abschluss der einstündigen Inkubation der Platte wurde diese erneut gewaschen. Diesmal allerdings dreimal mit PBS/0,05 % Tween 20 und drei weitere Male mit PBS allein.

Die Zugabe von 100 µl/well AEC-Färbelösung schloss sich an. Die sofort einsetzende Farbreaktion wurde nach genau vier Minuten durch Zugabe von destilliertem Wasser abgestoppt.

Nach dem Trocknen der jeweils auf dem Boden jedes wells befindlichen Membrane erfolgte die Auszählung der durch Anfärbung sichtbar gemachten Interferon gamma produzierenden Zellen in Form von einzelnen roten Punkten mit bloßem Auge unter dem Lichtmikroskop und am automatischen Elispot-Messgerät (A.EL.VIS 3.2, automated elisa-spot assay video analysis systems®, und Software Eli.analyse, beides A.EL.VIS GmbH, Hannover).

2.2.6 [6-H₃] Thymidin Proliferationsassay

Eine weltweit verbreitete und über viele Jahre angewendete Methode, um die Zellteilungsrate *in vitro* genauer bestimmen zu können, umfasst die Quantifizierung des inkorporierten [6-H₃] Thymidins in die DNA von teilungsfähigen Zellen. Dieser Ansatz vermittelt allerdings nur die Idee der Gesamtmenge der in Teilung befindlichen Zellen und lässt so keine Information über individuelle Zellen zu. Ferner wird die Substanz nur von denjenigen Zellen eingebaut, die sich im Moment, in dem das Kultursystem gepulst wird, in Teilung befinden. Dies könnte zur Unterschätzung der Proliferationsrate führen, wenn sich die Mehrheit der Zellen bereits in einer frühen Phase der Kultivierung in Teilung befinden.

Die Einbaurate von Thymidin, einem Nukleosidbaustein der DNA, in das zelleigene Genom stellte einen Indikator für die Proliferationsfähigkeit und damit

für die Aktivität von Zellen dar. Die Verwendung von radioaktiv markiertem [^3H] Thymidin und der davon ausgehenden β -Strahlung, die mit Hilfe eines Zählgeräts quantifiziert werden konnte, ließ einen Rückschluss auf die Proliferationsaktivität der sich in Kultur befindlichen Zellen zu.

Nach Ansetzen der sekundären MLC (verwendete Zellfraktionen und Antigene siehe Tabelle 8) in einer 96-well Rundbodenplatte steril mit Deckel (Cellstar, Falcon) wurde am Tag fünf in jedes Loch 25 μl [^3H] Thymidin, das zuvor mit Medium (X-VIVO mit 10% hAB-Serum) 1:20 verdünnt worden war, gegeben. Die Endkonzentration des [^3H] Thymidin lag somit bei 0,125 μl pro well. Die Kulturplatte wurde sodann über 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 bebrütet. Während dieser Inkubationszeit konnten die proliferierenden Zellen das Thymidin in ihre DNA einbauen. Im Anschluss wurde die Platte bei minus 20 °C eingefroren. Durch die Kälteeinwirkung kam es zur Zerstörung der Zellmembranen und somit zur Freilegung der intrazellulär befindlichen DNA. Die so entstandenen Zellfragmente konnten dann mittels Harvester (Tomtec Harvester, Wallac, Turku, Finnland) durch ein 90 x 120 mm großes Filterpapier (1450-421 Printed Filtermat A, Tomtec) gespült werden. Die freigelegte DNA der einzelnen Zellen blieb bei diesem Spülvorgang durch Adhärenz an den GF/C Glasfibern des Papiers haften. Das mit DNA bestückte Filterblatt wurde im Anschluss in der Mikrowelle (Siemens, München) bei 350 W für 10 min vollständig getrocknet, um dann nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit (1205-440 Betaplate Scintillation Cocktail, Wallac) in eine passende Folie (1450-432 Sample Bag, Perkin Elmer, life science) eingeschweißt (1295-012 Heat Sealer, Wallac) zu werden. Bevor die Messung am Zählgerät (1450 MicroBeta TriLux, liquid scintillation and luminescence counter, Wallac) erfolgen konnte, wurde das Filterpapier in eine Kassette (1450-104 Filtermate Cassette, Wallac) eingelegt und im Gerät platziert. Mit Hilfe von drei Detektoren, die aus je zwei Photomultipliern bestanden und sich automatisch über die Filterplatten bewegten, konnte die Radioaktivität, die durch die Szintillationsflüssigkeit in Lichtsignale umgewandelt wurde, detektiert werden. Mit der entsprechenden Software (MikroBeta Windows WorkStation) wurden Messresultate als Zahlenprotokolle auf dem PC gespeichert.

Tabelle 8:

Eingesetzte Zellfraktionen, Restimulatoren und Antigene im [6-H₃] Thymidin Proliferationsassay

A/B* v.D.:	Primäre MLC vor Depletion (Ausgangspopulation)
A/B* N.:	Primäre MLC Negativfraktion nach Depletion
A/B* P.:	Primäre MLC Positivfraktion nach Depletion
A:	Responderzellen in pr.MLC
B:	Stimulatorzellen in pr. MLC
A*:	Restimulation mit autologen bestrahlten PMNC
B*:	Restimulation mit allogenen bestrahlten PMNC
C* :	Restimulation mit bestrahlten "third party"-Zellen
Tetanus Toxoid:	Formalinisiertes Toxin des Bakteriums Clostridium tetani
CMV-Antigen + CMV-MOCK	Zytomegalie-Virus-Antigen und Kontrolle
PHA (Phythämagglutinin):	Mitogen aus der Gartenbohne (Phaseolus vulgaris)
SEB (Staphylococcus enterotoxin β):	Bakterientoxin mit Wirkung als Superantigen
ASP <i>hyphen</i> (Aspergillus fumigatus):	Hyphen aus 1x10 ⁶ Conidien/ml
ASP <i>ppsap</i> (Aspergillus fumigatus):	Überstand aus auf Saproaggar gewachsenen Asp.fum. in 70% Alkohol gefällt
ADV (Adenovirus) + ADV-Mock	Adenovirus Antigen und Kontrolle

2.2.7 Die Durchflußzytometrische BrdU Proliferationsanalyse

2.2.7.1 Grundlagen

Werden T-Zellen durch entsprechende Mechanismen zur Proliferation angeregt, wird DNA aus Nukleosidbausteinen wie Thymidin neu synthetisiert. Durch Nachweis der Einbaurate des Thymidinanalogs 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) in das zelleigene Genom mittels FACS gelingt es, die Proliferationsfähigkeit und damit die Aktivität jeder einzelnen T-Zelle zu bestimmen. Des Weiteren können simultan weitere Verfahren, wie Oberflächenantigenbestimmungen und Zytokinnachweise, durchgeführt werden, sodass Aussagen über einzelne T-Zellsubpopulationen getroffen werden können [115].

Als etablierter Test zum Nachweis aktivierter T-Zellen gilt der [6-H₃] Thymidin Proliferationsassay. Allerdings ist keine quantitative Aussage auf Einzelebene

möglich. Vergleichend wurden beide Methoden in drei einzelnen Experimenten parallel durchgeführt und die Ergebnisse überprüft. Weiterhin wurde der Proliferationsassay in Versuchen mit Dendritischen Zellen als Stimulatorquelle in der Lymphozytenmischkultur (MLC) von freiwilligen Gesunden und pädiatrischen Patienten eingesetzt.

2.2.7.2 Durchführung der Durchflußzytometrischen BrdU (5-Bromo-2`-deoxyuridin) Proliferationsanalyse

Die Durchflußzytometrische BrdU Proliferationsanalyse wurde in abgewandelter Form nach der von Mehta und Maino 1997 beschriebenen Methode durchgeführt [115].

Es wurden in einer primären Lymphozytenmischkultur je 50 µl der auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellten Stimulator- und Responderzellen auf eine 96-Loch Rundbodenplatte mit Deckel (96-Loch-Mikrotiterplatten Rundboden *Cellstar*, Greiner, Frickenhausen und 96-Loch-Mikrotiterplatten Rundboden *Costar*, Cambridge, MA, USA) pipettiert, mit entsprechenden Antigenen versetzt und mit X Vivo 15 Kulturmedium auf 200 µl/well aufgefüllt. Die Kultur wurde für drei Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Für die letzten sechs Stunden dieser Aktivierungsphase wurden den Ansätzen 10 µl BrdU Stammlösung (60 µM Endkonzentration)/ml Zellansatz und 20 µl BFA/ml Zellen hinzugegeben. Das Uridin-Derivat BrdU stand somit für einen definierten Zeitraum für den Einbau in das Genom anstelle von Thymidin in neu synthetisierten Zellen zur Verfügung. BFA (Brefeldin A), ein Metabolit des Pilzes *Eupenicillium brefeldianum*, blockiert den intrazellulären Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und erhöht somit die Konzentration an intrazellulären Zytokinen, sodass zytokin-positive Zellen in der anschließenden FACS-Analyse besser von Hintergrundsignalen durch Autofluoreszenz unterschieden werden konnten.

Nach 72 Stunden wurde jeder einzelne Ansatz der Mikro-Lymphozytenmischkultur mit einer 200 µl Pipettierhilfe resuspendiert, vollständig abgezogen und jeder Ansatz in entsprechend gekennzeichnete 15 ml Plastikröhrchen (Greiner, Sollingen/Frickenhausen) überführt. Nach

Hinzugabe von 100 µl EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)/ml, einem Komplexbildner, wurden die Zellsuspensionen für 15 s gevortext und bei Raumtemperatur und 15° Neigung für 15 min inkubiert, die Plastikröhrchen anschließend mit kaltem PBS (PBS DULBECO`S, GIBCO BRL, Eggenstein) bis zur 15 ml Marke aufgefüllt, die Zellen resuspendiert und gewaschen (Rotixa 50 RS, Hettich: 10 min, 10 °C, 500g, Auslauf mit Bremse, Stufe 7) und das sich im Überstand befindliche überschüssiges BrdU durch Dekantieren entfernt. Die erhaltenen Zellpellets wurden durch Schütteln resuspendiert und nach Zugabe von 3 ml FACS-Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg) je Röhrchen und mildem vortexen abermals bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert und anschließend gewaschen. Die abzentrifugierten Zellen wurden in maximal 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und in getrennte FACS-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurde jedem Röhrchen 500 µl FACS-PERM (Becton Dickinson, Heidelberg) zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubationszeit schloss sich ein Waschschrift mit FACS-Puffer an. Nach Verwerfen des Überstands konnte nun jedem Zellröhrchen 5 µl der vorgesehenen FACS-Antikörper für die Intra- und Extrazellulärfärbung zugegeben werden. Die dem BrdU-Antikörper beigefügte DNase I bewirkte einen Abbau von intrazellulär gelegener Doppelstrang DNA in Oligonukleotide. Das zu einem früheren Zeitpunkt inkorporierte BrdU war somit dem BrdU-Antikörper besser zugänglich und die Detektionsrate stieg. Um die DNase Aktivität zu steigern, wurden die Proben für die ersten 2,5 Minuten der 30-minütigen Inkubationszeit im Brutschrank und mit Alufolie umwickelt aufbewahrt. Die restliche Zeit wurden sie bei Raumtemperatur gelagert. Nach Waschen der Zellen mit FACS-Puffer, Dekantieren der Zellen und Hinzugabe von einprozentiger Paraformalinlösung war der Ansatz 24 Stunden haltbar. Unmittelbar vor der geplanten durchflußzytometrischen Zellanalyse wurde das genaue Volumen pro Ansatz bestimmt und je 10 µl gut resuspendierte TruCountBeads (Becton Dickinson, Heidelberg) hinzugegeben.

2.2.7.3 Auswertung

Zur computergestützten Datenverarbeitung wurden die Softwareprogramme CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg) und WinMDI (Joseph Trotter, 1993 – 2000) eingesetzt.

Um nur die Anzahl vitaler und aktivierter T-Zellen zu bestimmen, wurden diese auf Grund ihrer Eigenschaften im FSC und SSC ausgewählt und entsprechend ihrer Charakteristika bezüglich BrdU-Einbau, Oberflächenmarkern und intrazellulärem IFN- γ untersucht. Da sich die ebenfalls im Ansatz befindlichen TrueCountBeads durch ein sehr homogenes Streuverhalten im FSC und eine hohe Streubreite im SSC auszeichnen, konnten diese recht einfach identifiziert und so deren Anzahl bestimmt werden. Zur statistischen Datenerfassung wurde das erhaltene Diagramm in vier Quadranten unterteilt und statistisch ausgewertet. So konnte der prozentuale Anteil der jeweiligen Fluoreszenzsignale in den einzelnen Quadranten ermittelt werden.

Die Angabe der absoluten Zahl an aktivierten T-Zellen mit einem bestimmten Merkmal pro μl wurde möglich, indem die Anzahl an erfassten Merkmalsträgern auf die Anzahl der in der gleichen Probe gezählten TrueCountBeads bezogen wurde. Darüber hinaus konnten die proliferierenden Zellen durch entsprechende Anordnung im zweidimensionalen Diagramm bestimmten Untergruppen wie CD 4+ oder CD 8+ Zellen, zugeordnet werden.

2.2.8 [6- H_3] Thymidin Proliferationsassay

Nach Ansatz der primären Mikro-MLC wurden die Zellen für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Für die letzten sechs Stunden wurde pro Loch eine Endkonzentration von 0,125 μl [6- H_3] Thymidin zugegeben. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Platte bei minus 20 °C eingefroren und somit die intrazelluläre DNA freigelegt. Die so entstandenen Zellfragmente konnten dann mittels Harvester (Tomtec Harvester, Wallac, Turku, Finnland) analysiert und mit den Ergebnissen aus der Durchflußzytometrischen BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridin) Proliferationsanalyse verglichen werden.

2.2.9 Der durchflußzytometrische BrdU-Proliferationsassay als Restimulationsversuch

Die Proliferationsanalyse wurde parallel zum Elispot-Assay und zum [6-H₃] Thymidin-Proliferationsassay als zusätzlicher Restimulationsversuch in einigen Versuchsreihen eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 5 Tage, sechs Stunden vor Ende wurde BrdU und BFA hinzu gegeben. Als Responder wurden Zellkulturen vor Depletion und Zellen der Negativfraktion nach Depletion, beide als Responder, eingesetzt, als Stimulatoren wurde eine Auswahl aus in Tabelle 9 aufgeführten Zellkulturen, Restimulatoren und Antigenen verwendet.

Tabelle 9:

Eingesetzte Zellfraktionen, Restimulatoren und Antigene im BrdU Restimulationsversuch

A/B* v.D.:	Primäre MLC vor Depletion (Ausgangspopulation)
A/B* N.:	Primäre MLC Negativfraktion nach Depletion
A/B* P.:	Primäre MLC Positivfraktion nach Depletion
A:	Responderzellen in pr.MLC
B:	Stimulatorzellen in pr. MLC
A*:	Restimulation mit autologen bestrahlten PMNC
B*:	Restimulation mit allogenen bestrahlten PMNC
C* :	Restimulation mit bestrahlten "third party"-Zellen
Tetanus Toxoid:	Formalinisiertes Toxin des Bakteriums Clostridium tetani
CMV-Antigen + CMV-MOCK	Zytomegalie-Virus-Antigen und Kontrolle
PHA (Phythämagglutinin):	Mitogen aus der Gartenbohne (Phaseolus vulgaris
SEB (Staphylococcus enterotoxin β):	Bakterientoxin mit Wirkung als Superantigen
ASP _{hyphen} (Aspergillus fumigatus):	Hyphen aus 1x10 ⁶ Conidien/ml
ASP _{ppsap} (Aspergillus fumigatus):	Überstand aus auf Saproaggar gewachsenen Asp.fum. in 70% Alkohol gefällt
ADV (Adenovirus) + ADV-Mock	Adenovirus Antigen und Kontrolle

2.2.10 Statistische Analyse der Ergebnisse

Die statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Corporation, 1985-2001) und SigmaPlot 2000 (SPSS Inc., 1986-2000) durchgeführt.

Alle Ergebnisse (Messwerte beziehungsweise Indizes) sind als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. Der Mittelwert ist definiert als der Durchschnitt aller ermittelten Werte einer Messreihe und wurde als arithmetisches Mittel der zu Grunde liegenden Werte berechnet.

Die Standardabweichung (Std. dev.) quantifiziert in diesem Zusammenhang die Verschiedenheit oder die Streuung einzelner Messwerte einer Messreihe. Als Grundlage hierfür wurde ein Probenkollektiv, bestehend aus minimal drei Einzelwerten, die aus unabhängigen Versuchen ermittelt worden waren, gewählt. Berechnet wurde die Standardabweichung aus der Wurzel der quadratischen Abweichungen der einzelnen Messwerte vom Mittelwert, dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen.

Der Standardfehler (Std.err.) ist ein Streuungsmaß für eine Stichprobenverteilung. Der Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes ist definiert als der Quotient aus der Standardabweichung und der Wurzel des Stichprobenumfangs. Er gilt als Maß für die Güte des ermittelten Mittelwertes.

Bewertung des Unterschiedes zwischen einzelnen Werten erfolgte durch die Berechnung des einseitigen p-Werts (one-way ANOVA). Im Hinblick auf die Signifikanzkriterien galten dabei Werte von < 0.001 (extremely significant ***), von 0.001 bis 0.01 (very significant **) und von 0.01 bis 0.05 (significant *) als signifikant. Werte > 0.05 hingegen wurden als nicht signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung von T-Lymphozytenpopulationen

Für die Generierung nicht-alloreaktiver T-Zellen wurde sieben freiwilligen gesunden Spendern Vollblut entnommen. Bei zwei Experimenten wurden die T-Zellen aus Leukapheresat gewonnen.

3.1.1 Zellausbeute

In sieben Experimenten wurden aus 120 (+/-14,14) ml Vollblut 187,03 (+/-56,14) x 10⁶ periphere mononukleäre Zellen (PBMC) auf die Kapitel 2 beschriebenen Methode generiert. In zwei Experimenten kamen als primäre Zellquelle Leukaphereseprodukte zum Einsatz. Diese enthielten pro ml 100 x 10⁶ Zellen (Versuch V9) beziehungsweise 96,77 x 10⁶ Zellen (Versuch V6).

3.1.1.1 Anteile einzelner Zellfraktionen

Bei der Depletion von alloreaktiven Zellen am CliniMACS[®], die sich der primären T-Zellstimulation mittels MLC (gemischte Lymphozytenkultur) anschloss, konnten zwei verschiedene Populationen identifiziert werden. Die eine Population war CD 25, CD 69 und HLA DR negativ, das heißt es befanden sich keine dieser aktivierten Oberflächenmarker auf den einzelnen Zellen. Diese sind als nicht-allogen anzusehen. Die andere Population war in mindestens einem der genannten Marker positiv, also alloreaktiv. In neun Experimenten waren 51,35 (+/-18,59) Prozent der Zellen positiv markiert, 48,65 (+/-18,59) Prozent der Zellen zeigten keine Markierung.

3.1.1.2 Recovery Rate

Setzt man die Anzahl der nach immunomagnetischer Depletion erhaltenen, nicht-alloreaktiven Zellen, die so genannte Negativfraktion, in Relation zur Anzahl der eingesetzten Gesamtzellzahl vor Depletion (auch Ausgangspopulation genannt), erhält man die Recovery Rate. In sieben Experimenten waren durchschnittlich 34,64 (+/- 21,97) Prozent der primär aus Vollblut gewonnenen peripheren mononukleären Zellen (PMNC) ohne allogene

Potenz, also nicht-alloreaktiv. In zwei Versuchen, hier waren als Ausgangsmaterial Leukaphereseprodukte eingesetzt worden, konnten 27,45 (+/-5,76) Prozent der primär isolierten Zellen als nicht-alloreaktiv identifiziert werden. Der Anteil der aus Vollblut erhaltenen negativen Zellfraktionen ist somit mit denen aus Leukaphereseprodukten vergleichbar (p-Wert 0,67).

3.1.1.3 Anteil nicht-alloreaktiver Zellen pro Milliliter Vollblut

Es wurden pro ml Vollblut $0,44 (+/- 0,23) \times 10^6$ Zellen isoliert. Der höchste Anteil an nicht-alloreaktiven Zellen wurde in Versuch V4 ($0,80 \times 10^6$ Zellen/ml) erzielt, der niedrigste Anteil lag bei $0,11 \times 10^6$ Zellen/ml.

3.1.1.4 Anteil nicht-alloreaktiver Zellen pro Milliliter Leukapheresat

Leukapheresat besteht aus in hoher Konzentration vorliegenden lymphatischen Zellen, die in vivo abfiltriert wurden. Die Ausbeute an negativen Zellen pro Milliliter ist, im Vergleich zur Zellgewinnung aus Vollblut, sehr viel effektiver. $24,25 (+/-5,96) \times 10^6$ Zellen ohne Oberflächenmarkierung konnten isoliert werden. Dies entspricht einem um den Faktor 55 höheren Wert.

3.1.2 Zellverluste

Schon während der Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PMNC) aus Vollblut, der dreitägigen Inkubation der primären gemischten Lymphozytenkultur (MLC), der Vorbereitung der Zellen zur magnetisch aktivierten Zellseparation (MACS) und der Depletion selbst ist mit Zellverlusten zu rechnen.

Des Weiteren stehen diejenigen Zellen nicht mehr zur magnetischen Auftrennung zur Verfügung, die nach dreitägiger Lymphozytenkultur (MLC) für die nachfolgenden Nachweismethoden und zur Restimulation entnommen wurden. Je Versuch wurden dafür 20×10^6 Zellen vor Zellseparation gewonnen.

3.1.2.1 Zellverluste nach Isolation aus Vollblut

In sieben Versuchen wurden $187,03 (+/-56,14) \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Abzüglich der 20×10^6 vorher bei Seite gestellten Zellen verblieben $167,03 (+/-$

56,14) x 10⁶ Zellen. Nach magnetisch aktivierter Zellseparation (MACS) wurden 108,63 (+/- 38,03) x 10⁶ Zellen gezählt. Der Zellverlust betrug 108,63 (+/- 38,03) x 10⁶ Zellen oder 35,71 (+/-29,97) Prozent. Dies zeigt auch Tabelle 10. Die Gesamtzahl der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) nach Depletion setzte sich nicht nur aus Responderzellen zusammen. Vor allem die Stimulatorfraktion enthielt einen gewissen Anteil an Zellen mit positiven Oberflächenmarkern. Diese Zellen trugen zur Gesamtzahl der erhaltenen positiven Zellen nach erfolgter MACS-Sortierung bei. Somit erklärt sich die in Versuch V1 größere Gesamtanzahl an Zellen nach Depletion im Vergleich zur Ausgangspopulation.

Tabelle 10:

Zellverluste in neun unabhängigen Versuchen in absoluten Zahlen und Prozent unter Verwendung von PMNC aus Vollblut ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler. Mit “ –,, markierte Werte stehen für einen Zellgewinn.

<u>Zellverluste</u>								<u>Mean (Std.dev.)</u>	<u>Std.err.</u>
Versuch Nr.	V1	V2	V3	V4	V5	V7	V8		
Ausgangszellzahl (10*6)	112,50	173,00	225,50	190,00	213,00	124,20	271,00	187,03 (+/- 56,14)	21,22
Zellzahl n. Dep. (10*6)	113,00	83,62	84,30	187,00	114,10	105,60	72,90	108,63 (+/- 38,03)	14,37
Zellverlust ges. (10*6)	-0,50	89,38	141,20	3,10	98,94	18,60	198,10	78,40 (+/- 75,59)	28,57
Zellverlust ges. (%)	-0,44	51,66	62,62	1,63	46,45	14,98	73,10	35,71 (+/- 29,97)	11,33

3.1.2.2 Zellverluste nach Isolation aus Leukapheresat

In den beiden Versuchen mit Leukapheresematerial ergaben sich durchschnittlich 50,6 (+/-3,04) Prozent Zellverlust. Bei eingeschränkter Beurteilbarkeit scheint hier die Zellverlustrate homogener beziehungsweise stabiler, wie nachfolgend Tabelle 11 zeigt.

Tabelle 11:

Zellverluste in zwei Experimenten in absoluten Zahlen und Prozent unter Verwendung von PMNC aus Vollblut ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler.

Zellverluste			Mean (Std.dev.)	Std.err.
Versuch Nr.	V6	V9		
Ausgangszellzahl (10*6)	300,00	140,00	220,00 (+/- 113,14)	80,00
Zellzahl n. Dep. (10*6)	154,70	66,15	110,43 (+/- 62,61)	44,28
Zellverlust ges. (10*6)	145,40	73,85	109,63 (+/- 50,60)	35,78
Zellverlust ges. (%)	48,45	52,75	50,60 (+/- 3,04)	2,15

3.2 Charakterisierung von T-Lymphozytenpopulationen

Um eine Aussage über die allogene beziehungsweise antigene Potenz der untersuchten T-Zellen treffen zu können, wurden diese auf ihre spezifischen Aktivierungsmarker, oder auch Oberflächenantigene, mittels Durchflußzytometrie (FACS) untersucht. Darüber hinaus wurde ihre Fähigkeit zur Proliferation im Thymidin [6-H₃]-Proliferations Assay und ihr Grad an Aktivierungsfähigkeit gegenüber allogenen Stimuli mittels Elispot-Assay charakterisiert. Des Weiteren konnte dadurch die Effizienz der Magnetisch aktivierten Zellseparation am klinischen System (CliniMACS[®]) bestimmt werden.

3.2.1 Oberflächenantigenanalyse

Die Eigenschaften CD 3 positiver Zellen hinsichtlich der drei Oberflächenaktivierungsmarker CD 25, CD 69 und HLA DR wurden an den drei folgenden Zellpopulationen untersucht:

- T-Lymphozyten nach dreitägiger MLC, nicht magnetisch separiert (Ausgangspopulation)
- T-Lymphozyten nach dreitägiger MLC, magnetisch separiert und markiert (Positivfraktion)
- T-Lymphozyten nach dreitägiger MLC, magnetisch separiert und nicht markiert (Negativfraktion)

Die drei ausgewählten Aktivierungsmarker sind ein Maß für die alloreaktive Potenz der einzelnen Zellfraktionen, wie in Vorexperimenten [138] und von Fehse et al. [52] ausführlich beschrieben.

Die Oberflächenantigenanalyse wurde nach der immunomagnetischen Separation in insgesamt neun unabhängigen Versuchen zur Oberflächenmarkeranalyse angewendet. Sie dient neben der Bestätigung der Aktivierbarkeit der eingesetzten mononukleären Zellen als Nachweisverfahren für die Effizienz der durchgeführten immunomagnetischen Zellsortierung.

3.2.1.1 Oberflächenantigenanalyse als Nachweis der Aktivierbarkeit beziehungsweise Alloreaktivität der eingesetzten Zellpopulation

In insgesamt neun unabhängigen Versuchen wurden nach dreitägiger Kultur 20×10^6 Zellen vor der magnetischen Depletion (CliniMACS[®]) entnommen und mittels Durchflußzytometrie (FACS) analysiert. Dabei zeigte sich eine durchschnittliche Aktivierungsrate der CD 3 positiven T-Zellen für einen der drei Aktivierungsmarker CD 25, CD 69 und HLA DR von 14,68 (+/-4,53) Prozent. Unterteilte man die T-Zellen in ihre zwei Subpopulationen zeigte sich, dass CD 3+/CD 4+ T-Zellen mit 7,94 (+/-2,07) Prozent um 0,31 Prozentpunkte weniger Oberflächenantigene besaßen als CD 3+/CD 8+ Zellen, von denen in neun Versuchen durchschnittlich 8,25 (+/-2,87) Prozent Aktivierungsmarker exprimierten (Tabelle 12).

Tabelle 12:

Oberflächenexpression der T-Lymphozyten der Ausgangspopulation in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC bezogen auf alle drei untersuchten Oberflächenantigene in Prozent ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler.

<u>Ausgangspopulation</u>	<u>Mean</u>	<u>(Std.dev.)</u>	<u>Std.err.</u>
CD3/CD25,CD69,HLA-DR	14,68	(+/- 4,53)	1,51
CD4/CD25,CD69,HLA-DR	7,94	(+/- 2,07)	0,69
CD8/CD25,CD69,HLA-DR	8,25	(+/- 2,87)	0,96

Untersuchte man die T-Lymphozyten auf nur jeweils eines der drei Oberflächenantigene, so zeigten sich etwas niedrigere Werte, durchschnittlich 9,15 (+/-1,30) Prozent (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13:

Oberflächenexpression der T-Lymphozyten der Ausgangspopulation in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC in Prozent bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler. Zusätzliche Angabe von Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler aller untersuchten Oberflächenmerkmale. Anm.: in V1 wurde CD 3/25 nicht untersucht.

<u>Ausgangspopulation</u>	<u>Mean</u>	<u>(Std.dev.)</u>	<u>Std.err.</u>
CD3/CD25	11,73	(+/- 3,13)	1,11
CD3/CD69	10,07	(+/- 3,63)	1,21
CD3/HLA-DR	8,23	(+/- 5,00)	1,67
Versuche V1-V9	9,15	(+/- 1,30)	0,92

Die Untersuchung der T-Lymphozyten vor der Separierung an der magnetischen Säule diente dem Nachweis einer stattgehabten Aktivierung mit entsprechenden Antigenen während der dreitägigen Inkubation. Wurden diese mit Zellfraktionen, die depletiert wurden, verglichen, ließ sich die Effektivität der magnetischen Zellsortierung nachweisen.

3.2.1.2 Oberflächenantigenanalyse als Nachweis der Effektivität der magnetisch-aktivierten Zellseparation am klinischen System (CliniMACS®)

Um möglichst reine T-Lymphozyten zu erhalten, die in der primären MLC nicht aktiviert wurden und unserer Annahme nach somit nicht-alloreaktiv waren, mussten diese von den aktivierten separiert werden. Dies gelang durch das in Kapitel 2 beschriebene Verfahren. Da möglichst reine Zellen im klinischen Versuch eingesetzt werden sollten, wurde die Depletion einer Anreicherung

vorgezogen. Letztere hätte die Zellen mit kleinsten, magnetischen Kügelchen (MicroBeads), die sich auch nach mehreren Waschvorgängen nicht vollständig aus der Zellsuspension herauslösen lassen, besetzt.

3.2.1.2.1 Oberflächenantigenanalyse der Zellfraktionen nach Depletion (CliniMACS®)

In insgesamt neun unabhängigen Versuchen wurden die erhaltenen Zellfraktionen mittels Durchflußzytometrie untersucht und mit den Ergebnissen der Ausgangspopulation verglichen. Eine Darstellung der Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen zeigen die Abbildungen 1 und 2.

Abbildung 1:

Fluoreszenz-aktivierte Zellanlyse als Vier-Quadrantenstatistik der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf ein Oberflächenantigen ausgewählter Versuche in Prozent, bezogen auf die T-Zellpopulation der jeweiligen Zellfraktion (Versuch V1-9).

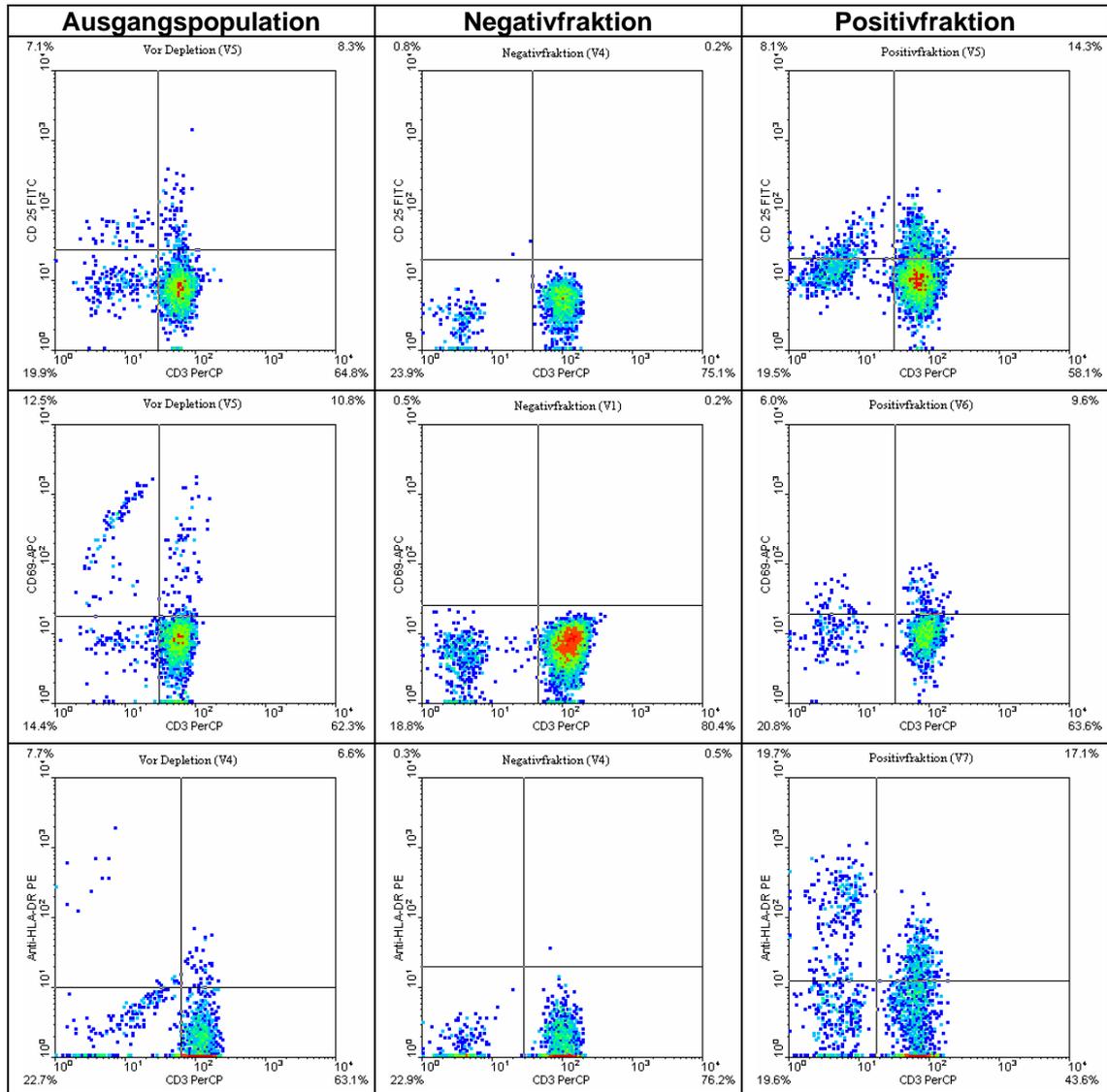
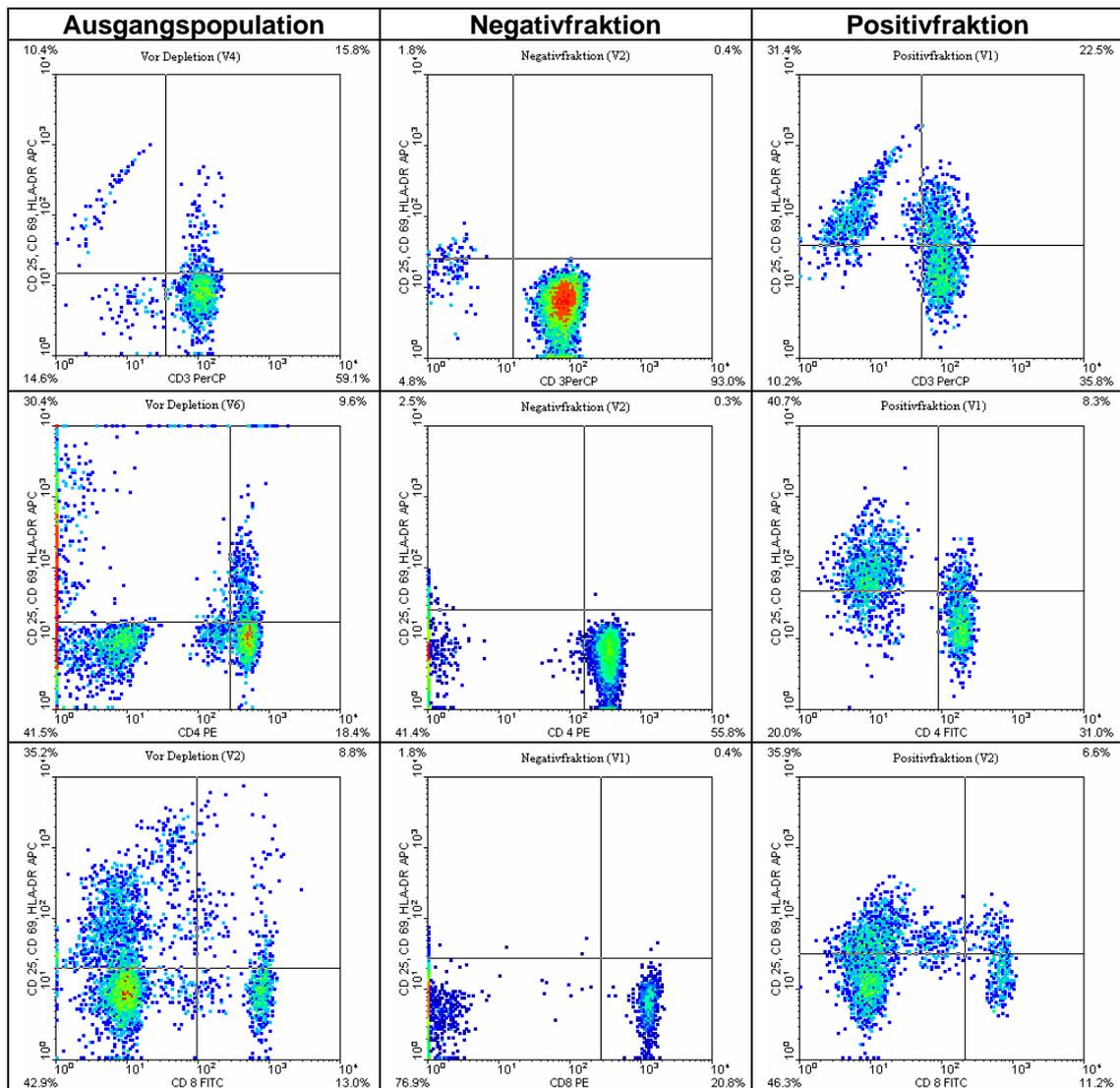


Abbildung 2:

Fluoreszenz-aktivierte Zellanlyse als Vier-Quadrantenstatistik der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf alle drei Oberflächenantigene ausgewählter Versuche in Prozent, bezogen auf die T-Zell Population der jeweiligen Zellfraktion (Versuch V1-9).



Nach erfolgreicher Separation erhielt man zwei unterschiedliche Lymphozytenpopulationen. Eine, die durch vorausgegangene magnetische Markierung ihrer exprimierten Oberflächenmoleküle an der magnetischen Säule anhaftete, diese wurde auch als „Positivfraktion“ benannt und eine zweite, die keine Aktivierungsmarker besaß, dementsprechend nicht magnetisch markiert

werden konnte, an der Säule vorbeifloss und als „Negativfraktion“ bezeichnet wurde. Die nachfolgende Oberflächenzellanalyse zeigte, dass, bezogen auf ein Merkmal, im Mittel 19,51 (+/-9,73) Prozent der als Positiv bezeichneten Zellfraktion dieses exprimierten. Auf durchschnittlich 0,58 (+/-0,26) Prozent der „Negativfraktion“ ließ sich CD 25, CD 69 oder HLA DR nachweisen. Dies entspricht einer Reinheit von 99,42 Prozent (siehe Tabelle 14). Wurden die T-Zellen auf alle drei Antigene simultan untersucht, waren im Mittel 0,78 (+/-0,40) Prozent positiv. Eine Aufteilung in T-Zelluntereinheiten ergaben für T4-Zellen mit 0,51 (+/-0,49) Prozent niedrigere Anteile an Oberflächenantigenen als für T8-Zellen, von denen durchschnittlich 0,72 (+/-0,36) Prozent Antigene aufwiesen (siehe Tabelle 15).

Tabelle 14:

Oberflächenexpression der Negativfraktion in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler. Anm.: CD3/25 wurde in V1 nicht untersucht

Negativfraktion										Mean	(Std.dev.)	Std.err.
Versuch Nr.	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9			
CD3/CD25	n.u.	0,14	0,58	0,26	0,67	0,37	0,78	0,51	0,26	0,45	(+/- 0,22)	0,08
CD3/CD69	0,20	0,26	0,24	0,78	0,46	0,26	0,71	0,29	0,45	0,41	(+/- 0,21)	0,07
CD3/HLA-DR	0,39	0,39	0,48	0,93	0,74	0,48	0,78	1,98	1,70	0,87	(+/- 0,58)	0,19
Versuche V1-9										0,58	(+/- 0,26)	0,15

Tabelle 15:

Oberflächenexpression der Negativfraktion in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf drei, simultan untersuchte Oberflächenantigene in Prozent ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler.

Negativfraktion										Mean	(Std.dev.)	Std.err.
Versuch Nr.	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9			
CD3/CD25, CD69,HLA-DR	0,45	0,58	0,21	0,90	0,67	0,58	1,14	1,54	0,91	0,78	(+/- 0,40)	0,13
CD4/CD25, CD69,HLA-DR	0,21	0,33	0,08	0,27	0,30	0,26	0,59	1,63	0,91	0,51	(+/- 0,49)	0,16
CD8/CD25, CD69,HLA-DR	0,40	1,34	0,17	1,03	0,62	0,45	0,74	0,91	0,83	0,72	(+/- 0,36)	0,12

Betrachtet man die Werte, wenn alle drei Antigene auf einmal nachgewiesen wurden, ergeben sich für die Positivfraktion für CD 3 Prozentsätze von durchschnittlich 23,14 (+/-11,65). Bei der Aufteilung in T-Zellsubpopulationen zeigten CD 4+ Zellen im Mittel mit 11,49 (+/-5,78) Prozent im Vergleich zu CD 8+ Zellen (13,55 (+/-6,71) Prozent) um 2,06 Prozentpunkte niedrigere Werte. In nachfolgenden Tabellen (Tabelle 16 und 17) sind die Ergebnisse zu jedem Versuch aufgelistet.

Tabelle 16:

Oberflächenexpression der Positivfraktion in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler. Anm.: CD 3/25 wurde in V1 nicht untersucht

Positivfraktion										Mean	(Std.dev.)	Std.err.
Versuch Nr.	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9			
CD3/CD25	n.u.	12,86	10,07	22,14	14,32	14,73	11,23	3,81	12,50	12,71	(+/- 5,13)	1,81
CD3/CD69	22,35	12,66	8,54	20,46	25,50	9,61	11,75	10,48	15,09	15,16	(+/- 6,14)	2,05
CD3/HLA-DR	43,78	31,45	27,01	29,61	24,20	27,31	17,13	28,45	46,96	30,66	(+/- 9,31)	3,10
Versuche V1-9										19,51	(+/- 9,73)	5,62

Tabelle 17:

Oberflächenexpression der Positivfraktion in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf drei, simultan untersuchte Oberflächenantigene in Prozent ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler.

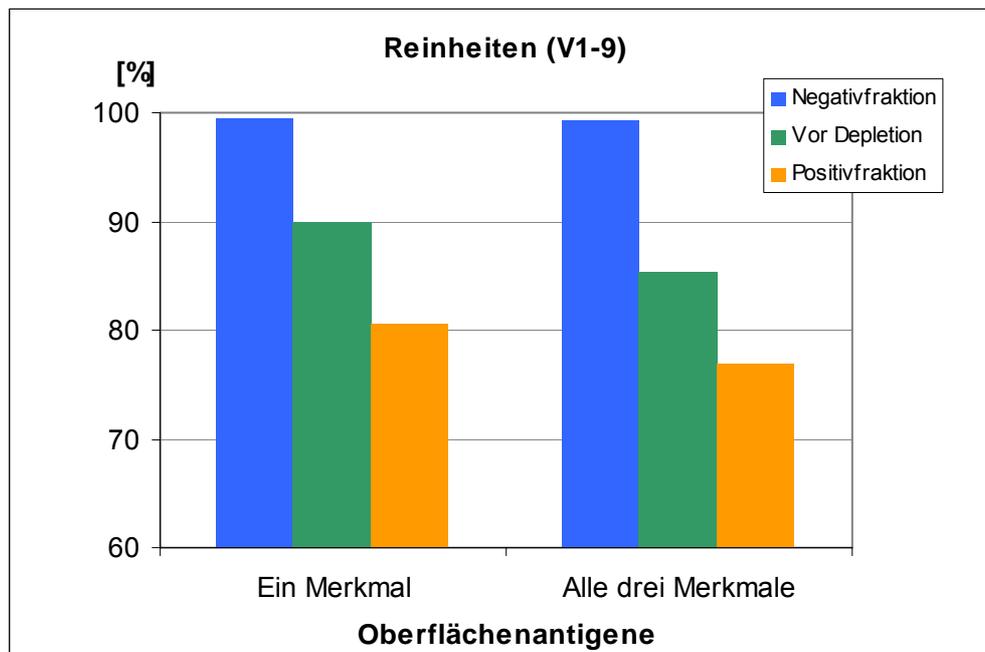
Positivfraktion										Mean	(Std.dev.)	Std.err.
Versuch Nr.	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9			
CD3/CD25, CD69,HLA-DR	22,54	10,73	6,46	33,16	32,37	10,35	27,11	25,57	39,93	23,14	(+/- 11,65)	3,88
CD4/CD25, CD69,HLA-DR	8,34	6,49	4,09	19,46	14,41	5,62	15,47	10,65	18,86	11,49	(+/- 5,78)	1,93
CD8/CD25, CD69,HLA-DR	15,27	6,55	2,88	15,45	19,81	8,17	14,59	24,51	14,76	13,55	(+/- 6,71)	2,24

3.2.1.2.2 Reinheiten der Zellfraktionen nach Depletion im Vergleich zur Ausgangspopulation

Als Maß für die Effektivität der Depletionsmethode gilt die Reinheit einer Zellfraktion, also der Anteil an Zellen, der nachweislich keine Oberflächenantigene besitzt. Die Reinheiten der in neun unabhängigen Versuchen untersuchten Zellgruppen ist in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt. Betrachtet man ein Merkmal, so reduzierte sich die Alloreaktivität der Negativfraktion auf 5,79 Prozent des Ausgangswertes. In der Positivfraktion konnte eine Erhöhung der Aktivierbarkeit um 194,91 Prozent nachgewiesen werden.

Abbildung 3:

Durchschnittliche Reinheiten der T-Zellen der drei Zellfraktionen „Negativ“, „Positiv“ und „Vor Depletion“ (=Ausgangspopulation) in neun unabhängigen Versuchen bezogen auf ein beziehungsweise alle drei untersuchten Aktivierungsmerkmale in Prozent.

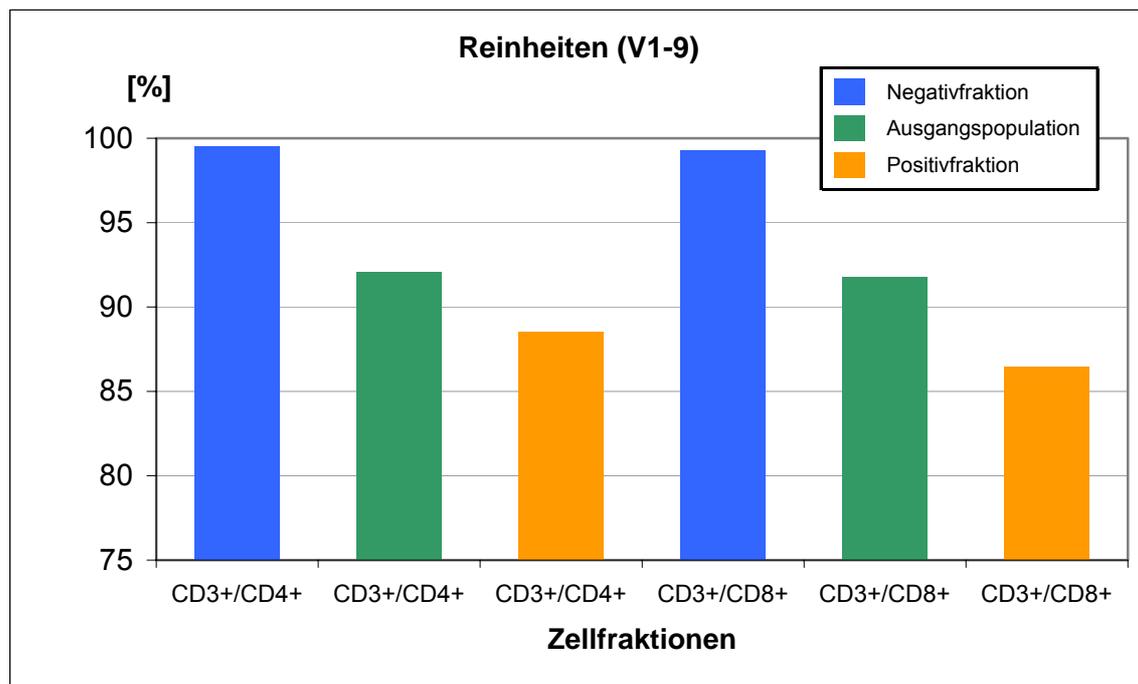


Wurden alle drei Merkmale auf einmal bestimmt, zeigte sich für die CD 3+ Negativfraktion eine Reduktion auf 5,28 Prozent des Ausgangswertes. CD 4+ T-Zellen zeigten 6,42, CD 8+ Zellen 8,73 Prozent Restaktivität.

Auf 144,01 Prozent konnte die Alloreaktivität der Positivfraktion gesteigert werden, betrachtet man alle drei Merkmale bezogen auf CD 3 positive Zellen. Unterteilt man die T-Zellen in ihre Untergruppen, ergaben sich für CD 4+ Zellen der Positivfraktion 144,71 Prozent. CD 8 positive T-Zellen ergaben mit 164,24 Prozent die höchste Alloreaktivität.

Abbildung 4:

Durchschnittliche Reinheiten der T-Zellen in drei simultan untersuchten Aktivierungsantigenen der drei Zellfraktionen „Negativ“, „Positiv“ und „Ausgangspopulation“ (=Vor Depletion) in neun unabhängigen Versuchen bezogen auf CD 4+ und CD 8+ T-Zellen.



3.2.2 Aktivierungsfähigkeit

Interferon gamma ist ein Zytokin, das von vielen verschiedenen Zellen als Zeichen der Zellaktivierung sezerniert wird. Zu den IFN-gamma produzierenden Zellen in der MLC gehören in erster Linie zytotoxische T-Zellen (CTL) und T-Helferzellen (Th1). Daneben wird IFN-gamma allerdings auch von NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten freigesetzt.

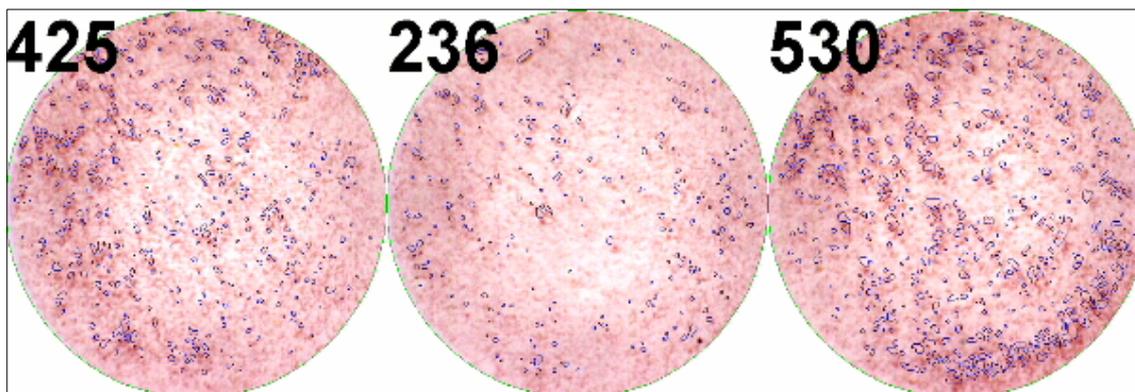
Der Interferon-Nachweis durch den so genannten EliSPOT (enzyme-linked immunospot) Assay kann unter anderem dazu herangezogen werden, die Frequenz alloreaktiver T-Lymphozyten zu ermitteln. Die Sensitivität dieser Methode, die sich lediglich auf das Registrieren von sezernierten Zytokinen beschränkt, wurde in diesem Zusammenhang mit 1/4.000 bis 1/20.000 angegeben [110]. Die sekretorische Aktivität einzelner Zellen beziehungsweise

einzelner Zellklone wird dabei ausschließlich zu dem Zeitpunkt erfasst, an dem der Zytokinnachweis durchgeführt wird.

Der in Kapitel 2 beschriebene EliSPOT Assay erlaubt eine quantitative Aussage bezüglich des sezernierten Interferon gamma. In diesem Zusammenhang wurden sowohl die primären MLC-Ansätze nach dreitägiger Kultivierung und anschließender zwanzigstündiger Restimulation als auch die gewonnenen Zellfraktionen nach Depletion und anschließender Exposition mit diversen Antigenen näher untersucht. Überall dort, wo während der Phase der Restimulation Interferon gamma produziert worden war, erschien ein Punkt auf der Nitrozellulosemembran. In Abbildung 5 ist eine solche Nitrozellulosemembran mit angefärbten Interferon gamma „spots“ graphisch dargestellt.

Abbildung 5:

Interferon gamma Nachweis mittels Enzymreaktion im EliSPOT Assay (Versuch 6): Negativfraktion versus C als Fremdantigennachweisreaktion. Gezeigt werden drei Nitrozellulosemembrankammern mit Angabe der gemessenen Punkte pro Kammer.*



Sowohl die absolute Zahl an „spots“ als auch der prozentuale Anteil, der von Punkten bedeckten Gesamtfläche, wurde anschließend von einem Messgerät aufgezeichnet. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und nachfolgend auf die unbehandelte Ausgangspopulation jeder Versuchsreihe bezogen. Die Tabellen

18 und 19 zeigen die Ergebnisse der neun unabhängigen Versuche. Tabelle 20 zeigt die dazugehörigen Korrelationen.

Tabelle 18:

Übersicht über Mittelwert und Standardabweichung aller Versuchsreihen der Ausgangspopulation, bestehend aus jeweils neun unabhängigen Versuchen im EliSPOT Assay. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 % gesetzt wurde, wiedergegeben.*

Ausgangspopulation	Mean	Std.dev.
A/B*	100,00	0,00
A/B* + A*	428,11	254,31
A/B* + B*	384,60	254,59
A/B* + C*	1538,81	3165,52
A/B*+ Tet.	478,49	605,58
A/B* + CMV	682,94	396,03
A/B* + CMVK	774,03	1131,93
A/B* + Adeno	881,68	1481,00
A/B* + AdenoK	237,96	285,34
A/B* + PHA	19016,27	29381,74

In der Population vor Depletion zeigten die Zellen gegenüber allen eingesetzten Antigenen eine erhöhte Interferon gamma Produktion. Dabei war die Aktivierung gegenüber PHA (Phythämagglutinin) erwartungsgemäß mit 19016,27 Prozent am stärksten. Die Reaktion auf PHA kann auch als Positivkontrolle gewertet werden. Sie spiegelt die Bereitschaft der Zellen wider, aktiviert zu werden. Auch gegen virale Antigene konnte eine Aktivitätssteigerung nachgewiesen werden. Eine durchschnittlich 8,81fache Steigerung der Zytokinproduktion und somit die stärkste antivirale Reaktion wurde durch Zugabe von Adenovirusantigen erzielt. In der Kontrolle zeigten sich Prozentwerte von 237,96 Prozent. Eine gesteigerte Aktivität gegenüber dem Zytomegalievirusantigen konnte ebenfalls beobachtet werden. Allerdings war die Negativkontrolle des CMV Antigens mit durchschnittlich 774,03 Prozent um 91,09 Prozentpunkte höher. Gegen das eingesetzte Fremdartigen (C*) wurden mit im Mittel 1538, 81 Prozent nur gegen PHA höhere

Zytokinsekretionen nachgewiesen. Autologe Zellen (A*) steigerten die Zytokinrate um durchschnittlich 4,28, während eine Zugabe der zuvor schon bekannten allogenen Fraktion (B*) Prozentwerte von 384,60 Prozent erzielten. Die nach Depletion erhaltene Positivfraktion (nicht dargestellt) ergab im Vergleich zu den anderen Zellfraktionen die höchsten Sekretionsraten. Schon die Positivfraktion ohne weitere Antigeninkubation sezernierte 498,20 Prozent mehr Interferon gamma als die Kontrollpopulation. Für die autologe Reaktion (vs. A*) konnten Steigerungen auf 1115,15 Prozent, für die allogene (vs. B*) 1069,94 Prozent erzielt werden. Die Inkubation mit Fremdanitigenen (vs. C*) ergab im Mittel 1350,94 Prozent.

Die antivirale Reaktion zeigte sich mit 5905,73 Prozent nach Stimulation mit dem Adenovirusantigen um den Faktor 13,28 effektiver als die Inkubation mit Zellen der Ausgangspopulation. Tetanus-Toxoid stimulierte die T-Zellen der Positivfraktion auf 1525,41 Prozent. Die Inkubation mit CMV ergab eine Aktivierung auf 3066,97 Prozent, die Kontrollstimulation ergab mit 2272,41 Prozent einen deutlich niedrigeren Wert.

Tabelle 19:

Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichung aller Versuchsreihen der Negativfraktion, bestehend aus jeweils neun unabhängigen Versuchen im EliSPOT Assay. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 % gesetzt wurde, wiedergegeben.*

Negativfraktion	Mean	Std.dev.
A/B*	39,60	37,92
A/B* + A*	201,51	286,78
A/B* + B*	165,33	189,53
A/B* + C*	418,86	732,32
A/B*+ Tet.	179,02	180,93
A/B* + CMV	355,52	415,83
A/B* + CMVK	391,73	406,22
A/B* + Adeno	444,84	512,79
A/B* + AdenoK	208,39	325,56
A/B* + PHA	16376,24	28431,47

Wie aus Tabelle 19 ersichtlich, ist PHA (Phythämagglutinin) auch für die Negativfraktion der stärkste Aktivierungsstimulus. Ihre T-Zellen sezernieren im Mittel 16,38 Mal mehr Interferon gamma im Vergleich zur unstimulierten Ausgangspopulation. Gegenüber dem Adenovirusantigen zeigte die Negativfraktion eine 444,84 prozentige Aktivitätssteigerung. Die Kontrolle hingegen stimulierte nur auf Werte von durchschnittlich 208,39 Prozent. Eine autologe Reaktion war ebenfalls nachweisbar, jedoch in geringerem Ausmaß als die der Kontrollpopulation vor Depletion, die mit 428,11 Prozent um 226,6 Prozentpunkte höher lag. Ähnlich verhielt es sich mit der allogenen Reaktion (vs. B*), sie zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe deutlich geringer. Die allogene Reaktion der Negativfraktion wurde mit 165,33 Prozent als die geringste registriert. Mehr als den 3,5 fachen Wert der Ausgangspopulation ergab die Inkubation mit CMV-Antigen. Allerdings ergab die CMV-Kontrollantigengabe mit 391,73 Prozent im Durchschnitt noch höhere Werte. Eine Aktivierung durch Tetanus-Toxoid lies die Zytokinsekretion auf 179,02 Prozent ansteigen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im EliSPOT Assay eine Reduktion der autologen Reaktion in der Negativfraktion auf 47,07 Prozent erzielt werden konnte. Auf 42,99 Prozent konnte die Alloreaktivität reduziert werden. Erhalten wurde die Fremdreaktion, sie zeigte um 1057,59 Prozent höhere Werte als die Negativreaktion, die nicht stimuliert wurde. Auch die antiviralen Eigenschaften konnten erhalten werden. Gegenüber Adenovirusantigen steigerte sich die Aktivität auf 1123,19, gegenüber CMV auf 897,67 Prozent, verglichen mit Reaktivität der Negativpopulation, die nicht inkubiert wurde. Eine Tetanus-Toxoidgabe zeigte gegenüber nicht stimulierten Zellen um den Faktor 4,52 höhere Werte. Tabelle 20 zeigt nachfolgend die Unabhängigkeit der Ergebnisse der drei unterschiedlichen Zellpopulationen (Negativfraktion, Positivfraktion und Ausgangspopulation).

Tabelle 20:

Übersicht über die p Werte aller Versuchsreihen aller Zellfraktionen, bestehend aus jeweils neun unabhängigen Versuchen im EliSPOT Assay.

Korrelation (p)	Ausgsp./Negf.	Ausgsp./Posf.	Negf./Posf.
A/B*	entfällt	entfällt	-0,19
A/B* + A*	0,60	0,92	0,21
A/B* + B*	0,21	-0,08	-0,78
A/B* + C*	0,97	0,51	0,80
A/B* + Tet.	0,01	0,76	0,38
A/B* + CMV	0,53	0,85	0,65
A/B* + CMVK	0,78	0,99	0,92
A/B* + Adeno	0,61	0,99	0,87
A/B* + AdenoK	0,87	-0,18	0,66
A/B* + PHA	0,98	1,00	1,00

3.2.3 Proliferationsfähigkeit

Im Gegensatz zu anderen Zellen zeichnen sich aktivierte T-Lymphozyten, neben der zellspezifischen Zytokinfreisetzung, auch durch die Fähigkeit aus, zu proliferieren und Zellklone zu bilden. Diese T-Zell spezifischen Proliferationseigenschaften lassen sich durch den Nachweis tritiummarkierten [6-H³] Thymidins, das im Rahmen dieser Aktivierungsvorgänge als Baustein in die DNA betroffener Zellen eingebaut wird, detektieren.

Der Nachweis von solchen Proliferationseigenschaften ist wichtig für die Charakterisierung von Zellen hinsichtlich ihres Aktivierungsgrades gegenüber allogenen und autologen Zellen.

Wie im Kapitel 2 beschrieben, wurden nach dreitägiger Inkubationsdauer jeweils 1 000 000 Zellen aus der primären MLC oder nach Aufbereitung mittels magnetisch aktivierter Zellseparation (CliniMACS[®]) verwendet und in einer sekundären Mikro-MLC für weitere fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart von [6-H³] Thymidin für weitere 15 Stunden inkubiert. Die hieraus resultierenden Daten aus neun unabhängigen Versuchen sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Tabelle 22 zeigt die entsprechenden Korrelationen.

Tabelle 21:

Durchschnittlicher Stimulationsindex und Standardabweichung der Mikro-MLCs jeder Versuchsreihe im Thymidin Proliferationsassay in neun unabhängigen Versuchen in Prozent, bezogen auf verschiedene Antigene. Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 10 0% gesetzt wurde, wiedergegeben.*

Stimulationsindex (%)	Ausgangspopulation	Negativfraktion	Positivfraktion
A/B*	100,00 (+/- 0,00)	15,56 (+/- 19,78)	90,15 (+/- 87,20)
A/B* + A*	124,50 (+/- 51,74)	5,77 (+/- 18,39)	120,85 (+/- 109,36)
A/B* + B*	424,90 (+/- 359,65)	457,40 (+/- 897,30)	763,48 (+/- 879,50)
A/B* + C*	506,22 (+/- 364,01)	1260,22 (+/- 2492,97)	577,43 (+/- 676,23)

Tabelle 22:

Übersicht über die p Werte aller Versuchsreihen aller Zellfraktionen, bestehend aus jeweils neun unabhängigen Versuchen im Thymidin Proliferationsassay

p-Wert	Ausgspop./Negativfraktion	Ausgspop./Positivfraktion	Negativfraktion/Positivfraktion
A/B*	entfällt	entfällt	0,13
A/B* + A*	0,06	0,19	0,07
A/B* + B*	0,93	0,93	0,85
A/B* + C*	0,37	0,51	0,94

Im Vergleich der Negativfraktion mit der ohne Antigenzusatz behandelten Ausgangszellfraktion, zeigten sich für die negativen Zellen deutlich reduzierte Proliferationsindizes gegenüber autologen Zellen (A*). Im Mittel zeigten diese einen Index von 5,77 (+/-18,39) Prozent, dies entspricht gegenüber Autolog einer um 95,36 Prozent geringeren Aktivität verglichen mit Zellen der Ausgangspopulation. Das Maß an Autoaggressivität reduzierte sich auf 4,64 % der Aktivität vor Depletion.

Ein wichtiger Faktor zur Bestimmung der Häufigkeit des GVH Effekts in vivo ist die Reaktion gegenüber potentiellen Empfängerzellen (B*). Die Ausgangspopulation zeigte einen Aktivitätsindex von durchschnittlich 424,90 (+/-359,65) Prozent, Negative Zellen mit 457,40 (+/-897,30) Prozent vergleichbare Werte. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche zeigten eine große Variationsbreite. Die geringste Anzahl an counts zeigte sich gegen (B*) in Versuch 1 (Index von 3,68 Prozent). Mit 763,48 (+/-879,49) Prozent zeigte die

Positivfraktion erwartungsgemäß die höchsten durchschnittlichen Werte an. Eine weitere Anforderung an immunkompetente Zellen ist ihre verbliebene Potenz, Fremdantigene zu erkennen. Hier zeigten Negativzellen einen durchschnittlichen Aktivitätsindex von 1260,22 (+/-2492,97) Prozent und waren somit um den Faktor 2,18 potenter als die Positivfraktion (577,43 (+/-676,23) Prozent).

3.2.4 Vergleich der eingesetzten Versuchsmethoden

Die Voraussetzungen, die an in vitro generierte T-Zellen zum Einsatz in vivo gestellt werden, wurden in den oben aufgeführten Methoden untersucht. Dabei muss an erster Stelle eine möglichst geringe Alloreaktivität bestätigt werden. Darüber hinaus sollte eine erhaltene Aktivität gegen Fremdantigene nachweisbar sein.

3.2.4.1 Alloreaktivität im Methodenvergleich

In insgesamt neun unabhängigen Versuchen wurde die nach Depletion erhaltene Negativfraktion hinsichtlich ihrer Aktivität gegen Empfängerzellen, mit denen sie in der primären MLC bereits stimuliert wurde, untersucht. Sowohl in der FACS Analyse als auch in der EliSPOT Untersuchung zeigten sich deutlich reduzierte Alloreaktivitäten im Vergleich zur Ausgangspopulation. Einzig im [6-H³] Proliferationsassay konnte dies nicht bestätigt werden. Die einzelnen Zahlenwerte sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23:

Alloreaktivität der Negativfraktion im Methodenvergleich, bezogen auf die jeweilige Ausgangspopulation in Prozent.

Alloreaktivität der Negativfraktion im Methodenvergleich (%)	Reduktion auf	Steigerung auf	Reduktion um	Steigerung um
Facs Analyse	5,31		94,69	
Elispot Assay	42,99		57,01	
[6-H ³] Proliferationsassay		107,65		7,65

3.2.4.2 Aktivität gegen autologe Zellen im Methodenvergleich

Wie aus Tabelle 24 zu entnehmen ist, zeigte sowohl der EliSPOT Nachweis als auch der Thymidineinbau reduzierte autologe Reaktionen, wobei in zweiterer Nachweisreaktion deutlich geringere Aktivitäten gemessen wurden, nämlich eine durchschnittliche Reduktion der Reaktion auf 4,63 Prozent Restaktivität, was einer Reduktion im Vergleich zur Ausgangspopulation um 95,37 Prozent entspricht.

Tabelle 24:

Autologe Reaktivität der Negativfraktion im Methodenvergleich, bezogen auf die jeweilige Ausgangspopulation in Prozent.

Autoreaktivität der Negativfraktion im Methodenvergleich (%)	Reduktion auf	Reduktion um
Elispot Assay	47,07	52,93
[6-H3] Proliferationsassay	4,63	95,37

Eine Korrelation beider Testmethoden ergab einen p Wert von 0,88. Die beiden Methoden weisen also keinen signifikanten Unterschied auf. Korreliert man die Oberflächenantigenanalyse mittels Facs Analyse mit der EliSPOT Methode, ergibt sich ein p Wert von 0,62. Auch diese beiden Versuchsmethoden erzielen vergleichbare Ergebnisse.

3.3 Dendritische Zellen als Stimulatorquelle

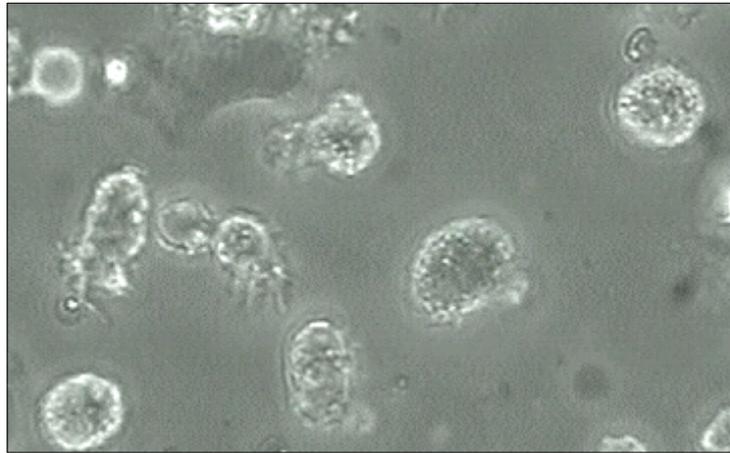
Dendritische Zellen (DC) sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems [167].

Sie nehmen eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von naiven T-Zellen ein [80].

Abbildung 6 zeigt eine solche Kultur.

Abbildung 6:

Dendritische Zellkultur nach siebentägiger Anzucht. Charakteristisch sind die ausgebildeten Zellausläufer, wie zentral bei 9 Uhr zu sehen.



Um eine möglichst hohe Aktivierung der Responderzellen in der primären MLC (gemischte Lymphozytenkultur) zu erzielen, wurden in drei unabhängigen Versuchen Dendritische Zellen isoliert und in der primären MLC (Lymphozytenmischkultur) als Stimulatoren eingesetzt. Die Generierung von Dendritischen Zellen erfolgte in einer Monozytenmonokultur. Zum einen, weil möglichst reine Endprodukte entstehen sollten und zum anderen, weil die in den peripheren mononukleären Zellen (PMNC) enthaltenen T-Zellen für Restimulationsversuche verwendet wurden. Da ihre Herstellung langwierig ist und die Zellausbeute nur gering, wurden von freiwilligen Probanden mehrfach Dendritische Zellen hergestellt und bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C gelagert.

3.3.1 Quantifizierung der eingesetzten Zellfraktionen

Für die Generierung nicht-alloreaktiver T-Zellen wurde in zwei Fällen auf Leukapheresat zurückgegriffen, für das dritte Experiment stand ein freiwilliger gesunder Spender zur Verfügung.

3.3.1.1 Dendritische Zellen

Als Stimulatorquelle wurden in drei Experimenten aus durchschnittlich 33,33 (+/-9,43) ml Vollblut $56,43 \times 10^6$ (+/-14,88) PMNCs und daraus wiederum $16,07 \times 10^6$ Dendritische Zellen nach der in Kapitel 2 näher beschriebenen Methode generiert. Das entspricht einer mittleren Ausbeute von $0,48 \times 10^6$ Zellen/ml.

3.3.1.2 Periphere Mononukleäre Zellen

In drei Experimenten wurden im Mittel 232 (+/-62,99) $\times 10^6$ periphere mononukleäre Zellen (PBMC) als Responderzellfraktion auf die in Kapitel 2 beschriebene Methode generiert.

3.3.1.2.1 Anteile einzelner Zellfraktionen

Bei der Depletion von alloreaktiven Zellen am CliniMACS[®], die sich der primären T-Zellstimulation mittels MLC (gemischte Lymphozytenkultur) anschloss, konnten zwei verschiedene Populationen identifiziert werden. Die eine Population war CD 25, CD 69 und HLA DR negativ, das heißt es befanden sich keine dieser aktivierten Oberflächenmarker auf den einzelnen Zellen. Diese galt als nicht-allogen reaktiv. Die andere Population war in mindestens einem der genannten Marker positiv, und somit alloreaktiv. In drei Experimenten waren im Mittel 47,67 Prozent der Zellen positiv markiert, 52,33 Prozent der Zellen zeigten keine Markierung.

3.3.1.2.2 Recovery Rate

Setzt man die Anzahl der nach immunomagnetischer Depletion erhaltenen nicht-alloreaktiven Zellen, die so genannte Negativfraktion, in Relation zur Anzahl der eingesetzten Gesamtzellzahl vor Depletion (Ausgangspopulation), erhält man die Recovery Rate. In drei Experimenten waren durchschnittlich 37,92 (+/-7,76) Prozent der gewonnenen peripheren mononukleären Zellen (PMNC) ohne allogene Potenz und somit nicht-alloreaktiv.

3.3.1.2.3 Zellverluste nach Isolation

Schon während der Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PMNC) aus Vollblut, während der dreitägigen Inkubation der primären gemischten Lymphozytenkultur (MLC), während der Vorbereitung der Zellen zur magnetisch aktivierten Zellseparation (MACS) und bei der Depletion selbst ist mit Zellverlusten zu rechnen.

Des Weiteren stehen diejenigen Zellen nicht mehr zur magnetischen Auftrennung zur Verfügung, die nach dreitägiger Lymphozytenkultur (MLC) für die nachfolgenden Nachweismethoden und zur Restimulation entnommen wurden. Je Versuch wurden dafür 20×10^6 Zellen vor Zellseparation gewonnen. In drei Versuchen wurden im Mittel $232 (+/-62,99) \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Abzüglich der für Restimulationsversuche benötigten 20×10^6 Zellen verblieben $212 (+/- 62,99) \times 10^6$ Zellen. Nach magnetisch aktivierter Zellseparation (MACS) wurden $147,25 (+/- 43,15) \times 10^6$ Zellen gezählt. Der Zellverlust betrug $84,75 (+/- 23,67) \times 10^6$ Zellen oder $36,53 (+/-23,67)$ Prozent.

3.3.1.2.4 Expansion der Negativfraktion

Nach Depletion standen durchschnittlich $55,83 \times 10^6$ Zellen ohne Oberflächenantigene zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung. Ein Teil wurde zurückbehalten und nach der in Kapitel 2 aufgeführten Methode weiter expandiert. Diese Zellen konnten im Anschluss in weiteren Restimulationsversuchen eingesetzt werden. Aus durchschnittlich $16,59 (+/- 7,38) \times 10^6$ Zellen entstanden nach 7 d Inkubation $19,21 (+/-4,58) \times 10^6$ vitale Zellen. Das entspricht einer Expansionsrate von $129,17 (+/-30,17)$ Prozent. In zwei Experimenten ist eine Expansion gelungen, in einem weiteren Versuch zeigte sich nach der siebentägigen Inkubation mit Expansionsbeads im Vergleich zur Ausgangspopulation eine geringere Anzahl an vitalen Zellen (siehe auch Tabelle 25).

Tabelle 25:

Zellausbeute (absolut und in Prozent) der Expansionsfraktion in drei unabhängigen Versuchen. Zusätzliche Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Expansion der Negativfraktion				Mean	Std.dev.	
Versuch Nr.		D1	D2	D3		
Ausgangspopulation	(Mio.)	25,90	7,86	16,00	16,59	7,38
nach 7d Inkubation	(Mio.)	23,22	12,80	21,60	19,21	4,58
Rate	(%)	89,65	162,85	135,00	129,17	30,17

3.3.2 Charakterisierung der eingesetzten Lymphozytenpopulationen

Um eine Aussage über die Aktivierbarkeit beziehungsweise allogene Potenz der untersuchten T-Zellen treffen zu können, wurden diese auf ihre spezifischen Aktivierungsmarker, oder auch Oberflächenantigene, mittels Durchflußzytometrie (FACS) untersucht. Darüber hinaus wurde ihre Fähigkeit zur Proliferation im Thymidin [6-H₃] Proliferations Assay und ihr Grad an Aktivierungsfähigkeit gegenüber allogenen Stimuli mittels EliSPOT Assay charakterisiert. Die Durchflußzytometrische BrdU Proliferationsanalyse stellt ein weiteres Verfahren zur Proliferationsanalyse, allerdings auf Einzelzellebene, dar. Sie wurde in den drei Versuchen, in denen Dendritische Zellen eingesetzt wurden, durchgeführt. Des Weiteren sollte in den Versuchen D1 bis D3 die expandierte Negativfraktion in Restimulationsversuchen näher charakterisiert werden. Schließlich konnten mittels FACS Analyse die Oberflächenmarker der gewonnenen Dendritischen Zellen untersucht werden.

3.3.2.1 Oberflächenantigenanalyse

3.3.2.1.1 Dendritische Zellen

Die Generierung von Dendritischen Zellen erfolgte in einer Monozytenmonokultur. Am siebten Tag konnten diese geerntet und mittels FACS Analyse näher untersucht werden. Da die Antigenprozessierung vom Aktivierungs- und Differenzierungszustand der Dendritischen Zellen abhängt [81] und dementsprechend nur aktivierte Dendritische Zellen die Fähigkeit besitzen, naive T-Zellen zu stimulieren, wurden diese nicht nur auf ihre

charakteristischen Oberflächenantigene (CD 80, 83 und 86), sondern auch auf den allgemeinen Aktivierungsmarker HLA DR untersucht.

Es wurden diejenigen Zellen als Dendritische Zellen gewertet, die weder T- oder B-, noch NK Zelleigenschaften besaßen, also für CD3, CD14, CD19 und CD56 negativ waren. In Tabelle 26 sind die Ergebnisse dreier Versuche aufgeführt.

Tabelle 26:

Oberflächenantigenexpression Dendritischer Zellen in drei Versuchen in Prozent. Zusätzliche Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Oberflächenantigene (%)				Mean	Std.dev.
Versuch Nr.	D1	D2	D3		
CD 80	53,19	45,62	47,80	48,87	3,18
CD 83	20,35	24,00	67,20	37,18	21,28
CD 86	57,17	39,86	72,08	56,37	13,17
HLA-DR	59,00	61,92	78,79	66,57	8,72

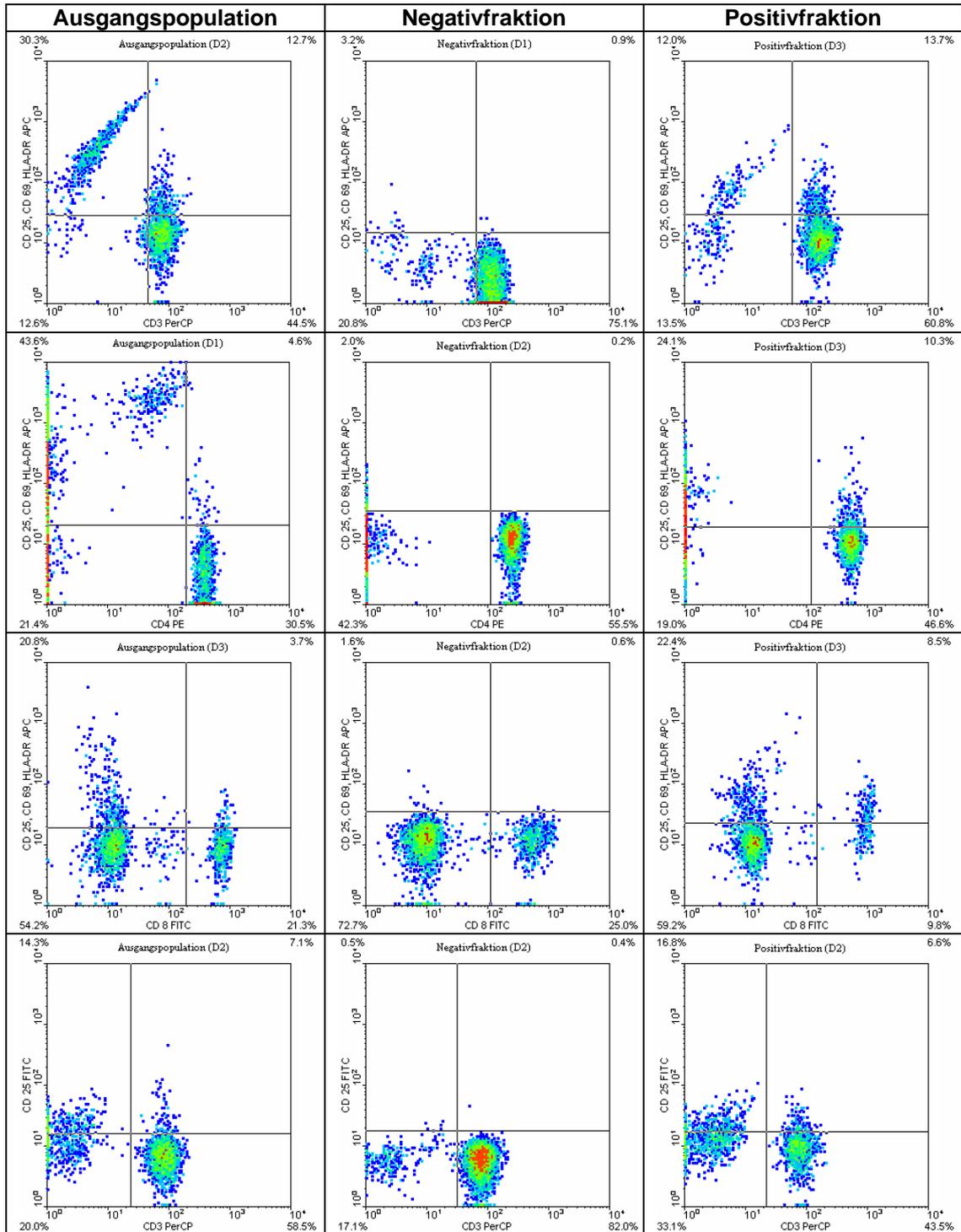
Die höchste Expression wurde mit durchschnittlich 56,37 (+/-13,17) Prozent für CD 86 positive Zellen registriert. Die geringsten Werte zeigte CD 83 mit 37,18 (+/-21,28) Prozent. Ein hoher Grad an Aktivierung zeigt HLA DR an. Es erzielte in jedem Einzelversuch die höchsten Werte und war bei nahezu zwei Drittel (66,57 (+/-8,72) Prozent) aller Zellen nachweisbar.

3.3.2.1.2 Oberflächenantigenanalyse der T-Zellpopulationen

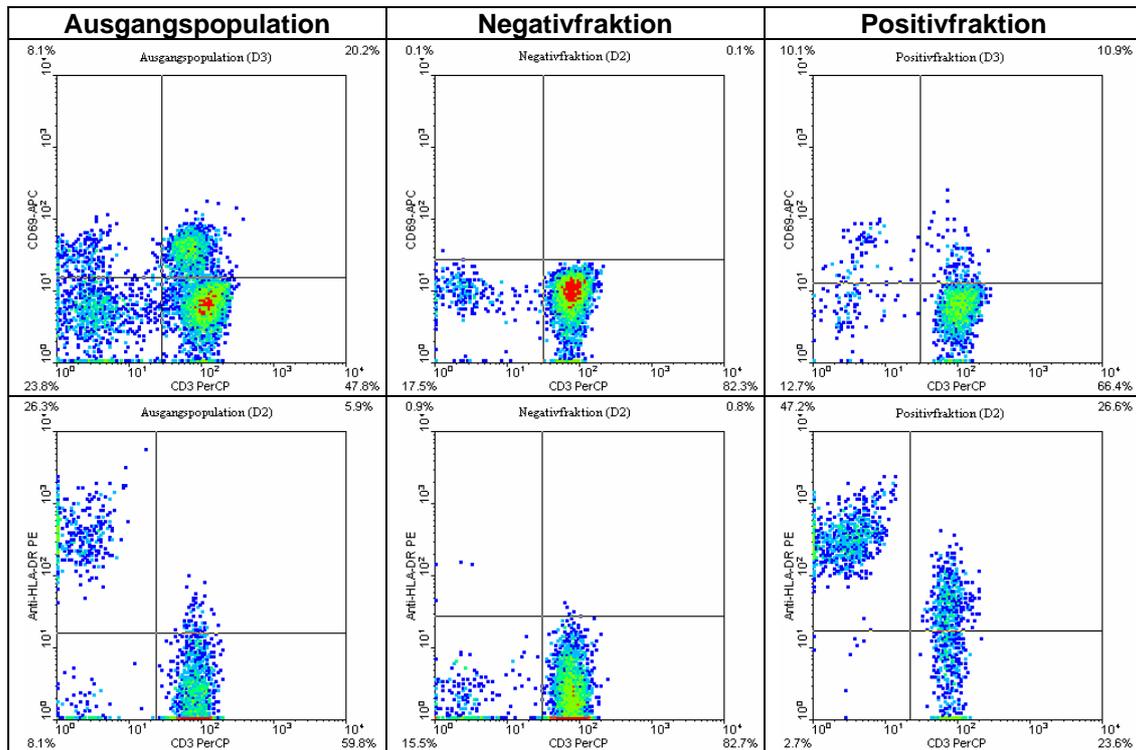
Nach erfolgreicher Depletion am magnetischen Zellseparator CliniMACS® erfolgte die Oberflächenantigenanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS). Die Auswertung erfolgte über eine Vier-Quadrantenstatistik. Die Ergebnisse aller drei untersuchten Zellpopulationen zeigt Abbildung 7.

Abbildung 7:

Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse als Vier-Quadrantenstatistik der einzelnen Zellfraktionen ausgewählter Versuche in Prozent. Die untersuchten Oberflächenantigene wurden auf die T-Zellpopulation der jeweiligen Zellfraktion bezogen (Versuch D1-3).



Fortsetzung Abbildung 7:



Dabei konnte in der Negativfraktion eine deutliche Abnahme der für einen beziehungsweise mehrere Antigene positiven Oberflächenantigene gemessen werden. Im Mittel zeigten diese T-Zellen im Vergleich zur Ausgangspopulation eine Reduktion der Ausprägung in einem Oberflächenmerkmal auf 2,88 Prozent. Es liegt somit eine Minderung um 97,12 Prozent vor. Betrachtet man Untersuchungen, bei denen alle drei Merkmale auf einmal getestet wurden, so zeigten CD 3 positive Zellen eine mittlere Aktivität von 0,74 (+/-0,06) Prozent der untersuchten Zellgruppe. Dies entspricht, bezogen auf die Ausgangspopulation, einer Reduktion auf 6,09 Prozent. Für CD 4 positive Zellen ergab die Messung eine Oberflächenmarkerverteilung von 0,24 (+/-0,00) Prozent. Das entspricht einer Reduktion um 96,79 Prozent. CD 8 positive T-Zellen zeigten in durchschnittlich 0,64 Prozent aller Fälle eine Markierung. Die Ergebnisse aller drei Versuche sind in Tabelle 27 und Tabelle 28 zusammengestellt.

Tabelle 27:

Oberflächenexpression der Negativfraktion nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Negativfraktion				Mean	Std.dev.
Versuch Nr.	D1	D2	D3		
CD3/CD25	0,32	0,41	0,05	0,26	0,15
CD3/CD69	0,07	0,09	0,23	0,13	0,07
CD3/HLA DR	0,74	0,76	0,37	0,62	0,18
Versuch D1-3				0,34	0,21

Tabelle 28:

Oberflächenexpression der Negativfraktion nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf drei parallel untersuchte Oberflächenantigene in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Negativfraktion				Mean	Std.dev.
Versuch Nr.	D1	D2	D3		
CD3/CD25,CD69,HLA DR	0,83	0,71	0,68	0,74	0,06
CD4/CD25,CD69,HLA DR	0,23	0,24	0,24	0,24	0,00
CD8/CD25,CD69,HLA DR	0,94	0,55	0,42	0,64	0,22

Die zweite Zellpopulation, die so genannte Positivfraktion, zeigte die in nachfolgenden Tabellen 29 und 30 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 29:

Oberflächenexpression der Positivfraktion nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Positivfraktion				Mean	Std.dev.
Versuch Nr.	D1	D2	D3		
CD3/CD25	6,44	6,62	13,22	8,76	3,15
CD3/CD69	4,13	8,69	10,89	7,90	2,82
CD3/HLA DR	5,51	26,64	16,36	16,17	8,63
Versuch D1-3				10,94	3,71

Tabelle 30:

Oberflächenexpression der Positivfraktion nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf drei parallel untersuchte Oberflächenantigene in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Positivfraktion				Mean	Std.dev.
Versuch Nr.	D1	D2	D3		
CD3/CD25,CD69,HLA-DR	10,51	22,33	13,67	15,50	5,00
CD4/CD25,CD69,HLA-DR	4,74	12,08	10,30	9,04	3,13
CD8/CD25,CD69,HLA-DR	8,23	7,21	8,51	7,98	0,56

Bezogen auf alle drei Merkmale, zeigten die als positiv bezeichneten T-Zellen im Vergleich zur Ausgangspopulation höhere Prozentwerte. Die höchste Ausprägung zeigte sich bei CD 8 positiven Zellen mit 7,98 (+/- 0,56) Prozent, dies ist eine Steigerung zur Ausgangsaktivität auf 166,55 Prozent. Eine 122,66 prozentige Steigerung wurden für CD 4 positive T-Zellen gezählt. Mit 15,50 (+/- 5,00) Prozent steigerten sich CD 3 positiven Zellen um 27,53 Prozent. Tabelle 31 und Tabelle 32 zeigen die Ergebnisse der Ausgangspopulation en detail.

Tabelle 31:

Oberflächenexpression der Ausgangspopulation nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Ausgangspopulation				Mean	Std. dev.
Versuch Nr.	D1	D2	D3		
CD3/CD25	10,63	7,06	26,77	14,82	8,57
CD3/CD69	10,74	7,24	20,23	12,74	5,49
CD3/HLA DR	7,91	5,88	9,18	7,66	1,36
Versuch D1-3				11,74	3,01

Tabelle 32:

Oberflächenexpression der Ausgangspopulation nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf drei parallel untersuchte Oberflächenantigene in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Ausgangspopulation				Mean	Std. dev.
Versuch Nr.	D1	D2	D3		
CD3/CD25,CD69,HLA-DR	10,00	12,69	13,78	12,16	1,59
CD4/CD25,CD69,HLA-DR	4,64	8,04	9,43	7,37	2,01
CD8/CD25,CD69,HLA-DR	6,81	3,88	3,69	4,79	1,43

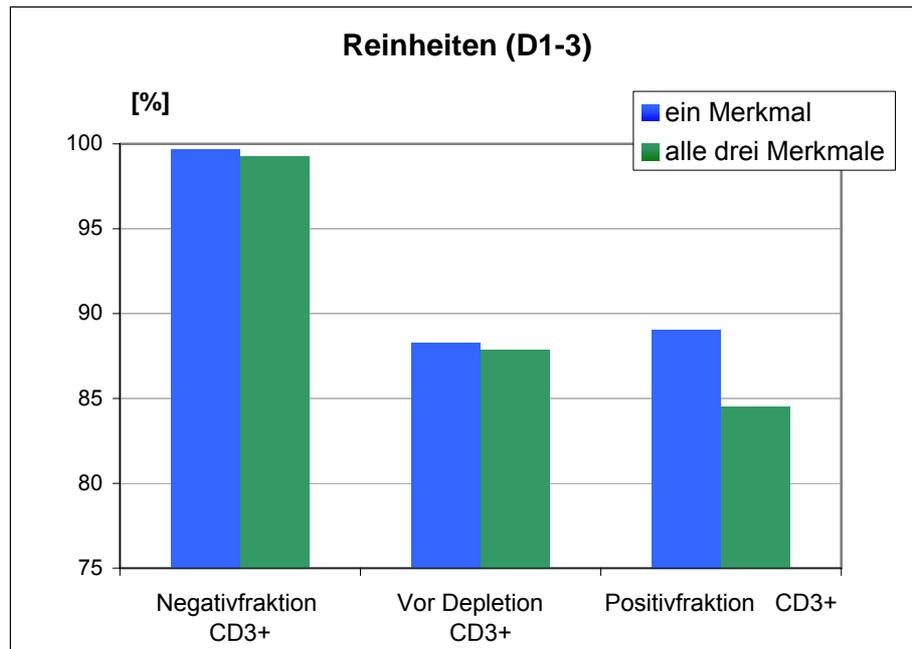
3.3.2.1.3 Reinheiten der Zellfraktionen nach Depletion im Vergleich zur Ausgangspopulation

Als Maß für die Effektivität der Depletionsmethode gilt die Reinheit einer Zellfraktion, also der Anteil an Zellen, der nachweislich keine Oberflächenantigene besitzt. Die Reinheiten der in drei unabhängigen Versuchen untersuchten Zellgruppen ist in Abbildung 8 und 9 dargestellt.

Betrachtet man ein Merkmal, so reduzierte sich die Alloreaktivität der Negativfraktion auf 2,88 Prozent des Ausgangswertes. Auch die Positivfraktion zeigte mit 93,24 Prozent eine geringere Aktivierbarkeit als die Ausgangspopulation.

Abbildung 8:

Durchschnittliche Reinheiten der T-Zellen der drei Zellfraktionen Neg, Pos und Ausgangspopulation (vor Depletion) in drei unabhängigen Versuchen bezogen auf ein beziehungsweise alle drei untersuchten Aktivierungsmerkmale in Prozent (D1-3.)

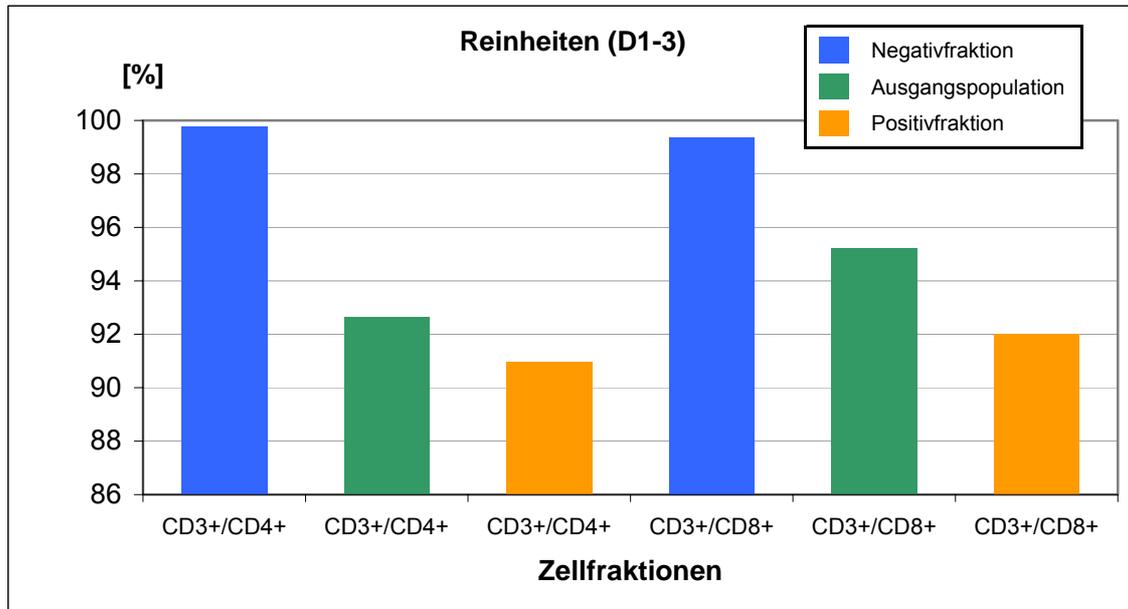


Wurden alle drei Merkmale auf einmal bestimmt, zeigte sich für die CD 3+ Negativfraktion eine Reduktion auf 6,09 Prozent des Ausgangswertes. CD 4+ T-Zellen zeigten 3,21, CD 8+ Zellen 13,28 Prozent Restaktivität.

Auf 127,53 Prozent konnte die Alloreaktivität der Positivfraktion gesteigert werden, betrachtet man alle drei Merkmale bezogen auf CD 3 positive Zellen. Unterteilt man die T-Zellen in ihre Untergruppen, ergaben sich für CD 4+ Zellen der Positivfraktion 122,66 Prozent. CD 8 positive T-Zellen ergaben mit 166,55 Prozent die höchste Alloreaktivität.

Abbildung 9:

Durchschnittliche Reinheiten der T-Zellen in drei simultan untersuchten Aktivierungsantigenen der drei Zellfraktionen Neg, Pos und Vor Depletion in drei unabhängigen Versuchen bezogen auf CD 4+ und CD 8+ T-Zellen (D1-3).



3.3.2.1.4 Reinheiten im Methodenvergleich

Die Effizienz der durchgeführten magnetisch aktivierten Zellseparation (CliniMACS®) lässt sich an der Reinheit der Negativfraktion messen. Vergleicht man die Ergebnisse der mit Dendritischen Zellen inkubierten Responderzellfraktion mit Zellen aus der Kultur mit PMNCs, so zeigt sich, dass erstere reinere Negativfraktionen bildeten. In allen untersuchten Merkmalen zeigten sich höhere Prozentsätze, durchschnittlich 0,16 Prozentpunkte.

Tabelle 33:

Gemittelte Reinheiten der Negativfraktion beider Versuchsreihen in Prozent, bezogen auf drei beziehungsweise ein untersuchtes Aktivierungsmerkmal der FACS Analyse.

Negativfraktion			
Versuch Nr.		D1-3	V1-9
alle drei Merkmale			
Neg.	CD3+/CD4+	99,76	99,49
Neg.	CD3+/CD8+	99,36	99,28
Neg.	CD3+	99,26	99,22
ein Merkmal			
Neg.	CD3+	99,66	99,42

Vergleicht man die Ergebnisse der neun Versuche mit PMNC als Stimulatorquelle mit den drei Experimenten, die mit Dendritischen Zellen durchgeführt wurden, sind sich die beiden Versuchsreihen im Ergebnis sehr ähnlich. Korreliert man CD 3 positive Zellen, bezogen auf ein Merkmal, erhält man einen Koeffizient von 0,83. In allen drei Merkmalen zeigten die beiden Reihen eine Übereinstimmung von 0,99. Betrachtet man die durchschnittlichen Prozentwerte der T-Zellunterpopulationen, sind diese mit 0,95 ebenfalls vergleichbar (siehe auch Tabelle 33).

3.3.2.1.4.1 Alloreaktivität

Ein Maß für die Alloreaktivität von Zellpopulationen ist ihr Anteil an aktivierten Zellen. Vergleicht man die nach magnetisch aktivierter Zellseparation am CliniMACS[®] erhaltenen Zellpopulationen, zeigt die Negativfraktion, bezogen auf die Ausgangspopulation, die niedrigsten Anteile. Ein Vergleich zwischen neun Versuchen, bei denen periphere mononukleäre Zellen (PMNC) verwendet wurden und drei Experimenten, bei denen Dendritische Zellen als Stimulatoren eingesetzt wurden, ergab die in Tabelle 34 dargestellten Werte.

Tabelle 34:

Alloreaktivitätsindex in Prozent und Korrelation (p Wert) der Versuchsreihen V1-9 mit D1-3 der einzelnen Zellpopulationen in der FACS Analyse, bezogen auf die jeweilige Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde.

Alloreaktivitätsindex			p-Wert
Versuch Nr.	D1-3 FACS	V1-9 FACS	
alle drei Merkmale			0,99
Neg. CD3+/CD4+	3,21	6,42	
Pos. CD3+/CD4+	122,66	144,71	
Neg. CD3+/CD8+	13,28	8,73	
Pos. CD3+/CD8+	166,55	164,24	
Neg. CD3+	6,09	5,31	1,00
Pos. CD3+	127,53	157,63	
ein Merkmal			1,00
Neg. CD3+	2,88	5,79	
Pos. CD3+	93,24	134,97	

Vergleicht man die Alloreaktivitätsindizes beider Zellpopulationen, zeigt sich eine deutliche Korrelation. Bezogen auf alle drei Merkmale, wurde ein Index von 0,99 erzielt. Wurden CD 3 positive Zellen auf ein Oberflächenantigen untersucht, zeigten sich jeweils Indices von 1,00.

Betrachtet man die Höhe der Alloreaktivitätsindizes, zeigten die untersuchten T-Zellen der Versuchsreihe mit PMNCs nach Depletion in der Positiv- wie in der Negativfraktion höhere Werte als T-Zellen, die mit Dendritischen Zellen inkubiert worden waren. Da diese Werte auf die jeweilige Ausgangspopulation bezogen wurden, lohnt sich eine nähere Betrachtung. Vergleicht man die beiden Ausgangsfraktionen, zeigte sich für die mit Dendritischen Zellen inkubierte Versuchsreihe D1-D3 ein höherer Prozentsatz an aktivierten Zellen, wenn man ein Merkmal untersuchte. Es waren im Mittel 11,74 (+/-3,01) Prozent der Zellen markiert. Wurden alle drei Oberflächenantigene gleichzeitig untersucht, zeigten mit PMNC inkubierte Zellen höhere Aktivierungsmarker.

3.4 Aktivierungsfähigkeit

Interferon gamma ist ein Zytokin, das von vielen verschiedenen Zellen als Zeichen der Zellaktivierung sezerniert wird. Zu den Interferon gamma produzierenden Zellen in der MLC gehören in erster Linie zytotoxische T-Zellen (CTL) und T-Helferzellen (Th1). Daneben wird IFN-gamma allerdings auch von NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten freigesetzt.

Der IFN-Nachweis durch den so genannten EliSPOT (enzyme-linked immunospot) Assay kann unter anderem dazu herangezogen werden, um die Frequenz alloreaktiver T-Lymphozyten zu ermitteln.

Der in Kapitel 2 beschriebene EliSPOT-Assay erlaubt eine quantitative Aussage bezüglich des sezernierten Interferon gamma. In diesem Zusammenhang wurden sowohl die primären MLC-Ansätze nach dreitägiger Kultivierung und anschließender zwanzigstündiger Restimulation als auch die gewonnenen Zellfraktionen nach Depletion und anschließender Exposition mit diversen Antigenen näher untersucht. Überall dort, wo während der Phase der Restimulation Interferon gamma produziert worden war, erschien ein Punkt auf der Nitrozellulosemembran. Eine solche Platte zeigt Abbildung 10. Sowohl die absolute Zahl an „spots“ als auch der prozentuale Anteil der von Punkten bedeckten Gesamtfläche wurde anschließend von einem Messgerät aufgezeichnet.

Abbildung 10:

Behandelte Nitrozellulosemembran (EliSPOT-Assay). Als Maß für die Aktivierbarkeit der untersuchten T-Zellen gilt die Interferon gamma Produktion. Jeder dunkle „spot“, entspricht IFN-gamma produzierenden und somit aktivierten Zellen (Versuch D3, Legende siehe Tabelle 35).

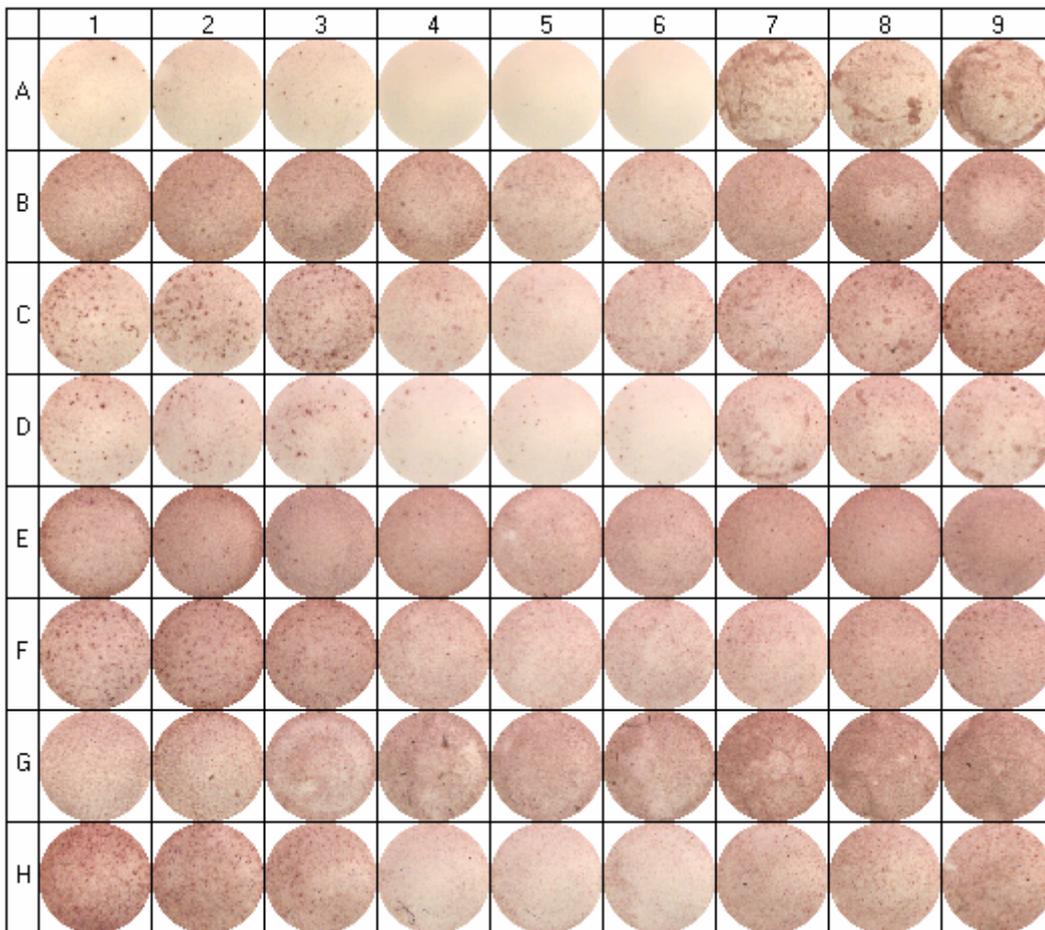


Tabelle 35:

Legende zu Abbildung 9: Pipettierschema

1-3:.....	Ausgangspopulation
4-6:.....	Negativfraktion
7-9:.....	Positivfraktion
A:.....	Zellfraktion alleine
B:.....	Zellfraktion + Autologer Stimulator
C:.....	Zellfraktion + Allogener Stimulator
D:.....	Zellfraktion + Fremdantigen
E:.....	Zellfraktion + Tetanus-Toxoid
F:.....	Zellfraktion + Adenovirus Antigen
G:.....	Zellfraktion + Aspergillus fumigatus Antigen
H:.....	Zellfraktion + PHA (Phythämagglutinin)

3.4.1 Aktivierungsfähigkeit der Zellfraktionen nach Depletion

Die nach Durchführung des EliSPOT-Assays erhaltenen Werte wurden gemittelt und anschließend auf die unbehandelte Ausgangspopulation jeder Versuchsreihe bezogen. Tabelle 36 zeigt die gemittelten Ergebnisse der drei unabhängigen Versuche.

Tabelle 36:

Aktivierungsindex der drei Zellpopulationen im EliSPOT gegenüber unterschiedlichen Antigenen in Prozent. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben (D1-3).*

Ausgangspopulation		Negativfraktion		Positivfraktion	
A/B*	100,00	A/B*	77,95	A/B*	409,45
A/B* + A*	525,20	A/B* + A*	645,67	A/B* + A*	718,11
A/B* + B*	457,48	A/B* + B*	184,25	A/B* + B*	534,65
A/B* + C*	366,14	A/B* + C*	283,46	A/B* + C*	391,34
A/B*+ Tet.	688,98	A/B*+ Tet.	751,18	A/B*+ Tet.	723,62
A/B* + CMV	1040,55	A/B* + CMV	930,71	A/B* + CMV	852,76
A/B* + CMVK	746,46	A/B* + CMVK	1022,83	A/B* + CMVK	1002,76
A/B* + Adeno	841,73	A/B* + Adeno	669,29	A/B* + Adeno	577,95
A/B* + AdenoK	549,21	A/B* + AdenoK	497,24	A/B* + AdenoK	305,91
A/B* + PHA	1466,93	A/B* + PHA	1100,00	A/B* + PHA	1418,90
A/B* + Asp	908,66	A/B* + Asp	777,17	A/B* + Asp	779,53

Die erhaltene Negativfraktion zeigte im Vergleich zur Ausgangspopulation eine um 59,72 Prozent niedrigere Reaktion gegenüber allogenen Stimuli. Gegenüber Fremdantigenen blieb die Aktivität mit 77,42 Prozent weitgehend erhalten. Bei der Inkubation mit autologen Zellen wurde eine Aktivitätserhöhung um 22,94 Prozent gemessen.

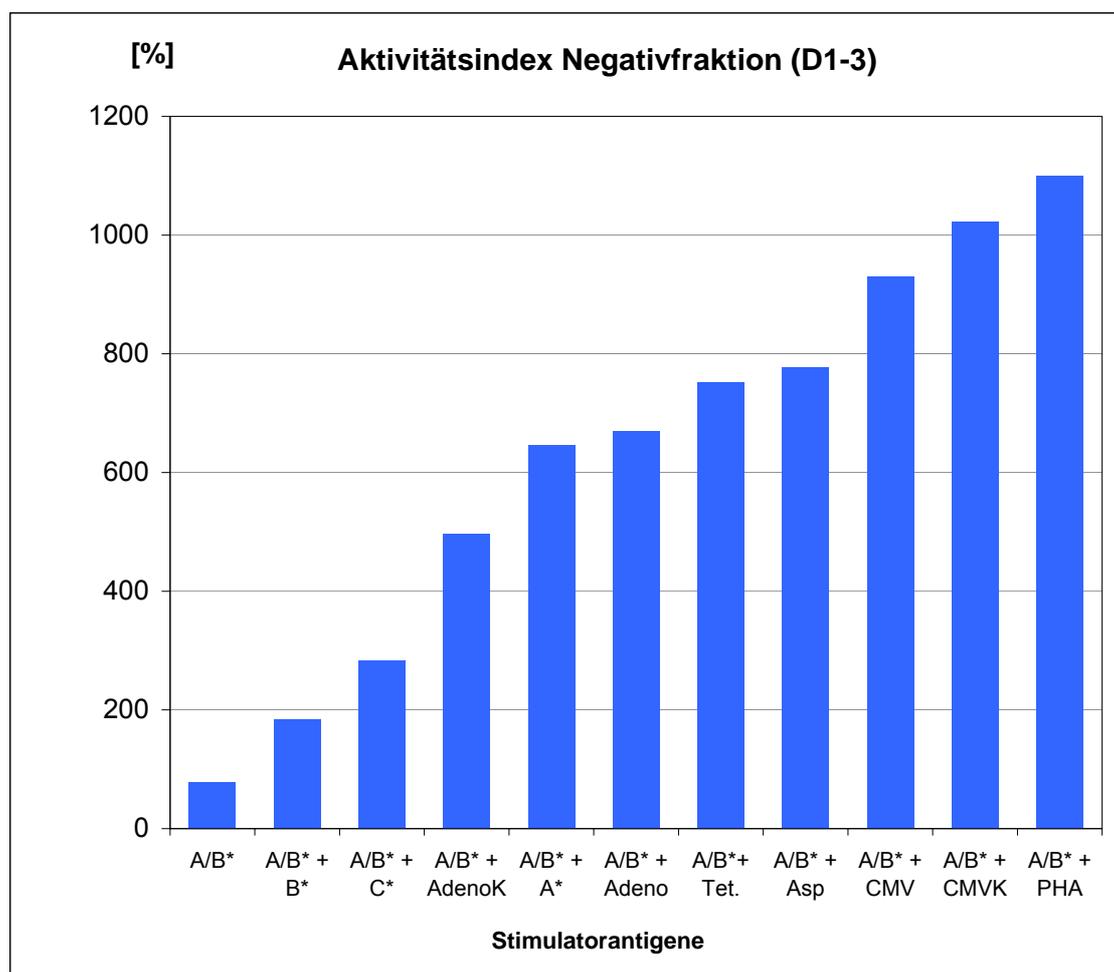
Antitoxoide Eigenschaften konnten auf 109,03 Prozent gesteigert werden. Gegenüber der unbehandelten Negativfraktion zeigte sich sogar eine Steigerung der Aktivität auf 963,64 Prozent.

Auch antivirale Eigenschaften konnten konserviert werden, so war die Reaktion nach Inkubation mit Adenovirus Antigen um den Faktor 8,59 höher als in der unbehandelten MLC derselben Population. Die Inkubation mit Aspergillus fumigatus Antigen aktivierte die negativen T-Zellen auf 996,97 Prozent. Gegenüber CMV wurden Steigerungen auf 1193,94 Prozent gemessen. Allerdings zeigten auch die entsprechenden Viruskontrollantigene hohe Aktivitäten. Die mit Adenovirus Antigen versetzte MLC zeigte gegenüber der Kontrolle 134,60 Prozent Aktivität. 90,99 Prozent der Kontrollaktivität erzielte die Inkubation mit CMV Antigen. Eine Kontrolle stand für Aspergillus fumigatus

nicht zur Verfügung. Aktivitätsindices der Negativfraktion der drei Versuche zeigt Abbildung 11.

Abbildung 11:

Aktivitätsindices der Negativfraktion nach primärer MLC im EliSPOT-Assay in Prozent gegenüber diversen Antigenen, bezogen auf die unbehandelte MLC (der Ausgangspopulation), die gleich 100 Prozent gesetzt wurde. Anm.: CMV, CMVK und AdenoK wurden in zwei von drei Versuchen eingesetzt (D1-3).



3.4.2 Aktivierungsfähigkeit der expandierten Negativfraktion

Nach der unter Kapitel 2 dargestellten Methode wurde ein Teil der primär nach Depletion erhaltenen Negativfraktion expandiert und anschließend in einem erneuten EliSPOT-Assay eingesetzt. Die wiederholte Durchführung als

Restimulationsversuch sollte die erhaltene Aktivierbarkeit der expandierten Zellen darlegen. Nachfolgend sind die Ergebnisse tabellarisch (Tab. 37) und als Diagramm (Abbildung 12) aufgeführt.

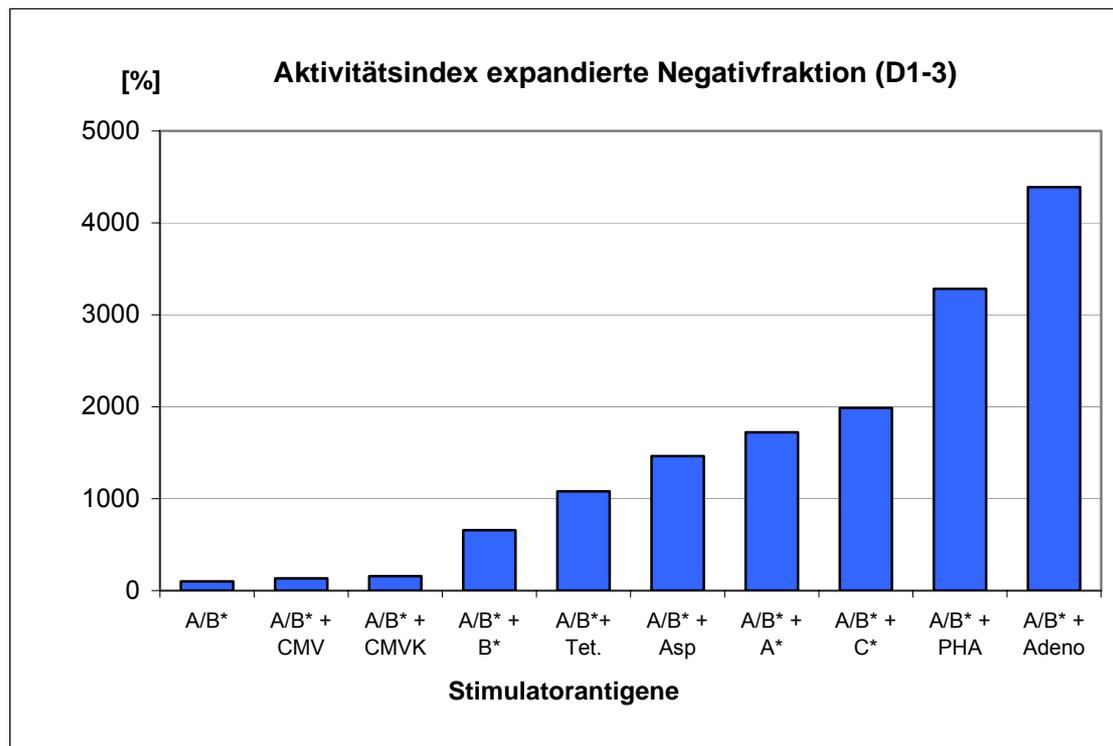
Tabelle 37:

Aktivierungsindex der expandierten Negativfraktion im Elispot Assay gegenüber unterschiedlichen Antigenen in Prozent. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Negativexpansion A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben Anm.: A*, C* und Adeno wurde in nur einem Versuch, CMV und CMV_k in zwei Versuchen eingesetzt (D1-3).*

Negativexpansion	D1-3
A/B*	100,00
A/B* + CMV	132,86
A/B* + CMVK	158,57
A/B* + B*	657,14
A/B*+ Tet.	1080,00
A/B* + Asp	1462,86
A/B* + A*	1722,86
A/B* + C*	1988,57
A/B* + PHA	3282,86
A/B* + Adeno	4388,57

Abbildung 12:

Aktivitätsindizes der expandierten Negativfraktion nach primärer MLC im EliSPOT-Assay in Prozent gegenüber diversen Antigenen, bezogen auf nicht inkubierte Zellen derselben Population, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde. Anm.: A, C* und Adeno wurde in nur einem Versuch, CMV und CMVc in zwei Versuchen eingesetzt (D1-3).*



Die nach siebentägiger Expansion erhaltenen T-Zellen zeigten gegenüber eingesetzten Antigenen deutliche Aktivität im Sinne einer Interferon gamma Sekretion. Bezogen auf die nicht inkubierten expandierten Zellen, zeigt die Aktivität gegenüber Adenovirus Antigen mit 4388,57 Prozent die höchsten Werte. PHA stimulierte die Zellen um 1105,71 Prozentpunkte weniger. Einen mit 1988,57 Prozent sehr hohen Index zeigten T-Zellen, die mit Fremdanigen (C*) inkubiert worden waren. Gefolgt von autologen Stimuli, die um den Faktor 17,23 höhere Werte als die unbehandelten Zellen zeigten. Aspergillus fumigatus entwickelte Aktivitäten von 1462,86 Prozent. Mit Tetanus-Toxoid inkubierte Zellen zeigten mit 1080,00 Prozent etwas weniger Stimulation. Das

ebenfalls zu den Pathogenen zählende CMV Antigen konnte einen Stimulationsindex von 132,86 Prozent erzielen, weniger als die dazugehörige Kontrolle, die sich mit 158,57 Prozent um 119,35 Prozent effektiver zeigte. Alloreaktive Reaktionen wurden mit 657,14 Prozent ebenfalls, jedoch in geringem Ausmaß, beobachtet.

3.4.2.1 Vergleich der Aktivierungsfähigkeit der Negativfraktion zur Aktivierungsfähigkeit der Expansionsfraktion

Vergleicht man die Aktivierungsfähigkeit der Expansionsfraktion mit ihrer Ausgangspopulation, der durch Depletion erhaltenen Negativfraktion, in dem man die jeweilige Reaktion der nicht inkubierten Zellen gleich 100 Prozent setzt, zeigen sich in Tabelle 38 aufgeführten Werte.

Tabelle 38:

Gegenüberstellung der Aktivierungsindizes der Negativfraktion und der expandierten Negativfraktion gegenüber unterschiedlichen Antigenen aus drei unabhängigen Versuchen im EliSPOT-Assay in Prozent. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Negativ A/B beziehungsweise Expansion A/B*) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben (D1-3).*

<u>Aktivitätsindex (%)</u>	<u>Expansionsfraktion</u>	<u>Negativfraktion</u>
A/B*	100,00	100,00
A/B* + CMV	132,86	1193,94
A/B* + CMVK	158,57	1312,12
A/B* + B*	657,14	236,36
A/B*+ Tet.	1080,00	963,64
A/B* + Asp	1462,86	996,97
A/B* + A*	1722,86	828,28
A/B* + C*	1988,57	363,64
A/B* + PHA	3282,86	1411,11
A/B* + Adeno	4388,57	858,59

Im Vergleich zur Negativfraktion zeigten T-Zellen der Expansionsgruppe mit Ausnahme gegenüber dem Zytomegalievirus Antigen und der CMV-Kontrolle höhere Sekretionsraten. Wurden die beiden Populationen mit Adenovirus

Antigen inkubiert, zeigte die Expansionsfraktion mit 4388,57 Prozent im Vergleich zu 858,59 Prozent um den Faktor 5,11 höhere Prozentwerte. *Aspergillus fumigatus* erreichte in der Expansionsfraktion Aktivitätsraten von 1462,86, während deren Ausgangspopulation lediglich 996,97 Prozent erreichte. 112,08 Prozent der Syntheseleistung der Negativfraktion erreichten expandierte T-Zellen, wurden sie mit Tetanus-Toxoid behandelt. PHA erreichte um den Faktor 2,33 höhere Aktivitätswerte. Betrachtet man die Reaktion der Expansionsfraktion gegenüber autologen Zellen, war diese ebenfalls hoch. Mit 1722,86 Prozent erreichte sie mehr als doppelte Werte im Vergleich zu T-Zellen der Negativfraktion. Die allogene Reaktion zeigte sich ebenfalls zur Vergleichsgruppe erhöht: 2,78 fache Werte erreichten die zuvor expandierten negativen Zellen. Fremdantigene schließlich lösten ebenfalls eine hohe Syntheseleistung aus, hier konnte ein um, im Vergleich zu den T-Zellen der ursprünglichen Negativfraktion, mehr als das fünffache erhöhten Index gemessen werden.

3.4.3 Vergleich der Aktivierungsfähigkeit der Versuchsreihen mit unterschiedlichen Stimulatorzellen

Vergleicht man die Aktivierungsfähigkeit der einzelnen T-Zellgruppen nach Depletion durch unterschiedliche Stimulatoren, erhält man die in Tabelle 39 aufgeführten Vergleichswerte.

Tabelle 39:

Vergleich der Aktivitätsindizes beider Versuchsreihen im EliSPOT-Assay unter Angabe der Korrelation (p-Wert). Die Aktivitätsindizes gegenüber unterschiedlichen Antigenen der neun Versuche mit PMNC (V1-9) wurden in Beziehung zu den Indizes der Experimente mit Dendritischen Zellen (D1-3) gesetzt. Anm.: Aspergillus fumigatus Antigen konnte nicht vergleichend beurteilt werden, da dieses Antigen nur in Versuch D1-3 eingesetzt wurde.

Aktivitätsindex	Ausgangspopulation	Negativfraktion	Positivfraktion
A/B*	100,00	50,81	121,68
A/B* + A*	81,51	31,21	155,29
A/B* + B*	84,07	89,73	200,12
A/B* + C*	420,28	147,76	345,21
A/B*+ Tet.	69,45	23,83	210,80
A/B* + CMV	65,63	38,20	359,65
A/B* + CMVK	103,69	38,30	226,62
A/B* + Adeno	104,75	66,46	1021,84
A/B* + AdenoK	43,33	41,91	396,48
A/B* + PHA	1296,33	1488,75	1824,55
P-Wert (V1-9/D1-3)	0,74	0,49	0,78

Betrachtet man die Ausgangspopulation, wurden in den neun Versuchen, in denen als Stimulatoren PMNC eingesetzt worden waren, gegenüber autologen und allogenen Antigenen niedrigere Werte erzielt als in den drei mit Dendritischen Zellen durchgeführten Experimenten. Gleiches gilt für die Inkubation mit CMV Antigen, in denen mit PMNC inkubierte Zellen 65,63 Prozent der Reaktion der Versuche mit Dendritischen Zellen erzielten. Höhere Werte erzielten mit PMNCs inkubierte T-Zellen der Ausgangspopulation nicht nur gegenüber PHA, nämlich 1296,33 Prozent, sondern auch 104,75 gegen Adenovirus Antigen. Eine über 420-prozentige Steigerung konnte gegenüber eingesetzten Fremdantigenen (C*) beobachtet werden.

Wendet man sich der Negativfraktion nach Depletion zu, wurden in der Serie mit PMNC-inkubierten Zellen bei der Reaktion auf PHA und gegen Fremd höhere Werte erzielt. Alle anderen Antigene lösten stärkere Indizes bei durch DC stimulierten Zellen aus. Insbesondere waren die antipathogenen Aktivitätswerte mit 66,46 Prozent (Adenovirus Antigen), beziehungsweise 38,20 Prozent (Zytomegalie Antigen) und 23,83 Prozent (Tetanus-Toxoid) geringer als

die der Dendritischen Versuchsreihe. Autologe waren um 68,79 Prozent, allogene um 10,27 Prozent geringer.

Die Positivfraktion schließlich zeigte bei mit PMNC inkubierten T-Zellen durchgehend höhere Aktivitätsindizes als die Vergleichsreihe. 1824,55 Prozent bei der Aktivierung durch PHA, 200,12 Prozent gegenüber allogenen Zellen. Adenovirus Antigene konnten mit Werten von 1021, 84 Prozent die höchsten antipathogenen Werte erzielen. 3,6-fache Aktivität zeigte die Reaktion gegenüber dem Zytomegalie Virus. 345,21 Prozent erzielte die Inkubation mit Fremdartigenen. Allogene Reaktionen waren mit 200,12 Prozent doppelt so hoch wie in der Vergleichsgruppe.

3.5 Proliferationsfähigkeit

Im Gegensatz zu anderen Zellen zeichnen sich aktivierte T-Lymphozyten, neben der zellspezifischen Zytokinfreisetzung, auch durch die Fähigkeit aus, zu proliferieren und Zellklone zu bilden. Diese T-Zell spezifischen Proliferationseigenschaften lassen sich durch den Nachweis tritiummarkierten [6-H³] Thymidins, das im Rahmen dieser Aktivierungsvorgänge als Baustein in die DNA betroffener Zellen eingebaut wird, detektieren.

Der Nachweis von solchen Proliferationseigenschaften ist wichtig für die Charakterisierung von Zellen hinsichtlich ihres Aktivierungsgrades gegenüber allogenen und autologen Zellen.

3.5.1 Proliferationsfähigkeit der Zellen nach Depletion

Wie im Kapitel 2 beschrieben, wurden nach dreitägiger Inkubationsdauer jeweils 1×10^6 Zellen aus der primären MLC oder nach Aufbereitung mittels magnetisch aktivierter Zellseparation (CliniMACS[®]) verwendet und in einer sekundären Mikro-MLC für weitere fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart von [6-H³] Thymidin für weitere 15 Stunden inkubiert. Die hieraus resultierenden Daten aus drei unabhängigen Versuchen sind in Tabelle 40 zusammengefasst.

Tabelle 40:

Gemittelte Proliferationsindizes der T-Zellen gegenüber unterschiedlichen Antigenen in der Micro-MLC des [6-H³] Thymidin-Assay dreier unabhängiger Versuche (D1-3) in Prozent. Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben. Anm.: Adenovirus Antigen wurde nur in Versuch D3 verwendet.*

Proliferationsindex (%)	Ausgangspopulation	Negativfraktion	Positivfraktion
A/B*	100,00	2,24	8,98
A/B* + A*	55,16	2,38	29,01
A/B* + B*	509,48	75,62	284,02
A/B* + C*	342,72	185,48	240,57
A/B*+ Tet.	84,79	22,22	91,76
A/B* + PHA	1537,56	893,99	886,06
A/B* + Asp	17,08	2,95	13,25
A/B* + Adeno	8,59	3,67	10,98

Betrachtet man die Proliferationsindizes der Negativfraktion, zeigt sich im Vergleich zur Ausgangspopulation eine reduzierte Aktivität gegenüber autologen Stimuli. Mit 2,38 Prozent im Stimulationsindex zeigten diese 4,31 Prozent des Wertes, der von der Vergleichspopulation erzielt wurde. Gegenüber allogenen Stimulatorzellen wurden, bezogen auf die Reaktion der unbehandelten Ausgangspopulation, 75,62 Prozent erzielt. Die Positivfraktion erzielte einen um 26,63 Prozent höheren Index. Gegen Fremdzellen war die Negativreaktion um 45,88 Prozent weniger stimulierbar als die Ausgangszellfraktion. Gegenüber positiven Zellen zeigten negative T-Zellen eine 77-prozentige Stimulierbarkeit. Grundsätzlich blieb die Fähigkeit zur Stimulation erhalten. Dies zeigt die Reaktion gegenüber PHA; mit 893,99 Prozent war diese gegenüber der Positivfraktion mit einem Index von 886,06 etwas höher. Die durch Pathogene induzierte Stimulierbarkeit war in allen drei Populationen stark reduziert. Die geringsten Reaktionen zeigten die T-Zellen der Negativfraktion. Diese zeigten 22,22 Prozent Stimulierbarkeit für Tetanus-Toxoid, 3,67 Prozent gegenüber Adenovirus Antigen, was 42,67 Prozent der Stimulierbarkeit der Ausgangsfraktion entspricht. Gegenüber Aspergillus

fumigatus Antigen zeigten die negativen T-Zellen einen Index von 2,95 Prozent, 33,39 Prozent der Potenz positiver T-Zellen für diesen Stimulator.

3.5.2 Proliferationsfähigkeit der expandierten Negativfraktion

Nach der in Kapitel 2 dargestellten Methode wurde ein Teil der primär nach Depletion erhaltenen Negativfraktion expandiert und anschließend in einem erneuten [6-H₃] Thymidin-Proliferationsassay eingesetzt. Die erneute Durchführung als Restimulationsversuch sollte die erhaltene Aktivierbarkeit der expandierten Zellen darlegen. Nachfolgend sind die Ergebnisse tabellarisch (Tab. 41) aufgeführt.

Tabelle 41:

Gemittelte Proliferationsindizes der T-Zellen (expandierte Negativfraktion) gegenüber unterschiedlichen Antigenen in der Micro-MLC des [6-H³] Thymidin-Assay dreier unabhängiger Versuche (D1-3) in Prozent. Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Expansionsfraktion A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben. Anm.: A* und Adenovirus Antigen wurden nur in D3, Tetanus-Toxoid und Aspergillus fumigatus Antigen in D1 und D2 eingesetzt.*

<u>Proliferationsindex (%)</u>	<u>Expansionsfraktion</u>
A/B*	100,00
A/B* + A*	169,87
A/B* + B*	816,22
A/B*+ Tet.	241,85
A/B* + PHA	38870,32
A/B* + Asp	182,18
A/B* + Adeno	371,21

Die nach siebentägiger Expansion erhaltene Zellpopulation zeigte gegenüber nicht behandelten Zellen derselben Gruppe Steigerungen der Proliferationsindizes. Erwartungsgemäß am höchsten zeigte sich die Reaktion gegenüber PHA. Sie konnte um den Faktor 388,70 gesteigert werden. Wurden expandierte Zellen mit allogenen Stimulatoren inkubiert, zeigte sich ein Index von 816,22 Prozent, das ist 2,20 mal mehr als die Reaktion gegenüber

Adenovirus Antigen (371,21 Prozent) hervorbrachte. Um den Faktor 1,82 konnte die Proliferation gegenüber *Aspergillus fumigatus* gesteigert werden. Tetanus-Toxoid erzielte einen Proliferationsindex von 241,85 Prozent.

3.5.3 Proliferationsfähigkeit der Negativfraktion im Vergleich zur expandierten Negativfraktion

Vergleicht man die Proliferationsfähigkeit der Expansionsfraktion mit ihrer Ausgangspopulation, die durch Depletion erhaltene Negativfraktion, in dem man die jeweilige Reaktion der nicht inkubierten Zellen gleich 100 Prozent setzt, zeigen sich in Tabelle 42 aufgeführten Werte.

Tabelle 42:

Gemittelte Proliferationsindizes der Negativ- beziehungsweise Expansionsfraktion gegenüber unterschiedlichen Antigenen in der Micro-MLC des [6-H³] Thymidin-Assay (D1-3) in Prozent unter Angabe der Korrelation (p-Wert). Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Negativfraktion A/B beziehungsweise Expansionsfraktion A/B*) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben.*

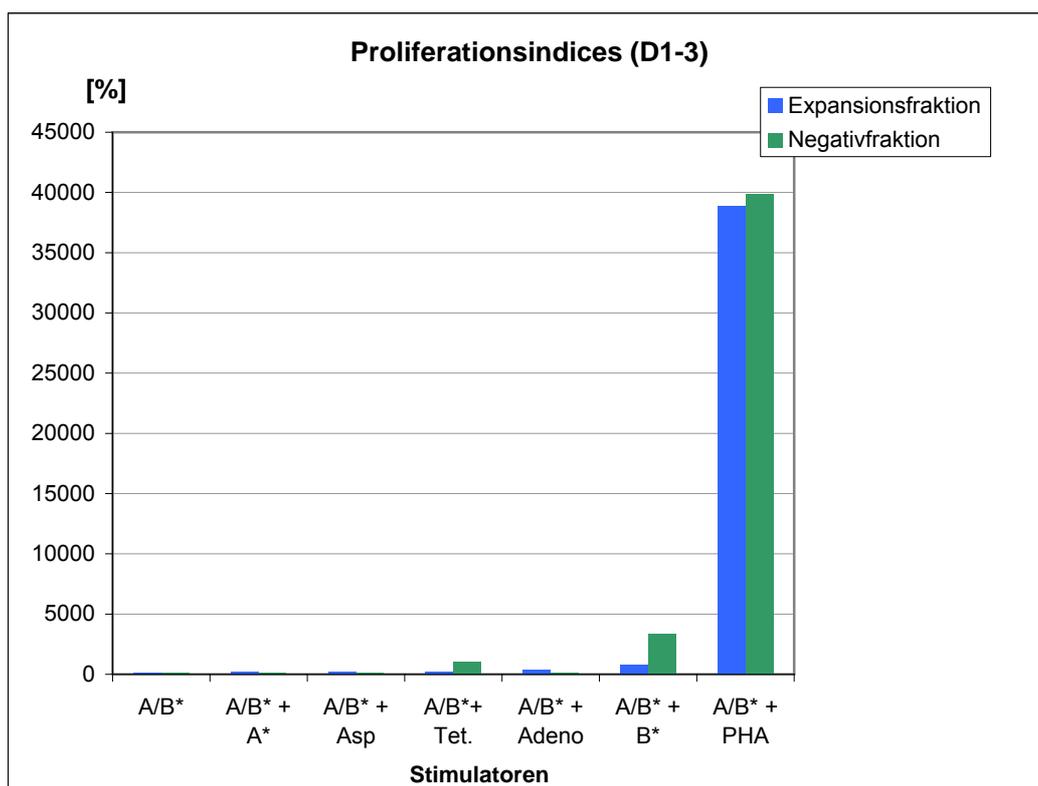
Proliferationsindex (%)	Expansionsfraktion	Negativfraktion
A/B*	100,00	100,00
A/B* + A*	169,87	106,16
A/B* + B*	816,22	3374,33
A/B*+ Tet.	241,85	991,67
A/B* + PHA	38870,32	39890,06
A/B* + Asp	182,18	131,74
A/B* + Adeno	371,21	163,58
P-Wert (Exp./Neg)	1,00	

Die beiden Versuchsreihen zeigen einen p-Wert von 1,00, stimmen also überein. Gegenüber Adenovirus Antigen zeigte die Expansionsfraktion mit 371,21 Prozent einen um den Faktor 2,27 höheren Proliferationsindex als die Negativfraktion. 138,29 Prozent der Ausgangspopulation erzielte die Reaktion gegen *Aspergillus fumigatus*. Mit 241,85 Prozent war die Proliferation der mit Tetanus-Toxoid inkubierten expandierten T-Zellen deutlich geringer als die der Negativfraktion. Nahezu identische Werte wurden durch PHA erzielt, mit einem

Index von 39890,06 Prozent zeigten sich die ursprünglichen Negativzellen um 1019,74 Prozentpunkte stimulierbarer als deren Expansionsfraktion. Betrachtet man die allogene Reaktion, zeigten die expandierten Zellen mit 816,22 Prozent weniger als ein Viertel der Reaktion, die die gleichen Antigene in der Negativfraktion auslösten. Autologe Zellen induzierten in der Expansionsfraktion gegenüber der Negativfraktion 1,6 fache Werte. Eine vergleichende Darstellung ist der Abbildung 13 zu entnehmen.

Abbildung 13:

Proliferationsindizes der Negativfraktion im Vergleich zur Expansionsfraktion gegenüber diversen Antigenen (D1-3) in Prozent. Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Negativ A/B beziehungsweise Expansion A/B*) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben.*



3.5.4 Proliferationsfähigkeit der Zellfraktionen mit unterschiedlichen primären Stimulatorzellen

Vergleicht man die Proliferationsfähigkeit der einzelnen T-Zellgruppen nach Depletion durch unterschiedliche Stimulatoren (PMNC beziehungsweise Dendritische Zellen), erhält man die in Tabelle 43 aufgeführten Vergleichswerte.

Tabelle 43:

Proliferationsindex und Korrelation (p-Wert) der beiden Versuchsreihen im [6-³H] Thymidin-Assay, wobei die Proliferationsindizes der neun Versuche mit PMNC (V1-9) in Beziehung zu den Indizes der Experimente mit Dendritischen Zellen (D1-3) gesetzt wurden. Anm.: Aspergillus fumigatus Antigen konnte nicht vergleichend beurteilt werden, da dieses Antigen nur in Versuch D1-3 eingesetzt wurde.

Index	Ausgangspopulation	Negativfraktion	Positivfraktion
A/B*	100,00	694,29	1003,61
A/B* + A*	225,72	242,51	416,54
A/B* + B*	83,40	604,84	268,81
A/B* + C*	147,71	679,45	240,03
P-Wert (V1-9/D1-3)	0,88	1,00	0,99

Betrachtet man die Ausgangspopulation, wurde in den neun Versuchen, in denen als Stimulatoren PMNC eingesetzt worden waren, gegenüber autologen Zellen ein höherer Wert, und zwar ein um 225,72 Prozent höherer Index erzielt als in den drei mit Dendritischen Zellen durchgeführten Experimenten. Auch gegen Fremdantigene wurde ein höherer Proliferationsindex erzielt. In der Negativfraktion zeigten mit PMNCs inkubierte T-Zellen durchgehend höhere Stimulationsindices als T-Zellen der Vergleichsgruppe. Mit 6,79-fachem Index reagierten sie gegen Fremdantigene. Wurden sie mit autologen Zellen stimuliert, war die Reaktion im Vergleich um 242,51 Prozent höher. 604,84 Prozent wurden im Vergleich zur Dendritenfraktion gegenüber allogenen Stimuli erzielt.

In der Positivfraktion (PMNC stimuliert) wurden ebenfalls höhere Proliferationswerte gemessen. Am deutlichsten war dies bei der Reaktion

gegen Selbstantigene zu beobachten. Die mit PMNCs inkubierten Zellen waren um 416,54 Prozent potenter als die Zellen der Vergleichsgruppe, obwohl zunächst eine höhere allogene Reaktion in der Ausgangspopulation von DC Zellen induziert wurde.

3.6 Proliferationsfähigkeit auf Einzelebene: Durchflußzytometrische BrdU (5-Bromo-2`-deoxyuridin)-Proliferationsanalyse

Werden T-Zellen durch entsprechende Mechanismen zur Proliferation angeregt, wird DNA aus Nukleosidbausteinen wie Thymidin neu synthetisiert. Durch Nachweis der Einbaurrate des Thymidinanalogons 5-Bromo-2`-deoxyuridin (BrdU) in das zelleigene Genom mittels FACS gelingt es, die Proliferationsfähigkeit und damit die Aktivität jeder einzelnen T-Zelle zu bestimmen. Des Weiteren können simultan weitere Verfahren, wie Oberflächenantigenanalyse und Zytokinnachweise, durchgeführt werden, sodass Aussagen über einzelne T-Zellsubpopulationen getroffen werden können [115]. Als etablierter Test zum Nachweis aktivierter T-Zellen gilt der [^3H] Thymidin-Proliferationsassay. Allerdings lässt dieser keine quantitative Aussage auf Einzelzelebene zu. Vergleichend wurden beide Methoden in drei einzelnen Experimenten parallel durchgeführt und die Ergebnisse überprüft. Weiterhin wurde der Proliferationsassay in drei Versuchen mit Dendritischen Zellen als Stimulatorquelle in der Lymphozytenmischkultur (MLC) und in einem weiteren mit Patientenzellen eingesetzt.

3.6.1 Vergleich Durchflußzytometrische BrdU (5-Bromo-2`-deoxyuridin)-Proliferationsanalyse und [^3H] Thymidin-Proliferationsassay

In drei unabhängigen Experimenten wurden beide Methoden nach den unter Kapitel 2 beschriebenen Methoden parallel durchgeführt. Die Responderzellen (A) wurden mit autologen (A*, in einem Versuch) Antigenen, Fremdzellantigenen (B*) (die Responderzellen wurden nicht, wie in anderen Versuchsreihen geschehen, mit B* vorinkubiert), mit PHA, SEB (Staphylococcus Enterotoxin B, ein Protein mit Superantigenwirkung) und mit Tetanus-Toxoid (Tet, in einem Versuch) inkubiert. Anschließend wurde die

Anzahl der aktivierten Zellen bezogen auf die jeweiligen Antigene und deren Proliferationsindizes bestimmt. Während die Reaktion der aktivierten Zellen im BrdU-Ansatz auf unterschiedliche Aktivierungsmarker bezogen werden konnten, ist für das Maß der Proliferationsfähigkeit im [6-H₃] Thymidin-Einbau nur die Anzahl der counts pro Minute bestimmbar. In nachfolgender Tabelle (Tabelle 44) sind die jeweiligen gemittelten Proliferationsindizes und Korrelationen aufgeführt.

Tabelle 44:

*Vergleich BrdU-Proliferationsanalyse/[6-H₃] Thymidin-Proliferationsassay
Korrelation (p-Wert) und gemittelter Proliferationsindex in Prozent der drei
Vergleichsversuche, wobei die Reaktion der einzelnen Responderzellen auf die
nicht inkubierter Zellen, die 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde.*

*Anm.: Autologe Zellen sowie Tetanus-Toxoid Antigen wurden in nur einer
Versuchsreihe eingesetzt. Der p-Wert bezieht sich jeweils auf A/B*, A/PHA und
A/SEB). Die im BrdU-Proliferationstest nachgewiesenen Aktivierungsmarker
BrdU, IFN-gamma und Oberflächenaktivierungsantigene wurden sowohl einzeln
als auch in Kombination analysiert und aufgeführt.*

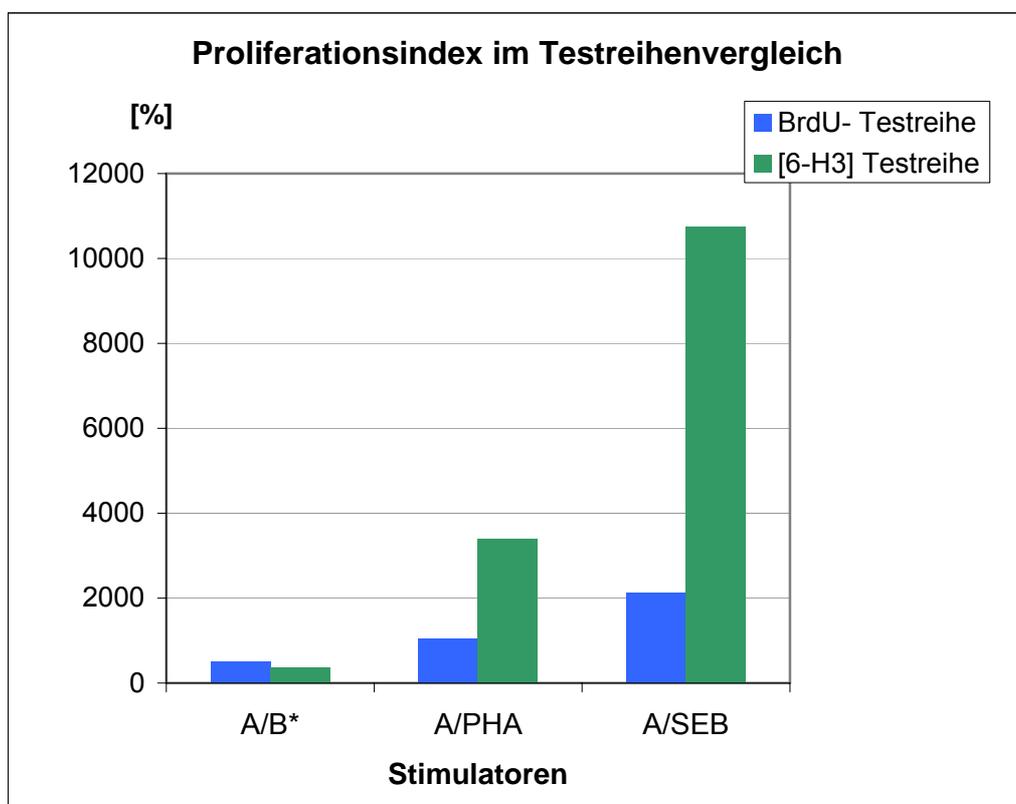
Index(%) Antigene	BrdU Proliferationsanalyse		[6-H3] Proliferationsassay		P-Wert
	Mean	Std. dev.	Mean	Std. dev.	
	BrdU				0,89
A/A*	1091,43	0,00	116,51	0,00	
A/B*	523,23	372,76	354,17	238,29	
A/PHA	2020,10	1368,61	3382,77	1615,22	
A/SEB	2647,05	1775,09	10746,36	10780,54	
A/TET	1562,34	0,00	20301,62	0,00	
	IFN gamma				0,96
A/A*	653,87	0,00	116,51	0,00	
A/B*	510,18	355,13	354,17	238,29	
A/PHA	1698,13	1146,47	3382,77	1615,22	
A/SEB	2701,30	1885,90	10746,36	10780,54	
A/TET	1593,10	0,00	20301,62	0,00	
	CD25,69,HLA DR				0,92
A/A*	677,83	0,00	116,51	0,00	
A/B*	556,92	384,83	354,17	238,29	
A/PHA	2368,28	1774,78	3382,77	1615,22	
A/SEB	3368,22	2350,67	10746,36	10780,54	
A/TET	1648,60	0,00	20301,62	0,00	
	BrdU+IFN gamma				1,00
A/A*	602,65	0,00	116,51	0,00	
A/B*	514,41	401,38	354,17	238,29	
A/PHA	1045,41	757,12	3382,77	1615,22	
A/SEB	2125,54	1449,62	10746,36	10780,54	
A/TET	1653,36	0,00	20301,62	0,00	
	BrdU+CD 25,69,HLA DR				0,81
A/A*	656,84	0,00	116,51	0,00	
A/B*	589,42	421,55	354,17	238,29	
A/PHA	2993,62	2293,01	3382,77	1615,22	
A/SEB	3373,06	2354,38	10746,36	10780,54	
A/TET	1591,33	0,00	20301,62	0,00	
	IFN gamma + CD25,69, HLA DR				0,85
A/A*	680,70	0,00	116,51	0,00	
A/B*	572,42	419,64	354,17	238,29	
A/PHA	2482,15	1786,40	3382,77	1615,22	
A/SEB	2989,65	1955,65	10746,36	10780,54	
A/TET	1666,15	0,00	20301,62	0,00	

Insgesamt zeigten beide Versuchsreihen eine hohe Übereinstimmung. Die entsprechenden p-Werte bewegen sich zwischen 0,81 (hier wurden aktivierte Zellen mittels der Merkmale BrdU, CD 25, 69 und HLA DR im BrdU-Assay mit ermittelten counts pro Minute im Thymidineinbau korreliert) und 1,00. Letztere Korrelation erbrachten im BrdU-Assay T-Zellen, die sich für BrdU und IFN-

gamma doppelt positiv zeigten und auf „counts per minute“ im [6-H₃] Thymidin-Einbau bezogen wurden. Abbildung 14 stellt diese Vergleichsreihe graphisch dar.

Abbildung 14:

Proliferationsindex in Prozent im Testreihenvergleich. Als Aktivierungsmarker wurden BrdU- und IFN-gamma positive Zellen (BrdU-Proliferationsanalyse) beziehungsweise „counts pro Minute“ ([6-H₃] Proliferationsassay) untersucht.



Betrachtet man die Ergebnisse, die der BrdU-Proliferationsassay lieferte (siehe auch Tabelle 45), so zeigten die eingesetzten Responderzellen wie der Vergleichstest die höchsten Proliferationswerte gegenüber SEB, gefolgt von PHA, das durchschnittlich 3382,77 Prozent im Thymidineinbau und 1521,07 Prozent im 5-Bromo-2'-deoxyuridin-Assay erzielte. Die geringsten Werte ergaben sich bei der Stimulation durch Fremdartigene (B*).

Ein Vorteil der BrdU Proliferationsanalyse ist die Tatsache, dass eine Charakterisierung von einzelnen Zellen bezogen auf mehrere Oberflächenmarker möglich ist. Es zeigte sich, dass die Anzahl der pro Mikroliter aktivierten Zellen einerseits von den zugeführten Antigenen, andererseits von den zur Analyse eingesetzten Oberflächenmarkern abhängig war. Wie schon erwähnt, aktivierte der Stimulus durch SEB mit durchschnittlich 215,74 (+/- 60,01) Zellen/ μ l die meisten T-Zellen pro Mikroliter. Wurden die aktivierten Zellen mittels BrdU- und IFN-gamma Markierung bestimmt, erhielt man 127,70 (+/- 91,42) Zellen/ μ l und den niedrigsten Wert in der SEB Gruppe. Die höchste Anzahl an Zellen pro Mikroliter wurde durch die Markierung mit den drei Aktivierungsmarkern CD 25, 69 und HLA DR beobachtet, nämlich 313,57 (+/- 105,64) Zellen/ μ l. In der gleichen Weise reagierten, mit Ausnahme der nicht inkubierten Kontrollzellen (A), auch alle mit B* (Fremdantigen) und PHA inkubierten Zellen. Versus Fremdzellen wurden mittels BrdU- und IFN-gamma-Fluoreszenzanalyse 43,80 (+/- 27,66) Zellen je Mikroliter, gegenüber PHA 71,03 (+/- 56,77) Zellen/ μ l als aktiviert identifiziert. Die Färbung mit CD 25, 69 und HLA DR ergab mit 60,07 (+/- 24,85) gegenüber Fremd beziehungsweise mit 210,75 (+/- 88,93) Zellen gegenüber PHA die jeweils höchsten Werte. In der T-Zellgruppe, die nicht inkubiert wurde, wurden die niedrigsten Werte mittels BrdU in Kombination mit CD 25, 69 und HLA DR bestimmt.

Tabelle 45:

Durchschnittliche Anzahl der Zellen/ μ l als Mittelwert und Standardabweichung pro Stimulus und Aktivierungsmerkmal (BrdU, IFN-gamma und Oberflächenantigene) in drei unabhängigen Versuchen im BrdU-Proliferationsassay.

Anzahl Zellen/μl	Mean	Std.dev.	Mean	Std.dev.
A			14,69	1,96
BrdU	15,32	12,96		
IFN gamma	15,66	12,92		
BrdU+IFN gamma	14,47	12,51		
BrdU	13,20	9,03		
CD25,69,HLA DR	17,64	14,21		
BrdU+CD 25,69,HLA DR	12,34	8,86		
IFN gamma	13,33	8,58		
CD25,69,HLA DR	17,80	13,58		
IFN gamma + CD25,69, HLA DR	12,43	8,23		
A/B*			50,34	4,94
BrdU	47,11	27,75		
IFN gamma	48,66	29,38		
BrdU+IFN gamma	43,80	27,66		
BrdU	49,26	25,06		
CD25,69,HLA DR	57,76	25,37		
BrdU+CD 25,69,HLA DR	47,64	24,42		
IFN gamma	50,72	27,39		
CD25,69,HLA DR	60,07	24,85		
IFN gamma + CD25,69, HLA DR	48,08	26,01		
A/PHA			158,07	55,47
BrdU	94,66	57,27		
IFN gamma	78,31	56,01		
BrdU+IFN gamma	71,03	56,77		
BrdU	200,33	89,92		
CD25,69,HLA DR	209,76	87,18		
BrDU+CD 25,69,HLA DR	196,40	88,11		
IFN gamma	182,29	78,77		
CD25,69,HLA DR	210,75	88,93		
IFN gamma + CD25,69, HLA DR	179,12	78,47		
A/SEB			215,74	60,01
BrdU	148,90	86,49		
IFN gamma	166,39	95,56		
BrdU+IFN gamma	127,70	91,42		
BrdU	223,73	101,97		
CD25,69,HLA DR	305,68	97,96		
BrdU+CD 25,69,HLA DR	219,07	99,89		
IFN gamma	220,85	92,55		
CD25,69,HLA DR	313,57	105,64		
IFN gamma + CD25,69, HLA DR	215,77	91,01		

3.6.2 Proliferationsanalyse auf Einzelzellebene mit Dendritischen Zellen als Stimulatoren

Nach der in Kapitel 2 beschriebenen Methode wurde in drei unabhängigen Versuchen der BrdU-Proliferationstest durchgeführt. In den drei, mit Dendritischen Zellen als Stimulatoren eingesetzten Versuchen wurden die in Tabelle 46 aufgeführten Ergebnisse erzielt.

3.6.2.1 Proliferationsanalyse der Negativfraktion

Tabelle 46:

Stimulationsindex als Mittelwert und Standardabweichung in drei unabhängigen Versuchen im BrdU-Proliferationsassay in Prozent, wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Pro Zellpopulation wurden die jeweiligen Ergebnisse der Oberflächenmarkeranalyse gegenüber den einzelnen Stimuli gemittelt. Anm.: Die Antigene PHA und Aspergillus Antigen wurden in zwei, Adenovirus Antigen in einem Versuch eingesetzt

Proliferationsindex (%)	Ausgangspopulation		Negativfraktion	
	Mean	Std.dev.	Mean	Std.dev.
Antigene	100,00	0,00	56,82	36,61
A/B*	100,00	0,00	56,82	36,61
A/B*+A*	888,42	84,12	254,24	72,33
A/B*+B*	439,72	47,26	379,56	89,86
A/B*+C*	793,96	219,56	859,10	354,48
A/B*+PHA	572,30	171,54	746,58	401,23
A/B*+SEB	724,07	142,17	123,85	123,85
A/B*+TET	817,81	94,94	470,97	37,15
A/B*+Adeno	1064,62	115,97	514,43	37,97
A/B*+Asp	314,42	70,96	380,39	62,65

Es zeigt sich in Tabelle 46, dass die Negativfraktion hinsichtlich der Alloreaktivität deutlich niedrigere Proliferationsindizes zeigt als die entsprechende Ausgangspopulation. Nur gegenüber autologen Zellen und SEB wurden mit einem Index von 254,24 (+/-72,33) beziehungsweise 123,85 (+/-123,85) geringere mittlere Reaktionen gemessen. Die höchste Aktivität im Vergleich zur Ausgangspopulation wurde durch Fremdanigen stimulierte Zellen erzielt. Sie erreichten im Vergleich zur nicht stimulierten Ausgangspopulation

einen 8,59 fachen Aktivitätsindex. Das sind 65,14 Prozentpunkte mehr als die mit Fremdantigen inkubierten Ausgangszellen erbrachten. Relativ hohe Indices konnten gegenüber Tetanus-Toxoid (470,97 Prozent), Adenovirus Antigen (514,43 Prozent) und Aspergillus fumigatus Antigen (380,39 Prozent) erzielt werden. Letzteres zeigte eine durchschnittliche Steigerung von 120,98 Prozent gegenüber der mit gleichem Antigen stimulierten Ausgangszellfraktion. Auch gegenüber PHA war die Negativfraktion besser zu aktivieren als die Vergleichsgruppe, diese erreichte einen Index von 572,30 (+/- 171,54) Prozent. Die Zellen der Negativfraktion konnten hier um 174,28 Prozentpunkte höhere Aktivitäten erzielen.

Zusammenfassend zeigte die negative T-Zellfraktion nach Depletion eine erhaltene Aktivität gegenüber Adenovirus Antigen und Tetanus-Toxoid eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit gegenüber Aspergillus fumigatus und Fremdantigen und darüber hinaus eine reduzierte Aktivität gegenüber autologen und allogenen Zellen.

3.6.2.2 Proliferationsanalyse der Expansionsfraktion

Nach der in Kapitel 2 beschriebenen Methode wurde in einem Versuch der BrdU-Proliferationstest an der expandierten Negativfraktion durchgeführt. Die Ergebnisse des Versuches sind in Tabelle 47 näher aufgeführt.

Tabelle 47:

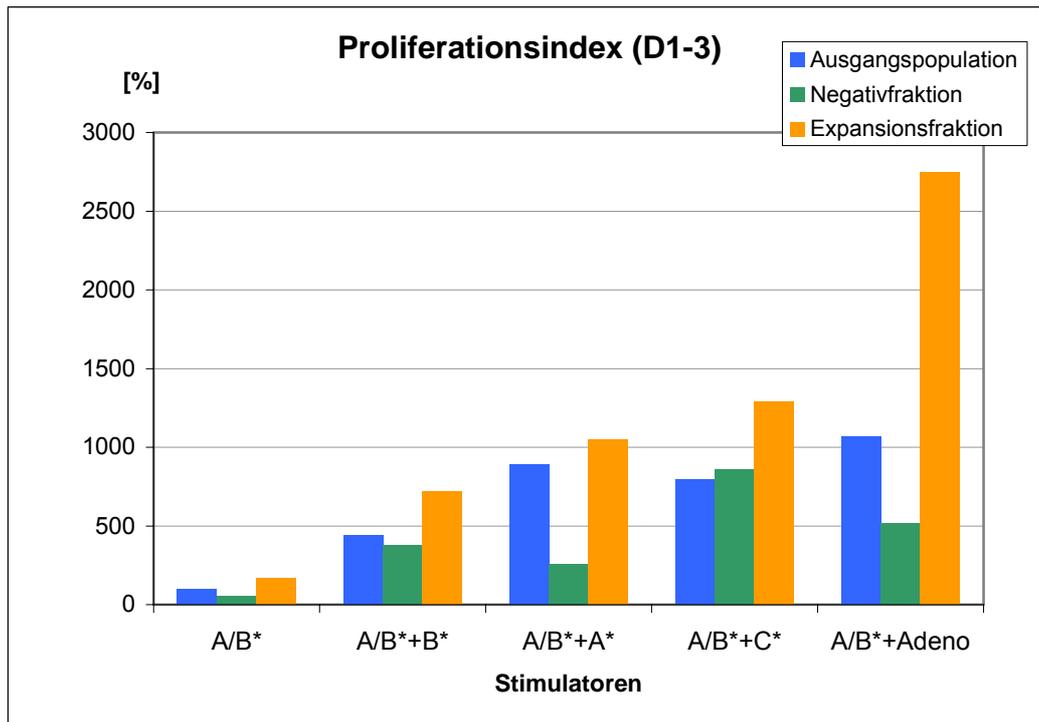
Proliferationsindex der Oberflächenantigenanalyse im BrdU-Proliferationsassay der Ausgangspopulation, der Negativ- und der Expansionsfraktion in Prozent, wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Pro Zellpopulation wurden die jeweiligen Ergebnisse der Oberflächenmarkeranalyse gegenüber den einzelnen Stimuli gemittelt.

Proliferationsindex (%)	Ausgangspopulation	Negativfraktion	Expansionsfraktion
A/B*	100,00	56,82	168,91
A/B*+A*	888,42	254,24	1050,17
A/B*+B*	439,72	379,56	718,93
A/B*+C*	793,96	859,10	1291,07
A/B*+Adeno	1064,62	514,43	2744,99

Betrachtet man die expandierten Zellen der Negativfraktion, ist gegenüber der Ausgangsfraktion und der Negativfraktion eine deutlich erhöhte Aktivität zu erkennen. Nicht inkubierte Zellen erreichen im Vergleich zur Ausgangspopulation um 168,91 Prozent höhere Werte. Gegenüber der Negativfraktion ist der Index auf den 2,97 fachen Wert angestiegen. Stimulierte man die Expansionsfraktion mit autologen Zellen, erreichten diese mit einem Index von 1050,17 Prozent einen Wert, der über dem vierfachen der Reaktion der Negativfraktion lag. Auch die allogene Reaktion zeigte um 339,37 Prozentpunkte höhere Werte. Mit 2744,99 Prozent konnten die mit Adenovirus Antigen inkubierten expandierten Zellen die höchsten Werte erzielen. Die Negativfraktion reagierte mit unter einem fünftel dieses Wertes. Die Zellen der expandierten Negativfraktion erreichten gegen Fremddantigene 150,28 Prozent des Wertes der Negativfraktion. Expandierte Zellen zeigten eine gesteigerte Aktivität gegenüber Fremddantigenen und Pathogenen, allerdings auch hohe Aktivität in der Allogenität und gegenüber autologen Zellen. Abbildung 15 führt die Indizes aller drei untersuchten Zellpopulationen auf.

Abbildung 15:

Proliferationsindex der Oberflächenantigenanalyse im BrdU-Proliferationsassay der Ausgangspopulation, der Negativ- und der Expansionsfraktion in Prozent, wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Pro Zellpopulation wurden die jeweiligen Ergebnisse der Oberflächenmarkeranalyse gegenüber den einzelnen Stimuli gemittelt.



3.6.2.3 Die BrdU-Proliferationsanalyse im Methodenvergleich

Werden die Ergebnisse der drei Einzelversuche im BrdU-Proliferationsassay mit den Ergebnissen des parallel durchgeführten [6-H₃] Thymidin-Assays und des Elispot-Assays verglichen, erhält man die in nachfolgenden Tabellen (Tab. 48, 49 und 50) aufgeführten Zahlenwerte.

Tabelle 48:

Gemittelter Proliferationsindex der Ausgangspopulation gegenüber diversen Antigenen im BrdU-Proliferationsassay, Elispot-Assay und [6-H₃] Thymidin-Assay in Prozent wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Zusätzlich aufgeführt die Korrelationen (p-Wert) der Testmethoden zueinander (BrdU/[6-H₃], BrdU/Elispot Assay und in der letzten Spalte [6-H₃]/Elispot Assay.

	BrdU Proliferationsassay	[6-H₃] Thymidin Assay	Elispot Assay	P-WertT/E
P-Wert	BrdU	0,88	0,98	0,93
A/B*	100,00	100,00	100,00	
A/B*+B*	428,61	509,48	457,48	
A/B*+A*	436,15	55,16	525,20	
A/B*+PHA	855,45	1537,56	1466,93	
P-Wert	IFN gamma	0,58	0,79	0,93
A/B*	100,00	100,00	100,00	
A/B*+B*	285,14	509,48	457,48	
A/B*+A*	352,29	55,16	525,20	
A/B*+PHA	389,29	1537,56	1466,93	
P-Wert	BrdU+IFN gamma	0,55	0,81	0,93
A/B*	100,00	100,00	100,00	
A/B*+B*	246,00	509,48	457,48	
A/B*+A*	424,36	55,16	525,20	
A/B*+PHA	463,28	1537,56	1466,93	
P-Wert	CD 69	0,86	0,95	0,93
A/B*	100,00	100,00	100,00	
A/B*+B*	360,46	509,48	457,48	
A/B*+A*	348,43	55,16	525,20	
A/B*+PHA	609,00	1537,56	1466,93	
P-Wert	BrdU+CD69	0,84	0,95	0,93
A/B*	100,00	100,00	100,00	
A/B*+B*	380,98	509,48	457,48	
A/B*+A*	394,76	55,16	525,20	
A/B*+PHA	669,80	1537,56	1466,93	
P-Wert	IFN gamma+CD69	0,66	0,83	0,93
A/B*	100,00	100,00	100,00	
A/B*+B*	319,41	509,48	457,48	
A/B*+A*	338,77	55,16	525,20	
A/B*+PHA	418,99	1537,56	1466,93	

In der Ausgangspopulation sind die beiden parallel zum BrdU-Einbau durchgeführten Tests, [6-H₃] Thymidin-Assay und Elispot-Analyse korreliert worden und ergaben eine Übereinstimmung von 0,93. Vergleicht man die

einzelnen Oberflächenanalysen des BrdU-Einbaus mit diesen Versuchsreihen, ergeben sich je nach untersuchtem Oberflächenantigen unterschiedliche Werte. Die höchste Übereinstimmung ergab sich zwischen BrdU-Assay und Elispot, wenn dabei als Oberflächenantigen BrdU analysiert wurde, nämlich 0,98. Eine Korrelation von 0,95 zeigte sich, wenn die Aktivität mittels CD 69 und in Kombination mit BrdU bestimmt worden war. Die Kombination von BrdU und Interferon gamma ergab eine Korrelation von 0,81, die simultanen Analyse von Interferon gamma mit CD 69 eine Übereinstimmung von 0,83. Die Bestimmung von Interferon gamma allein ergab eine Korrelation mit dem Elispot-Assay von 0,79.

Bezogen auf den Thymidineinbau, zeigte sich für BrdU eine Korrelation von 0,88, gefolgt von CD 69 mit 0,86. 0,84 wurde mit der simultanen Analyse von BrdU und CD 69 erreicht. Wurde CD 69 in Kombination mit Interferon gamma bestimmt, ergab sich eine Übereinstimmung von 0,66. Die Analyse der Interferon gamma Sekretion zeigte, bezogen auf den Thymidineinbau, eine Übereinstimmung von 0,58, für BrdU in Kombination mit IFN-gamma 0,55.

Tabelle 49:

Gemittelter Proliferationsindex der Negativfraktion gegenüber diversen Antigenen im BrdU-Proliferationsassay, Elispot-Assay und [6-H₃] Thymidin-Assay in Prozent wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Zusätzlich aufgeführt die Korrelationen (p-Wert) der Testmethoden zueinander (BrdU/[6-H₃], BrdU/Elispot Assay und in der letzten Spalte [6-H₃]/Elispot Assay).

	BrdU Proliferationsassay	[6-H₃] Thymidin Assay	Elispot Assay	p-WertT/E
P-Wert	BrdU	0,97	0,78	0,83
A/B*	51,18	2,24	77,95	
A/B*+A*	213,51	2,38	645,67	
A/B*+B*	287,96	75,62	184,25	
A/B*+PHA	1610,31	893,99	1100,00	
P-Wert	IFN gamma	0,58	0,44	0,83
A/B*	116,30	2,24	77,95	
A/B*+A*	342,37	2,38	645,67	
A/B*+B*	535,13	75,62	184,25	
A/B*+PHA	583,621551	893,99	1100,00	
P-Wert	BrdU+IFN gamma	0,80	0,62	0,83
A/B*	71,19	2,24	77,95	
A/B*+A*	231,68	2,38	645,67	
A/B*+B*	532,39	75,62	184,25	
A/B*+PHA	700,82	893,99	1100,00	
P-Wert	CD 69	0,89	0,80	0,83
A/B*	22,30	2,24	77,95	
A/B*+A*	161,88	2,38	645,67	
A/B*+B*	233,4628833	75,62	184,25	
A/B*+PHA	594,85	893,99	1100,00	
P-Wert	BrdU+CD69	0,77	0,77	0,83
A/B*	18,07	2,24	77,95	
A/B*+A*	215,07	2,38	645,67	
A/B*+B*	274,88	75,62	184,25	
A/B*+PHA	639,12	893,99	1100,00	
P-Wert	IFN gamma+CD69	0,28	0,47	0,83
A/B*	42,51	2,24	77,95	
A/B*+A*	360,9520902	2,38	645,67	
A/B*+B*	413,54	75,62	184,25	
A/B*+PHA	350,77	893,99	1100,00	

Für die Negativfraktion ergibt sich, vergleicht man den Thymidineinbau mit dem Elispot Assay, eine Korrelation von 0,83. Mit 0,80 zeigt die Analyse auf CD 69 im Vergleich zum Elispot-Assay die höchste Korrelation der BrdU-Proliferationsanalyse. 0,78 wird durch den Vergleich mit Werten der BrdU-

Einbaurrate, 0,77 bei der Analyse von BrdU in Kombination mit CD 69 erzielt. Kombinierte man die Analyse von BrdU mit Interferon gamma, war die Übereinstimmung 0,62. Die simultane Bestimmung der Aktivität durch Interferon gamma und CD 69 brachte eine Korrelation von 0,47. 0,44 ergab der Vergleich zwischen dem Elispot-Assay und der Bestimmung von Interferon gamma.

Vergleicht man die Ergebnisse der BrdU-Analyse mit denen des [6-H₃] Thymidin-Assays, ergaben sich Korrelationen mit großer Variationsbreite. Die höchste Übereinstimmung, nämlich eine Korrelation von 0,97, konnte mit der Analyse der BrdU-Einbaurrate erzielt werden. 0,89 ergab der Vergleich der Analyse von CD 69 mit der Thymidineinbaurrate. Die simultane Untersuchung von BrdU und Interferon gamma ergab eine Übereinstimmung von 0,80, mit CD 69 eine Übereinstimmung von 0,77. Vergleicht man die Ergebnisse der Interferon gamma-Analyse mit denen der Thymidineinbaurrate, ergibt sich eine Übereinstimmung von 0,58. Die geringste Übereinstimmung ergab sich mit einer Korrelation von 0,28 bei der Untersuchung von Interferon gamma und CD 69.

Tabelle 50:

Gemittelter Proliferationsindex der Expansionsfraktion gegenüber diversen Antigenen im BrdU-Proliferationsassay, Elispot-Assay und [6-H₃] Thymidin-Assay in Prozent wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Zusätzlich aufgeführt die Korrelationen (p-Wert) der Testmethoden zueinander (BrdU/[6-H₃], BrdU/Elispot Assay und in der letzten Spalte [6-H₃]/Elispot Assay).

	BrdU	[6-H₃] Thymidin Assay	Elispot Assay	p-WertT/E
P-Wert	BrdU	0,09	0,99	-0,02
A/B*	123,85	100,00	100,00	
A/B*+B*	542,69	816,22	657,14	
A/B*+A*	791,97	169,87	1722,86	
A/B*+Adeno	2080,95	371,21	4388,57	
P-Wert	IFN gamma	0,07	1,00	-0,02
A/B*	152,53	100,00	100,00	
A/B*+B*	628,39	816,22	657,14	
A/B*+A*	975,48	169,87	1722,86	
A/B*+Adeno	2578,35	371,21	4388,57	
P-Wert	BrdU+IFN gamma	0,00	0,97	-0,02
A/B*	15,10	100,00	100,00	
A/B*+B*	46,79	816,22	657,14	
A/B*+A*	103,73	169,87	1722,86	
A/B*+Adeno	628,23	371,21	4388,57	
P-Wert	CD 69	0,10	0,99	-0,02
A/B*	155,11	100,00	100,00	
A/B*+B*	683,70	816,22	657,14	
A/B*+A*	982,42	169,87	1722,86	
A/B*+Adeno	2417,21	371,21	4388,57	
P-Wert	BrdU+CD69	0,10	0,99	-0,02
A/B*	263,07	100,00	100,00	
A/B*+B*	1118,21	816,22	657,14	
A/B*+A*	1560,17	169,87	1722,86	
A/B*+Adeno	4080,75	371,21	4388,57	
P-Wert	IFN gamma+CD69	0,09	0,99	-0,02
A/B*	303,78	100,00	100,00	
A/B*+B*	1293,82	816,22	657,14	
A/B*+A*	1887,26	169,87	1722,86	
A/B*+Adeno	4684,48	371,21	4388,57	

Betrachtet man die Untersuchungen der Expansionsfraktion, zeigen die parallel durchgeführten Tests im Fall des Vergleichs der BrdU-Proliferationsanalyse mit dem Elispot-Assay hohe Übereinstimmungen. Vergleicht man die Ergebnisse des Thymidineinbaus mit denen des Elispots und des BrdU-Assays, ergeben

sich geringe Übereinstimmungen. Von 0,97 (Analyse von BrdU und IFN-gamma) bis 1,00 (IFN-gamma alleine) reichen Vergleichswerte von BrdU mit dem Elispot-Assay. Dem gegenüber ergibt sich die Korrelation von -0,02, wenn man die Ergebnisse des Thymidineinbaus mit denen des Elispots vergleicht.

3.7 Versuchsreihe mit Patientenzellen

Die unter Kapitel 2 beschriebenen Methoden wurden in insgesamt drei Fällen mit pädiatrischem Patientenblut durchgeführt, wobei in nur einem Fall ein kompletter Versuchszyklus vollendet werden konnte. Als Stimulatorfraktion dienten aus Patientenblut generierte Dendritische Zellen. Die benötigten Responderzellen wurden aus entsprechendem Spenderleukapheresat gewonnen. Da in nur einem Fall die Versuchsreihe komplettiert werden konnte, wird im Folgenden auch nur dieser näher beschrieben (P1; Pat.I.D.: B.M.C).

Aus 4,2 ml Leukapheresat wurden 413×10^6 periphere mononukleäre Zellen (PMNC) hergestellt. Für die Generierung Dendritischer Zellen standen insgesamt 14 ml Vollblut zur Verfügung, aus denen nach dem Auftauen $2,5 \times 10^6$ Zellen zur weiteren Verwendung bereitstanden.

3.7.1 Anteile einzelner Zellfraktionen

Bei der Depletion von alloreaktiven Zellen am CliniMACS[®] (s.o.), die sich der primären T-Zellstimulation mittels MLC (gemischte Lymphozytenkultur) anschloss, konnten zwei verschiedene Populationen identifiziert werden. Die eine Population war CD 25, CD 69 und HLA DR negativ, das heißt es befanden sich keine dieser aktivierten Oberflächenmarker auf den einzelnen Zellen. Diese sind also nicht-allogen reaktiv. Die andere Population war in mindestens einem der genannten Marker positiv, also alloreaktiv. In diesem Experiment konnten 212×10^6 Zellen zur Depletion eingesetzt werden. Davon waren nach der magnetischen Zellseparation 54×10^6 Zellen positiv markiert, 72×10^6 Zellen zeigten keine Markierung.

3.7.2 Recovery Rate

Setzt man die Anzahl der nach immunomagnetischer Depletion erhaltenen nicht-alloreaktiven Zellen, die so genannte Negativfraktion, in Relation zur Anzahl der eingesetzten Gesamtzellzahl vor Depletion, erhält man die Recovery Rate. In diesem Experiment waren 33,96 Prozent der primär aus Vollblut gewonnenen peripheren mononukleären Zellen (PMNC) ohne allogene Potenz, also nicht-alloreaktiv.

3.7.3 Anteil nicht-alloreaktiver Zellen pro Milliliter Leukapheresat

Leukapheresat besteht aus in hoher Konzentration vorliegenden lymphatischen Zellen, die in vivo abfiltriert wurden. Die Ausbeute an negativen Zellen pro Milliliter betrug 98,33 Zellen.

3.7.4 Zellverluste

Schon während der Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PMNC) aus Vollblut, während der dreitägigen Inkubation der primären gemischten Lymphozytenkultur (MLC), während der Vorbereitung der Zellen zur magnetisch aktivierten Zellseparation (MACS) und bei der Depletion selbst ist mit Zellverlusten zu rechnen.

Des Weiteren stehen diejenigen Zellen nicht mehr zur magnetischen Auftrennung zur Verfügung, die nach dreitägiger Lymphozytenkultur (MLC) für die nachfolgenden Nachweismethoden und zur Restimulation entnommen wurden. Je Versuch wurden dafür 20×10^6 Zellen vor Zellseparation gewonnen. In diesem Versuch wurden 413×10^6 Zellen eingesetzt. Abzüglich der 20×10^6 Zellen verblieben 393×10^6 Zellen. Nach magnetisch aktivierter Zellseparation (MACS) wurden 212×10^6 Zellen gezählt. Der Zellverlust betrug somit 201×10^6 Zellen.

Auch während der magnetisch aktivierten Zellseparation gibt es Zellverluste. Von den eingesetzten Zellen waren nach Depletion 126×10^6 Zellen, das entspricht 40,57 Prozent der Zellzahl vor Depletion, vorhanden.

3.7.5 Charakterisierung von T-Lymphozytenpopulationen

Um eine Aussage über die allogene beziehungsweise antigene Potenz der untersuchten T-Zellen treffen zu können, wurden diese auf ihre spezifischen Aktivierungsmarker, oder auch Oberflächenantigene, mittels Durchflußzytometrie (FACS) untersucht. Darüber hinaus wurde ihre Fähigkeit zur Proliferation im Thymidin [6-H₃] Proliferations-Assay und ihr Grad der Aktivierungsfähigkeit gegenüber allogenen Stimuli mittels Elispot-Assay charakterisiert. Außerdem kann dadurch die Effizienz der Magnetisch aktivierten Zellseparation am klinischen System (CliniMACS®) bestimmt werden.

3.7.5.1 Oberflächenantigenanalyse

Die Eigenschaften CD 3 positiver Zellen hinsichtlich der drei Oberflächenaktivierungsmarker CD 25, CD 69 und HLA DR wurden an den drei folgenden Zellpopulationen untersucht.

- T-Lymphozyten nach dreitägiger MLC, nicht magnetisch separiert (Ausgangspopulation)
- T-Lymphozyten nach dreitägiger MLC, magnetisch separiert und markiert (Positivfraktion)
- T-Lymphozyten nach dreitägiger MLC, magnetisch separiert und nicht markiert (Negativfraktion)

3.7.5.2 Oberflächenantigenanalyse als Nachweis der Aktivierbarkeit beziehungsweise Alloreaktivität der eingesetzten Zellpopulation

In vorliegendem Experiment wurden nach dreitägiger Kultur mindestens 20×10^6 Zellen vor der magnetischen Depletion (CliniMACS®) entnommen und mittels Durchflußzytometrie (FACS) analysiert. Dabei zeigte sich eine Aktivierungsrate der CD 3 positiven T-Zellen für einen der drei Aktivierungsmarker CD 25, CD 69 und HLA DR von 17,08 Prozent. Unterteilte man die T-Zellen in ihre zwei Subpopulationen zeigte sich, dass CD 3+/CD 4+ T-Zellen mit 6,21 Prozent deutlich weniger Oberflächenantigene besaßen als

CD 3+/CD 8+ Zellen, von denen 11,45 Prozent Aktivierungsmarker exprimierten.

Untersuchte man die T-Lymphozyten auf nur jeweils einen der drei Oberflächenantigene, so zeigten sich etwas niedrigere Werte, durchschnittlich 14,02 (+/-4,98) Prozent.

Die Untersuchung der T-Lymphozyten vor der Separierung an der magnetischen Säule dient dem Nachweis einer stattgehabten Aktivierung mit entsprechenden Antigenen während der dreitägigen Inkubation. Vergleicht man diese mit Zellfraktionen, die depletiert wurden, lässt sich die Effektivität der magnetischen Zellsortierung nachweisen.

3.7.5.3 Oberflächenantigenanalyse der Zellfraktionen nach Depletion (CliniMACS®)

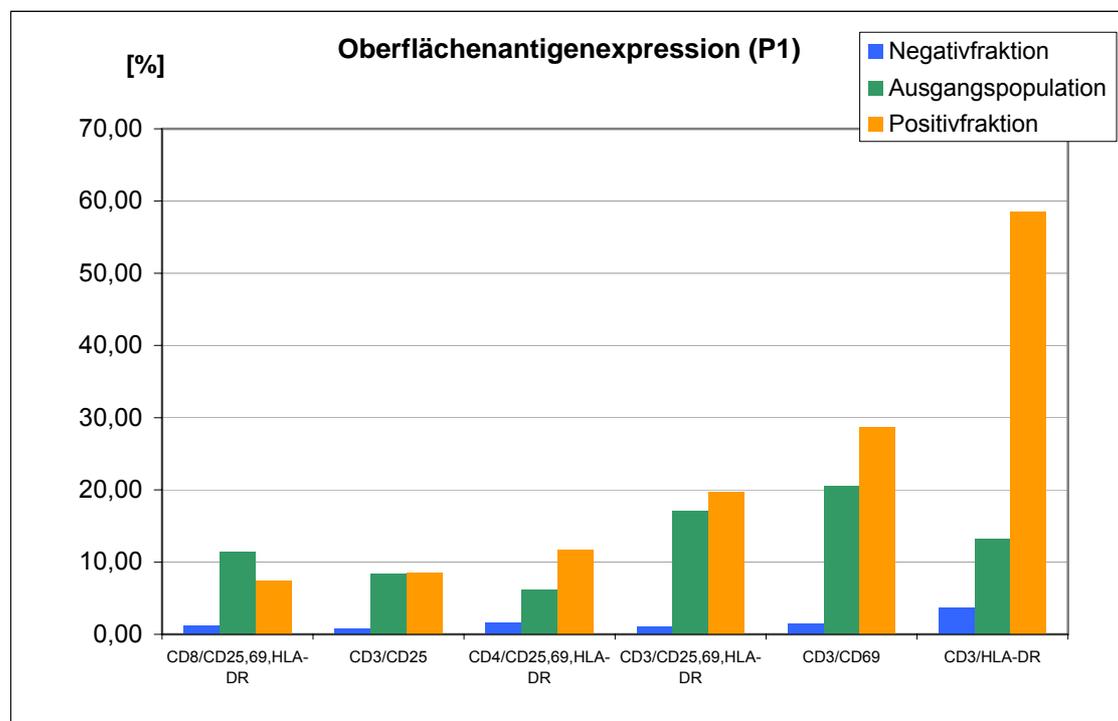
Im vorliegenden Versuch wurden die erhaltenen Zellfraktionen mittels Durchflußzytometrie untersucht und mit den Ergebnissen der Ausgangspopulation verglichen.

Nach erfolgreicher Separation erhielt man zwei unterschiedliche Lymphozytenpopulationen. Eine, die durch vorausgegangene magnetische Markierung ihrer exprimierten Oberflächenmoleküle an der magnetischen Säule anhaftete, diese wurde auch als „Positivfraktion“ benannt und eine zweite, die keine Aktivierungsmarker besaß, dementsprechend nicht magnetisch markiert werden konnte, an der Säule vorbeifloss und als „Negativfraktion“ bezeichnet wurde. Die nachfolgende Oberflächenzellanalyse zeigte, dass, bezogen auf ein Merkmal, im Mittel 31,90 (+/-20,58) Prozent der als Positiv bezeichneten Zellfraktion dieses exprimierten. Auf durchschnittlich 1,99 (+/-1,23) Prozent der Negativfraktion ließ sich CD 25, CD 69 oder HLA DR nachweisen. Dies entspricht einer Reinheit von 98,01 Prozent. Wurden diese auf alle drei Antigene untersucht, waren 1,02 Prozent positiv. Eine Aufteilung in T-Zelluntereinheiten ergab für CD 4+ T-Zellen mit 1,6 Prozent höhere Anteile an Oberflächenantigenen als für CD 8+ T-Zellen, von denen durchschnittlich 1,13 Prozent Antigene aufwiesen. Betrachtet man die Werte, wenn alle drei Antigene auf einmal nachgewiesen wurden, ergibt sich für die Positivfraktion für CD 3 ein

Prozentsatz von 19,69. Bei der Aufteilung in T-Zellsubpopulationen zeigten CD 4+ Zellen im Mittel mit 11,60 Prozent im Vergleich zu CD 8+ Zellen, von denen 7,44 für die genannten Aktivierungsmarker positiv waren, um 64,14 Prozent höhere Aktivitäten. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse aller drei Zellfraktionen ist in Abbildung 16 dargestellt.

Abbildung 16:

Oberflächenantigenanalyse der drei T-Zellpopulationen im Patientenversuch (P1) mittels FACS-Analyse in Prozent.



3.7.5.4 Reinheiten der Negativfraktion nach Depletion

Als Maß für die Effektivität der Depletionsmethode gilt die Reinheit der depletierten Zellfraktion, also der Anteil an Zellen, der nachweislich keine Oberflächenantigene besitzt. Die Reinheiten dieses Versuches sind in Tabelle 51 dargestellt.

Tabelle 51:

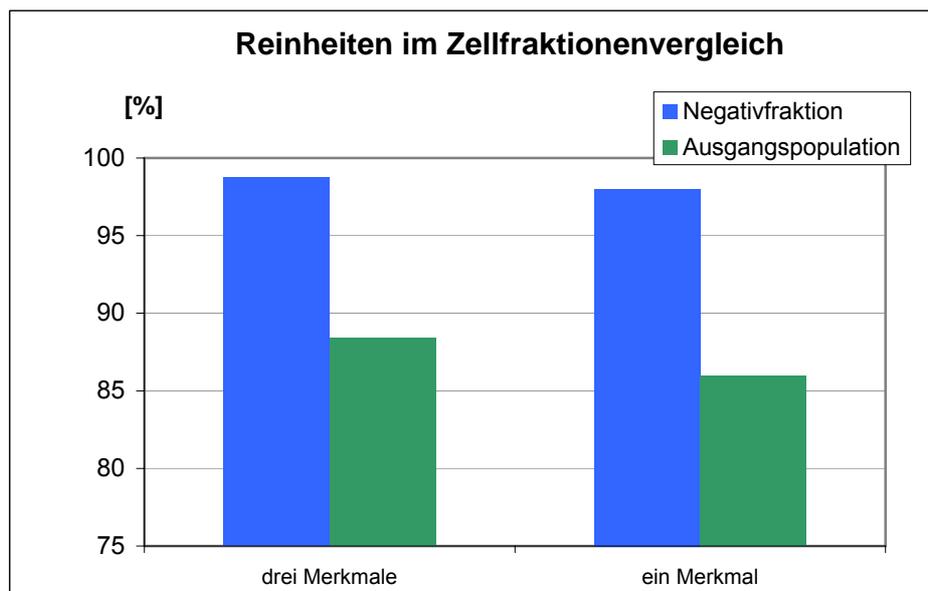
Oberflächenantigenanalyse der Ausgangs- und der Negativfraktion. Dargestellt sind die gemessenen Reinheiten der beiden T-Zellfraktionen in Prozent (Patientenversuch P1).

Oberflächenantigene (%)	Ausgangspopulation	Negativfraktion
CD3/CD69	79,49	98,51
CD3/HLA DR	86,83	96,32
CD3/CD25	91,61	99,20
CD3/25,69,HLA DR	82,92	98,98
CD8/25,69,HLA DR	88,55	98,87
CD4/25,69,HLA DR	93,79	98,40

Die durchschnittliche Reinheit der depletierten Negativfraktion lag bei 98,38 (+/- 0,96) Prozent. Eine vergleichende Darstellung der Reinheiten der Negativfraktion und der Ausgangspopulation zeigt Abbildung 17.

Abbildung 17:

Mittlere Reinheiten der Negativfraktion und der Ausgangspopulation hinsichtlich eines beziehungsweise drei Oberflächenaktivierungsantigene in der FACS-Analyse in Prozent (Versuch P1).



Am reinsten stellten sich die auf CD 3 in Kombination mit CD 25 untersuchten T-Zellen dar. Mit 3,68 Prozent der Zellen am häufigsten registriert wurden CD 3 Antigene in Verbindung mit HLA DR. Im Mittel reduzierte sich die Aktivität der depletierten T-Zellfraktion um 11,18 Prozentpunkte, die Alloreaktivität der Negativfraktion konnte auf 14,19 Prozent des Ausgangswertes reduziert werden. Am effektivsten zeigte sich die Depletion der CD 3 positiven Zellen, die eines der drei Aktivierungsmarker exprimierten, deren Expression auf 5,97 Prozent des Ausgangswertes herabgesetzt werden konnte. Auf 7,36 Prozent des Ausgangswertes wurden CD 3 positive Zellen in Verbindung mit CD 69 depletiert. Die höchste Restaktivität bildeten CD 3 positive Zellen, die HLA DR exprimierten.

3.7.6 Aktivierungsfähigkeit

Interferon gamma ist ein Zytokin, das von vielen verschiedenen Zellen als Zeichen der Zellaktivierung sezerniert wird. Zu den IFN-gamma produzierenden Zellen in der MLC gehören in erster Linie zytotoxische T-Zellen (CTL) und T-Helferzellen (Th1). Daneben wird Interferon gamma allerdings auch von NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten freigesetzt.

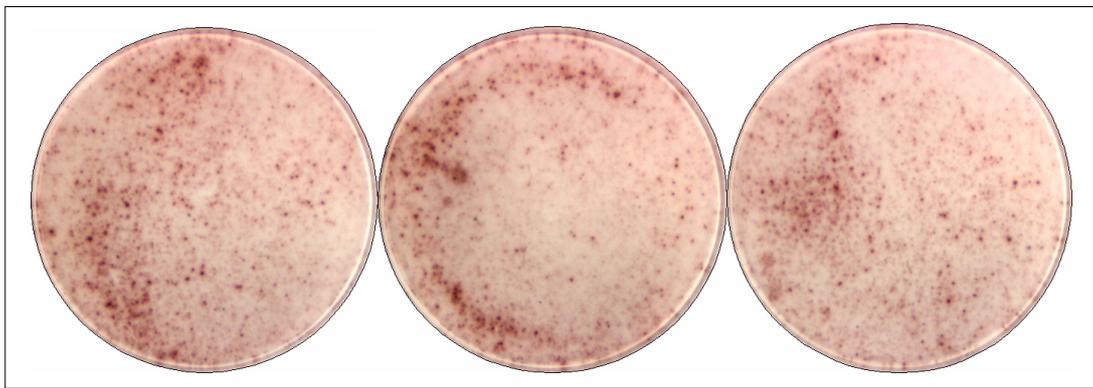
Der IFN-Nachweis durch den so genannten EliSPOT (enzyme-linked immunospot) Assay kann unter anderem dazu herangezogen werden, um die Frequenz alloreaktiver T-Lymphozyten zu ermitteln. Die Sensitivität dieser Methode, die sich lediglich auf das Registrieren von sezernierten Zytokinen beschränkt, wurde in diesem Zusammenhang mit 1/4.000 bis 1/20.000 angegeben [110]. Die sekretorische Aktivität einzelner Zellen beziehungsweise einzelner Zellklone wird dabei ausschließlich zu dem Zeitpunkt erfasst, an dem der Zytokinnachweis durchgeführt wird.

Der in Kapitel 2 beschriebene Elispot-Assay erlaubt eine quantitative Aussage bezüglich des sezernierten Interferon gamma. In diesem Zusammenhang wurden sowohl die primären MLC-Ansätze nach dreitägiger Kultivierung und anschließender zwanzigstündiger Restimulation als auch die gewonnenen Zellfraktionen nach Depletion und anschließender Exposition mit diversen Antigenen näher untersucht. Überall dort, wo während der Phase der

Restimulation Interferon gamma produziert worden war, erschien ein Punkt auf der Nitrozellulosemembran. Abbildung 18 zeigt einen Ausschnitt (Triplet) aus einer solchen 96-Loch Flachbodenplatte mit Zellulosemembran.

Abbildung 18:

Interferon gamma-Nachweis mittels Enzymreaktion im Elispot-Assay (Versuch P1). Gezeigt werden drei Nitrozellulosemembrankammern als so genanntes Triplet der Negativfraktion vs. PHA (Phythämagglutinin).



Sowohl die absolute Zahl an „spots“ als auch der prozentuale Anteil, der von Punkten bedeckten Gesamtfläche, wurde anschließend von einem Messgerät aufgezeichnet. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und anschließend auf die unbehandelte Ausgangspopulation bezogen (Tabelle 52).

Tabelle 52:

Index der Interferon gamma Sekretion im Elispot-Assay der untersuchten Populationen je Antigen in Prozent. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben.*

Index (%)	Ausgangspopulation	Negativfraktion	Positivfraktion
A/B*	100,00	44,44	77,78
A/B*+A*	577,78	1155,56	955,56
A/B*+B*	600,00	722,22	133,33
A/B*+C*	244,44	322,22	88,89
A/B*+Tet	633,33	188,89	611,11
A/B*+ADV	3344,44	1633,33	1122,22
A/B*+PHA	7900,00	5188,89	7700,00
A/B*+CMV	244,44	166,67	322,22

Es zeigt sich, dass die Negativfraktion hohe Reaktionen gegenüber autologen Antigenen hervorbrachte. Mit einem Index von 1155,56 Prozent reagierten diese gegenüber der Ausgangspopulation mit dem zweifach erhöhten Wert. Auch die allogene Reaktion versus B* ist mit 722,22 Prozent im Vergleich zum Wert der Ausgangsfraktion (600,00 Prozent), deutlich höher. Fremdartigen gegenüber zeigten sich T-Zellen der Negativfraktion ebenfalls sehr aktiv. Hier wurden im Vergleich zur Ausgangspopulation 131,82 Prozent, im Vergleich zur Positivfraktion 362,50 Prozent erzielt. Das Verhalten gegenüber humanpathogenen Erregern stellt sich wie folgt dar: CMV-Antigen stimulierte die negativen T-Zellen auf den 1,67 fachen Wert im Vergleich zur nicht inkubierten Ausgangsfraktion, Adenovirus Antigen konnte mit einem Index von 1633,33 Prozent einen gegenüber der Positivfraktion 1,46 fachen Aktivitätsindex erzielen. Tetanus-Toxoid aktivierte die Negativfraktion auf einen Index von 188,89 Prozent. Die maximale Stimulation wurde mit 5188,89 Prozent durch PHA erzielt.

Zusammenfassend zeigten T-Zellen der Negativfraktion hohe Stimulationsindizes. Dies ist gegenüber Fremdartigen, Humanpathogenen und PHA erwünscht. Damit verbunden ist allerdings auch eine erhöhte Alloreaktivität und eine verstärkte Aktivität gegenüber autologen Zellen.

3.7.7 Proliferationsfähigkeit

Im Gegensatz zu anderen Zellen zeichnen sich aktivierte T-Lymphozyten, neben der zellspezifischen Zytokinfreisetzung, auch durch die Fähigkeit aus, zu proliferieren und Zellklone zu bilden. Diese T-Zell spezifischen Proliferationseigenschaften lassen sich durch den Nachweis tritiummarkierten [6-H³] Thymidins, das im Rahmen dieser Aktivierungsvorgänge als Baustein in die DNA betroffener Zellen eingebaut wird, detektieren.

Der Nachweis von solchen Proliferationseigenschaften ist wichtig für die Charakterisierung von Zellen hinsichtlich ihres Aktivierungsgrades gegenüber allogenen und autologen Zellen.

Wie in Kapitel 2 näher beschrieben, wurden nach dreitägiger Inkubationsdauer jeweils 1×10^6 Zellen aus der primären MLC oder nach Aufbereitung mittels

magnetisch aktivierter Zellseparation (CliniMACS®) verwendet und in einer sekundären Mikro-MLC für weitere fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart von [6-H³] Thymidin für weitere 15 Stunden inkubiert. Die hieraus resultierenden Daten dieses Versuches sind in Tabelle 53 dargestellt.

Tabelle 53:

Stimulationsindex der Mikro-MLC im [6-H₃] Thymidin-Proliferationsassay der drei Zellpopulationen, die durch diverse Antigene stimuliert wurden, in Prozent. Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben.*

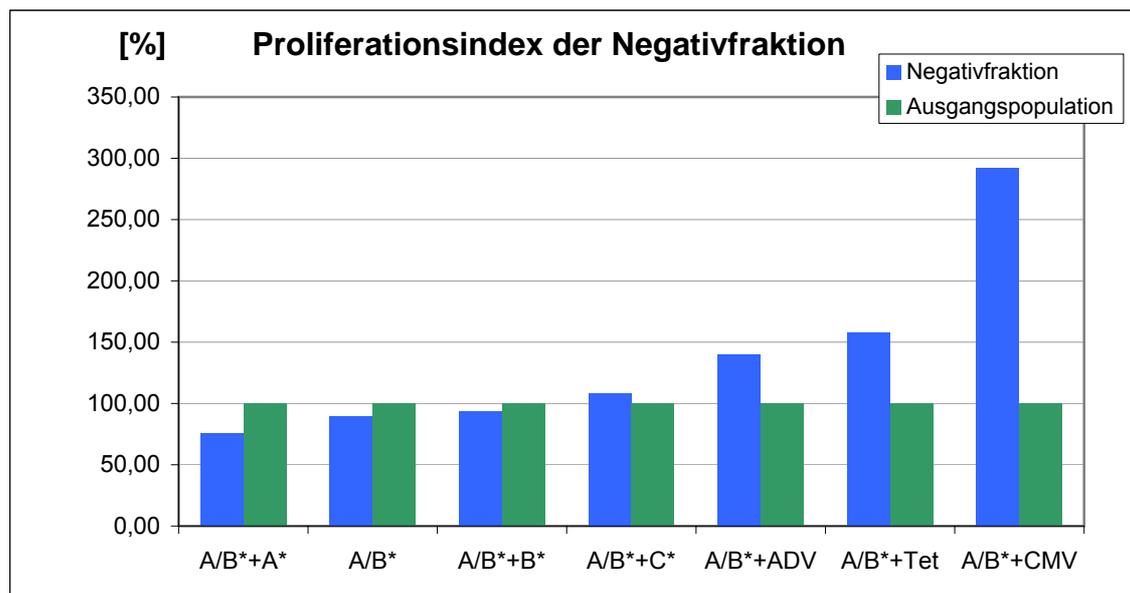
<u>Proliferationsindex (%)</u>	<u>Ausgangspopulation</u>	<u>Negativfraktion</u>	<u>Positivfraktion</u>
A/B*	100,00	89,41	27,72
A/B**+A*	1064,19	805,52	1794,77
A/B**+B*	935,95	873,28	1512,45
A/B**+C*	1157,69	1256,40	1260,96
A/B**+Tet	4082,27	6434,36	5559,56
A/B**+ADV	34,17	47,94	29,64
A/B**+PHA	13088,38	6898,37	13787,13
A/B**+CMV	19,20	56,08	836,24

Betrachtet man die Proliferationsindizes der Negativfraktion stellt man fest, dass gegenüber allogenen Antigenen eine Reduktion der Aktivität vorhanden ist. Mit einem Index von 873,28 Prozent war diese im Vergleich zur Ausgangspopulation um 6,70, gegenüber der Positivfraktion um 57,74 Prozent niedriger. Auch gegenüber autologen Zellen zeigten sich T-Zellen der Negativfraktion weniger reagibel als die Vergleichspopulationen. Brachten negative Zellen einen Index von 805,52 Prozent hervor, zeigten sich die Werte der entsprechenden Positivzellen um 989,25 Prozentpunkte höher. Die Negativfraktion erreichte in der Proliferationsfähigkeit gegenüber ihrer Ausgangspopulation nur 75,69 Prozent. Gegenüber Fremdanigen zeigte sich die Aktivierungsfähigkeit der Negativpopulation mit 1256,40 Prozent etwas höher als die der Ausgangszellen, jedoch nahezu gleich der Reaktion der Positivfraktion, die 1260,96 Prozent erzielte. Adenovirus Antigen stimulierte die

Negativfraktion auf einen Index von 47,97 Prozent. Dies sind 140,29 Prozent der Reaktion der Ausgangsfraktion, und 161,67 Prozent der Reaktion positiver Zellen. Auch Tetanus-Toxoid erzielte in der Negativfraktion mit 6434,36 Prozent den höchsten Index und war somit gegenüber der Ausgangszellpopulation um 157,62, gegenüber der Positivfraktion um 136,19 Prozent effektiver. Gegenüber Zytomegalievirus Antigen erreichten die negativ bezeichneten T-Zellen 56,08 Prozent, was einer Steigerung um 292,09 Prozent gegenüber den Ausgangszellen entspricht. Der Proliferationsindex der Negativfraktion ist in Abbildung 19 dargestellt.

Abbildung 19:

Proliferationsindex der Negativfraktion (Versuch P1) in Prozent, wobei der Proliferationsindex auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde.



4 Diskussion

4.1 Die haploidentische Stammzelltransplantation

Die haploidentische Stammzelltransplantation (HSCT) ist ein etabliertes Verfahren zur Therapie maligner und nicht maligner immunologischer Erkrankungen [3]. Reisner [135] und O`Reilly [126] zeigten, dass an schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID) erkrankte Kinder durch eine elterliche, T-Zell depletierte, haploidentische Knochenmarktransplantation geheilt werden konnten. Durch die Gabe nicht HLA-identischer hämatopoetischer Stammzellen wird sowohl ein verlässliches Anwachsen des Transplantats als auch eine akzeptable Rate an GVHD, die Graft versus Host disease, erzielt [9], [70]. Der Nachteil dieses Verfahrens stellt die hohe Frequenz an alloreaktiven T-Zellen im peripheren Blut des haploidentischen Spenders dar. Um eine GVHD zu vermeiden, ist eine radikale Depletion der T-Zellen aus dem Transplantat erforderlich. Dies führt, zusammen mit der therapeutischen Immunsuppression in vivo, zu einer schweren Immundefizienz im Empfänger während der Phase post transplantationem [68], [50]. Dies bedeutet eine hohe Morbidität und Mortalität durch opportunistische Erkrankungen, insbesondere durch virale Erreger, und hohe Rezidivraten, da der erwünschte Graft versus Leukemia Effekt (GVL Effekt, Transplantat gegen Leukämie Effekt), ebenfalls durch T-Zellen vermittelt [192], fehlt.

4.2 Geeignete Depletionsverfahren

Die Suche nach einem geeigneten Depletionsverfahren, das in der Lage ist, spezifische T-zelluläre Immunantworten, die gegen Empfängergewebe gerichtet ist, vollständig zu eliminieren, während das antiinfektiöse und antileukämische beziehungsweise antitumoröse Potential erhalten bleibt, ist schon länger Gegenstand der Forschung.

So untersuchten Mavilio et al. [113] unter der Annahme, dass sich teilende Zellen im Vergleich zu ruhenden Zellen häufiger retrovirales Material in ihre DNA integrieren, die Aktivierung von Spenderzellen mit Hilfe spezifischer antigenpräsentierender Zellen des Empfängers in Gegenwart eines retroviralen

Vektors, der den so genannten LNGFR (human low affinity nerve growth factor receptor), einen „Medikamenten sensitiven Marker“, enthielt. Nach Aktivierung und Markierung der Responderzellen mit diesem Rezeptor konnten diese, nach voriger Gabe des entsprechenden Medikaments, dem Empfänger verabreicht werden, ohne dass eine GVHD in vivo entstehen konnte - allerdings nur unter der Voraussetzung, dass jede einzelne alloreaktive Zelle diesen retroviralen Vektor inkorporierte.

Unter dem gleichen Aspekt wurde von Helene et al. [73] nach einer Methode gesucht, um die GVHD im Mausmodell kontrollieren zu können. Bestrahlten DBA/2 Mäusen wurden transgene B10.A (5R) Milzzellen, die ein Herpes Simplex Virus Thymidinkinase-Suizidgen enthielten, das mit einem IL-2 Promoter verbunden war, transfundiert. Dies induzierte eine fulminante akute GVHD. Eine Behandlung mit Ganciclovir verbesserte die Symptome signifikant. Auf den Erfolg eines gentechnischen Ansatzes hofften Tiberghien et al. [175] und Bonini et al. [21]. Sie veränderten T-Zellen in der Weise, dass diese ein so genanntes „Suicide“ Gen, ein „Suizidgen“, das für die Herpes simplex Virus Thymidinkinase (HSV-tk) codiert, exprimierten. Die Expression dieses Gens sollte nach Entstehung der GVHD die selektive Eliminierung der transduzierten alloreaktiven Zellen durch Gabe von Ganciclovir erleichtern. Alternativ zu diesem Ansatz stimulierten Valteau-Couanet et al. [180] Spenderzellen durch Zellen des Empfängers in Gegenwart eines toxingekoppelten Anti-Interleukin-2-Rezeptorantikörpers. Das zu Grunde liegende Prinzip beruhte auf der Tatsache, dass aktivierte T-Zellen die Fähigkeit besitzen, das Immunotoxin zu binden [114].

Zuvor hatten Cavazzana-Calvo et al. [28] vorgeschlagen, ex vivo aktivierte alloreaktive Zellen mittels ihrer CD 25 (Interleukin-(IL)-2 Rezeptor α -Kette) Expression zu identifizieren und durch Gabe eines Immunotoxins zu eliminieren. Dabei zeigte sich trotz effektiver Elimination von CD 25 positiven Zellen eine hohe Rate an GVHD. Dies zeigte, dass außer der oben genannten, weitere T-Zellsubpopulationen für die GVHD verantwortlich zu sein schienen.

Ein weiterer Ansatzpunkt im Bestreben, die GVHD zu eliminieren, ist der Versuch, eine T-Zell Toleranz zu induzieren. Basierend auf der Blockade der

B7-CD28/CTLA-4 Interaktion wurde ein Anergie Status bei stimulierten T-Lymphozyten erzielt [96], [57]. Erreicht wurde dies durch Einsatz eines Anti-B7 Antikörpers und Cyclosporin A. Voraussetzung für den Erfolg war allerdings, dass die gesamte Phase der Kultivierung ohne Zellwachstumsfaktoren wie IL-2 abläuft, da diese potentiell in der Lage gewesen wären, den Status der Inaktivität zu durchbrechen [183]. Andere Gruppen setzten monoklonale Antikörper gegen T-Zell Epitope ein. Champlin et al. [30] verwendeten CD 8 depletierte Zellen, um eine GVHD zu vermeiden. Herrera et al. [75] hingegen wählten die CD 4 T-Zell Depletion und infundierte geringe Mengen CD 8 positiver Zellen. Es handelte sich dabei um Ansätze, bei denen ein identischer Fremdspender zum Einsatz kam und somit das Risiko einer GVHD von Beginn viel geringer anzusehen ist als im haploidentischen Versuchsaufbau. Beide Ansätze wurden von einem Tierexperiment von Truitt and Atasoylu [179] in Frage gestellt, das besagt, dass sowohl CD 4+ als auch CD 8+ Zellen für die GVL (Graft versus Leukemia, Transplantat gegen Leukämie) Reaktion notwendig sind.

Während oben genannte Eliminationsverfahren die Gefahr einer GVHD nach einer Stammzellgabe senken [76], [29], erhöht sich das Risiko eines Rezidivs und einer Infektion durch gleichzeitige unspezifische Eliminierung nicht-alloreaktiver T-Zellen, so dass sich die durch eine verminderte GVHD gesenkte Morbiditätsrate nach T-Zell Depletion wieder erhöht [61], [39].

4.2.1 Das immunomagnetische Depletionsverfahren

Weitere Versuche, alloreaktive T-Zellen zu eliminieren, beinhalteten direkte immunomagnetische Depletionsverfahren mittels anti-CD 5 Antikörpern [5]. Wobei dieses Verfahren einer totalen T-Zell Depletion gleichkommt, da CD 5 positive Zellen CD 3 positiven Zellen zu einem hohen Prozentsatz entsprechen. Eine relevante GVHD konnte so größtenteils vermieden werden; ein GVL-Effekt jedoch trat erwartungsgemäß ebenfalls nicht auf.

Eine selektive T-Zell Depletion auf Grund spezifischer Aktivierungsantigene auf deren Oberfläche mit nachfolgender physikalischer Separation hat gegenüber anderen Depletionsmethoden entscheidende Vorteile. Es werden zum einen

keine aktivierten T-Zellen, die sich im Stadium der Anergie befinden, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert werden könnten, zurückgelassen, zum anderen bedarf es bei dieser Methode keiner zusätzlichen medikamentösen Therapie mit der Gefahr, dass sich mit dieser nach Eintreten der GVHD in vivo nur unzureichende Erfolge erzielen lassen. Außerdem werden alloreaktive T-Zellen dauerhaft aus dem Transplantat eliminiert. Dadurch wird eine Einflussnahme auf die verbliebenen T-Zellen verhindert [3].

Garderet et al. [60] schlugen dieses neue Depletionsverfahren alloreaktiver Zellen, die zuvor ex vivo aktiviert worden waren, vor. Anstelle eines Immuntoxin vermittelten Absterbens alloreaktiver T-Zellen wurde das Verfahren des magnetischen Zellsortierens (MACS, magnetic activated cell sorting) angewendet. Garderet et al. depletierten, in Analogie zu Cavazzana-Calvo et al. [28] CD 25 positive T-Zellen, während Koh et al. [87] Lymphozyten des Phänotyps CD 69 depletierten. Effizienter wurde das Verfahren, wenn man beide Methoden kombinierte [52].

Die durch uns gewählte Depletionsmethode zur Eliminierung alloreaktiver Zellen mit GVHD-Potential erforderte zunächst die Herstellung einer gemischten Lymphozytenkultur (MLC) als in vitro Modell der Alloreaktion. HLA-Antigene von Stimulatorzellen dienten als Aktivatoren der HLA-disparaten Responderzellen im System. Anschließend sollte das Ausmaß der Aktivität als Ausdruck der allogenen Reaktion mittels Charakterisierung definierter Oberflächenmarker der Responderzellen bestimmt werden. In einem weiteren Schritt wurden die identifizierten aktivierten T-Zellen durch immunomagnetische Separation eliminiert.

Fehse et al. [52] aktivierten in einer 72-stündigen MLC Spenderlymphozyten mittels einer adhärennten Zellschicht, die sich aus zuvor mit IL-4 und GM-CSF inkubierten peripheren mononukleären Zellen (15-20 Prozent Dendritische Zellen und bis zu 80 Prozent T-Zellen) des Empfängers zusammensetzte. Durch diesen Ansatz konnte eine effektive allogene Stimulation erzielt und die Responderzellen ohne Kontamination durch Stimulatorzellen näher analysiert werden. Darüber hinaus bot dieses Verfahren Schutz vor einem von in vitro vorbehandelten Zellen ausgehenden Reinfusionsrisiko. Die

Durchflußzytometrische Oberflächenantigenanalyse mittels FACS ergab eine deutliche Zunahme der Aktivierungsmarker CD 40L und CD 71, vor allen Dingen jedoch der Oberflächenantigene CD 69 (2,4 Prozent) und CD 25 (1,9 Prozent). Eine Koexpression beider Antigene war nur zu einem geringen Prozentsatz nachweisbar. Während CD 4+ Zellen beide Aktivierungsmarker exprimierten, konnte auf CD 8+ Zellen fast ausschließlich CD 69 nachgewiesen werden.

Die von uns mittels MLC (siehe Kapitel 2) durchgeführte Kokultivierung von Spender- und Empfängerzellen erzielte mit durchschnittlich 14,68 Prozent für die drei bestimmten Aktivierungsmarker CD 25, CD 69 und HLA DR beziehungsweise 9,15 Prozent für CD 3 Zellen, die sich für einen der drei untersuchten Oberflächenantigene positiv zeigten, deutlich höhere Stimulationsraten durch periphere mononukleäre Zellen (PMNC). Wurden Dendritische Zellen als Stimulatoren eingesetzt, konnten zum Teil noch höhere Aktivitätsindizes bestimmt werden. Während Fehse et al. [52] die Stimulatorpopulation mittels einer adhärennten Zellschicht in die gemischte Lymphozytenkultur einbrachten und somit nur eine begrenzte Anzahl an Zell-zu-Zell Kontakten zu Stande kommen konnte, waren unsere beiden Zellpopulationen in flüssigem Nährmedium inkubiert worden. Somit erhöhte sich die Anzahl an möglichen Oberflächeninteraktionen und es konnte eine effektivere Zellstimulation und somit -aktivierung erzielt werden. Die Gefahr eines möglichen Reperfusionzwischenfalls durch Reinfusion autologer, ex vivo behandelte Stimulatorzellen kann hierbei vernachlässigt werden. Zum einen werden die Stimulatorzellen vor Einsatz in die MLC bestrahlt und somit anerg [33], zum anderen wären diese, trügen sie als aktivierte und somit für den Empfangsorganismus als potentiell schädlich anzusehende Zellen einen Aktivierungsmarker, vor der Reinfusion mittels magnetischer Zellseparation depletiert worden. Die von uns gewählte Methode gewährleistet eine effektive Stimulation von Spender T-Zellen durch periphere mononukleäre Zellen beziehungsweise Dendritische Zellen des Empfängers, auf deren Grundlage die nachfolgende Selektion nicht-alloreaktiver Zellen durchgeführt werden kann.

4.2.2 Die immunologische Depletion mittels CliniMACS®

In früheren Studien konnten wir bereits zeigen, dass die MACS (magnetic activated cell sorting, magnetisch aktivierte Zellseparation) Technik eine effektive Methode zur Zellseparation im klinischen System darstellt [69]. Das CliniMACS® System als automatisierte Weiterentwicklung erzielte durch Anreicherung von CD 34+ Zellen aus peripheren Stammzellen und Knochenmark neben einer hohen Reinheit (durchschnittlich 97,0 Prozent), eine hohe Vitalität der gewonnenen Zellen (durchschnittlich 99,0 Prozent) und eine hohe Recovery (Zellausbeute nach magnetischer Zellsortierung) von durchschnittlich 71 Prozent der Zellen. Eine effektive T-Zell Depletion konnte ebenfalls nachgewiesen werden (in 17 Experimenten zeigten maximal 0,27 Prozent der angereicherten Zellen nach Depletion den T-Zell Marker CD 3 auf ihrer Oberfläche [154]).

4.3 Nachweis der Effektivität der Depletionsmethode durch Oberflächenantigenanalyse

Im Jahr 2000 depletierten Fehse et al. [52] T-Zellen mittels eines VarioMACS® Gerätes und einer AS Depletionssäule (beides Miltenyi Biotec). Die untersuchten Zellen waren zuvor in einer 48-stündigen MLC inkubiert und anschließend mit einem sekundären IgG1 Antikörper, der an ein magnetisches Kügelchen (MACS®, Miltenyi Biotec) gekoppelt war, markiert worden. Um die Effektivität der Depletionsmethode zu bestimmen, wurden die erhaltenen negativen T-Zellen anschließend mittels FACS analysiert. Wurden CD 25 positive Zellen depletiert, konnten Reinheiten größer 99 Prozent erzielt und diese damit viel effizienter selektiert werden als CD 69 negative T-Zellen, die mit einer Reinheit von durchschnittlich 80 Prozent deutlich schlechter eliminiert worden waren. Wurden beide Aktivierungsmarker magnetisch markiert, ließen sich für die einzelnen Antigene jeweils höhere Reinheiten erzielen. Für CD 25 negative T-Zellen 99,7 und für CD 69 negative T-Zellen 86 Prozent. Ein Grund für die im Vergleich zu den in der Literatur und unseren Ergebnissen erzielte geringere Reinheit könnte in der geringeren Ausgangsaktivierung der Zellen

durch zu geringe Zell-Zell Kontakte begründet sein. Je höher die primäre Aktivierung in der MLC, desto effizienter ist die nachfolgende Depletion [138]. Zuvor konnten Koh et al. [87] anhand der Oberflächentypisierung zeigen, dass, nach Kultivierung von Responder PMNC im gleichen Verhältnis mit bestrahlten "first party" Stimulatorzellen in einer one-way, primären Lymphozytenmischkultur (MLC) und nachfolgender CD 69 Depletion, durch das Zellseparationsverfahren der Ausgangswert von 6 (+/- 2,4) Prozent CD 69+ T-Zellen auf 1,5 (+/-1,2) Prozent CD 69+ Lymphozyten reduziert werden konnte. Hansen et al. [72] beschrieben ein fünf- bis siebentägiges Kulturverfahren und die anschließende Depletion mittels Anti-CD 25 Antikörpern und Schaf-Anti Maus Dynabeads IgG. Die Erfolgsrate hinsichtlich einer CD 25+ T-Zelldepletion lag bei 97,6 (+/-2,3) Prozent.

In früheren Depletionsversuchen unserer Arbeitsgruppe [138] mittels Magnetpartikel-Konzentrator-System, spezifischer Antikörper gegen CD 25, CD 69 und HLA DR sowie unter zu Hilfenahme von Dynalbeads M-450 Sheep-anti-Mouse IgG konnte gezeigt werden, dass eine effektive Depletion durch die magnetisch aktivierte Zellseparation erzielt werden kann. Eine FACS-Analyse der Zellen vor Depletion ergab einen durchschnittlichen Prozentsatz an positiven Zellen von 34,66 (+/-11,81) Prozent. Nach Separation zeigten nur 0,37 (+/-0,26) Prozent der Zellen einen der drei Aktivierungsmarker. Somit scheint eine Kombination mehrerer Oberflächenaktivierungsmarker und die nachfolgende simultane Depletion effektiver als die Separation von aktivierten T-Zellen auf Grund eines Oberflächenaktivierungsantigens. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen erzielten wir in der vorliegenden Arbeit entsprechende Reinheiten. Dabei ergab die Inkubation mit Dendritischen Zellstimulatoren höhere Reinheiten für alle drei Merkmale (0,24 Prozent zeigten einen der drei Aktivierungsmarker), während auf 0,78 Prozent der mit PMNC stimulierten CD 3+ Zellen ein Oberflächenmarker nachweisbar war.

Rencher et al. [137], [136] depletierten ebenfalls alle drei Oberflächenantigene CD 25, CD 69 und HLA DR, allerdings mittels eines Zellsorters. Dabei wurden diese nach erfolgter Separation erneut kokultiviert, um anschließend ein weiteres Mal depletiert zu werden. Es resultierte eine sehr geringe Anzahl an

Lymphozyten, die eines der drei Aktivierungsmarker exprimierten. Anstatt PMNC als Stimulatoren zu verwenden, wurden EBV-transformierte B-Zellen eingesetzt, da diese eine spezifische allogene Immunantwort gegen Empfängerantigene verlässlicher eliminieren konnten. Die Vorteile lagen zum einen in der Zellgröße, zum anderen in einer umfassenden MHC-Expression der Klasse I und II. Außerdem wurden zusätzlich Minor Antigene präsentiert [182], was in jedem Fall zu einer besseren Alloreaktivierung und daraus resultierend zu einer effizienteren Depletion geführt hatte. Allerdings wurden dadurch auch spezifische T-Zellen, die für den Graft versus Leukemia effect (GVL-Effekt, Transplantat-gegen-Leukämie Effekt) verantwortlich sind, ebenfalls eliminiert. Eine antileukämische Potenz geht sowohl von CD 8+ als auch CD 4+ Zellen aus, wenn diese die Fähigkeit besitzen, spezifische mHAGs (Minorantigene) auf Leukämiezellen, leukämie-spezifischen oder leukämie-assoziierten Proteinen zu erkennen [139].

Versuche von Koh et al. [87] zeigten, dass durch selektive Entfernung von CD 69 positiven T-Zellen nach voriger Aktivierung Reinheiten von 97 Prozent erzielt werden konnten. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass über 90 Prozent der alloreaktiven Komponenten, die in einer nachweisbaren Zellproliferation zum Ausdruck gebracht wurden, durch ein Magnetseparationsverfahren gegen CD 69 eliminiert werden konnten. Die allogene Immunreaktion gegen Dritte, die als Maß für die immunologische Aktivität der T-Zellen gilt, blieb erhalten (77,8±20,9 Prozent im Vergleich zur Zellpopulation vor Depletion). Dies impliziert eine Verbesserung der Immunrestitution sowie ein Fortdauern der antiviralen und möglicherweise auch der antileukämischen Aktivität durch diese Form der Depletion, so dass alle Voraussetzungen für den Einsatz dieses Verfahrens im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie erfüllt wären.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine modifizierte MLC prädiktive Aussagekraft in Bezug auf die Inzidenz einer klinisch symptomatischen GVHD besitzt. Allein durch die Depletion von CD 69 positiven Zellen konnten Koh et al. [87] die allogene Immunantwort weit unter den empirischen Schwellenwert, der eine klinisch symptomatische GVHD beinhaltet, senken. Allerdings konnte CD 69 nicht als Äquivalent für die Proliferation in vitro angesehen werden. Ein

Alloreaktivitätsnachweis war also nicht möglich. Dennoch gilt die Tatsache, dass eine CD 69 Expression, wie auch die Proliferationsrate, die mittels [^3H] Thymidininkorporation gemessen werden kann, einen spezifischer Marker für eine allogene Immunantwort darstellt, als unumstritten.

Durch die von uns gewählte Depletionsmethode konnten nicht-alloreaktive, immunkompetente T-Zellen unter GMP-Bedingungen (Good manufacturers practice, Reinraumbedingungen) in hohen Reinheiten generiert werden, die als Donor Lymphozyteninfusion (DLI, Spenderlymphozyteninfusion) nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation transfundiert werden und in Übereinstimmung mit Ergebnissen der Literatur und eigenen Ergebnissen zum einen zu einer schnelleren Immunrestitution des Empfängers und zum anderen zu einem dauerhaften Anwachsen des Transplantats beitragen könnten.

4.4 CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (T_{reg})

Seit einiger Zeit sind die so genannten regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) in den Mittelpunkt immunologischer Forschung gerückt. Schon länger war die Existenz von Suppressorzellen, die in die Regulation von T-Zellfunktionen involviert sind, vermutet worden. Jedoch erst in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts konnte diese These durch die Identifizierung der CD4⁺CD25⁺ Zellen bestätigt werden [144]. Seit dieser Zeit wird diesen natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ T_{reg} Zellen eine bedeutende Rolle in der peripheren Toleranz gegenüber Autoantigenen zugeschrieben [146]. Diese spezifisch für Autoantigene im Thymus generierten T-Zellen sind überaus wichtig, um eine autologe Reaktion im Körper zu verhindern [147], sie können allerdings auch einer Kontrolle mikrobieller Infektionen im Organismus entgegenstehen [77]. Mangelt es quantitativ oder funktionell an T_{reg} Zellen, so kann es zur Ausbildung diverser Autoimmunerkrankungen kommen [11].

Im allogenen Transplantationssystem tragen T_{reg} Zellen in Zusammenarbeit mit APC (antigenpräsentierenden Zellen) des Empfängers sowohl zur GVHD (Graft versus Host disease) als auch zum GVL (Graft versus Leukemia) Effekt bei, wenn nach Transplantation eine DLI (Donor Lymphocyte Infusion) verabreicht

wird [191]. Xia et al. [191] konnten zeigen, dass T_{reg} Zellen eine bedeutende Rolle in der Supprimierung der GVHR spielen, wenn diese 28 Tage nach Transplantation Empfängern verabreicht werden, die einen kompletten Spenderchimärismus aufweisen. Langzeitprotektion durch diese T-Zellen gegenüber einer GVHR ist nicht notwendig, da im kompletten Chimärismus keine APC des Empfängers vorliegen, die alloreaktive T-Zellen aktivieren könnten. Wurden regulatorische $CD4+CD25+$ T-Zellen aus dem Empfängerorganismus nach DLI-Gabe entfernt, trat eine letale GVHD auf. Allerdings nur, wenn die DLI-Gabe vor dem 70. Tag nach Transplantation stattfand. Auch ein ebenfalls mit der DLI-Gabe assoziierter GVL-Effekt trat nicht mehr auf. Diese Beobachtung wurde mit der Tatsache begründet, dass in kompletten Chimären keine APC des Empfängers vorhanden waren und demzufolge keine Aktivierung von Spender T-Zellen stattfinden konnte.

Andere Forschungsgruppen zeigten am Mausmodell, dass T_{reg} Zellen einen potenten suppressiven Effekt auf Immuneffektorzellen, die durch Empfängerantigene aktiviert werden, ausüben vermögen. Dadurch wird eine GVHD, bei gleichzeitigem Erhalt eines GVL-Effektes, verhindert [196]. Es scheint, als spiele ein Ungleichgewicht zwischen Effektorzellen und T_{reg} Zellen während der Phase der Immunrestitution nach Stammzelltransplantation eine entscheidende Rolle in der Entstehung der GVHD.

Oben genannte Ergebnisse jüngster Forschung bieten die Möglichkeit, T_{reg} Zellen in der adoptiven Immuntherapie einzusetzen. Das Bestreben, spezifische $CD4+CD25+$ Zellen *ex vivo* zu expandieren und als DLI nach Stammzelltransplantation zu infundieren, ist Ziel diverser Forschungsgruppen.

Tang et al. [172] konnten anhand eines Mausmodells zeigen, dass gegen Antigene des Zielorgans spezifische T_{reg} in der Therapie von Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden können. In diesem Zusammenhang berichtete Fisson et al. [53] über eine gelungene Expansion von antigen spezifischen regulatorischen T-Zellen aus einem polyklonalen T_{reg} Repertoire durch Dendritische Zellen (1-DC) der Milz *ex vivo*, deren Phänotyp $CD11c^{high}CD8^{+}CD11b^{-}$ entspricht.

Studien von Graca et al. [64] zur Antikörper-induzierten Toleranz gegenüber Transplantaten haben aufgezeigt, dass die Abstoßungsreaktion durch eine Induktion der T_{reg} verhindert werden kann. Diese Toleranz ist spezifisch für die Transplantatantigene. Die im Versuchsaufbau eingesetzten Tiere zeigten sich kompetent, Transplantate von dritten, nichtverwandten Spendern abzustoßen. Exprimierte jedoch ein und dieselbe Zelle sowohl das Fremdartigen als auch das tolerierte Transplantatantigen eines F1 Spenders (der durch Kreuzung des toleranten Genträgers mit einem Fremdspender entstanden war), so wurde die Fähigkeit zur Toleranz auf das Fremdartigen ausgeweitet [41], [66]. Diese Tiere konnten zu einem späteren Zeitpunkt sogar Fremdspendertransplantate akzeptieren, ohne dass diese mit dem initial tolerierten Antigen verbunden waren. Dieses, durch T_{reg} vermitteltes Phänomen wird auch als „linked suppression“, als „verknüpfte Suppression“ bezeichnet [41]. Davies [41] stellte in diesem Zusammenhang jedoch fest, dass diese verknüpfte Suppression nicht auftritt, wenn es sich bei dem initial tolerierten Antigen um ein Selbstantigen handelt, wie es bei F1 Transplantaten (aus Selbst und Fremdspender entstanden), die zu einem früheren Zeitpunkt abgestoßen worden waren, der Fall ist. Dies könnte damit begründet sein, dass, um eine konstante Suppression immunologischer T-Zellantworten gegenüber Fremdartigenen, durch DC (Dendritische Zellen) präsentiert, zu verhindern, das T_{reg} Repertoire gegenüber DC Selbstantigenen „blind“ sein muss, diese also nicht erkennen kann.

Wie schon erläutert, depletierten wir mittels magnetischer Zellaktivierung neben CD 69 und HLA DR positiven Zellen auch die CD 25⁺ T-Zellsubpopulation in hohen Reinheiten.

Um, bezogen auf unsere Depletionsmethode, eine noch effektivere Selektion alloreaktiver T-Zellen zu gewährleisten, ohne den wertvollen GVL-Effekt zu eliminieren, sollten in weiteren Experimenten die Rolle und Funktion der bisher in hohen Prozentsätzen eliminierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen näher untersucht und gegebenenfalls klinisch eingesetzt werden.

4.5 Sekundäre Nachweisverfahren zur Bestimmung der Alloreaktivität

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität von Lymphozyten nach einem entsprechenden Depletionsverfahren abschätzen zu können, stellt die erneute Kokultivierung der depletierten Lymphozyten mit autologen Zellen, ursprünglichen Stimulatorzellen, „third party“ („Fremd“) Zellen und Pathogenen dar.

4.5.1 Oberflächenantigenanalyse

Koh et al. [87] konnten durch Oberflächenantigenanalyse zeigen, dass durch das Zellseparationsverfahren der Ausgangswert von 6,0 (+/-2,4) Prozent CD 69+ Lymphozyten auf 1,5 (+/-1,2) Prozent CD 69+ Lymphozyten reduziert werden konnte, während die Aktivitäten versus Fremdanitigenen, den „third party“ Zellen, mit 3,9 (+/-2,7) Prozent in der primären und 4 (+/-2,4) Prozent in der sekundären MLC konstant blieben. Die Restaktivität nach Depletion wurde, um den Grad der selektiven Depletion feststellen zu können, berechnet, indem die primären Immunantworten gegen allogene Zellen und gegen „third party“ Zellen gleich 100 Prozent gesetzt wurden. Die allogene Reaktion zeigte Werte von durchschnittlich 25,6 (+/-17,9) Prozent und blieb in der Fremdreaktion mit 115,7 (+/-35,9) Prozent weitgehend erhalten [87]. Nach sechstägiger allogener Aktivierung post depletionem konnten Fehse et al. [52] nur noch eine sehr geringe Anzahl an CD 25+ Zellen nachweisen. Wurden die depletierten Zellen mit „third party“ Zellen inkubiert, konnte eine neue CD 25+ T-Zellpopulation registriert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit CD 69+ depletierten Zellen und simultaner Depletion beider Aktivierungsmarker erzielt. Dabei ist festzustellen, dass die erhaltene Alloreaktivität mit bis zu 20 Prozent relativ hoch war. Dies könnte durch die relativ niedrige Reinheit der CD 69+ Zellen nach Depletion begründet sein. Die Selektion erreichte maximale Prozentsätze von 86 Prozent der für diesen Marker positiven Zellen [52]. Ursache dafür könnte sein, dass verschiedene allogene Zellklone zu unterschiedlichen Zeitpunkten in unterschiedlichen Aktivierungsstadien auftraten. Um eine maximale Reduktion allogener Lymphozyten zu erhalten, depletierten wir mittels

einer Antikörperkombination, deren spezifische Antigene unterschiedliche Aktivierungsstadien, eventuell zusätzlich auch unterschiedliche Zellaktivierungswege, repräsentierten. Eine weitere sekundäre Depletion nach Reinkubation stellt eine weitere Möglichkeit dar, eine noch effektivere Eliminierung alloreaktiver T-Lymphozyten und demzufolge einen sicheren klinischen Einsatz zu gewährleisten. Auch wir konnten beobachten, dass trotz effektiver Depletion mit einer Restaktivität der Negativfraktion von durchschnittlich 0,34 (+/-0,21) Prozent diese nach fünftägiger Restimulation in einer sekundären MLC einen im Vergleich zur Ausgangspopulation höheren Anteil an aktivierten Zellen (CD 69) aufwies. Dies gilt sowohl für nicht inkubierte, expandierte T-Zellen als auch für mit autologen Zellen beziehungsweise Fremdanigen behandelten T-Lymphozyten. Dies könnte in der oben erwähnten Tatsache begründet sein, dass in einer primären MLC mit anschließender Depletion nicht alle potentiell aktivierbaren T-Lymphozyten stimuliert und somit auch nicht vollständig eliminiert werden konnten.

Die Beobachtung, dass eine sekundäre Inkubation mit autologen Zellen einen deutlich höheren Zellanteil an CD 69 positiven Lymphozyten als die Ausgangspopulation und die nicht expandierte Zellfraktion erzielte, könnte an der Tatsache liegen, dass die in letzter Zeit zunehmend in den Mittelpunkt der Forschung gerückten CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen ebenfalls depletiert wurden. Somit wurde auch deren spezifische suppressorische Wirkung gegen autologe Antigene gerichtete, immunologische T-Zellen eliminiert. Es scheint, dass diese suppressorische Wirkung erst im Verlauf von mehreren Tagen an Bedeutung gewinnt. Drei Tage nach Depletion konnten deutlich weniger positive Zellen identifiziert werden als nach einem Zeitraum von acht Tagen.

Im Gegensatz dazu zeigten expandierte T-Zellen eine um circa ein Drittel geringere allogene Potenz; eine antivirale Aktivität konnte gegenüber Adenovirus Antigen in hohem Maße, und zwar um den mehr als zweifachen Wert, gesteigert werden. Somit wird deutlich, dass sich durch unsere Strategie, zuvor aktivierte T-Lymphozyten zu eliminieren, um sie einer adoptiven Immuntherapie zuführen zu können, die Gefahr einer allogenen Reaktion auch

über einen längeren zeitlichen Verlauf deutlich reduzieren lässt, und gleichzeitig die Aktivität gegenüber Fremdanthigenen und Pathogenen erhalten bleibt.

4.5.2 [H^3] Thymidineinbaurate

Neben der Oberflächenantigenanalyse existieren weitere sekundäre Nachweisverfahren zur Analyse alloreaktiver Zellen. Fehse et al. [52] ermittelten die zelluläre Aktivität alloreaktiver T-Zellen durch die [H^3] Thymidineinbaurate. Des Weiteren konnten die Vitalität und die funktionelle Kapazität der Zellen abgeschätzt werden. Es wurde eine starke Reduktion der [H^3] Thymidininkorporation registriert. Dabei erzielte die Depletion von CD 25+ Zellen höhere Reduktionen als eine Eliminierung von CD 69+ T-Zellen. Maximal niedrige alloreaktive Reaktionen wurden bei simultaner Depletion beider Oberflächenmarker erzielt. Den gleichen Effekt konnten Rencher et al. [137] aufzeigen. Während die Immunreaktion gegenüber Fremdanthigenen voll erhalten blieb, waren die depletierten Zellen nicht mehr fähig, gegen Empfängerzellen zu reagieren. Dieser Versuch wurde mit den oben schon erwähnten EBV transformierten B-Zellen des Empfängers durchgeführt. Wurden PMNC des Empfängers eingesetzt, konnten die Ergebnisse hinsichtlich Alloreaktivität und Fremdanthigenerkennung verifiziert werden. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe [138] und der Literatur konnten auch wir mittels [H^3] Thymidineinbauanalyse zeigen, dass nach erfolgter Depletion eine deutlich niedrigere Alloreaktivität der T-Lymphozyten auftrat, wenn Dendritische Zellen als primäre Stimulatoren eingesetzt worden waren. Wurden PMNC des Empfängers eingesetzt, konnte die Alloreaktivität nicht gesenkt werden. Vermutlich, weil durch die DC eine effektivere allogene Stimulation zu erzielen ist. Eine Aktivität gegenüber Fremdanthigenen konnte deutlich erhöht werden. Unter PMNC Stimulation gelang dies deutlich effektiver als mittels DC aktivierter Lymphozyten, während die autologe Reaktion im Thymidineinbau in beiden Fällen kaum messbar war. Wurde die Negativfraktion erneut mit diversen Antigenen in einer sekundären MLC inkubiert, so konnte eine weitere Abnahme der allogenen Reaktion verzeichnet werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Beobachtungen von

Rencher et al. [137], die nach dreiwöchiger Expansion der depletierten Zellfraktion zumindest keine signifikante Veränderung der proliferativen Aktivität verzeichnen konnte. Während die autologe Proliferationsfähigkeit, aus oben genannten Gründen, im zeitlichen Verlauf etwas zunahm, sank die Aktivierbarkeit gegenüber Tetanus-Toxoid. Gegenüber Pathogenen jedoch konnten Aktivitätssteigerungen erzielt werden. Die für den Proliferationsnachweis erhaltenen Ergebnisse konnten zum großen Teil durch den Elispot-Assay, wobei die IFN-gamma Freisetzung als ein weiteres Maß für die Aktivierbarkeit von T-Lymphozyten gilt, verifiziert werden. Vermutlich durch fehlende regulatorische T-Zellen zeigten auch hier expandierte Zellen eine höhere Aktivierbarkeit als ihre depletierten Ausgangszellen. Des Weiteren boten sie hohe Stimulationsindizes für autologe Antigene sowie für Fremdanigene. Auch hier konnte eine Steigerung der Aktivität hinsichtlich viraler Antigene nachgewiesen werden. Dabei wurden bis auf die Reaktion gegenüber „third party“ Zellen jeweils höhere Zytokinsekretionsraten und damit auch höhere Aktivitätsindizes bei primär durch Dendritische Zellen stimulierten Responderzellen gemessen.

4.6 Depletion alloreaktiver Patientenzellen

Die oben genannten Ergebnisse sollten in einer Versuchsreihe mit Patientenzellen verifiziert werden. Es wurden von insgesamt drei pädiatrischen Patienten wenige Milliliter Blut entnommen, um entsprechende Dendritische Zellen (DC) als Stimulatorfraktion zu gewinnen. Die Generierung einer ausreichenden Anzahl an DC gelang nur in einem Fall. In den beiden anderen Fällen gelang es nicht, qualitativ und quantitativ ausreichende Dendritische Zellen herzustellen (nicht dargestellt). Zum einen handelte es sich um sehr junge Patienten, denen zu einem bestimmten Zeitpunkt jeweils nur eine geringe Menge an peripherem Blut entnommen werden konnte. Zum anderen ließen sich kaum Zellen mit entsprechenden Oberflächenantigenen anzüchten. Dies könnte unter Umständen durch die nicht zu einhundert Prozent erzielte Remission zum Zeitpunkt der Blutabnahme begründet sein. Somit konnten die Versuche in nur einem Fall durchgeführt werden.

Dabei zeigte sich, dass die Effektivität der Depletion, gemessen anhand der Reinheit der erhaltenen Zellfraktion, die 98,38(+/-0,96) Prozent entsprach, nicht an die der Vorversuche heranreichte. Die eingesetzte Anzahl an stimulatorisch wirksamen Dendritischen Zellen scheint hierbei nicht ausreichend gewesen zu sein um alle potentiellen allogenen T-Lymphozyten zu aktivieren und nachfolgend für die Depletion zu markieren.

Die nachfolgend erhaltenen T-Lymphozyten zeigten in den beiden durchgeführten sekundären Proliferationstests neben einer hohen autologen Aktivität eine erhaltene allogene Potenz. Eine Reaktion gegenüber „third party“ Zellen konnte ebenfalls konserviert werden. Gegen Pathogene zeigten sich die generierten T-Lymphozyten weniger stimulierbar als ihre Ausgangspopulation. Allerdings konnte in einem von beiden Tests eine erhöhte Aktivität gegenüber Tetanus-Toxoid festgestellt werden.

Somit konnten die Vorversuche an den durchgeführten Versuchen mit Patientenzellen nicht verifiziert werden. Die Schwierigkeiten bestehen primär in der Gewinnung geeigneter Zellen in ausreichender Menge. Entweder besitzt der Patient keine bis wenige periphere mononukleäre Zellen, oder Blasten. Letztere würden während der Herstellung Dendritischer Stimulatorzellen expandiert, die Spenderzellen gegen diese aktiviert und zu einem späteren Zeitpunkt depletiert werden, wobei dadurch ein möglicher GVL-Effekt von Anbeginn eliminiert werden würde. Aus diesem Grund sollten nur Patienten in Frage kommen, die sich im Stadium der kompletten Remission befinden, und ausreichende periphere Zellzahlen aufweisen.

Stehen keine PMNC aus peripherem Blut zur Verfügung, könnten entsprechende Antigenpräsentierende Zellen auch aus dem Knochenmark von Patienten generiert werden. Wobei auch hierbei die Voraussetzung erfüllt sein muss, dass keine malignen Zellen vorhanden sein dürfen. Dieses Verfahren stellt allerdings unter Umständen einen zusätzlichen Eingriff für die schwer kranken Patienten dar. Des Weiteren wird dadurch zusätzlicher personeller und zeitlicher Aufwand benötigt, so dass diese Methode ebenfalls als nicht uneingeschränkt geeignet erscheint.

Andere Versuche, EBV-transfizierte Zellen als geeignete Stimulatoren zu generieren, kämen ebenfalls in Betracht. Demgegenüber ist das Risiko einer Laborkontamination durch Viren und eine abgeschwächte EBV Aktivität der im Rahmen der adoptiven Immuntherapie verabreichten Zellen zu sehen.

Alternativ zu Dendritischen Zellen als Stimulatoren könnten grundsätzlich auch mesenchymale Zellen in Frage kommen; allerdings wird diesen ein immunsuppressiver Effekt zugeschrieben [133]. Der Vorteil dieses Ansatzes wäre die über HLA-Grenzen hinweg unabhängige Gabe.

Weitere Versuche, die Alternativen zu den bis dato eingesetzten antigenpräsentierenden Zellen aufzeigen, sind nötig, um für den Patienten sichere, nicht-alloreaktive T-Zellen mit antipathogenem und potentiell antileukämischem Effekt zur Applikation im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie zu generieren.

4.7 Der BrdU-Assay als Methode zur Zellanalyse auf Einzelzellebene

Zelluläre Vorgänge wie die Expression von Oberflächenaktivierungsantigenen, die Zytokinproduktion und die Proliferation, charakterisieren immunologische Antworten von Lymphozyten auf polyvalente und spezifische Stimuli [115], [169]. Die Möglichkeit, diese unterschiedlichen Parameter lymphatischer Zellen wie die DNA Synthese, die Zytokin- und die Oberflächenantigenexpression simultan zu messen, würde es erleichtern, eine noch vollständigere Analyse der funktionellen Aktivitäten auf Einzelzellebene zu erzielen [115]. Traditionell wird die DNA Synthese mittels [H^3] Thymidineinbaurate (H^3 -TdR) nach drei- bis fünftägiger Antigenstimulation mittels MLC, gemessen [7], [105]. Eine eindeutige Limitierung dieses Verfahrens ist, dass keine Proliferationsvorgänge einzelner Zellen detektiert werden können. Eine, von Gratzner 1982 in Science [67] beschriebene alternative Methode zur Detektion zellulärer Proliferation nutzt die Inkorporierung von Bromodesoxyuridin (BrdU), einem Thymidinanalogon, in zelluläre DNA. Hierbei verwendete Gratzner, und nachfolgend auch andere Arbeitsgruppen [177], [44] nach entsprechender Fixierung und Permeabilisierung der Zellen einen monoklonalen Antikörper

(mAb), der gegen BrdU gerichtet und mit einer fluoreszierenden Substanz markiert worden war, um anschließend mittels zytometrischer Analyse das inkorporierte BrdU zu bestimmen. Nachteil dieser von Gratzner beschriebenen Methode war jedoch, dass das verwendete Protokoll zur Denaturierung von DNA Substanzen vorgab, die die Struktur intrazellulärer Proteine zerstörte. Wir entschieden uns deshalb, analog zu Gonchoroff et al. [62], das Enzym Deoxyribonuklease I (DNase I) zur Denaturierung einzusetzen, um über die zelluläre Proliferation hinaus weitere zelluläre Vorgänge, wie die intrazelluläre Zytokinsekretion und die Oberflächenexpression, simultan bestimmen zu können. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die fluoreszierende Eigenschaft von Phycoerythrin (PE) erhalten bleibt [171] und so zur Fluoreszenzfärbung eingesetzt werden kann.

Mehta et al. [115] fixierten und permeabilisierten T-Zellen in Anwesenheit eines Sekretionshemmers. Die T-Zellen wurden zuvor durch Antigene wie das Staphylococcus Enterotoxin B (SEB), einem Superantigen, das T-Zellen durch eine spezifische Bindung an V β Sequenzen des T-Zellrezeptors (TCR) aktiviert [108], und das CD 28 Oberflächenantigen stimuliert. Anschließend konnte mittels Immunfluoreszenzmessungen die intrazelluläre Zytokinsekretion bestimmt werden. So konnten nicht nur die BrdU-Inkorporation, sondern neben der Zytokinexpression auch diverse Oberflächenantigene simultan bestimmt werden. Der parallel durchgeführte [H^3] Thymidineinbau (H^3 -TdR) ergab für mit SEB und CD 28 inkubierte T-Lymphozyten erwartungsgemäß hohe Proliferationsraten. Es konnte allerdings nur die Gesamtpopulation der T-Zellen analysiert werden. Durch die ebenfalls unter gleichen Bedingungen durchgeführte BrdU-Analyse mittels FACS (Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung) konnten die einzelnen Subpopulationen näher betrachtet werden. SEB aktiviert spezifisch CD 4+ T-Zellen [85]. Die gemessene BrdU-Inkorporation dieser T-Zellsubpopulation betrug, je nach eingebrachter SEB Konzentration, 30 bis 40 Prozent der CD 4+ Zellen und verlief parallel zur Thymidineinbaurrate der Gesamtpopulation. Im Vergleich dazu zeigten CD 8+ Zellen mit Anteilen von unter 10 Prozent signifikant geringere Inkorporationsraten. In der von uns durchgeführten Versuchsreihe

beschränkten wird uns auf den Nachweis der Gleichwertigkeit der BrdU-Testmethode gegenüber dem TdR. Im Gegensatz zu Mehta et al. [115] stimulierten wir die zu untersuchenden T-Zellen zusätzlich mit autologen Zellen, „third party“ Zellen, Tetanus-Toxoid Antigen und PHA. Nach Bestimmung der Proliferationsindizes im BrdU-Ansatz wurden diese mit den entsprechenden Counts per minute des TdR Tests korreliert. Dabei variierten, je nachdem welcher untersuchte Parameter auf das TdR Ergebnis bezogen wurde, die Korrelationen von 0,81 bis 1,00. Eine absolute Übereinstimmung zeigten beide Tests, wenn zur BrdU-Inkorporation simultan eine IFN-gamma Bestimmung erfolgte. Wurden die beiden Substanzen getrennt voneinander bestimmt, ergaben sich Korrelationen von 0,89 (BrdU) beziehungsweise 0,96 (IFN-gamma). Dies stimmt mit Beobachtungen von Mehta et al. [115] überein, die zeigten, dass die Zytokinexpression und die DNA Synthese zwei kinetisch unterschiedliche Aktivitäten darstellen und nicht simultan ablaufen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zytokinproduktion transient ist und in den ersten 12 Stunden nach Antigenkontakt auftritt, während die DNA Synthese nicht vor Ablauf von 24 Stunden nachzuweisen ist. Stand BrdU durch SEB stimulierte, IFN-gamma positiven Zellen über den gesamten Inkubationszeitraum zur Verfügung, so zeigten sich 76 Prozent der Zellen positiv für BrdU. Wurden die Zellen hingegen nur für sechs Stunden mit BrdU inkubiert, zeigten sich nur 25 Prozent der Zellen doppelt positiv. Durch die vergleichende Gegenüberstellung von etabliertem H^3 -TdR und der BrdU-Inkorporationsanalyse konnten wir zeigen, dass durch die durchgeführte FACS-Methode multiparametrische Messungen mit den Vorteilen der parallelen Analyse von Oberflächenantikörpern, DNA Synthese und intrazellulärer Zytokinsekretion auf Einzelzellebene valide durchgeführt werden konnte.

Die oben genannten Ergebnisse konnten zum größten Teil in drei Versuchen bestätigt werden. Neben dem H^3 -TdR Assay wurde zusätzlich die IFN-gamma Sekretion mittels Elispot-Assay bestimmt. Betrachtet man die nach Depletion generierte „positive“, also alloreaktive Zellpopulation, dann korrelierten die beiden Tests mit einem p-Wert von 0,93, waren sich also ähnlich. Der BrdU-Nachweis mittels FACS zeigte sich sowohl dem Elispot-Assay (p-Wert 0,98) als

auch dem [H^3] Thymidineinbau (p Wert 0,88) am ähnlichsten. Große Übereinstimmung zeigte auch der Nachweis von CD 69+ Zellen mit dem EliSPOT-Assay (p-Wert 0,95). Der fluoreszenzmarkierte Nachweis von IFN-gamma und dessen Überprüfung mittels EliSPOT zeigte eine Korrelation von lediglich 0,79. Dies könnte an den unterschiedlichen Zeiträumen der Detektion des intrazellulären Zytokins gelegen haben, da deren Produktion, wie oben beschrieben, nur transienter Natur ist [115]. Betrachtet man die Negativfraktion, ließen sich hohe Übereinstimmungen hinsichtlich BrdU und CD 69 Nachweis im Vergleich zur [H^3] Inkorporation erzielen.

Wurde diese Fraktion weiter expandiert und erneut untersucht, so zeigten diese im Vergleich zu den vorigen Testungen divergente Ergebnisse. Der Thymidineinbau zeigte im Vergleich zur FACS-Analyse und zum EliSPOT signifikant unterschiedliche Ergebnisse an ([H^3]/Elispot: p-Wert -0,02; [H^3]/FACS-Analyse: p-Wert 0,00 bis 0,10). Sehr gute Übereinstimmungen hingegen wurden im Vergleich EliSPOT/BrdU-Inkorporation erzielt (p-Wert 0,97 bis 1,00). Dies könnte zum einen daran liegen, dass durch die Zytokinsekretion nur CD 4+ Zellen detektiert werden. Zum anderen stellen die Zytokinproduktion und -proliferation zeitlich und kinetisch unterschiedliche Phänomene dar. Dadurch könnte der Zytokinsekretionsassay positiv ausfallen, während die eigentliche Proliferation zu einem anderen Zeitpunkt stattfindet und so noch negativ ausfällt. Die Frage stellt sich jedoch, warum das Thymidinanalogon BrdU und die [H^3]-TdR gegenläufige Ergebnisse liefern. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Tests zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt worden waren und sich die Zellen jeweils in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befanden.

5 Zusammenfassung

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) mittels CD 34 positiven haploidentischen Stammzellen stellt seit mehr als einem Jahrzehnt eine etablierte Therapie maligner und nichtmaligner Erkrankungen immunologischer und hämatopoetischer Zellen dar. In jüngerer Zeit werden auch CD 3 depletierte Stammzellen appliziert. Sie bieten den Vorteil einer schnelleren Immunrekonstitution und somit -kompetenz. Studien belegen neben den Vorteilen einer hohen Anzahl an verfügbaren, haploidentischen Spendern, ausgezeichnetem Anwachsen des Transplantats und niedriger GVHD Raten dieser Therapieform auch ernsthafte Komplikationen. Dazu gehören die Transplantatabstoßung und eine prolongierte Immundefizienz, wobei CD 4+ Zellen definitionsgemäß zu weniger als 100/ μ l auftreten. Der Transplantatabstoßung voraus eilt die Entwicklung eines gemischten Chimärismus, dem mittels Spenderlymphozytengabe als DLI entgegenzuwirken versucht wird. Allerdings können wegen der Gefahr einer unter Umständen lethalen GVHD nur geringe Mengen appliziert werden. Weitere schwerwiegende Komplikationen stellen neben viralen Infektionen auch komplizierte Pilzinfektionen dar.

Die Verabreichung von immunkompetenten, nicht-alloreaktiven T-Zellen mit antipathogener Potenz und eventuellem GVL-Effekt könnte eine Möglichkeit der Reduktion von Morbidität und Mortalität im Posttransplantationsstadium darstellen, ohne dabei eine erhöhte GVHD Rate zu provozieren.

Um dieses Ziel zu erreichen, generierten wir mittels Aktivierungsantigenmarkierung und nachfolgender magnetisch aktivierter Zellseparation T-Zellen im klinischen System, die in mindestens zwei verschiedenen Testmethoden nachweislich deutlich reduzierte allogene Eigenschaften besaßen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass diese T-Lymphozyten eine starke Aktivierungsfähigkeit gegenüber viralen Antigenen aufwiesen. Versuche mit entsprechenden Patientenzellen im klinischen System konnten diese viel versprechenden Ergebnisse nicht verifizieren. Unter Umständen liegt dies an der nicht ausreichenden Anzahl und stimulatorischer Kapazität der zur Verfügung stehenden Patientenzellen. Die nächsten Schritte

zur Etablierung nicht-alloreaktiver T-Lymphozyten im klinischen System zur Applikation im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie stellt die Suche nach alternativen Antigenpräsentierenden Zellen des Patienten dar.

Das von uns durchgeführte T-Zelldepletionsverfahren könnte, unter der Voraussetzung des Einsatzes geeigneter APC, virale Infektionen vermeiden, ein Abstoßen verhindern sowie einem Rezidiv entgegenstehen und somit einen Fortschritt in der allogenen Transplantation darstellen.

Ein etabliertes Verfahren zum Nachweis der Proliferationsfähigkeit von T-Lymphozyten ist der [H^3] Thymidineinbau. Hierbei ist allerdings über die Proliferationsfähigkeit hinaus keine weitere Zellcharakterisierung möglich. Der BrdU-Inkorporationsassay mit Hilfe der Durchflußzytometrie stellt eine alternative Methode zur näheren Charakterisierung von T-Lymphozytensubpopulationen dar. Simultane Untersuchungen hinsichtlich Proliferationsfähigkeit, Oberflächenantigen- und Zytokinexpression auf Einzelzellebene werden durch diesen Test ermöglicht. Wir konnten in dieser Arbeit die Gleichwertigkeit des BrdU-Inkorporationsassay zu allgemein anerkannten Testverfahren wie dem [H^3] Thymidin-Proliferationstest und dem EliSPOT-Assay belegen. Ein Einsatz würde eine nähere Charakterisierung von aktivierten Lymphozytensubpopulationen auf Einzelzellebene im zeitlichen Verlauf ermöglichen.

6 Verzeichnis der Abkürzungen

[6-H ₃]	Tritium Thymidin
[6-H ₃] TdR	Thymidin-Release Assay; Thymidinfreisetzungstest
A	Autologe Responderzellen
A*	Bestrahlte autologe Responderzellen (Spenderzellen)
ADV	Adenovirus
ADVk	Adenovirus Kontrollantigen
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANLL	Akute nichtlymphozytische Leukämie
Anm.	Anmerkung
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen Presenting Cell; Antigen präsentierende Zelle
Asp	Aspergillus fumigatus Antigen
ASPhyphen	Aspergillus fumigatus Antigen, bestehend aus Hyphen
ASPppsap	Aspergillus fumigatus Antigen, bestehend aus Überstand
ATG	Anti T Lymphozytenglobulin
B	Allogene Stimulatorzellen
B*	Bestrahlte allogene Stimulatorzellen (Empfängerzellen)
BFA	Brefeldin A
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
C	“Third party” Stimulatorzellen (Fremdzellen)
C*	Bestrahlte Stimulatorzellen (Fremdzellen)
C ₂ H ₃ NaO ₂	Natriumacetat
C ₂ H ₄ OH	Eisessig
C ₅ H ₇ NO	N,N-Dimethylformamid
CCR3	Chemokinrezeptor
CCR4	Chemokinrezeptor

CCR5	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CD45 RA	Naive T-Zelle
CD45 RO	Memory T-Zelle; Gedächtniszelle
cDNA	Komplementäre DNA
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CML	Cell mediated Lympholysis; Zellvermittelte Lympholyse
CMV	Zytomegalievirus
CMV _k	Zytomegalievirus Kontrollantigen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin
COS 1 Zelle	Empfangszelle für cDNA
¹³⁷ Cs	Cäsiumisotop
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte; Zytotoxischer T Lymphozyt
CXCR3	Chemokinrezeptor
DAT	Chemotherapieschema, bestehend aus Daunorubicin, Cytosinarabinosid und 6-Thioguanin
DC	Dendritic Cell; Dendritische Zelle
DLI	Donor Lymphozyten Infusion; Spenderlymphozyten Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleïnase
DNS	Desoxyribonukleïnäure
EBV	Ebstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EliSPOT	Enzyme-linked immunospot; Enzym- gekoppelter Immuntest
F1	Erste Filialgeneration
FACS	Fluorescent activated Cellsorter; Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FITC	Floureszinisothiocyant

FSC	Forward Scatter
G CSF	Granulocyte colony stimulating Factor; Granulozyten-stimulierender Faktor
GMP	Good Manufacturing Practice (Reinraumbedingungen)
GVH	Graft versus Host
GVHD	Graft versus Host disease; Graft versus Host Krankheit
GVL	Graft versus Leukemia Effekt
H ₂ O ₂	Wasserstoffsuperoxid
HA 1, -2, -8	Subtypen von Minorantigenen
hAB Serum	Humanes Spenderserum der Blutgruppe A und B
HB 1	Minorantigensubtyp
HHV6	Humanes Herpesvirus Typ 6
HLA	Hauptleukozytenantigen
HLA	Human Leucocyte Antigen
HLA A, -B, -C, -DR	Hauptleukozytenantigenuntereinheiten
HSA	Humanes Serumalbumin
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSP 70	Heat Shock Protein; Hitzeschockprotein
HSV	Herpes Simplex Virus
HY-Antigen	Minor Antigen, auf männliche Merkmalsträger beschränkt
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL2R	IL 2 Rezeptor
K	Kontrolle
KG1a	Myelomzelllinie
KMT	Knochenmarktransplantation
LDA	Limiting Dilution Analysis
LNGFR	Human low Affinity nerve Growth factor Receptor

mAb	Monoklonaler Antikörper
MACS [®]	Magnet activated Cellsorter; Magnet aktivierte Zellsortierung
mHA _g	Minor Histokompatibilitätsantigen
MHC	Major histocompatibility complex
miH	Minor Histokompatibilitätsantigen
miHA	Minor Histokompatibilitätsantigen
MLC	Mixed Lymphocyte Culture; Gemischte Lymphozytenkultur
MLR	Mixed lymphocyte reaction; Gemischte Lymphozytenreaktion
MOCK	Kontrollantigen ohne Wirkung
MPS	Mukopolysaccharidose
My 10	Antikörper gegen Myelomzelllinie KG1a
N.	Negative Population
NK	Natürliche Killerzelle
P.	Positive Population
p55	T Zellaktivierungsantigen
p75	IL 2 Rezeptor
PBMC	Peripheral Blood mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered Saline; phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PHA	Phythämagglutinin
PMNC	Periphere mononukleäre Zellen
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
RNA	Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
SCID	Severe combined Immunodeficiency; Schwere kombinierte Immundefizienz
SEB	Staphylokokkus Enterotoxin B
SSC	Sideward Scatter
Std. dev.	Standart deviation; Standardabweichung

Std. err.	Standart error; Standardfehler
TAC Antigen	T Cell Activation Antigen; T Zell Aktivierungsantigen
TAP	Peptidtranslokator
Tc	Zytotoxische T-Zelle
TCR	T Cell Rezeptor; T-Zellrezeptor
Tet.	Tetanus-Toxoid
TGF	Tumor Growth Factor
Th1	T Helferzelle 1
Th2	T Helferzelle 2
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
v.D.	(Population) vor Depletion
V/V	Volumenanteil am Gesamtvolumen
VP-16	Etoposid
V β	Bestandteil des T Zell Rezeptors
+	Positiv
-	Negativ
-	bis

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:

Verwendete maus-konjugierte Super-paramagnetische MicroBeads zur selektiven Zellseparation (MACS[®]).

Tabelle 2:

Vor jeder durchflußzytometrischen Messung als Kontrollanalytate eingesetzte FACS-Antikörper (Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg).

Tabelle 3:

Antikörper zur Expressionsanalyse von Zellpopulationen (Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg).

Tabelle 4:

Antikörper zur Expressionsanalyse Dendritischer Zellen (Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg).

Tabelle 5:

Antikörper zur Expressions- und Sekretionsanalyse von Zellen im BrdU-Proliferationsassay (Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg).

Tabelle 6:

Anonymisierte Patientenprobe und Spenderleukapheresat zur Generierung von nicht-alloreaktiven T-Zellen.

Tabelle 7:

Eingesetzte Zellfraktionen, Restimulatoren und Antigene im EliSPOT-Restimulationsversuch.

Tabelle 8:

Eingesetzte Zellfraktionen, Restimulatoren und Antigene im [6-H₃] Thymidin-Proliferationsassay.

Tabelle 9:

Eingesetzte Zellfraktionen, Restimulatoren und Antigene im BrdU Restimulationsversuch.

Tabelle 10:

Zellverluste in neun unabhängigen Versuchen in absoluten Zahlen und Prozent unter Verwendung von PMNC aus Vollblut ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler. Mit “ –”, markierte Werte stehen für einen Zellgewinn.

Tabelle 11:

Zellverluste in zwei Experimenten in absoluten Zahlen und Prozent unter Verwendung von PMNC aus Vollblut ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler.

Tabelle 12:

Oberflächenexpression der T-Lymphozyten der Ausgangspopulation in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC bezogen auf alle drei untersuchten Oberflächenantigene in Prozent ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler.

Tabelle 13:

Oberflächenexpression der T-Lymphozyten der Ausgangspopulation in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC in Prozent bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler. Anm.: in V1 wurde CD3/25 nicht untersucht.

Tabelle 14:

Oberflächenexpression der Negativfraktion in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent ausgedrückt in Mittelwert,

Standardabweichung und Standardfehler. Anm.: CD3/25 wurde in V1 nicht untersucht.

Tabelle 15:

Oberflächenexpression der Negativfraktion in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf drei, simultan untersuchte Oberflächenantigene in Prozent ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler.

Tabelle 16:

Oberflächenexpression der Positivfraktion in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler. Anm.: CD3/25 wurde in V1 nicht untersucht.

Tabelle 17:

Oberflächenexpression der Positivfraktion in neun unabhängigen Versuchen nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf drei, simultan untersuchte Oberflächenantigene in Prozent ausgedrückt in Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler.

Tabelle 18:

Übersicht über Mittelwert und Standardabweichung aller Versuchsreihen der Ausgangspopulation, bestehend aus jeweils neun unabhängigen Versuchen im EliSPOT-Assay. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben.*

Tabelle 19:

Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichung aller Versuchsreihen der Negativfraktion, bestehend aus jeweils neun unabhängigen Versuchen im

EliSPOT-Assay. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben.*

Tabelle 20:

Übersicht über die p-Werte aller Versuchsreihen aller Zellfraktionen, bestehend aus jeweils neun unabhängigen Versuchen im EliSPOT-Assay.

Tabelle 21:

Durchschnittlicher Stimulationsindex und Standardabweichung der Mikro-MLCs jeder Versuchsreihe im Thymidin-Proliferationsassay in neun unabhängigen Versuchen, bezogen auf verschiedene Antigene. Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben.*

Tabelle 22:

Übersicht über die p-Werte aller Versuchsreihen aller Zellfraktionen, bestehend aus jeweils neun unabhängigen Versuchen im Thymidin-Proliferationsassay.

Tabelle 23:

Alloreaktivität der Negativfraktion im Methodenvergleich, bezogen auf die jeweilige Ausgangspopulation in Prozent.

Tabelle 24:

Autologe Reaktivität der Negativfraktion im Methodenvergleich, bezogen auf die jeweilige Ausgangspopulation in Prozent.

Tabelle 25:

Zellausbeute (absolut und in Prozent) der Expansionsfraktion in drei unabhängigen Versuchen. Zusätzliche Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Tabelle 26:

Oberflächenantigenexpression Dendritischer Zellen in drei Versuchen in Prozent. Zusätzliche Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Tabelle 27:

Oberflächenexpression der Negativfraktion nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Tabelle 28:

Oberflächenexpression der Negativfraktion nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf drei parallel untersuchte Oberflächenantigene in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Tabelle 29:

Oberflächenexpression der Positivfraktion nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Tabelle 30:

Oberflächenexpression der Positivfraktion nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf drei parallel untersuchte Oberflächenantigene in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Tabelle 31:

Oberflächenexpression der Ausgangspopulation nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf ein untersuchtes Oberflächenantigen in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Tabelle 32:

Oberflächenexpression der Ausgangspopulation nach dreitägiger MLC und nachfolgender Depletion bezogen auf drei parallel untersuchte Oberflächenantigene in Prozent, Mittelwert und Standardabweichung (Versuch D1-3).

Tabelle 33:

Gemittelte Reinheiten der Negativfraktion beider Versuchsreihen in Prozent, bezogen auf drei beziehungsweise ein untersuchtes Aktivierungsmerkmal der FACS- Analyse.

Tabelle 34:

Alloreaktivitätsindex in Prozent und Korrelation der Versuchsreihen V1-9 mit D1-3 der einzelnen Zellpopulationen in der FACS-Analyse, bezogen auf die jeweilige Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde.

Tabelle 35:

Legende zu Abbildung 9: Pipettierschema

Tabelle 36:

Aktivierungsindex der drei Zellpopulationen im EliSPOT gegenüber unterschiedlichen Antigenen in Prozent. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben (D1-3).*

Tabelle 37:

Aktivierungsindex der expandierten Negativfraktion im EliSPOT-Assay gegenüber unterschiedlichen Antigenen in Prozent. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Negativexpansion A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben Anm.: A*, C* und Adeno wurde in nur einem Versuch, CMV und CMVk in zwei Versuchen eingesetzt (D1-3).*

Tabelle 38:

Gegenüberstellung der Aktivierungsindizes der Negativfraktion und der expandierten Negativfraktion gegenüber unterschiedlichen Antigenen aus drei unabhängigen Versuchen im EliSPOT-Assay in Prozent. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Negativ A/B beziehungsweise Expansion A/B*) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben (D1-3).*

Tabelle 39:

Vergleich der Aktivitätsindizes beider Versuchsreihen im EliSPOT-Assay unter Angabe der Korrelation (p-Wert). Die Aktivitätsindizes gegenüber unterschiedlichen Antigenen der neun Versuche mit PMNC (V1-9) wurden in Beziehung zu den Indizes der Experimente mit Dendritischen Zellen (D1-3) gesetzt. Anm.: Aspergillus fumigatus Antigen konnte nicht vergleichend beurteilt werden, da dieses Antigen nur in Versuch D1-3 eingesetzt wurde

Tabelle 40:

Gemittelte Proliferationsindizes der T-Zellen gegenüber unterschiedlichen Antigenen in der Micro-MLC des [6-H³] Thymidin-Assay dreier unabhängiger Versuche (D1-3) in Prozent. Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben. Anm.: Adenovirus Antigen wurde nur in Versuch D3 verwendet.*

Tabelle 41:

Gemittelte Proliferationsindizes der T-Zellen (expandierte Negativfraktion) gegenüber unterschiedlichen Antigenen in der Micro-MLC des [6-H³] Thymidin-Assay dreier unabhängiger Versuche (D1-3) in Prozent. Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Expansionsfraktion A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben. Anm.: A* und Adenovirus Antigen wurden nur in D3, Tetanus-Toxoid und Aspergillus fumigatus Antigen in D1 und D2 eingesetzt).*

Tabelle 42:

Gemittelte Proliferationsindizes der Negativ- beziehungsweise Expansionsfraktion gegenüber unterschiedlichen Antigenen in der Micro-MLC des [6-H³] Thymidin-Assay (D1-3) in Prozent. Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Negativfraktion A/B beziehungsweise Expansionsfraktion A/B*) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben.*

Tabelle 43:

Proliferationsindex und Korrelation (p-Wert) der beiden Versuchsreihen im Thymidin-Assay, wobei die Proliferationsindizes der neun Versuche mit PMNC (V1-9) in Beziehung zu den Indizes der Experimente mit Dendritischen Zellen (D1-3) gesetzt wurden. Anm.: Aspergillus fumigatus Antigen konnte nicht vergleichend beurteilt werden, da dieses Antigen nur in Versuch D1-3 eingesetzt wurde.

Tabelle 44:

Vergleich BrdU-Proliferationsanalyse/[6-H₃] Thymidin-Proliferationsassay Korrelation (p-Wert) und gemittelter Proliferationsindex in Prozent der drei Vergleichsversuche, wobei die Reaktion der einzelnen Responderzellen auf die nicht inkubierter Zellen, die 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Anm.: Autologe Zellen sowie Tetanus-Toxoid Antigen wurden in nur einer Versuchsreihe eingesetzt. Der p-Wert bezieht sich jeweils auf A/B, A/PHA und A/SEB. Die im BrdU-Proliferationstest nachgewiesenen Aktivierungsmarker BrdU, IFN-gamma und Oberflächenaktivierungsantigene wurden sowohl einzeln als auch in Kombination analysiert und aufgeführt.*

Tabelle 45:

Durchschnittliche Anzahl der Zellen/ μ l als Mittelwert und Standardabweichung pro Stimulus und Aktivierungsmerkmal (BrdU, IFN-gamma und Oberflächenantigene) in drei unabhängigen Versuchen im BrdU-Proliferationsassay.

Tabelle 46:

Stimulationsindex als Mittelwert und Standardabweichung in drei unabhängigen Versuchen im BrdU-Proliferationsassay in Prozent, wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Pro Zellpopulation wurden die jeweiligen Ergebnisse der Oberflächenmarkeranalyse gegenüber den einzelnen Stimuli gemittelt. Anm.: Die Antigene PHA und Aspergillus Antigen wurden in zwei, Adenovirus Antigen in einem Versuch eingesetzt.

Tabelle 47:

Proliferationsindex der Oberflächenantigenanalyse im BrdU-Proliferationsassay der Ausgangspopulation, der Negativ- und der Expansionsfraktion in Prozent, wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Pro Zellpopulation wurden die jeweiligen Ergebnisse der Oberflächenmarkeranalyse gegenüber den einzelnen Stimuli gemittelt.

Tabelle 48:

Gemittelter Proliferationsindex der Ausgangspopulation gegenüber diversen Antigenen im BrdU-Proliferationsassay, Elispot-Assay und [6-H₃] Thymidin-Assay in Prozent, wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Zusätzlich aufgeführt die Korrelationen (p-Wert) der Testmethoden zueinander (BrdU/[6-H₃], BrdU/EliSPOT-Assay und in der letzten Spalte [6-H₃]/EliSPOT-Assay).

Tabelle 49:

Gemittelter Proliferationsindex der Negativfraktion gegenüber diversen Antigenen im BrdU-Proliferationsassay, EliSPOT-Assay und [6-H₃] Thymidin-Assay in Prozent wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Zusätzlich aufgeführt die Korrelationen (p-Wert) der Testmethoden zueinander

(BrdU/[6-H₃], BrdU/EliSPOT-Assay und in der letzten Spalte [6-H₃]/EliSPOT-Assay).

Tabelle 50:

Gemittelter Proliferationsindex der Expansionsfraktion gegenüber diversen Antigenen im BrdU-Proliferationsassay, EliSPOT-Assay und [6-H₃] Thymidin-Assay in Prozent, wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Zusätzlich aufgeführt die Korrelationen (p-Wert) der Testmethoden zueinander (BrdU/[6-H₃], BrdU/EliSPOT-Assay und in der letzten Spalte [6-H₃]/EliSPOT-Assay).

Tabelle 51:

Oberflächenantigenanalyse der Ausgangs- und der Negativfraktion. Dargestellt sind die gemessenen Reinheiten der beiden T-Zellfraktionen in Prozent (Patientenversuch P1).

Tabelle 52:

Index der Interferon gamma Sekretion im EliSPOT-Assay der untersuchten Populationen je Antigen in Prozent. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Ausgangspopulation A/B) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben.*

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse als Vier-Quadrantenstatistik der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf ein Oberflächenantigen ausgewählter Versuche in Prozent, bezogen auf die T-Zellpopulation der jeweiligen Zellfraktion (Versuch V1-9).

Abbildung 2:

Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse als Vier-Quadrantenstatistik der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf alle drei Oberflächenantigene ausgewählter Versuche in Prozent, bezogen auf die T-Zell Population der jeweiligen Zellfraktion (Versuch V1-9).

Abbildung 3:

Durchschnittliche Reinheiten der T-Zellen der drei Zellfraktionen „Negativ“, „Positiv“ und „Vor Depletion“ (=Ausgangspopulation) in neun unabhängigen Versuchen bezogen auf ein beziehungsweise alle drei untersuchten Aktivierungsmerkmale in Prozent.

Abbildung 4:

Durchschnittliche Reinheiten der T-Zellen in drei simultan untersuchten Aktivierungsantigenen der drei Zellfraktionen „Negativ“, „Positiv“ und „Ausgangspopulation“ (=Vor Depletion) in neun unabhängigen Versuchen bezogen auf CD 4+ und CD 8+ T-Zellen.

Abbildung 5:

Interferon gamma Nachweis mittels Enzymreaktion im EliSPOT Assay (Versuch 6): Negativfraktion versus C als Fremdartigennachweisreaktion. Gezeigt werden drei Nitrozellulosemembrankammern mit Angabe der gemessenen Punkte pro Kammer.*

Abbildung 6:

Dendritische Zellkultur nach siebentägiger Anzucht. Charakteristisch sind die ausgebildeten Zellausläufer, wie zentral bei 9 Uhr zu sehen.

Abbildung 7:

Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse als Vier-Quadrantenstatistik der einzelnen Zellfraktionen ausgewählter Versuche in Prozent. Die untersuchten Oberflächenantigene wurden auf die T-Zellpopulation der jeweiligen Zellfraktion bezogen (Versuch D1-3).

Abbildung 8:

Durchschnittliche Reinheiten der T-Zellen der drei Zellfraktionen Neg, Pos und Ausgangspopulation (vor Depletion) in drei unabhängigen Versuchen bezogen auf ein beziehungsweise alle drei untersuchten Aktivierungsmerkmale in Prozent (D1-3.)

Abbildung 9:

Durchschnittliche Reinheiten der T-Zellen in drei simultan untersuchten Aktivierungsantigenen der drei Zellfraktionen Neg, Pos und Vor Depletion in drei unabhängigen Versuchen bezogen auf CD 4+ und CD 8+ T-Zellen (D1-3).

Abbildung 10:

Behandelte Nitrozellulosemembran (EliSPOT-Assay). Als Maß für die Aktivierbarkeit der untersuchten T-Zellen gilt die Interferon gamma Produktion. Jeder dunkle „spot“, entspricht IFN-gamma produzierenden und somit aktivierten Zellen (Versuch D3, Legende siehe Tabelle 35).

Abbildung 11:

Aktivitätsindizes der Negativfraktion nach primärer MLC im EliSPOT-Assay in Prozent gegenüber diversen Antigenen, bezogen auf die unbehandelte MLC (der Ausgangspopulation), die gleich 100 Prozent gesetzt wurde. Anm.: CMV, CMVK und AdenoK wurden in zwei von drei Versuchen eingesetzt (D1-3).

Abbildung 12:

Aktivitätsindizes der expandierten Negativfraktion nach primärer MLC im EliSPOT-Assay in Prozent gegenüber diversen Antigenen, bezogen auf nicht inkubierte Zellen derselben Population, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde. Anm.: A, C* und Adeno wurde in nur einem Versuch, CMV und CMV_k in zwei Versuchen eingesetzt (D1-3).*

Abbildung 13:

Proliferationsindizes der Negativfraktion im Vergleich zur Expansionsfraktion gegenüber diversen Antigenen (D1-3) in Prozent. Die Anzahl der „counts“ ist als Prozentsatz der MLC, die nicht stimuliert wurde (Negativ A/B beziehungsweise Expansion A/B*) und gleich 100 Prozent gesetzt wurde, wiedergegeben.*

Abbildung 14:

Proliferationsindex in Prozent im Testreihenvergleich. Als Aktivierungsmarker wurden BrdU- und IFN-gamma positive Zellen (BrdU-Proliferationsanalyse) beziehungsweise „counts pro Minute“ ([6-H3] Proliferationsassay) untersucht.

Abbildung 15:

Proliferationsindex der Oberflächenantigenanalyse im BrdU-Proliferationsassay der Ausgangspopulation, der Negativ- und der Expansionsfraktion in Prozent, wobei die Zellaktivität auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde. Pro Zellpopulation wurden die jeweiligen Ergebnisse der Oberflächenmarkeranalyse gegenüber den einzelnen Stimuli gemittelt.

Abbildung 16:

Oberflächenantigenanalyse der drei T-Zellpopulationen im Patientenversuch (P1) mittels FACS-Analyse in Prozent.

Abbildung 17:

Mittlere Reinheiten der Negativfraktion und der Ausgangspopulation hinsichtlich eines beziehungsweise drei Oberflächenaktivierungsantigene der FACS-Analyse in Prozent (Versuch P1).

Abbildung 18:

Interferon gamma Nachweis mittels Enzymreaktion im EliSPOT-Assay (Versuch P1). Gezeigt werden drei Nitrozellulosemembrankammern als so genanntes Triplet der Negativfraktion vs. PHA (Phythämagglutinin).

Abbildung 19:

Proliferationsindex der Negativfraktion (Versuch P1) in Prozent, wobei der Proliferationsindex auf nicht inkubierte Zellen der Ausgangspopulation, die gleich 100 Prozent gesetzt wurde, bezogen wurde.

9 Literaturverzeichnis

1. Abbas, "Cellular and Molecular Immunology", Philadelphia Saunders, (1994)
2. Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A, Tesch H: CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. *J Immunol Methods* (1989), 125: 19-28
3. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Yvon E, et al: Selective Depletion of donor alloreactive T cells without loss of antiviral or antileukemic responses. *Blood* (2003), 102: 2292-2299
4. Anderlini P, Korbling M, Dale D, Gratwohl A, Schmitz N, Stroncek D, Howe C, Leitman S, Horowitz M, Gluckman E, Rowley S, Przepiorka D, Champlin R: Allogeneic blood stem cell transplantation: considerations for donors. *Blood* (1997), 90: 903-908
5. Antin JH, Bierer BE, Smith BR, Ferrara J, Guinan EC, Sieff C, Golan GE, Macklis RM, Tarbell NJ, and Lynch E: Selective depletion of bone marrow T lymphocytes with anti-CD5 monoclonal antibodies: effective prophylaxis for graft-versus-host disease in patients with hematologic malignancies. *Blood* (1991), 78: 2139ff
6. Antoniou A, McCormick D, Scott D, Yeoman H, Chandler P, Mellor A, Dyson J: T cell tolerance and activation to a transgene-encoded tumor antigen. *Eur J Immunol* (1996), 26: 1094-1102
7. Arnaiz AV, Timon M, Rodriguez-Gallego C, Perez-Blas M, Corell A, Martin-Villa JL, and Regueiro JR: Human T-cell activation deficiencies. *Immunol Today* (1992), 13: 259ff
8. Auchincloss H JR, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH: The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1993), 90: 3373-7
9. Aversa F, Tabilio A, Velardi A. et al: Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* (1998), 339: 1186-1193
10. Bach FH, van Rood JJ: The major histocompatibility complex: genetics and biology. *N Engl J Med* (1976), 295: 872-877
11. Baecher-Allan C and Hafler DA: Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med* (2004), 200: 273-276
12. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Lechler RI: The role of the allograft in the induction of donor-specific T cell hyporesponsiveness. *Transplantation* (2001), 72: 480-485
13. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID, Thomas ED: Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* (1991), 77: 1717-22
14. Bernard A, Lamy L, Alberti I: The two-signal model of T-Cell activation after 30 years. *Transplantation* (2002), 73: 31-35
15. Bethge WA, Hegenbart U, Stuart MJ, Storer BE, Maris MB, Flowers MED, Maloney DG, Chauncey T, Bruno B, Agura E, Forman SJ, Blume KG,

- Niederwieser D, Storb R, Sandmaier BM: Adoptive Immunotherapy with donor lymphocyte infusions after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Blood* (2004), 103: 790-795
16. Billingham, RE: The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* (1966), 62: 21-78
 17. Blazer BR, Roopenian DC, Taylor PA, Christianson GJ, Panoskaltis-Mortani A, Valleria DA: Lack of GVHD across classical, single minor histocompatibility (miH) locus barriers in mice. *Transplantation* (1996), 61: 619-24
 18. Bohley P: Surface hydrophobicity and intracellular degradation of proteins. *Biol Chem* (1996), 377: 425-435
 19. Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW), Leiden, Niederlande. www.bmdw.org
 20. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F: Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* (1998), 187: 129-134
 21. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Marvilio F, Traversari C, and Bordignon C: HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* (1997), 276: 1719-1724
 22. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A: Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* (1994), 12: 337-365
 23. Bortin MM: A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* (1970), 9: 571-587
 24. Bradley TR, Metcalf D: The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* (1966), 44: 287-299
 25. Böyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* (1968), 97: 7
 26. Burmester G-R, Pezzutto A, Ulrichs T, Aicher A: Grundlagen. In: *Taschenatlas der Immunologie, Grundlagen, Labor, Klinik*. Thieme Verlag, Stuttgart; (1998)
 27. Cavanagh LL, Saal RJ, Grimmett KL, Thomas, R: Proliferation in monocyte-derived dendritic cell cultures is caused by progenitor cells capable of myeloid differentiation. *Blood* (1998), 92:1598-1607
 28. Cavazzana-Calvo M, Fromont C, Le Deist F, Lusardi M, Coulombel L, Derocq JM, Gerota I, Griscelli C, and Fisher A: Specific elimination of alloreactive T cells by an anti-inteleukin-2 receptor b chain specific immunotoxin. *Transplantation* (1990), 50: 1-7
 29. Cavazzana-Calvo M, Andre-Schmutz I, Hacein-Bey-Abina S, Bensoussan D, Le Deist F, Fischer A: Improving immune reconstitution while preventing graft-versus-host disease in allogeneic stem cell transplantation. *Semin Hematol* (2002), 39: 32-40
 30. Champlin R, Ho W, Gajewksi J, Feig S, Burnison M, Holley G, Greenberg P, Lee K, Schmid I, and Giorgi J: Selektive Depletion of CD8+ T

- lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* (1990), 76: 418ff
31. Chao NJ: Graft versus host disease. 2. Auflage, R.G. Landes Co.; Austin, Texas (1999)
 32. Chao NJ: Minors come of age: minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease *Biol Blood Marrow Transplant.* (2004), 10: 215-223
 33. Chen JC, Davis BH, Leon MA, and Leong LC: Gamma Radiation Induces CD69 Expression on Lymphocytes. *Cytometry* (1997), 30: 304-312
 34. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH: Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* (1984), 133:157-165
 35. Claas, FHJ: Predictive parameters for in vivo alloreactivity. *Transpl Immunol.* (2002), 10: 137-142
 36. Cole LJ, Fisher MC, Ellis ME, Bond VP: Protection of mice against x-irradiation by spleen homogenates administered after exposure. *Proc Soc Exp Biol Med.* (1952), 80: 112-117
 37. Cole LJ, Habermeyer JG, Bond VP: Recovery from akute radiation injury in mice following administration of rat bone marrow. *J Natl Cancer Inst.* (1955), 16: 1-9
 38. Confer DL, Stroncek DF: Bone marrow and peripheral blood stem cell donors. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ (Hrsg.). *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, 2. Auflage. Blackwell, Oxford, England (1999): 421-430
 39. Couriel D, Canosa J, Engler H, Collins A, Dunbar C, Barrett AJ: Early reactivation of cytomegalovirus and high risk of interstitial pneumonitis following T-depleted BMT for adults with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* (1996), 18: 347-353
 40. Dausset J: Iso-leuco-anticorps *Acta Haematol.* (1958), 20: 156
 41. Davies JD, Leong LY, Mellor A, Cobbold SP, and Waldmann H: T cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition. *J Immunol* (1996), 156: 3602-3607
 42. Dazzi F, Szydlo RM, Goldman JM: Donor lymphocyte infusions for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplant: where we now stand. *Exp Hematol.* (1999), 27: 1477-1486
 43. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Cross NC, Kaeda J, Chase A, Olavarria E, van Rhee F, Kanfer E, Apperley JF, Goldman JM: Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood.* (2000), 95: 67-71
 44. Dean PN, Colbeare F, Gratzner H, Rice GC, and Gray JW: Cell-cycle analysis using an monoclonal antibody to BrdUrd. *Cell Tissue Kinet* (1984), 17: 427ff
 45. Den Haan JM, Sherman NE, Blokland E, Huczko E, Koning F, Drijfhout JW, Skipper J, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, et al.: Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* (1995), 268: 1476-1479

46. Den Haan JM, Meadows LM, Wang W, Pool J, Blokland E, Bishop TL, Reinhardus C, Shabanowitz J, Offringa R, Hunt DF, Engelhard VH, Goulmy E: The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science* (1998), 279: 1054-1057
47. Dolstra H, Fredrix H, Maas F, Coulie PG, Brasseur F, Mensink E, Adema GJ, de Witte TM, Figdor CG, van de Wiel-van Kemenade E: A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* (1999), 189: 301-308
48. Dowling R, Weber V, Osborne L, Klein H: Mononuclear cell collection using various techniques. *J Clin Apheresis* (1984), 2: 32-40
49. Drobyski WR, Gendelman M, Vodanovic-Jankovic S, Gorski J: Elimination of leukemia in the absence of lethal graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* (2003), 170: 3046-3053
50. Eyrich M, Lang P, Lal S et al: A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors. *Br J Haematol* (2001), 114: 422-432
51. Falk K, Rötzschke O, Stefanovic S, Jung G, Rammensee HG: Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* (1991), 351: 290-296
52. Fehse B, Frerk O, Goldman M, Bulduk M, Zander AR: Efficient depletion of alloreactive donor T lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69). *Br J Haematol* (2000), 109: 644ff
53. Fisson S, Djelti F, Trenado A, Billiard F, Liblau R, Klatzmann D, Cohen JL, and Salomon BL: Therapeutic potential of self-antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells selected in vitro from a polyclonal repertoire. *Eur J Immunol*. 2006 Apr;36(4):817-27
54. Fluck N, Witzke O, Morris PJ, Wood KJ: Indirect allorecognition is involved in both acute and chronic allograft rejection. *Transplant Proc* (1999), 31: 842-843
55. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH: Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* (1956), 177: 452-454
56. Ford WL, Simmonds SJ, and Atkins FC: Early cellular events in a systemic graft-vs.-host reaction. II. Autoradiographic estimates of the frequency of donor lymphocytes which respond to each Ag-B-determined antigenic complex. *J Exp Med* (1975), 141: 681ff
57. Freeman GJ, Borriello F, Hodes RJ, Reiser H, Hathcock KS, Laszlo G, McKnight AJ, Kim J, Du L, Lombard DB et al: Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice. *Science* (1993), 262: 907ff
58. Gale RP, Reisner Y: Graft rejection and graft-versus-host: mirror images. *Lancet* (1986), 1: 1468-1470
59. Game DS, Lechler RI: Pathways of allorecognition: implications for transplant tolerance. *Transpl Immunol* (2002), 10: 101-108
60. Garderet L, Snell V, Przepiorka D, Schenk T, Lu JG, Marini F, Gluckman E, Andreeff M, and Champlin RE: Effective Depletion of alloreactive lymphocytes from peripheral blood mononuclear cell preparations. *Transplantation* (1999), 67: 124ff

61. Goldman M, Gale RP, Horowitz MM, et al: Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* (1988), 108: 806-814
62. Gonchoroff NJ, Katzann JA, Currie RM, Evans EL, Houck DW, Kline BC, Greipp PR, and Loken MR: S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine, Role of DNase pretreatment. *J Immunol Methods* (1986), 93: 97ff
63. Goulmy E, Persijn G, Paul LC, Wilmink F, Van Rood JJ: HLA regulates postrenal transplant CML non reactivity. *J Immunol* (1985), 135: 3082-3086
64. Graca L, Cobbold SP, and Waldmann, H: Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* (2002), 195: 1641-1646
65. Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, and Waldmann H: Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* (2002), 168: 5558-5565
66. Graca L, Le Moine A, Lin CY, Fairchild PJ, Cobbold SP, and Waldmann H: Donor-specific transplantation tolerance: the paradoxical behavior of CD4+CD25+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004), 101: 10122-10126
67. Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo-and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* (1982), 218: 474ff
68. Haddad E, Landais P, Friedrich W et al: Longterm immune reconstruction and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients. *Blood* (1998), 91: 3646-3653
69. Handgretinger R, Lang P, Schumm M et al: Isolation and transplantation of autologous peripheral CD34+ progenitor cells highly purified by magnetic-activated cell sorting. *Bone Marrow Transplant* (1998), 21: 987ff
70. Handgretinger R, Schumm M, Lang P, et al: Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells. *Ann N Y Acad Sci* (1999), 872: 351-361
71. Hansen JA, Choo SY, Geraghty DE, Mickelson E: The HLA system in clinical marrow transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* (1990), 4: 507-523
72. Hansen M, Schaeffer A, Tseng-Law J, Bender J, Van Epps D and Luqman M: Use of Recipient-Derived Dendritic Cells for Selective Depletion of Alloreactive T Cells from Allografts. *Bone Marrow Transplant* (2001), 27: 127f
73. Helene M, Lake-Bullock V, Bryson JS, Jennings CD, and Kaplan AM: Inhibition of graft-versus-host disease. Use of a T cell-controlled suicide gene. *J Immunol* (1997), 158: 5079ff
74. Hernandez-Fuentes MP, Baker RJ, Lechler RI: The alloresponse. *Rev Immunogenet* (1999),1: 282-296
75. Herrera C, Torres A, Garcia-Castellano JM, Roman J, Martin C, Serrano J, Falcon M, Alvarez MA, Gomez P, and Martinez F: Prevention of graft-versus-host disease in high risk patients by depletion of CD4+ and reduction of CD8+ lymphocytes in the marrow graft. *Bone Marrow Transplant* (1999), 23: 443-450

76. Ho VT, Soiffer RJ: The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* (2001), 98: 3192-3204
77. Hori S, Carvalho TL, and Demengeot J: CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol* (2002), 32: 1282-1291
78. Hornick PI, Mason PD, Yacoub MH, Rose ML, Batchelor R, Lechler RI: Assessment of the contribution that direct allorecognition makes to the progression of chronic cardiac transplant rejection in humans. *Circulation* (1998), 97: 1257-1263
79. Ibelgauft H: GM-CSF und G-CSF. Horst Ibelgaufts COPE- Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. Version 10.3 (2003). www.copewithcytokines.de
80. Inaba K, Steinman RM, Van Voorhis WC, Muramatsu S: Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1983), 80: 6041-6045
81. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM, Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* (1993), 178:479
82. Jacobson LO, Marks EK, Robson MJ: Effect of Spleen Protection on Mortality Following X-Irradiation. *J Lab Clin Med* (1949), 34:1538
83. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Gaston EO, Robson MJ, Eldredge JH: Further studies on recovery from radiation injury. *J Lab Med* (1951), 37: 683-697
84. Jacobson LO: Evidence for a humoral factor (or factors) concerned in recovery from radiation injury: a review. *Cancer Res* (1952), 12: 315-325
85. Kappler J, Kotzin B, Herron L, Gelfand EW, Bigler RD, Boylston A, Carrel S, Posnett DN, Choi Y, and Marrack P: V β -specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* (1989), 244: 811ff
86. Kishimoto H, Sprent J: Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med* (1997), 185: 263-271
87. Koh MB, Prentice HG, and Lowdell MW: Selective removal of alloreactive cells from haematopoietic stem cell grafts: graft engineering for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant* (1999), 23: 1071ff
88. Korngold R, Sprent J: Lethal graft-versus-host disease following bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp Med* (1978), 148: 1687-1698
89. Korngold R, Sprent J: Variable capacity of L3T4+ cells to cause lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. *J Exp Med* (1987), 165: 1552-1564
90. Korngold R, Wettstein PJ: Immunodominance in the graft-versus-host disease T cell response to minor histocompatibility antigens. *J Immunol.* (1990), 145: 4079-88

91. Korngold R, Leighton C, Mobraaten LE, Berger MA: Interstrain graft-vs-host disease T-cell responses to immunodominant minor histocompatibility antigens. *Biol Blood Marrow Transplant* (1997), 3: 57-64
92. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS: CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility. *Blood* (1996), 87: 1-13
93. Lang, P: The Tuebingen Protocol for haploidentical transplantation in children, 72 pediatric patients, 1995-2004. Information center for haploidentical stem cell transplantation. www.haplo.org
94. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH: The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today*. (1990), 11: 83-88
95. Leiva LE, Regueira O, and Sorensen RU: Peripheral blood mononuclear cell sonicates as an alternative to irradiated allogeneic cells to stimulate a mixed lymphocyte reaction and to enumerate CD69+ alloreactive T cells. *Hum Immunol* (1997), 56: 49ff
96. Lenschow DJ and Bluestone JA: T cell co-stimulation and in vivo tolerance. *Curr Opin Immunol* (1993), 5: 747ff
97. Lindahl KF, Wilson DB: Histocompatibility antigen activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors. *J Exp Med* (1977), 145: 508-522
98. Littman DR: The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu Rev Immunol* (1987), 5: 561-584
99. Loetscher P, Pellegrino A, Gong JH, Mattioli I, Loetscher M, Bardi G, Baggiolini M, Clark-Lewis I: The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem* (2001), 276: 2986-2991
100. Lombardi G, Sidhu S, Batchelor JR, Lechler RI: Allorecognition of DR1 by T cells from a DR4/DRw13 responder mimics self-restricted recognition of endogenous peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1989), 86: 4190-4194
101. Lombardi G, Sidhu S, Daly M, Batchelor JR, Makgoba W, Lechler RI: Are primary alloresponses truly primary? *Int Immunol* (1990), 2: 9-13
102. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* (51 A.D.), 12: 197
103. Lyons AB, Parish CR: Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* (1994), 2: 131-7
104. Main JM, Prehn RT: Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J Natl Cancer Inst* (1955), 15: 1023
105. Maino VC, Suni MA, and Ruitenberg JJ: Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* (1995), 20: 127ff
106. Majolino I, Cavallaro AM, Bacigalupo A, Rambaldi A, Falda M, Locatelli F, Raimondi R, Pucci G, Mordini N, Barbui T, Locatelli F, Rodeghiero F, Irrera G, Indovina A, Valbonesi M, Bellavita P, Tassi V, Perotti C, Soli M, Bresolin G: Mobilisation and collection of PBSC in healthy donors: a retrospective analysis of the Italian Bone Marrow Transplantation Group (GITMO). *Haematologica* (1997), 82: 47-52
107. Mapara MY, Kim YM, Marx J, Sykes M: Donor lymphocyte infusion-mediated graft-versus-leukemia effects in mixed chimeras established with

- a nonmyeloablative conditioning regimen: extinction of graft-versus-leukemia effects after conversion to full donor chimerism. *Transplantation* (2003), 76: 297-305
108. Marrack P and Kappler J: The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* (1990), 248: 705ff
 109. Martin PJ, Gooley T, Anasetti C, Petersdorf EW, Hansen JA: HLAs and risk of acute graft-vs.-host disease after marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Biol Blood Marrow Transplant.* (1997), 3: 142-149
 110. Matesic D, Lehmann PV, and Heeger PS: High-resolution characterization of cytokine-producing alloreactivity in naive and allograft-primed mice. *Transplantation* (1998), 65: 906ff
 111. Matzinger P, Bevan MJ: Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell Immunol* (1977), 29: 1-5
 112. Matzinger P, Bevan MJ: Induction of H-2-restricted cytotoxic T-cells: in vivo induction has the appearance of being unrestricted. *Cell Immunol* (1977), 33: 92-100
 113. Mavilio F, Ferrari G, Rossini S, Nobili N, Bonini C, Casorati G, Traversari C, and Bordignon C: Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector-mediated gene transfer. *Blood* (1994), 83: 1988ff
 114. Mavroudis DA, Jiang YZ, Hensel N, Lewalle P, Couriel D, Kreitman RJ, Pastan I, and Barrett AJ: Specific depletion of alloreactivity against haplotype mismatched related individuals by a recombinant immunotoxin: a new approach to graft-versus-host disease prophylaxis in haploidentical bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* (1996), 17: 793ff
 115. Mehta BA, Maino VC: Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4+ T lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* (1997), 208: 49-59
 116. Melville D: Direct magnetic separation of red cells from whole blood. *Nature* (1975), 255: 706-708
 117. Merckenschlager M, Ikeda H, Wilkinson D: Allorecognition of HLA-DR and –DQ transfectants by human CD45RA and CD45RO CD4 T cells: repertoire analysis and activation requirements. *Eur J Immunol* (1991), 21: 79-88
 118. Michalek J, Collins RH, Durrani HP, Vaclavakova P, Ruff LE, Douek DC, Vitetta ES: Definite separation of graft-versus-leukemia and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor β loci sequences. *PNAS* (2003), 100: 1180-1184
 119. Mickelson EM, Petersdorf E, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, Hansen JA: HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol* (2000), 61: 92-100
 120. Miescher PA, Fauconnet M: Mise en évidence de différents groupes leucocytaires chez l'homme. *Schweiz.Med.Wochenschr.* (1954), 84: 597
 121. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A: High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* (1990), 11: 231-238
 122. Momburg F, Roelse J, Hämmerling GJ, Neefjes JJ: Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med* (1994), 179: 1613-1623
 123. Olsen AC, Pedersen LO, Hansen AS, Nissen MH, Olsen M, Hansen PR, Holm A, Buus S: A quantitative assay to measure the interaction between

- immunogenic peptides and purified class I major histocompatibility complex molecules. *Eur J Immunol.* (1994), 24: 385-392
124. Oluwole SF, Chowdhury NC, Ingram M, Garrovillo M, Jin MX, Agrawal S: Mechanism of acquired thymic tolerance induced by a single major histocompatibility complex class I peptide with the dominant epitope: differential analysis of regulatory cytokines in the lymphoid and intragraft compartments. *Transplantation* (1999), 68: 418-429
 125. Opelz G, Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J: HLA compatibility and organ transplant survival Collaborative transplant study. *Rev Immunogenet* (1999), 1: 334-342
 126. O'Reilly RJ, Keever CA, Small TN et al: The use of HLA-non-identical T-cell-depleted marrow transplants for correction of severe combined immunodeficiency disease. *Immunodeficiency Rev* (1989), 1: 273-309
 127. Owen RD: Immunogenetic consequences between vascular anastomoses between bovine twins. *Science* (1945), 102: 400-402
 128. Parnes JR: Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol* (1989), 44: 265-311
 129. Paz P, Brouwenstijn N, Perry R, Shastri N: Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC-I-dependent peptide trimming in the ER. *Immunity* (1999), 11: 241-251
 130. Petersdorf E, Anasetti C, Martin PJ, Woolfrey A, Smith A, Mickelson E, Malkki M, Lin MT, Hansen JA: Genomics of unrelated-donor hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol* (2001), 13: 582-589
 131. Petrányi GG: The complexity of immune and alloimmune response. *Transpl Immunol* (2002), 10: 91-100
 132. Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG: CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest* (2000), 106: 1003-1010
 133. Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favortg MC: Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* (2005), 19: 1597-604
 134. Reiffers J, Bernard P, David B, Vezon G, Sarrat A, Marit G, Moulinier J, Broustet A: Successful autologous transplantation with peripheral blood hematopoietic cells in a patient with acute leukemia. *Exp Hematol* (1986), 14: 312-315
 135. Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D et al: Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A, B, D, DR incompatible parenteral marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Blood* (1983), 61: 341-348
 136. Rencher SD, Slobod KS, Smith FS, and Hurwitz JL: Activity of transplanted CD8+ versus CD4+ cytotoxic T cells against Epstein-Barr virus immortalized B cells tumors in SCID mice. *Transplantation* (1994), 58: 629ff
 137. Rencher SD, Houston JA, Lockey TD, and Hurwitz JL: Eliminating graft-versus-host potential from T cell immunotherapeutic populations. *Bone Marrow Transplant* (1996), 18: 415ff
 138. Rettinger E: Generierung, Identifizierung und Charakterisierung nicht alloreaktiver T-Lymphozyten zur adoptiven Immuntherapie im Rahmen

- allogener Stammzelltransplantationen. Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, (2003)
139. Riddel SR, Murata M, Bryant S, and Warren EH: T-Cell Therapy of Leukemia. *Cancer Control* (2002), 9: 114-122
 140. Ringden O, Hermans J, Labopin M, Apperley J, Gorin NC, Gratwohl A: The highest relapse-free survival after allogeneic bone marrow transplantation is seen in patients with grade I acute graft-versus-host disease. Acute and Chronic Leukemia Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leuk Lymphoma* (1996), 24: 71-79
 141. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* (1994), 180: 83-93
 142. Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A: Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* (1958), 181: 1735
 143. Saba N, Abraham R, Keating A: Overview of autologous stem cell transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol.* (2000), 36: 27-48
 144. Sakaguchi S, Sakaguchi M, Asano M, Itoh M, and Toda, M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* (1995), 155: 1151-1164
 145. Sakaguchi S: Policing the regulators. *Nat Immunol* (2001), 2: 283-284
 146. Sakaguchi S: Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* (2004), 22: 531-562
 147. Sakaguchi S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* (2005), 6: 345-352
 148. Salom R, Brookes P, Hornick P, and Lechler R: High frequency of alloreactive T cells is a consequence of the presentation of many peptides by allogeneic MHC molecules. *Transplant.Proc.* (1995),27: 3579ff
 149. Sallusto F, Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* (1994), 179: 1109-1118
 150. Salom R, Brookes P, Hornick P, and Lechler R: High frequency of alloreactive T cells is a consequence of the presentation of many peptides by allogeneic MHC molecules. *Transplant.Proc.* (1995),27: 3579ff
 151. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC: Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* (1991), 219: 277-319.
 152. Sayegh MH, Perico N, Gallon L, Imberti O, Hancock WW, Remuzzi G, Carpenter CB: Mechanisms of acquired thymic unresponsiveness to renal allografts. Thymic recognition of immunodominant allo-MHC peptides induces peripheral T cell anergy. *Transplantation* (1994), 58: 125-132
 153. Schaefer UW, Beelen DW, Neuser J: Erste Klinische Versuche. In: *Knochenmarktransplantation*. S.Karger GmbH;Germering; (1989).

154. Schumm M, Lang P, Taylor G, Kuci S, Klingebiel T, Bühring HJ, Geiselhart A, Niethammer D, and Handgretinger R: Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *J Hematother* (1999), 8: 209-218
155. Scott D, Addey C, Ellis P, James E, Mitchell MJ, Saut N, Jurcevic S, Simpson E: Dendritic cells permit identification of genes encoding MHC class II-restricted epitopes of transplantation antigens. *Immunity* (2000), 12: 711-720
156. Seeger RC, Reynolds CP, Gallego R, Stram DO, Gerbing RB, Matthay KK: Quantitative tumor cell content of bone marrow and blood as a predictor of outcome in stage IV neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol.* (2000), 18: 4067-4076
157. Sherman LA, Chattopadhyay S: The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* (1993), 11: 385-402
158. Shevach EM: CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* (2002), 2: 389-400
159. Shoskes DA, Wood KJ: Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* (1994), 15: 32-38
160. Simpson E, Scott A, James E, Lombardi G, Cwynarski K, Dazzi F, Millrain M, Dyson PJ: Minor H antigens: genes and peptides. *Transpl Immunol* (2002), 10: 115-123
161. Snyder HL, Yewdell JW, Bennink JR: Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment. *J Exp Med* (1994), 180: 2389-2394
162. Soiffer RJ, Fairclough D, Robertson M, Alyea E, Anderson K, Freedman A, Bartlett-Pandite L, Fisher D, Schlossman RL, Stone R, Murray C, Freeman A, Marcus K, Mauch P, Nadler N, and Ritz J: CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission. *Blood* (1997), 89: 3039ff
163. Soiffer RJ, Weller E, Alyea EP, Mauch P, Webb IL, Fisher DC, Freedman RM, Schlossman RL, Gribben J, Lee S, Anderson KC, Marcus K, Stone RM, Antin JH, and J Ritz: CD6+ donor marrow T-cell depletion as the sole form of graft-versus-host disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic bone marrow transplant from unrelated donors. *J Clin Oncol* (2001), 19: 1152ff
164. Spies T, DeMars R: Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* (1991), 351: 323-324
165. Stefanovic S, Schild H: Quantitative aspects of T cell activation: peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Sem Immunol* (1999), 11: 375-384
166. Stefanovic S: Structural basis of immunogenicity. *Transpl Immunol.* (2002), 10: 133-136
167. Steinman RM: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* (1991), 9: 271-296
168. Stram DO, Matthay KK, O'Leary M, Reynolds CP, Haase GM, Atkinson JB, Brodeur GM, Seeger RC: Consolidation chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation versus continued chemotherapy

- for metastatic neuroblastoma: a report of two concurrent Children's Cancer Group studies. *J Clin Oncol.* (1996), 14: 2417-2426
169. Street, NE and Mosmann, TR: Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* (1991), 5: 171ff
170. Sullivan KM: Graft versus host disease. In: Thomas ED, Blume KB, Forman SJ (Hrsg.): *Hematopoietic Cell Transplantation*; 2. Aufl. Blackwell Scientific Publications; Oxford, UK; (1991) 515-536
171. Takagi S, McFadden ML; Humphreys RE, Woda BA, and Sairenji T: Detection of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrDUrd) incorporation with monoclonal anti-BrDU antibody after deoxyribonuclease treatment. *Cytometry* (1993), 14: 640
172. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, et al.: In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* (2004), 199: 1455-1465
173. Theobald M, Nierle T, Bunjes D, Arnold R, Heimpel H: Host-specific interleukin-2 secreting donor T cell precursors as predictors of acute- graft-versus- host disease in bone marrow transplantation between HLA identical siblings. *N Engl J Med* (1992), 327: 1613-1617
174. Thomas ED, Blume KG: Historical markers in the development of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl* (1999), 5: 341-346
175. Tiberghien P, Reynolds CW, Keller J, Spence S, Deschaseaux, M, Certoux JM, Contassot E, Murphy WJ, Lyons R, Chiang Y, Hervé P, Longo DI and Ruscetti FW: Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo T-cell depletion after bone marrow transplantation?: *Blood* (1994), 84: 1333-1341
176. Toes REM, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NPN, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Müller J, Schönfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H: Discrete Cleavage Motifs of Constitutive and Immunoproteasomes Revealed by Quantitative Analysis of Cleavage Products. *J Exp Med* (2001), 194: 1-12
177. Tough DF, Borrow P, and Sprent J: Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* (1996), 272: 1947ff
178. Trigg ME: Milestones in the development of pediatric hematopoietic stem cell transplantation- 50 years of progress. *Pediatr Transplantation* (2002), 6: 465-474
179. Truitt, RL and Atasoylu, AA: Contribution of CD4+ and CD8+ cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC-compatible marrow. *Bone Marrow Transplant* (1991), 8: 51-58
180. Valteau-Couanet D, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Fromont C, and Fischer A: Functional study of residual T lymphocytes after specific elimination of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor Bk chain immunotoxin. *Transplantation* (1993), 56: 1574
181. Van Bekkum DW, Vos O, and Weyzen WW: The pathogenesis of the secondary disease following foreign bone marrow transplantation in irradiated mice. *Bull Soc Int Chir.* (1959), 18: 302-312

182. Van Els CA, D'Amaro J, Pool J, Blokland E, Bakker A, Van Elsen PJ, Van Rood JJ, and Goulmy, E: Immunogenetics of human minor histocompatibility antigens: their polymorphism and immunodominance. *Immunogenetics* (1992), 35: 161ff
183. Van Gool SW, De Boer M, and Ceuppens JL: The combination of anti-B7 mononukleal antibody and cyclosporin A induces alloantigen-specific anergy during a primary mixed lymphocyte reaction. *J Exp Med* (1994), 179: 715ff
184. Volpi I, Perruccio K, Tosti A, Capanni M, Rugeri L, Posati S, Aversa F, Tabilio A, Romani I, Martelli MF, Velardi A: Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants. *Blood* (2001), 97: 2514-2521
185. Vos O, Davids JA, Weyzen WW, Van Bekkum DW: Evidence for the cellular hypothesis in radiation protection by bone marrow cells. *Acta Physiol Pharmacol Neerl.* (1956), 4: 482-486
186. Warrens A, Lombardi G, Lechler R: MHC and alloreactivity: presentation of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl Immunol* (1994), 2: 103-107
187. Waymouth, C, Varnum, D: Simple freezing procedure for storage in serum-free media of cultured and tumor cells of mouse. *TCA Manual* (1976), 2: 311-313
188. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R: Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med.* (1979), 300: 1068-1073
189. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED: Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: Contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* (1981), 304: 1529-1533
190. Womer KL: T cell recognition of allograft target antigens. *Curr Opin Organ Transplant* (2000), 5: 23-8
191. Xia G, Truitt RL, and Johnson BD: Graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactions after donor lymphocyte infusion are initiated by host-type antigen-presenting cells and regulated by regulatory T cells in early and long-term chimeras. *Biol Blood Marrow Transplant* (2006), 12: 397-407
192. Yang YG, Qi J, Wang MG et al: Donor-derived interferon γ separates graft-versus-leukemia effects and graft-versus-host-disease induced by donor CD8 T cells. *Blood* (2002), 99: 4207-4215
193. Zavazava N, Fandrich F, Zhu X, Freese A, Behrens D, Yoo-Ott KA: Oral feeding of an immunodominant MHC donor-derived synthetic class I peptide prolongs graft survival of heterotopic cardiac allografts in a high-responder rat strain combination. *J Leukoc Biol* (2000), 67: 793-800
194. Zhou LJ, Tedder TF: Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* (1995), 154, (8): 3821-3835

-
195. Zhou LJ, Tedder TF: Proliferation in monocyte-derived dendritic cell cultures is caused by progenitor cells capable of myeloid differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. (1996), 93: 2588-2592
 196. Zorn E: CD4+CD25+ regulatory T cells in human hematopoietic cell transplantation. Semin Cancer Biol (2006), 16: 150-159

10 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. med. D. Niethammer, langjähriger Direktor der Kinderklinik für Kinder- und Jugendmedizin, für die Möglichkeit, dieses Projekt an der Kinderklinik der Eberhard-Karls Universität Tübingen bearbeiten zu dürfen. Seinem Nachfolger, Prof. Dr. med. R. Handgretinger, jetziger Direktor der Kinderklinik Tübingen, für die Möglichkeit, diese Arbeit fertig stellen zu können.

Bei Herrn Dr. med. vet. M. Schumm, wissenschaftlicher Mitarbeiter und wissenschaftlicher Laborleiter des KMT-Labors, sowie bei Herrn PD Dr. med. P. Lang, Facharzt für Kinderheilkunde, wissenschaftlicher Mitarbeiter, medizinischer Leiter des KMT-Labors und Oberarzt der Abteilung pädiatrische Hämatologie und Onkologie bedanke ich mich sehr herzlich für die überaus engagierte und kompetente Betreuung dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich allen medizinisch technischen Assistentinnen und Assistenten, den wissenschaftlichen Angestellten des KMT- sowie des hämatologischen Labors der Kinderklinik Tübingen und allen Mitdoktoranden für ihre Unterstützung und Beratung in technischen Fragen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Hebarth, Abteilung für Innere Medizin, Hämatologie und Onkologie, für die Überlassung des eingesetzten Pilzantigens. Meinem Onkel, Prof. Dr. Dr. Martin Schader, gilt mein herzlicher Dank für die anregende Diskussion zum Thema.

Meiner Familie danke ich für die unendlich großzügige Unterstützung in jederlei Hinsicht.

J.B. und seiner Familie danke ich herzlich für die Inspiration zu dieser Arbeit.

Allen Probanden und vor allem den kleinen Patientinnen und Patienten gilt großer Dank für die zur Verfügung gestellten Blutproben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Bruder, Michael Schüle. Du bist immer da.

Dieses Projekt wurde durch das Förderprogramm der Universität Tübingen (fortune) unterstützt.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kristina Sabine Schüle
Geburtsdatum und –ort: 24. September 1974 in Stuttgart
Eltern: Sunhilde Schüle, geb. Spanihel
Hans Schüle

Schulbildung:

1981 – 1985: Grundschule Sommerrain, Stuttgart
1985 – 1994: Elly Heuss-Knapp Gymnasium, Stuttgart
23.06.1994: Allgemeine Hochschulreife

Studium der Humanmedizin:

04/1997-09/1999: Vorklinik, Justus Liebig Universität
Giessen
10.09.1999: Physikum
10/1999-05/2004: Erster, Zweiter und Dritter Abschnitt des
Klinischen Studiums, Eberhard-Karls-
Universität Tübingen
20.09.2000: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.04.2003: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr 05/03-04/04: King`s College London, England und
Klinikum Esslingen, Esslingen a.N.
30.04.2004: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Weiterbildung:

Seit 01.08.2004: Weiterbildungsassistentin, Klinik für
Allgemein- und Viszeralchirurgie, Klinikum
Esslingen, Esslingen a.N.