

Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Generierung nicht-alloreaktiver T-Zellen durch  
Methotrexat, AICD (activation induced cell death) und  
immunomagnetische Depletion zur Immuntherapie  
nach Stammzelltransplantation**

**Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Stefanie Seitz  
aus Stuttgart**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen  
1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. D. Niethammer  
2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Kanz

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	7
1.1 Die Transplantation allogener hämatopoetischer Stammzellen	7
1.1.1 Die Knochenmarkstransplantation (KMT)	9
1.1.2 Die Gewinnung und der Einsatz hämatopoetischer peripherer Stammzellen	10
1.1.3 Relevanz von HLA-Merkmalen für die allogene Stammzelltransplantation	11
1.2 Die Problematik der Stammzelltransplantation und zukünftige therapeutische Interventionen	12
1.2.1 Phasen einer Transplantation	12
1.2.2 Opportunistische Infektionen als Folge der Immunsuppression nach einer Transplantation	13
1.2.3 Die Adoptive Immuntherapie und der Graft versus Leukämie Effekt (GVL)	15
1.2.4 Donor Lymphocyte Infusion (DLI)	17
1.2.5 Die Abstoßungsreaktion	17
1.2.6 Die Graft versus Host Erkrankung (GVHD)	18
1.2.6.1 Die Immunpathophysiologie der GVHD	18
1.2.6.2 Die akute GVHD	19
1.2.6.3 Die chronische GVHD	20
1.2.6.4 Präventive therapeutische Maßnahmen zur Vermeidung einer GVHD	21
1.3 Die Apoptose	24
1.3.1 Definition	24
1.3.2 Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose	24
1.3.3 Proteasen und DNS-Fragmentierung	25
1.4 CD95 und CD95-Ligand	26
1.4.1 CD95 (Fas/Apo-1)	26
1.4.2 CD95-Ligand	26
1.4.3 Signalweg und Funktion	27
1.4.4 Die Regulation der Apoptoseinduktion in T-Lymphozyten	29
1.5 Das Zytostatikum Methotrexat (MTX)	33
1.5.1 Die Funktion von Purin- und Pyrimidinnukleotide	33
1.5.2 Der klinische Einsatz von Methotrexat (MTX)	34
1.5.3 Wirkungsweise von Methotrexat (MTX)	34
1.5.4 Leukovorin (Formyltetrahydrofolsäure)	37
1.5.5 Apoptose-Induktion durch MTX	37
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	38
2 Material und Methoden	40
2.1 Allgemein benötigte technische Geräte, Materialien und Reagenzien	40
2.2 Materialien und Reagenzien für die Isolierung mononukleärer Zellen	41
2.3 Material und Reagenzien für die Zellkultur	42
2.4 Zellkulturmedien	42
2.5 Wachstumsfaktoren	42
2.5.1 Apoptose induzierende Reagenzien	43

2.6	Material für die selektive Zellseparation .....	43
2.6.1	Puffer und Lösungen.....	43
2.6.2	Geräte.....	44
2.7	Material und Reagenzien für die Durchflusszytometrie .....	44
2.7.1	Puffer und Lösungen.....	44
2.7.2	Geräte.....	44
2.7.3	Antikörper zur Expressionsanalyse von Zellpopulationen.....	45
2.7.4	.....	45
2.7.5	Antikörper und Reagenzien zur Analyse der Apoptose.....	45
2.8	Material und Reagenzien für den Zytotoxtest.....	46
2.9	Material und Reagenzien für den Thymidin(6-H3)-Proliferation-Assay 46	
2.10	Zellisolierung.....	47
2.10.1	Blutproben .....	47
2.10.2	Isolierung peripherer mononukleärer Zellen .....	48
2.11	Zellkultivierung.....	49
2.11.1	Zellzahlbestimmung.....	49
2.11.2	Kultursysteme für Responder und Stimulatorzellen .....	49
2.11.2.1	Kultivierung der Stimulator- und Responderzellen in serum- haltigem Medium .....	49
2.11.3	Lymphozytenmischkultur MLC (mixed lymphocyte culture) .....	50
2.12	Die Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe von Methotrexat und Anti-CD95 .....	50
2.12.1	Methotrexat Verdünnungsreihe.....	50
2.12.1.1	Hintergrund.....	50
2.12.1.2	Durchführung.....	51
2.12.2	Leucovorin (5-Formyltetrahydrofolat) Verdünnungsreihe.....	52
2.12.2.1	Hintergrund.....	52
2.12.2.2	Durchführung.....	52
2.12.3	Anti-CD95 monoklonaler Mausantikörper .....	53
2.12.3.1	Hintergrund.....	53
2.12.4	Entwicklung alternativer Depletionsverfahren unter Verwendung von Methotrexat und Anti-CD95 Antikörper.....	53
2.12.5	Restimulierung der Lymphozytenmischkultur.....	54
2.13	Die Depletion alloreaktiver T-Zellen mit Hilfe des MACS-Systems ....	55
2.13.1	Hintergrund .....	55
2.13.2	Durchführung der MACS-Depletion .....	56
2.14	Zellanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie .....	57
2.14.1	Hintergrund .....	57
2.14.2	Messung der Lichtstreuung.....	57
2.14.3	Messung der Fluoreszenz.....	58
2.14.4	Durchführung .....	59
2.14.5	Auswertung.....	60
2.15	Der (6-H3)-Thymidin-Proliferations-Assay .....	61
2.15.1	Hintergrund .....	61
2.15.2	Durchführung .....	61
2.16	Der Zytotoxizitätstest.....	62
2.16.1	Hintergrund .....	62

2.16.2	Durchführung .....	63
2.16.2.1	Markierung der Targetzellen .....	63
2.16.2.2	Die Gewinnung der Effektorzellen und Herstellung einer Verdünnungsreihe .....	63
2.16.2.3	Der Testansatz .....	64
2.17	Statistische Analyse .....	66
3	Ergebnisse .....	67
3.1	Antigenexpression alloreaktiver T-Zellen, unter Zusatz von MTX und Anti-CD95 .....	67
3.2	Apoptosenachweis in aktivierten T-Zellen unter dem Einfluß von MTX und Anti-CD95 .....	73
3.3	Darstellung der gegensätzlichen Wirkungen von Methotrexat und Leucovorin (5-Formyltetrahydrofolat), anhand einer Titrationsreihe .....	78
3.4	Selektive Depletion alloreaktiver T- Lymphozyten mit Hilfe drei unterschiedlicher Depletionsverfahren.....	80
3.4.1	Das Kultursystem der MLC als Methode der allogenen Stimulation von T-Lymphozyten.....	80
3.4.2	Etablierung des experimentellen Versuchsaufbaus: Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe des Antimetaboliten Methotrexat (MTX) .....	80
3.4.3	Etablierung einer Depletionsmethode, unter zu Hilfenahme des Anti-CD95 Antikörper .....	81
3.4.4	Die selektive immunomagnetische Depletion von alloreaktiven T-Lymphozyten.....	81
3.4.5	Untersuchung der Effektivität der immunomagnetischen Depletionsmethode, anhand der phänotypischen Zellanalyse .....	82
3.4.6	Beurteilung der Effizienz der drei unterschiedlichen Depletionsverfahren mit Hilfe des (6-H3)- Thymidin– Proliferations- Assay .....	84
3.4.7	Untersuchung der Effektivität der Depletionsverfahren, unter zu Hilfenahme des Zytotoxizitätstests.....	96
4	Diskussion.....	105
4.1	Antigenexpression alloreaktiver T-Zellen unter dem Zusatz von MTX und Anti-CD95 .....	105
4.2	Apoptosenachweis in aktivierten T-Lymphozyten unter dem Einfluss von MTX und Anti-CD95 .....	109
4.3	Darstellung der gegensätzlichen Wirkungen von Methotrexat und Leucovorin (5-Formyltetrahydrofolat) .....	115
4.4	Selektive Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe unterschiedlicher Depletionsmethoden .....	117
4.4.1	Die MLC (mixed lymphocyte culture) .....	117
4.4.2	Proliferation als Indikator der T-Zellaktivität .....	119
4.4.3	Etablierung des experimentellen Versuchsaufbaus: Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe des Folsäureantagonisten Methotrexat (MTX) .....	119
4.4.4	Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten unter Anwendung des agonistischen CD95-IgM Antikörpers .....	124

4.4.5	Die selektive immunomagnetische Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten.....	126
4.4.6	Beurteilung der Effizienz der drei verschiedenen Depletionsverfahren .....	128
4.5	Untersuchung der Effektivität der Depletionsverfahren mit Hilfe des Zytotoxizitätstests .....	129
5	Zusammenfassung.....	137
6	Verzeichnis der Abkürzungen .....	141
7	Literaturverzeichnis .....	146
8	Lebenslauf.....	163
9	Danksagung .....	164

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Transplantation allogener hämatopoetischer Stammzellen

Die hämatopoetische zelluläre Rekonstitution mit Knochenmark-(KM) oder peripheren Blutstammzellen (PBSZ), ist eine klinisch etablierte Behandlungsmethode für zahlreiche hämatologische, onkologische und immunologische Erkrankungen. Ziel dieser Therapie ist es, kranke, fehlende, oder maligne Zellen des Patienten durch normale hämatopoetische und immunkompetente Zellen zu ersetzen. Im Knochenmark enthalten, sich selbst replizierende Stammzellen sind in der Lage, Erythrozyten, Granulozyten, Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems, Megakaryozyten und immunkompetente T- und B-Lymphozyten zu generieren. Hämatopoetische Stammzellen können für klinische Zwecke aus drei Quellen gewonnen werden: Direkt aus dem Knochenmark des Spenders, aus dem peripheren Blut oder aus Nabelschnurblut. Unter einer allogenen Transplantation versteht man in diesem Zusammenhang die Transfusion von Zellen immunogenetisch fremder Spender, zu denen u.a. HLA-identische Geschwister, HLA-haploidentische Familienangehörige oder nicht verwandte HLA-identische Fremdspender gehören, die in so genannten Spenderkarteien verzeichnet sind.

Eine Stammzelltransplantation findet ihre Anwendung bei Erkrankungen, denen eine Beeinträchtigung der Blutbildung durch eine Störung der hämatopoetischen Stammzelle zugrunde liegt. Des Weiteren besteht die Indikation einer Transplantation bei Schädigung der Stammzellen im Rahmen einer zytostatischen Chemotherapie oder Bestrahlung. Die häufigste Anwendung der allogenen Stammzelltransplantation findet sich bei der akuten myeloischen Leukämie (104) und der lymphatischen Leukämie (77) mit hohem Rezidivrisiko im ersten Remissionsstadium sowie bei allen akuten Leukämien im zweiten und höheren Stadium der Remission, weiterhin bei der chronisch myeloischen Leukämie (26), der aplastischen Anämie (125) und den myelodysplastischen Syndromen. Weitere Indikationen bestehen für Patienten, die an schweren Formen der Immundefizienzsyndrome leiden, z.B. Wiskott-Aldrich-Syndrom. Auch für Patienten die an Hämoglobinopathien, insbesondere der Major-Form

## Einleitung

der  $\beta$ -Thalassämie (94) erkrankt sind, stellt sich die allogene Stammzelltransplantation als alternative Therapieform dar.

Im Rahmen der überwiegend durchgeführten, herkömmlichen Knochenmarkstransplantation treten häufig eine Reihe von Komplikationen auf. So wiesen Patienten nach erfolgter Transplantation eine erhöhte Morbiditäts- und Mortalitätsrate auf, die ursächlich mit der Transplantation in Zusammenhang gebracht werden konnte (46, 58, 86). Dieser Problematik lag folgende Ursache zu Grunde: die transfundierten, hämatopoetischen Zellsuspensionen enthielten noch eine geringe Anzahl an immunkompetenten T-Zellen, die in der Lage waren, eine Immunreaktion gegen das fremde Gewebe des Empfängers zu generieren (50, 60). Diese Immunreaktion wird als Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD) bezeichnet und kann eine lebensbedrohliche Gefahr für den Patienten darstellen (121). Allerdings trug diese Immunreaktion auch zur Verbesserung der Prognose der Grunderkrankung bei. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang der Graft-versus-Leukaemia-Effekt (GVL) bzw. Graft-versus-Tumor-Effekt (66). Um das Auftreten einer Graft-versus-Host-Erkrankung zu minimieren, wurde versucht, die Anzahl der immunkompetenten T-Lymphozyten des Transplantats zu reduzieren. Dazu wurden verschiedene Methoden der T-Zell-Depletion eingesetzt, unter anderem die Komplementlyse nach Inkubation des Knochenmarkes mit Anti-Thymozytenglobulin oder monoklonalen Antikörpern (Campath, OKT3), die Rosettierung mit Schafserythrozyten, die einen CD2-spezifischen Rezeptor tragen, die Selektion mit verschiedenen Lektinen (z.B. Sojabohnen) oder die Trennung mit Magnetpartikeln. Besonders die frühen Verfahren hatten jedoch den Nachteil eines großen Zellverlustes bei gleichzeitig nur mäßigem Depletionserfolg. Dies führte in der Summe dazu, dass die Abwesenheit der Lymphozyten, zu erhöhten Rezidivraten, Fehlfunktionen oder Abstoßungsreaktionen des Transplantats sowie zu einer verlängerten Phase der Immundefizienz der Patienten führte, wodurch Pilzinfektionen, virale Infektionen sowie EBV-induzierte lymphoproliferative Erkrankungen hervorgerufen wurden (9, 53, 54, 98, 140). Diesen Erkenntnissen zufolge führen Spender T-Lymphozyten nicht nur zu der gefürchteten Transplantat-Wirt-Reaktion, sondern tragen ebenfalls



## Einleitung

zu einer verbesserten Ansiedelung und Funktionsfähigkeit des Transplantats bei. Zusätzlich verfügen sie über ein „antiinfektiöses und antileukämisches“ Potenzial, das die Prognose der Grunderkrankung entscheidend begünstigen kann. Ursprünglich war die Transplantation in der Regel auf HLA-identische Spender beschränkt, Knochenmark vom haploidentischen Spender führte in der Regel zur Transplantatabstoßung oder zu schwerer GvHD. Zu Beginn der 90er Jahre konnte durch die Verfügbarkeit von G-CSF zum ersten Mal eine um den Faktor 10 größere Menge an Stammzellen aus dem peripheren Blut gewonnen und eingesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Anhebung der Zahl an transplantierten Zellen die Abstoßungsrate erheblich gesenkt werden konnte, wobei durch eine sehr effektive T-Zelldepletion auch die GvHD vermieden werden konnte (11). Eine Weiterentwicklung dieses so genannten Megadosiskonzeptes konnte durch die ausschließliche Verwendung von peripheren Stammzellen nach immunomagnetischer Anreicherung mit dem CLiniMACS-System erreicht werden. Hier wurde, besonders für Kinder, die Möglichkeit erhalten, auch haplo-identische Spender einzusetzen. Trotzdem ist, besonders beim erwachsenen Patienten, die Gefahr von Infektionen wegen der deutlich verlängerten Erholungszeit der T-Zellen so groß, dass sich das Megadosiskonzept noch nicht in größerem Ausmaß durchgesetzt hat (11, 56, 57, 87).

Um die Effizienz und den therapeutischen Erfolg der allogenen Stammzelltransplantation auszuweiten, müssten Verfahren Anwendung finden, die in der Lage sind, die gefährliche GVHD zu unterbinden und die gleichzeitig dazu beitragen, drohende leukämische Rezidive und Transplantatabstoßungen sowie Pilzinfektionen und virale Infektionen abzuwenden.

### **1.1.1 Die Knochenmarktransplantation (KMT)**

Historisch gesehen steht die Transplantation von Knochenmarkstammzellen zahlenmäßig an erster Stelle. 1968 wurde die erste Indikation für eine Knochenmarktransplantation im Rahmen einer angeborenen kombinierten Störung der zellulären und humoralen Immunität gestellt. Ab 1971 gelang es in Seattle ein Therapieprogramm zu etablieren, das die Transplantation von

## Einleitung

Knochenmarkstammzellen zur Therapie von aplastischen Anämien vorsah. In den folgenden Jahren wurde diese Therapieform zur Behandlung von Dysfunktionen des hämatopoetischen Systems, wie z.B. der Thalassämia major (94) der aplastischen Anämie, (125) sowie der Sichelzellanämie (71) eingesetzt. Zu einem noch späteren Zeitpunkt fand die Knochenmarktransplantation auch Einzug in die Therapie der malignen Erkrankungen. Allerdings wurde sie nur bei Patienten durchgeführt, die bereits das Endstadium ihrer Erkrankung erreicht hatten, wodurch sich nur ein mäßiger Erfolg erzielen ließ. Diese Erfahrungen führten zur Überlegung, die Knochenmarktransplantation bereits bei Patienten einzuführen, die sich in einem frühen Erkrankungsstadium befanden. Im Rahmen dieser Erkenntnisse wurde Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts erstmals eine leukämische Erkrankung, die zusätzlich erste Hinweise auf ein leukämisches Rezidiv aufwies, mit einer Knochenmarktransplantation therapiert. Daraus resultierte eine statistisch nachweisbare, entscheidende Verbesserung der Langzeitüberlebensrate (130).

### **1.1.2 Die Gewinnung und der Einsatz hämatopoetischer peripherer Stammzellen**

Die Anwesenheit von hämatopoetischen Stammzellen im peripheren Blut war seit längerer Zeit bekannt. Die ersten Beobachtungen wurden diesbezüglich beim Menschen gemacht, als sich diese Zellen vermehrt nach chemotherapeutischer Behandlung im Blut nachweisen ließen (72). Durch die Möglichkeit, mit Hilfe hämatopoetischer Wachstumsfaktoren wie z.B. GM-CSF und G-CSF diese Stammzellen in hohen Konzentrationen aus dem Knochenmark in den Kreislauf zu mobilisieren, konnten mittels neuer Techniken ausreichend periphere Blutstammzellen (PBSZ) für klinische Zwecke gesammelt werden. Die zunächst im autologen System gewonnenen Erfahrungen werden seit 1995 auch bei allogenen Transplantationen genutzt. Im Vergleich mit Knochenmark ist die durchschnittlich gesammelte Zahl an CD34<sup>+</sup>-Zellen 10-20fach höher. Damit verbunden ist auch eine höhere Zahl an T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen im Apherisat. Mit Hilfe der immunomagnetischen Separation können Stammzellpopulationen, die positiv für die

## Einleitung

Marker CD34<sup>+</sup> und negativ für linienspezifische Marker reifer Zellpopulationen sind, hochselektiv angereichert werden. Die Entfernung reifer, immunkompetenter T-Zellen führt zu einer fast vollständigen Reduktion der GVHD-Inzidenz, so dass es möglich ist, auf eine pharmakologische Immunsuppression post transplantationem zu verzichten, während die B-Zell-Depletion entscheidend zur Verringerung EBV-assoziiierter Lymphome im ersten Jahr nach Transplantation beiträgt. Dieses Verfahren findet zur Zeit eine zunehmende Anwendung bei haploidentischer Stammzelltransplantation für Patienten, die über keinen konventionellen Spender verfügen.

### **1.1.3 Relevanz von HLA-Merkmalen für die allogene Stammzelltransplantation**

Anhand von Tierexperimenten bei Transplantationsuntersuchungen wurde festgestellt, dass bei genetisch nicht identischen Tieren Transplantate abgestoßen wurden, wofür die Haupthistokompatibilitätsantigene (MHC-Antigene) verantwortlich gemacht werden konnten. In den 50er Jahren gelang es, auch beim Menschen die entsprechenden Strukturen zu entdecken. Fortschritte bei der Aufklärung der Struktur des Haupthistokompatibilitätskomplexes waren eng mit der Entwicklung der klinischen Knochenmarkstransplantation verbunden. Diese Region wird beim Menschen als HLA-System bezeichnet. Das HLA-System zeichnet sich durch einen extremen Polymorphismus aus, d.h. es kodiert für genetische Merkmale, die in mehr als einer phänotypischen Ausprägung vorkommen und nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden. Dies ist mit der Funktion des MHC-Systems einer möglichst umfassenden Antigen-Präsentation verbunden. Es wird beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert. Zu unterscheiden sind die Klasse-I-Antigene, sie bilden einen Komplex von drei miteinander benachbarten Genorten: HLA-A, HLA-B und HLA-C. Während diese Antigene serologisch definiert wurden, bezeichnete man die Klasse-II-MHC-Moleküle auch als HLA-D-Antigene, die ihre Beschreibung zellulär im Rahmen der gemischten Lymphozytenkultur erhielten. Letztere bilden einen Komplex, zu dem HLA-DR, HLA-DQ- und HLA-DP-Antigene gehören. Wird ein allogenes Transplantat eines Geschwisterspenders oder Fremdspenders

## Einleitung

eingesetzt, sollte dabei ein Spender gewählt werden, dessen HLA-Merkmale HLA-A, HLA-B und HLA-DR (mit jeweils 2 Allelen) mit denen des Empfängers übereinstimmen. Spender und Empfänger sind dann im Hinblick auf vorgenannte Loci HLA-identisch. Dies ist, wie bereits erwähnt, von großer Bedeutung, um das Risiko einer Transplantat-gegen-Empfänger-Erkrankung möglichst gering zu halten. Beim Fehlen eines HLA-identischen Spenders, kann in bestimmten Situationen auf ein Elternteil als Stammzellspender zurückgegriffen werden. Das HLA-Muster eines Elternspenders stimmt lediglich zur Hälfte mit dem des Kindes überein, der Elternspender ist „haploidentisch“. Unterschiede in den Hauptloci erfordern wegen der drohenden immunologischen oder alloreaktiven Antwort vor und nach der Transplantation eine starke Immunsuppression, um eine Abstoßung, bzw. eine massive GVHD zu vermeiden. Die erwähnten Komplikationen können auch bei Verwendung eines HLA-identischen Geschwistermarkers auftreten. Die Ursachen dafür liegen v.a. in nicht diagnostizierbaren HLA-A, B- und DR-Differenzen, in Inkompatibilitäten von HLA-C, DQ-, DP- oder in Unterschieden von Minortransplantationsantigenen. Eine weitere, neue Möglichkeit dieser Problematik beizukommen, besteht in der Transplantation der bereits erwähnten hochaufgereinigten, hochangereicherten CD34<sup>+</sup> Stammzellfraktion.

### **1.2 Die Problematik der Stammzelltransplantation und zukünftige therapeutische Interventionen**

#### **1.2.1 Phasen einer Transplantation**

Der zeitliche Verlauf einer Transplantation gliedert sich in drei Phasen:

1. Konditionierung, 2. Transplantation, 3. Rekonstitution. Die Phase der Konditionierungsbehandlung dauert in der Regel 4-6 Tage und umfaßt die sequentielle Gabe verschiedener Chemotherapeutika mit oder ohne fraktionierte Ganzkörperbestrahlung. Ziele dieser intensiven Behandlung sind zum einen die Zerstörung residualer Tumor/Leukämiezellen, zum anderen die Ausschaltung der körpereigenen Immunabwehr des Empfängers, so dass neues Knochenmark nicht mehr abgestoßen werden kann. Die Chemotherapeutika beinhalten vornehmlich Substanzen der Gruppe der

## Einleitung

Alkylanzien. Der Einsatz einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung im Kindesalter wird wegen seiner negativen Auswirkungen auf Fertilität, Wachstum und der späteren Induktion von Zweittumoren nur bei Hochrisikopatienten eingesetzt.

Die Transplantation selbst beinhaltet die intravenöse Infusion entweder des gesamten Knochenmarks oder der aufgereinigten Stammzellfraktion über einen zentralvenösen Katheter. Die infundierten Spenderzellen finden über eine Kaskade bestimmter Adhäsions- und Homing-Rezeptoren den Weg in den nun „leeren“ Knochenmarksraum, siedeln sich im Stroma des Knochenmarksraums an und beginnen sich vermittelt durch Signale des lokalen Stroma, zu teilen und zu differenzieren.

Gefolgt werden die beiden vorangegangenen Zeitabschnitte durch die Phase der Rekonstitution. In dieser Phase teilen sich die infundierten Stammzellen in Tochterzellen und in Progenitorzellen, die sich sowohl in die verschiedenen blutbildenden Linien aufteilen als auch zu antigenpräsentierenden Zellen differenzieren. Insgesamt ist ein Zeitraum von ca.12-14 Tagen (autologe STZ) bzw.14-21 Tage (allogene STZ) nötig, bis eine Leukozytenzahl  $>1000/\mu\text{l}$  bzw. eine Granulozytenzahl  $>500/\mu\text{l}$  im peripheren Blut erreicht wird. Während dieser Phase kommen im Gefolge einer ausgeprägten Aplasie toxische Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie zeitverzögert zur Ausprägung. Diese können beinhalten: Mukositis, Entzündung der Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes mit begleitenden Diarrhöen, Verlust der Immunabwehr, bedingt durch die Neutropenie und der Zerstörung der intakten Haut-Schleimhaut-Barriere (bakterielle Sepsis, virale Infektionen, invasive Pilzinfektionen) und toxische Beeinträchtigung der Funktion weiterer Organe, z.B. Herz, Leber. Während dieser Phase ist eine intensiv-medizinische Betreuung in keimarmen, speziell belüfteten Einzelzimmern mit Schleuse erforderlich.

### **1.2.2 Opportunistische Infektionen als Folge der Immunsuppression nach einer Transplantation**

Patienten nach einer Stammzelltransplantation sind durch schwere Myelosuppression und lang anhaltende Immunsuppression charakterisiert, die ggf.

## Einleitung

durch eine chronische GVHD verstärkt werden kann. Die Transplantationsperiode kann in allogenen Stammzellempfängern im Hinblick auf Infektionen in 2 Abschnitte unterteilt werden. Während der Phase der Aplasie (Phase 1) finden sich gehäuft bakterielle Infektionen, ausgelöst durch Neutropenie und Zerstörung wichtiger Haut- und Schleimhautbarrieren. Es überwiegen Infektionen mit gramnegativen und -positiven Bakterien sowie Pilzen. Nach erfolgtem Anwachsen des neuen Knochenmarks beginnt infektiologisch die Phase 2 (Phase der Immunrekonstitution). Bis zum Ende des ersten Jahres sind T- und B-Zellen noch deutlich erniedrigt, was wesentlich zu einer erhöhten Infektionsrate beiträgt. In dieser Phase finden sich gehäuft virale Infektionen. Als Erreger kommen dabei vor allem HSV-, VZV-, und CMV-, HHV6- und Adenoviren in Betracht. Typische Spätinfektionen, die Monate bis Jahre nach der Transplantation auftreten können, werden durch Varicella-Zoster-Virus hervorgerufen oder sind gefährliche Infektionen mit grampositiven Bakterien (v.a. Pneumokokken wie bei Aspleniepatienten).

Die komplette Eradikation der T- und B-Zellimmunität, durch die Konditionierungstherapie, erfordert eine Wiederholung der lymphoiden Ontogenese aus den transplantierten hämatopoetischen Stammzellen, die sich in Abhängigkeit von ihrer allogenen Umgebung differenzieren und teilen. Diese Entwicklung wird nicht nur allein durch die Major- und Minor-Antigene des Empfängers hervorgerufen, sondern ist auch abhängig von der Menge an noch vorhandenem Thymusgewebe, das für die Zellreifung notwendig ist. Daraus resultiert eine schwere Immundefizienz für mehrere Monate, die volle Immunrekonstitution benötigt 1-2 Jahre. Daneben spielt die immunsuppressive Therapie, die in erster Linie zur Reduktion des GVHD-Risikos eingesetzt wird, sowie die GVHD selbst, die durch immunkompetente T-Lymphozyten ausgelöst wird, als Ursache einer verzögerten Lymphozytenrekonstitution eine Rolle. In diesem Zusammenhang sollte bereits erwähnt werden, dass der Mechanismus der CD95-vermittelte Apoptose (activation induced cell death), der während der GVHD stattfindet, mitverantwortlich ist für eine verlängerte Immundefizienz (19, 92, 33). Beide Formen der GVHD, die akute (106) und insbesondere die chronische Form der GVHD (95, 106, 111), tragen zu einer verspäteten

## Einleitung

Normalisierung der Immundefizienz bei, da sie mit einem starken CD4<sup>+</sup>-Defekt bei CD8<sup>+</sup>-Dominanz verbunden ist. Des Weiteren wurde auch auf die Schädigung der Thymusepithelzellen des Empfängers hingewiesen, die sowohl durch die Konditionierungstherapie als auch durch die GVHD selbst geschädigt werden, woraus ebenfalls eine Dysfunktion der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten resultiert (123).

Wie bereits zuvor erwähnt, treten in der Phase der Neutropenie, häufig bakterielle Infektionen bis hin zur Sepsis auf. Hingegen sind T-Zelldysfunktionen, ebenso wie erst allmählich rückkehrende immunologische Funktionen, für virale Infektionen und Pilzinfektionen verantwortlich. Die Ursache hierfür liegt unter anderem in einer bestimmten zeitlichen Abfolge der Neuformung des Immunsystems nach Transplantation. Dabei rekonstituieren NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) als erste immunologische Effektorzellen. Es folgt ein allmähliches Ansteigen des T- und B-Zell-Pools, wobei ein inverses CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis (CD4<sup>+</sup>Lymphozyten, Helfer-T-Zell-Subpopulation, CD8<sup>+</sup>Lymphozyten, zytotoxische-T-Zell-Subpopulation, T-Suppressorzellen), vorliegt und eine reduzierte T-Zellfunktion beobachtet wird (30, 44, 122,). Die Entwicklung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen dauert 6-9 Monate, die der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur 4-6 Monate.

### **1.2.3 Die Adoptive Immuntherapie und der Graft versus Leukämie Effekt (GVL)**

Mathe und Mitarbeiter verwiesen bereits 1965, in einem Bericht über die allogene Knochenmarktransplantation auf den Begriff der „adoptiven Immuntherapie“. In diesem Zusammenhang wurde der therapeutische Nutzen der transplantierten immunkompetenten Zellen eingehender erläutert (100). Mathe und Mitarbeiter legten nahe, dass es sinnvoll sei, die anfängliche Graft-versus-Host-Reaktion zur Tumorerstörung auszunutzen, um erst anschließend die gefährliche Graft-versus-Host-Erkrankung mit Hilfe von immunsuppressiven Medikamenten zu therapieren. Kolb und Mitarbeiter berichteten ebenfalls davon, dass eine adoptive Immuntherapie die Prognose der Erkrankung bei Patienten mit CML günstig beeinflusst, insbesondere wenn es bereits erste Hinweise auf ein Rezidiv der Grunderkrankung gab (81, 82). Die Effizienz

## Einleitung

dieser Therapieform wurde in weiteren Studien anhand einer dauerhaften, molekularbiologisch nachweisbare Remission bei den Patienten verdeutlicht (33, 96). Die „adoptive Immuntherapie“ basiert auf der Annahme, dass bestimmte T-Zellsubpopulationen fähig sind, in einem Patienten, leukämische Tumorzellen von normalen Zellen des hämatopoetischen Systems zu unterscheiden (29, 95). Die entarteten Zellen des hämatopoetischen Systems sind in der Lage, unterschiedliche Antigene zu präsentieren. Neben den Antigenen, die in allen gesunden Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert werden, finden sich auf der Oberfläche leukämischer Blasten Tumorspezifische Antigene und Neoantigene, die unter anderem durch chromosomale Translokation im Rahmen der Tumorgenese entstanden sind. Diese Erkenntnisse führten zur Auffassung, dass die Graft-versus-Leukämie-Reaktion mit der Entwicklung einer akuten GVHD, nach Transplantation allogener Stammzellen, und anschließender Infusion von Spenderlymphozyten in Verbindung steht (66, 81). Die pathophysiologische Grundlage dieses Phänomens beruht vorwiegend auf der Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten, die in der Lage sind, Tumorzellen aufgrund der aberranten Expression von tumorspezifischen Antigenen zu erkennen und in diesen ein internes Zerstörungsprogramm auszulösen (59). So sind CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der Lage, den Fas-Liganden zu exprimieren, den sie auf ihrer Oberfläche präsentieren, die Interaktion zwischen diesen Fas-Liganden und den Fas-Rezeptoren auf den leukämischen Zielzellen setzt in diesen eine Signalkaskade in Gang, die am Ende zur Apoptose führt (59). Des Weiteren vermögen zytotoxische T-Zellen in den leukämischen Zellen eine Porenbildung in deren Zellmembran mittels zuvor freigesetzter Perforine auszulösen, wodurch diese mit einem Zusammenbruch des Ionengleichgewichts (Ca<sup>2+</sup>Na<sup>+</sup>-Efflux) reagieren. Lysosomale Proteasen, so genannte Granzyme, sind dann in der Lage, in die Zielzelle einzudringen und zu einer Zerstörung der Zielzelle beizutragen (67). Zusätzlich kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem freigesetzten Tumor-Nekrose-Faktor-  $\alpha$ -  $\beta$ , und entsprechenden Rezeptoren auf der leukämischen Zelle, wodurch ebenfalls die Induktion der Apoptose der Tumorzelle hervorgerufen wird.



### **1.2.4 Donor Lymphocyte Infusion (DLI)**

Von einigen Wissenschaftlern wird heutzutage die Transfusion spezifischer T-Lymphozyten des Spenders in den Empfänger im Sinne einer Immuntherapie befürwortet (62, 110). Diese Therapieform beinhaltet die Generierung virusspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten und scheint im Vergleich zur Verwendung unspezifischer T-Lymphozyten, im Hinblick auf virale Infektionen, wesentlich wirksamer zu sein. Allerdings ist die Infusion spezifischer allogener Spenderlymphozyten auch mit dem Risiko der Entstehung einer Graft-versus-Host-Reaktion behaftet, die sich zu einer schweren Graft-versus-Host Erkrankung entwickeln kann. Unter diesem Gesichtspunkt wurde darüber diskutiert, ob eine Lymphozyteninfusion weiter angewandt werden sollte und welche präventiven Maßnahmen man ergreifen müsste, um einer sich entwickelnden GVHD entgegen zu wirken. In diesem Zusammenhang wurde empfohlen, ausschließlich virusspezifische T-Zellen zu verabreichen, die in vitro keine erkennbare Immunantwort gegen HLA-Antigene des Empfängers aufweisen (21).

### **1.2.5 Die Abstoßungsreaktion**

In seltenen Fällen kann das neue Knochenmark von wenigen überlebenden immunologischen Effektorzellen des Empfängers als fremd erkannt werden und abgestoßen werden, so dass entweder primär kein Anwachsen der neuen Stammzellen erfolgt oder nach vorübergehendem Anwachsen der neuen Zellen eine Abstoßung im zeitlichen Intervall eintritt. Verantwortlich für beide Prozesse sind sowohl alloreaktive T-Lymphozyten als auch NK-Zellen des Empfängers (18). Diese Komplikation ist relativ selten, (3-5 %). Häufiger wird sie bei polytransfunden HLA-sensibilisierten Patienten beobachtet. Damit es zu dieser Abstoßungsreaktion kommt, müssen die residualen Lymphozyten des Empfängers die myeloablative Behandlung im Vorfeld der Transplantation überlebt haben und in der Lage sein, die Antigenstrukturen der Spenderstammzellen als fremd zu erkennen, um durch diesen Kontakt aktiviert zu werden und zu proliferieren, wodurch sich ein so genannter gemischter Chimärismus ausbildet (12, 13). Die Therapie einer bereits eingetretenen

Abstoßungsreaktion beinhaltet eine immunologische Rekonditionierung und erneute Transplantation.

### **1.2.6 Die Graft versus Host Erkrankung (GVHD)**

#### **1.2.6.1 Die Immunpathophysiologie der GVHD**

Die GVHD ist eine immunologische Reaktion der Spenderlymphozyten gegen Empfängerewebe und kommt als akute oder chronische Form vor. Die GVH-Reaktion entsteht dadurch, dass immunologisch kompetente Zellen des Spendermarks Gewebsantigene, die nicht im Transplantatspender vorkommen, erkennen und der Empfänger die transplantierten Zellen aufgrund seiner myeloablativen Vorbehandlung nicht abstoßen kann.

Die Alloreaktivität repräsentiert eine polyklonale T-Zell-Immunantwort des Empfänger-Immunsystems, gegen Major- und Minorhistokompatibilitätsantigene des Transplantats (67). Als Effektoren, sowohl der akuten, als auch chronischen GVHD, gelten vor allem reife  $CD4^+$  und  $CD8^+$ T-Lymphozyten (124), die während der Transplantation eines unmanipuliertem Stammzelltransplantats oder im Rahmen einer zusätzlichen Spenderlymphozyteninfusion, übertragen werden. In diesem Zusammenhang spielen  $CD4^+$ -T-Lymphozyten eine wesentliche Rolle in der Initiierung der GVHD, da sie die Unterschiede der Minor- und Major-Histokompatibilitätsantigene erkennen (48, 55). In einer Studie am Tiermodell konnte aufgezeigt werden, dass die Ausprägung und Dauer einer GVHD von der Anwesenheit der  $CD4^+$ Helferzellen abhing, da in deren Abwesenheit eine Aktivierung der zytotoxischen  $CD8^+$ T-Zellen, die maßgeblich für die Zerstörung des Empfängergewebes verantwortlich sind, ausblieb. (48). Dabei erkennen  $CD4^+$ T-Zellen die MHC II Moleküle des allogenen Spenders, die Peptidliganden gebunden haben (88).  $CD4^+$ -Zellen können in zwei Untergruppen unterteilt werden, nämlich in TH-1- und TH-2-Zellen. Die TH-1-Zellen produzieren IL-2, Interferon- $\gamma$  und den Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ . Sie sind für die funktionelle Reifung der zytolytischen T-Zellen und die Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen z.B. Makrophagen zuständig. Die TH-2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Sie kontrollieren die Differenzierung von B-Zellen in antikörperbildende

## Einleitung

Plasmazellen und die Aktivierung von Eosinophilen. Im Vergleich zur TH-2-Zellpopulation, vermögen TH-1-Zellen eine wesentlich schwerwiegendere und länger andauernde GVHD zu initiieren. TH-1- und TH-2-Zellen können sich gegenseitig supprimieren. Neueren Studien zufolge verläuft die Stimulierung von TH-1- und TH-2-Zellen nicht unabhängig voneinander, vielmehr kontrollieren sich beide Aktivierungswege wechselseitig über Zytokine. Das Wechselspiel zwischen den Zytokinen die von TH-1- bzw. TH-2-Zellen sezerniert werden, bestimmt wesentlich den Verlauf der Immunantwort (40).

### **1.2.6.2 Die akute GVHD**

Die akute GVHD stellt eine der wichtigsten Komplikationen nach allogener Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation dar, deren Häufigkeit trotz immunsuppressiver Therapie und trotz HLA-Identität in verschiedenen Studien zwischen 27 und 83% liegt und deren Letalität bis zu 50 % betragen kann.

Zielorgane der akuten GVHD, die während der ersten 100 Tage nach KMT beobachtet wird und in unterschiedlicher klinischer Intensität auftreten kann, sind Haut, Darm und Leber. Die Haut zeigt dabei eine erythematöse Veränderung, eventuell mit Blasenbildung und Epidermolyse. Durch den Befall des GI-Traktes kommt es zu ausgeprägten Durchfällen mit Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten, Gerinnungsstörungen, sekundärer Anämie bis hin zur irreparablen Zerstörung der Mukosa. Die Leberbeteiligung äußert sich durch einen Anstieg des direkten Bilirubins, der alkalischen Phosphatase, des Weiteren stellen sich Synthesestörungen ein. Der Schweregrad der Erkrankung korreliert mit der Ausprägung der Organdysfunktion. Zusätzlich ist eine floride GVHD mit einer Immunsuppression assoziiert. Diese äußert sich, wie bereits erwähnt, in einer erhöhten Infektanfälligkeit. In diesem Zusammenhang spielt das Zytokin INF- $\gamma$  in der Unterhaltung der Immundefizienz eine entscheidende Rolle (139).

Die GVHD verläuft in zwei unterschiedlichen Phasen: Die erste Phase ist durch die zellschädigende Wirkung der Radiochemotherapie (Konditionierung) geprägt (35, 48). Hiervon betroffen sind vorwiegend Gewebe, mit hoher mitotischer Aktivität, z.B. die Haut, der GI-Trakt. Bedingt durch diese

## Einleitung

Zellschädigung kommt es zur massiven Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (48, 63, 139). Durch die Zytokinsekretion werden Antigen-präsentierende Zellen verstärkt stimuliert und rekrutiert. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Expression von Zelladhäsions- und HLA-Molekülen. Beide Faktoren begünstigen die CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung. Die dabei freigesetzten Zytokine, wie z.B. IL-2 und INF- $\gamma$  tragen zu einer weiteren Unterhaltung der Immunantwort bei. Zusätzlich führt die Bestrahlung zu einer Schädigung der gastrointestinalen Schleimhaut, die dabei freigesetzten Lipopolysaccharide (LPS) der intestinalen Flora induzierten durch die Stimulation von Makrophagen und konsekutiver Freisetzung proinflammatorischer Zytokine eine weitreichende sekundäre Entzündungsreaktion.

Die zweite Phase der GVHD umfasst schließlich die Aktivierung der zytolytischen T-Lymphozyten, NK-Zellen und der Makrophagen (105). Der immunologische Angriff dieser Effektorzellen äußert sich, wie bereits näher beschrieben, in einer direkten Zellschädigung und der Sekretion zytopathischer Moleküle.

### **1.2.6.3 Die chronische GVHD**

Die chronische GVHD tritt in der Regel nach den ersten 100 Tagen nach Transplantation auf. Sie kann sich aus einer akuten Form heraus entwickeln, jedoch auch als eigenständiges Krankheitsbild auftreten. Die chronische Form betrifft vor allem Haut und Schleimhäute mit chronischer Entzündung, Induration und Sklerosierung, begleitet von Episoden sekundärer Infektion (viral und bakteriell). Der Verlauf ist variabel und kann sich über Monate und Jahre erstrecken. Die Erkrankung wird von T-Lymphozyten des Spenders vermittelt, von denen die meisten gegen den Minor-Histokompatibilitätskomplex des Empfängers reagieren. Des Weiteren kann es im Rahmen einer Kreuzreaktivität autoreaktiver T-Zellen des Spenders, zu einer Immunantwort gegen das Empfängergewebe kommen. Die autoreaktiven T-Zellen vermögen sowohl körpereigene Antigene als auch Autoantigene des Empfängers zu erkennen, die im Rahmen einer Gewebsschädigung verstärkt präsentiert werden (139). Die von aktivierten T-Lymphozyten sezernierten Zytokine spielen eine

entscheidende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung. Wie bereits erläutert wurde, hängt das Ausmaß der die GVHD determinierenden inflammatorischen Immunantwort von dem Wechselspiel der Zytokine ab, die von TH-1- und TH-2-Zellen gebildet werden. Die TH-2 Lymphozyten sind in der Lage, mit Hilfe der von ihnen produzierten Zytokine die TH-1-Zellentwicklung zu inhibieren und gleichzeitig ihre eigene Entwicklung zu verstärken. Die Alloreaktivität kann z.B. durch IL-10, das von TH-2-Lymphozyten sezerniert wird, gehemmt werden. Dies ist vermutlich sowohl auf die Herunterregulierung der HLA-Moleküle, als auch auf die Suppression der Makrophagen-Aktivität und die Beeinflussung des Gleichgewichts zugunsten des TH-2-Schenkels zurückzuführen (15). Diese immunologischen Phänomene verdeutlichen die Auswirkung einer reduzierten IL-10-Produktion bei Patienten mit chronischer GVHD, die zu ungehemmter Aktivierung alloreaktiver T-Zellen und unkontrollierter INF- $\gamma$  Produktion führt (8).

### **1.2.6.4 Präventive therapeutische Maßnahmen zur Vermeidung einer GVHD**

Der Pathomechanismus der GVH-Erkrankung ist schon seit längerer Zeit bekannt. Jedoch ist es bis heute nicht gelungen, dieses Problem zufriedenstellend therapeutisch anzugehen (140). In diesem Zusammenhang wurden Verfahren entwickelt, die es ermöglichten, T-Zellen aus dem Transplantat zu entfernen, wodurch das Risiko der GVHD reduziert werden konnte. Viele dieser Depletionstechniken fanden ihren Einzug in die präklinische und klinische Forschung (68, 99, 138). Mit Hilfe dieser neuen Ansätze wurde das Ziel verfolgt, alloreaktive T-Zellen selektiv zu eliminieren. Man erhoffte sich davon ein verbessertes Anwachsen des Transplantats, da die nicht alloreaktiven Spenderlymphozyten weiterhin in der Lage waren, die für das Anwachsen des Transplantats notwendigen Zytokine bereit zu stellen. Außerdem vermögen sie die Effektorzellen des Empfängers zu eliminieren, die maßgeblich für die Transplantatabstoßung verantwortlich sind (24). Des Weiteren erhoffte man sich, auf diese Weise die Neuformung des Immunsystems zu beschleunigen, da demonstriert werden konnte, dass sich die Immunrekonstitution mit zunehmender Anzahl der verbliebenen, nicht-alloreaktiven T-Zellen im Transplantat früher einstellte (93). Anhand

## Einleitung

retrospektiver Studien konnte gezeigt werden, dass diese therapeutischen Ansätze durchaus die Erwartungen erfüllte (101, 93). Im Rahmen dieser Therapieform bestand allerdings weiterhin die Notwendigkeit einer Intensivierung der Konditionierungstherapie im Vorfeld der Transplantation, sowie der immunsuppressiven Therapie nach erfolgter Transplantation.

Die Stammzelltransplantation ist ein sich rasch entwickelndes Feld. Viele neue Therapieansätze sind aus der Grundlagenforschung hervorgegangen. Die von uns bislang bevorzugte Methode umfasst das Zellanreicherungsverfahren (MACS bzw. CLINIMACS), mit Hilfe der Mobilisation periphere Blutstammzellen, nach Gabe von G-CSF und anschließender Leukapherese. Dabei werden hochselektiv CD34<sup>+</sup> Stammzellen angereichert und T- und B-Zellen depletiert. Ein Vorteil dieser Therapie ist darin zu sehen, dass bei Fehlen eines konventionellen HLA-identischen Spenders, auf einen HLA-haploidentischen Familienspender zurückgegriffen werden kann. Ein weiterer positiver Aspekt dieses Verfahrens ist die fast vollständige Reduktion der GVHD. Den Vorteilen dieser Methode müssen die Nachteile gegenübergestellt werden. So ist weiterhin die Gefahr des leukämischen Rezidivs nicht gebannt und die Eliminierung der Lymphozyten aus dem Transplantat begünstigt die Immundefizienz in der Phase der Aplasie und Immunrestitution (87). Diese Problematik schuf die Grundlage für weitere Bemühungen, die Elimination alloreaktiver T-Lymphozyten zu optimieren, um im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie, nach Transplantation hochangereicherter, T-Zell-depletierter hämatopoetischer Stammzellen, die Infusion nicht-alloreaktiver T-Zellen in den Empfänger zu ermöglichen. Die nicht-alloreaktiven T-Zellen werden durch Antigenstrukturen des Empfängergewebes nicht aktiviert und können somit keine GVHD auslösen. Dafür gewährleisten sie einen Immunschutz und sind eventuell in der Lage, residuale leukämische Blasten zu zerstören, sowie eine Abstoßung des Transplantats durch Effektorzellen des Empfängers abzuwenden. Allerdings zeigte sich die Umsetzung dieser theoretischen Überlegungen problematisch, da zuerst geeignete Verfahren gefunden werden mussten, die zur Elimination der alloreaktiven T-Lymphozyten beitrugen, die in der Infusion enthaltenen waren. Ein experimenteller Ansatz umfasste die

## Einleitung

Verwendung eines Immunotoxins, wodurch selektiv alloreaktive T-Lymphozyten eliminiert werden konnten, die das Aktivierungsantigen CD25 auf ihrer Oberfläche präsentierten (24, 101). Unter demselben Vorzeichen wurde von Tiberghien und Mitarbeitern eine alternative Methode in Erwägung gezogen (132). Dieses Vorgehen beinhaltete die Verwendung genetisch veränderter T-Lymphozyten, die ein so genanntes Suizidgen exprimierten, das für die Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-tk) kodierte und ebenfalls zur selektiven Deletion alloreaktiver T-Zellen führen sollte. In neueren Studien basierte die Depletion alloreaktiver T-Zellen auf dem Verfahren des magnetischen Zellsortierens (MACS, magnet-activated cell sorter). Für diese Depletionstechnik wurden die alloreaktiven T-Zellen zuvor ex vivo aktiviert (45, 80). Sowohl Cavazzana-Calvo und Mitarbeiter (24) als auch Garderet und Mitarbeiter (45) depletierten ausschließlich alloreaktive T-Zellen die den Aktivierungsmarker CD25 exprimierten. Koh und Mitarbeiter (80) hingegen depletierten alloreaktive T-Lymphozyten, die das Aktivierungsantigen CD69 auf ihrer Oberfläche präsentierten. Von Fehse und Mitarbeitern (39) konnte allerdings gezeigt werden, dass sich die Elimination alloreaktiver T-Zellen wesentlich verbessern ließ, indem die Depletion gegen beide Aktivierungsantigene gerichtet war. Durch den Einsatz eines Depletionsverfahrens, das sich gegen drei Aktivierungsantigene richtete, nämlich CD25, CD69 und HLA-DR, konnte dieses Verfahren weiter optimiert werden (115). Hartwig und Mitarbeiter (59), etablierten in diesem Zusammenhang eine weitere Depletionstechnik. Das experimentelle Vorgehen basierte auf der Generierung alloreaktiver T-Zellen, die unter In vitro-Bedingungen mit einem monoklonalen agonistischen Antikörper inkubiert wurden, der gegen das Fas-Antigen (CD95) gerichtet war, das von aktivierten T-Lymphozyten vermehrt exprimiert wird. Die Interaktion zwischen agonistischem CD95 Antikörper und Fas-Rezeptor (CD95) der alloreaktiven T-Zellen, initiierte in letzteren ein Apoptosesignal. Als weitere Alternative wurde von Genestier und Mitarbeitern (47), sowie von Strauss und Mitarbeitern (127) ein Ansatz diskutiert, der hinsichtlich der selektiven Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten den Einsatz eines bekannten Zytostatikums, nämlich Methotrexat, umfasste. Für dieses Depletionsverfahren wurden die T-

Zellen ex vivo aktiviert und anschließend mit Methotrexat inkubiert, wodurch in aktivierten Zellen der programmierte Zelltod ausgelöst wurde.

### **1.3 Die Apoptose**

#### **1.3.1 Definition**

Der Begriff der „Apoptose“ als Bezeichnung für eine eigenständige Art des Zelltods wurde erstmals 1972 von Kerr und Mitarbeitern geprägt (76). Sie ist die natürliche Form der Zellmauserung und Zellelimination, die das Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellelimination ermöglicht. Apoptose tritt physiologischerweise im Rahmen der Embryonalentwicklung und von Involutionen auf, außerdem spielt sie bei einer Vielzahl von pathologischen Situationen eine zentrale Rolle wie bei der Elimination infizierter Zellen, bei Autoimmunerkrankungen, degenerativen Erkrankungen, ischämischen Gewebsschäden, beim aktiven Zelltod, der durch die Notwendigkeit von RNA- und Proteinsynthese gekennzeichnet ist, und insbesondere bei der Krebsentstehung. Aber auch Zytostatika, Bestrahlung, Hyperthermie, Entzug von Wachstumsfaktoren, und andere Stimuli induzieren die Apoptose in bestimmten Zellen. „Apoptose“ (griechisch: „Herabfallen von Blättern“) ist eine morphologisch definierte Form des Zelltods, bei dem die Zellen bestimmte Kennzeichen aufweisen. Zuerst findet eine Verdichtung des Chromatins, vor allem am Rand des Zellkerns, statt. Danach wird der Zellkern fragmentiert und die Zellmembran stülpt sich in Blasen aus (membrane blebbing). Diese Blasen werden abgeschnürt und bilden kleine Körperchen (apoptotic bodies). Sie werden von benachbarten Makrophagen phagozytiert.

#### **1.3.2 Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose**

Die Nekrose ist die Summe aller Veränderungen, die dem Zelltod in einem lebenden Gewebe folgen. Sie ist Folge der Denaturierung von Proteinen und der enzymatischen Auflösung von Zell- und Gewebskomponenten, hervorgerufen durch ATP-Verlust infolge der Störung der mitochondrialen oxidativen Atmungsphosphorylierung und konsekutiver Beeinträchtigung ATP-abhängiger Zellfunktionen, wie z.B. ATP-abhängige Kationenpumpen. Des Weiteren führt die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediärprodukte, die



## Einleitung

aufgrund der Zellschädigung durch die eigentlichen protektiven Mechanismen der Zelle nicht mehr beseitigt werden können und daher mit Membranlipiden, Membran- und Zellproteinen, sowie mit der DNA reagieren, zu einem Verlust der Membranintegrität und infolge Störung der Kalziumhomöostase zu einer Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Enzyme, wie z.B. Proteasen. Bei der Nekrose finden sich zytoplasmatische Veränderungen mit Vakuolisierung und Schwellung der Organellen. Der folgende Zellzerfall führt zum Freiwerden von Enzymen, aber auch von chemotaktisch wirksamen Zellkomponenten, die eine Entzündung hervorrufen. Bei der Apoptose bleiben Zelle und Organellen lange Zeit intakt oder die Zelle zerbricht in größere Bruchstücke. Das apoptotische Material wird phagozytiert ohne Entwicklung einer Entzündung (49, 68, 74, 134).

### **1.3.3 Proteasen und DNS-Fragmentierung**

Apoptoseinduzierende Signale führen oft zu einer Aktivierung bestimmter Proteasen, der Caspasen. Eine entscheidende Rolle dabei spielen die Mitochondrien. Im Verlauf vieler Formen der Apoptose wird die Mitochondrienmembran depolarisiert, außerdem wird, vermutlich vor der Depolarisierung, Cytochrom-c aus Mitochondrien freigesetzt. Cytochrom c bindet im Zytoplasma an das Protein APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1). Dies führt zur Aktivierung von Caspasen wie Caspase-9 (134). In Form einer Kaskade kann eine weitere Caspaseaktivierung stattfinden. Durch proteolytische Vorgänge wird aus einer inaktiven Proform eine aktive Form gebildet. Die aktivierte Caspase spaltet die Proform einer anderen Caspase in deren aktive Form, die daraufhin weitere Caspasen aktiviert. Darüber hinaus unterliegen Zytoskelettproteine einer proteolytischen Alteration durch Caspasen, wodurch morphologische Veränderungen während der Apoptose hervorgerufen werden (49, 134). Schließlich aktivieren die Caspasen Endonukleasen, die in den Zellkern gelangen und dort zur DNS-Fragmentierungen führen. Die nukleäre DNS wird im Verlauf der Apoptose im Bereich der Linker-DNS, dem Bereich zwischen den Nukleosomen, geschnitten. Da die Entfernung zwischen zwei Linker-Bereichen ca. 180 bp beträgt, entstehen bei der apoptotischen DNS-Fragmentierung DNS-Bruchstücke, deren Länge ganzzahlige Vielfache von

etwa 180 bp beträgt. Wird die DNS von apoptotischen Zellen auf ein Agarose-Gel aufgetragen, werden diese Fragmente als apoptotische Leiter sichtbar (141). Einer dieser Endonukleasen ist CAD (caspase-activated deoxyribonuclease). Sie liegt durch Bindung an den Inhibitor ICAD (inhibitor of CAD) in inaktiver Form vor. Die Caspaseaktivierung führt zur Spaltung von ICAD. Dadurch wird CAD aktiv und führt zur DNS-Fragmentierung (34, 119).

### 1.4 CD95 und CD95-Ligand

#### 1.4.1 CD95 (Fas/Apo-1)

CD95, auch Fas oder Apo-1 genannt, ist ein Typ-1-Membranprotein, das strukturell zur Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)-Rezeptor-Familie gehört. Außer CD95 gehören dazu wie TNF-Rezeptoren (TNF-R1 und TNF-R2), *nerve-growth-factor receptor* (NGF-R), p75, CD27, CD30, CD40, 4-1BB, OX40, receptor activator of NF-kappa B (RANK), DR3, vier Apo-2-Ligand-Rezeptoren (DR4, DR5, DcR1 und DcR2) und DR6. Extrazellulär besitzen diese Rezeptoren zwei bis sechs glyzinreich, konservierte Domänen. Außerdem weisen CD95, TNF-R-1, DR3, DR4, und DR6 eine Sequenzhomologie in der intrazellulären Domäne auf, die so genannte *death domain* (Todesdomäne). Ihr Vorhandensein ist wichtig für die Weiterleitung des apoptotischen Signals. CD95 wird vor allem auf der Oberfläche aktivierter T- und B-Lymphozyten exprimiert (90, 74). Darüber hinaus wurde in lymphoiden und nichtlymphoiden Tumorzellen eine CD95-Expression gefunden (102).

#### 1.4.2 CD95-Ligand

Der CD95-Ligand (CD95 L) ist der natürliche Ligand des CD95-Rezeptors und gehört zur TNF-Familie, zu der außerdem TNF- $\alpha$ , Lymphotoxin  $\alpha$  und  $\beta$ , CD27-Ligand, CD30-Ligand, CD40-Ligand, 4-1BB-Ligand, ox40-Ligand und der Apo-2-Ligand gehören. Außer dem Lymphotoxin  $\alpha$  sind diese Liganden ausnahmslos Typ-II-Membranproteine. Sie besitzen N-terminal eine zytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne und C-terminal eine Extrazellulärdomäne, in der ebenfalls die Sequenzhomologie der TNF-Familien-Mitglieder zu erkennen ist. Diese Struktur legt nahe, dass CD95 L ein membrangebundener Ligand ist. Durch proteolytische Spaltung außerhalb der

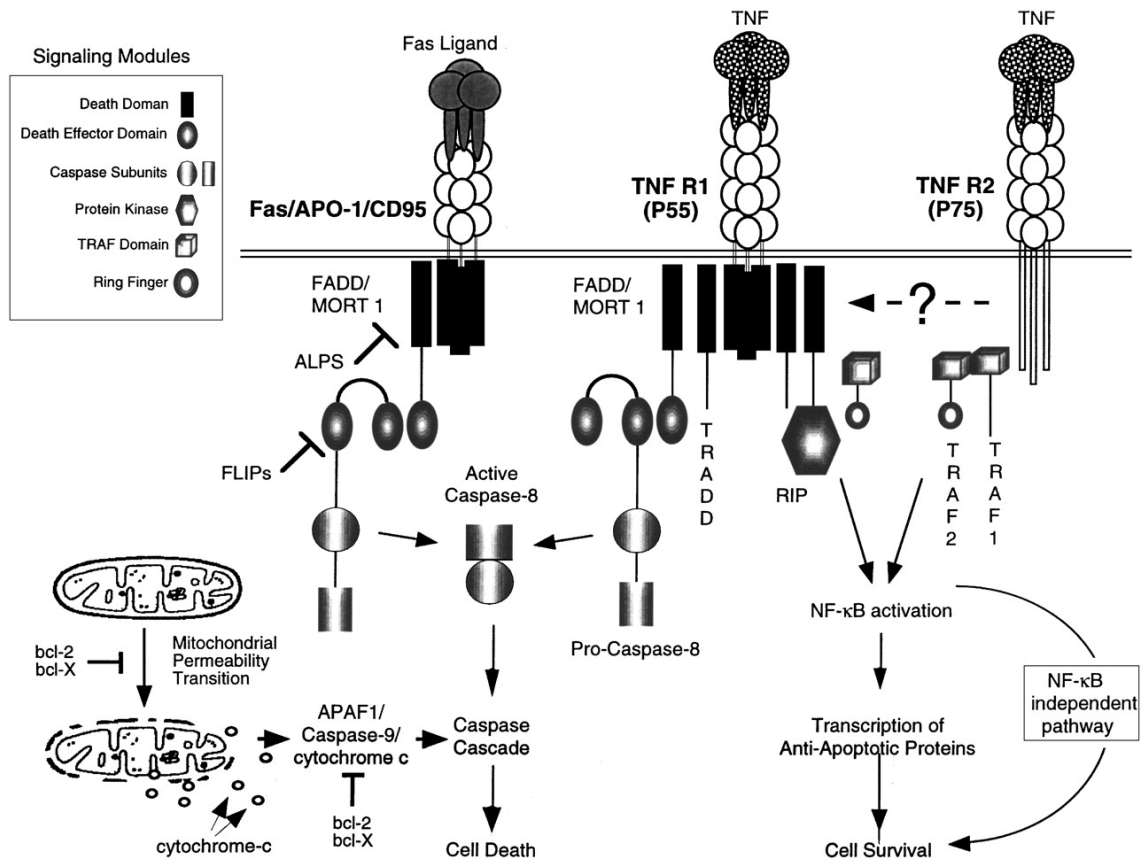
Transmembrandomäne kann auch ein löslicher CD95-Ligand entstehen (74). Exprimiert wird CD95 L auf aktivierten T-Zellen (90, 74) und in der vorderen Augenkammer (52). Auch auf der Oberfläche von Tumorzellen konnte CD95 L nachgewiesen werden (141).

### **1.4.3 Signalweg und Funktion**

CD95 L bindet trimerisiert an CD95 R und führt zur Quervernetzung von drei CD95R-Molekülen. Ebenso kann die Aktivierung von CD95 R durch quervernetzende CD95-Antikörper stattfinden. Die Trimerisierung von CD95 R führt dazu, dass die intrazellulär gelegenen Todesdomänen (*death domains*) in unmittelbare Nähe gelangen und dass das Adapterprotein *Fas-associated protein with death domain* (FADD) rekrutiert wird. FADD besteht aus einer Domäne mit Homologie zur *death domain*, mittels der die Bindung an den CD95-Rezeptor erfolgt und einer *death effector domain* (DED) am C-Terminus. Diese *death-effector domain* bindet die Protease Caspase-8 (*FADD-like ICE* (FLICE) ). In diesem als *death-inducing signalling complex* (DISC) genannten Komplex wird die Caspase-8 aktiviert, die nun proteolytisch andere Proteasen wie Caspase-3 (CPP32) spaltet. Auf eine noch nicht vollständig geklärte Art und Weise werden letztlich Endonukleasen (CAD) aktiviert und Apoptose induziert (90).

## Einleitung

Abb.1: Signalweg der CD95-induzierten Apoptose: M.Lenardo, Mature T-lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable environment, ANN: Rev. Immunol. 17:221 (1999)



Für die CD95-vermittelte Apoptose ist weder RNA- noch Proteinsynthese notwendig, denn CD95L-induzierter Zelltod wird durch Hemmung von RNA- oder Proteinsynthese in den meisten Zellen sogar potenziert (144).

Des Weiteren verläuft diese Form des Zelltods  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig ab (116) und kann ohne Anwesenheit eines Zellkerns fortgeführt werden (74). Gehemmt wird CD95-vermittelte Apoptose unter anderem durch das zelluläre *FLICE inhibitory protein* (FLIP), das die Aktivierung der Caspase-8 hemmt (74). Auch viele virale Proteine mit Homologie zu FLIP und einer ähnlichen apoptosehemmenden Wirkung sind bekannt (v-FLIPs) (128). Auch das antiapoptotische BCL-2 kann CD95-induzierte Apoptose inhibieren (6). Hinweise auf die biologische Funktionen von CD95 R und CD95 L geben die mutanten *lpr-* und *gld-*

## Einleitung

Mausstämme. Beide Mausstämme entwickeln ein Lymphoproliferatives Syndrom, Splenomegalie, Arthritis, Nephritis und andere Anzeichen einer Autoimmunerkrankung. Die *lpr*-Mutation ist eine Mutation des CD95-Gens, während die *gld*-Mutation eine Mutation des CD95 L-Gens ist. Beide Mutanten zeigen eine erhöhte Zahl an T-Zellen. Folgeuntersuchungen zeigten, dass das CD95-Antigen eine entscheidende Bedeutung für die Eliminierung aktivierter T-Zellen hat und somit zur Beendigung einer Immunantwort beiträgt. Dies erklärte die erhöhte Immunaktivität in den beiden mutanten Stämmen. Eine weitere mögliche Funktion für CD95 betrifft CD8<sup>+</sup>-Killer-T-Zellen. Diese können Zielzellen auf zwei verschiedene Arten töten. Einerseits mittels des Perforin Granzym Mechanismus und andererseits mittels CD95 L. Bei Erkennung der Zielzelle exprimiert die CD8<sup>+</sup>-Killer-T-Zelle CD95 L, das durch Bindung an CD95 R auf der Oberfläche der Zielzelle in dieser Apoptose induziert. Ausgehend vom Expressionsmuster des CD95 L wird noch eine weitere immunologische Funktion vermutet. Sowohl Auge als auch Hoden, die CD95 L exprimieren, sind Organe mit privilegierter Immunität. In ihnen finden nur schwache Immunreaktionen statt, vermutlich damit Organschäden durch starke Entzündungen verhindert werden. Somit wird postuliert, dass durch die CD95 L-Expression in diesen Organen Entzündungszellen getötet werden und damit eine Limitierung der Immunantwort stattfindet (52). Da auch auf Tumorzellen eine CD95L-Expression gefunden werden kann, wird vermutet, dass Tumorzellen auf diese Weise die Immunabwehr unterdrücken (141).

### **1.4.4 Die Regulation der Apoptoseinduktion in T-Lymphozyten**

Der programmierte Zelltod oder die Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus, der in der Regulation der zellulären Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt. Durch die Anwesenheit eines Antigens wird das Immunsystem aktiviert. Immunzellen beginnen zu proliferieren und Zytokine und Antikörper zu sezernieren, um die eindringenden Pathogene erfolgreich zu bekämpfen. Nach Eliminierung der Antigene besteht die Notwendigkeit, die Immunantwort zu beenden. Einen wesentlichen Beitrag leistet in diesem Zusammenhang der

## Einleitung

AICD-Mechanismus (activation-induced-cell-death), der im Verlauf einer Immunantwort eine weitere klonale Expansion der Immunzellen verhindert. Des Weiteren sorgen diese empfindlichen Apoptosevorgänge für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems und sind dafür verantwortlich, dass eine Immuntoleranz in der Körperperipherie etabliert wird (68). Defekte innerhalb dieser sensiblen Abläufe führen zu malignen Erkrankungen, aber auch Autoimmunerkrankungen und Lymphoproliferativen Syndromen, wobei eine erhöhte Apoptoserate zu Immundefizienzen und Leukopenien führen kann (130). Die Bezeichnung AICD wurde verwendet, um den signalvermittelten Zelltod von T-Lymphozyten zu beschreiben (73). Die Apoptose kann in T-Zellen aber auch durch eine Verarmung an Zytokinen, so genannten Überlebensfaktoren, wie z.B.IL-2, ausgelöst werden. Diese Form der Apoptose wird als passive Apoptose bezeichnet. Erst in den letzten 5 Jahren, hat sich herausgestellt, dass das CD95/CD95 L System eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Regulierung des programmierten Zelltods in T-Lymphozyten spielt (20, 32). Es konnte dabei gezeigt werden, dass AICD ein Mechanismus ist, der durch den T-Zellrezeptor-vermittelten Antigenkontakt hervorgerufen wird, wodurch es zur Auslösung einer Signalkaskade kommt. Diese führt zur Thyrosinphosphorylierung und Aktivierung T-Zellrezeptor-sensitiver Transkriptionsfaktoren. Die Transkriptionsfaktoren steigern die Transkription bestimmter Genabschnitte, die für den CD95-Rezeptor und CD95-Liganden kodieren und zu einer verstärkten Präsentation dieser Moleküle auf der Zelloberfläche führen, die somit verstärkt auf der Membranoberfläche der Zelle präsentiert werden (20, 32). Bedingt durch eine proteolytische Abspaltung des membranverankerten CD95 L mittels einer Metalloprotease kann dieser so genannte Todesfaktor (death factor) in eine lösliche Form überführt werden (96). Bindet der lösliche CD95 L nun an den CD95-Rezeptor derselben T-Zelle wird ein so genannter autokriner Zelltod (autocrine suicide) induziert. Die Interaktion des CD95 L mit dem CD95-Rezeptor einer benachbarten T-Zelle, wird als parakriner Zelltod (paracrine fratricide) bezeichnet. In ruhenden reifen T-Lymphozyten ist der AICD-Mechanismus nicht auslösbar, stattdessen ruft ein T-Zellrezeptor-vermittelter Antigenkontakt eine Aktivierung der T-Zelle hervor.

## Einleitung

Die T-Zellantwort auf ein Antigen stellt sich in zwei voneinander abhängigen Phasen dar: der Aktivierungsphase und der Proliferationsphase (27). Die entscheidenden Ereignisse in der Aktivierungsphase sind die Induktion des IL-2-Gens sowie des IL-2-Rezeptorgens. Während dieser initialen Phase wird keine Apoptose ausgelöst, da unter physiologischen Bedingungen eine Apoptose die protektive Immunantwort gegen das eindringende Antigen unterbinden würde. Die Proliferationsphase der T-Zellantwort tritt ein, sobald IL-2 an den entsprechenden Rezeptor bindet und die T-Zelle in den Zellzyklus eintritt. Nach Durchlaufen ein oder mehrerer Zellzyklen und am Übergang der G1- zur S-Phase des Zellzyklus erreicht die T-Zelle ein Stadium, das sie durch erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem AICD-Mechanismus auszeichnet (17, 89). Ein wesentlicher Einfluss auf die Sensibilität der T-Zellen gegenüber der CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose scheint der T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 zu haben (17, 69, 89). Von Lenardo und Mitarbeitern (89) wurde gezeigt, dass die CD95-Rezeptor-vermittelte Apoptose in T-Lymphozyten unter In vitro Bedingungen durch Zugabe von IL-2 gesteigert werden konnte. Des Weiteren demonstrierten Hornung und Mitarbeiter (65) in ihrer Studie, dass zur optimalen Auslösung der CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose, zusätzlich zur T-Zellrezeptor-vermittelten Antigenstimulierung eine Bindung des CD95L an den CD95-Rezeptor vorliegen musste. Der AICD-Mechanismus kann sowohl in T-Zellen, die den  $\alpha/\beta$ -T-Zellrezeptor exprimieren, ausgelöst werden, als auch in  $\gamma/\delta$ -T-Zellrezeptor-tragenden T-Zellen (142). Des Weiteren scheint es keine Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber dem CD95-Rezeptor-vermittelten programmierten Zelltod, zwischen  $CD4^+$ -T-Helferzellen und  $CD8^+$ -T-Killerzellen zu geben (74). Vor kurzer Zeit wurde allerdings darauf hingewiesen, dass der AICD-Mechanismus in der TH1-Subpopulation der T-Helferzellen wesentlich besser induziert werden kann, hingegen zeigt sich die TH2-Subpopulation diesem Mechanismus gegenüber resistenter (108).

Während einer Immunantwort ist das Schicksal einer aktivierten T-Zelle entscheidend von den jeweils vorherrschenden Umgebungsbedingungen abhängig. Bleibt die Antigenstimulierung aus, verringert sich die Expression für IL-2 und den zugehörigen Rezeptor. Dies führt zu einem Zytokinmangel, in

## Einleitung

dessen Folge die passive Apoptose induziert wird. Im Gegensatz dazu bewirkt erst eine kontinuierliche starke Antigenstimulation und eine hohe IL-2-Konzentration die Auslösung des AICD-Mechanismus. Somit verhindern beide Mechanismen eine überschießende Expansion der klonalen Immunantwort. Im Gegensatz zur CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose setzt die passive Apoptose eine Protein- und RNA-Synthese voraus. Diese Form des programmierten Zelltods involviert die direkte zytoplasmatische Aktivierung von Caspasen, vermutlich als Folge der Schädigung der Mitochondrien. Der Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran führt zur Freisetzung von Cytochrom-c und weiteren Proteinen, die wiederum zytoplasmatische Caspasen aktivieren und die schließlich das apoptotische Programm ausführen. Bcl-2/Bcl-X-Proteine sind möglicherweise in der Lage, die passive Apoptose zu inhibieren, indem sie an die Mitochondrienmembran binden um so der Freisetzung von Cytochrom c entgegen wirken (89).

Die Apoptose leistet einen entscheidenden Beitrag während der Entwicklung und Reifung von T-Lymphozyten im Thymus. Unreife T-Zellen erfahren im Laufe ihrer Reifung und Prägung im Thymus eine positive oder negative Selektion. Die Auswirkung der Bindung zwischen den MHC-Peptidkomplexen der Epithelzellen der Thymusrinde und den T-Zellrezeptoren der Thymozyten ist von der Stärke des Signals abhängig, das, vermittelt durch den T-Zellrezeptor, im Verlauf der Bindung an den MHC-Peptidkomplex ins Innere der Zelle weitergeleitet wird. Dabei spielt nicht nur die Affinität des T-Zellrezeptor gegenüber dem MHC-Peptidkomplex eine Rolle, sondern auch die Dichte dieses Komplexes auf den Thymusepithelzellen. Vermittelt der T-Zellrezeptor ein zu starkes Signal, werden die unreifen T-Lymphozyten durch Apoptose eliminiert (negative Selektion), hingegen werden MHC-restringierte Thymozyten, deren T-Zellrezeptor ein zu schwaches Signal initiiert, positiv selektioniert, (79). Unreife T-Lymphozyten, die körpereigene Peptide in Verbindung mit MHC-Molekülen erkennen, werden demnach weiteren Reifeprozessen unterzogen. Im Gegensatz dazu werden diejenigen T-Zellen, deren T-Zellrezeptor möglicherweise eine zu starke, autoreaktive Immunantwort



initiieren könnte, entfernt (67). Obwohl der CD95-Rezeptor auf unreifen T-Zellen des Thymus exprimiert wird, zeigt sich nur eine vergleichsweise schwache Expression des CD95L (74). Castro und Mitarbeiter (23) erbrachten in ihrer Untersuchung dennoch den Nachweis, dass die Interaktion zwischen CD95L und CD95-Rezeptor im Rahmen der intrathymischen Apoptose eine Rolle spielt.

Eine weitere Rolle spielt der CD95-Rezeptor-vermittelte programmierte Zelltod im Rahmen der akuten GVHD. Brochu und Mitarbeiter (19) berichten darüber, dass die CD95-Rezeptor-vermittelte Apoptose einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung der Immundefizienz, der an aGVHD erkrankten Mäuse leistete. Dabei wurde beobachtet, dass nach einer initialen Proliferation der alloreaktiven CD8<sup>+</sup>-T-Killerzellen, ein Stadium der massiven CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose folgte. Es konnte dabei aufgezeigt werden, dass diese aktivierten T-Zellen eine verstärkte Expression des CD95 Liganden und CD95-Rezeptors aufwiesen. Hingegen präsentierten die nicht alloreaktiven T-Zellen nur eine geringe Anzahl des CD95 L auf ihrer Zelloberfläche. Es wurde lediglich auf eine verstärkte Expression des CD95 Rezeptors hingewiesen. Die Ursache dafür ließ sich auf die verstärkte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine z.B. INF- $\gamma$ ; der alloreaktiven T-Zellen zurückzuführen. Brochu und Mitarbeiter nahmen an, dass die Interaktion zwischen den CD95-Liganden der zytotoxischen alloreaktiven T-Zellen und den CD95-Rezeptoren der benachbarten nicht-alloreaktiven T-Lymphozyten zu einer massiven Apoptoseinduktion in letzteren führte, wodurch eine Immunrekonstitution im Empfänger verhindert wurde.

### **1.5 Das Zytostatikum Methotrexat (MTX)**

#### **1.5.1 Die Funktion von Purin- und Pyrimidinnukleotiden**

Purin- und Pyrimidinnukleotide sind biochemisch ganz besonders interessante Moleküle, da sie als Bausteine von Coenzymen wichtige Aufgaben haben und außerdem als Polynukleotide die Funktion der Informationsspeicherung und Weitergabe in biologischen Systemen übernommen haben. Die in der DNA vorkommenden Bausteine sind die Purinnukleotide Adenosin-5`-Monophosphat und Guanin-5`-Monophosphat sowie die Pyrimidinnukleotide, Cytidin-3`-Mono-

phosphat und Thymidin-5`-Monophosphat, in der RNA wird alternativ an Stelle des Thymidylats, Uridin-5`-monophosphat verwendet. Aus der Kenntnis der Biosynthesewege ergab sich nicht nur ein tieferes Verständnis für die Regulation dieser Vorgänge, sondern fanden sich auch Ansatzpunkte zur erfolgreichen Entwicklung von Arzneimitteln, die durch Beeinträchtigung der Purin- und Pyrimidinsynthese als Zytostatika verwendet werden.

### **1.5.2 Der klinische Einsatz von Methotrexat (MTX)**

Ein besonderes Interesse gilt in diesem Zusammenhang dem Folsäureantagonisten Methotrexat (MTX). Es ist ein sehr häufig eingesetztes Medikament in der Therapie der GVHD (125) und der rheumatoiden Arthritis, (143). Des Weiteren findet MTX vielfach Einzug in die Therapie von Autoimmunerkrankungen und wird zur Behandlung der Transplantatabstoßung eingesetzt (44). Zusätzlich zu dieser anti-entzündlichen Eigenschaft, die u.a. mit einer verstärkten Adenosinabgabe assoziiert ist, verfügt MTX auch über anti-proliferative Fähigkeiten, indem es die Enzyme der Purin- und Pyrimidinbiosynthese hemmt. MTX wurde aufgrund dieser Eigenschaften zu Beginn seiner klinischen Einführung, hauptsächlich zur Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt (44) und ist auch heute noch ein sehr wichtiges und häufig angewandtes Cytostatikum in der Leukämie, sowie Tumorthherapie.

### **1.5.3 Wirkungsweise von Methotrexat (MTX)**

Methotrexat ist ein Antagonist der Folsäure. Es unterscheidet sich von diesem essentiellen Vitamin durch die Substitution einer Aminogruppe durch eine Hydroxylgruppe an der 4. Position des Pteridinrings. Diese strukturelle Alteration führt dazu, dass MTX an das Enzym Dihydrofolsäurereduktase (DHFR), das für die Aufrechterhaltung des intrazellulären, reduzierten Folsäurepools verantwortlich ist, bindet und es reversibel hemmt (5). Tetrahydrofolsäuren sind reduzierte Formen der Folsäure und nur in reduziertem Zustand biologisch aktiv. Sie sind wichtige Cofaktoren und spielen als Überträger von einzelnen Kohlenstoffgruppen in der Biosynthese von Purin und Pyrimidinnukleotiden eine wichtige Rolle. Zur Gruppe der reduzierten Folsäure gehört z.B. die 10-Formyltetrahydrofolsäure. Sie ist für die

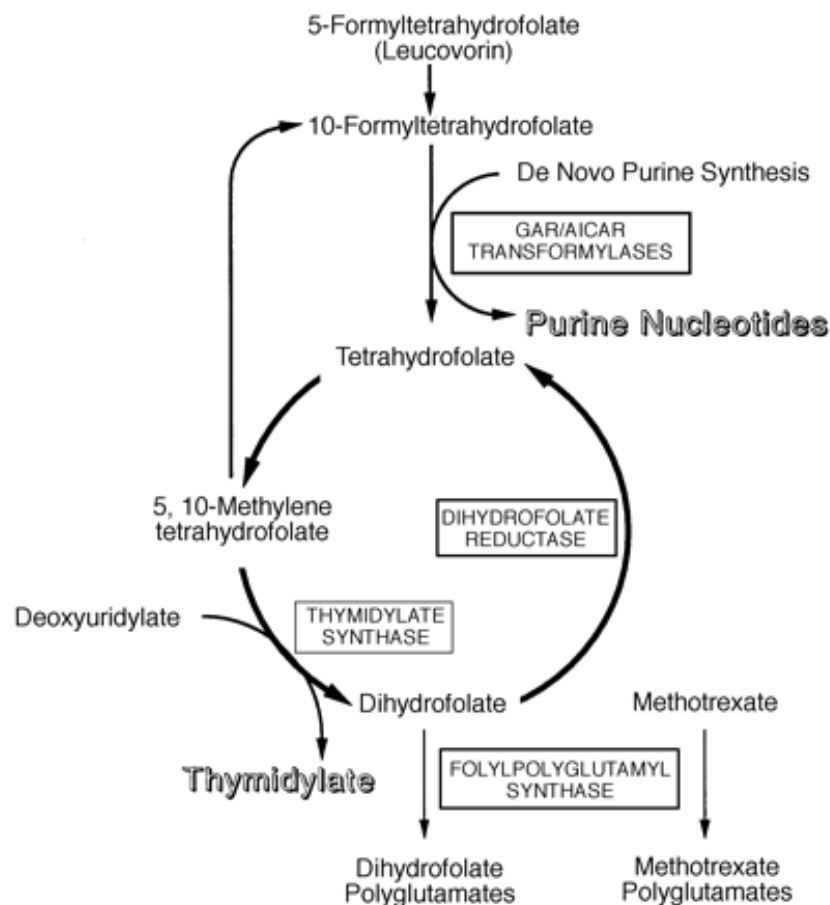
## Einleitung

Übertragung von einzelnen Kohlenstoffgruppen verantwortlich, die für die de-novo-Biosynthese der Purinnukleotide von Bedeutung ist. Diese Biosyntheseschritte werden von zwei Enzymen katalysiert, der Glycinamid-Ribonucleotid-Transformylase (GAR) und der Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonucleotid-Transformylase (AICAR). Eine weitere reduzierte Form der Folsäure ist die 5,10-Methylentetrahydrofolsäure. Sie stellt einzelne Methylgruppen zur Verfügung, um im Rahmen der Pyrimidinnukleotidbiosynthese aus Desoxyuridinmonophosphat durch Methylierung mittels des Enzyms Thymidylat-Synthase (TS), Thymidylat zu synthetisieren. Während dieses Syntheseschritts, wird Tetrahydrofolsäure (FH-4) zu Dihydrofolsäure (FH-2) oxidiert. Durch das Hilfsenzym Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) wird FH-2 mit Hilfe von  $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$  zu FH-4 umgewandelt. Dies gewährleistet eine Aufrechterhaltung des reduzierten Folsäureangebots (127). Im Rahmen einer Zellteilung findet eine kontinuierliche Purin- und Pyrimidinnukleotidbiosynthese statt. Eine Hemmung der DHFR führt zur partiellen Reduktion des intrazellulär reduzierten Folsäureangebots, wodurch letztendlich eine Beeinträchtigung der Synthese essentieller Nukleotidvorstufen, die zur DNA-Replikation benötigt werden, hervorgerufen wird (127). MTX unterliegt in der Zelle einer chemischen Veränderung. Verantwortlich dafür ist das Enzym Foyl-Polyglutamyl-Synthase (FPGS), das die Fähigkeit besitzt, mehrere Glutamatmoleküle, sowohl an den Pteridinring der natürlich vorkommenden Folsäure, als auch an das MTX-Molekül zu binden (5). Diese strukturelle Alteration hat zur Folge, dass das MTX-Molekül an Größe gewinnt und einen erhöhten Ionisationsgrad aufweist, wodurch das Verlassen der Zelle deutlich erschwert wird. Zusätzlich weist MTX in diesem Zustand eine hohe Affinität gegenüber weiteren folsäureabhängigen Enzymen, wie z.B. der Thymidylat-Synthase, der Glycinamid-Ribonucleotid-Transformylase (GAR) und der Amino-Imidazol-Carboxamid-Ribonucleotid-Transformylase (AICAR), auf und ist demzufolge in der Lage, diese Enzyme effektiv zu inhibieren (2). Des Weiteren wird auch das natürliche Substrat der DHFR, die Dihydrofolsäure, die sich im Rahmen der Enzymhemmung durch MTX anhäuft, in die Polyglutamat-Form umgewandelt und ist in dieser Form ebenfalls in der Lage, die bereits

## Einleitung

genannten Enzyme der Purin- und Pyrimidinsynthese zu hemmen (3, 4). Die zytotoxische DNA-Schädigung scheint zum einen aus einem Mangel an DNA-Vorstufen zu resultieren, in dessen Folge es zu einer ineffektiven DNA-Synthese und Reparatur kommt, wodurch DNA-Strangbrüche entstehen (127). Zusätzlich wird vermutet, dass durch die Hemmung der TS, ihr Substrat Desoxyuridinmonophosphat in der Zelle akkumuliert und fälschlicherweise in die DNA eingebaut wird. Das DNA Exzision-Reparatur-Enzym erkennt und entfernt diese Nukleotide, wodurch weitere DNA-Schäden entstehen (127).

Abb.2:Die Enzymreaktionen des Folsäuremetabolismus: C.Takomoto, New antifolate:Pharmacology and clinical applications, The Oncologist, 1:68 (1996)



### **1.5.4 Leucovorin (10-Formyltetrahydrofolsäure/Folinsäure)**

Die Verabreichung von 10-Formyltetrahydrofolsäure (Leucovorin), einem Derivat der biologisch aktiven Form der Folsäure, neutralisiert effektiv die zytotoxische Wirkung von MTX indem es direkt um die Bindungsstelle der DHFR und anderer Folsäure-abhängiger Enzyme, sowie um die Transportsysteme der Zelle und die Anheftung der Glutamatgruppen konkurriert (5). Leucovorin wird vorwiegend in der Hochdosis-MTX-Chemotherapie eingesetzt, um schwerwiegende toxische Schäden, die durch das Zytostatikum hervorgerufen werden, zu kupieren (127).

### **1.5.5 Apoptose-Induktion durch MTX**

Durch genotoxischen Stress, wie ionisierende Strahlung, UV-Strahlung und Zytostatikabehandlung wird, als Antwort auf die DNA-Schädigung, das *Tumor-Suppressor-Gen* verstärkt exprimiert (75). Das Gen kodiert für das p53-Protein, einem Transkriptionsfaktor, das in der Lage ist, die Expression bestimmter Proteine zu initiieren, wie z.B. den CDK-Inhibitor-p21, wodurch der Zellzyklus arretiert wird, um die DNA Reparatur zu ermöglichen. Aus einem Mangel an DNA-Vorstufen resultiert jedoch eine ineffektive DNA-Reparatur, wodurch p53 veranlasst wird, pro-apoptotische Genprodukte zu induzieren, wie z.B. das Bax-Molekül, das CD95-Rezeptor-Molekül, und gleichzeitig die Transkription anti-apoptotischer Moleküle, wie z.B. das Bcl-2 Protein, zu inhibieren, das in der Lage ist, die Apoptose zu hemmen (133). Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass p53 unter anderem Oxidoreduktasen induzieren kann und damit über die Bildung von Sauerstoffradikalen zum Zelltod führt (112). Die durch p53 induzierten Bax-Moleküle binden in dimerisiertem Zustand an ein Kanalprotein des Mitochondriums, das als MPT (*mitochondrial permeability transition pore*) bezeichnet wird (51), und führen über einen verstärkten Ioneneinstrom zur Depolarisierung der Mitochondrienmembran, wodurch es zu einer Freisetzung von Cytochrom-c aus dem Mitochondrium kommt, das nach Bindung des cytosolischen Proteins Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) in der Lage ist, die Caspasenkaskade zu aktivieren, die in dem programmierten Zelltod der Zelle resultiert (133).

### **1.6 Zielsetzung dieser Arbeit**

Die Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten aus dem allogenen Stammzelltransplantat verhindert erfolgreich die Entstehung einer Graft-versus-Host-Erkrankung. Allerdings ist in diesem Zusammenhang mit einem verstärkten Auftreten von Abstoßungsreaktionen des Transplantats, erhöhten Rezidivraten und Infektionsrisiken zu rechnen. Daher war es Ziel unserer Arbeit, im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie nach allogener Stammzelltransplantation, nicht-alloreaktive T-Lymphozyten in vitro zu generieren. Diese T-Zellen des Spenders sind nicht fähig, eine Immunantwort gegen die HLA-Antigene des fremden Empfängers auszulösen, weisen aber dennoch ein antileukämisches bzw. anti-infektiöses Potenzial auf. In diesem Zusammenhang wählten wir das MLC-Verfahren (mixed lymphocyte reaction). Da jedoch die erreichbare Frequenz an alloreaktiven T-Zellen lediglich bei 1-10 % liegt (42) und somit schwer nachzuweisen ist, waren wir bestrebt, die Empfindlichkeit der MLC zu erhöhen. Dafür unternahmen wir den Versuch, optimale Kulturbedingungen zu schaffen, indem wir unter anderem zytokinvorbehandelte Stimulatorzellen in die gemischte Lymphozytenkultur einsetzten und die Kultur einer zusätzlichen Behandlung mit Interleukin-2 unterzogen. Die Intention unseres weiteren Vorgehens lag darin, geeignete Depletionsverfahren zu entwickeln, mit deren Hilfe es uns gelingen sollte, alloreaktive T-Zellen von nicht-alloreaktiven T-Zellen möglichst schonend und einfach zu separieren. Unsere Aufmerksamkeit konzentrierte sich unter anderem auf den Einsatz eines Zytostatikums, nämlich Methotrexat (MTX), da von Genestier und Mitarbeitern (47) gezeigt werden konnte, dass MTX unter In-vitro-Bedingungen in der Lage ist, selektiv in aktivierten, nicht aber in ruhenden T-Lymphozyten die Apoptose zu induzieren. Auf dieser Erkenntnis basierte unser Vorhaben, ein einfach anwendbares, jederzeit reproduzierbares Depletionsverfahren zu etablieren, das es gleichzeitig zulässt, nicht-alloreaktive, immunkompetente T-Zellen zu erhalten. In einem zusätzlichen Schritt wurde beabsichtigt, die apoptotischen, alloreaktiven T-Zellen anhand geeigneter Nachweismethoden darzustellen und näher zu charakterisieren. Im Hinblick auf die Schonung der nicht-aktivierten T-Zellen, untersuchten wir die Wirksamkeit einer Folsäurelösung, von der

## Einleitung

berichtet wurde, dass sie in der Lage ist, den zytotoxischen Effekt von MTX aufzuheben (47). Unter Verfolgung desselben Ziels untersuchten wir die Möglichkeit, die CD95-vermittelte Apoptose, spezifisch in aktivierten T-Lymphozyten, zu induzieren und ebenfalls näher zu charakterisieren, da von Lenardo und Mitarbeitern (90) über eine selektive Sensitivität aktivierter T-Lymphozyten gegenüber diesem Apoptosemechanismus berichtet wurde. Zusätzlich fand die immunomagnetische Depletionsmethode Einzug in unsere Versuchsreihe. Die Depletion erfolgte anhand der Expression der Aktivierungsantigene CD25, CD69 und HLA-DR, die sich gegen aktivierte T-Zellen richtete. Nach Anwendung der verschiedenen Depletionsverfahren sollten die resultierenden Zellfraktionen hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression einzelner Aktivierungsantigene untersucht werden. Weiterhin wurde angestrebt, die depletierten Zellkulturen im Hinblick auf ihre proliferative Aktivität gegenüber spezifischen Antigenen, mitogenen Reagenzien und denselben allogenen Stimulatorzellen zu erfassen und diesbezüglich mit der jeweiligen Ausgangspopulation vor der immunomagnetischen Zellseparation bzw. mit der unbehandelten Lymphozytenmischkulturkultur zu vergleichen. Unser Anliegen war es, die drei eingesetzten Depletionsverfahren hinsichtlich ihrer Effektivität, Sensitivität und Handhabung zu vergleichen, um daraus die geeignetste Methode zu finden, die es ermöglicht, unter Bewahrung immunkompetenter T-Lymphozyten möglichst alle alloreaktiven T-Lymphozyten zu deletieren. Wir beabsichtigten des Weiteren, den Erfolg der unterschiedlichen Depletionsverfahren anhand der Eliminierung alloreaktiver, zytotoxischer CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten aufzuzeigen. Für dieses Vorhaben wurde ein Verfahren gewählt, mit dem es gelingen sollte, spezifische zytolytische Effektorfunktionen alloreaktiver CD8<sup>+</sup>T-Zellen nachzuweisen, sowie die zytotoxische Immunantwort nicht alloreaktiver CD8<sup>+</sup>T-Zellen gegen HLA-Antigene einer dritten Person darzustellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemein benötigte technische Geräte, Materialien und Reagenzien

Sterile Werkbank, Hera safe Hanau	Heräus Instruments GmbH,
Brutschrank, Hera cell Hanau	Heräus Instruments GmbH,
Laborzentrifuge	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Rotixa 50 RS</li><li>• Rotixa RP</li></ul>	
Drehschüttler	Snijders, Tilburg Niederlande
Vortexer VF2 Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik	
Bestrahlungsgerät:	MDS Nordion,
<ul style="list-style-type: none"><li>• GammaCell 1000 Elite CEO 120</li></ul>	Science Advancing Health, Ontario, Kanada
Durchflusszytometer, FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Blutanalysegerät:	Bayer, Leverkusen
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cellcounter Advia 120</li></ul>	
Lichtmikroskop, Olympus, CX40LF200	Olympus, Japan
und Olympus IX50	Olympus, Japan
Zellkulturmikroskop Olympus IM	Olympus, Japan
Trypanblau (0,4%)	Sigma, Deisenhofen
Neubauer Zählkammer	Kästner, München
Beheizbares Wasserbad	Memmet, Schwabach
Pipettiergerät, Pipettboy	Integra Bioscience, Schweiz



## Material und Methoden

Sterile Plastikpipetten (1,2,5,10,25 ml)	Greiner Sollingen/Frickenhausen
Pipetten	Glison, Frankreich oder Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg und Gilson, Frankreich
Plastikröhrchen, steril, 15 ml, 50 ml	Greiner Sollingen/Frickenhausen
Reaktionsgefäße, steril, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallentgaser Sonorex, Super RK 106	Bandelin
Bovine serum albumin (BSA), 30 %	Sigma, Deisenhofen

### **2.2 Materialien und Reagenzien für die Isolierung mononukleärer Zellen**

Butterfly-21	Abbott, Irland
Einmal-Injektionskanüle Microlane 3	Becton Dickinson, oder Braun Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritze, 1 ml-20 ml	B. Braun Melsungen AG,
Heparin-Natrium	
• Liquemin N 25.000, 5 ml	Roche, Grenzach Whylen
Bicoll Separating Solution, Ficoll	Biochrom KG, Berlin

### 2.3 Material und Reagenzien für die Zellkultur

PBS DULBECOS:

- Phosphat gepufferte Saline GIBCO BRL, Eggstein
- Gewebeskulturflaschen, 50 ml, 250 ml Becton, Dickinson, Heidelberg
- Zwölf-Loch-Kulturplatten Becton, Dickinson, Heidelberg

### 2.4 Zellkulturmedien

Als Nährmedium diente RPMI 1640 Medium mit folgenden Zusätzen:

- 500 ml RPMI 1640 Biochrom, Berlin
- 50 ml fetales Kälberserum(FCS) Seromed, Biochrom KG, Berlin
- 5 ml L-Glutamin (200 mM) Biochrom, Berlin
- 5 ml Penicillin (10000 U)/ Streptomycin Biochrom, Berlin  
(10 mg/ml)
- 12,5 ml Hepes-Puffer 1M Biochrom, Berlin

### 2.5 Wachstumsfaktoren

Interleukin-2 (IL-2) R&D Systems Inc., Minneapolis  
USA

Granulozyten-Makrophagen-  
Kolonie-stimulierender Faktor, (GM-CSF) R&D Systems Inc., Minneapolis  
USA

Tumor-Nekrose-Faktor-  $\alpha$ , (TNF-  $\alpha$ ) R&D Systems Inc., Minneapolis

Interferon-  $\gamma$ , (INF-  $\gamma$ ) R&D Systems Inc., Minneapolis

## Material und Methoden

Phythämagglutinin (PHA-M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim
Tetanus Toxoid, Tetanol	Behringwerke, Bad Homburg
Leucovorin-Lösung	Wyeth Pharma GmbH
10 mg/ml (Calciumfolinat)	Münster

### 2.5.1 Apoptose induzierende Reagenzien

Methotrexat-Lösung	Lederle
5 mg/ml	
Anti-CD95 (Fas-Antigen) monoklonaler	Becton Dickinson
Mausantikörper IgM	PharMingen

## 2.6 Material für die selektive Zellseparation

### 2.6.1 Puffer und Lösungen

Stammlösung: MACS-Puffer

- 500ml Phosphat gepufferte Saline (PBS)
- 10,6 ml EDTA (250 mM)
- 10ml Humanalbumin 20 %

Polyglobulin 5 %	Bayer
Goat-anti-MouseIgG Microbeads	Miltenyi Biotec

### 2.6.2 Geräte

Vario MACS-(Magnet)	Miltenyi Biotec
Separationssäule Typ LS+	Miltenyi Biotec

Tab.2.6.2-1

Antikörper	Bezeichnung	Markierung	Hersteller
CD 25 Microbeads	Anti-IL-2 R	nicht fluoreszierend	Miltenyi Biotec
CD69 IgG	Early Activation Antigen	nicht fluoreszierend	Becton Dickinson, Heidelberg
HLA-DR Microbeads	MHC-Klasse II Antigen	nicht fluoreszierend	Miltenyi Biotec

## 2.7 Material und Reagenzien für die Durchflusszytometrie

### 2.7.1 Puffer und Lösungen

Stammlösung: FACS - Puffer

- 500 ML Phosphat gepufferte Saline (PBS) GIBCO BRL, Eggstein
- 1,6 ml Bovine serum albumin (BSA) 30 % Sigma, Deisenhofen
- 5ml Natriumazid, 10 % Sigma, Deisenhofen

### 2.7.2 Geräte

FACS-Calibur	Becton Dickinson
Angeschlossene Hardware	Apple
Auswertungsprogramm CellQuest	Becton Dickinson
Analyseröhrchen (5 ml,Rundboden)	Becton Dickinson

### 2.7.3 Antikörper zur Expressionsanalyse von Zellpopulationen

#### 2.7.4

Tab. 2.5.3-2

Monoklonale Antikörper

Antikörper	Subtyp	Klon	Markierung	Hersteller
Kontrollantikörper g <sub>1</sub> /g <sub>2</sub>	IgG <sub>1</sub> IgG <sub>2a</sub>	X40 bzw. X39	FITC, PE	Becton Dickinson
CD 3	IgG <sub>1</sub>	UCHT1	APC, PerCP	Becton Dickinson
CD 25	IgG <sub>1</sub>	M-A251	FITC	Becton Dickinson
CD 69	IgG <sub>1</sub>	FN50	FITC	Becton Dickinson
HLA-DR	IgG <sub>2a</sub>	G46-6	PE	Becton Dickinson
CD 95	IgG <sub>1</sub>	DX2	PE	Becton Dickinson

### 2.7.5 Antikörper und Reagenzien zur Analyse der Apoptose

Tab.2.5.4-3

Antikörper	Subtyp	Klon	Markierung	Hersteller
CD3	IgG1	UCHT1	APC	Becton Dickinson
CD 95	IgG1	DX2	PE	Becton Dickinson
HLA-DR	IgG2a	G46-6	PE	Becton Dickinson

## Material und Methoden

Annexin V-Fluorescein	Roche Diagnostics GmbH Mannheim
Propidiumiodid	Roche Diagnostics GmbH
Inkubationspuffer	Roche Diagnostics GmbH
PBS DULBECO`S	
Phosphat-gepufferte Saline	GIBCO BRL Eggstein

### **2.8 Material und Reagenzien für den Zytotoxtest**

Sonifer Cell Disruptor B-12	Branson Sonic Power
Victor 1420 Multilabel Counter	Wallac
Angeschlossene Hardware	Compaq
Software Wallac 1420 Workstation	Wallac
96-Loch-Mikrotiterplatten, Cellstar (Flachboden, Rundboden)	Greiner
BDTA-Ligand	Wallac
Europium-Lösung	Wallac
Lyse-Puffer	Wallac

### **2.9 Material und Reagenzien für den Thymidin(6-H3)-Proliferation-Assay**

96-Loch-Mikrotiterplatten, Cellstar, (Rundboden)	Greiner
Tritium-Thymidin (6-H3), 1 mCi/ml	Amersham, Pharmacia, Biotech, UK

## Material und Methoden

Szintillationslösung	Wallac Turku, Finnland
1205-440 Betaplate Scint	
Harvester, Tomtec	Wallac Turku, Finnland
Filterpapier, 1450-241 Printed Filtermat A	Wallac Turku, Finnland
Tomec	
Mikrowelle	Siemens
Einschweißgerät 1295-012 Heat Sealer	Wallac Turku, Finnland
Folien, 1450-432 Sample Bag	Perkin Elmer, Life Science
Kassetten, 1450-Filtermate-Cassette	Wallac, Turku, Finnland
Zählgerät, 1450 MicroBeta Trilux,	Wallac, Turku, Finnland
Liquid scintillation and luminescence counter	
Software	MicroBeta Windows Work Station

## 2.10 Zellisolierung

### 2.10.1 Blutproben

Zur Herstellung einer Lymphozytenmischkultur (MLC) wurden Responder- und bestrahlte Stimulatorzellen eingesetzt.

Hierzu wurde peripherenöses Vollblut von freiwilligen, gesunden, nicht-HLA-identischen Spendern verwendet. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen unter der Nummer 14/2001 lag vor.

### **2.10.2 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen**

Die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque erlaubt die Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen (pMNC) durch Trennung peripherer mononukleärer Zellen und anderer Blutzellen aufgrund der Dichteunterschiede der verschiedenen Zellen. Thrombozyten und pMNC haben eine geringere Dichte als Ficoll-Hypaque und sammeln sich auf der Ficollschicht an, während z.B. Erythrozyten und Granulozyten eine höhere Dichte haben und sich deshalb unterhalb der Ficollschicht absetzen.

Heparinisiertes Vollblut wurde in einem sterilen 50ml Plastikröhrchen (Falcon, Becton Dickinson) mit PBS DULBECO`S (GIBCO BRL, Eggstein) im Verhältnis 1:2 verdünnt. In ein weiteres 50 ml Plastikröhrchen wurden 15 ml Ficoll (Bicoll Saporating Solution, Biochrom KG Berlin) vorgelegt.

35ml des verdünnten Vollblutes wurden mit einer Pipette vorsichtig auf die Ficollschicht aufgeschichtet. Das Röhrchen wurde 30 min lang bei einer Temperatur von 20°C, einer Anlaufzeit von 100 s, einer Umdrehungszahl von 800 g, sowie einem Auslauf (Bremse); Stufe 2 zentrifugiert (Rotixa 50 RS, Hettich).

Nach erfolgter Zentrifugation befand sich in der obersten Schicht das Plasma und die Thrombozyten, welche mit einer sterilen Pipette entfernt und verworfen wurden. Unterhalb dieser Schicht trat ein weißer Ring zum Vorschein, es handelte sich hierbei um eine Schicht bestehend aus mononukleären Zellen z.B. B- und T-Lymphozyten, Monozyten und wenige mononukleäre Vorläuferzellen. Diese Schicht wurde vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgesaugt und in ein steriles 50ml Plastikröhrchen überführt, dieses wurde anschließend mit PBS aufgefüllt und erneut bei 400 g für 10 min bei einer Temperatur von 10°C und einem Auslauf (Bremse) Stufe 9 zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt und das Zellpellet resuspendiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt und das Zellpellet zum Schluss in Medium RPMI 1640 aufgenommen.



### 2.11 Zellkultivierung

#### 2.11.1 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer (Neubauer Improved Assistent Bright Line, Germany). Die Zellsuspension wurde hierzu mit Trypanblau (trypan blue solutin 0,4 %, sigma chemicals co) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Diese Färbung ermöglichte es, vitale Zellen von toten Zellen zu unterscheiden, da die Zellmembranen toter Zellen durchlässiger werden und das Trypanblau aufnehmen und daher als unförmige blaue Punkte imponieren. Vitale Zellen dagegen leuchten unter dem Mikroskop hell auf und können folglich in je vier Großquadranten ausgezählt werden. Des Weiteren konnte die Zellzahl mittels eines automatischen Zählgeräts (Advia 120, Bayer Leverkusen) bestimmt werden. Hierbei wurde das von jeder einzelnen Zelle ausgesandte Streulicht sowie deren Peroxidaseaktivität erfasst, diese präzise Messmethode ermöglichte neben der Zellzahlbestimmung auch eine Zelldifferenzierung.

#### 2.11.2 Kultursysteme für Responder und Stimulatorzellen

##### 2.11.2.1 Kultivierung der Stimulator- und Responderzellen in serumhaltigem Medium

Nach dem Isolierungsverfahren und der Zellzahlbestimmung lagen die pMNC zunächst in PBS resuspendiert vor. Es wurde angestrebt, eine Zelldichte von  $2 \times 10^6$  pMNC/ ml in der jeweiligen Zellkultur zu erreichen, dies erfolgte durch Anpassung des Volumens des Mediums (RPMI 1640, versetzt mit 10 % hAB Serum) an die Ausgangszellzahl. Die anschließende Kultivierung wurde in Polystyrenkulturflaschen (Falcon, Becon Dickinson) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Hera cell, Heraeus Instruments GmbH) und einer durchschnittlichen Kulturdauer von 12 Stunden vorgenommen.

Während dieser Zeit wurden ausschließlich die Stimulatorzellen mit Zytokinen (Tumor-Nekrose-Faktor-  $\alpha$ , (TNF-  $\alpha$ ) Genzyme, West Malling, Kent, UK, und Interferon-  $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ) (Genzyme, West Malling, Kent, UK) für 12 Stunden inkubiert.

### **2.11.3 Lymphozytenmischkultur MLC (mixed lymphocyte culture)**

Mit Hilfe einer MLC können T-Lymphozyten durch allogene Stimulatorzellen aktiviert werden. Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt aufgrund von Unterschieden der HLA-Antigene. Dabei besteht eine positive Korrelation zwischen der Aktivität und der Diversität der MHC-Moleküle. Unter bestimmten Umständen wird auch eine Reaktion zwischen HLA-identischen Zellen beobachtet, dies ist auf die Stimulierung so genannter Minor-Histokompatibilitätsantigene zurückzuführen. In unserer Versuchsanordnung basierte die MLC auf dem Reaktionsnachweis der T-Zellen eines Reaktionspartners (Responder) mit den Stimulatorzellen eines anderen Partners. Dafür wurden die Stimulatorzellen bestrahlt, um ihre Proliferation und Reaktionsfähigkeit zu verhindern. Zur Verstärkung der Reaktion wurden die verwendeten Stimulatorzellen über Nacht mit jeweils 100 U/ml (TNF-  $\alpha$ ) und (INF-  $\gamma$ ) inkubiert und anschließend mit einer Strahlendosis von 30 Gy in einem Bestrahlungsgerät (Gammacell 1000 Elite CEO 120, MDS Norton) bestrahlt. Dann wurden Responder- und Stimulatorzellen im Verhältnis 1:1 in die gemischte Lymphozytenkultur eingesetzt. Die MLC wurde nach dreitägiger Kultivierung mit IL-2 (10 U/ml) stimuliert.

### **2.12 Die Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe von Methotrexat und Anti-CD95**

#### **2.12.1 Methotrexat Verdünnungsreihe**

##### **2.12.1.1 Hintergrund**

Methotrexat ist ein Folsäureanalogon und vermag unter anderem das Enzym Dihydrofolatreduktase zu hemmen, das eine entscheidende Funktion in der Thymidinnukleotidbiosynthese hat. Daraus resultieren Störungen zellulärer Funktionen, insbesondere der DNA-Replikation, die während der Zellteilung eine entscheidende Rolle spielen. Methotrexat vermag in sich teilenden Zellen die Apoptose zu induzieren. Angesichts dieser Tatsache basierte die Depletion alloreaktiver T-Zellen auf der gezielten Generierung alloreaktiver T-Lymphozyten in einer Lymphozytenmischkultur und gleichzeitiger Exposition

gegenüber Methotrexat. Ziel unseres Versuchs war es ausschließlich, die alloreaktiven T-Zellen zu erfassen und die ruhenden, nicht alloreaktiven Zellen zu erhalten. Um diejenige Konzentration zu ermitteln, bei der Methotrexat seine Wirkung effektiv entfalten konnte, wurde zuvor eine Verdünnungsreihe aufgestellt.

### **2.12.1.2 Durchführung**

Aus der Methotrexat-Lösung 2,5 mg/ml (Lederle) wurden 1,8 µl mit einer sterilen Pipettenspitze (Glison) in ein steriles 15 ml Plastikröhrchen (Falcon Becton Dickinson), in das zuvor 1 ml Medium RPMI 1640 pipettiert wurden, überführt. Diese Stocklösung enthielt eine 10 µmolare Methotrexatkonzentration und wurde als Ausgangskonzentration verwendet.

Für die Verdünnungsreihe wurden 7 sterile 15 ml Plastikröhrchen verwendet. In jedes dieser Röhrchen wurde 1000 µl Medium vorgelegt. Es wurde mit Zehnerlogarithmischen Verdünnungsschritten verfahren. Dabei wurden in das erste Röhrchen 100 µl aus der Stocklösung pipettiert, mehrmals resuspendiert und davon weitere 100 µl in das nächste Röhrchen überführt und abermals ausreichend resuspendiert. Diese Schritte wurden bis einschließlich des letzten Röhrchens wiederholt. Die Maximalkonzentration lag bei 10 µM/l und verringerte sich nach 7 zehnerlogarithmischen Verdünnungsschritten auf eine Konzentration von 0,000001 µM/l.

In eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden jeweils 50 µl einer Lymphozytenmischkultur pipettiert. In je ein Loch eines Triplets wurde 100 µl der einzelnen absteigenden Methotrexatkonzentration überführt. Dieser Ansatz wurde für 6. Tage im Brutschrank kultiviert.

### **2.12.2 Leucovorin- (10-Formyltetrahydrofolsäure/Folinsäure) Verdünnungsreihe**

#### **2.12.2.1 Hintergrund**

Die Leucovorin ist ein Derivat der Folsäure, einem Coenzym das unter anderem beteiligt ist an vielen Biosynthesewegen. Besondere Bedeutung hat die Folsäure hinsichtlich ihrer maßgeblichen Beteiligung am Aufbau von Purin und Pyrimidinbasen, der Bausteine der DNA. Leucovorin vermag die apoptoseinduzierende Wirkung von Methotrexat vollständig aufzuheben, wenn es in ausreichend hoher Konzentration verabreicht wird. Um die effektive Leucovorin-Konzentration zu ermitteln, die in der Lage ist, Methotrexat vollständig zu neutralisieren, wurde ebenfalls eine Leucovorin-Verdünnungsreihe aufgestellt.

#### **2.12.2.2 Durchführung**

Aus der Leucovorin-Lösung (Calciumfolinat 10 mg/ml) wurden 100 µl mit einer sterilen Pipette in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt, in welchem zuvor 1 ml Medium vorgelegt wurden. Diese Lösung enthielt eine Leucovorin-Konzentration von 1mg/ml, daraus wurden 4,5 µl in ein 15 ml Plastikröhrchen, das 1 ml Medium RPMI 1640 enthielt, pipettiert. Diese Stocklösung enthielt eine 10 µmolare Leucovorin-Konzentration und wurde als Ausgangskonzentration verwendet.

Für die Verdünnungsreihe wurden ebenfalls 7 sterile 15 ml-Plastikröhrchen verwendet. In jedes dieser Röhrchen wurden 1000 µl Medium vorgelegt. Es wurde abermals mit zehnerlogarithmischen Verdünnungsschritten verfahren. Dabei wurde in das erste Röhrchen 100 µl aus der Stocklösung pipettiert, mehrmals resuspendiert und davon weitere 100 µl in das nächste Röhrchen überführt. Diese Schritte wurden bis einschließlich des letzten Röhrchens weiter verfolgt. Die Maximalkonzentration lag bei 10 µM/l und verringerte sich auf eine Konzentration von 0,000001 µM/l.

Anschließend wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatteplatte 50 µl einer mit Methotrexat versetzten Lymphozytenmischkultur (die Methotrexat-Konzentration wurde auf 10 µM/l eingestellt) pipettiert. In jedes Triplet wurden 100 µl der einzelnen absteigenden Leucovorin-Konzentration überführt. Dieser Ansatz wurde für 6 Tage im Brutschrank kultiviert.

### 2.12.3 Anti-CD95 monoklonaler Mausantikörper

#### 2.12.3.1 Hintergrund

CD95 monoklonaler Mausantikörper (IgM, $\kappa$ ) reagiert mit einem 45Kd Membranmolekül, welches auch bekannt ist unter der Bezeichnung APO-1, oder Fas-Antigen. CD95-R gehört zu der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie (TNF-R) und wird auf den unterschiedlichsten Zellen exprimiert, einschließlich auf aktivierten T-Zellen und B-Zellen. Die Interaktion zwischen dem Fas-Antigen und dem Fas-Liganden ist eine der vielen Mechanismen, die zur Apoptose, dem programmierten Zelltod führen.

#### 2.12.4 Entwicklung alternativer Depletionsverfahren unter Verwendung von Methotrexat und Anti-CD95 Antikörpern

Nach Übernachtinkubation der Stimulatorzellen mit Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und anschließender Bestrahlung wurden die Responder- und Stimulatorzellen im Verhältnis 1:1 in sterile Polystyrenkulturflaschen (50 ml) in einem Volumen von jeweils 20 ml in die Lymphozytenmischkultur eingesetzt. In der ersten Versuchsreihe wurden der primären MLC 36  $\mu$ l der Methotrexat-Lösung zugeführt, gemäß der zuvor ermittelten, effektiven Konzentration von 10  $\mu$ M/l. Anschließend erfolgte eine Inkubationsphase von fünf Tagen, darauf folgte die sekundäre Restimulierung (*Nähere Erläuterung dieser Methode siehe unten*). Die Weiterentwicklung des Verfahrens sah vor, dass die primäre MLC nach einer Inkubationsphase von vier Tagen unter Anwesenheit von MTX zuerst gewaschen und anschließend in frischem Medium für weitere 24 h kultiviert wurde. Darauf folgte die sekundäre MLC. In einem ergänzenden Schritt wurde die primäre MLC für 48 h in Anwesenheit von MTX kultiviert und anschließend gewaschen. Nachfolgend wurde der Ansatz für weitere 48 h in frischem Medium aufgenommen. Eine erneute Veränderung erfuhr die Depletionsmethode, indem die primäre MLC im Anschluss an eine dreitägige Kultivierungsphase mit der Methotrexat-Lösung behandelt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die Zellkultur gewaschen und für weitere zwei Tage in frischem Medium kultiviert. Des Weiteren wurde dem MLC-Ansatz 100  $\mu$ l/l der Leucovorin-Lösung (Calciumfolinat) zugeführt. Einem Kontroll-Ansatz wurde nichts hinzugefügt. Für den MLC-Ansatz, der mit Anti-CD95 behandelt wurde, kam eine 12-Loch-Kulturplatte zum Einsatz. In jedes Loch wurden 2 ml der Lymphozytenmischkultur überführt. Zuvor wurde jedes der Löcher mit einem monoklonalen Goat anti Mouse

## Material und Methoden

Antikörper beschichtet. Anschließend wurde der monoklonale Anti-CD95-Antikörper eingesetzt. Davon wurden in jedes Loch 4  $\mu$ l pipetiert. Die Beschichtung der Kulturplatte mit einem Goat-anti-Mouse IgG Antikörper sollte zu einer verbesserten Quervernetzung der CD95 monoklonalen IgM Antikörper beitragen, die an Fas-Rezeptoren der Zellmembran binden. Diese Interaktion ist von entscheidender Bedeutung für eine effektive Initiierung des Apoptosesignals. Ein weiterer MLC-Ansatz wurde für die immunomagnetische Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten verwendet (*Beschreibung der Methode siehe unten*).

Alle unterschiedlichen primären MLC-Ansätze wurden nach dreitägiger Kultivierung mit IL-2 (10 U/ml) stimuliert.

Am fünften Tag nach dem Ansetzen der Lymphozytenmischkultur wurden alle Ansätze in ein steriles 50 ml Plastikröhrchen überführt, mit PBS bis zur Markierung aufgefüllt und anschließend abzentrifugiert (10 °C, 300 g, 10 min, Auslauf mit starker Bremse: Stufe 9). Das Zellsediment wurde mit jeweils 10 ml Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt, wobei angestrebt wurde; in jedem Ansatz eine Zelldichte von  $2 \times 10^6$  PMNC/ml zu erreichen.

### **2.12.5 Restimulierung der Lymphozytenmischkultur**

Am Tag fünf nach dem Ansetzen der primären MLC wurden erneut periphere mononukleäre Zellen (PBMC) aus zuvor bereitgestelltem heparinisiertem Vollblut mit Hilfe der Dichtezentrifugation gewonnen. Es wurden die gleichen Stimulator- und Responderzellen verwendet. Des Weiteren wurden periphere mononukleäre Zellen eines dritten Probanden isoliert. Nach erfolgtem Isolierungsverfahren und Einstellung der Zellzahl auf  $2 \times 10^6$  PMNC/ml, wurden die Stimulatorzellen und die „third party“ Zellen, die ebenfalls zur Stimulation der Responderzellen dienten mit je 100 U/l (TNF- $\alpha$ ) und (INF- $\gamma$ ) über zwölf Stunden inkubiert. Am sechsten Tag nach dem Ansetzen der primären MLC wurden auf eine sterile 96-Loch-Mikrotiterkulturplatte jeweils 100  $\mu$ l der verschiedenen MLC-Ansätzen pipetiert. Im Anschluss wurden die präparierten, mit etwa 3000 cGy bestrahlten Stimulatorzellen, sowie weitere stimulatorisch wirkende Reagenzien zu den drei Ansätzen auf die Kulturplatte überführt. Die Restimulation erfolgte für weitere fünf Tage. Es ergab sich im Einzelnen folgendes Belegungsmuster:

Tab. 2.10.5.-4

A/B* Methotrexat und Folsäure	A/B* +Anti-CD95 Antikörper	A/B* nach Depletion	A/B* Kontrolle
A/B*+MTX+FS	A/B*+Anti-CD95	A/B* nach Depletion	A/B*
A/B*+MTX+FS +A*	A/B*+Anti-CD95 +A*	A/B* nach Depletion +A*	A/B*+A*
A/B*+MTX+FS +B*	A/B*+Anti-CD95 +B*	A/B* nach Depletion +B*	A/B*+B*
A/B*+MTX+FS +C*	A/B*+Anti-CD95 +C*	A/B* nach Depletion +C*	A/B*+C*
A/B*+MTX+FS +Tetanus Toxoid	A/B*+Anti-CD95 +Tetanus Toxoid	A/B* nach Depletion + Tetanus Toxoid	A/B* + Tetanus Toxoid
A/B*+MTX+FS +PHA	A/B*+Anti-CD95 + PHA	A/B* nach Depletion +PHA	A/B*+PHA

Legende (ein Kästchen entspricht einem Triplett):

A/B\*:primäre MLC:

A:Responderzellen

B:Stimulatorzellen

A\*:Restimulation mit autologen bestrahlten PMNC

B\*Restimulation mit allogenen bestrahlten PMNC

C\*Restimulation mit bestrahlten „third party“ -Zellen

Tetanustoxoid:formalinisiertes Toxin des Bakteriums Clostridium tetani

PHA (Phytohämagglutinin) Mitogen aus der Gartenbohne (Phaseolus vulgaris)

## 2.13 Die Depletion alloreaktiver T-Zellen mit Hilfe des MACS-Systems

### 2.13.1 Hintergrund

“Magnetic-activated cell sorting” erlaubt die Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe immunomagnetischer Substanzen. Dazu markiert man die zu depletierenden aktivierten T-Lymphozyten mit einem monoklonalen Antikörper, der an Epitope bindet, die für diese Zellen charakteristisch sind. In unserer Versuchsanordnung waren dies gegen CD69, CD25 und HLA-DR gerichtete Antikörper, da diese Membranmoleküle sehr stark auf aktivierten Zellen exprimiert werden. Diese Antikörper sind mit kleinen Metallpartikeln konjugiert, die magnetisch sind. Lässt man das Zellgemisch nun über eine Trennsäule laufen, die mit einer paramagnetischen Eisenmatrix gefüllt ist und sich in einem starken Magnetfeld befindet, bleiben die magnetisch markierten Zellen in der Säule hängen, während sich die Negativfraktion auswaschen lässt. Entfernt man

danach die Säule aus dem Magnetfeld, lassen sich die markierten Zellen als Positivfraktion aus der Säule eluieren.

### **2.13.2 Durchführung der MACS-Depletion**

Am dritten Tag nach dem Ansetzen der Lymphozytenmischkultur erfolgte die Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten. Um anschließend Aussagen über die Ausgangssituation machen zu können, wurde aus der zu depletierenden Lymphozytenmischkultur ein kleines Volumen für die Durchflusszytometrie entnommen.

Zu Beginn wurden die MLC abzentrifugiert, die Zellsuspension in MACS-Puffer aufgenommen und die Zellen auf eine Dichte von 100 Mio/ml eingestellt.

Alle nun folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Es folgte die Inkubation mit 50 µl/ml Polyglobulin für 10 min, um unpezifische Bindungsstellen abzusättigen:

Nächster Schritt war die Inkubation mit CD69 monoklonaler Antikörper für 20 min auf dem Schüttler, wobei 20 µl Antikörper für  $1 \times 10^7$  Zellen verwendet wurden bei einer Zelldichte von 100 Mio/ml entspricht dies 200 µl für 1 ml Zellsuspension.

Im Anschluss wurden die Zellen mit zuvor entgastem MACS-Puffer bei 300 g für 10 min, bei 10°C gewaschen.

Das Zellpallet wurde erneut mit MACS-Puffer auf eine Zelldichte von 100 Mio/ml eingestellt.

Es folgte die Inkubation mit jeweils 200 µl CD25, HLA-DR und Goat anti Mouse Micro Beads, für weitere 20 min.

Das Zellpellet wurde mit 7 ml entgastem Puffer resuspendiert.

Darauf folgte die Installation der Trennsäule (VS) im Vario MACS und das Spülen derselben mit 10 ml entgastem MACS-Puffer.

Des Weiteren wurde die Zellsuspension langsam auf die Säule aufgetragen und vollständig durch die Säule laufen gelassen, dabei musste darauf geachtet werden, dass die Säule niemals leer wurde.

Nach erfolgtem Durchlauf wurde erneut mit dem 5-fachen Ausgangsvolumen des Puffers gespült, um unmarkierte Zellen zu entfernen.



## Material und Methoden

Die Säule wurde aus dem Magneten entfernt, auf ein 50 ml Plastikröhrchen aufgesetzt, mit 7ml Puffer aufgefüllt, um diesen danach mit dem Stempel schnell und kräftig durch die Säule zu drücken, damit die Zellen aus der Säule ausgespült werden konnten.

Sowohl die depletierte als auch die gewonnene Positivfraktion wurden abermals mit MACS-Puffer bei 300 g für 10 min gewaschen und anschließend in dem selben Puffer resuspendiert.

Diese Zellen wurden erneut in der Zählkammer oder am Zählgerät gezählt und auf eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$ /ml eingestellt.

Ein kleines Volumen dieser Zellfraktionen wurde für die Durchflusszytometrie verwendet.

Die in Medium resuspendierte, depletierte MLC wurde anschließend ebenfalls auf die 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und mit den zuvor präparierten Stimulatorzellen und weiteren stimulatorisch wirkenden Reagenzien behandelt.

### **2.14 Zellanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie**

#### **2.14.1 Hintergrund**

Durch die Durchflusszytometrie (FACS=Fluorescence Activated-Cell-Sorter) ist es möglich, einzelne Zellen zu charakterisieren und zu quantifizieren, dies geschieht auf Grund ihrer spezifischen Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Zur Analyse wird die jeweilige Zellsuspension über eine Stahlkapillare mittels Überdruck in eine Messküvette befördert. Beim Eintreffen in die Messkammer werden die Zellen stark verdünnt, dies ermöglicht eine Vereinzelung und Ausrichtung der Einzelzellen, die dadurch sequentiell den Analysepunkt erreichen, an welchem sie von einem Laser erfasst und durchstrahlt werden können. In der analytischen Durchflusszytometrie werden zum einen der Argon-Ionenlaser, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert, und zum anderen der Helium-Neon-Laser verwendet, der Licht einer Wellenlänge von 635 nm erzeugt.

#### **2.14.2 Messung der Lichtstreuung**

Trifft ein Laserstrahl eine Zelle, so wird der ausgesandte Lichtstrahl entweder gebrochen, gestreut oder gebeugt. Diese Lichtstreuung wird im wesentlichen von der Zellgröße, der Oberflächenstruktur sowie der intrazellulären Beschaffenheit jeder

einzelnen Zelle beeinflusst. Mit Hilfe so genannter Photomultiplier erfolgt die Messung der Lichtstreuung.

Die mit dieser Methode ermittelten Werte für das seitwärtsgerichtete (Sideward Scatter, y-Achse) und vorwärtsgerichtete (Forward Scatter, x-Achse) Streulicht, werden in einem zweidimensionalen Diagramm wiedergegeben.

### Forward Scatter (FSC):

Die Vorwärtsstreuung stellt ein Maß für die Zellgröße dar.

### Sideward Scatter (SSC):

Die Seitwärtsstreuung spiegelt die intrazelluläre Granulierung, die Oberflächenmorphologie der einzelnen analysierten Zelle wieder.

### **2.14.3 Messung der Fluoreszenz**

Des Weiteren besteht die Möglichkeit Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren, um sie noch exakter charakterisieren und bestimmten Zellpopulationen zuordnen zu können. Dies lässt sich zum einen erreichen, indem die zu analysierenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern inkubiert werden, die gegen zellspezifische Oberflächenantigene gerichtet sind. Darüber hinaus kann mittels Fluoreszenzfarbstoffen die nicht primär an Antikörper sondern an bestimmte  $\text{Ca}^{+}$ -abhängige Phospholipid-bindende Proteine gekoppelt sind, wie z.B. Annexin V, der programmierte Zelltod in einzelnen Zellen identifiziert und untersucht werden. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv die DNA nekrotischer Zelle anfärbt. Abhängig vom jeweils verwendeten Fluoreszenzfarbstoff wird Licht einer bestimmten Wellenlänge erzeugt, es ist daher möglich eine einzelne Zelle mit verschiedenen Fluoreszenzantikörpern bzw. Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren und zu detektieren. Bei dem von uns verwendeten Gerät können mit 2 Lasern bis zu vier verschiedene Farbstoffe detektiert werden.

### Fluoreszenz 1 (Fl-1):

Fluoreszinoisothiocyanat (FITC) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der, angeregt durch einen Argon-Ionen-Laser im Wellenlängenbereich von 488 nm Fluoreszenzen mit einem Maximum bei 520 nm emittieren kann. Unter Verwendung eines Filters, der Farbstoffe

mit einer Emissionswellenlänge von ca. 530 nm erfasst, kann dieser Farbstoffe erkannt werden.

### Fluoreszenz 2 (FI-2):

Phycoerythrin (PE) mit einem Emissionsmaximum bei 576 nm kann, ebenfalls mit Hilfe eines Filters, der alle Farbstoffe im Wellenlängenbereich von ca.575 nm erfasst, erkannt werden.

### Fluoreszenz 3 (FI-3):

Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Propidiumiodid (PI) werden mittels eines weiteren Filters (Long Pass Filter) erfasst.

### Fluoreszenz 4 (FI-4):

Allophycocyanin (APC, angeregt durch einen He-Ne-Laser bei 635 nm) mit einem Absorptionsmaximum im Bereich von 650 nm und einem Emissionsmaximum im Bereich von 660 nm, wird durch einen Filter, der Licht im Wellenlängenbereich von ca.660 nm absorbiert, erfasst.

#### **2.14.4 Durchführung**

Die zu analysierenden Zellsuspensionen, bestehend aus vorwiegend mononukleären Zellen nach Kultivierung in verschiedenen Kultursystemen, wurden in Polystyren-Rundboden-Plastikröhrchen überführt, anschließend erfolgte die Zugabe der jeweiligen Antikörper (je 5-10 µl). Danach erfolgte eine Inkubationszeit von 10 min, bei 4°C, unter Lichtabschluss im Kühlschrank. Es folgte die Waschung der Zellen mit 2 ml FACS-Puffer (PBS mit 0,1 % BSA und 0,1 % Natriumazid) für 10 min, bei 400 g und 4°C . Nachdem der Überstand dekantiert und die Zellsuspension resuspendiert wurde, konnte die Messung am FACS-Calibur (Fluorescence-ActivatedCell Analyser) durchgeführt werden. Zur Einstellung des Bezugspunktes wurden immer Messungen mit Negativ-und Positivkontrollen durchgeführt.

Zur Detektion und Quantifizierung von Apoptosevorgängen sowie der Abgrenzung gegenüber dem Nekrorestadium der einzelnen Zelle, wurde ebenfalls die Durchflusszytometrie eingesetzt. Dabei wurde zur Darstellung apoptotischer Zellen Fluoreszinoisothiocyanat (FITC)-markiertes Annexin V verwendet. Dieses Protein besitzt eine hohe Affinität für Phosphatidylserin, einem Membranphospholipid, welches nur im

## Material und Methoden

frühen Stadium der Apoptose zur Darstellung kommt. Hinsichtlich der Abgrenzung gegenüber nekrotischen Zellen, die sich ebenfalls mit Annexin V anfärben, wurde ein anderer Fluoreszenzfarbstoff, nämlich Propidiumiodid, verwendet, der ausschließlich die DNA nekrotischer Zellen markiert. Die Zellen wurden speziell für diese Analyse keinem der bisher beschriebenen Kultursysteme entnommen. Hierfür wurden periphere mononukleäre Zellen nach Isolierung mit PHA (5 %) und IL-2 stimuliert und nach viertägiger Kultivierung mit Apoptose-induzierenden Reagenzien (Methotrexat und Anti-CD95 monoklonaler Mausantikörper) behandelt. Diese Ansätze wurden nach 48 Stunden für die Messung der Fluoreszenz vorbereitet. Dabei wurden die Zellsuspensionen zuerst mit 2 ml PBS bei 200 g, 20°C, 5 Minuten lang gewaschen. Alle darauf folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um einer weiteren Progression der Apoptose entgegen zu wirken. Im Anschluss wurden alle Ansätze mit 100 µl Inkubationspuffer resuspendiert. Nach erfolgter Fluoreszenzfarbstoffzugabe (1µl Annexin V/Propidiumiodid/100 µl Zellsuspension) schloss sich eine 10 Minuten lange Inkubationphase an.

### **2.14.5 Auswertung**

Zur computergestützten Datenverarbeitung wurden die Softwareprogramme Cell Quest und WinMDI (Joseph Trotter, 1993-2000); Version 2.8 eingesetzt. Die Klassifizierung einzelner mononukleärer Zellen erfolgte mit Hilfe der „Dot blot“ sowie der „Density blot“ Darstellung von Streulichtsignalen im Vorwärts- (FSC, forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter). Zunächst wurden alle Zellen entsprechend ihrer Größe und Granulierung in einem zweidimensionalen Diagramm graphisch dargestellt. Von dieser Darstellung ausgehend konnte nun die Lymphozytenpopulation weiter analysiert werden, indem ein so genanntes Gate auf die vitale Lymphozytenpopulation gesetzt wurde. Die bestrahlten Stimulatorzellen unterlagen zu diesem Zeitpunkt bereits apoptotischen Prozessen und waren daher nicht mehr im Gate der vitalen Lymphozyten lokalisiert, folglich wurden hauptsächlich die Responderzellen analysiert. Durch die Verwendung von zwei oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen erschienen die Messdaten auch als zweidimensionales Streudiagramm, wobei in diesem Fall die Fluoreszenzfarbstoffe gegeneinander aufgetragen und graphisch dargestellt wurden. Um die Messdaten statistisch erfassen zu können, wurde die Darstellung in vier Quadranten eingeteilt und mittels einer Quadrantenstatistik ausgewertet, dies ermöglichte die prozentuale Ermittlung der spezifischen Fluoreszenzsignale in den einzelnen Quadranten.

### **2.15 (6-H3)-Thymidin-Proliferationsassay**

#### **2.15.1 Hintergrund**

Thymidin ist ein Nukleosidbaustein der DNA und kann während der Replikationsphase des Zellzyklus (S-Phase) in den DNA-Strang eingebaut werden. Die Analyse der Einbaurrate erlaubt es, eine Aussage über die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu machen. Hierbei wird die von dem radioaktiv markierten Thymidin ausgehende  $\beta$ -Strahlung von einem Analysegerät detektiert und quantifiziert. Dieser Proliferationsassay lässt keine Aussage über die Teilungsfähigkeit der einzelnen Zelle zu, sondern vermittelt einen Eindruck über die Gesamtheit der sich teilenden Zellen.

#### **2.15.2 Durchführung**

Am Tag fünf nach dem Ansetzen der sekundären MLC wurden in jedes der Löcher der 96-Loch-Rundbodenplatte 20  $\mu$ l (6-H3)-Thymidin (Amersham Pharmacia Biotech, UK), das zuvor mit Medium im Verhältnis von 1:20 verdünnt worden war, gegeben und die Kulturplatten im Anschluss für 12 Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Kulturphase konnten die proliferierenden Zellen das Thymidin in ihre DNA einbauen. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Kulturplatten bei  $^{\circ}$ 20C eingefroren. Die Kälteeinwirkung bewirkte eine Zerstörung der Zellmembran, wodurch die DNA freigelegt wurde. Die einzelnen Kulturansätze wurden nach einer Auftauphase mit Hilfe eines Harvesters (Tomec Harvester, Wallac, Turku; Finnland) durch ein Filterpapier (1450-421 Printed Filtermate A, Tomec) gespült, dabei kam es zu Adhärenzvorgängen der freigelegten DNA der Zellfragmente an den Glasfasern des Filters. Anschließend wurden die Filterpapiere in einer Mikrowelle getrocknet, in Plastikfolien (1450-432 Sample Bag, Perkin Elmer, Life Science) eingeschweißt (1295-012 Heat Sealer) und nachfolgend mit Scintillationsflüssigkeit (1205-440 Betaplate Scint Scintillation Cocktail, Wallac) beschichtet. Diese Filterpapiere wurden nun in Kassetten (1450-104 Filtermate Cassette, Wallac) eingelegt und in ein Zählgerät (1450 MicroBeta Trilux, Liquid Scintillation and Luminescence Counter, Wallac) geschoben. Die Radioaktivität konnte mit Hilfe der Szintillationsflüssigkeit in Lichtsignale umgewandelt und von drei Detektoren, die sich über die Kassetten bewegten; detektiert werden. Mit der entsprechenden Software (MicroBeta Windows WorkStation) wurden die Messresultate als Zahlenprotokolle auf dem PC gespeichert.

## 2.16 Der Zytotoxizitätstest

### 2.16.1 Hintergrund

Bei der hier angewandten Methode des BATDA- Release- Assay, handelt es sich um einen nicht-radioaktiven Zytotoxizitätstest, der als Alternative zum klassischen 51 Chromfreisetzungstest verwendet wurde. Die Methode wurde weitgehend so verwendet, wie sie von K. Blomberg und Mitarbeitern veröffentlicht wurde und dient zur Bestimmung der Zytotoxizität von Lymphozyten gegenüber verschiedenen Targetzellen.

Das Prinzip des Tests beruht auf dem Nachweis eines intrazellulären fluoreszenzverstärkenden Liganden im Zellüberstand, der von lysierten Zellen freigesetzt werden kann. Dazu wurden Targetzellen mit fluoreszenzverstärkenden Liganden (BATDA) inkubiert, der als hydrophobe Verbindung die Zellmembran leicht passieren kann. Intrazellulär werden die Esterverbindungen des Liganden hydrolysiert, so dass eine hydrophile Verbindung (TDA) entsteht, welche die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Die nun markierten Targetzellen werden anschließend mit den Effektorzellen, z.B. zytotoxischen T-Lymphozyten, inkubiert. Werden die Targetzellen von den Effektoren lysiert, tritt der hydrophile Ligand (TDA) in den Überstand ein. Durch Zugabe von Europiumlösung lässt sich die Menge des freigesetzten Liganden über eine zeitverzögerte Fluoreszenz im Fluorometer messen, da er mit Europium einen starken fluoreszierenden und stabilen Chelatkomplex (ETDA) bildet. Die Zytotoxizität der Effektorzellen, ausgedrückt in einem prozentualen Anteil an lysierbaren Targetzellen, kann nur errechnet werden, indem das Ergebnis auf die Anzahl der maximal lysierbaren Zellen bezogen wird. Im Test müssen deshalb folgende Werte zusätzlich bestimmt werden:

Maximallyse:

Sie bezeichnet den Wert, der maximal erreicht werden kann, wenn alle Targetzellen lysiert werden.

Spontanlyse:

Sie stellt den Wert dar, der dadurch zustande kommt, dass Targetzellen ohne Einfluss von Effektoren absterben und den Liganden freisetzen.

Für die Berechnung der spezifischen Lyse in Prozent ergibt sich folgende Formel:(1)

Spezifische Lyse in % =  $\frac{\text{Messwerte} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse}} \times 100$

#### **2.16.2 Durchführung**

##### **2.16.2.1 Markierung der Targetzellen**

1. Als Targetzellen dienten PMNC, die für 3 Tage mit PHA 5 % inkubiert wurden und nach dieser Kulturphase unter dem Lichtmikroskop ein blastenähnliches Aussehen aufwiesen, weswegen sie als PHA-Blasten bezeichnet wurden. Diese wurden in einem 15 ml-Plastikröhrchen auf eine Zelldichte von 1Mio/ml eingestellt.

2. Anschließend wurde der BATDA-Ligand zugegeben (2,5 µl/ml Zellvolumen).

3. Es folgte eine Inkubationsphase von 50 Minuten, im Brutschrank bei 37°C, währenddessen mussten die Röhrchen alle 10 Minuten geschüttelt werden, um den Liganden optimal zu verteilen.

4. Nach der Inkubationsphase wurden die Röhrchen mit auf 37°C angewärmtem Medium aufgefüllt und für 7 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt fünfmal wiederholt.

5. Im Anschluss an die Waschvorgänge wurde die Zellsuspension in 3-4 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und in der Neubauerzählkammer gezählt, um auf eine Zelldichte von 50 000/ml eingestellt zu werden. Durch die Zugabe von Trypanblau war es möglich, tote von vitalen Zellen zu unterscheiden, es wurde angestrebt ausschließlich die vitalen Zellen zu zählen. War der Anteil an toten Zellen groß, musste damit gerechnet werden, dass sich eine hohe Spontanlyse darstellen würde, die im schlimmsten Fall die Auswertung des Tests unmöglich machen könnte. Durch wiederholtes Waschen wurde versucht werden, den Anteil toter Zellen zu vermindern.

6. Ein Teil dieser gewaschenen Targetzellen wurde entnommen um erneut zentrifugiert zu werden, da der anschließend gewonnene Überstand zur Backgroundbestimmung verwendet wurde. Ein weiterer Anteil wurde Ultraschall-lysiert.

##### **2.16.2.2 Gewinnung der Effektorzellen und Herstellung einer Verdünnungsreihe**

Als Effektoren dienten die MLC-Ansätze, die mit MTX und Anti-CD95 behandelt wurden, sowie eine unmanipulierte Kontrolle. Alle Ansätze wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, die im Kapitel Material Methoden, Abschnitt 2.12.4, Entwicklung

alternativer Depletionsverfahren unter Verwendung von MTX und Anti-CD95, bereits eingehend beschrieben wurden. Nach einer Kultivierungsphase von sechs Tagen wurde die primäre MLC für weitere fünf Tage mit allogenen PMNC restimuliert, die bereits in der primären MLC verwendet wurden, sowie mit „third party“ Stimulatorzellen. Diese Effektoren wurden auf eine Zelldichte von 1 Mio/ml eingestellt.

Um einen Nachweis hinsichtlich der zytotoxischen Eigenschaften der Effektorzellen erbringen zu können, mussten diese in unterschiedlichen Konzentrationen zu einer gleichbleibenden Anzahl von Targetzellen vorliegen (E/T-Verhältnis). Dieses Vorgehen ermöglichte es uns festzustellen, dass sich die gemessene Lyse der Targetzellen auf die zugegebenen Effektorzellen zurückführen ließ. Da beim Testansatz 100 µl Effektorzellen pro Loch eingesetzt wurden und die Zahl der Targetzellen durchgehend 5000 betrug, musste, um ein E/T-Verhältnis von 20:1 zu erreichen, die Ausgangskonzentration der Effektoren 1 Mio Zellen/ml betragen.

Da mehrere E/T-Verhältnisse getestet wurden, war es erforderlich, eine Verdünnungsreihe über vier Stufen herzustellen.

### **2.16.2.3 Der Testansatz**

1. Der Test wird in einer 96-Loch-Mikrotiterkulturplatte (Rundboden) angesetzt, wobei alle Werte 3-fach bestimmt wurden.
2. Für den Background wurden 100 µl Überstand (s. oben) und 100 µl Medium angesetzt.
3. Der Ansatz für die Spontanlyse ergab sich aus 100 µl Targetzellen und 100 µl Medium.
4. Der Ansatz für die Maximallyse wurde zweimal auf unterschiedliche Weise angesetzt: Einmal wurden 100 µl Targetzellen 20 ml Lysepuffer und 80 µl Medium zugeführt, ein zweiter Ansatz ergab sich aus 100 µl ultraschallzertrümmerten Targetzellen und 100 µl Medium.
5. Um eine Verdünnungsreihe der Effektorzellen herzustellen, wurden in die Lochreihe mit der höchsten Konzentration jeweils 100 µl Effektorzellen vorgelegt, derselbe Schritt erfolgte in der nächsten Reihe, wobei hier zusätzlich 100 µl Medium pro Loch zugeführt wurden ausgehend von dieser Verdünnung wurden 100 µl nach mehrmaliger Resuspension mit einer sterilen Pipette in die nächste Lochreihe überführt, in welcher



## Material und Methoden

bereits 100 µl Medium vorgelegt wurden, dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, so dass schließlich vier Verdünnungsstufen der Effektorzellen vorlagen.

Zu diesen Effektorzellen wurden nun jeweils 100 µl der Targetzellen pipettiert und die Platte anschließend abzentrifugiert (100 g, 2 min, Bremse 3), um danach für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert zu werden.

6. Die Platten wurden nach dieser Inkubationsphase nochmals zentrifugiert (200 g, 5 min, Bremse 3), da wir für den Nachweis des Liganden nur den Überstand verwendeten.

7. Eine entsprechende Anzahl an Löchern einer 96-Loch-Mikrotiterkulturplatte (Flachboden) wurde nun mit 200 µl Europiumlösung und je 20 µl Überstand aus den entsprechenden Löchern der Testplatte beladen und die Flachbodenplatte für 20 Minuten auf dem Schüttler inkubiert.

8. Im Anschluss erfolgte die Messung der Platte im Multilabel-Counter.

9. Die gemessenen counts wurden entsprechend der obigen Formel (1) in Prozentzahlen umgerechnet, wobei aus den jeweils drei Werten Mittelwerte gebildet wurden. Um die Güte des Tests abzuschätzen, wurde eine Spontanlyse des Assays errechnet: Formel (2)

$$\text{Spontanlyse des Assays in \%} = \frac{\text{Spontanlyse} - \text{Background} \times 100}{\text{Maximallyse} - \text{Background}}$$

Die Spontanlyse sollte nicht mehr als 30 % betragen.

### Statistische Analyse

Die statistische Analysen wurden mit dem Statistikprogramm InStat: Copyright 1992-1998 Prism GraphPad Version 3 Software Inc. durchgeführt.

Alle Ergebnisse (Messwerte bzw. Indizes) sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Der Mittelwert ist definiert als Durchschnitt aller ermittelten Werte einer Messreihe. Die Standardabweichung quantifiziert in diesem Zusammenhang die Verschiedenheit oder Streuung einzelner Messwerte einer Messreihe. Die Standardabweichung wurde dabei mit Hilfe des Paired t Test errechnet. Als Grundlage hierfür wurde ein Probenkollektiv aus minimal drei Einzelwerten, die aus unabhängigen Versuchen ermittelt worden waren, gewählt.

Bewertung des Unterschieds zwischen einzelnen Werten erfolgte durch die Berechnung des 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 significant. Werte  $>0.05$  hingegen wurden als nicht signifikant gewertet.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Antigenexpression alloreaktiver T-Zellen unter Zusatz von MTX und Anti-CD95**

Die in die verschiedenen MLC`s eingesetzten peripheren mononukleären Zellen (PMNC), wurden durch die Dichtegradientenseparation über Ficoll gewonnen. Die Responderzellen sowie die zytokinvorbehandelten Stimulatorzellen, wurden am Tag 0 in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in die entsprechende Lymphozytenmischkultur (MLC) eingesetzt. Um den Einfluss von MTX und Anti-CD95 auf die Oberflächenexpression der Aktivierungsantigene alloreaktiver T-Lymphozyten näher zu untersuchen und diesbezüglich mit der Antigenexpression unbehandelter alloreaktiver, sowie nicht aktivierter T-Zellen zu vergleichen, kamen vier verschiedene Kulturansätze zum Einsatz. Nach einer Kulturdauer von fünf Tagen, wurden aus allen vier Kulturansätzen Proben entnommen und die vitalen T-Lymphozyten hinsichtlich ihres Antigenexpressionsmusters mit Hilfe des durchflusszytometrischen Verfahrens untersucht. Die phänotypische Zellanalyse beschränkte sich auf CD3<sup>+</sup>T-Lymphozyten mit Lymphozytenmorphologie. Die hierbei relevanten Oberflächenmarker sind in Tab. 3.1.-01 wiedergegeben.

## Ergebnisse

Tab. 3.1.-01

*Aktivierungsantigene auf der Oberfläche von T-Lymphozyten*

CD-Antigen	Zellen die das Antigen exprimieren	Funktionen	Verwandschaftsbeziehungen
CD69	aktivierte T-und B-Zellen, aktivierte Makrophagen und NK-Zellen	frühes Aktivierungsantigen	C-Typ-Lektin
CD95	Eine Vielzahl an Zelllinien	Rezeptor des natürlichen CD95-Liganden, induziert Apoptosesignal	TNF-Rezeptorfamilie
HLA-DR	antigen- präsentierende Zellen, aktivierte T-Lymphozyten	MHC-Molekül der Klasse II	–
CD25	aktivierte T-und B-Zellen und Monozyten	IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette assoziiert mit CD122 und der IL-2R- $\gamma$ -Kette	$\alpha$ -Kette:CCP, $\gamma$ -Kette: Zytokinrezeptorsuperfamilie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Antigenexpression bestimmt. Anhand des Prozentsatzes antigenpositiver Zellen konnten die aktivierten und nicht aktivierten T-Lymphozyten identifiziert und quantifiziert werden.

## Ergebnisse

Tab. 3.1-02

Übersicht über die Antigenexpression alloreaktiver T- Lymphozyten nach einer Kulturdauer von fünf Tagen unter dem Einfluss von MTX =(A/B\*+MTX), sowie im direkten Vergleich mit unbehandelten =(A/B\*) und nicht aktivierten T-Zellen =(A). In folgender Tabelle sind die prozentualen Anteile an Lymphozyten dargestellt, die die entsprechenden Antigene exprimieren. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, ermittelt aus jeweils drei unabhängigen Versuchen

CD-Molekül	A/B mit MTX n=3	A/B ohne Zusatz n=3	A n=3
CD69	22±7	26±7	2±1,5
CD95	99±1	99±1,5	38±9
HLA-DR	31±10	41±5	8±4
CD25	14±5	17±4	9±3

Tab. 3.1-03

Übersicht über die Antigenexpression alloreaktiver T- Lymphozyten nach einer Kulturdauer von fünf Tagen unter dem Einfluss von Anti-CD95 =(A/B\*+Anti-CD95), sowie im direkten Vergleich mit unbehandelten =(A/B\*) und nicht aktivierten T-Zellen =(A). In folgender Tabelle sind die prozentualen Anteile an Lymphozyten dargestellt, die die entsprechenden Antigene exprimieren. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, ermittelt aus jeweils drei unabhängigen Versuchen

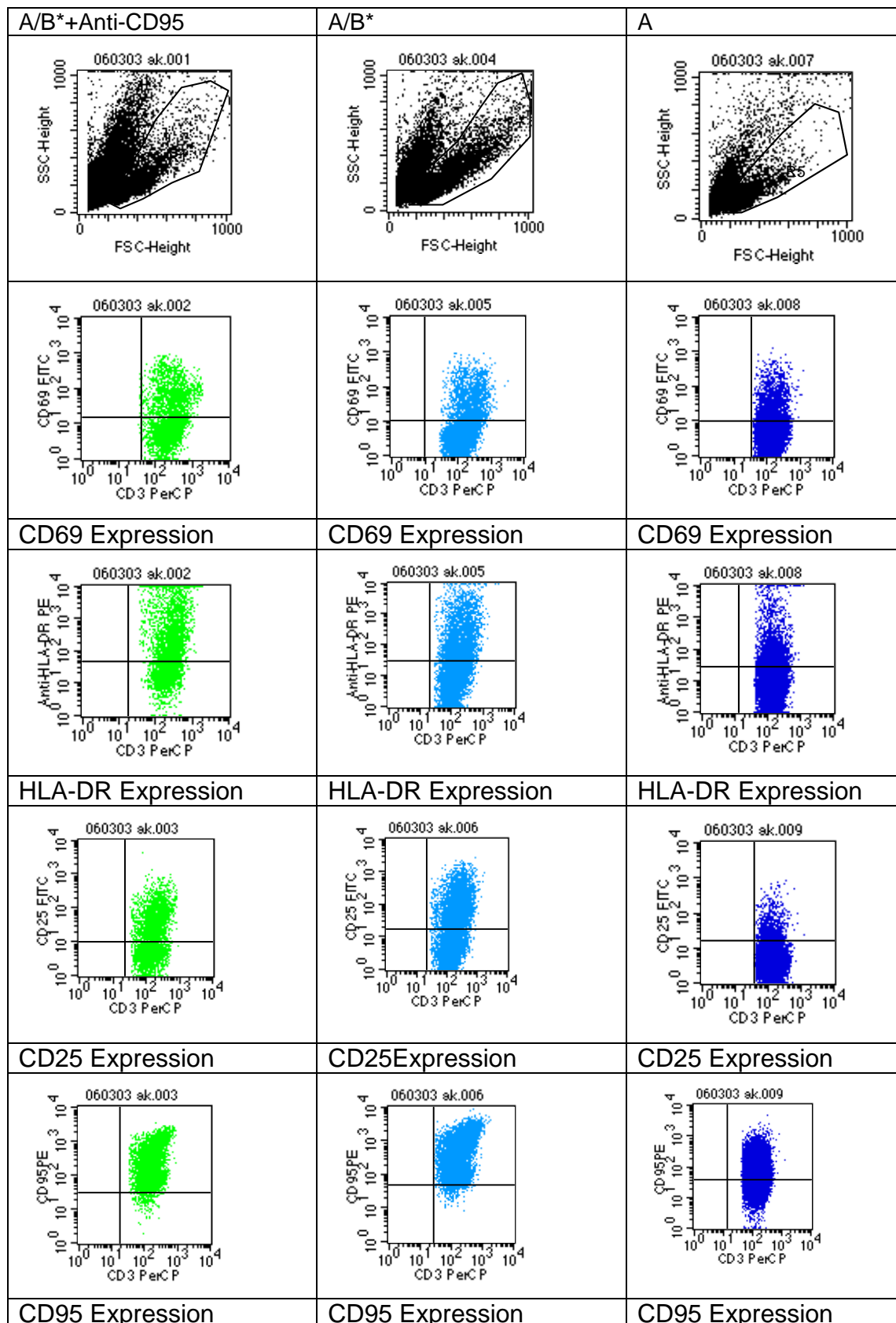
CD-Molekül	A/B mit Anti-CD95 n = 3	A/B ohne Zusatz n = 3	A n = 3
CD69	13±4	23±18	7±6
CD95	94±7	94±6	55±19
HLA-DR	39±8	57±18	11±9
CD25	30±24	42±21	10±1

Die Abbildungen 3.1-01 und 3.1-02 zeigen das Expressionsmuster der Oberflächenantigene CD69, CD95, HLA-DR und CD25 aktivierter T-Lymphozyten einer MLC und einer nicht aktivierten Kontrolle. Diese wurden für einen Zeitraum von fünf Tagen mit der MTX und Anti-CD95 behandelt sowie in unmanipulierten Zustand belassen.

# Ergebnisse

Abb. 3.1-01

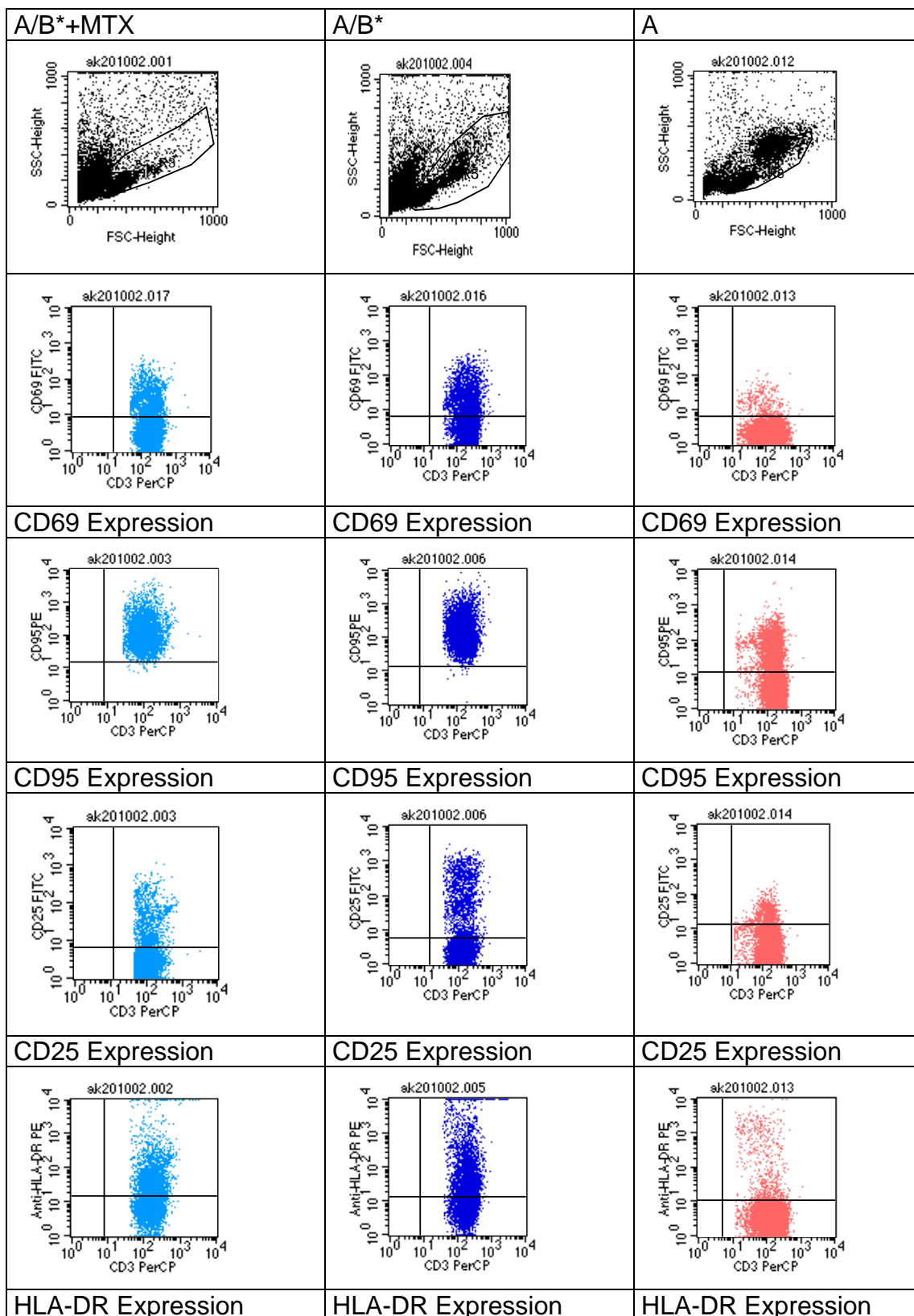
Antigenexpression vitaler alloantigenaktivierter T-Lymphozyten, unter Zugabe von Anti-CD95  $= (A/B^* + \text{Anti-CD95})$ , sowie in unbehandeltem  $= (A/B^*)$  und unstimuliertem Zustand  $= (A)$ .



# Ergebnisse

Abb. 3.1-02

Antigenexpression vitaler alloantigenaktivierter T-Lymphozyten, unter Zugabe von MTX  $= (A/B^* + MTX)$ , sowie in unbehandeltem  $= (A/B^*)$  und unstimuliertem Zustand  $= (A)$ .



## Ergebnisse



## Ergebnisse

Im Hinblick auf den Prozentsatz der Expression der Oberflächenmarker CD69, CD25, CD95 und HLA-DR erbrachte die statistische Auswertung mit Hilfe des Pairedt-Test, zwischen den Kulturansätzen, die jeweils mit MTX und Anti-CD95 behandelt wurden, und der unmanipulierten Kontrolle keine signifikanten Unterschiede. Das Expressionsmuster der Oberflächenantigene nicht aktivierter T-Lymphozyten diente ebenfalls zur Kontrolle. Hierbei ließ sich der geringste prozentuale Anteil an T-Zellen, die die Aktivierungsantigene CD25, CD69 und HLA-DR präsentierten, nachweisen. Hingegen zeigte sich die CD95-Expression mit einem durchschnittlichen Prozentsatz von 55 % vergleichsweise hoch.

### **3.2 Apoptosenachweis in aktivierten T-Zellen unter dem Einfluß von MTX und Anti-CD95**

Um die Apoptose-induzierenden Effekte von MTX und Anti-CD95 gegenüber mitogenaktivierten T-Lymphozyten zu demonstrieren und näher zu untersuchen, sowie diesbezüglich den Unterschied zu unbehandelten, sowie nicht aktivierten T-Lymphozyten zu verdeutlichen, wurden vier verschiedene Kulturansätze vorbereitet. Hierfür kamen periphere mononukleäre Zellen (PMNC) zum Einsatz, die mit Phythämagglutinin (PHA), einem mitogenen T-Zellstimulator, behandelt wurden. Ein Ansatz wurde ausgespart und als nicht aktivierte Kontrolle verwendet. Nach einer Inkubation von vier Tagen erfolgte jeweils der Zusatz von MTX und Anti-CD95. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Expression der Oberflächenmarker auf aktivierten T-Zellen, die mit MTX und Anti-CD95 behandelt wurden, positiv mit typischen Apoptosezeichen korrelierte. Dafür wurden die Kulturen nach einer 48-stündigen Inkubation mit MTX und Anti-CD95 mit Hilfe des durchflusszytometrischen Verfahrens sowohl auf ihre Aktivierungsantigenexpression als auch auf nachweisbare Apoptosezeichen hin untersucht.

## Ergebnisse

Tab. 3.2-01

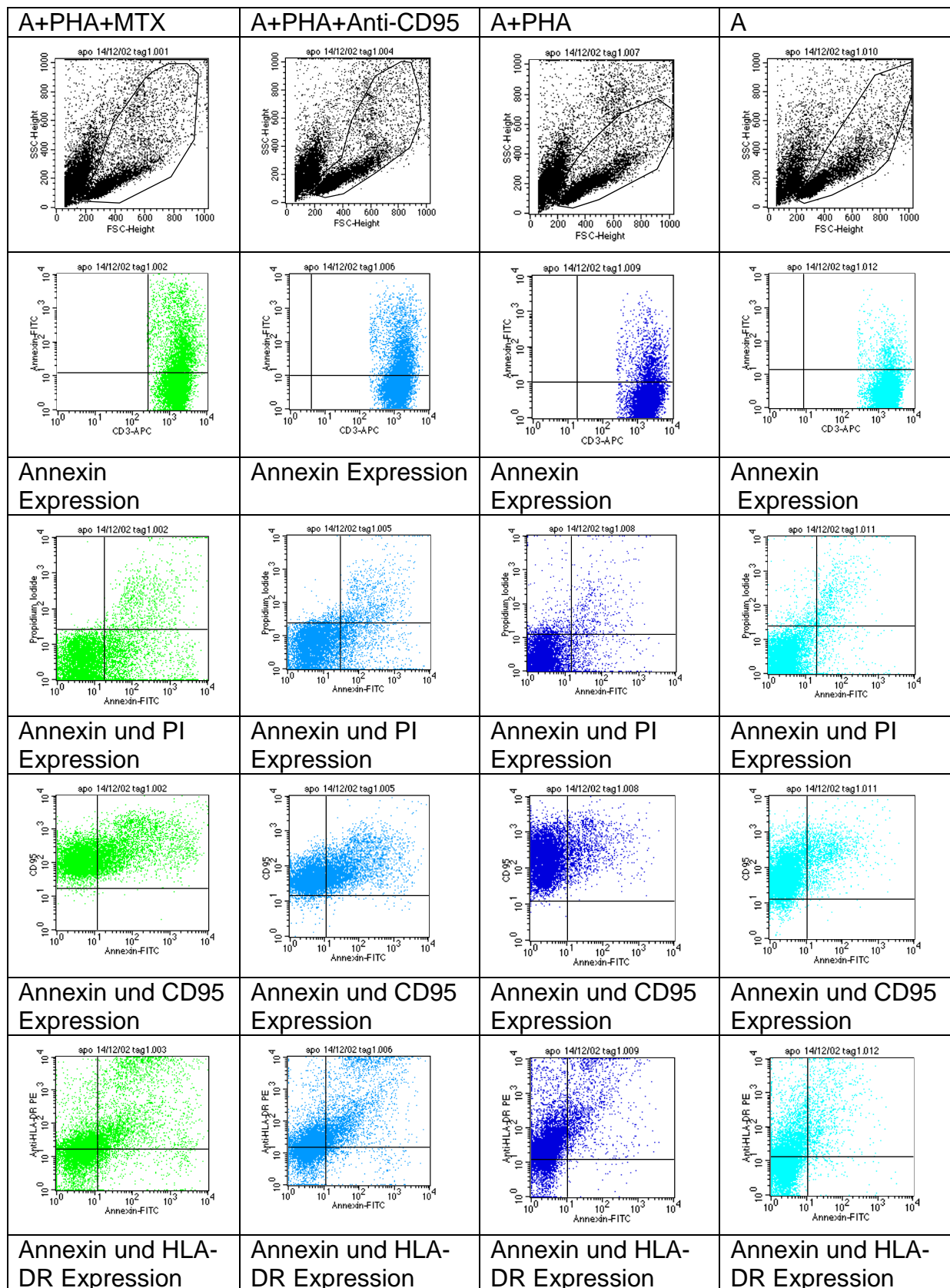
*Reagenzien zur Detektion und Quantifizierung der Apoptose sowie der Abgrenzung gegenüber der Nekrose von Zellen*

Reagenzien	Zellen, die sich durch Annexin oder Propidiumiodid markieren lassen	Funktionen
Annexin V	Alle Zellpopulationen, die sich in einem frühen Stadium der Apoptose befinden und Phosphatidylserin an ihrer äußeren Zellmembran präsentieren, sowie nekrotische Zellen die ihre Membranintegrität verloren haben und daher ebenfalls Phosphatidylserin exponieren können	Ca <sup>2+</sup> -abhängiges Phospholipid bindendes Protein mit hoher Affinität gegenüber Phosphatidylserin
Propidiumiodid	Alle Zellpopulationen, die sich im Stadium der Nekrose befinden	spezifische Markierung der DNA nekrotischer Zellen

# Ergebnisse

Abb. 3.2-01

Apoptosenachweis vitaler PHA-stimulierter T-Lymphozyten unter Zugabe von Anti-CD95 und MTX sowie in unbehandeltem und unstimuliertem Zustand



## Ergebnisse

Tab. 3.2-02

Übersicht über die Apoptose und Nekrosezeichen PHA-stimulierter T-Lymphozyten, nach einer Kulturdauer von 48 h, unter dem Einfluss von MTX =(A+PHA+MTX) und Anti-CD95 =(A+PHA+Anti-CD95), sowie im direkten Vergleich mit unbehandelten =(A+PHA) und nicht-aktivierten T-Zellen =(A). In folgender Tabelle sind die prozentualen Anteile an Annexin V-positiven, apoptotischen Lymphozyten aufgezeigt, sowie die gleichzeitige Expression der Aktivierungsantigene CD95 und HLA-DR. T-Zellen, die sich sowohl mit Annexin V als auch mit Propidiumiodid anfärben repräsentieren den Prozentsatz der nekrotischen Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf repräsentativen Versuchen. Zusätzlich wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kultursätzen bestimmt.

Nach 48h	A+PHA+ MTX n = 5	A+PHA n = 5	A+PHA+Anti- CD95 n=5	A n = 5
Anzahl der Annexin-positiven CD3+T-Zellen in % = apoptotische Zellen	54±15	29±5	50±9	9±4
Signifikanz	p = 0,0024**			
Signifikanz	p = 0,0006***			
Anzahl der Annexin- und PI-positiven CD3+T-Zellen= nekrotische Zellen	14±7	7±3	9±3	4±2
Signifikanz	p = 0,1182, keine Signifikanz			
Signifikanz	p = 0,1292, keine Signifikanz			
Anzahl der CD95- und Annexin-positiven T-Zellen in %	56±14	21±7	54±7	9±4
Signifikanz	p = 0,0022**			
Signifikanz	p = 0,0001***			
Anzahl der HLA-DR- und Annexin-positiven T-Zellen in %	53±10	20±7	48±8	7±3
Signifikanz	p = 0,0001***			
Signifikanz	p = 0,0005***			

## Ergebnisse

Nach einem 48-stündigen Inkubationszeitraum zeigten mitogenaktivierte T-Zellen, die unter dem Einfluss von Anti-CD95 und MTX standen, in fünf unabhängigen Experimenten einen deutlichen prozentualen Anstieg des frühen Apoptosemarkers Annexin V. Methotrexat wies im Vergleich zu Anti-CD95 eine geringfügig höhere apoptosevermittelnde Wirkung auf. Im Gegensatz dazu, konnte unter den unbehandelten, mitogenaktivierten T-Zellen ein signifikant kleinerer Prozentsatz Annexin V-positiver Zellen aufgefunden werden. Nicht aktivierte T-Zellen wiesen hinsichtlich der Annexinexposition die geringste Apoptoserate auf. Um zusätzlich apoptotische T-Zellpopulationen von nekrotischen Zellen abzugrenzen, wurde gleichzeitig der Prozentsatz Propidiumiodid und Annexin V-positiver T-Zellen bestimmt. Nekrotische Zellen können aufgrund des Verlustes ihrer Membranintegrität Phosphatidylserin exponieren und werden somit ebenfalls durch Annexin V markiert. Hinzu kommt, dass sich ihre DNA mit Propidiumiodid (PI) anfärbt. In diesem Zusammenhang konnte in den Kulturansätzen, die in Anwesenheit von Anti-CD95 und MTX kultiviert wurden, nach einem Zeitraum von 48 Stunden teilweise eine leichte Zunahme nekrotischer Veränderungen verzeichnet werden. Auch die unmanipulierten, mitogenaktivierten und die unstimulierten Kontrollen wiesen einen geringfügigen Anteil nekrotischer Zellen auf. Um den Nachweis zu erbringen, dass MTX und Anti-CD95 ihre apoptoseinduzierende Wirkung selektiv in aktivierten T-Zellen entfalten, wurden Proben der unterschiedlichen Kulturansätze zugleich auf ihren Anteil apoptotischer T-Zellen und ihre Antigenexpression der Aktivierungsmarker CD95 und HLA-DR hin untersucht. Nach 48-stündiger Kultivierung unter dem Einfluss von MTX und Anti-CD95, zeigten aktivierte T-Zellen einen deutlichen Anstieg der CD95 und HLA-DR-Antigenexpression. Parallel dazu, wiesen sie im Vergleich zur unbehandelten, sowie unstimulierten Kontrollgruppe einen signifikant höheren Prozentsatz AnnexinV-positiver Zellen auf. Unter den unmanipulierten aktivierten T-Zellen konnte ebenfalls eine Zunahme der Expression der Aktivierungsantigene verzeichnet werden, diese ging allerdings mit einer wesentlich geringeren prozentualen Annexin V-Detektion einher. Unstimulierte T-Zellen wiesen demgegenüber nach 48 Stunden einen verminderten Prozentsatz CD95 bzw. HLA-DR und gleichzeitig Annexin V-positiver T-Zellen auf.

### 3.3 Darstellung der gegensätzlichen Wirkungen von Methotrexat und Leucovorin (10-Formyltetrahydrofolat/Folinsäure) anhand einer Titrationsreihe

Um eine genaue Vorstellung davon zu bekommen, in welchen Konzentrationsbereichen der Wirkstoff MTX seine Wirkung entfaltet und wie sich diesbezüglich der neutralisierende Effekt von Leucovorin (10-Formyltetrahydrofolat) verhält, wurde eine Lymphozytenmischkultur (MLC) mit absteigenden MTX-Konzentrationen behandelt. Parallel dazu, wurde Leucovorin, in abnehmender Konzentration, einer bereits mit MTX versetzten MLC zugeführt. Als Kontrolle kam eine unmanipulierte Lymphozytenmischkultur zum Einsatz. Zur Darstellung der MTX-bzw. Leucovorin-vermittelnden Effekte wurden die Proliferationseigenschaften der T-Lymphozyten durch den Nachweis tritiummarkierten (H3)-Thymidins, das im Rahmen der Aktivierungsvorgänge als Baustein in die DNA der betroffenen Zellen eingebaut wird, ausgenutzt. Nach einer Kulturzeit von sechs Tagen wurden die Titrationsreihen sowie die Kontroll-MLC auf ihre Proliferationsraten hin untersucht. Die hieraus resultierenden Daten sind in der Tabelle Tab. 3.3-01 zusammengefasst.

Tab. 3.3-01

*Darstellung der spezifischen konzentrationsabhängigen Wirkung von MTX und Leucovorin, auf die Proliferationsfähigkeit von alloantigenaktivierten T-Zellen  $= (A/B^*)$ . Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Thymidineinbauraten aus drei repräsentativen Versuchsreihen, sowie die jeweils eingesetzten MTX- und reduzierten Leucovorinkonzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$*

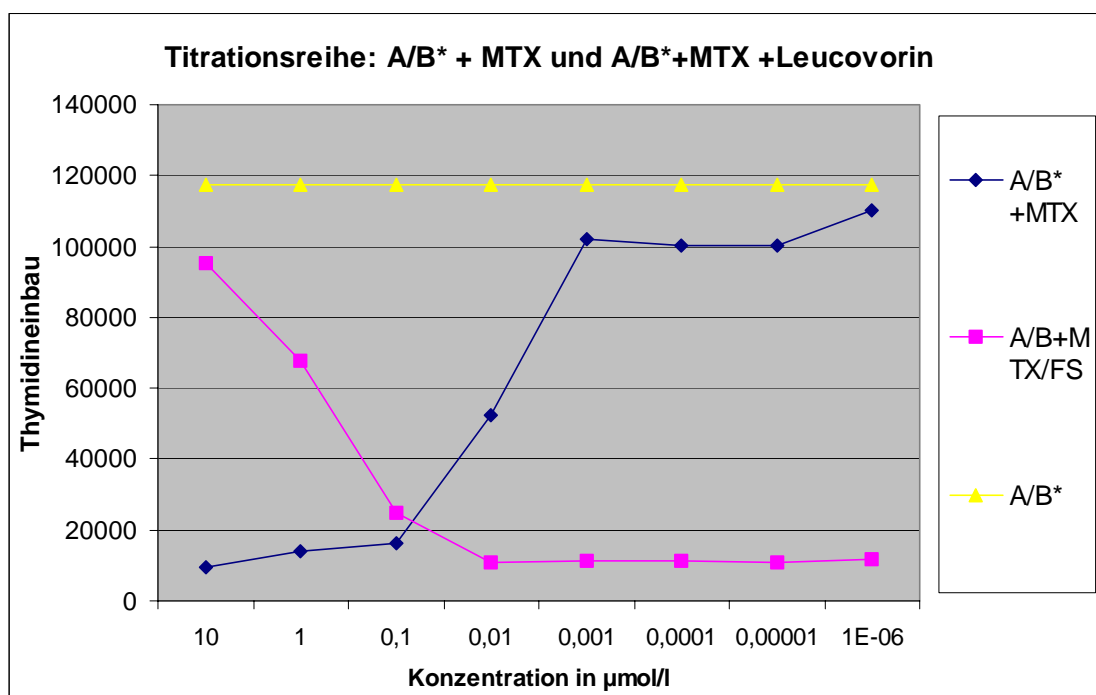
Konzentration der Folsäure/Leucovorin bzw. MTX in $\mu\text{M/l}$	A/B* +MTX (wie angegeben) n = 3	A/B*+10 $\mu\text{M/l}$ MTX und Folsäure (wie angegeben) n = 3	A/B* n = 3
10	9397±1513	95327±40916	117578±54582
1	13935±3453	67523±36269	117578±54583
0,1	16395±8681	24929±12382	117578±54584
0,01	52505±40071	10889±4132	117578±54585
0,001	101884±552928	11314±4331	117578±54586
0,0001	100082±57563	11446±4323	117578±54587
0,00001	100331±52450	10979±2747	117578±54588
0,000001	110311±51052	11710±1995	117578±54589

## Ergebnisse

Anhand der Abbildung Abb. 3.3-01 lassen sich die Einflüsse von MTX und Leucovorin auf die Proliferationsfähigkeit der alloantigenaktivierten T-Zellen genauer aufzeigen.

Abb. 3.3-01

Übersicht über die Thymidineinbauraten alloantigenaktivierter T-Zellen unter abnehmenden MTX- und Leucovorinkonzentrationen. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.



Der zytotoxische Effekt von MTX gegenüber Alloantigen-aktivierten T-Zellen wies eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit auf. Dabei zeigte sich eine maximale proliferationshemmende Wirkung unter einer MTX-Konzentration von 10 µmol/l. Eine einschneidende Wirkungsabschwächung konnte in einem Konzentrationsbereich von 0,001-0,00001 µmol/l nachgewiesen werden. Unter weiterer Reduzierung der MTX-Konzentration glich sich die Thymidineinbaurate an die Proliferationsrate der unmanipulierten Kontroll-MLC an. In Anwesenheit steigender Leucovorinkonzentrationen, ließ sich eine stufenweise Annäherung an die Proliferationsrate der unbehandelten Kontrolle verfolgen. Allerdings setzte erst unter äquimolaren Leucovorin-Konzentrationen eine deutliche Reduktion der proliferationshemmenden Wirkung von MTX ein, wobei selbst unter dieser Voraussetzung keine vollständige Neutralisierung der Zytotoxizität gelang.

### **3.4 Selektive Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe von unterschiedlicher Depletionsverfahren**

#### **3.4.1 Das Kultursystem der MLC als Methode der allogenen Stimulation von T-Lymphozyten**

Um die isolierten peripheren mononukleären Zellen (PMNC), die über Ficoll gereinigt wurden, auf ihre allgemeine Reaktionsfähigkeit in Bezug auf einen allogenen Stimulus zu untersuchen, wurde eine Lymphozytenmischkultur angesetzt. Unter der Vorgabe, die Empfindlichkeit der MLC hinsichtlich der Generierung alloreaktiver T-Zellen zu verbessern, wurden PMNC über Nacht mit den Zytokinen TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  inkubiert, um ihr stimulatorisches Potenzial zu steigern. Die Stimulatorzellen besitzen die Fähigkeit, körpereigene Antigene auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren, die von Responderzellen als „fremd“ erkannt werden können, wodurch es zu einer Aktivierung alloreaktiver Responderlymphozyten kommt. Die Stimulatorzellen wurden bestrahlt und im Verhältnis 1:1 (Responder/Stimulatorzellen) in die MLC eingesetzt. Durch die Bestrahlung wird verhindert, dass die Stimulatorzellen teilungsfähig bleiben und durch die „fremden“ MHC-Moleküle der Responderzellen stimuliert werden. Die Lymphozytenmischkultur war der Ausgangspunkt der Etablierung verschiedener Depletionsmethoden, die hinsichtlich ihres Potentials, alloreaktive T-Lymphozyten möglichst vollständig zu deletieren, und gleichzeitig nicht-alloreaktive T-Zellen zu erhalten, untersucht wurden.

#### **3.4.2 Etablierung des experimentellen Versuchsaufbaus: Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe des Antimetaboliten Methotrexat (MTX)**

Unter der Vorgabe, ein Depletionsverfahren zu entwickeln, mit dem es gelingt, alloreaktive T-Zellen erfolgreich zu eliminieren und gleichzeitig immunkompetente T-Zellen zu erhalten, wurde in mehreren aufeinanderfolgenden experimentellen Versuchen, eine Optimierung der Methode angestrebt. Hierfür machte man sich das apoptoseinduzierende Potenzial des Folsäureantagonisten zu Nutze, um selektiv aktivierte T-Zellen zu depletieren. Die erste Versuchsanordnung sah die Verwendung einer primären Lymphozytenmischkultur vor. Dieser wurde am Tag 1 eine definierte, ausreichend wirksame MTX-Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  zugeführt, die zuvor aus einem Titrationsverfahren ermittelt werden konnte. Als Kontrolle wurde eine unmanipulierte MLC verwendet. Der nachfolgende zweite Versuchsschritt beinhaltete die Einführung eines Waschvorgangs, der dazu diente, MTX nach viertägiger Inkubationsphase aus dem Überstand der MLC zu entfernen. Anschließend wurde der



## Ergebnisse

Ansatz für weitere 24 Stunden in frischem Kulturmedium aufgenommen, um die Restimulierbarkeit durch den Einfluss von MTX nicht zu beeinträchtigen. Der dritte Versuchsaufbau erfuhr eine erneute Veränderung durch den Einsatz von Leucovorin (LV). Durch das neutralisierende Potential von LV im Bezug auf die MTX-Toxizität versprach man sich eine verbesserte Reaktivierung der sekundären MLC. Hierzu wurde die MLC für 48 Stunden in Anwesenheit von MTX kultiviert und anschließend gewaschen. Danach erfolgte die Aufnahme und Kultivierung für weitere 48 Stunden, in frischem Kulturmedium, das zusätzlich mit 100 µl/l LV behandelt wurde. In einem weiterführenden vierten Ansatz wurde die primäre MLC für drei Tage kultiviert, und im Anschluss für weitere 24 Stunden mit MTX inkubiert. Zusätzlich wurde die Kultur einer Behandlung mit IL-2 unterzogen, wodurch eine Steigerung der Empfindlichkeit der MLC hinsichtlich der Generierung alloreaktiver T-Lymphozyten erwartet wurde.

### **3.4.3 Etablierung einer Depletionsmethode, unter Zuhilfenahme von Anti-CD95 Antikörpern**

Mit der Einführung des agonistischen monoklonalen IgM-Antikörpers CD95 in den experimentellen Versuchsaufbau versprach man sich die Etablierung einer alternativen, effizienten Depletionsmethode. Dieses Verfahren basiert auf der spezifischen Induktion des programmierten Zelltods in aktivierten T-Zellen. Hierzu wurde eine primäre MLC am Tag 1 mit einer definierten Konzentration an Anti-CD95 inkubiert. Zusätzlich wurde dieser Ansatz mit einem Goat-anti-Mouse-IgG-Antikörper versetzt. Dies sollte zu einer verbesserten Quervernetzung der CD95 IgM-Antikörper beitragen, die an CD95-Rezeptoren der Zelle gebunden sind. Es wurde erwartet, dass diese Interaktion eine entscheidende Bedeutung für eine effektive Initiierung des Apoptosesignals hätte. In der zweiten Versuchsanordnung wurde dem Ansatz am dritten Tag der Kultivierungsphase IL-2 in einer Konzentration von 10 U/l zugeführt. Durch den Zusatz des Zytokins versprach man sich zugleich eine Steigerung der Empfindlichkeit der CD95-vermittelten Apoptose und eine verbesserte alloreaktive Antwort der T-Lymphozyten in der MLC.

### **3.4.4 Selektive immunomagnetische Depletion von alloreaktiven T-Lymphozyten**

Für diesen Depletionsversuch wurde die Anzahl der peripheren mononukleären Zellen, die in der MLC enthalten waren, auf 100 Millionen eingestellt. Die eigentliche Depletion erfolgte am Tag 3 nach dem Ansetzen der primären MLC. Es wurde erwartet, dass in diesem Zeitraum eine möglichst große Anzahl der T-Zellen durch allogene

## Ergebnisse

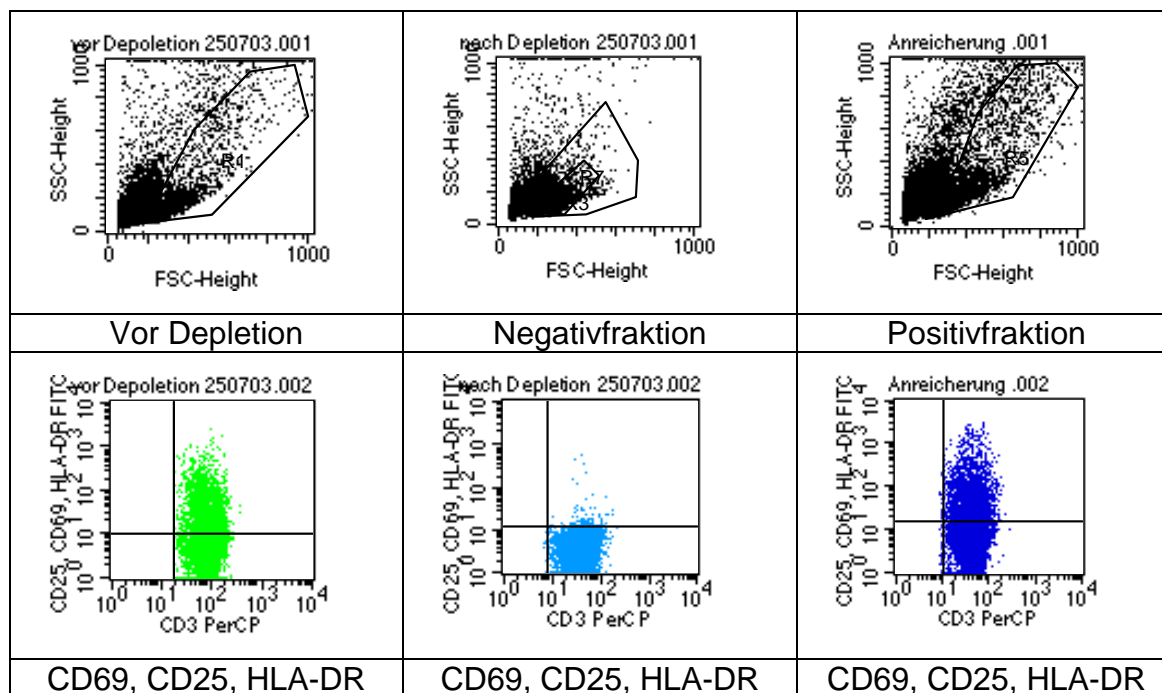
Stimulatoren aktiviert werden würde. Auf diese Weise versprach man sich, die Anzahl potentiell GVHD-induzierender T-Zellen nach der Depletion so gering wie möglich zu halten. Die Depletion erfolgte mittels Antikörper, die gegen die Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR gerichtet waren, sowie mit Hilfe der Goat-anti-Mouse-Micro-Beads. Um sämtliche alloreaktive T-Zellen unter Zuhilfenahme des MACS-Systems eliminieren zu können, wurden alle CD25-, CD69- und HLA-DR-positiven Zellen eliminiert.

### **3.4.5 Untersuchung der Effektivität der immunomagnetischen Depletionsmethode anhand der phänotypischen Zellanalyse**

Die durchflusszytometrische Analyse beschränkte sich auf T-Lymphozyten. Durch Verknüpfung definierter Regionen gelang es, die CD3<sup>+</sup>T-Lymphozytenpopulation spezifisch zu beurteilen. Die Ergebnisse der phänotypischen Analyse von T-Zellen im nicht depletierten sowie im depletierten Zustand sind in folgenden Abb. 3.4.05-01, exemplarisch dargestellt.

## Ergebnisse

Abb. 3.4.05-01



Eine entsprechende Übersicht über alle Versuche bietet die Tabelle Tab.3.4.5-1

Tab. 3.4.5-01

Tabellarische Darstellung der prozentualen Koexpression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR auf alloreaktiven T-Lymphozyten vor und nach der Depletion sowie nach Anreicherung der Positivfraktion. Angegeben sind die Resultate aus drei repräsentativen Versuchen, sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen

Koexpression von CD25 CD69 und HLA-DR	vor Depletion	nach Depletion	Anreicherung der Positivfraktion
Experiment 1.	32	1	35
Experiment 2.	34	4	39
Experiment 3.	62	2	-
Mittelwert	43	2	37
Standardabweichung	±17	±2	±3

Vergleicht man die verschiedenen Ausgangspopulationen vor und nach der Depletion sowie nach der Anreicherung der Positivfraktion anhand der durchflusszytometrischen Analysen, so ist daraus ersichtlich, dass die aktivierten T-Zellen, da sie außerhalb der

## Ergebnisse

eigentlichen Lymphozytenpopulation vorzufinden sind, an Größe und Grannulierungsgrad zugenommen haben. So waren vor der immunomagnetischen Depletion  $43 \% \pm 17$  der T-Zellen positiv für die Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR. Ähnlich verhielt es sich mit den Werten der Positivfraktion nach der Anreicherung. Nach der Depletion konnten lediglich  $2 \% \pm 1$  der verbliebenen T-Lymphozyten eine Koexpression dieser Oberflächenmarker aufweisen.

### **3.4.6 Beurteilung der Effizienz der drei unterschiedlichen Depletionsverfahren mit Hilfe des (6-H3)-Thymidin-Proliferationsassays**

Die Proliferationseigenschaften alloreaktiver T-Zellen, zu deren Darstellung die Messung der Einbauraten tritiummarkierten (6-H3)-Thymidins in die DNA der betroffenen Zellen herangezogen wurde, diente als Nachweisverfahren zum Ausschluss der Alloreaktivität nach Anwendung der unterschiedlichen Depletionsverfahren. Des Weiteren wurde die Autoreaktivität sowie die Restaktivität gegen „third party“-Zellen, Tetanustoxoid und PHA aufgezeigt. Hierzu wurden Zellproben nach fünftägiger Kultivierung aus den primären MLC-Ansätzen entnommen, die den drei verschiedenen Depletionsverfahren ausgesetzt waren, sowie die Lymphozytenmischkultur die in unmanipuliertem, nichtdepletiertem Zustand belassen wurden. Nach fünf Tagen wurden alle Kulturansätze in eine sekundäre MLC überführt. Im Rahmen der sekundären MLC wurden die verschiedenen Zellkulturen erneut mit den selben Stimulatorzellen inkubiert, die bereits in der primären MLC Verwendung fanden, zusätzlich stimulierte man jeden der Ansätze mit einer autologen Zellfraktion, den PMNC`s eines dritten Spenders, sowie mit PHA und Tetanustoxoid. Im folgenden Abschnitt sind die Resultate mehrerer Messungen der drei verschiedenen Depletionsverfahren zusammengestellt. Um dabei Vergleiche zwischen den einzelnen Daten ziehen zu können, wurden zusätzlich Stimulationsindizes eingeführt, die von der durchschnittlichen Proliferationsrate in der unmanipulierten primären MLC ausgingen. Dieser Wert wurde mit 100 % festgesetzt.

## Ergebnisse

Tab. 3.4.5-01

*(6-H3)-Thymidinproliferationsassay*

*Tabellarische Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen der vier verschiedenen Versuchsreihen der Depletionsmethode mit Methotrexat =(A/B\*+MTX), sowie der unmanipulierten Kontrollen =(A/B\*). Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten MLC, die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

Zellkultur-system	A/B*+MTX, nicht entfernt vor sekundärer MLC n = 4	A/B*+MTX, entfernt vor sekundärer MLC n = 3	A/B*+MTX +LV n = 2	A/B*+MTX +LV+IL-2 n = 6	A/B*-Kontrolle n = 4
A/B*	16+-6	13+-4	13+-10	6+-7	100
A/B*+A*	25+-7	14+-3	15+-15	8+-9	192+-93
A/B*+B*	22+-12	18+-9	23+-23	12+-14	220+-92
A/B*+C*	35+-20	29+-19	53+-35	58+-30	170+-77
A/B*+Tetanol	32+-19	27+-19	38+-29	46+-34	115+-47
A/B*+PHA	154+-44	181+-45	141+-113	127+-55	383+-213

Tab. 3.4.5-02

*(6-H3)-Thymidinproliferationsassay*

*Darstellung aller Resultate der ersten Versuchsanordnung des Depletionsverfahren mit Methotrexat =(A/B\*+MTX), das vor der sekundären MLC nicht aus der Kultur entfernt wurde, sowie der unmanipulierten Kontrollen =(A/B\*). Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten MLC, die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

Zellkultursystem	A/B*+MTX, nicht entfernt vor sekundärer MLC				A/B*-Kontrolle			
Anzahl der Experimente	Ex.1	Ex.2.	Ex.3.	Ex.4.	Ex.1.	Ex.2.	Ex.3.	Ex.4.
A/B*	10	14	23	19	100	100	100	100
A/B*+A	–	22	32	18	–	98	193	284
A/B*+B	11	38	17	22	171	123	331	256
A/B*+C	12	41	58	27	174	129	284	120
A/B*+Tetanol	11	43	52	21	68	118	96	178
A/B*+PHA	7	58	87	14	218	223	420	670

## Ergebnisse

Tab. 3.4.5-03

*(6-H3)-Thymidinproliferationsassay*

*Darstellung aller Resultate der zweiten Versuchsanordnung des Depletionsverfahren mit Methotrexat =(A/B\*+MTX), das vor der sekundären MLC aus der Kultur entfernt wurde, sowie der unmanipulierten Kontrollen. Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten MLC =(A/B\*), die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

Zellkultursystem	A/B*+MTX, entfernt vor sekundärer MLC			A/B*-Kontrolle		
Anzahl der Experimente	Ex.1	Ex.2.	Ex.3.	Ex.1.	Ex.2.	Ex.3.
A/B*	15	10	4	100	100	100
A/B*+A	16	12	3	77	98	124
A/B*+B	25	12	9	190	139	105
A/B*+C	42	15	19	229	124	95
A/B*+Tetanol	29	25	3	139	147	93
A/B*+PHA	212	149	45	220	380	163

## Ergebnisse

Tab. 3.4.5-04

*(6-H3)-Thymidinproliferationsassay*

*Darstellung aller Resultate der dritten Versuchsanordnung des Depletionsverfahren mit Methotrexat unter Zusatz von Leucovorin  $= (A/B^*+MTX+LV)$ , sowie der unmanipulierten Kontrollen. Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten  $MLC=(A/B^*)$ , die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

Zellkultursystem	A/B*+MTX+LV		A/B*-Kontrolle	
	Ex.1	Ex.2.	Ex.1	Ex.2.
Anzahl der Experimente				
A/B*	6	20	100	100
A/B*+A	5	26	48	65
A/B*+B	7	39	157	198
A/B*+C	28	77	97	146
A/B*+Tetanol	18	59	114	125
A/B*+PHA	61	221	106	225

Tab. 3.4.5-04

*(6-H3)-Thymidinproliferationsassay*

*Darstellung aller Resultate der vierten Versuchsanordnung des Depletionsverfahren mit Methotrexat unter Zusatz von Leucovorin und IL-2  $= (A/B^*+MTX+LV+IL-2)$ , sowie der unmanipulierten Kontrollen. Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten  $MLC=(A/B^*)$ , die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

Zellkultursystem	A/B*+MTX+LV+IL-2			A/B*-Kontrolle		
	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.1	Ex.2	Ex.3
Anzahl der Experimente						
A/B*	1	2	20	100	100	100
A/B*+A	2	2	26	90	102	65
A/B*+B	4	8	39	79	126	198
A/B*+C	11	50	77	79	123	146
A/B*+Tetanol	1	13	59	87	116	125
A/B*+PHA	64	153	221	108	168	225

## Ergebnisse

Tab. 3.4.5-05

*(6-H3)-Thymidinproliferationsassay*

*Darstellung aller Resultate der vierten Versuchsanordnung des Depletionsverfahren mit Methotrexat unter Zusatz von Leucovorin und IL-2 =(A/B\*+MTX+LV+IL-2), sowie der unmanipulierten Kontrollen. Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten MLC=(A/B\*), die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

Zellkultursystem	A/B*+MTX+LV+IL-2			A/B*-Kontrolle		
Anzahl der Experimente	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.1	Ex.2	Ex.3
A/B*	3	2	8	100	100	100
A/B*+A	5	3	7	77	55	100
A/B*+B	6	4	9	94	79	99
A/B*+C	56	52	100	70	57	96
A/B*+Tetanol	62	48	93	118	103	94
A/B*+PHA	128	99	94	100	97	97



## Ergebnisse

Tab. 3.4.5-06

*(6-H3)-Thymidinproliferationsassay*

*Tabellarische Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen der zwei unterschiedlichen Versuchsreihen der Depletionsmethode mit Anti-CD95 =(A/B\*+ Anti-CD95), sowie der unmanipulierten Kontrolle =(A/B\*). Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten MLC, die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

Zellkultursystem	A/B*+Anti-CD95 n = 4	A/B*+Anti- CD95+IL-2 n = 3	A/B*-Kontrolle n = 5
A/B*	65+-28	18+-27	100
A/B*+A*	48+-20	20+-22	90+-39
A/B*+B*	59+-20	23+-25	115+-51
A/B*+C*	124+-82	63+-29	103+-47
A/B*+Tetanol	94+-60	61+-34	147+-80
A/B*+PHA	165+-66	104+-50	157+-75

Tab. 3.4.5-07

*(6-H3)-Thymidinproliferationsassay*

*Darstellung aller Resultate der ersten Versuchsanordnung des Depletionsverfahren mit Anti-CD95 =(A/B\*+ Anti-CD95), sowie der unmanipulierten Kontrollen =(A/B\*). Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten MLC, die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

Zellkultursystem	A/B*+Anti-CD95				A/B*-Kontrolle			
Anzahl der Experimente	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.4	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.4
A/B*	65	47	42	104	100	100	100	100
A/B*+A	23	41	62	67	104	65	87	148
A/B*+B	32	54	69	79	115	198	103	101
A/B*+C	53	235	72	134	161	146	75	76
A/B*+Tetanol	59	85	51	181	289	125	108	100
A/B*+PHA	108	260	149	143	237	225	154	63

## Ergebnisse

Tab. 3.4.5-08

*(6-H3)-Thymidinproliferationsassay*

*Darstellung aller Resultate der zweiten Versuchsanordnung des Depletionsverfahren mit Anti-CD95 unter Zusatz von IL-2 =(A/B\*+ Anti-CD95+IL-2), sowie der unmanipulierten Kontrollen =(A/B\*). Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten MLC, die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

Zellkultursystem	A/B*+Anti-CD95+IL-2			A/B*-Kontrolle		
Anzahl der Experimente	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.1	Ex.2	Ex.3
A/B*	4	3	11	100	100	100
A/B*+A	8	4	11	77	55	100
A/B*+B	9	5	13	94	79	99
A/B*+C	75	67	87	70	57	96
A/B*+Tetanol	82	81	98	118	103	94
A/B*+PHA	80	72	94	100	97	97

Tab. .4.5-09

*(6-H3)-Thymidinproliferationsassay*

*Tabellarische Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen aus allen Versuchen der immunomagnetischen Depletionsmethode, sowie der nicht-depletierten Kontrolle =(A/B\*). Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten MLC, die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

Zellkultursystem	A/B* nach immunomagnetischer Depletion+IL-2 n = 3	A/B*Kontrolle n = 3, vor immunomagnetischer Depletion
A/B*	2+-3	100
A/B*+A*	3+-1	100+-24
A/B*+B*	4+-1	145+-43
A/B*+C*	33+-43	149+-71
A/B*+Tetanol	30+-50	123+-29
A/B*+PHA	43+-44	421+-281

## Ergebnisse

Tab. 3.4.5-10

*(6-H3)- Thymidinproliferationsassay*

*Darstellung aller Resultate vor und nach der immunomagnetischen Depletion. Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der unmanipulierten MLC, die auf 100 % festgesetzt wurde, wiedergegeben*

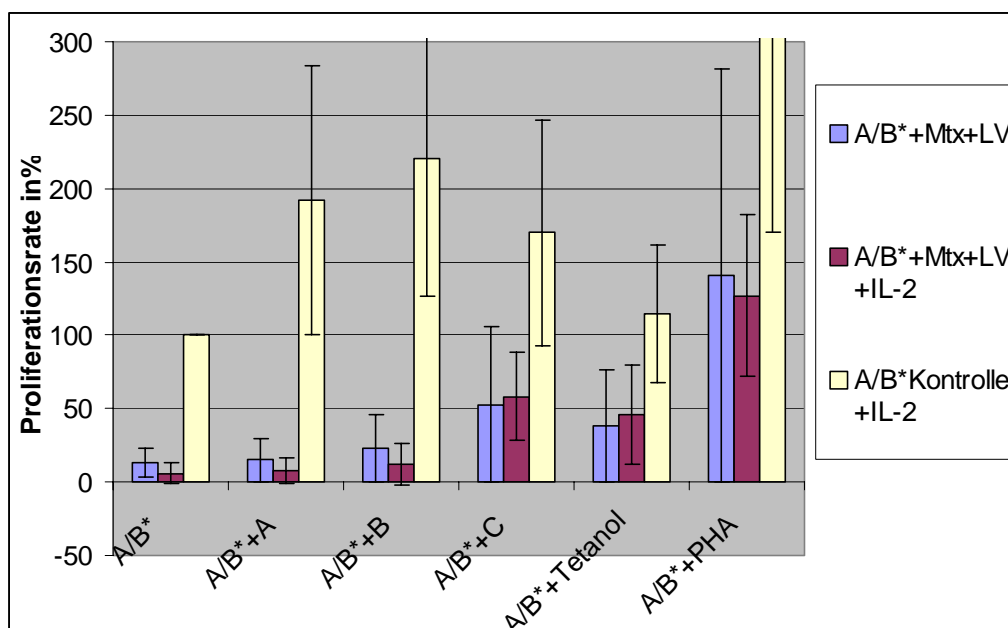
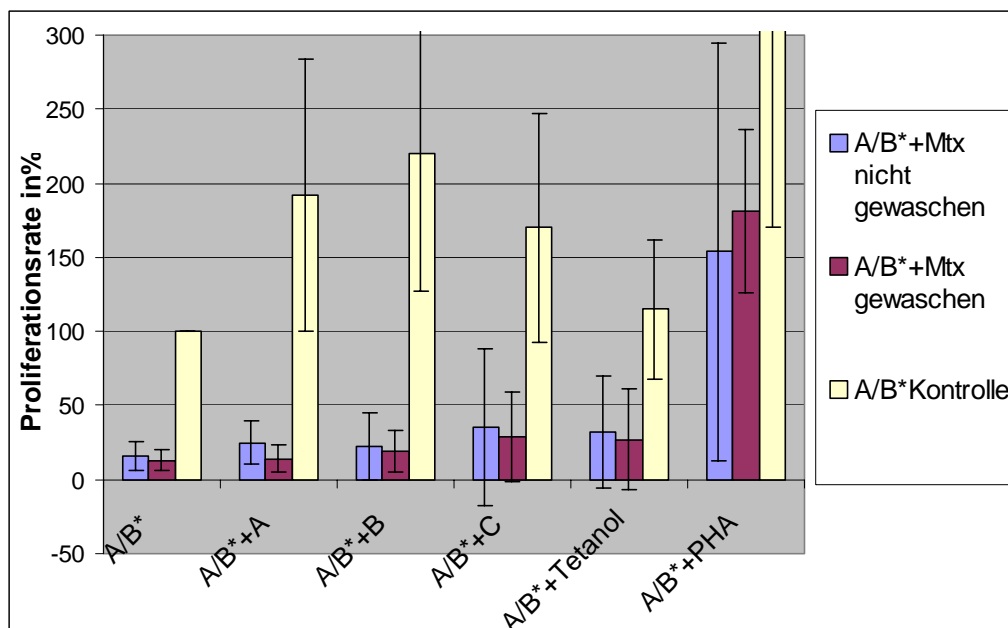
Zellkultursystem	A/B* nach immunomagnetischer Depletion+IL-2			A/B*-Kontrolle, vor immunomagnetischer Depletion		
Anzahl der Experimente	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.1	Ex.2	Ex.3
A/B*	1	6	0	100	100	100
A/B*+A	3	4	3	77	55	100
A/B*+B	4	4	4	94	79	99
A/B*+C	33	82	7	70	57	96
A/B*+Tetanol	30	88	0	118	103	94
A/B*+PHA	43	94	17	100	97	97

## Ergebnisse

Abb. 3.4.5-01

(6-H3)-Thymidinproliferationsassay

Sekundäre MLC nach Anwendung der Depletionsmethode mit MTX sowie in unbehandeltem Zustand unter verschiedenen Kulturbedingungen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Versuchsreihe

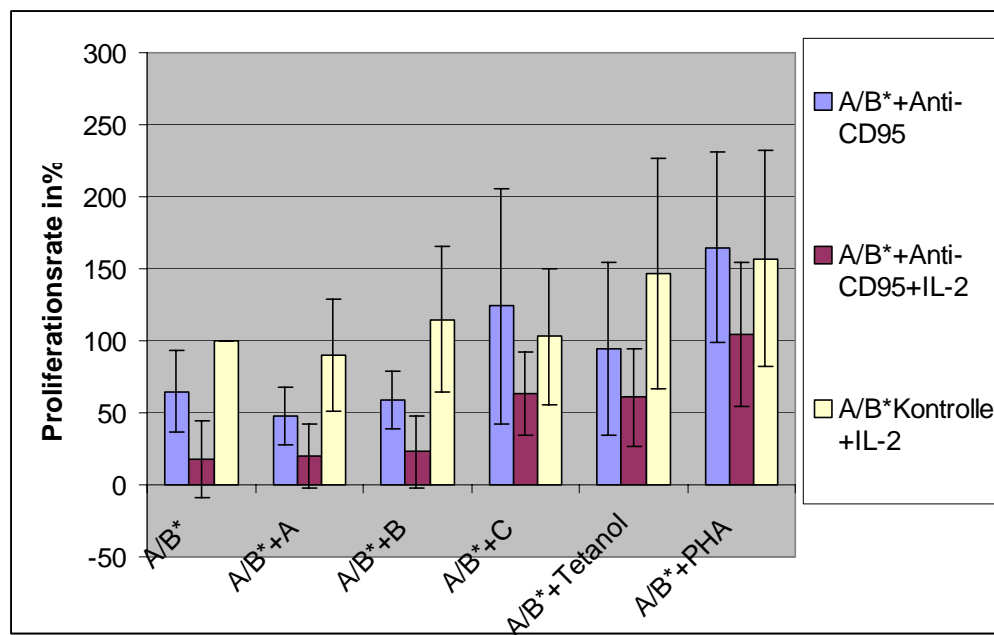


## Ergebnisse

Abb. 3.4.5-02

(6-H3)-Thymidinproliferationsassay

Sekundäre MLC nach Anwendung der Depletionsmethode mit Anti-CD95 sowie in unbehandeltem Zustand unter verschiedenen Kulturbedingungen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Versuchsreihe

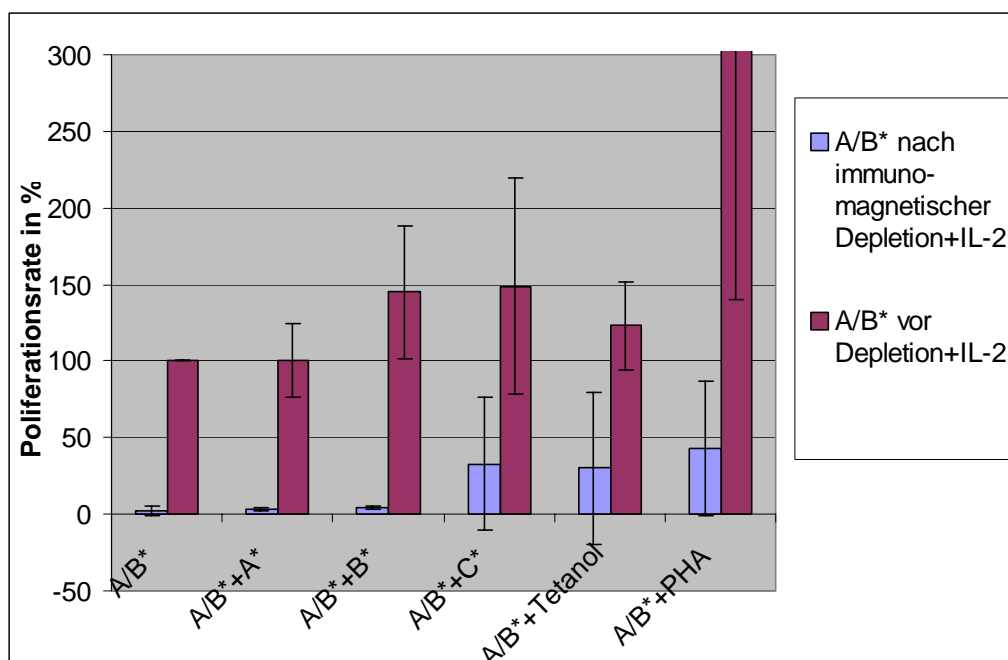


## Ergebnisse

Abb. 3.4.5-03

(6-H3)-Thymidinproliferationsassay

Sekundäre MLC nach Anwendung der immunomagnetischen Depletionsmethode sowie in undepletiertem Zustand. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Versuchsreihe



Während die initialen Wachstumsraten in den einzelnen unmanipulierten primären MLC-Ansätzen durch einen Durchschnittswert von 100 % charakterisiert wurden, umfasste die Proliferationsrate der primären Lymphozytenmischkultur, unter dem Einfluss von MTX, deutlich reduzierte Werte, die bei durchschnittlich  $16\% \pm 6$  lagen. Durch die Entfernung von MTX aus dem Kulturansatz wurden Wachstumsraten von  $13\% \pm 4$  erzielt. Unter dem Zusatz von Leucovorin lagen diese ebenfalls bei  $13\% \pm 10$ . Durch die Kultivierung der MLC mit IL-2 konnte eine weitere Reduktion der Proliferationstendenz mit Werten von  $6\% \pm 7$  erreicht werden. Im Vergleich dazu zeichnete sich die Situation, unter Anwendung von Anti-CD95 durch nachweislich höhere Thymidineinbauraten der primären MLC von  $65\% \pm 18$  aus. Allerdings ließ sich die Proliferationsrate unter Inkubation mit IL-2 entscheidend auf  $18\% \pm 7$  senken. Unter Zuhilfenahme der immunomagnetischen Depletionstechnik konnte eine noch effektivere Wachstumsreduzierung der primären MLC, mit Werten von  $2\% \pm 3$  erzielt werden. Ähnlich verhielt es sich mit den Daten der sekundären MLC, die Hinweise auf die allogene Reaktivität der unmanipulierten sekundären MLC sowie der sekundären

## Ergebnisse

Lymphozytenmischkulturen, die durch MTX, Anti-CD95 und das immunomagnetische Depletionsverfahren von alloreaktiven T-Zellen befreit wurden, lieferten. Hierfür wurden die Ansätze mit den selben Stimulatorzellen restimuliert, die in den primären MLCs Verwendung fanden. Mit Werten von  $220 \% \pm 92$  lag das Ausgangsniveau der unbehandelten sekundären MLC hinsichtlich der Alloreaktivität deutlich über den Werten der depletierten Ansätze. So konnte durch Verwendung der Depletionsmethode mit MTX ein sichtbarer Rückgang der allogenen Reaktivität beobachtet werden. Hierbei lagen die Wachstumsraten unter der anhaltenden Präsenz von MTX bei  $22 \% \pm 12$ . Durch Entfernung des Zytostatikums aus der Zellkultur konnten Werte von  $18 \% \pm 9$  erzielt werden. Ähnliche Resultate ergaben sich durch den Zusatz von Leucovorin. Diese ließen sich allerdings unter zusätzlicher Kultivierung mit IL-2 auf  $12 \% \pm 14$  reduzieren. Die Anwendung des Depletionsverfahrens mit Anti-CD95 erbrachte eine Senkung der Alloreaktivität auf  $59 \% \pm 20$ , die wiederum in Anwesenheit von IL-2 auf Werte von  $23\% \pm 25$  vermindert werden konnte. Die effektivste Eliminierung alloreaktiver T-Zellen wurde unter Zuhilfenahme der immunomagnetischen Depletionstechnik erreicht. Hier konnte lediglich eine Proliferationsrate von  $4 \% \pm 1$  nachgewiesen werden. Wie die tabellarische Übersicht Tab. 3.4.5-01-10 zeigt, blieb die Proliferationsfähigkeit nach Anwendung der drei verschiedenen Depletionsverfahren, hinsichtlich der Reaktivierbarkeit gegenüber „third party“ (=Zellen eines dritten Spenders), Tetanustoxoid, Phythämagglutinin (PHA) partiell erhalten. So ließ sich nach der Elimination alloreaktiver T-Zellen mit Hilfe der CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose, die deutlichste Immunantwort gegenüber „third party“-Zellen, spezifischen Antigenen (=Tetanustoxoid) und mitogenen Reagenzien = (PHA) nachweisen. Lymphozytenmischkulturen, die mit MTX behandelt wurden, zeigten lediglich unter Anwesenheit von Leucovorin eine vergleichbare Restimulierbarkeit der verbliebenen nicht-alloreaktiven T-Zellen, wobei eine leichte Aktivitätssteigerung durch den Zusatz von IL-2 verzeichnet werden konnte. Einen entscheidend Rückgang der Reaktivierbarkeit erfuhren die Zellkulturansätze nach Anwendung der immunomagnetischen Depletionsmethode. Hier ließ sich selbst in Anwesenheit des starken T-Zellstimulators PHA keine befriedigende erhaltene T-Zellaktivität mehr nachweisen.

### **3.4.7 Untersuchung der Effektivität der Depletionsverfahren, unter Zuhilfenahme des Zytotoxizitätstests.**

Der Zytotoxizitätstest ist eine ergänzende Nachweismethode zum Ausschluss alloreaktiver, zytotoxischer CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten, nach Anwendung der drei unterschiedlichen Depletionsverfahren. Im Gegensatz zu den T-Zell-spezifischen Proliferationseigenschaften, die mit Hilfe des (6-H3)-Thymidin-Proliferationsassays ermittelt werden können, zeichnet sich der Zytotoxizitätstest durch eine höhere Güte aus und profitiert von aussagekräftigeren Resultaten. Der Zytotoxizitätstest ist ein klassische Methode zur Funktionsprüfung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>T-Zellen. Dieses Nachweisverfahren wurde dabei neben dem Aufzeigen der Alloreaktivität auch zur Darstellung der Autoreaktivität, sowie der Reaktivität gegen periphere mononukleäre Zellen einer dritten Person genutzt. Die ermittelte Autoreaktivität wurde jeweils als Kontrolle verwendet. Hierzu wurden primäre MLC- Ansätze unter Einfluss von MTX, Anti-CD95 und unter Ausschluss dieser Zusätze, nach sechstägiger Kultivierung erneut einer Restimulation unterzogen. Jeder Ansatz wurde jeweils mit den gleichen allogenen Stimulatorzellen, die bereits in der primären MLC Anwendung fanden, sowie mit PMNCs einer dritten Person reaktiviert. Um Hinweise auf die allogene Reaktivität =(B-Blasten), die Autoreaktivität =(A-Blasten), sowie die Immunantwort gegenüber „third party“ =(C-Blasten), zu erhalten, wurden die selben, aus dem Blut isolierten peripheren mononukleären Zellen zur Generierung von Targetzellen verwendet, was durch dreitägige Inkubation mit Phythämagglutinin (PHA), einem starken T-Zell-Stimulans, bewerkstelligt wurde. Aufgrund der morphologischen Analogie zu maligne entarteten Lymphozyten wurden diese Targetzellen auch als PHA-Blasten bezeichnet. Mit Hilfe dieser Methode gelingt ein selektiver Nachweis der zytotoxischen Aktivität der CD8<sup>+</sup>T-Zellen. Ausschlaggebend hierfür ist der direkte zytolytische Angriff auf Targetzellen, die unter Freisetzung eines fluoreszenzverstärkten Liganden zerstört werden. Die resultierende Zytotoxizität der Effektor-CD8<sup>+</sup>T-Zellen wurde durch Angabe des Prozentsatzes an lysierbaren PHA-Blasten ermittelt. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen sind in folgenden Tabellen (Tab.3.4.7-1-5) und Abbildungen (Abb. 3.4.7-01-11) wiedergegeben.



## Ergebnisse

Tab. 3.4.7-1

### Zytotoxizitätstest

Tabellarische Darstellung der resultierenden Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup>T-Zellen unter Anwendung von MTX und Anti-CD95 anhand der spezifischen maximalen Lyse der A/B/C/-Blasten in Prozent. Angegeben sind die Resultate eines repräsentativen Versuchs

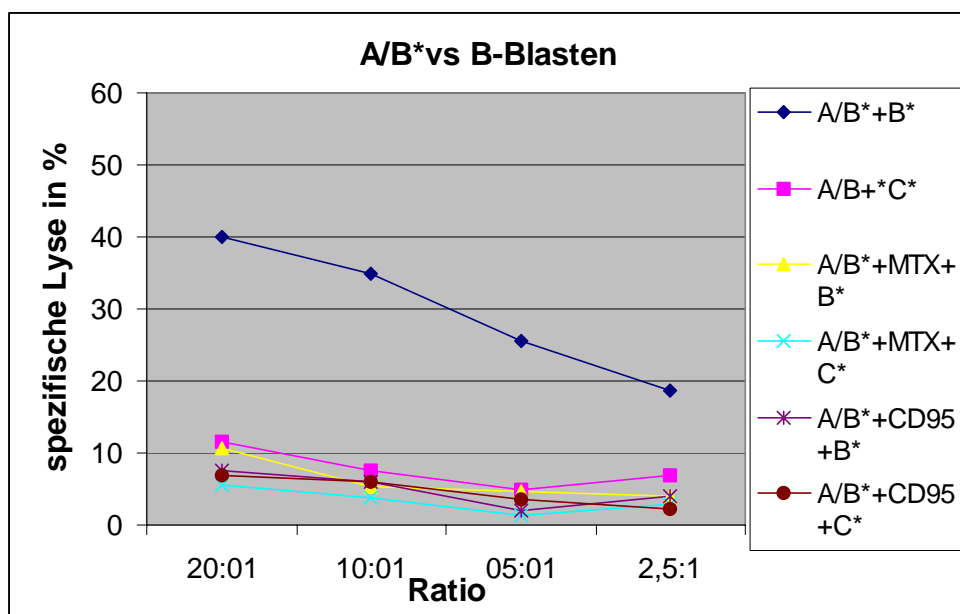
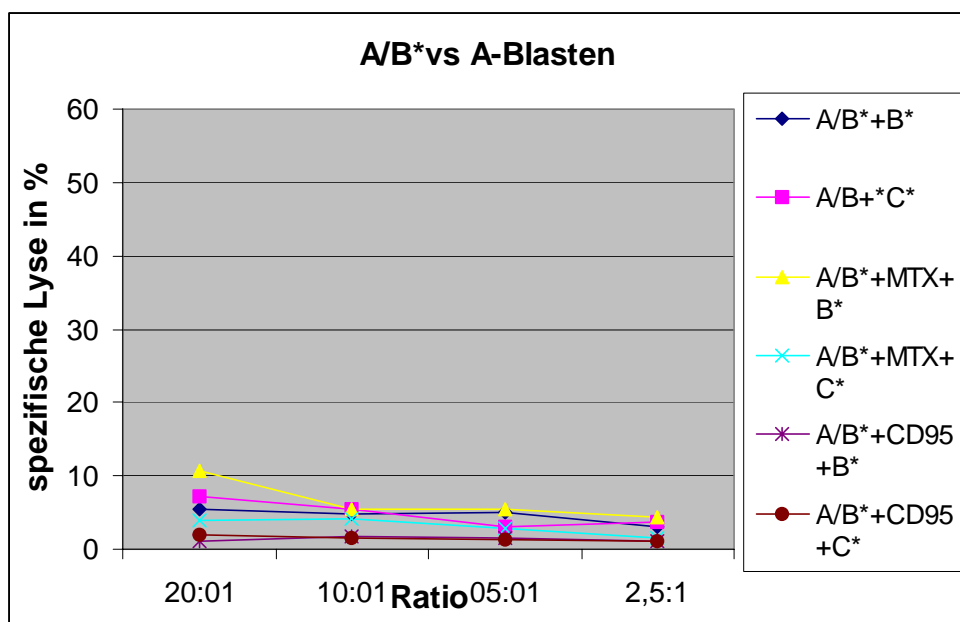
Maximale Lyse:	vs A-Blasten	vs B-Blasten	vs C-Blasten
A/B*+B*	5,5	40	5,3
A/B*+C*	7,1	11,6	49
A/B*+CD95+B*	1,1	7,5	4,5
A/B*+CD95+C*	2	70	51,7
A/B*+MTX+B*	10,7	10,7	9,2
A/B*+MTX +C*	3,9	5,5	55

## Ergebnisse

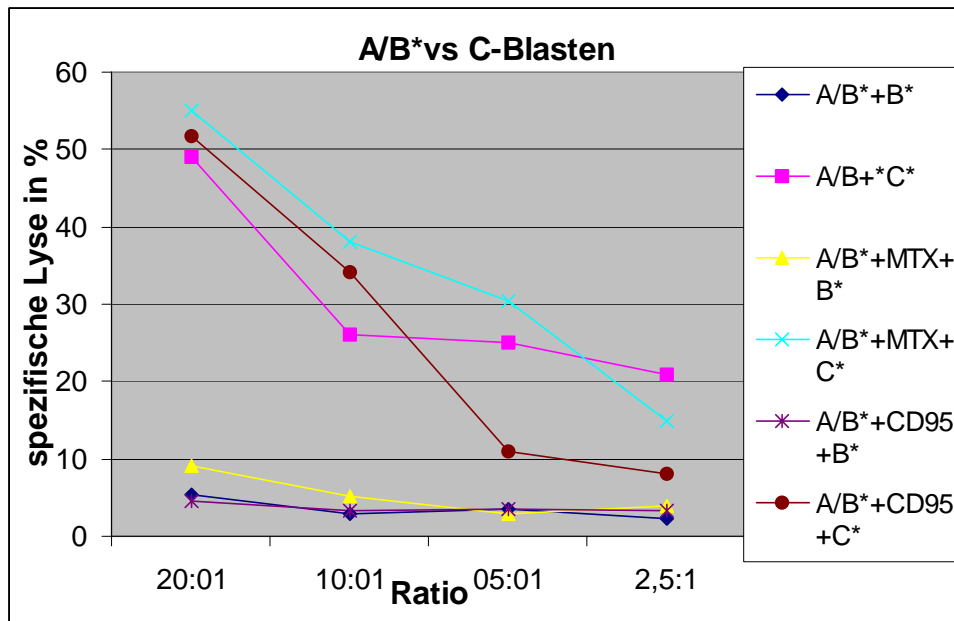
Abb. 3.4.7-01-03

### Zytotoxizitätstest

Nachweis der zytozoxischen Aktivität von  $CD8^+$ T-Zellen der unterschiedlichen MLC-Ansätze gegen A-/B- und C-Blasten. Die Kultivierung erfolgte in Anwesenheit von MTX und Anti-CD95 sowie ohne Zusätze. Aufgeführt sind die Resultate eines repräsentativen Versuchs



# Ergebnisse



## Ergebnisse

Tab. 3.4.7-2

### Zytotoxizitätstest

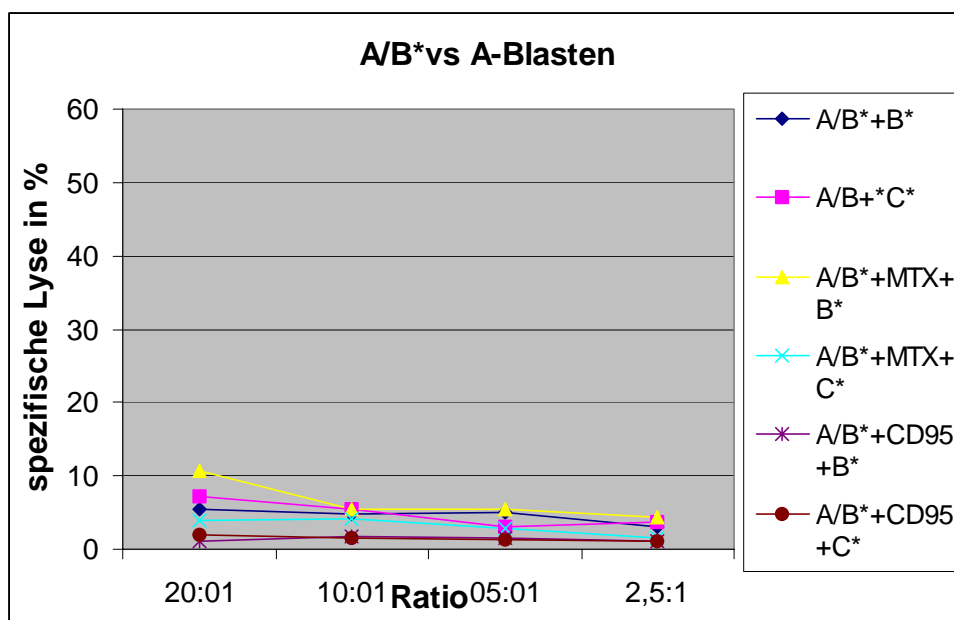
Tabellarische Darstellung der resultierenden Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup>T-Zellen unter Anwendung von MTX und Anti-CD95 anhand der spezifischen maximalen Lyse der A/B/C/-Blasten in Prozent. Angegeben sind die Resultate eines repräsentativen Versuchs

Maximale Lyse:	vs A-Blasten	vs B-Blasten	vs C-Blasten
A/B*+B*	6	40	4
A/B*+C*	7,4	17,4	29,5
A/B*+CD95+B*	8,9	17,4	9,9
A/B*+CD95+C*	3,9	7,4	15
A/B*+MTX+B*	3,2	10,8	2,9
A/B*+MTX +C*	6,4	6,7	29

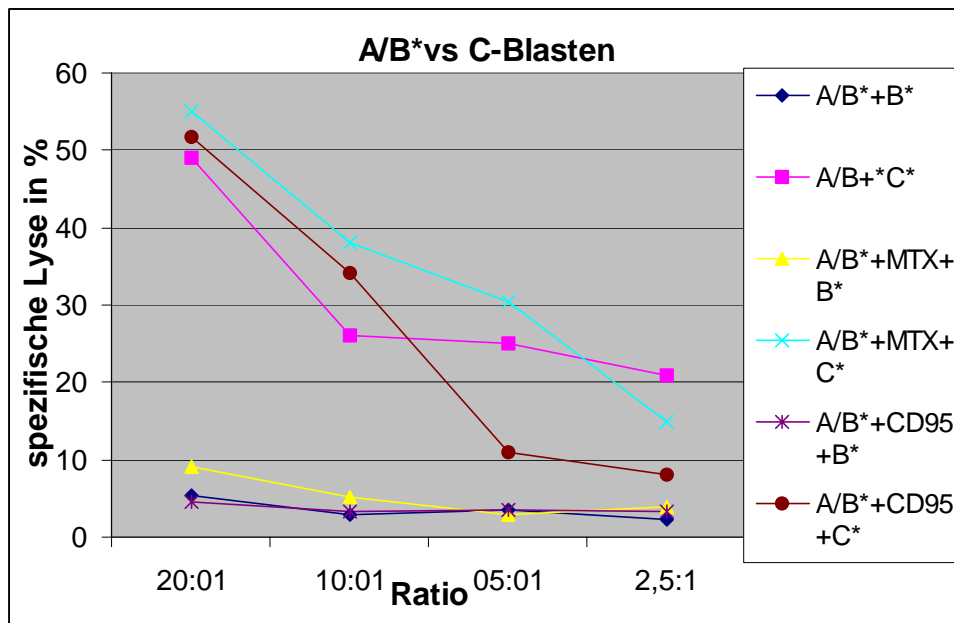
Abb. 3.4.7-04-06

### Zytotoxizitätstest

Nachweis der zytotoxischen Aktivität von CD8<sup>+</sup>T-Zellen der unterschiedlichen MLC-Ansätze gegen A-/B- und C-Blasten. Die Kultivierung erfolgte in Anwesenheit von MTX und Anti-CD95 sowie ohne Zusätze. Aufgeführt sind die Resultate eines repräsentativen Versuchs



# Ergebnisse



## Ergebnisse

Tab. 3.4.7-3

### Zytotoxizitätstest

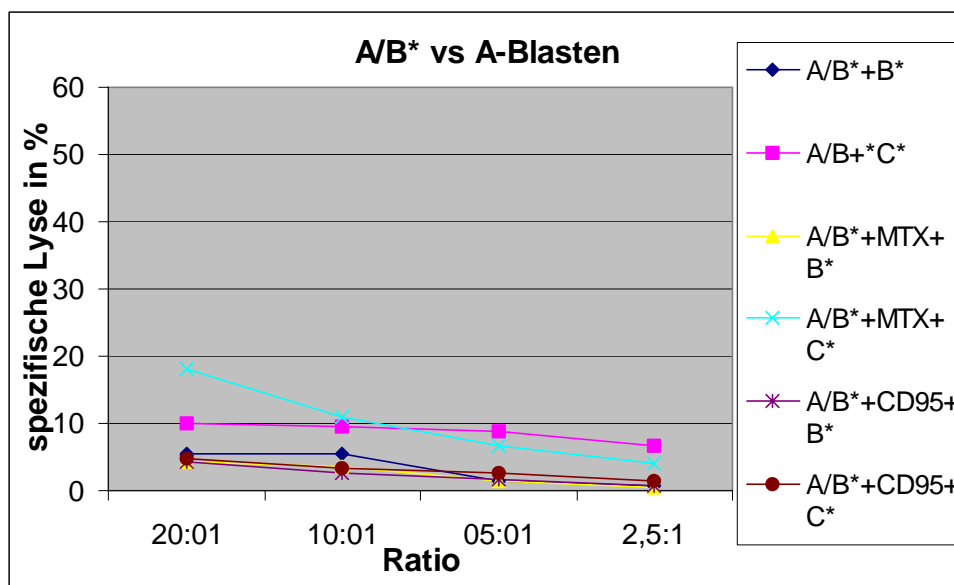
Tabellarische Darstellung der resultierenden Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup>T-Zellen unter Anwendung von MTX und Anti-CD95 anhand der spezifischen maximalen Lyse der A/B/C/-Blasten in Prozent. Angegeben sind die Resultate eines repräsentativen Versuchs

Maximale Lyse:	vs A-Blasten	vs B-Blasten	vs C-Blasten
A/B <sup>+</sup> +B <sup>+</sup>	5,5	32	5
A/B <sup>+</sup> +C <sup>+</sup>	10	22,3	36
A/B <sup>+</sup> +CD95+B <sup>+</sup>	4,4	12,7	6,6
A/B <sup>+</sup> +CD95+C <sup>+</sup>	4,8	13	18,9
A/B <sup>+</sup> +MTX+B <sup>+</sup>	4,2	5,7	4,6
A/B <sup>+</sup> +MTX+C <sup>+</sup>	18	11	24

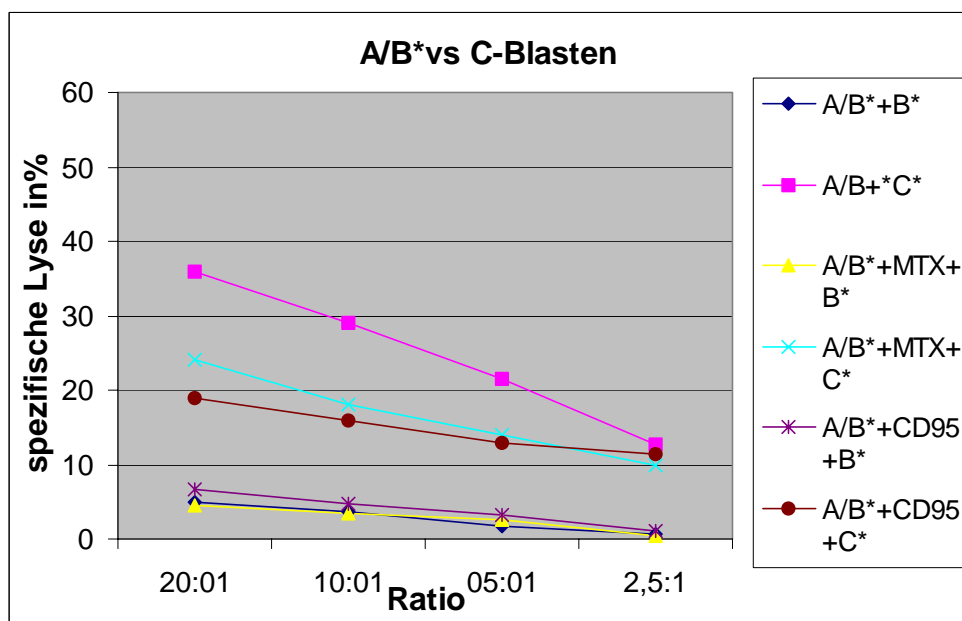
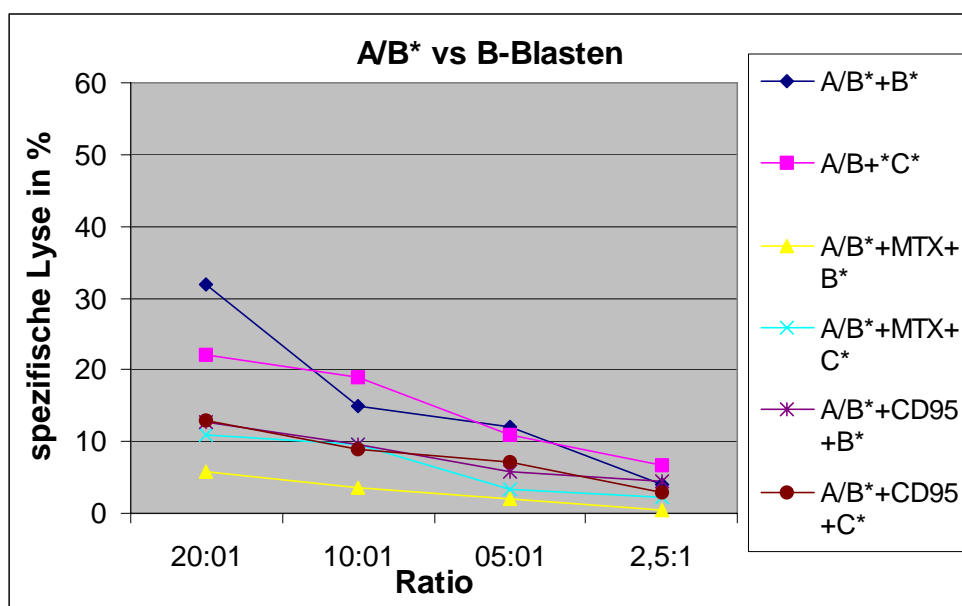
Abb. 3.4.7-07-09

### Zytotoxizitätstest

Nachweis der zytoxischen Aktivität von CD8<sup>+</sup>T-Zellen der unterschiedlichen MLC-Ansätze gegen A-/B- und C-Blasten. Die Kultivierung erfolgte in Anwesenheit von MTX und Anti-CD95 sowie ohne Zusätze. Aufgeführt sind die Resultate eines repräsentativen Versuchs



## Ergebnisse



Anhand der tabellarischen Übersicht und der ergänzenden Veranschaulichung durch die graphischen Darstellungen lässt sich der Verlauf des direkten zytolytischen Angriffs der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die unter verschiedenen Kulturbedingungen generiert wurden, auf so genannte Targetzellen verfolgen. So konnte sowohl unter Anwesenheit von MTX und Anti-CD95, als auch bei der unmanipulierten Kontroll -MLC, unabhängig von der vorausgehenden Restimulation mit denselben Stimulatorzellen die in der primären MLC eingesetzt wurden oder mit „third party“-Stimulatorzellen eine nur geringe

## Ergebnisse

spezifische Lyse autologer A-Blasten beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ließen sich, hinsichtlich der spezifischen Lyse der B-Blasten, deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellkulturansätzen nachweisen. Die Alloreaktivität der unmanipulierten MLC, die durch die gleichen PMNC erneut stimuliert wurden, kam verstärkt zum Ausdruck. Dies spiegelte sich in einer vergleichsweise ausgeprägten spezifischen maximalen Lyse der B-Blasten wider. Demgegenüber ließ sich unter den gleichen Voraussetzungen keine signifikante zytolytische Immunantwort gegen Zielzellen einer dritten Person (=C-Blasten) erzielen. Im Vergleich dazu wies eine unmanipulierte MLC, die einer weiteren Kultivierung mit Stimulatorzellen einer dritten Person ausgesetzt war, eine verstärkte, zytotoxische Immunantwort gegen C-Blasten auf, während ein zytolytischer Angriff auf B-Blasten abgeschwächt war. Im Gegensatz zur unbehandelten Kontroll-MLC, gelang unter dem Einfluss von MTX und Anti-CD95 eine signifikante Reduzierung der allogenen Reaktivität. Die Voraussetzung dafür war, dass die depletierten Ansätze durch die selben PMNC`s erneut stimuliert wurden. Die Abnahme der Alloreaktivität ließ sich anhand einer deutlich eingeschränkten spezifische Lyse der B-Blasten aufzeigen. Allerdings konnte unter Anwendung von MTX eine geringfügig stärkere Dezimierung der sekundären zytotoxischen Immunantwort gegen allogene B-Blasten aufgezeigt werden, als unter Kultivierung mit Anti-CD95. Um eine Aussage über die Aufrechterhaltung der spezifischen zytotoxischen Funktionen der verbliebenen nicht-alloreaktiven CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten treffen zu können, wurden die depletierten MLC-Ansätze jeweils einer Restimulation mit allogenen PMNCs einer dritten Person unterzogen, um nach erfolgter Kultivierung auf ihr vorhandenes zytotxisches Potential gegenüber C-Blasten untersucht zu werden. Die Daten belegen, dass sich durch die Depletionsverfahren mit MTX und Anti-CD95 eine starke Reduktion der sekundären zytotoxischen Immunantwort gegen allogene Zielzellen (=B-Blasten) erreichen ließ, während die zytotoxischen Aktivitäten gegen „third party“-Zielzellen (=C-Blasten) erhalten werden konnten. Unter dem Einfluss von MTX konnte eine geringfügig höhere spezifischen Lyse der C-Blasten erreicht werden als unter Inkubation mit Anti-CD95. Deutlich reduzierte zytolytische Angriffe auf „third party“-Targetzellen (=C-Blasten), zeigten die depletierten MLC-Ansätze in Anwesenheit von MTX und Anti-CD95 unter der Bedingung, dass die Ansätze durch die selben PMNCs restimuliert wurden, die ihre Anwendung bereits in der primären MLC gefunden hatten.



## 4 Diskussion

### 4.1 Antigenexpression alloreaktiver T-Zellen unter dem Zusatz von MTX und Anti-CD95

Die Oberflächenphänotypisierung im Durchflusszytometer ermöglicht eine präzise Identifizierung und Charakterisierung einzelner alloreaktiver T-Lymphozyten sowie eine Beurteilung des Ausmaßes ihres Aktivierungszustands. Während der Aktivierungsphase einer naiven T-Zelle wird zwischen einem sofortigen frühen und späten Aktivierungsvorgang unterschieden. Daran sind zunächst Protoonkogene (c-fos und c-myc), Kernbindungsproteine (NFkB und NFAT-1) beteiligt und dann folgen, mit unterschiedlichen Expressionskinetiken, Zytokine wie z.B. IL-2, Rezeptoren, wie z.B. die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors CD25 und der CD95 Rezeptor (APO-1/Fas) sowie das frühe Aktivierungsantigen CD69 und der CD95 Ligand. Erst nach Tagen kommt es dann zu einer verstärkten Expression von MHC-Determinanten wie z.B. dem MHC-II-Molekül HLA-DR und Adhäsionsmolekülen wie z.B. VLA-4, VLA-1. Die Aktivierungsantigene CD25, CD69, CD95 werden als typische G-1-Zellzyklusphasemarker klassifiziert und setzen eine entsprechende De-novo-Proteinsynthese voraus (47). Die durchflusszytometrische Analyse Alloantigen-aktivierter T-Lymphozyten zeigte nach einer Kultivierungsphase von fünf Tagen bereits einen leichten Abfall der Expression des frühen Aktivierungsantigene CD69. Dies könnte auf die Expressionskinetik von CD69 zurückgeführt werden. Das Antigen wird nach einer mitogenen Stimulation von vier Stunden auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen präsentiert und erreicht nach drei Tagen einen Höhepunkt der Hochregulierung. Anschließend fällt die Expression wieder stark ab (117). Der CD95-Rezeptor wird als ausgesprochen sensitiver Marker der T-Lymphozytenaktivierung eingestuft (47). Bereits wenige Stunden nach erfolgter Aktivierung nimmt die Präsentation des CD95-Antigens auf der Membranoberfläche langsam aber stetig zu, um nach fünf bis sechs Tagen die höchste Antigendichte zu erreichen (126). Die von uns durchgeführte Analyse der Aktivierungsantigene ergab dabei, dass im Mittel 99 % der alloreaktiven T-Zellen das CD95 Antigen auf ihrer Oberfläche exprimierten. Die Expression

## Diskussion

des CD25 Antigen setzt unter dem Gesichtspunkt der mitogenen Stimulation von PMNC nach vier Stunden ein und erreicht erst nach mehrtägiger Aktivierung eine maximale Ausprägung (22). Der Höhepunkt der HLA-DR Hochregulierung wird nach einer vier-bis achttägigen Stimulation durch PHA erreicht (22). Unsere Ergebnisse in den einzelnen Versuchsreihen entsprachen hinsichtlich des prozentualen Anteils an CD25- und HLA-DR-positiven T-Lymphozyten dem erwarteten Anteil an alloreaktiven T-Zellen (22).

Der Folsäureantagonist Methotrexat (MTX) ist ein Inhibitor der Enzyme der Purin- und Pyrimidinbiosynthese. Purine und Pyrimidine sind elementare Bausteine, die unter anderem Bestandteile von Coenzymen sind und als Polynukleotide wichtige Funktionen der Informationsspeicherung und -weitergabe haben. Des Weiteren erlangen sie eine besondere Bedeutung in der Regulierung des Zellzyklus. Der Zellzyklus umfasst vier Phasen. Unmittelbar nach Beendigung der Mitose und zu Beginn der Aktivierung einer ruhenden naiven T-Zelle erfolgt ein Übertritt in die G1-Phase des Zellzyklus. Die diploide Zelle wächst und synthetisiert wichtige zelluläre Proteine, Membranlipide, Saccharide und Nukleinsäuren. Fehlen Wachstumsfaktoren oder besteht Substratmangel, so können Zellen von der G1-Phase in die G0-Phase eintreten, in der sie sich sehr lange Zeiträume aufhalten können. Auch ruhende naive T-Zellen verweilen in dieser Phase. Für das weitere Durchlaufen des Zellzyklus sind verschiedene Wachstumsfaktoren wie z.B. IL-2 notwendig, unter deren Einfluss die T-Zelle einen als Restriktionspunkt bezeichneten Zeitpunkt der G1-Phase überschreiten kann, von dem aus keine Möglichkeit mehr besteht, in der G1-Phase zu verharren. Die nächste Phase ist die so genannte S-Phase. In ihr erfolgt die Replikation der DNA. Die Zellen treten danach in die G2-Phase ein, die sehr kurz ist und in der sich die Zellen auf die nächste Mitose vorbereiten (113). Eine Reduzierung des Purinnukleotidpools führt zu einer Arretierung der aktivierten T-Zelle in der S-Phase des Zellzyklus, unter der Voraussetzung, dass die Zelle bereits einen oder mehrere Zellzyklen durchlaufen hat. (85, 113). Die Inhibierung der Pyrimidinbiosynthese führt nicht nur in bereits proliferierenden, sondern auch in naiven aktivierten T-Zellen zu einem Zellzyklusarrest und konsekutiver Apoptoseinduktion, wobei ebenfalls ein

## Diskussion

Durchlaufen der G1-Phase und ein Eintreten in die S-Phase ermöglicht wird. Durch das Verharren in der S-Phase unternimmt die Zelle den Versuch, ihre fehlerhaft synthetisierte DNA zu reparieren, was ihr aufgrund des fortbestehenden Purin- und Pyrimidinnukleotidmangels nicht gelingt. Aus diesem Grund wird das Tumor-Suppressor-Protein p53 vermehrt exprimiert, das für die Initiierung der Apoptose notwendig ist (61). Diesen Erkenntnissen zu Folge scheint der Eintritt der aktivierten Zelle in die S-Phase des Zellzyklus eine grundlegende Voraussetzung für die Apoptoseinduktion von MTX in aktivierten T-Lymphozyten zu sein. Diese Vermutung lässt sich unter anderem durch die Arbeit von Genestier und Mitarbeiter unterstützen, die eine Hemmung der IL-2 Synthese in T-Zellen durch Cyclosporin A herbeiführten, wodurch die Zelle in der G1-Phase arretiert wurde. In diesem Zusammenhang beobachteten sie eine deutliche Herabsetzung der apoptosevermittelnde Wirkung von MTX (47). Um den direkten Einfluss von MTX auf die Expression der Membranantigene Alloantigen-aktivierter T-Lymphozyten zu untersuchen, wurde eine Lymphozytenmischkultur unter Anwesenheit von MTX für fünf Tage kultiviert. Dabei ließ sich nachweisen, dass der prozentuale Anteil an aktivierten T-Zellen, die die Aktivierungsantigene CD25, CD69, CD95 und HLA-DR auf ihrer Oberfläche exprimierten, durch den Zusatz von MTX im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht signifikant vermindert wurde. Ein gemeinsames, kennzeichnendes Merkmal der CD25, CD69 und CD95 Moleküle ist ihr frühes Erscheinen in der Aktivierungsphase, meist noch bevor die DNA-Synthese einsetzt. Daher werden sie auch als G1-Phase-Marker bezeichnet (47). Genestier und Mitarbeitern konnten in ihrer Studie demonstrieren, dass MTX keinen Einfluss auf die Expression der frühen Aktivierungsantigene mitogen stimulierter T-Zellen ausübte (47). Die Tatsache, dass wir in unseren Testreihen eine leicht abgeschwächte Expression der aktivierungsabhängigen Oberflächenantigene in dem mit MTX behandelten Ansatz auffanden, könnte darin begründet sein, dass alloantigenaktivierte T-Zellen, die unter dem Apoptose-vermittelten Einfluss von MTX für fünf Tage kultiviert wurden, bereits eine deutliche Dezimierung ihrer Anzahl erfahren hatten. Aktivierte T-Zellen erreichen bereits nach 24-stündiger Aktivierung einen Zustand, der von einer

## Diskussion

zunehmenden Empfindlichkeit gegenüber der zytotoxischen Wirkung von MTX geprägt ist (47).

Der AICD-Mechanismus (activation-induced-cell-death) wird durch das CD95-Rezeptor/CD95-Ligand-System repräsentiert. Eine Induktion der Apoptose erfolgt unter wiederholtem T-Zellrezeptor-vermitteltem Antigenkontakt und setzt die Anwesenheit von IL-2 voraus (Lenardo et al. 1991). Bereits während der frühen Aktivierungsphase der T-Zelle werden der CD95-Rezeptor und der CD95-Ligand verstärkt exprimiert und auf der Oberfläche präsentiert (126). Durch die Bindung des CD95 Liganden oder eines agonistischen monoklonalen CD95-Antikörpers an den CD95-Rezeptor, wird die Apoptose initiiert. Dieser Vorgang setzt allerdings voraus, dass die T-Zelle über einen Zeitraum von fünf bis sechs Tagen mehrmals durch das gleiche Antigen in Anwesenheit von IL-2 stimuliert wird (126) und ein oder mehrere Zellzyklen passiert werden, bevor sie ein Stadium erreicht, das sie durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose auszeichnet (17, 89). Die Resultate der vorliegenden Arbeit lassen erkennen, dass allogene aktivierte T-Zellen unter Anwesenheit des agonistischen monoklonalen CD95-Antikörpers in der Lage sind, die Oberflächenmarker CD25, CD69, CD95 und HLA-DR hochzuregulieren, bevor sie empfänglich für den AICD-Mechanismus werden. Hartwig und Mitarbeiter berichteten in diesem Zusammenhang davon, dass die Induktion der CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose zu keiner Beeinträchtigung der Aktivierungsantigenexpression führt. (59). Die Resultate unserer durchflusszytometrischen Messung zeigten unter den genannten Kulturbedingungen keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die prozentuale Expression der Aktivierungsantigene CD25, CD69, CD95 und HLA-DR, zwischen dem Kulturansatz, der in Anwesenheit von Anti-CD95 inkubiert wurde, und der unmanipulierten Kontrolle. Die im Vergleich zur unmanipulierten Kontrolle leicht verminderte Präsentation der aktivierungsabhängigen Oberflächenmarker lässt sich vermutlich auf die durch Anti-CD95 vermittelte Apoptoseinduktion in aktivierten T-Zellen zurückführen, die nach fünf Tage langer Kultivierung zu einer Verminderung des prozentualen Anteils an Aktivierungsantigen-präsentierenden T-Zellen geführt hatte. Unstimulierte,

ruhende T-Lymphozyten wiesen eine deutlich verringerte Expression der Membranantigene auf. Eine Ausnahme bildete der Prozentsatz CD95-positiver, ruhender T-Zellen, der zwischen 38 und 66 % lag. Nicht-aktivierte T-Zellen weisen eine geringe CD95-Antigendichte auf ihrer Oberfläche auf. Erst während der Aktivierungsphase erfahren T-Lymphozyten eine ausgeprägte Steigerung der CD95-Rezeptor Expression (126). Anhand der durchflusszytometrischen Untersuchung konnte eine geringfügige Hochregulierung der Aktivierungsantigene CD25, CD69 und HLA-DR beobachtet werden. In diesem Zusammenhang könnten Überlegungen angestellt werden, die ein minimales autoreaktives Potenzial der PMNCs, das durch Präsentation körpereigener Peptide in Verbindung mit identischen MHC-Molekülen, so genannter Minor-Histokompatibilitätsantigene, zu Stande kommt, für die Aktivierung der ruhenden T-Zellen verantwortlich macht. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass das Serum, das dem Kulturmedium zugeführt wird, eine Antigenquelle darstellt, die zur unspezifischen Aktivierung der T-Lymphozyten führt (136).

### **4.2 Apoptosenachweis in aktivierten T-Lymphozyten unter dem Einfluss von MTX und Anti-CD95**

In der vorliegenden Arbeit wurden apoptotische Veränderungen in mitogen aktivierten T-Lymphozyten, hervorgerufen durch Methotrexat und den agonistischen monoklonalen CD95-Antikörper, unter zu Hilfenahme des durchflusszytometrischen Verfahrens identifiziert und quantifiziert. Diese Methode ermöglicht einen präzisen Nachweis und eine Charakterisierung bestimmter apoptotischer T-Zellsubpopulationen. Normale Blutzellen weisen im Hinblick auf die Anordnung ihrer Membranlipide eine Membranasymmetrie auf. So sind aus der Gruppe der Phospholipide, das Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, hauptsächlich auf der Membranaußenseite lokalisiert. Der größte Anteil der Membranphospholipide wie z.B. Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin lassen sich auf der Innenseite der Zellmembran nachweisen (83). Von Fadock und Mitarbeitern (36, 37) konnte demonstriert werden, dass die Initiierung des programmierten Zelltods mit einem Verlust der Membranasymmetrie einhergeht. Dies spiegelte sich in der Präsentation von

## Diskussion

Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran wider. Einige Autoren konnten aufzeigen, dass Annexin V bevorzugt an negativ geladene Phospholipiden bindet, wobei das Molekül die höchste Affinität gegenüber Phosphatidylserin entwickelte (7, 10, 64). Annexin V ist Mitglied einer Proteinfamilie, die untereinander Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz aufweisen und die Fähigkeit besitzen,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Phospholipide zu binden (64). Umfassende Untersuchungen erbrachten den Nachweis, dass die Exposition von Phosphatidylserin auf der Membranoberfläche eine besondere Bedeutung hinsichtlich der selektiven Erkennung und Beseitigung apoptotischer Zellen durch Makrophagen hat (36, 37). Eine beschleunigte Phagozytose der apoptotischen Zellen verhindert eine mögliche Gewebsschädigung, hervorgerufen durch zytolytische Angriffe, wodurch eine Entzündungsreaktion verhindert werden kann (83). Die Anwendung des durchflusszytometrischen Verfahrens ermöglicht nicht nur eine genaue Analyse und Charakterisierung der Apoptose, sondern auch eine Abgrenzung gegenüber der Nekrose. Durch die Bindung von Annexin V an die Oberfläche der Zellen ist es möglich, ein sehr frühes Stadium der Apoptose zu erfassen, das mit der Kondensation des Chromatins einhergeht (64). Im Rahmen nekrotischer Veränderungen hingegen verlieren Zellen ihre Membranintegrität und ermöglichen dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI), in das Innere der Zelle einzudringen und sich selektiv an die DNA des pyknotischen Zellkerns zu binden. Gleichzeitig erfährt die nekrotische Zelle eine Anfärbung durch Annexin, da eine ausgeprägte Zellmembranschädigung ebenfalls mit der Exposition von Phosphatidylserin einhergeht (10).

Quemeneur und Mitarbeiter (113) demonstrierten, dass die Sensitivität proliferierender T-Lymphozyten gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Inhibitoren der Purin- und Pyrimidinsynthese durch die Anzahl der Zellteilungen gesteigert werden konnte. Die erhöhte Vulnerabilität gegenüber diesen Hemmstoffen führten sie darauf zurück, dass proliferierende T-Zellen, bereits mehrmals den Zellzyklus durchlaufen hatten und dabei häufiger die S-Phase passieren mussten, in der sie besonders empfindlich auf die zytotoxische Wirkung der Enzymhemmer reagierten. Des Weiteren gingen sie davon aus,

## Diskussion

dass der Purin- und Pyrimidinpool mit jeder Zellteilung zusätzlich reduziert wird. Diese Erkenntnisse veranlassten uns, periphere mononukleäre Zellen für vier Tage mit dem starken T-Zellstimulator Phythämagglutinin (PHA) zu stimulieren, um anschließend den Apoptose-vermittelten Effekt von MTX nach einem Zeitraum von 48 Stunden zu bestimmen. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden konnte gezeigt werden, dass MTX in der Lage ist, den programmierten Zelltod in mitogenaktivierten T-Zellen zu induzieren. Dabei ließ sich eine deutliche Zunahme des Prozentsatzes Annexin V positiver T-Zellen im Vergleich zu unbehandelten, PHA-stimulierten PMNCs ermitteln. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Resultaten anderer Arbeiten (113, 126).

T-Lymphozyten, die einer hohen IL-2-Konzentration ausgesetzt waren und anhaltend durch das gleiche Antigen stimuliert wurden, ließen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber der Auslösung der Apoptose erkennen (69, 89, 90). Diese Form des programmierten Zelltods wird als AICD-(activation-induced cell death) oder CD95-vermittelte Apoptose bezeichnet (68, 74). T-Lymphozyten, die sich entweder in der G0-Phase des Zellzyklus oder in einem frühen Aktivierungsstadium befinden, zeigen sich diesem Mechanismus gegenüber unempfindlich. Sobald eine aktivierte T-Zelle den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 sezerniert und den dazugehörigen IL-2-Rezeptor exprimiert und es zur Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten kommt, erlangt die T-Zelle nach Durchlaufen eines oder mehrerer Zellzyklen ein Stadium, das sie durch erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose auszeichnet (89). In diesem Zusammenhang wird davon ausgegangen, dass die Bedeutung von IL-2 darin liegt, der aktivierten T-Zelle den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus zu ermöglichen und zusätzlich zu einer verstärkten Expression des CD95-Rezeptors und CD95-Liganden beizutragen (69, 89, 90). Die Interaktion des CD95-R mit dem CD95-L oder dem agonistischen monoklonalen CD95 Antikörper ist unter gleichzeitiger Antigen-vermittelter T-Zellrezeptorstimulation für die Initiierung des Apoptosesignals verantwortlich (65). Strauss und Mitarbeiter legten diesbezüglich nahe, dass es einer fünf- bis sechstägigen Stimulierung bedarf, um in aktivierten T-Zellen die

## Diskussion

CD95-vermittelte Apoptose auszulösen (126). In Anlehnung an diese Beobachtungen, stimulierten wir in unseren Experimenten PMNC für vier Tage mit PHA und IL-2, um sie anschließend für 48 h mit einem agonistischen monoklonalen CD95 Antikörper zu inkubieren. Unter diesen Bedingungen konnte demonstriert werden, dass die CD95-vermittelte Apoptose in mitogenaktivierten T-Lymphozyten induziert werden kann und im Vergleich zur unmanipulierten Kontrolle eine deutlich höhere Apoptoserate anzutreffen war. Methotrexat wies im Vergleich zu Anti-CD95 eine geringfügig höhere Apoptosevermittelnde Wirkung auf. Dieser Umstand lässt vermuten, dass T-Lymphozyten nach einer viertägigen Stimulation bereits eine gewisse Anzahl an Zellteilungen vollzogen hatten und den Erkenntnissen von Quemeneur und Mitarbeitern zufolge mit jeder weiteren Zellzykluspassage empfindlicher gegenüber der zytotoxischen Wirkung von MTX reagierten (113). Für eine erfolgreiche Initiierung der CD95-vermittelten Apoptose wird hingegen eine Kultivierungsphase von fünf bis sechs Tagen vorausgesetzt (89, 126), so dass angenommen werden kann, dass das apoptoseinduzierende Potential von Anti-CD95 durch eine längere Inkubationszeit noch gesteigert werden kann.

Weiterhin konnten wir den Nachweis erbringen, dass auch unter der PHA-stimulierten Zellkultur ein geringer Anteil apoptotischer Zellen vorlag. Diese Tatsache könnte den Berichten von Lenardo und Mitarbeitern und Kabelitz und Janssen zufolge auf die CD95-vermittelte Apoptose zurückgeführt werden (68, 74, 89, 90). Wie bereits näher erläutert wurde, exprimieren aktivierte T-Lymphozyten, neben einer Vielzahl unterschiedlicher Aktivierungsantigene, verstärkt den CD95-Rezeptor, sowie den entsprechenden CD95-Ligand (126). Unter kontinuierlicher, mitogener Stimulierung und in Anwesenheit von IL-2 erreicht die T-Zelle ein Stadium der maximalen Sensitivität gegenüber dem AICD-Mechanismus. Voraussetzung für die Initiierung des apoptotischen Signals ist eine Wechselwirkung des CD95-R mit seinem CD95-L auf der Oberfläche der T-Zelle (65, 69, 89, 90). Aktivierung, klonale Expansion und Apoptose bilden somit unter physiologischen In-vivo-Bedingungen die Grundlage für die Generierung eines Repertoires an immunkompetenten Zellen. Das Immunsystem ist dadurch in der Lage, den Körper vor gefährlichen



## Diskussion

Antigenen zu schützen. Gleichzeitig wird gewährleistet, dass die Immunantwort nach erfolgreicher Eliminierung des Antigens beendet wird. Dies ermöglicht nicht nur die Aufrechterhaltung der Homöostase des Blutes, sondern verhindert außerdem die klonale Expansion autoreaktiver Immunzellen in der Körperperipherie (31). Eine weitere Ursache für das Auftreten apoptotischer Ereignisse in mitogen aktivierten PMNCs könnte die Induktion der passiven Apoptose sein, die durch eine Verarmung an Lymphokinen hervorgerufen wird. Dieser Prozess scheint sich erst im Verlauf einer T-Zellaktivierung zu manifestieren. Zu Beginn der Aktivierung sezernieren und exprimieren T-Lymphozyten in großem Ausmaß den T-Zellwachstumsfaktor IL-2 und den IL-2-Rezeptor. Die Wechselwirkung, des von der T-Zelle produzierten und freigesetzten IL-2 mit dem IL-2-R wird als autokrine Stimulation bezeichnet, wodurch nicht nur eine klonale Expansion der naiven T-Zellen, sondern auch die Differenzierung ihrer Nachkommen zu Effektorzellen induziert wird (89, 90). Es kann davon ausgegangen werden, dass die starke mitogene Stimulierung der T-Lymphozyten zu einem erhöhten IL-2-Bedarf führt, der durch die eigene IL-2-Produktion nicht mehr ausreichend gedeckt werden kann, so dass nach längerer Kultivierungszeit eine Verminderung der IL-2 Konzentration im Kulturmedium eintritt, wodurch ein apoptotisches Signal initiiert wird (68, 89).

PMNC, die vier Tage lang in unstimuliertem Zustand kultiviert wurden, ließen ebenfalls die Anwesenheit weniger apoptotischer T-Zellen erkennen. Diese Umstände können wahrscheinlich auf spontane apoptotische Ereignisse zurückgeführt werden, die in einer Zellkultur vereinzelt stattfinden.

In unserer Arbeit konnte ferner eine leichte Zunahme nekrotischer Zellen in den Zellkulturen verzeichnet werden, die unter dem Einfluss von Anti-CD95 und MTX standen. Aber auch in den unmanipulierten, aktivierten- und unstimulierten Kontrollen konnte ein annähernd großer Anteil nekrotisch veränderter Zellen nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür könnte in der Tatsache begründet liegen, dass mit zunehmender Dauer der Kultivierung und zunehmender Zellzahl ein Farbumschlag des im Komplettmedium enthaltenen Indikators auf ein stark sauer werdendes Milieu hindeutet. Der rasche Abfall des pH-Werts unterhalb des physiologischen Normbereichs von 7,35-7,45 dürfte der Grund für

## Diskussion

das Absterben einiger kultivierter Zellen gewesen sein. Eine Begründung für den geringfügig höheren Anteil Annexin und Propidiumiodid-(PI)-positiver Zellen in denjenigen Ansätzen, die in Anwesenheit von Anti-CD95 und MTX kultiviert wurden, könnte die vermehrte Anhäufung apoptotischer Zellen im Kulturmedium sein. Diese verlieren allmählich ihre Membranintegrität, da sie nicht, wie unter in vivo-Bedingungen durch Makrophagen beseitigt werden können. Die morphologischen Veränderungen ermöglichen ein Eindringen von PI in das Zellinnere und eine Anfärbung der fragmentierten DNA.

Um zu demonstrieren, dass Methotrexat und Anti-CD95 den programmierten Zelltod selektiv in aktivierten T-Lymphozyten induzieren, wurde, zusätzlich zur Annexin-Exposition, die Präsentation der Aktivierungsantigene auf der Zelloberfläche bestimmt. Unter den gleichen Kultivierungsbedingungen konnte aufgezeigt werden, dass die Population apoptotischer T-Zellen gleichzeitig deutliche Anstiege der Expression der Aktivierungsmarker CD95 und HLA-DR aufwies. In Anlehnung an die im Kapitel Diskussion 4.1., Antigenexpression alloreaktiver T-Zellen unter dem Zusatz von Anti-CD95 und MTX erläuterten Ergebnisse scheint sich erneut zu bestätigen, dass die apoptosevermittelnde Wirkung von MTX und Anti-CD95 die Aktivierungsantigenexpression der T-Lymphozyten nicht beeinträchtigt. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass eine grundlegende Voraussetzung für die erfolgreiche Initiierung der Apoptose in T-Lymphozyten durch MTX und Anti-CD95 ein Durchlaufen des Zellzyklus ist. Genestier und Mitarbeitern legten nahe, dass naive T-Lymphozyten für 24h stimuliert werden müssen, bevor sie sensibel auf den zytotoxischen Effekt von MTX reagieren. Zur Induktion der CD95-vermittelte Apoptose, besteht sogar die Notwendigkeit, T-Zellen über fünf Tage zu stimulieren (47).

Das Hauptanliegen dieser Versuchsreihe war die direkte apoptosevermittelnde Wirkung von MTX und Anti-CD95 aufzuzeigen. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass eine Behandlung mit MTX und Anti-CD95 eine vollständige Ausschaltung der GVH-auslösenden T-Lymphozyten gewährleistet. Eine Proliferationshemmung, ohne gleichzeitige Apoptoseinduktion, würde unter dem

Gesichtspunkt der Deletion alloreaktiver T-Zellen nicht ausreichen, um die gefährliche T-Zellpopulation dauerhaft zu eliminieren.

### **4.3 Darstellung der gegensätzlichen Wirkungen von Methotrexat und Leucovorin (10-Formyltetrahydrofolsäure/Folinsäure)**

Methotrexat zeigte eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf die deletierenden, proliferationshemmenden Eigenschaften gegenüber alloantigenaktivierten T-Lymphozyten. So konnte im Rahmen unserer Untersuchungen, eine maximale Wachstumshemmung aktivierter T-Zellen unter einer MTX-Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  erzielt werden. Annähernd verminderte Proliftrationsraten ließen sich in einem Bereich von 1-0,1  $\mu\text{mol/l}$  nachweisen. Eine deutliche Wirkungsabschwächung von MTX stellte sich ab einer MTX-Konzentration von 0,001  $\mu\text{mol/l}$ . Ähnliche Beobachtungen wurden von Genestier und Mitarbeitern gemacht, die in einem vergleichbaren Ansatz, alloreaktive T-Zellen in einer Lymphozytenmischkultur generierten und MTX in abgestuften Konzentrationen zuführten. Unter diesen Bedingungen entfaltete sich die maximale zytotoxischen Wirkung von MTX in einem Wirkungsbereich von 0,1-10  $\mu\text{mol/l}$ . Sowohl eine Zunahme als auch eine Reduzierung der MTX-Konzentration führte zu einer deutlichen Abnahme der Wirkungsentfaltung (47). Leucovorin (10-Formyltetrahydrofolsäure) ist ein Derivat der Folsäure, die die Zytotoxizität von MTX effektiv neutralisieren kann, indem sie direkt um die Bindungsstelle der Dihydrofolsäurereduktase (DHFR) und anderer Folsäure-abhängiger Enzyme sowie um die Aufnahme in die Zelle und die Anheftung der Glutamatgruppen konkurriert (5, 38, 127).

Die Zufuhr von Leucovorin führt zur Wiederauffüllung des reduzierten Folsäurepools der Zelle. Zum einen geschieht dies durch Leucovorin selbst, das bereits in reduzierter Form als 10-Formyltetrahydrofolsäure vorliegt. Zum anderen trägt die Verdrängung des Folsäureantagonisten MTX von der DHFR, einem Enzym das für die Aufrechterhaltung des reduzierten Folsäurepools verantwortlich ist, in entscheidendem Maße dazu bei. Reduzierte Tetrahydrofolsäuren sind wichtige Cofaktoren der Purin- und Pyrimidinbiosynthese. Ihre Reduzierung führt zu Störungen wichtiger zellulärer Funktionen, wie z.B. der DNA-Replikation (127). Sowohl natürliche Folsäuren

## Diskussion

und deren Derivate als auch Folsäureantagonisten erfahren innerhalb der Zelle eine chemische Veränderung. Verantwortlich hierfür ist das Enzym Folyl-Polyglutamyl-Synthase (FPGS), das in der Lage ist, mehrere Glutamatreste auf MTX oder Folsäure zu übertragen (5, 38, 127). In Folge dieser Alteration erlangt MTX die Fähigkeit, außer der DHFR, auch andere Folsäure-abhängige Enzyme, wie z.B. die Thymidylat-Synthase, sowie Enzyme der Purinbiosynthese, effektiv zu inhibieren (127, 14). Im Rahmen der Glutamataneftung gewinnt MTX an Molekülgröße und erlangt einen höheren Ionisationsgrad. Beide Komponenten führen dazu, dass das Molekül in der Zelle zurückgehalten wird (2, 38). Die Enzymaktivität der FPGS ist vorallem in malignen Zellen stark ausgeprägt. In nicht entarteten Zellen findet sich hingegen ein geringeres Ausmaß der Glutamatübertragung (2, 25). Leucovorin verhindert die Bildung des glutamatreichen Folsäureantagonisten, wodurch zum einen erreicht wird, dass der Antimetabolit die Zelle wieder schneller verlassen kann. Zusätzlich ist es MTX in seiner ursprünglichen Form nicht mehr möglich, alle Folsäureabhängigen Enzyme effektiv zu inhibieren (1127, 38, 14). Die zelluläre Aufnahme von MTX erfolgt über die gleichen Transportsysteme, die normalerweise für den Transport der physiologischen Folsäure verantwortlich sind. Es wird zwischen zwei Transportsystemen unterschieden. Der reduzierte Folsäure Transporter besitzt eine niedrige Affinität gegenüber Folsäure und MTX. Der humane Folat Rezeptor (hFR) ist ein membranassoziiertes folsäurebindendes Protein, das eine wesentlich höhere Bindungskonstante zu reduzierter Folsäure und MTX aufweist (127, 16). Anhand dieser Darlegung wird verständlich, dass Leucovorin in der Lage ist, die zelluläre Aufnahme von MTX zu verhindern.

Farrugia und Flombaum (38, 41) gingen in ihrer Arbeit unter anderem näher auf die zytoprotektive Wirkung von Leucovorin ein. Sie berichteten darüber, dass Leucovorin unter In-vitro-Bedingungen in der Lage war, die wachstumshemmende Aktivität des Folsäureantagonisten gegenüber maligne entarteten Zellen vollständig aufzuheben. Allerdings lag dieser protektiven Eigenschaft eine Konzentrationsabhängigkeit zugrunde. Pinedo und Mitarbeiter (111) konnten diesbezüglich in einer Studie aufzeigen, dass die zytotoxischen

Effekte unter 1  $\mu$ molarer MTX-Konzentration durch äquimolare Leucovorin-Gaben neutralisiert werden konnten. Im Verlauf zunehmender MTX-Konzentrationen konnte der zytoprotektive Effekt nur unter einer überproportional hohen Leucovorin-Zufuhr aufrechterhalten werden. Ab einer MTX-Konzentration von 100  $\mu$ mol/l ließ sich kein Zellschutz mehr nachweisen (111). Ähnliche Ergebnisse ließen sich in unseren Versuchsreihen erzielen, wobei wir eine konstante MTX-Konzentration von 10  $\mu$ mol/l wählten, um die zytoprotektive Wirkung absteigender Leucovorin-Konzentrationen aufzuzeigen. Dabei konnten wir demonstrieren, dass eine deutliche Reduktion der zytotoxischen Wirkung von MTX erst unter äquimolaren Leucovorin-Konzentrationen einsetzte. Allerdings gelang selbst unter diesen Bedingungen keine vollständige Aufhebung der Zytotoxizität.

Unter der Vorgabe, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht alloreaktive T-Lymphozyten effektiv zu eliminieren und gleichzeitig immunkompetente T-Zellen zu erhalten, wurde eine MTX-Konzentration ausgewählt, die eine maximale zytotoxische Wirkung entfalten kann und gleichzeitig gering genug ist, um durch eine überproportional hohe Leucovorin-Konzentration vollständig neutralisiert zu werden.

#### **4.4 Selektive Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe unterschiedlicher Depletionsmethoden**

##### **4.4.1 Die MLC (mixed lymphocyte culture)**

Die Lymphozytenmischkultur stellt ein In-vitro-Modell dar, das lange Zeit dazu verwendet wurde, um im Rahmen einer Knochenmarktransplantation eine geeignete Auswahl von Spendern und Empfängern zu treffen. Es wurde davon ausgegangen, dass die Proliferationstendenz der MLC positiv mit dem späteren Auftreten einer GVHD nach erfolgter Knochenmarktransplantation korrelierte (135, 136). Grundlage der Lymphozytenmischkultur ist die Erkennung der polymorphen Allele der allogenen MHC-Moleküle der Klassen I und II. Dabei kommt es zu einer Lymphozytenproliferation, die anhand der ( $^3$ H)-Thymidineinbaurate gemessen werden kann (67, 135, 136). In einer MLC werden T-Helferzellen durch MHC-Antigene der Klasse II und zytotoxische T-

## Diskussion

Zellen durch MHC-Antigene der Klasse I stimuliert. Dabei scheinen zwei unterschiedliche Mechanismen zur spezifischen T-Zellaktivierung beizutragen. Zum einen werden Responder-T-Lymphozyten durch die Fremd-MHC-Antigene auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC) aktiviert, die als Stimulatorzellen in der MLC eingesetzt werden. Zum anderen können auch so genannte Minor-H-Antigene (mHA) zu einer T-Zellaktivierung beitragen, die in Formprozessierter Peptidfragmente von MHC-Molekülen präsentiert und durch MHC-restringierten T-Zellen erkannt werden (67). In einer Lymphozytenmischkultur ist nur ein geringer Prozentsatz an naiven T-Lymphozyten in der Lage, Alloantigene zu erkennen. Die erreichbare Frequenz an alloreaktiven T-Zellen liegt lediglich bei 1-10 % (42) und ist somit schwer nachzuweisen. Betrachtet man diesen prozentualen Anteil an alloreaktiven T-Zellen unter dem Gesichtspunkt, dass T-Zellen eines Individuums fremde MHC-Moleküle erkennen, obwohl keine Notwendigkeit für das Immunsystem besteht, eine Immunabwehr gegen Gewebstransplantate zu entwickeln, so ist die tatsächliche Anzahl der alloreaktiven T-Zellen eines Individuums verhältnismäßig hoch (67). In diesem Zusammenhang gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, die zur Generierung alloreaktiver T-Zellen führen. Zum einen ist eine T-Zelle, die sich auf die Erkennung eines spezifischen Proteins festgelegt hat in der Lage, dieses Protein auch in Kombination mit einem fremden MHC-Molekül zu erkennen. Ein alternativer Mechanismus wäre die direkte, starke Bindung des fremden MHC-Molekül an den T-Zellzeptor, wobei die Peptiderkennung eine untergeordnete Rolle spielt (67). Um einen Weg zu finden, die Empfindlichkeit der Standard-MLC, hinsichtlich der erfolgreichen Generierung alloreaktiver T-Lymphozyten zu verbessern und selbst schwache Immunantworten gegen Minor-H-Antigene zu potenzieren, setzten wir in unseren Versuchsreihen periphere mononukleäre Zellen ein, die als antigenpräsentierende Stimulatorzellen einer Vorbehandlung mit Interferon- $\gamma$  und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  unterzogen wurden, um ihr stimulatorisches Potential zu steigern. Die Behandlung der Stimulatorzellen durch Zytokine erhöht die Expression von MHC-Antigenen, dabei konnte besonders eine Hochregulierung des HLA-DR-Antigens auf Monozyten beobachtet werden

(136). Des Weiteren werden verschiedene Adhäsionsmolekülen, wie z.B. ICAM und LFA1, und kostimulatorische Moleküle, wie z.B. CD28, verstärkt auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen präsentiert (136). Zusätzlich verfolgten wir das Ziel, die Empfindlichkeit der Lymphozytenmischkultur zu steigern, indem wir Interleukin-2 in die Kultur einsetzten. IL-2 ist ein T-Zellwachstumsfaktor, der in der Lage ist, die Sensitivität der MLC zu verbessern, indem es nicht nur die T-Zellaktivierung -und Proliferation unterstützt, sondern auch deren Differenzierung zu Effektorzellen und Gedächtniszellen induziert (67, 70). Des Weiteren regt IL-2 T-Zellen zur Synthese von Interferon- $\gamma$  an, einem Zytokin, das neben der T-Zellproliferation auch die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität verstärken kann (132, 136). In nachfolgenden Schritten sollten die alloreaktiven T-Lymphozyten anhand des proliferativen Verhaltens quantitativ nachgewiesen werden.

### **4.4.2 Proliferation als Indikator der T-Zellaktivität**

Der Nachweis der zellulären Immunantwort nach einem Antigenkontakt in vitro, gelingt mit Hilfe des Proliferationsassays. Hierbei handelt es sich um eine bewährte Methode, die durch Messung der Inkorporation von tritiummarkiertem Thymidin in die DNS eine quantitative Aussage der Proliferationseigenschaften aktivierter Zellen zulässt.

### **4.4.3 Etablierung des experimentellen Versuchsaufbaus: Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe des Folsäureantagonisten Methotrexat (MTX)**

In früheren Abschnitten wurde bereits eingehend über die Wirkung von Methotrexat auf alloreaktive T-Zellen berichtet. So konnten wir aufzeigen, dass MTX in der Lage ist, alloreaktive T-Zellen selektiv über den Weg der Apoptoseinduktion zu eliminieren. Ereignisse, die in einem frühen Aktivierungsstadium der Zelle stattfinden wie z.B. die Expression der Aktivierungsantigene werden hingegen durch MTX nicht tangiert. Unter dem Vorzeichen, eine Depletionsmethode zu etablieren, die geeignet ist, um alloreaktive T-Zellsubpopulationen möglichst vollständig zu eliminieren, während das antiinfektiöse und antileukämische Potential unbeeinflusst bleibt,

## Diskussion

unternahmen wir den Versuch, die Methode mit MTX in mehreren aufeinanderfolgenden Versuchsschritten zu optimieren.

Die Strategie, die wir für die Eliminierung des GVHD-Potentials alloreaktiver T-Zellen wählten, umfasste zunächst den Ansatz einer Lymphozytenmischkultur (MLC). Dieses experimentelle Vorgehen beinhaltet unter anderem die Präsentation von HLA-Antigenen, entsprechender Stimulatorzellen in Gegenwart mononukleärer Responderzellen, die aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert wurden. Alloreaktive Responder-T-Zellen erfahren nach Ko-Inkubation mit Stimulatorzellen eine klonale Expansion. Unter gleichzeitiger Anwesenheit von MTX wurde die MLC nach einer weiteren viertägigen Kultivierungsphase auf ihre potentielle Reaktivität gegenüber allogenen Stimulatorzellen getestet, die bereits in der primären MLC Verwendung gefunden hatten. Demgegenüber wurde die erhaltene Immunantwort gegen „third party“, Tetanustoxoid und PHA untersucht. Der Einfluss, den MTX sowohl auf die primäre als auch auf die sekundäre MLC ausübte, konnte anhand der Messung der ( $^3\text{H}$ )-Thymidineinbaurrate beurteilt werden. Dabei zeigte sich eine starke Reduktion der sekundären Immunantwort, gegen die identischen Stimulatorzellen und eine deutliche Einschränkung der Reaktivität gegenüber „third party“ und Tetanustoxoid. Lediglich auf den starken T-Zell-Stimulator PHA reagierten die verbliebenen T-Zellen mit einer proliferativen Aktivität. Anhand dieser Resultate konnte aufgezeigt werden, dass MTX in der Lage ist, alloreaktive T-Zellen nahezu vollständig zu eliminieren. Allerdings verfolgten wir das Ziel, eine Depletionsmethode zu entwickeln, mit der es gelingen sollte, alloreaktive T-Lymphozyten zu eliminieren, ohne gleichzeitig die immunologischen Fähigkeiten der übrigen T-Lymphozyten zu beeinträchtigen. Im Rahmen dieser Versuchsreihe stellte sich jedoch heraus, dass die Depletionsmethode mit MTX dieser Anforderung nicht gerecht wurde. Aus diesem Grund arbeiteten wir daran, eine Abwandlung der Methode herbeizuführen. Unter Verfolgung des gleichen Ziels wurde von Genestier und Mitarbeitern der Versuch unternommen, eine primäre MLC, die in Anwesenheit von MTX inkubiert wurde, für weitere vier Tage in frischem Kulturmedium aufzunehmen, um die



## Diskussion

Freisetzung des Zytostatikums aus der Zelle zu ermöglichen (47). Dieses Vorgehen basiert vermutlich auf den folgenden Erkenntnissen. Für die Aufnahme von MTX in die Zelle sind zwei verschiedene Transportsysteme erforderlich, die auch für den Transport der natürlichen Folsäure verantwortlich ist (16, 127). MTX vermag in jede Zelle zu gelangen, unabhängig von deren Aktivierungszustand (38). In der Zelle unterliegt der Folsäureantagonist einer chemischen Veränderung, indem, vermittelt durch das Enzym (FPGS), mehrere Glutamatreste auf das Molekül übertragen werden. Daraus resultiert eine Retention von MTX in der Zelle, da es aufgrund der erworbenen Molekülgröße und des erhöhten Ionisationsgrads nur erschwert die Zelle wieder verlassen kann (2, 5, 14, 127). Genestier und Mitarbeiter konnten in diesem Zusammenhang aufzeigen, dass ruhende PMNC, die man zuvor mit MTX inkubierte, apoptotisch wurden, nachdem man sie in frischem Medium aufgenommen und mit PHA aktiviert hatte (47). Sie gingen ebenfalls davon aus, dass MTX intrazellulär einer chemischen Alteration unterliegt und in dieser Form bis zu 24 Stunden in der Zelle zurückgehalten werden kann. Dieses modifizierte MTX-Molekül wird durch ein intrazelluläres Enzym, der Folyl-Polyglutamy-Hydrolase (FPGH) schrittweise von seinen Glutamatresten befreit. Dieser Vorgang gewährleistet eine allmähliche Freisetzung von MTX aus der Zelle (38, 115). In Anbetracht dieser Erkenntnisse waren wir bestrebt, die Depletionsmethode durch einen zusätzlichen Schritt zu ergänzen. Dies beinhaltete einen Waschvorgang und die anschließende Aufnahme der MLC in frischem Kulturmedium, nachdem sie zuvor für vier Tage mit MTX inkubiert wurde. Unter diesen Bedingungen wurde die MLC für weitere 24 Stunden kultiviert. Wir gingen davon aus, dass innerhalb dieses Zeitraums der größte Anteil der retinierten MTX-Moleküle die Zelle wieder verlassen hatte und demzufolge der toxische Einfluss auf ruhende, nicht alloreaktive T-Lymphozyten deutlich abgeschwächt sein würde. Im Anschluss daran erfolgte die sekundäre Restimulation für weitere fünf Tage. In Bezug auf die Alloreaktivität wurde dabei ebenfalls eine starke Reduktion verzeichnet, allerdings konnte die Immunantwort gegen „third party“ und Tetanustoxoid auch trotz Einführung eines MTX-freien Intervalls nicht erhalten werden. Eine partielle Immunantwort

## Diskussion

ließ sich lediglich gegen PHA nachweisen. Eine Ursache für diese Tatsache könnte sein, dass die MLC zu lange unter dem Einfluss von MTX stand. Genestier und Mitarbeiter (47) gingen in diesem Zusammenhang nach dem folgenden Prinzip vor, sie wendeten MTX ausschließlich in den letzten 16 Stunden der primären Lymphozytenmischkultur an. Unter Berücksichtigung dieser Anregungen, erfuhr die Methode eine erneute Abwandlung. So wurde die MLC nur noch für 48 Stunden mit MTX inkubiert und nach erfolgtem Waschvorgang weitere 48 Stunden in Medium kultiviert, dem zusätzlich Leucovorin (5-Formyltetrahydrofolat) hinzugefügt wurde. Leucovorin (LV) ist ein reduzierter Folsäurecofaktor, der, wie bereits erläutert wurde, mit dem Folsäureantagonisten MTX um die zelluläre Aufnahme, die enzymatische Anheftung von Glutamatresten und die Bindung der Purin- und Pyrimidinsynthese konkurriert (38, 41, 127). Farrugia und Mitarbeiter (38) berichteten darüber, dass LV in der Lage ist, die wachstumshemmende Eigenschaft von MTX vollständig aufzuheben. Unter der Voraussetzung, dass LV bereits zu Beginn der Kultur anwesend ist und in einer überproportionalen Konzentration vorliegt. Ähnliche Beobachtungen diesbezüglich konnten von Genestier und Mitarbeitern (47) gemacht werden. Das Vorhaben, das wir verfolgten, bezog diese Erkenntnisse ein. So sah die Änderung des Versuchsaufbaus vor, Leucovorin erst nach erfolgter Depletion alloreaktiver T-Zellen durch MTX einzusetzen. Dabei sollte gewährleistet werden, dass ruhende, nicht-alloreaktive T-Lymphozyten, die während der Inkubationsphase ebenfalls MTX aufgenommen und akkumuliert hatten, vor dessen toxischer Wirkung bewahrt blieben. Die Intention, die hinter diesem Vorgehen stand, war es, einer Beeinträchtigung der verbliebenen Immunantwort gegen verschiedene Stimulatoren entgegenzuwirken. In unseren Ergebnissen konnte aufgezeigt werden, dass die sekundäre Immunantwort gegen die ursprünglich in der primären MLC eingesetzten Stimulatorzellen nahezu vollständig außer Kraft gesetzt wurde. Es zeigte sich weiterhin eine geringfügige Steigerung der Restimulierbarkeit gegenüber „third party“ und Tetanustoxoid. Die durch PHA hervorgerufene Stimulation blieb demgegenüber erhalten. Insgesamt blieben diese Resultate hinter den von uns gestellten Erwartungen zurück. Die Ursache

## Diskussion

dafür könnte sein, dass MTX über einen zu langen Zeitraum in der primären MLC anwesend war. Des Weiteren könnte eine zu kurze Erholungszeit der Kultur nach Anwendung von MTX eine entscheidende Rolle gespielt haben. Da wir von dem neutralisierenden Potential von LV aufgrund der vorab durchgeführten Untersuchungen überzeugt waren, erfuhr das Depletionsverfahren eine weitere Ergänzung. Hierfür wurde die MLC nach dreitägiger Kultivierungsphase mit IL-2 stimuliert und daran anschließend für weitere 24 Stunden mit MTX inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere zweitägige Kultivierung in frischem Medium unter Anwesenheit von LV.

IL-2 ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor, der von naiven T-Zellen 20-30 Stunden nach deren Stimulation gebildet und verbraucht wird. Dies ermöglicht den T-Zellen, ihre eigene klonale Expansion sowie ihre Reifung und Differenzierung zu Effektorzellen und Gedächtniszellen zu unterstützen (67, 70). Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass der T-Zell-Wachstumsfaktor einen wesentlichen Einfluss auf die Empfindlichkeit aktivierter Lymphozyten gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose ausübt. Dabei sind vor allem diejenigen Lymphozyten für eine Apoptoseinduktion prädisponiert, die einer hohen IL-2 Konzentration ausgesetzt waren und anhaltend durch das gleiche Antigen stimuliert wurden (89, 100, 118). Auf der anderen Seite ist ebenfalls bekannt, dass eine Verarmung an Wachstumsfaktoren zur Initiierung eines Apoptosesignals in T-Lymphozyten führt (69, 90, 99). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse, beabsichtigten wir, den positiven Einfluss von IL-2 in Bezug auf die Unterstützung der T-Zellantwort gegenüber Alloantigenen zu verbessern. Davon wurde eine erfolgreichere Eliminierung einzelner alloreaktiver T-Zellklone erwartet. Da aktivierte T-Zellen 20-30 Stunden nach ihrer Aktivierung IL-2 sezernieren und sich selbst stimulieren können, wurde der T-Zell-Wachstumsfaktor erst drei Tage nach dem Ansetzen der primären MLC in einer niedrigen Konzentration in die Kultur eingebracht. Nach diesem Zeitraum wird von einem gesteigerten Verbrauch des endogen gebildeten Zytokins der Responderzellen ausgegangen. Die Reduktion der Alloaktivität fiel noch deutlicher aus als in den Verfahren zuvor. Zusätzlich konnte eine leichte

Zunahme der Reaktivität gegen die verschiedenen Stimulatoren verzeichnet werden.

Unter eingehender Betrachtung der Ergebnisse aller vier Versuchsreihen, lässt sich durchaus eine Optimierung der Depletionsmethode verfolgen. Es ließ sich demonstrieren, dass MTX in der Lage ist, alloreaktive T-Zellen unter geeigneten Kulturbedingungen nahezu vollständig zu eliminieren. Durch eine kürzere Exposition gegenüber MTX und einer sich daran anschließenden längeren Erholungsphase der primären MLC in Gegenwart von LV konnte die verbliebene Immunantwort der T-Lymphozyten gegen „third party“, Tetanustoxoid und PHA leicht gesteigert werden. Möglicherweise lässt sich die Restimulierbarkeit durch ein verlängertes MTX-freies Intervall weiter potenzieren, wodurch eine annähernd vollständige Freisetzung von MTX aus der Zelle gewährleistet wäre.

#### **4.4.4 Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten unter Anwendung des agonistischen CD95-IgM-Antikörpers**

Wir untersuchten die Möglichkeit, eine selektive Eliminierung alloreaktiver T-Lymphozyten unter Aufrechterhaltung der zellulären Immunantwort gegen „third party“, Tetanustoxoid und PHA mit Hilfe des AICD-Mechanismus (activation-induced cell death) zu erzielen. Wie bereits ausführlich erläutert wurde, handelt es sich bei dem AICD-Mechanismus um eine physiologische Form der Apoptoseinduktion in T-Lymphozyten. Unter kontinuierlicher Anwesenheit des gleichen Antigens werden T-Zellen wiederholt aktiviert und exprimieren demzufolge verstärkt den CD95-Rezeptor und den CD95-Liganden, deren Interaktion zur Initiierung eines Apoptosesignals führt. Um diesen physiologischen Mechanismus für unsere Vorhaben zu nutzen, inkubierten wir eine Lymphozytenmischkultur mit einer definierten Konzentration des agonistischen CD95 Antikörpers. Vor einer erneuten Restimulation wurde der Antikörper durch einen Waschvorgang aus der MLC entfernt, um die Reaktivierung der immunkompetenten T-Zellen nicht zu beeinträchtigen. Dabei ließ sich die ursprüngliche Alloreaktivität nur um 35 % senken, ähnlich verhielt es sich mit den Proliferationsraten, die Hinweise auf die verbliebene sekundäre

## Diskussion

Immunantwort gegen die gleichen allogenen Stimulatorzellen zuließen. Erfreulicherweise blieb die Immunantwort gegen „third party“, Teatnustoxid und PHA vollständig erhalten. Diese Resultate stehen im Einklang mit der Arbeit von Hartwig und Mitarbeitern (59), allerdings konnten wir keine vergleichbar starke Dezimierung der Alloreaktivität erreichen. Dieser Umstand ließe sich möglicherweise dadurch begründen, dass eine geringe Anzahl alloreaktiver T-Zellen vermutlich der Induktion des AICD-Mechanismus entkommen sind. Berichten zufolge sind einige T-Zellen, die sich zu Gedächtniszellen entwickelt haben; gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose resistent (78). Ein weiterer Grund könnte auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass die Versuchsreihe keine ergänzende Behandlung mit IL-2 erfuhr. Dem T-Zell-Wachstumsfaktor wird von einigen Autoren ein wichtiger Einfluss in Bezug auf die Steigerung der Empfindlichkeit von aktivierten T-Lymphozyten gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose attestiert (17, 68, 74, 89, 90). In diesem Zusammenhang wird davon ausgegangen, dass die Bedeutung von IL-2 darin liegt, der aktivierten T-Zelle den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus zu ermöglichen, wodurch sie ein Stadium erreichen, dass sie durch eine ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose auszeichnet. Algeciras-Schimnich und Mitarbeiter (1) führten diesen Umstand nicht nur auf die Tatsache zurück, dass der Eintritt in die S-Phase mit der Hochregulierung des CD95 Rezeptors und des CD95 Liganden verbunden ist, sondern zusätzlich mit einer Herunterregulierung des so genannte FLIP-Proteins (FLICE-like inhibitory protein) einhergeht. Das FLIP-Protein inhibiert die CD95-vermittelte Apoptose, indem es die Bindung der Caspase 8 an den CD95-Rezeptorkomplex inhibiert und somit die Weiterleitung des Apoptosesignals unterbindet (1, 84). Des Weiteren führt IL-2 aufgrund einer verstärkten Rekrutierung intrazellulärer Moleküle, die für die Transduktion der apoptotischen Signale verantwortlich sind, wie z.B. FADD und Caspase 8, zu einer effizienteren Apoptoseinduktion (89). Unter Einbeziehung dieser Erkenntnisse unternahmen wir den Versuch, die Depletionsmethode durch eine ergänzende Behandlung der primären MLC mit IL-2 abzuwandeln. Durch dieses Vorgehen versprachen wir uns nicht nur eine Steigerung der CD95-vermittelten

Apoptose und demzufolge eine Optimierung des Depletionsverfahrens, sondern auch eine Steigerung der Sensitivität der primären MLC. Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigten unsere Erwartungen bezüglich des Depletionserfolgs alloreaktiver T-Zellen. Es zeichnete sich eine Reduktion der Alloreaktivität um 80 % ab, zusätzlich konnte die sekundäre Immunantwort gegen die gleichen Alloantigene beträchtlich dezimiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Hartwig und Mitarbeitern (59) überein. In unserem Fall ging allerdings die verstärkte Depletion alloreaktiver T-Zellen mit einer vergleichsweise verminderten Immunantwort gegen „third party“, Tetanustoxoid und PHA einher. Die Ursache dafür könnte in der Tatsache begründet liegen, dass es zu einer verstärkten Reaktivität der T-Lymphozyten gegenüber den verschiedenen Stimulatoren gekommen ist und aufgrund der repetitiven Stimulierung, eine gewisse Anzahl aktivierter T-Zellen dem AICD-Mechanismus anheimgefallen sind.

#### **4.4.5 Die selektive immunomagnetische Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten**

Die Einführung der immunomagnetischen Depletion alloreaktiver T-Zellen unter Verwendung des MACS-Systems (magnetic-activated cell sorting), stellte eine weitere alternative Depletionstechnik dar, die auf der Identifizierung alloreaktiver T-Lymphozyten anhand der Expression spezifischer Aktivierungsantigene basiert und eine anschließende physikalische Zellseparation auf immunomagnetischer Grundlage einschließt. Dieses Depletionsverfahren wurde erstmals von Koh und Garderet durchgeführt (45, 80). Für die Depletion verwendeten sie ebenfalls das Verfahren des magnetischen Zellsortierens (MACS), allerdings depletierten Koh und Mitarbeiter ausschließlich alloreaktive T-Zellen, die das Aktivierungsantigen CD69 exprimieren, während Garderet und Mitarbeiter (45) die Lymphozyten mit dem CD25-Phänotyp depletierten. Fehse und Mitarbeiter konnten allerdings aufzeigen, dass diese Depletionsmethode optimiert werden kann, indem sich die Depletion gegen beide Oberflächenmarker richtet (39). Dies führten sie darauf zurück, dass die Expression der zwei Aktivierungsantigene unterschiedliche Aktivierungsstadien repräsentierte, wonach CD25 einen

## Diskussion

Expressionshöhepunkt nach 72 Stunden erreichte und CD69 bereits nach 48 Stunden eine maximale Hochregulierung erlangte. Entsprechend dieser Expressionskinetik empfahlen sie den optimalen Zeitpunkt der Depletion alloreaktiver T-Zellen nach einer Aktivierungsphase von 48 Stunden festzulegen. Sie gingen davon aus, dass zu diesem Zeitpunkt eine optimale Identifizierung alloreaktiver T-Zellklone gelingt und demzufolge die Effizienz der Depletion verbessert werden kann. In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir zur Depletion alloreaktiver T-Zellen das Verfahren des magnetischen Zellsortierens (MACS). Hierfür wurde eine große Anzahl peripherer mononukleärer Zellen für die Lymphozytenmischkultur benötigt. Das Vorgehen sah vor, die primäre MLC für 48 Stunden zu kultivieren und im Anschluss mit der eigentlichen Depletion fortzufahren. Die Depletion erfolgte anhand der Expression der Aktivierungsantigene CD25, CD69 und HLA-DR. Da die gleichzeitige Depletion mehrerer Aktivierungsmarker effizienter zu sein schien, verwendeten wir im Rahmen der Depletion Antikörper gegen diejenigen Aktivierungsantigene, die in einer großen Anzahl auf der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten präsentiert werden. Um den Erfolg der Depletionsmethode zu verbessern, verwendeten wir in Anlehnung an die Empfehlung von Fehse und Mitarbeitern (39) direkte magnetgekoppelte CD25- und HLA-DR-Antikörper, lediglich der CD69 Antikörper wurde mit einem sekundären magnetgekoppelten Goat-Anti-Mouse-Antikörper markiert. Unter dem gleichen Vorzeichen ließen wir die zu depletierende Zellfraktion zweimal über die Magnetsäule laufen. Die Effizienz dieses Depletionsverfahrens wurde mit Hilfe der Oberflächenphänotypisierung vor und nach der Depletion eingeschätzt. Ferner untersuchten wir die negative depletierte T-Zellfraktion hinsichtlich ihrer potentiellen Reaktivierbarkeit auf die gleichen Alloantigene sowie auf verschiedene antigene, mitogene und fremde allogene Stimulatoren. Durch das immunomagnetische Depletionsverfahren konnten 96 % der alloreaktiven T-Lymphozyten eliminiert werden. Demgegenüber zeigte sich eine vergleichsweise schwache Immunantwort gegen „third party“, Tetanustoxoid und PHA. Diese Ergebnisse zeigten auf, dass unter Verwendung einer Antikörperkombination gegen verschiedene Aktivierungsmarker und der

anschließenden immunomagnetischen Separation eine maximale Anzahl alloreaktiver Zellen eliminiert werden konnte. Fehse und Mitarbeiter (39) gingen diesbezüglich davon aus, dass verschiedene alloreaktive T-Zelklone zu unterschiedlichen Zeitpunkten erscheinen. Durch Anwendung einer Antikörperkombination, die gegen Aktivierungsantigene gerichtet ist, die unterschiedliche Aktivierungsstadien repräsentieren, könnte eine nahezu vollständige Eliminierung der alloreaktiven T-Zellsubpopulationen gelingen.

Der Erfolg der Depletionsmethode konnte auch anhand der Ko-Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD25 und HLA-DR vor und nach der Depletion wiedergespiegelt werden. Durch das Depletionsverfahren konnte der Anteil CD69-, CD25- und HLA-DR-positiver Zellen bis auf 2 % reduziert werden.

#### **4.4.6 Beurteilung der Effizienz der drei verschiedenen Depletionsverfahren**

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die immunomagnetische Depletionsmethode hinsichtlich der Elimination alloreaktiver T-Lymphozyten am effizientesten war. Ein weiterer Vorteil dieses Depletionsverfahrens besteht darin, dass es in der Klinik einsetzbar ist, da entsprechende Vorrichtungen, wie z.B. das Clini-MACS Isolex, bereits zur Zellseparation, bzw. Zellanreicherung klinisch angewendet werden (39). Ein zusätzlicher positiver Aspekt ist die sofortige Verfügbarkeit der depletierten nicht-alloreaktiven T-Lymphozytenfraktion nach Anwendung des Depletionsverfahrens (45, 80). Auf der anderen Seite wies der mit der Depletion einhergehende ausgeprägte Zellverlust einen deutlichen Nachteil auf, da dieser Umstand ein großes Blutvolumen der Probanden erforderte. Des Weiteren konnten im Hinblick auf die verbliebenen Immunantworten gegen „third party“, Tetanustoxoid und PHA keine befriedigenden Resultate erzielt werden.

Die Depletionsmethode unter Anwendung von MTX stellt demgegenüber eine Alternative dar, deren Vorteil vor allem darin zu sehen ist, dass das Zytostatikum bereits in der immunsuppressiven Therapie nach allogener, nicht-T-Zell-depletierter Stammzelltransplantation eingesetzt wird, um eine GVHD zu vermeiden. Demzufolge steht es in der Klinik ausreichend zur Verfügung. Ein weiterer Vorteil ist die einfache Anwendung des Depletionsverfahrens da es



## Diskussion

keiner zeitaufwendigen komplizierten Durchführung bedarf. Die Daten belegen außerdem, dass durch diese Methode eine starke Reduktion der sekundären Immunantwort gegen die gleichen allogenen Stimulatorzellen erzielt werden konnte. Die Ergänzung dieses Verfahrens durch den Einsatz von LV verspricht eine erfolgreiche Aufhebung der zytotoxischen Wirkung von MTX gegenüber verbliebenen immunkompetenten T-Lymphozyten. Allerdings konnten sich die T-Lymphozyten nicht in ausreichendem Maße von dem toxischen Einfluss des MTX erholen, um eine ausreichend starke Immunantwort gegen verschiedene Antigene zu generieren. Möglicherweise könnte man dieser Problematik durch eine verlängerte Erholungsphase der T-Zellen in frischem Kulturmedium, im Anschluss an die Inkubation mit MTX, beikommen.

Durch die Einführung des agonistischen monoklonalen CD95 Antikörpers in die Depletionsmethode gelingt eine erfolgreiche Separation alloreaktiver T-Lymphozyten von immunkompetenten T-Zellen. Im Vergleich zu den anderen Verfahren, zeichnet sich die Anwendung des CD95 Antikörpers durch eine schwächere Reduktion der verbliebenen Alloaktivität aus. Die Immunantwort gegen „third party“, Tetanustoxoid und PHA blieb hingegen partiell erhalten. Ein weiterer positiver Aspekt dieser Depletionsmethode ist ihre einfache und schnelle Durchführung. Ein zusätzlicher Vorteil dieses Verfahrens wird darin gesehen, dass die TH-1 CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation empfindlicher gegenüber der CD95-vermittelten Apoptoseinduktion reagiert als ihre Gegenspieler, die TH-2 T-Zellen (59, 134). Die Depletion alloreaktiver T-Zellen durch die CD95-vermittelte Apoptose führt daher zur Beeinflussung des Gleichgewichts der verbliebenen CD4+GVH-auslösenden T-Lymphozyten zugunsten des TH-2 Zellschenkels. Diese Tatsache könnte vermutlich der Entwicklung einer klinisch manifesten GVHD zusätzlich entgegenwirken (43).

### **4.5 Untersuchung der Effektivität der Depletionsverfahren mit Hilfe des Zytotoxizitätstests**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Effektivität von MTX und Anti-CD95, hinsichtlich der Elimination alloreaktiver zytotoxischer CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten und der Aufrechterhaltung der zytotoxischen Immunantwort nicht-alloreaktiver CD8<sup>+</sup>T-Zellen anhand einer ergänzenden Untersuchung der T-Zellfunktion

## Diskussion

ermittelt. Hierfür wurde im Vergleich zum Proliferations-Assay die Alloantigen-spezifische zytotoxische Zellzerstörung als Parameter für die T-Zellfunktion untersucht. Mit Hilfe des Zytotoxizitätstest ist es möglich, spezifische Funktionen zytotoxischer Effektor-T-Lymphozyten aufzuzeigen und zu beurteilen.

Zytolytische T-Lymphozyten entsprechen dem Formbild  $CD3^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+$ , sie sind MHC-Klasse-I-restringiert. Ihre biologische Bedeutung liegt darin, dass sie durch antigenspezifischen Kontakt die Zielzelle zerstören. Hierfür ist ein direkter Zellkontakt notwendig. Die  $CD8^+$ -T-Lymphozyten bilden mit der Zielzelle ein so genanntes Konjugat. Neben der direkten Bindung zwischen dem spezifischen T-Zellrezeptor und dem MHC-Klasse-I-Peptidkomplex sind auch Adhäsionsmoleküle z.B. Integrine, Lektine, akzessorische Moleküle und  $Mg^{2+}$  ,für die Stabilisierung des Kontaktes verantwortlich. Im Anschluss an die Konjugatbildung kommt es in der zytotoxische T-Zelle zu Polaritätsänderungen von mikrotubulären Strukturen, Golgi-Apparat und Lysosomen in der Nähe der Kontaktzone zur Zielzelle. Anschließend werden transmembranös verschiedene Inhaltsstoffe freigesetzt, wodurch die Zell-Lyse einsetzt. In der Zielzelle kommt es zur Porenbildung in der Zellmembran und damit zu einem Zusammenbruch des Ionengleichgewichts. Die Porenbildung ist äußerst effektiv und unabhängig von der ursprünglichen Erkennungsspezifität der zytotoxischen T-Lymphozyten. Schließlich erhalten die Granula der zytolytischen T-Zellen auch verschiedene Proteasen, die gemeinsam als Granzyme bezeichnet werden. Obwohl Granzyme nicht direkt zytolytisch wirken, sind sie an der Abtötung von Zielzellen beteiligt. Nachdem die Zellmembran durch Perforine porös gemacht wurde, können Granzyme in das Innere der Zielzelle gelangen und dort eine Enzymkaskade aktivieren, wodurch es letztendlich zur Fragmentierung der DNS durch so genannte Nukleasen kommt, die mit der Apoptose der Zielzelle einhergeht. Ein weiterer an der Zell-Lyse beteiligter Mechanismus ist die Sekretion von Zytokinen, wie z.B.  $INF-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  und  $TNF-\beta$ , sowie die Expression von CD95-Liganden, auf der Oberfläche zytotoxischer T-Zellen, die in der Lage sind, über spezifische Rezeptoren, wie z.B. der CD95-Rezeptor und der TNF-Rezeptor-I, mit der Zelloberfläche der Zielzelle in Wechselwirkung zu

## Diskussion

treten und dadurch in letzteren Nukleasen zu induzieren, die für die DNS-Desintegration verantwortlich sind, wodurch ebenfalls eine Apoptose der Zielzelle eingeleitet wird. INF-  $\gamma$ , ist demgegenüber in der Lage, Makrophagen zu aktivieren, sowie die Replikation pathogener Viren zu inhibieren und vermag die Expression der MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Antigene zu verstärken (67).

Der erste MLC-Ansatz wurde für drei Tage kultiviert und daran anschließend für 24 Stunden mit MTX inkubiert, worauf ein Waschvorgang und die zweitägige Kultivierung in frischem Medium, das zusätzlich Leucovorin enthielt, folgten. Der zweite Ansatz wurde für sechs Tage unter kontinuierlicher Anwesenheit des agonistischen CD95-Antikörpers inkubiert. Eine unbehandelte Lymphozytenmischkultur diente als Kontrolle. Unter dem Vorzeichen, der Amplifizierung der zytotoxischen alloreaktiven CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurde jeder MLC-Ansatz nach dreitägiger Kultivierung mit einer definierten Konzentration an IL-2 behandelt. Dieses Vorgehen basierte unter anderem auf den Erkenntnissen von Dai und Mitarbeitern (28), die in ihrer Arbeit demonstrieren konnten, dass IL-2 unter In-vivo-Bedingungen den Umfang des CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellpools deutlich steigern konnte. Die Voraussetzung dafür war allerdings, dass die Behandlung mit IL-2 im Verlauf der initialen T-Zellaktivierung erfolgte. Des Weiteren konnten sie feststellen, dass IL-2 eine gegensätzliche Rolle in Bezug auf die Generierung und Aufrechterhaltung des CD8<sup>+</sup>-Gedächtnispools spielte. Da das Ausmaß der klonalen Expansion positiv mit dem späteren Umfang des CD8<sup>+</sup>-Gedächtnispools korrelierte, verstärkte IL-2 indirekt die Generierung zytotoxischer Effektor- und Gedächtniszellen, da die Proliferation der CD8<sup>+</sup>-Vorläuferzellen durch Anwendung des Zytokins deutlich gesteigert werden konnte. Auf der anderen Seite konnten sie herausfinden, dass das Lymphokin in der Lage ist, die Anzahl der CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen zu reduzieren. Dieses Phänomen basiert darauf, dass IL-2 die Phase der Aufrechterhaltung des Gedächtniszellpools negativ beeinflusst. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine bestimmte Population der Gedächtniszellen unter kontinuierlicher Aktivierung durch persistierende Antigene zur Proliferation angeregt werden müssen, um ihre Gedächtnisfunktion aufrechterhalten zu

## Diskussion

können und um ihr Überleben zu gewährleisten. IL-2 inhibiert die Proliferation der Gedächtniszellen und trägt somit zur Dezimierung des CD8<sup>+</sup>-Gedächtnispools bei (28). Zusätzlich verfolgten wir mit der IL-2-Behandlung das Ziel, die Depletionsmethode unter Verwendung des agonistischen CD95 Antikörpers zu optimieren, da davon ausgegangen wird, dass IL-2 die Empfindlichkeit der CD95-vermittelten Apoptose steigern kann (17, 68, 74, 99, 89).

Die sekundäre Restimulation erfolgte sowohl mit den gleichen Stimulatorzellen, die ihre Anwendung bereits in der primären MLC fanden, als auch mit Stimulatorzellen einer dritten Person. Um einen Nachweis über die allogene Reaktivität, sowie die Immunantwort gegen „third party“ zu erhalten, wurden die gleichen PMNC, die zur Restimulation verwendet wurden, zur Generierung von Zielzellen, so genannten PHA-Blasten verwendet. Dabei erzielte eine unmanipulierte MLC, die durch die gleichen Stimulatorzellen reaktiviert wurde, eine starke sekundäre Immunantwort gegen allogene Zielzellen. Demgegenüber konnte kein signifikanter zytolytischer Angriff auf „third party“-Zellen nachgewiesen werden. Hintergrund dieser Beobachtungen ist die Differenzierung naiver CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu Effektor- und Gedächtniszellen. Naive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen ihr Zielantigen durch die Antigenpräsentation der HLA-Klasse-I-Moleküle auf den Zielzellen, sowie die Bindung dieser Antigene an den T-Zellrezeptor (107). Dieser Aktivierungsvorgang führt nach 24 Stunden zu einem ersten Teilungsschritt der CD8<sup>+</sup>-T-Zelle. Daran schließt sich alle acht Stunden eine weitere Verdopplung des T-Zellklons an. Diese klonale Expansion wird entscheidend durch IL-2 beeinflusst (28). Nach einer vier- bis fünftägigen rapiden Proliferationsphase differenzieren die CD8<sup>+</sup>-Vorläuferzellen zu zytotoxischen Effektorzellen, die in der Lage sind, Effektormoleküle wie z.B. Granzyme, Perforine und Zytokine zu synthetisieren, die sie benötigen, um Zielzellen zu zerstören. Die Differenzierung geht mit einer Reihe von phänotypischen Veränderungen einher. Dies äußert sich darin, dass die Expression bestimmter Oberflächenmarker und Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. CD44, LFA-1 und CD45 RO deutlich gesteigert ist (119). Auf die Effektorphase folgt ein Stadium, das durch den AICD-Mechanismus geprägt ist. Die

## Diskussion

Apoptoseinduktion trägt dazu bei, dass rapide proliferierende CD8<sup>+</sup>-Effektorzellen absterben, wodurch eine Dezimierung der stark expandierten Effektorzellen hervorgerufen wird (107). Die dritte Phase der T-Zell-Immunantwort ist durch das Auftreten von T-Gedächtniszellen charakterisiert. Diese zeichnen sich ebenfalls durch eine bestimmte Ausprägung der Expression der Oberflächenmarker und Adhäsionsmoleküle aus. Dabei zeigt sich eine verstärkte Präsentation von CD44 und CD45RO auf ihrer Oberfläche (119). Das T-Zellgedächtnis kann jahrelang andauern. Es gibt zurzeit zwei unterschiedliche Ansätze, die zum Verständnis der Entwicklung der T-Gedächtniszellen herangezogen werden. Zum einen wird davon ausgegangen, dass T-Gedächtniszellen Nachkommen der Effektorzellen darstellen, die einer Elimination durch den AICD-Mechanismus entkommen sind. Im Gegensatz dazu basiert das zweite Erklärungsmodell auf der Theorie, dass eine naive T-Zellen zwei verschiedene Differenzierungswege einschlägt und sich sowohl zur Effektorzelle, als auch zur Gedächtniszelle entwickeln kann (107). Opfermann und Mitarbeiter (107) konnten allerdings in ihrer Studie demonstrieren, dass CD8<sup>+</sup>Gedächtniszellen nur unter der Voraussetzung generiert wurden, dass bereits vollständig differenzierte CD8<sup>+</sup>Effektorzellen in der Zellkultur vorlagen. Somit legten sie nahe, dass Gedächtniszellen Nachkommen bereits differenzierter Effektorzellen darstellen. Zytotoxische Effektorzellen sind in der Lage, eine Zielzelle innerhalb weniger Minuten zu zerstören. Gedächtniszellen müssen hingegen zuerst reaktiviert werden, um eine zytotoxische sekundäre Immunantwort zu generieren (67). Sekundäre Immunantworten sind stärker als primäre Immunantworten naiver T-Zellen. Hierfür verantwortlich ist die erhöhte Anzahl antigenspezifischer T-Gedächtniszellen sowie deren qualitative Veränderung, die es erlaubt, wesentlich effektiver und empfindlicher auf einen erneuten Antigenkontakt zu reagieren. Dieses Phänomen wird daher als antigene Hyperreaktivität bezeichnet (107). T-Gedächtniszellen unterliegen einer weiteren Unterteilung in Subklassen, die sich sowohl phänotypisch als auch hinsichtlich ihrer Aktivierungsvorgänge voneinander unterscheiden (106). Die Effektor-Gedächtniszellen stellen eine Untergruppe dar, die sich durch den CD44 positiven und CD62-L negativen Phänotyp charakterisieren lassen. Sie

## Diskussion

zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich infolge einer erneuten Antigenerkennung sehr schnell zu Effektorzellen entwickeln können. Ein Überleben dieser T-Gedächtniszellen setzt eine kontinuierliche Aktivierung durch persistierende Antigene voraus. Auf der anderen Seite repräsentiert die zentrale T-Gedächtniszelle eine Subpopulation, die anhand der Präsentation der Oberflächenmarker CD44 und CD62-L klassifiziert werden kann. Ein wesentliches Charakteristikum dieser Subklasse ist ihre lange Lebensdauer, die keiner Antigenstimulation bedarf. Ein weiteres kennzeichnendes Merkmal ist die ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber dem T-Zell-vermittelten Antigenkontakt, auf den eine verzögerte Entwicklung zur Effektorzelle folgt (106). Anhand dieser Erkenntnisse wird deutlich, dass Alloantigen-spezifische T-Gedächtniszellen für die starke sekundäre, zytotoxische Immunantwort verantwortlich waren. Demgegenüber konnte kein signifikanter zytolytischer Angriff auf „third party“ Zielzellen nachgewiesen werden, da Alloantigen-spezifische Gedächtniszellen nicht in der Lage sind „third party“-Zielzellen zu zerstören. Wurde die unmanipulierte primäre MLC hingegen unter den gleichen Voraussetzungen mit Stimulatorzellen einer dritten Person restimuliert blieb eine starke zytotoxische Immunantwort gegen die gleichen Alloantigene, die bereits in der primären MLC eingesetzt wurden aus. Demgegenüber konnte ein ausgeprägter zytolytischer Angriff auf „third party“-Zielzellen beobachtet werden. Diese Tatsache könnte darauf basieren, dass die sekundäre Restimulation mit Stimulatorzellen einer dritten Person, zu einer verstärkten Generierung spezifischer CD8<sup>+</sup>-Effektorzellen geführt hat, die sich möglicherweise bereits zu Gedächtniszellen weiterentwickelt haben und deren zytotoxisches Potential selektiv gegen „third party“-Zielzellen gerichtet war. Der Nachweis einer geringen zytolytischen Immunantwort gegen allogene B-Blasten ist vermutlich auf die Entwicklung Alloantigen-spezifischer CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen im Verlauf der primären MLC zurückzuführen.

Im Vergleich dazu wies die primäre MLC, die einer erneuten Stimulation durch die gleichen Stimulatorzellen unterzogen wurde und einer Behandlung mit MTX ausgesetzt war, eine deutliche Abschwächung der zytotoxischen sekundären Immunantwort gegen B-Blasten auf. Diese Resultate stimmen mit denen von

## Diskussion

Strauss und Mitarbeitern überein (126). Daraus kann gefolgert werden, dass MTX aufgrund seiner Apoptose-induzierenden Wirkung in der Lage ist, der klonalen Expansion alloreaktiver T-Zellen entgegenzuwirken, wodurch deren Weiterentwicklung zu Effektorzellen und Gedächtniszellen verhindert wird.

Durch die Inkubation der primären MLC mit dem agonistischen CD95 Antikörper, konnte unter den gleichen Kulturbedingungen ebenfalls eine beachtliche Reduktion der sekundären, zytotoxischen Immunantwort gegen B-Blasten erzielt werden. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Hartwig und Mitarbeitern (59). Allerdings ließen sich die zytolytischen alloreaktiven T-Lymphozyten unter dieser Voraussetzung nicht im gleichen Ausmaß dezimieren, wie unter der Behandlung mit MTX. Die Ursache dafür könnte in der Tatsache begründet liegen, dass sich ein bestimmter Anteil der zytotoxischen Effektorzellen zu Gedächtniszellen entwickelt hatte, wodurch es ihnen gelang, der CD95-vermittelten Apoptose zu entkommen (59, 107). Des Weiteren gelang es uns aufzuzeigen, dass die Anwendung der unterschiedlichen Depletionsverfahren zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der Funktion nicht-depletierter CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten geführt hatte. In diesem Zusammenhang blieb der zytotoxische Angriff auf „third party“ Zielzellen auch nach der Depletion alloreaktiver T-Zellen zum einem großen Teil erhalten.

Die Notwendigkeit der Erhaltung zytotoxischer T-Zellen wird durch ihren entscheidenden Beitrag zum Graft-versus-Leukämie-Effekt verdeutlicht. Der GVL-Effekt ist verantwortlich für die Zerstörung residueller leukämischer Blasten, die die vorausgehende Konditionierung durch Chemotherapie und oder Ganzkörperbestrahlung überlebt haben und zu einem Rezidiv der Grunderkrankung führen können. Die Pathophysiologie des antileukämischen Effekts der Lymphozyten beruht insbesondere auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, da diese in der Lage sind, die leukämischen Zielzellen aufgrund der Präsentation aberranter leukämiespezifischer Antigene zu erkennen und zu zerstören. Darüber hinaus spielen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten eine wichtige Rolle im Rahmen der Bekämpfung viraler Infektionen, die während der Aplasie- und Immunrekonstitutionsphase nach erfolgter Knochenmarktransplantation eine Gefahr darstellen (59).

## Diskussion

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten durch MTX und Anti-CD95 zu einer deutlichen Reduktion der sekundären zytotoxischen Immunantwort gegen allogene Zielzellen geführt hat, während der zytolytische Angriff auf „third party“ Zellen erhalten blieb.



### 5 Zusammenfassung

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) einer Megadosis hochselektiv angereicherter CD34<sup>+</sup> allogener Stammzellen stellt eine bewährte Therapieform dar, die zur Zeit im Rahmen erworbener maligner Erkrankungen oder kongenitaler Störungen des hämatopoetischen Systems sowie des Immunsystems eine zunehmende Anwendung findet. Ein Vorteil dieser Therapie liegt darin, dass bei Fehlen eines konventionellen HLA-identischen Spenders auf einen HLA-haploidentischen Familienspender zurückgegriffen werden kann. Ein weiterer positiver Aspekt dieser Therapieform ist die fast vollständige Reduktion der GVHD-Inzidenz durch die starke Dezimierung an T-Zellen im Rahmen der Stammzellselektion. Auf der anderen Seite ist die hochselektive Anreicherung humaner hämatopoetischer Stammzellen mit einer Reihe von Komplikationen behaftet. Hierzu zählt insbesondere das Auftreten lebensbedrohlicher viraler Infektionen im Rahmen einer verlängerten Immundefizienz, die hauptsächlich durch Adenoviren und Cytomegalieviren hervorgerufen werden. Aber auch die toxischen Nebenwirkungen der Konditionierung die eine Notwendigkeit darstellt, um eine Abstoßung des neuen Stammzelltransplantats zu verhindern sowie das Rezidiv der Grunderkrankung können nach zunächst erfolgreicher Stammzelltransplantation eine ernstzunehmende Gefahr für den Patienten darstellen. Die Indikation für eine Applikation immunkompetenter Spenderlymphozyten wird gestellt, sobald ein zunehmender gemischter Chimärismus diejenigen Patienten identifiziert, bei denen eine akute oder chronische Abstoßung des Transplantats droht. Dabei kann durch frühzeitige Gabe von Spenderlymphozyten ein kompletter Chimärismus wieder hergestellt werden. Die Gabe von Spenderlymphozyten ist außerdem indiziert, wenn lebensbedrohliche virale Infektionen oder Pilzinfektionen vorliegen. Allerdings birgt die Infusion einer zu hohen Anzahl immunkompetenter T-Lymphozyten die Gefahr der Induktion einer schweren GVHD.

Unter diesem Gesichtspunkt könnte die Gabe immunkompetenter, nicht-alloreaktiver T-Lymphozyten im Rahmen eines drohenden leukämischen

## Zusammenfassung

Rezidivs sowie bei schwerwiegenden Infektionen eine therapeutische Option darstellen, die nicht mit der Komplikation einer GVHD-Entwicklung einhergehen würde.

Unter diesem Vorzeichen entwickelten wir unterschiedliche Verfahren für eine selektive Entfernung GVH-vermittelnder T-Lymphozyten unter Aufrechterhaltung immunologischer Funktionen der verbliebenen, nicht alloreaktiver T-Zellen. Dazu wurden potentiell alloreaktive T-Zellen mit bestrahlten zytokinvorbehandelten peripheren mononukleären Zellen (PMNC) koinkubiert. Hierbei konnten wir zeigen, dass die Zugabe von Interleukin 2 die Aktivierung der Effektorzellen steigerte und dadurch die Effektivität der Depletion deutlich erhöht wurde. Das erste der drei untersuchten Depletionsverfahren beinhaltete die Anwendung des Zytostatikums Methotrexat in der Lymphozytenmischkultur. Wir konnten aufzeigen, dass MTX in einer zuvor definierten Konzentration in der Lage war, alloreaktive T-Lymphozyten selektiv und erfolgreich zu deletieren. Dies gelang allerdings nur bei ausreichend starker Stimulierung der Effektorzellen mit IL-2. Die Deletion der T-Zellen erfolgte dabei durch Induktion der Apoptose, die einen irreversiblen Prozess darstellt. Der Nachweis der Apoptose erfolgte durch die gezielte Anfärbung der apoptotischen Zellen mit Annexin V. Des Weiteren gelang es und zu demonstrieren, dass durch Anwendung von MTX keine spezifischen Funktionen des frühen Aktivierungsstadiums, wie z.B. die Expression der Aktivierungsantigene CD25, CD69, CD95 und HLA-DR, wesentlich beeinträchtigt wurden. Im Thymidineinbau, ließ sich zusätzlich eine deutlich reduzierte Immunantwort in der MLC nach Restimulation durch die ursprünglich verwendeten allogenen Stimulatoren nachweisen. Nur unter der zytoprotektiven Wirkung von LV (Leucovorin) äußerten die verbliebenen T-Zellen eine abgeschwächte immunologische Aktivität in Gegenwart von „third party“ Zellen, Tetanustoxoid und PHA (Phythämagglutinin). Darüber hinaus gelang uns zudem nachzuweisen, dass Methotrexat die Generierung zytotoxischer, alloreaktiver CD8<sup>+</sup>T-Zellen erfolgreich verhindern kann. Gleichzeitig ließ sich eine Bewahrung der zytotoxischen Reaktivität gegenüber Zielzellen einer dritten Person darstellen. Im zweiten Verfahren untersuchten wir die Möglichkeit

## Zusammenfassung

alloreaktive T-Lymphozyten durch den CD95/CD95L-vermittelten AICD-Mechanismus (activation-induced cell death) zu depletieren. Hierfür setzten wir einen agonistischen monoklonalen CD95-Mausantikörper in die MLC ein, der an Stelle des natürlichen CD95-Liganden mit dem CD95-Rezeptor auf der Oberfläche Alloantigen-aktivierter T-Lymphozyten wechselwirkte und ein Apoptosesignal initiierte. Auch unter Anwendung dieser Methode gelang uns der Nachweis der selektiven Induktion der CD95-vermittelte Apoptose in alloreaktiven T-Zellen. Die Hochregulierung der frühen Aktivierungsantigene CD25, CD69, CD95 und HLA-DR wurde durch die Kultivierung mit dem CD95-Antikörper nicht wesentlich beeinflusst. Durch den Einsatz des CD95-Antikörpers in Verbindung mit Interleukin-2 (IL-2) in der Lymphozytenmischkultur konnten alloreaktive T-Lymphozyten effizient depletiert werden. Dabei zeigte sich in der proliferativen Zellaktivität eine deutliche Reduktion der sekundären Immunantwort gegen die gleichen Alloantigene. Allerdings ließ sich die Alloreaktivität nicht in dem Maße vermindern, wie unter der Behandlung mit MTX. Demgegenüber besaßen die übrigen T-Zellen eine partiell erhaltene immunologische Aktivität gegen „third party“, Tetanustoxoid und PHA. Auch dieses Depletionsverfahren ermöglichte eine erfolgreiche Deletion alloreaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten, die im Vergleich zur Kultivierung mit MTX geringfügig schwächer ausfiel. Gleichfalls konnte eine erhaltene zytotoxische Immunantwort gegen „third party“ Zellen erzielt werden. Mit der immunomagnetischen Depletionsmethode eröffnete sich eine weitere Option für eine effektive Eliminierung alloreaktiver T-Zellen. Hierfür wurde zu Kulturbeginn eine sehr hohe Ausgangszellzahl der PMNC benötigt, da durch das Depletionsverfahren eine große Anzahl der ursprünglichen T-Lymphozyten verloren ging. Durch die immunomagnetische Depletion gegen die Oberflächenantigene CD25, CD69, CD95 und HLA-DR mit Hilfe des MACS-Systems (magnetic-activated cell sorting), konnten die alloreaktiven T-Lymphozyten erfolgreich eliminiert werden. Im Thymidineinbau zeigte sich eine äußerst starke Abnahme der Alloreaktivität, verglichen mit dem Ausgangszustand vor der Depletion. Dies ließ sich auch anhand der deutlichen Reduktion der Aktivierungsantigenexpression beurteilen. Allerdings konnten die

## Zusammenfassung

verbliebenen T-Zellen lediglich eine stark verminderte Immunantwort gegen „third party“, Tetanustoxoid und PHA generieren.

Eine sinnvolle Immuntherapie in der frühen Post-KMT-Phase sollte unter dem Gesichtspunkt erfolgen, ein Rezidiv der Grunderkrankung und eine Transplantatabstoßung sowie eine virale/fungale Infektion erfolgreich anzugehen. Um diese therapeutischen Ziele in die Tat umzusetzen, ist die Verabreichung einer ausreichenden Anzahl immunkompetenter T-Lymphozyten notwendig. Bisher konnte eine bereits geringfügig erhöhte T-Lymphozytenzahl im Inoculum eine lebensbedrohliche GVHD hervorrufen. Die Intention, die hinter der Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten steht, ist die Anreicherung immunkompetenter T-Lymphozyten, die nicht nur in der Lage sind, einen Immunschutz zu gewähren, sondern darüber hinaus residuale Leukämiezellen, sowie überlebende immunologische Effektorzellen des Empfängers zu bekämpfen, ohne eine gefährliche GVHD zu induzieren. Dieses Vorgehen würde es zudem erlauben, die intensive Konditionierungstherapie im Vorfeld der Stammzelltransplantation einzuschränken, deren Ziel es ist, die überlebenden Leukämiezellen zu zerstören sowie die körpereigene Immunabwehr des Empfängers auszuschalten, so dass das neue Knochenmark nicht mehr abgestoßen werden kann. Alle drei untersuchten Depletionsmethoden wurden dem Anspruch gerecht, die Anzahl alloreaktiver T-Lymphozyten deutlich zu reduzieren. Die effektivste Eliminierung alloreaktiver T-Zellen gelang unter Zuhilfenahme der immunomagnetischen Depletionstechnik. Allerdings blieb es nur dem Depletionsverfahren unter Verwendung des agonistischen monoklonalen CD95 Antikörpers vorbehalten, eine ausreichende Immunantwort nach erfolgter Depletion gegen verschiedene Antigene aufrechtzuerhalten.

## 6 Verzeichnis der Abkürzungen

A	Autologe Responderzellen einer Versuchsperson
A*	Bestrahlte autologe Responder- (Spender-) Zellen
AICD	Activation induced cell death
AICAR	Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid-Transformylase, Enzym
Anti-CD95	agonistischer monoklonaler Mausantikörper (IgM, $\kappa$ ),
APO-1	CD95-Rezeptor oder Fas-Antigen
APAF-1	apoptotic protease activating factor-1, cytosolisches Protein
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
B	Allogene Stimulatorzellen
B*	Bestrahlte allogene Stimulator- (Empfänger-) Zellen
BCL-2	antiapoptotisches Protein
BCL-X	antiapoptotisches Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
C	„third party“ Stimulatorzellen
C*	Bestrahlte „third party“ Stimulatorzellen
CAD	caspase-activated desoxyribonuclease, Endonuklease
CD	Cluster of Differentiation
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CPP32	Caspase-3

## Verzeichnis der Abkürzungen

CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DED	death effector domain
CDK	cyclin dependent kinases, (Proteinkinase)
DHFR	Dihydrofolsäurereduktase, Enzym
DISC	death-inducing signalling complex
DLI	Donor Lymphocyte Infusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Komplexbildner
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
FADD	Fas-associated protein with death domain, Adapterprotein
Fas-Antigen	CD95-Rezeptor
FH-2	Dihydrofolsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FH-4	Tetrahydrofolsäure
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
FLICE	Caspase-8
FLIP	flice inhibitory protein
v-FLIP	virus flice inhibitory protein
FPGS	Folyl-Polyglutamyl-Synthase
FSC	Forward Scatter
GAM	Goat-anti-Mouse
GAR	Glycinamid-Ribonucleotid-Transformylase
GvHD	Graft versus Host Erkrankung
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor

## Verzeichnis der Abkürzungen

G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	Graft versus Host Erkrankung
aGvHD	Akute Graft versus Host Erkrankung
cGvHD	Chronische Graft versus Host Erkrankung
GvL	Graft versus Leukaemia
GvHR	Graft versus Host Reaction
HLA	Human Leucocyte Antigen
HHV-6	Humanes Herpes Virus 6
HSA	Humanes Serumalbumin
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSV	Humanes Herpesvirus
HSV-tk	Herpes Simplex Virus Thymidinkinase
H <sup>3</sup> -TdR	[6-H <sup>3</sup> ]-Thymidininkorporation
ICAD	inhibitor of CAD
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KMT	Knochenmarktransplantation
L	Ligand
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Leucovorin
mAb	Monoclonal Antibody
MACS	Magnet activated cell sorter
mHA	Minor-Histokompatibilitätsantigen
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex

## Verzeichnis der Abkürzungen

MLC	Mixed Lymphocyte Culture
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
MPT	(mitochondrial permeability transition pore), Kanalprotein des Mitochondriums
MTX	Methotrexat
NADPH+H*	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, Bestandteil von zwei wasserstoffübertragenden Coenzymen
NGF	Non-Hodgkin-Lymphom
NGF-R	nerve growth factor receptor
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OKT3	Stimulans
OVA	Stimulans
PBMC	Peripher Blood Mononuclear Cells
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PHA	Phythämaglutinin
PI	Propidiumiodid
PMNC	Periphere mononukleäre Zellen
RANK	receptor activator of NF-kappaB
R	Receptor
RNA	Ribonukleinsäure
SCID	Severe Combined Immundeficiency
SSC	Side Scatter
STZ	Stammzelltransplantation
TBI	Total Body Irradiation
TCR	T-Zellrezeptor



## Verzeichnis der Abkürzungen

TNF	Tumor Nekrose Faktor
TH-1/2	CD4 <sup>+</sup> T-Helferzelle vom Subtyp 1/2
TS	Thymidylat-Synthase
VZV	Varizella-Zoster-Virus

## 7 Literaturverzeichnis

1. Algeciras-Schimmich, T.S.Griffith, D.H.Lynch, C.V.Paya, Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis, *J.Immunol.* 162:5205 (1999).
2. C.J.Allegra, B.A.Chabner, J.C.Drake, R.Lutz, D.Rodbard, J.Jolivet, Enhanced inhibition of thymidilate synthase by methotrexate polyglutamates, *JBC*, 260:9720 (1985).
3. C.J.Allegra, R.L.Fine, J.C.Drake, B.A.Chabner, The effect of methotrexate on intracellular folate pools in human MCF-7 breast cancer cells, *JBC*, 261:6478 (1986).
4. C.J.Allegra, K.Hoang, G.C.Yeh, Evidence for direct inhibition of the novo purine synthesis in human MCF-7 breast cells as a principle mode of metabolic inhibition by methotrexate, *JBC.*, 262:13520 (1987).
5. C.J.Allegra, Antifolates; In: B. Chabner, J.Collins, eds *Cancer Chemotherapy:Principles and Practice*, Philadelphia:Lippincott, (1990):110.
6. R.C.Amstrong, T.Aja, J.Xiang, S.Gaur, JF.Krebs, K.Hoang, K.Bi, S.J.Korsemyer, Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors, *J.Biol. Chem.*, 271:16850 (1996).
7. H.A.M. Andree, CPM.Reutlingsberger, R.Hauptmann, HC.Hemker, Binding of vascular anticoagulant  $\alpha$  (VAC $\alpha$ ) to planar phospholipid binding bilayers, *J.Bio.Chem* 265:4923 (1990)
8. J.H.Antin and J.L.Ferrara, Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease, *Blood* 80:2964 (1992).
9. J.F.Apperley, L.Jones, G.Hale, H.Waldmann, J.Hows, Y.Rombos, C.Tsatalas, R.E.Marcus, A.W.Goolden, E.C.Gordon-Smith, and ., Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse, *Bone Marrow Transplant* 1:53 (1986).

## Literaturverzeichnis

10. J.P.Aubry, A.Blaecke, S.Lecoanet-Henchoz, P.Jeannin, N.Herbault, G.Caron, V.Moine, J.Y.Bonnefoy, Annexin used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity, *Cytometry*, 37:197 (1999).
11. F.Aversa, A.Tabilio, A.Terenzi, A.Velardi, F.Falzetti, C.Giannoni, R.Ia, MP: Martelli, C.Gambelunghe, Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three loci" incompatible transplants in leukaemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum, *Blood* 84: 3948 (1994).
12. P.Bader, J.Beck, P.G.Schlegel, R.Handgretinger, D.Niethammer, and T.Klingebl, Additional immunotherapy on the basis of increasing mixed hematopoietic chimerism after allogeneic BMT in children with acute leukemia: is there an option to prevent relapse?, *Bone Marrow Transplant.* 20:79 (1997a)
13. P.Bader, W.Holle, T.Klingebl, R.Handgretinger, N.Benda, P.G.Schlegel, D.Niethammer, and J.Beck, Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children, *Bone Marrow Transplant.* 19:697 (1997b).
14. M.J.Barnes, E.J.Estlin, G.A.Taylor, G.Wynne Aherne, A.Hardcastle, J.J.McGuire, J.A.Calvete, J.Lunec, A.D.J. Pearson, D.R.Newell, Impact of polyglutamation on sensitivity to raltrexes and methotrexate in relation to drug-induced inhibition of de npvo thymidilate and purine biosynthesis in CCRF-CEMcell lines, *Clinical Cancer Research*, 5:2548 (1999).
15. M.T.Bejarano, M.R.de Waal, J.S.Abrams, M.Bigler, R.Bacchetta, J.E.de Vries, and M.G.Roncarolo, Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures, *Int.Immunol.* 4:1389 (1992).
16. V.M.Belkov, E.Y.Krynetski, J.D.Schuetz, Y.Yanishevski, E.Masson, S.Mathew, S.Raimondi, C.H. Pui, M.V.Relling, W.E.Evans, Reduced folate carrier, expression in acute lymphoblastic leukemia:A mechanism for ploidy but not lineage differences in Methotrexate accumulation,*Blood*, 93:1643 (1999).

## Literaturverzeichnis

17. S.A.Boehme, M.J.Lenardo, Propriocidal apoptosis of mature T-lymphocytes occurs at the S-phase of the cell cycle, *Eur. J.Immunol.*, 23:1552 (1993).
18. L.D.Bosserman, C.Murray, T.Takvorian, K.C.Anderson, A.S.Freedman, J.Fitzsimmons, F.Coral, L.M.Nadler, S.F.Schlossman, and J.Ritz, Mechanism of graft failure in HLA-matched and HLA-mismatched bone marrow transplant recipients, *Bone Marrow Transplant* 4:239 (1989).
19. S.Brochu, B.Rioux-Masse, J.Roy, D.C.Roy, C.Perreault, Massive activation-induced cell death of alloreactive T-cells with apoptotic bystander postthymic T-cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease, *Blood*, 94:390 (1999).
20. T.Brunner, R.J.Mogil, D.LaFace, N.J.Yoo, A.Mahboubbi, F.Echeverri, Cell autonomous fas (CD95)/ fas -ligand interaction mediates activation - induced apoptosis in T-cell hybridomas, *Nature*, 373:441 (1995).
21. S.R.Burrows, R.Khanna, J.M.Burrows, and D.J.Moss, An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease, *J.Exp.Med.* 179:1155 (1994).
22. A.Caruso, S.Licenziati, M.Corulli, A.D.Canaris, M.A.De Francesco, S.Fiorentini, L.Peroni, F.Fallacara, F.Dima, A.Balsari, and A.Turano, Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation, *Cytometry* 27:71 (1997).
23. J.E.Castro, J.A.Listman, B.A. Jacobson, Y.Wang, P.A. Lopez, S.Ju, P.W. und D.L.Perkins, Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes, *Immunity* 5:617 (1996).
24. M.Cavazzana-Calvo, J.L.Stephan, S.Sarnacki, S.Chevret, C.Fromont, C.de Coene, F.Le Deist, D.Guy-Grand, and A.Fischer, Attenuation of graft-versus-host disease and graft rejection by ex vivo immunotoxin elimination of alloreactive T cells in an H-2 haplotype disparate mouse combination, *Blood* 83:288 (1994).

## Literaturverzeichnis

25. M.Chow, H.Rubin, Selective killing of preneoplastic and neoplastic cells by methotrexate with leucovorin, *Proc. Nat. Acad. Sci.USA*, 95:4550 (1998).
26. R.A.Clift, C.D.Buckner, E.D.Thomas, E.Bryant, C.Anasetti, W.I.Bensinger, R.Bowden, H.J.Deeg, K.C.Doney, L.D.Fisher, and ., Marrow transplantation for patients in accelerated phase of chronic myeloid leukemia, *Blood* 84:4368 (1994).
27. G.R.Crabtree, Contingent genetic regulatory events in T-lymphocyte activation, *Science*, 243:355 (1989).
28. Z.Dai, A.Arakelov, M.Wagener, B.T.Konieczny, F.G.Lakkis, The role of the common cytokine receptor  $\gamma$ -Chain in regulating IL-2-dependent, activation-induced CD8<sup>+</sup> T-cell death, *J.Immunol* 163:3131 (1999).
29. A.R.Datta, A.J.Barrett, Y.Z.Jiang, Distinct T-cell populations distinguish chronic myeloid leukemia cells from lymphocytes in the same individual: a model for separating GVHD from GVL reactions, *Bone Marrow Transplant.* 14:517 (1994).
30. H.G.De Bruin, A.Astaldi, T.Leupers, R.J.van de Griend, L.J.Dooren, P.T.Schellekens, H.J.Tanke, M.Roos, and J.M.Vossen, T lymphocyte characteristics in bone marrow-transplanted patients. II. Analysis with monoclonal antibodies, *J.Immunol.* 127:244 (1981).
31. G.De Panfilis, A.Caruso, P.Sansoni, G.Pasolini, D.Semenza, C.Torresani, Identification of fas-ligand-expressing apoptotic T-lymphocytes in normal human peripheral blood, *American J.Pathology*, 158:2 (2001).
32. J.Dhein, H.Walczak, C.Baumler, K.M.Debatin, P.H.Krammer, Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/ fas/CD95, *Nature*, 373:438 (1995)
33. W.R.Drobyski, R.Komorowski, B.Logan, M.Gendelman, Role of the passive apoptotic pathway in graft-versus-host-disease, *J.Immunol.*, 169:1626 (2002).
34. M.Enari, H.Sakahira, H.Yokohama, K.Okawa, A.Iwamatsu, S.Nagata, A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD, *Nature* 391:43 (1998).

## Literaturverzeichnis

35. G.Eissner, F.Kohlhuber, M.Grell, M.Ueffing, P.Scheurich, A.Hieke, G.Multhoff, G.W.Bornkamm, and E.Holler, Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-alpha in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin, *Blood* 86:4184 (1995).
36. V.A.Fadok, D.R.Voelker, P.A.Campbell, J.J.Cohen, D.L.Bratton, P.M.Henson, Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J.Immunol.* 148:2207 (1992).
37. V.A.Fadok, A.deCathelineau, D.L.Dalekes, P.M.Henson, D.L.Bratton, Loss of the phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts, *JBC*, 276:1071 (2001).
38. D.C.Farrugia, G.W.Aherne, L.Brunton, S.J.Clark, A.L.Jackson, Leucovorin rescue from raltitrexed (tomudex)-induced antiproliferative effects: In vitro cell line and in vivo mouse studies, *Clinical Cancer Research*, 6:3646 (2000).
39. B.Fehse, O.Ferek, M.Goldman, M.Bulduk und A.R.Zander, Efficient depletion of alloreactive donor T-Lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69), *British J. Haematol.* 109:644 (2000).
40. .L.Ferrara, K.R.Cooke, L.Pan, and W.Krenger, The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease, *Stem Cells* 14:473 (1996).
41. C.D.Flombaum, P.A.Meyer, High dose leucovorin as sole therapy for methotrexate toxicity, *J.of Clinical Oncology*, 17:1589 (1999). Algeciras-Schimmich, T.S.Griffith, D.H.Lynch, C.V.Paya, Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis, *J.Immunol.* 162:5205 (1999).

## Literaturverzeichnis

42. W.L.Ford, S.J.Simmonds, and R.C.Atkins, 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.* 141:681 (1975).
43. D.H.Fowler, K.Kurasawa, R.Smith, M.A. Eckhaus, R.E.Gress, Donor CD4-enriched cells of TH-2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice, *Blood* 84:3540 (1994).
44. W.Friedrich, R.J.O'Reilly, B.Koziner, D.F.Gebhard, Jr., R.A.Good, and R.L.Evans, T-lymphocyte reconstitution in recipients of bone marrow transplants with and without GVHD: imbalances of T-cell subpopulations having unique regulatory and cognitive functions, *Blood* 59:696 (1982).
45. L.Garderet, V.Snell, D.Przepiorka, T.Schenk, J.G.Lu, F.Marini, E.Gluckman, M.Andreeff, and R.E.Champlin, Effective depletion of alloreactive lymphocytes from peripheral blood mononuclear cell preparations, *Transplantation* 67:124 (1999).
46. R.B.Geller, S.M.Devine, K.O'Toole, L.Persons, J.Keller, D.Mauer, H.K.Holland, S.P.Dix, M.Piotti, I.Redei, G.Connaghan, L.T.Heffner, C.D.Hillyer, E.K.Waller, E.F.Winton, and J.R.Wingard, Allogeneic bone marrow transplantation with matched unrelated donors for patients with hematologic malignancies using a preparative regimen of high-dose cyclophosphamide and fractionated total body irradiation, *Bone Marrow Transplant* 20:219 (1997).
47. L.Genestier, R:Paillot, S.Fournel, C.Ferraro, P.Miossec, J.P.Revillard, Immunosuppressive properties of Methotrexate: Apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T-cells, *J.Clin.Invest.* 102:322 (1998).
48. M.Gonzales, S.A.Quezada, B.R.Blazar, A.Panooskaltis-Mortari, A.Y.Rudensky, R.J.Noelle, The balance between donor T-cell anergy and suppression versus lethal graft-versus-host disease is determined by host conditioning, *J.Immunol*, 169:5581 (2002).

## Literaturverzeichnis

49. D.J.Granville, C.M.Carthy, D.W.C.Hunt, W.C.David, B.M.McManus, Apoptosis: Molecular aspects of cell death and disease, *Laboratory Investigation* 78:893 (1998).
50. A.Gratwohl, J.Hermans, J.Apperley, W.Arcese, A.Bacigalupo, G.Bandini, P.di Bartolomeo, M.Boogaerts, A.Bosi, E.Carreras, and ., Acute graft-versus-host disease: grade and outcome in patients with chronic myelogenous leukemia. Working Party Chronic Leukemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, *Blood* 86:813 (1995).
51. D.Green und G.Kroemer, The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Cell Biol.* 8:267 (1998).
52. T.S.Griffith, und T.A.Ferguson, The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege, *Immunol. Today* 18: 240 (1997).
53. E.Haddad, P.Landais, W.Friedrich, B.Gerritsen, M.Cavazzana-Calvo, G.Morgan, Y.Bertrand, A.Fasth, F.Porta, A.Cant, T.Espanol, S.Muller, P.Veys, J.Vossen, and A.Fischer, Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T- cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients, *Blood* 91:3646 (1998).
54. G.Hale and H.Waldmann, Risks of developing Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disorders after T-cell-depleted marrow transplants. *CAMPATH Users*, *Blood* 91:3079 (1998).
55. B.L.Hamilton, M.J.Bevan, and R.Parkman, Anti-recipient cytotoxic T lymphocyte precursors are present in the spleens of mice with acute graft versus host disease due to minor histocompatibility antigens, *J.Immunol.* 126:621 (1981).
56. R.Handgretinger, M.Schumm, P.Lang, J.Greil, A.Reiter, P.Bader, D.Niethammer, and T.Klingebl, Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells, *Ann.N Y.Acad.Sci.* 872:351 (1999).
57. R.Handgretinger, T.Klingebl, P.Lang, M.Schumm, S.Neu, A.Geiselhart, P.Bader, P.G.Schlegel, J.Greil, D.Stachel, R.J.Herzog, and D.Niethammer,



Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34<sup>(+)</sup> progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children, *Bone Marrow Transplant.* 27:777 (2001).

58. J.A.Hansen, T.A.Gooley, P.J.Martin, F.Appelbaum, T.R.Chauncey, R.A.Clift, E.W.Petersdorf, J.Radich, J.E.Sanders, R.F.Storb, K.M.Sullivan, and C.Anasetti, Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia, *N.Engl.J.Med.* 338:962 (1998).

59. U.F.Hartwig, M.Robbers, C.Wickenhauser, C.Huber, Murine acute graft-versus-host disease can be prevented by depletion of alloreactive T-Lymphocytes using activation-induced cell death, *Blood* 99:8 (2002).

60. P.J.Henslee-Downey, S.H.Abhyankar, R.S.Parrish, A.R.Pati, K.T.Godder, W.J.Neglia, K.S.Goon-Johnson, S.S.Geier, C.G.Lee, and A.P.Gee, Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant, *Blood* 89:3864 (1997).

61. J.Herr und K.M.Debatin, Cellular response and apoptosis in cancer therapy, 98:2603 (2001).

62. H.E.Heslop, M.K.Brenner, and C.M.Rooney, Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma, *N.Engl.J.Med.* 331:679 (1994).

63. E.Holler, H.J.Kolb, J.Mittermüller, M.Kaul, G.Ledderose, T.Duell, B.Seeber, M.Schleuning, R.Hintermeier-Knabe, B.Ertl, and ., Modulation of acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) release in the course of pretransplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF alpha (MAK 195F), *Blood* 86:890 (1995).

64. C.H.E.Homburg, M.de Haas, A.E.G.Kr von dem Borne, A.J.Verhoven, C.P.M. Reutlingsperger D.Roos, Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire annexin binding sites during apoptosis in vitro, *Blood*, 85:532 (1995).

## Literaturverzeichnis

65. F.Hornung, L.Zheng, M.J.Lenardo, Maintenance of clonotype specificity in CD95/APO-1/fas-mediated apoptosis of mature T-lymphocytes, *J.Immunol*, 159:3816 (1997).
66. M.M.Horowitz, R.P.Gale, P.M.Sondel, J.M.Goldman, J.Kersey, H.J.Kolb, A.A.Rimm, O.Ringden, C.Rozman, B.Speck, and, Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation, *Blood* 75:555 (1990).
67. C.Janeway, P.Travers, M.Walport, M.J.Shlomchik, *Immunobiology*, 5 (2001).
68. O.Janssen, R.Sanzenbacher, D.Kabelitz, Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations, *Cell Tissue Res*, 301:85 (2000a).
69. O.Janssen, A.Stocker, R.Stanzenbacher, HH.Oberg, MA.Siddiqi, D.Kabelitz, Differential regulation of activation-induced cell death,(AICD) in individual human Tcell clones, *Int Arch Allergy Immunol*, (2000b).
70. D.M.Jelley-Gibbs, N.M.Lepak, M.Yen, S.L.Swain, Two distinct stages in the transition from naïve CD4+T-cells to effectors, early antigen-dependent and late cytokine-driven expansion and differentiation, *J.Immunol*. 165:5017 (2000).
71. F.L.Johnson, A.T.Look, J.Gockerman, M.R.Ruggiero, L.Dalla-Pozza, and F.T.Billings, III, Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia, *N.Engl.J.Med*. 311:780 (1984).
72. C.A.Juttner, L.B.To, D.N.Haylock, P.G.Dyson, K.F.Bradstock, B.M.Dale, A.Enno, R.E.Sage, J.Szer, and I.R.Toogood, Approaches to blood stem cell mobilisation. Initial Australian clinical results, *Bone Marrow Transplant* 5 Suppl 1:22 (1990).
73. D.Kabelitz, T.Pohl, K.Pechthold, Activation-induced cell death, apoptosis, on mature peripheral T-lymphocytes, *Immunol Today* 14:339 (1993).
74. D.Kabelitz und O.Janssen, Antigen-induced death of T-Lymphocytes, Review article, *Frontiers in Bioscience*, 2:61 (1997).

## Literaturverzeichnis

75. H.Kamesaki, Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy, *Int.J.Hematol.* 68:29(1998).
76. J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26:239 (1972).
77. J.H.Kersey, Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia, *Blood* 90:4243 (1997).
78. S.Kirchhoff, W.W.Müller, A.Krueger, I.Schmitz, P.H.Krammer, TCR-mediated-up-regulation of cFLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signalling complex activity, *J.Immunol.* 165:6293 (2000).
79. P.Kisielow und H.von Boehmer, Development and selection of T-cells:Facts and puzzles, *Adv. Immunol.* 58:87 (1995).
80. M.B.Koh, H.G.Prentice, and M.W.Lowdell, Selective removal of alloreactive cells from haematopoietic stem cell grafts: graft engineering for GVHD prophylaxis, *Bone Marrow Transplant* 23:1071 (1999).
81. H.J.Kolb, J.Mittermüller, C.Clemm, E.Holler, G.Ledderose, G.Brehm, M.Heim, and W.Wilmanns, Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients, *Blood* 76:2462 (1990).
82. H.J.Kolb, A.Schattenberg, J.M.Goldman, B.Hertenstein, N.Jacobsen, W.Arcese, P.Ljungman, A.Ferrant, L.Verdonck, D.Niederwieser, and, Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia, *Blood* 86:2041 (1995).
83. G.Koopman, C.P.M. Reutlingsberger, G.A.M.Kuijten, R.M.J.Keehnen, S.T.Pals, M.H.J.van Oers, Annexin for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on Bcells undergoing apoptosis, *Blood*, 84:1415 (1994).

## Literaturverzeichnis

84. A.Krueger, S.Baumann, P.H.Krammer, S.Kirchhoff, FLICE-inhibitory proteins:Regulator of death receptor-mediated apoptosis, *Molecular and cellular biology* 21:8247 (2001).
85. J. Laliberte, A.Yee, Y.Xiong, B.S.Mitchell, Effects of guanine nucleotide depletion on cell cycle progression in human T-lymphocytes, *Blood* 91:2896 (1998).
86. T.Lamparelli, M.T.Van Lint, F.Gualandi, D.Occhini, M.Barbanti, N.Sacchi, G.Ficai, C.Ghinatti, G.B.Ferrara, L.Delfino, S.Pozzi, A.Morabito, P.Zikos, V.Vitale, R.Corvo, F.Frassoni, and A.Bacigalupo, Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia (CML) from unrelated and sibling donors: single center experience, *Bone Marrow Transplant* 20:1057 (1997).
87. P.Lang, R.Handgretinger, D.Niethammer, P.G.Schlegel, M.Schumm, J.Greil, P.Bader, C.Engel, H.Scheel-Walter, M.Eyrich, and T.Klingebiel, Transplantation of highly purified CD34<sup>+</sup> progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia, *Blood* 101:1630 (2003).
88. R.I.Lechler, G.Lombardi, J.R.Batchelor, N.Reinsmoen, and F.H.Bach, The molecular basis of alloreactivity, *Immunol.Today* 11:83 (1990).
89. M. Lenardo, Interleukin-2 programs mouse T-lymphocytes for apoptosis, *Nature*, 353:858 (1991).
90. M.Lenardo, F.Ka-Ming Chan, F.Hornung, H.McFarland, R.Siegel, J.Wang, L.Zheng, Mature T-lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable environment, *ANN: Rev. Immunol.* 17:221 (1999).
91. H.Lin, S.F.Bolling, P.S.Linsley, R.Q.Weil, D.Gordon, C.B.Thompson, and L.A.Turka, Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion, *J.Exp.Med.* 178:1801 (1993).
92. M.W.Lowdell, R.Craston, N.Ray, M.Koh, G.Galatowicz, and H.G.Prentice, The effect of T cell depletion with Campath-1M on immune reconstitution after chemotherapy and allogeneic bone marrow transplant as treatment for leukaemia, *Bone Marrow Transplant* 21:679 (1998).

## Literaturverzeichnis

93. G.Lucarelli, P.Polchi, T.Izzi, M.Manna, F.Agostinelli, C.Delfini, A.Porcellini, M.Galimberti, L.Moretti, A.Manna, Allogeneic marrow transplantation for thalassemia, *Exp.Hematol.* 12:676 (1984).
94. L.G.Lum, M.C.Seigneuret, R.F.Storb, R.P.Witherspoon, and E.D.Thomas, In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after marrow transplantation. I. T-cell and B-cell deficiencies in patients with and without chronic graft-versus-host disease, *Blood* 58:431 (1981).
95. S.Mackinnon, E.B.Papadopoulos, M.H.Carabasi, L.Reich, N.H.Collins, F.Boulad, H.Castro-Malaspina, B.H.Childs, A.P.Gillio, N.A.Kernan, Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease, *Blood* 86:1261 (1995).
96. S.M.Mariani, B.Matiba, C.Bäumler, P.H.Krammer, Regulation of cell surface APO-1Fas (CD95) ligand expression by metalloproteinases, *Eur.J.Immunol.* 25:2302 (1995).
97. A.M.Marmont, M.M.Horowitz, R.P.Gale, K.Sobocinski, R.C.Ash, D.W.van Bekkum, R.E.Champlin, K.A.Dicke, J.M.Goldman, R.A.Good, and, T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia, *Blood* 78:2120 (1991).
98. P.J.Martin, J.A.Hansen, C.D.Buckner, J.E.Sanders, H.J.Deeg, P.Stewart, F.R.Appelbaum, R.Clift, A.Fefer, R.P.Witherspoon, and ., Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts, *Blood* 66:664 (1985).
99. G.Mathe, J.L.Amiel, L.Schwarzenberg, A.Cattan, and M.Schneider, Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results, *Cancer Res.* 25:1525 (1965).
100. D.A.Mavroudis, Y.Z.Jiang, N.Hensel, P.Lewalle, D.Couriel, R.J.Kreitman, I.Pastan, and A.J.Barrett, 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* 17:793 (1996).

101. D.A.Mavroudis, S.Dermime, J.Molldrem, Y.Z.Jiang, A.Raptis, F.van Rhee, N.Hensel, V.Fellowes, G.Eliopoulos, and A.J.Barrett, Specific depletion of alloreactive T cells in HLA-identical siblings: a method for separating graft-versus-host and graft-versus-leukaemia reactions, *Br.J.Haematol.* 101:565 (1998).

102. S.Nagata, P.Goldstein, The Fas death factor, *Cell* 88:355 (1995).

103. M.E.Nesbit, Jr., J.D.Buckley, S.A.Feig, J.R.Anderson, B.Lampkin, I.D.Bernstein, T.H.Kim, S.Piomelli, J.H.Kersey, P.F.Coccia, and, Chemotherapy for induction of remission of childhood acute myeloid leukemia followed by marrow transplantation or multiagent chemotherapy: a report from the Childrens Cancer Group, *J.Clin.Oncol.* 12:127 (1994).

104. F.P.Nestel, K.S.Price, T.A.Seemayer, and W.S.Lapp, Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease, *J.Exp.Med.* 175:405 (1992).

105. D.R.Noel, R.P.Witherspoon, R.Storb, K.Atkinson, K.Doney, E.M.Mickelson, H.D.Ochs, R.P.Warren, P.L.Weiden, and E.D.Thomas, Does graft-versus-host disease influence the tempo of immunologic recovery after allogeneic human marrow transplantation? An observation on 56 long-term survivors, *Blood* 51:1087 (1978).

106. S.Oehen, K.Bedruscha-Riem, Differentiation of naïve CTL to effector and memory CTL:Correlation of effector function with phenotype and cell division, *J.Immunol.* 161:5338 (1998).

107. T.Opferman, B.T.Ober, P.G.Ashton-Richardt, Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T-Lymphocytes, *Science* 283:1745 (1999).

108. H.Oberg, B.Lengl-Janßen, MJ. Robertson, D. Kabelitz, O.Janssen, Differential role of tyrosine phosphorylation in the induction of apoptosis in T-cell clones via CD95 or the TCR/CD3-complex, *Cell Death Diff* 4:403, (1997).

## Literaturverzeichnis

109. E.B.Papadopoulos, M.Ladanyi, D.Emanuel, S.Mackinnon, F.Boulad, M.H.Carabasi, H.Castro-Malaspina, B.H.Childs, A.P.Gillio, T.N.Small, and, Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation, *N.Engl.J.Med.* 330:1185 (1994).
110. T.Paulin, O.Ringden, and B.Nilsson, Immunological recovery after bone marrow transplantation: role of age, graft-versus-host disease, prednisolone treatment and infections, *Bone Marrow Transplant* 1:317 (1987).
111. H.M.Pindeo, D.S.Zaharko, J.M.Bull, The reversal of the methotrexate cytotoxicity to mouse bone marrow cells by leucovorin and nucleosids, *Cancer Research*, 36:4418 (1976).
112. K.Polyak, Y.Xia, J.L.Zweier, K.W. Kinzler, W. B.Vogelstein, A model for p53-induced apoptosis, *Nature* 389:300 (1997).
113. L.Quemeneur, L.M.Gerland, M.Flacher, M.French, J.P.Revillard, L.Genestier, *J.Immunol.* 170:4986 (2003).
114. S.D.Rencher, J.A.Houston, T.D.Lockey, and J.L.Hurwitz, Eliminating graft-versus-host potential from T cell immunotherapeutic populations, *Bone Marrow Transplant* 18:415 (1996).
115. M.S.Rhee, B.Lindau-Shepard, K.J.Chave, J.Galivan, T.J.Ryan, Characterization of human cellular g-glutamyl hydrolase, *Mol.Pharm*, 53:1040 (1998).
116. E.Rouvier, M:F: Luciani und Goldstein, Fas involment in  $Ca^{2+}$ -independent cell-mediated cytotoxicity, *J.Exp.Med.* 177:195 (1993).
117. S.Rutella, C.Rumi, M.B. Lucia, T.Barberi, P.L.Puggioni, M.Lai, A.Romano, R.Cauda, G.Leone, Induction of CD69 antigen on normal CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets and its relationship with the phenotype of responding T-cells, *Cytometry* 38:95 (1999).
118. H. Sakahira, M. Enari, S. Nagata, Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature* 391: 96 (1998).

## Literaturverzeichnis

119. K.Sandberg, N.M.Fast, D.F.Nixon, Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes, *J.Immunol.* ,167:181 (2001).
120. N.Schmitz, P.Dreger, M.Suttorp, E.B.Rohwedder, T.Haferlach, H.Loffler, A.Hunter, and N.H.Russell, Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor), *Blood* 85:1666 (1995).
121. R.W.Schroff, R.P.Gale, and J.L.Fahey, Regeneration of T cell subpopulations after bone marrow transplantation: cytomegalovirus infection and lymphoid subset imbalance, *J.Immunol.* 129:1926 (1982).
122. M.Seddik, T.A.Seemayer, and W.S.Lapp, The graft-versus-host reaction and immune function. II. Recruitment of pre-T-cells in vivo by graft-versus-host-induced dysplastic thymuses following irradiation and bone marrow treatment, *Transplantation* 37:286 (1984).
123. J.Sprent, H.V.Boehmer, and M.Nabholz, Association of immunity and tolerance to host H-2 determinants in irradiated F1 hybrid mice reconstituted with bone marrow cells from one parental strain, *J.Exp.Med.* 142:321 (1975).
124. R.Storb, E.D.Thomas, C.D.Buckner, R.A.Clift, F.L.Johnson, A.Fefer, H.Glucksberg, E.R.Giblett, K.G.Lerner, and P.Neiman, Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia, *Blood* 43:157 (1974).
125. R.Storb, H.J.Deeg, F.Whitehead, F.Appelbaum, P.Beatty, W.Bensinger, D.Buckner, R.Clift, K.Doney, V.Farewell, Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft-versus-host-disease after bone marrow transplantation for leukaemia, *N.Engl. J. Med.* 314:721 (1986).
126. G.Strauss, W.Osen und Debatin, Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T-cells by immunosuppressive drugs, *Clin. Exp. Immunol.* 128:255 (2002).
127. C.Takomoto, New antifolate:Pharmacology and clinical applications, *The Oncologist*, 1:68 (1996).



## Literaturverzeichnis

128. M.Thome, P.Schneider, K. Hoffmann, H.Fickenscher, E.Meinle, F.Neipel, C.Mattmann, K.Burns, J.-L.Bodmer, M.Schröter, C.Scaffidi, P.H.Krammer, M.E.Peter, J.Tschopp, Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors, *Nature* 386:517 (1997).
129. E.D.Thomas, C.D.Buckner, R.A.Clift, A.Fefer, F.L.Johnson, P.E.Neiman, G.E.Sale, J.E.Sanders, J.W.Singer, H.Shulman, R.Storb, and P.L.Weiden, Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission, *N.Engl.J.Med.* 301:597 (1979).
130. C.B.Thompson, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267:1456 (1995).
131. P.Tiberghien, C.W.Reynolds, J.Keller, S.Spence, M.Deschaseaux, J.M.Certoux, E.Contassot, W.J.Murphy, R.Lyons, Y.Chiang, and ., Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation?, *Blood* 84:1333 (1994).
132. M.Umemoto, E.Azuma, M.Hirayama, M.Nagai, S.Hirataka, J.QI, T.Kkumamoto, M.Kobayashi, Y.Komada, M.Sakurai, Cytokine-enhanced mixed lymphocyte reaction (MLR) in cord blood, *Clin Exp Immunol.* 112:459 (1998).
133. S.Van Cruchten und W.Van Den Broeck, Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis, *Anat. Histol.Embryol.* 31:214 (2002).
134. S.A.Varadhachary, S.N.Perdow, C.Hu, differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death, *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, 94:5778 (1997).
135. J.E.L.Visentainer, S.R.Lieber, L.B.L.Persoli, S.C.B. de Souza Lima, A.C. Vigorito, F.J.P. Aranah, K.A.B. Eid, G.B.Oliveira, E.C.M.Miranda, C.A.de Souza, Correlation of mixed lymphocyte culture with chronic graft-versus-host-disease following allogeneic stem cell transplantation, *Braz J. Med Biol Res* 35:567 (2002a).

## Literaturverzeichnis

136. J.E.L.Visentainer, S.R.Lieber, L.B.L.Persoli, A.C.Vigorito, F.J.P.Aranah, C.A.de Souza, Addition of exogenous cytokines in mixed culture for selecting related donors for bone marrow transplantation, Sao Paulo Med. J. 120:175 (2002b).
137. J.E.Wagner, G.W.Santos, S.J.Noga, S.D.Rowley, J.Davis, G.B.Vogelsang, E.R.Farmer, B.A.Zehnbauer, R.Saral, and A.D.Donnenberg, Bone marrow graft engineering by counterflow centrifugal elutriation: results of a phase I-II clinical trial, Blood 75:1370 (1990).
138. D.A.Wall, S.D.Hamberg, D.S.Reynolds, S.J.Burakoff, A.K.Abbas, and J.L.Ferrara, Immunodeficiency in graft-versus-host disease. I. Mechanism of immune suppression, J.Immunol. 140:2970 (1988).
139. J.R.Wingard, Advances in the management of infectious complications after bone marrow transplantation, Bone Marrow Transplant 6:371 (1990).
140. A.Wyllie, An endonuclease at last, Nature 391:20 (1998).
141. P.R.Walker, P.Saas, P.Y.Dietrich, Role of Fas ligand in immune escape. Tumor cell strikes back, J.Immunol 158:4521 (1997).
142. S.Wesselborg, O. Janssen und D.Kabelitz, Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T-cells, J.Immunol 150:432 (1993).
143. M.E.Weinblatt, J.S.Coblyn, D.A. Fox, P.A. Fraser, D.E. Holdsworth, D.N. Glass, D.E.Trentman, Efficacy of low dose methotrexate in rheumathoid arthritis, N.Engl.J.Med. 312:818 (1985).
144. S.Yonehara, A.Ishii, M.Yonehara, A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor, J.Exp.Med. 169:1747 (1989).

## 8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

---

Name: Stefanie Seitz  
Geburtsdatum/-ort: 02.05.1977 in Stuttgart  
Eltern: Monika Seitz, geborene Hoffman  
Günther Seitz

Schulbildung:

---

1983 - 1987 Grundschule bei Kornwestheim  
1987 - 1993 Theodor-Heuss Realschule in Kornwestheim  
1993 - 1997 Mathilde-Planck Gymnasium in Ludwigsburg  
1997 Allgemeine Hochschulreife  
1994 - 1995 High School - Aufenthalt in Richmond,  
Virginia, USA

Studium:

---

04/1999 – 11/2005 Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
03/2001 Ärztliche Vorprüfung  
03/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
09/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
23.11.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## **9 Danksagung**

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. D. Niethammer, Direktor der Kinderklinik für Kinder- und Jugendmedizin, für die Möglichkeit dieses Projekt an der Kinderklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen bearbeiten zu dürfen.

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

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

Dieses Projekt wurde durch das Förderungsprogramm der Universität Tübingen (Fortüne) unterstützt