

**Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und
Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer**

**Generierung, Identifizierung und Charakterisierung
nicht alloreaktiver T-Lymphozyten zur adoptiven
Immuntherapie im Rahmen allogener
Stammzelltransplantationen**

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

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

**vorgelegt von
Eva Rettinger
aus
Erlangen**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Niethammer

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Treuner

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	6
1.1 Einführung in die Problematik der allogenen Stammzelltransplantation	6
1.2 Ein kurzer Überblick über die Geschichte der Knochenmarktransplantation	8
1.2.1 Die Anfänge der Knochenmarktransplantation	8
1.2.2 Frühe Studien am Tiermodell, die zur Entdeckung der GVHD führten	9
1.2.3 Die Entdeckung der Haupt-Histokompatibilitätskomplexe (MHC)	9
1.2.4 Die Knochenmarktransplantation (KMT) als anerkannte Therapieform maligner Erkrankungen sowie angeborener Dysfunktionen des hämatopoetischen Systems	10
1.2.5 Alternativen zur Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen	11
1.3 Die Problematik der Transplantation und mögliche therapeutische Interventionsmöglichkeiten	12
1.3.1 Die Konditionierungstherapie im Vorfeld der Transplantation	12
1.3.2 Opportunistische Infektionen als Folge der Immunsuppression nach einer Transplantation	13
1.3.2.1 Das EBV assoziierte lymphoproliferative Syndrom und die Adenovireninfektion nach allogenen Transplantationen	15
1.3.2.2 Die CMV-Infektion	15
1.3.3 Die Adoptive Immuntherapie und der Graft versus Leukämie Effekt (GVL)	15
1.3.4 Donor Lymphocyte Infusion (DLI)	17
1.3.5 Die Transplantatabstoßung	18
1.3.6 Die Graft versus Host Erkrankung (GVHD)	19
1.3.6.1 Die allgemeine Immunpathophysiologie der GVHD	19
1.3.6.2 Die Immunpathophysiologie der akuten GVHD (aGVHD)	20
1.3.6.3 Die Immunpathophysiologie der chronischen GVHD (cGVHD)	21
1.3.6.4 Risikofaktoren der GVHD-Entwicklung nach allogener Transplantation	22

1.3.6.5 Vorbeugende therapeutische Maßnahmen zur Vermeidung einer GVHD	23
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	26
2. Material und Methoden	28
2.1 Zusammenstellung von generell benötigten technischen Geräten, Materialien und Reagenzien	28
2.2 Material und Reagenzien für die Zellseparation	29
2.3 Material und Reagenzien für die Zellkultur	29
2.3.1 Zellkulturmedien	30
2.3.2 Zusatz von Serum	30
2.3.3 Zusammensetzung der Nährmedien	30
2.3.4 Wachstumsfaktoren	31
2.4 Material für die selektive Zellseparation auf Magnetpartikel-Konzentrator-Basis	32
2.5 Material und Reagenzien für die Durchflußzytometrie	32
2.5.1 Puffer und Lösungen	32
2.5.2 Allgemein benötigte Kontroll-Antikörper	33
2.5.3 Antikörper zur Expressionsanalyse von Zellpopulationen	34
2.5.4 Antikörper und Reagenzien zur Analyse von Interferon- γ produzierenden Zellen	35
2.6 Material und Reagenzien für den Elispot-Assay	35
2.7 Material und Reagenzien für den Thymidin [^3H]-Proliferations-Assay	37
2.8 Zellisolierung	37
2.8.1 Zur Verfügung stehende Blutproben	37
2.8.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen	37
2.9 Zellkultivierung	38
2.9.1 Zellzahlbestimmung	38
2.9.2 Kultursysteme für Stimulatorzellen	39
2.9.2.1 Kultivierung der Stimulatorzellen in serumhaltigen Medien	39
2.9.2.2 Kultivierung der dendritischen Zellen in serumfreien Medien	40
2.9.3 Lymphozytenmischkultur MLC (mixed-lymphocyte-culture)	40

2.9.4 Der Medienvergleich	41
2.10 Die Depletion alloreaktiver T-Zellen mit Hilfe des Magnet-Partikel Konzentrator-Systems (DynaL MPC)	42
2.11 Zellanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)	43
2.11.1 Grundlagen	43
2.11.2 Messung der Lichtstreuung	44
2.11.3 Messung der Fluoreszenz	44
2.11.4 Durchführung	45
2.11.5 Auswertung	46
2.12 Der Interferon- γ Nachweis als Zeichen der T-Zellaktivierung	47
2.12.1 Sekretions-Assay (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)	47
2.12.2 Elispot-Assay	48
2.13 Der [6- H^3]-Thymidin-Proliferations-Assay	51
2.14 Statistische Analyse	53
3 Ergebnisse	54
3.1 Zellkultivierung	54
3.1.1 Medienvergleich	54
3.1.2 Das Kultursystem der MLC als Methode der allogenen Stimulation von T-Lymphozyten	58
3.1.2.1 Vergleichende Gegenüberstellung allogener Stimuli in der MLC	58
3.1.2.1.1 Die Antigenexpression	59
3.1.2.1.2 Zytokinsekretion	62
3.1.2.1.3 Proliferation	67
3.1.2.2 Antigenexpression alloreaktiver T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf	68
3.2 Selektive immunomagnetische Depletion von alloreaktiven T-Lymphozyten	73
3.2.1 Beurteilung der Effizienz der Depletionsmethode anhand der phänotypischen Zellanalyse	75
3.2.2 Interferon- γ Nachweis	79
3.2.3 [6- H^3]-Thymidineinbau	88
4. Diskussion	93

4.1	Vergleichende Gegenüberstellung verschiedener Zellkultur-systeme unter dem Gesichtspunkt der spezifischen allo-antigenen und mitogenen Lymphozytenaktivierung	93
4.1.1	Medienvergleich	93
4.1.2	Die MLC (mixed lymphocyte culture)	97
4.1.2.1	Identifizierung und Charakterisierung alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe der Oberflächenphänotypisierung	100
4.1.2.2	Identifizierung und Charakterisierung alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe des Interferon- γ Nachweises	102
4.1.2.3	Proliferation als Indikator der T-Zellaktivität	108
4.1.2.4	Begründung für den Einsatz zytokinmodifizierter PMNC als antigenpräsentierende Stimulatorzellen	111
4.1.2.5	Begründung für den Einsatz dendritischer Zellen als antigenpräsentierende Stimulatorzellen	112
4.1.2.6	Vergleichende Gegenüberstellung der stimulatorischen.Potenz antigenpräsentierender Zellen	113
4.2	Die Expressionskinetik verschiedener Aktivierungsmarker auf alloreaktiven Lymphozyten	116
4.2.1	Das CD4 Molekül	119
4.2.2	Das CD8 Molekül	120
4.2.3	Das CD69 Molekül	121
4.2.4	Das CD28 Molekül	125
4.2.5	Das CD25 Molekül	129
4.2.6	HLA-DR	131
4.2.7	Der FAS Ligand (CD95)	133
4.3	Die immunomagnetische Depletion alloreaktiver Zellen	134
4.3.1	Der Zeitpunkt der Immunomagnetischen Depletion und die Auswahl entsprechender Antikörper	138
4.3.2	Evaluation der Effizienz der jeweiligen Depletionsmethode anhand sekundärer Nachweisverfahren	142
4.3.2.1	Oberflächenphänotypisierung	143
4.3.2.2	Verbleibende Aktivierbarkeit nach der Depletion alloreaktiver Zellen	144

4.3.2.3 Trotz T-Zelldepletion werden die T-Zellsubpopulationen bestehend aus DC4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Lymphozyten beibehalten	145
4.3.2.4 Mausmodell	145
5. Zusammenfassung	148
6. Verzeichnis der Abkürzungen	151
7. Tabellenverzeichnis	156
8. Abbildungsverzeichnis	159
9. Literaturverzeichnis	161
10. Danksagung	196
11. Lebenslauf	197

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Problematik der allogenen Stammzelltransplantation

Das Prinzip der peripheren Blutstammzelltransplantation (HSCT) besteht in der Transfusion einer Suspension gesunder Stammzellen in Empfänger mit gestörter Blutbildung. Ziel dieser Therapie ist die Ansiedlung hämatopoetischer Stammzellen in Knochenmarkräumen, die nach Proliferation und Differenzierung die Blutbildung des Empfängers ersetzen.

Unter allogener Transplantation versteht man in diesem Zusammenhang die Transfusion von Zellen immunogenetisch fremder Spender, zu denen u. a. HLA-identische Geschwister, HLA-haploidentische Familienmitglieder oder nicht verwandte, HLA-identische Fremdspender gehören, die in so genannten Spenderkarteien verzeichnet sind. Heutzutage ist das Zentrale Knochenmarkspender Register Deutschland (ZKRD) weltweit (Spenderzahl absolut: 8.231.800), nach dem NMDP in Minneapolis, MN, USA mit derzeit 3.525.852 Spendern und vor dem Anthony Nolan Trust in London mit 322.612 Spendern, das zweitgrößte Register. Die Absolutzahl der typisierten Spender beläuft sich in Deutschland heute auf 1.900.001 Spender. Derzeit führen über 80% der Spendersuchen für deutsche Patienten zum Erfolg. Berücksichtigt man auch verwandte Spender, so können inzwischen rund 90% der Patienten mit Spenden versorgt werden.

Die Indikation einer Transplantation besteht grundsätzlich im Rahmen von Erkrankungen, bei denen hämatopoetische Stammzellen befallen sind oder im Verlauf einer zytostatischen Chemotherapie oder Bestrahlung geschädigt werden. Zu den bewährten Indikationen einer allogenen Transplantation zählen die akute myeloische (332) und lymphatische Leukämie (229) - mit einem hohen Rezidivrisiko - im Stadium der ersten Remission, sowie alle akuten Leukämien im Stadium der zweiten oder höheren Remission, die chronische myeloische Leukämie (81), die aplastische Anämie (433), die myelodysplastischen Syndrome (8) und einige letale Formen der Immundefizienzsyndrome, wie das Wiskott-

Aldrich-Syndrom (348). Für ausgewählte Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen (213) oder mit einem Morbus Hodgkin (73) ebenso, wie für Patienten mit Hämoglobinopathien, besonders der β -Thalassämia major (289), stellt die allogene Transplantation, im Vergleich zu herkömmlichen Therapieformen, möglicherweise eine erfolgreichere Behandlungsoption dar. Darüber hinaus wurden auch bei Speichererkrankungen, wie dem Morbus Gaucher, bei Mukopolysaccharidosen und bei metachromatischen Leukodystrophien durch allogene Transplantationen Besserungen der Grunderkrankung erzielt. Erfolgversprechend sind zudem die Ergebnisse allogener Transplantationen beim Plasmozytom.

Die früher überwiegend durchgeführte, herkömmliche Knochenmarktransplantation ist mit einer Reihe von Komplikationen verbunden. So wiesen transplantierte Patienten im Zusammenhang mit der Transplantation eine erhöhte Morbidität und Mortalität auf (133, 161, 226, 256, 302, 342, 380, 412, 436). Die Ursache dieser Problematik war vor allem darin zu sehen, dass alle transfundierten Suspensionen hämatopoetischer Zellen, selbst nach der Depletion von T-Zellen, eine geringe Anzahl an T-Lymphozyten enthielten, die weiterhin zu Immunreaktionen gegen Gewebe des immungenetisch fremden Empfängers befähigt waren (15) (176) (365) (117) (146). Unter pathophysiologischem Gesichtspunkt wurden besagte Lymphozyten nach der Transplantation durch verschiedene allogene Stimulatoren in die Lage versetzt, zu proliferieren, Zytokine zu sezernieren und inflammatorische Effektorzellen zu rekrutieren. Die daraus resultierende Transplantat-Wirt-Reaktion, die so genannte Graft versus Host Erkrankung (GVHD), konnte dabei durchaus determinierend für den Patienten sein (397) (434). Andererseits korrelierte der ebenfalls aus einer derartigen Immunreaktion resultierende Graft versus Leukaemia Effekt (GVL) bzw. Graft versus Tumor Effekt positiv mit der Prognose der Grunderkrankung (186, 321). Auch wurde in Abwesenheit von Lymphozyten, in erster Linie bedingt durch die Konditionierungstherapie im Vorfeld einer Transplantation, vermehrt über höhere Rezidivraten, Fehlfunktionen oder Abstoßungsreaktionen des Transplantats, eine deutlich verlängerte Periode, in der die Patienten in erster Linie hinsichtlich viraler Infektionen oder Pilzinfektionen immundefizient waren, sowie über EBV vermittelte lymphoproliferative Dysfunktionen berichtet (14, 66, 131, 140, 151, 154, 228, 300, 320, 487, 495).

Folglich vermittelten die T-Lymphozyten nicht nur eine GVHD, sondern verbesserten darüber hinaus auch das Anwachsen sowie die Funktionsfähigkeit des Transplantats und verfügten durch den bereits zuvor erwähnten Graft versus Leukämie Effekt (GVL) neben einem „antiinfektiösen auch über ein antileukämisches Potential“.

Seit Einführung der Megadosistherapie, bestehend aus hochangereicherten CD34⁺ Stammzellen (399) haploidentischer Familienspender zu Beginn der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts konnten, im Hinblick auf oben erwähnte Komplikationen post Transplantationem, große Fortschritte erzielt werden. Die Problematik der Transplantatabstoßung, sowie eine verlängerte Periode der Immundefizienz, die mit wachsendem Alter des Patienten ebenfalls zunimmt, besteht dennoch nach wie vor (376) (259) (157) (158) (159).

Verfahren, die dazu beitragen, die Entstehung einer GVHD effizient zu unterbinden und die gleichzeitig in der Lage sind, den Patienten vor der Transplantatabstoßung und damit vor einem Rezidiv seiner Grunderkrankung oder vor Infektionen viraler Genese, sowie vor Pilzinfektionen zu bewahren, könnten dazu beitragen, dass allogene Stammzelltransplantation in Zukunft häufiger und mit größerem therapeutischen Erfolg durchgeführt werden könnten. Grundlage für sämtliche Untersuchungen, im Rahmen dieser Arbeit, war daher die Beobachtung, dass eine selektive Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten weder die antileukämische noch die antiinfektiöse Immunantwort der übrigen T-Lymphozyten tangiert (340).

1.2 Ein kurzer Überblick über die Geschichte der Knochenmarktransplantation

1.2.1 Die Anfänge der Knochenmarktransplantation (KMT)

Die Geschichte der Knochenmarktransplantation begann im Jahr 1949 mit den Studien von Jacobson et al. (201), die herausfanden, dass das Abschirmen der Milz, während der Bestrahlung mit einer tödlichen Strahlendosis, im Mausmodell ein Überleben zuließ. Lorenz et al. (287) berichtete auf der anderen Seite darüber, dass das Überleben bestrahlter Mäuse durch eine Infusion von Milz- oder

Knochenmarkzellen gesichert werden konnte. Allerdings ging man initial davon aus, dass dieses Phänomen auf humoralen Faktoren basierte. 1954 revidierten Barnes und Loutit ihre eigenen Experimente, sowie die anderer, mit dem Zitat „die chemische Hypothese sei noch nicht unter dem kompletten Ausschluss der zellulären Hypothese geprüft worden“ (26). Die Befürwortung der zellulären Hypothese kam prompt, als Main und Prehn (297) demonstrierten, dass bestrahlte Mäuse, die die Bestrahlung durch eine Infusion allogener Knochenmarkzellen überlebten, gegenüber einem allogenen Hauttransplantat immunologische Toleranz entwickelten. Kurz danach zeigten Ford et al. (121), dass, mit einer tödlichen Strahlendosis bestrahlte Mäuse, nach der Infusion von Knochenmark zytogenetische Charakteristiken des Spenders aufwiesen.

1.2.2 Frühe Studien am Tiermodell, die zur Entdeckung der GVHD führten

In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden in einigen Fällen, trotz erfolgreich durchgeführter Knochenmarktransplantationen, verschiedenste Begleiterscheinungen beobachtet, die entsprechend ihrer Symptomatik als so genannte „wasting disease“ bezeichnet wurden (460). Billingham erkannte, als Ursache dieser Erkrankung, T-Zellfraktionen, die in der Lage waren, einen immunologischen Angriff gegen das Gewebe des Empfängers durchzuführen. Diese, vom Spender ausgehende Immunreaktion gegen das Gewebe des Empfängers, ist heute auch als Graft versus Host Erkrankung (GVHD) bekannt (37). Eine weitere Beobachtung, nämlich, dass die schwere der GVHD dabei in erster Linie von der Fremdheit der Spender- und Empfängergewebe abhing, führte letztendlich zur Entdeckung der MHC-Komplexe.

1.2.3 Die Entdeckung der Haupt-Histokompatibilitätskomplexe (MHC)

Techniken, die dazu beitrugen, Gewebsantigene des Menschen genauer definieren zu können, waren für die Entwicklung der Knochenmarktransplantation, besonders im Hinblick auf die Vermeidung einer GVHD, unerlässlich. 1954 entdeckten Miescher und Fauconnet (319) Antikörper, die zuvor durch Transfusionen oder frühere Schwangerschaften induziert worden sein mussten

und gegen Antigene auf humanen Leukozyten gerichtet waren. Dausset (93) und van Rood et al. (466) verwendeten diese Antikörper, um die Gruppen der humanen Leukozytenantigene (HLA) näher beschreiben zu können. In den nachfolgenden Jahren wurden hinsichtlich der immungenetischen Charakterisierung dieser Antigene kontinuierlich Fortschritte erzielt (44).

Die genetischen Grundlagen dieser Antigene sind auf dem Chromosom Nummer 6 in einer Supergenregion lokalisiert, die auch als Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) bekannt ist. Die MHC-Moleküle der Klasse I umfassen drei Genfamilien, die bei Transplantationen eine Rolle spielen, nämlich HLA-A, -B und -C während die Antigene der Klasse II durch die Genfamilien HLA-D, -DR, -DP und -DQ näher definiert sind.

In den 90er Jahren wurden sämtliche Techniken der serologischen Typisierung durch molekulare Techniken ersetzt, die eine präzisere Charakterisierung der MHC-Gene zuließen. Durch diese Techniken entdeckte man allerdings auch, dass die Heterogenität der MHC-Moleküle noch umfassender war, als bisher angenommen. Auf der anderen Seite war es aber nun möglich, nicht verwandte Individuen hinsichtlich ihrer MHC-Antigene zu vergleichen (318). Die nachfolgende Einrichtung so genannter Spenderkarteien erlaubt es, trotz der Vielfalt an MHC-Antigenen, passende Fremdspender zu finden (187).

1.2.4 Die Knochenmarktransplantation (KMT) als anerkannte Therapieform maligner Erkrankungen sowie angeborener Dysfunktionen des hämatopoetischen Systems

Die ersten Knochenmarktransplantationen wurden zunächst bei Patienten vorgenommen, die nicht an einer malignen Erkrankung, sondern an einer Dysfunktion des hämatopoetischen Systems, wie der aplastischen Anämie litten (433, 448). Darüber hinaus konnten bald auch die Thalassämia major (290) und die Sichelzellanämie (210) im Rahmen von Knochenmarktransplantationen kurativ behandelt werden.

Erst später wurden Knochenmarktransplantationen als Therapieoption maligner Erkrankungen bei bereits „austherapierten“ Patienten und folglich auch mit nur

mäßigem Erfolg durchgeführt. Der ausbleibende Erfolg führte schließlich zu der Überlegung, Knochenmarktransplantationen auch bei Patienten einzusetzen, deren Erkrankung noch nicht das Endstadium erreicht hatte. Aus diesem Grund wurden Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts erstmals, im Rahmen leukämischer Erkrankungen mit Erstrezidiv, bzw. mit ersten Anzeichen eines Rezidivs der Grunderkrankung, Transplantationen durchgeführt. In diesen Fällen kam es anschließend tatsächlich, d. h. statistisch belegbar, zu einer deutlichen Verbesserung der Langzeitüberlebensrate (35) (447).

In den letzten zwanzig Jahren wurden Knochenmarktransplantationen vor allem bei Patienten mit akuten Leukämien durchgeführt (46, 123). Die allogene Knochenmarktransplantation erbrachte auch in der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML), der akuten myeloischen Leukämie (AML) und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) einen gewaltigen Fortschritt (72). Kürzlich konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese Form der Therapie auch bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und bei Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) eingesetzt werden kann (73, 471).

1.2.5 Alternativen zur Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen

Die Transplantation von Stammzellen aus dem peripheren Blut wurde erstmals in Erwägung gezogen, als es gelang, diese Zellen im Blut von Mäusen (142), Hunden (68) und anderen Primaten (432) nachzuweisen. Darüber hinaus beobachtete man, dass Stammzellen nach einer chemotherapeutischen Behandlung vermehrt im peripheren Blut zu finden waren (219) und zahlenmäßig durch eine zusätzliche Gabe hämatopoetischer Wachstumsfaktoren, wie z.B. GM-CSF und G-CSF (135) vermehrt werden konnten. Die auf diese Weise mobilisierten Zellen konnten anschließend, ohne operativen Eingriff, aus dem peripheren Blut „abgesammelt“ werden. Seit der Entdeckung des CD34 Moleküls auf der Oberfläche dieser Zellen war es zudem möglich, Zellen mit diesem charakteristischen Oberflächenmarker extra-korporal mittels verschiedenster Techniken anzureichern und dem Patienten als Megadosistherapie zu transfundieren. Diese Form der Stammzelltherapie kommt seit etwas mehr als einem Jahrzehnt zum Einsatz.

Vollständigkeitshalber bleibt noch zu erwähnen, dass selbst im Nabelschnurblut, sowie in der fetalen Leber, begrenzte Mengen an Stammzellen zu finden sind, die ebenfalls zu therapeutischen Zwecken genutzt werden können (139).

1.3 Die Problematik der Transplantation und mögliche therapeutische Interventionsmöglichkeiten

1.3.1 Die Konditionierungstherapie im Vorfeld der Transplantation

Mit einer Hochdosischemo- oder Radiochemotherapie, die unmittelbar vor der Transplantation appliziert wird, werden verschiedene Intensionen verfolgt. Zum einen sollen dadurch möglichst viele Tumorzellen zerstört werden, zum anderen möchte man auf diese Weise auch möglichst viele T-Lymphozyten des Empfängers inaktivieren, die u. a. zu einer nachfolgenden Transplantatabstoßung beitragen könnten.

Darüber hinaus war man früher der Meinung, auf diese Weise neuen Platz für die zu transplantierenden Zellen zu schaffen, eine These, die mittlerweile durch die Einführung von so genannten Minitransplantaten widerlegt werden konnte (101). Was aber bedeutet die Konditionierungstherapie für das Immunsystem des Empfängers? In einem Zeitraum von Beginn der myeloablativen Therapie, bis einige Tage nach der Transplantation, kommt es durch die Konditionierung zur so genannten „funktionellen Asplenie“, d. h. diese Patienten müssen, sowohl vor, als auch nach der Konditionierungstherapie, wie splenektomierte Patienten behandelt werden. Aus diesem Grund sollte vor der Konditionierungstherapie eine antibiotische Darmdekontamination erfolgen. Zudem sollte die Behandlung der Patienten möglichst steril, d. h. unter Einhaltung strengster Hygienemaßnahmen in Bereichen mit „Laminar Airflow“, den so genannten „Life Islands“ von statten gehen. Auch wenn es bereits wenige Tage nach einer Transplantation zur Regeneration der Granulozyten kommt, die vor allem einen Schutz vor Infektionen bakterieller Genese darstellen, sollte die Anfälligkeit gegenüber viraler Erkrankungen, sowie gegenüber von Pilzinfektionen in den nachfolgenden ein bis zwei Jahren gesondert beachtet werden.

1.3.2 Opportunistische Infektionen als Folge der Immunsuppression nach einer Transplantation

Das Wissen um das Spektrum an möglichen Infektionssyndromen nach einer Knochenmarktransplantation hat im letzten Jahrzehnt stark zugenommen.

Die Immunabwehr des Empfängers wird im Laufe der Transplantationsprozeduren durch Schädigung der Schleimhautbarrieren im Mund und Gastrointestinaltrakt, durch Zerstörung der Integrität der Haut mittels iatrogenen Prozeduren, wie z.B. Katheteranlagen und durch Reduktion von Zahl und Funktion Neutrophiler Granulozyten, durch Verminderung oder Dysregulation der zellulären und humoralen Immunantwort, durch Verschlechterung der Opsonisierung mittels Komplement und durch den Verlust der retikuloendothelialen Funktion der Milz, stark geschwächt. Darüber hinaus wird diese Situation zusätzlich durch Alterationen der mikrobiologischen Flora auf Haut und Schleimhäuten, Expositionen gegenüber antibiotischen Substanzen, Resistenzentwicklungen und Überwucherungen durch opportunistische Pathogene kompliziert.

Nach einer Transplantation kann man drei aufeinander folgende Phasen unterscheiden, in denen die Patienten für einzelne Pathogene besonders anfällig sind. Die erste Phase umfasst dabei einen Zeitraum von etwa vier Wochen nach der Transplantation, in dem vor allem grampositive und gramnegative Bakterien, Pilze und Epstein-Barr-Viren eine erhöhte Infektionsgefahr darstellen. Im zweiten Intervall, das den zweiten und dritten Monat nach der Transplantation umfasst, werden vermehrt CMV, Pneumocystis carinii Pneumonien, grampositive und gramnegative Bakterien sowie Pilze als ernstzunehmendes Agens für Infektionen beobachtet. Nach dem dritten Monat spielen Infektionen durch VZV, Streptococcus Pneumonien, Neisseria Meningitiden, Haemophilus Influenzae und die Hepatitis C eine entscheidende Rolle (487). Diese letzte Phase wird vor allem durch die Suppression der Lymphozytenfunktion geprägt.

Lymphozyten durchlaufen bei Transplantatempfängern im Erwachsenenalter in Abhängigkeit von der allogenen Umgebung eine ontogenetische Entwicklung, die nicht nur durch Unterschiede in den Minor- und Major-Antigenen sondern auch von der Menge an noch vorhandenem Thymusgewebe, das für die T-Zellreifung nötig ist, bestimmt wird. Daneben spielt die immunsuppressive Therapie, die in erster

Linie zur Minimierung des GVHD Risikos eingesetzt wird, sowie die GVHD an sich, die durch immuninkompetente T-Lymphozyten ausgelöst wird, als Ursache für die verzögerte Lymphozytenfunktion eine wichtige Rolle. Beide Formen der GVHD, die akute (aGvHD) (337) und insbesondere die chronische GVHD (cGvHD) (17, 18, 293, 337, 354, 488), sowie die physikalische Destruktion des Immunsystems durch die Bestrahlung bewirken folglich eine erhebliche Verzögerung der Immunrekonstitution. In diesem Zusammenhang wurde auf eine spezifische Zellschädigung des Thymusepithels durch die Konditionierungstherapie, sowie auf eine resultierende Dysfunktion CD4⁺-Lymphozyten aufmerksam gemacht (401-403).

Zusätzlich zu bisher Erwähntem, sind häufig, sowohl die Serumkonzentration an Immunglobulin A (IgA) (337) (106), als auch die Sekretionsrate von IgA besonders bei Patienten mit cGVHD (200) deutlich reduziert. Alle diese Faktoren spielen bei der Infektanfälligkeit transplantierte Patienten eine große Rolle (316).

Wie bereits zuvor erwähnt treten in der Phase der Neutropenie häufig bakterielle Infektionen auf, während hingegen Defekte in der T-Zellfunktion Virusinfektionen, wie CMV (317), Herpes Simplex (395) und VZV (285) nach sich ziehen. Die Ursache hierfür ist u. a. in der Inversion des CD4/CD8 Verhältnisses zu sehen, da nach einer Transplantation zunächst eine geringe Anzahl an CD4⁺-Lymphozyten („Helfer induzierende“ T-Zellsubpopulation, MHC Klasse II reaktive T-Zellen) nachweisbar ist, während die Anzahl an CD8⁺-Zellen („zytotoxische“ bzw. „Suppressor“-T-Zellsubpopulation, MHC Klasse I reaktive T-Zellen) sehr schnell wieder in ursprünglicher Menge vorhanden ist und dann auch für eine längere Zeit erhöht bleibt (16, 18, 95, 106, 114, 124, 130, 398) (107). Nach einer Zeitspanne von sechs bis zwölf Monaten post Transplantationem sind die Patienten, mit Ausnahme derer, die an einer GVHD leiden und aus genannten Gründen, sowohl für bakterielle als auch für virale Infektionen vermehrt anfällig sind, in der Regel immunkompetent (18, 19). Dieses Stadium der Immunkompetenz wird von Kindern schneller als von Erwachsenen erreicht.

1.3.2.1 Das EBV assoziierte lymphoproliferative Syndrom und die Adenovireninfektion nach allogenen Transplantationen

Eine Epstein-Barr-Virus-Reaktivierung, kann nach einer Knochenmarktransplantation, u. a. zu einer so genannten „lymphoproliferativen Erkrankung“ führen, die zum Teil nur sehr schlecht auf herkömmliche Therapieoptionen anspricht. Im Kindesalter stellen zudem Adenovireninfektionen eine therapeutische Herausforderung dar.

1.3.2.2 Die CMV-Infektion

Eine häufig sehr schwer und kompliziert verlaufende Infektion zu jedem Zeitpunkt nach der Transplantation ist die CMV-Infektion, die früher, bezüglich der Todesursachenhäufigkeit nach KMT, mit einem Prozentsatz von 15 - 20% an zweiter Stelle hinter der GVHD angesiedelt werden konnte (487). Faktoren, die ein erhöhtes Risiko einer CMV-Infektion in sich bergen, beinhalten die allogene Transplantation, die Seropositivität hinsichtlich CMV, die GVHD-Prophylaxe, das Alter des Patienten und letztlich das Auftreten einer akuten GVHD. Wichtig für das Überleben und die Bekämpfung dieser Infektion ist eine effektive, CMV-spezifische Immunantwort, die entweder von NK-Zellen oder T-Lymphozyten vermittelt werden kann (370, 371). Aus diesem Grund wird von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, Subpopulationen von Lymphozyten, die immunologische Aktivität gegen CMV, nicht aber gegen HLA-Antigene des Empfängers zeigen, zu isolieren und in vitro, unter Zuhilfenahme von Wachstumsfaktoren, zu amplifizieren. Die auf diese Weise generierten virusspezifischen T-Zellen könnten dann im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie zum Einsatz gebracht werden (104, 171) (103).

1.3.3 Die Adoptive Immuntherapie und der Graft versus Leukämie Effekt (GVL)

Mathé et al. führte 1965 in einem der ersten Berichte über die allogene Knochenmarktransplantation bei Menschen, den Begriff „adoptive Immuntherapie“ ein, der den therapeutischen Effekt transplantierte Immunzellen näher

beschreiben sollte (304).

Mathé et al. riet zunächst dazu, die Graft versus Host Reaktion (GVHR) zur Tumorzerstörung zuzulassen und erst dann die damit verbundene GVHD durch anschließende Behandlung dieser Erkrankung anzugehen. Auch Kolb et al. beobachtete, dass eine adoptive Immuntherapie, besonders bei Patienten mit CML, effizient zu sein schien, auch oder besonders wenn sich bereits Anzeichen eines Rezidivs zeigten (10, 83, 240, 241). So konnte bei vielen dieser CML-Patienten durch eine Infusion von Immunzellen (37, 100, 174, 179, 240, 241, 296, 364, 465) eine dauerhafte, molekularbiologisch nachweisbare Remission erzielt werden.

Die theoretische Grundlage dieses Phänomens scheint darin zu liegen, dass leukämische Blasten zwei unterschiedliche Antigenklassen exprimieren, nämlich „Leukämie-spezifische Antigene“ (27), die durch chromosomale Translokationen entstanden sind und „Knochenmark-restringierte Antigene“, die sowohl auf gesunden als auch auf leukämischen Zellen des Myelons präsentiert werden (27, 355). Bestimmte T-Zellpopulationen sind aufgrund dessen in der Lage, Leukämiezellen von Zellen des normalen hämatopoetischen Systems in ein und dem selben Individuum zu unterscheiden (92, 186). Diese Beobachtung führte zur Annahme, dass die antileukämische Reaktion mit der Entwicklung einer akuten GVHD, sowohl nach allogener Stammzelltransplantation, als auch nach der Infusion von Spenderlymphozyten, in Verbindung stehen könnte (186, 209, 241, 481). Wahrscheinlich richtet sich die antileukämische Immunreaktion in diesem Zusammenhang aber eher gegen spezifische Alloantigene, als gegen spezifische „Targets“ der Grunderkrankung (47). Dabei scheinen die Minor-Histokompatibilitätsantigene, die durch Alloantigene auf den hämatopoetischen Stammzellen repräsentiert werden, Ziele für den GVL Effekt darzustellen (111, 144).

Die Pathophysiologie des antileukämischen Effekts der Lymphozyten beruht insbesondere auf CD8⁺-Zellen, da diese in der Lage sind, den Zelltod, wenn auch auf unterschiedliche Art und Weise, herbeizuführen (31, 32). So können CD4⁺- und CD8⁺-Zellen durch Interaktionen zwischen ihren Fas-Liganden und den Fas-Molekülen auf der Zelloberfläche der jeweiligen leukämischen Zielzelle (325)

Apoptose induzieren. Die dabei nötigen Reaktionsschritte verlaufen calciumunabhängig. Auf der anderen Seite können T-Zellen Perforin freisetzen, das in der Lage ist, die Permeabilität der Zellmembran bestimmter Zielzelle zu erhöhen. Dadurch können einzelne Serinproteasen, die so genannten Granzyme nach intrazellulär gelangen und dort den programmierten Zelltod initiieren (221). Andere Studien wiederum zeigten, dass die Effizienz der tumorspezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) in vivo am ehesten mit der Sekretion von Interferon- γ korrelierte, nicht aber mit der Tumorlyse (28).

Hinsichtlich des GVL Effekts gibt es allerdings bislang nur wenige Daten, die besagen, dass nach der Elimination alloreaktiver Zellen eine antileukämische Reaktivität erhalten bleibt (311) (340). Horowitz et al. untersuchte unter diesem Gesichtspunkt 2.254 Patienten mit AML und ALL in der ersten Remission, sowie Patienten mit CML in der ersten chronischen Phase, die eine Knochenmarkspende von HLA-identischen Geschwistern erhalten hatten (186). Dabei wurde bei Patienten, die kein T-Zell-depletiertes Knochenmark erhalten hatten, eine verminderte Rezidivrate beobachtet, die bei Patienten mit akuter GVHD mit einem relativen Risiko von 0,68, bei denen mit chronischer GVHD mit einem relativen Risiko von 0,43 und bei Patienten mit akuter und chronischer GVHD mit einem relativen Risiko von 0,33 angegeben wurde, verglichen mit Patienten die keine Symptome einer GVHD zeigten. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass von der GVHD ein GVL Effekt ausgeht. Allerdings steht der GVL Effekt nicht immer mit einer GVHD in Verbindung (13, 82). Heutzutage besteht kein Zweifel mehr daran, dass T-Lymphozyten eine integrale Rolle bei den Entstehungsmechanismen der Transplantatabstoßung, aber auch der GVHD und der GVL Effekte spielen (238).

1.3.4 Donor Lymphocyte Infusion (DLI)

Heutzutage befürworten eine Reihe von Wissenschaftlern die Transfusion von spezifischen T-Lymphozyten des Spenders in den Empfänger hinsichtlich immuntherapeutischer Absichten (182, 351, 378, 387) da, verglichen mit der Verwendung von antigenunspezifischen Lymphozyten, die spezifische CTL-Therapie sehr viel effektiver zu sein scheint, selbst wenn hierbei nur eine geringe

Anzahl an Zellen verwendet wird (387). Allerdings ist die Infusion von Spenderlymphozyten im allogenen Bereich mit dem Risiko einer Graft versus Host Reaktion (GVHR) assoziiert, die wiederum die Entwicklung einer sehr schwer verlaufenden und potentiell letalen Graft versus Host Erkrankung (GVHD) nach sich ziehen kann. In diesem Zusammenhang konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl an T-Lymphozyten im Inoculum und der Schwere der nachfolgenden GVHD anhand eines Tiermodells dokumentiert werden (346). Aus dieser Beobachtung war zu ersehen, dass reife, immunkompetente Spenderlymphozyten für die pathophysiologischen Effekte der GVHD verantwortlich sind (242). Diese werden dabei, entweder durch das Nichtübereinstimmen in den Major- oder Minor-Antigenen oder durch die Zytokinfreisetzung nach Ganzkörperbestrahlung, in vielen Fällen aber auch durch beides, aktiviert. Unter diesem Gesichtspunkt wurde vermehrt darüber debattiert, ob Lymphozyteninfusionen zugelassen werden können und welche Vorsichtsmaßnahmen hinsichtlich der Entwicklung einer GVHD getroffen werden müssen. Einige Autoren empfahlen in diesem Zusammenhang sogar unmanipulierte Spenderlymphozyten aus dem peripheren Blut als T-Zellquelle heranzuziehen (174), während andere angesichts dieser Äußerungen zu strengen Vorsichtsmaßnahmen rieten und lediglich die Gabe virusspezifischer T-Zellklone befürworteten, die in vitro keine nachweisbare Aktivität gegen HLA-Moleküle des Empfängers zeigten (378, 379) (58).

1.3.5 Die Transplantatabstoßung

Die wichtigste Determinante bei einer Abstoßungsreaktion umfasst den genetischen Unterschied zwischen Spender und Empfänger. Im Allgemeinen korreliert der genetische Unterschied mit dem Unterschied in den Antigenen, auch wenn nicht alle Genprodukte antigenen Charakter besitzen. Die Wahrscheinlichkeit für eine Abstoßungsreaktion liegt bei HLA-identischen Fremd Spendern bei bis zu 15%.

Abstoßungsreaktionen werden von alloreaktiven T-Lymphozyten des Empfängers vermittelt und sind in der Lage, hämatopoetische Elemente des Spenders zu zerstören (48). Zuvor müssen allerdings einige T-Lymphozyten des Empfängers

die myeloablative Therapie im Vorfeld der Transplantation überlebt haben und in der Lage sein, als Antwort auf den starken allogenen Stimulus, der von dem Knochenmark des HLA-identen Fremdspenders ausgeht, zu proliferieren und einen so genannten gemischten Chimärismus auszubilden (22-24, 228). Die Inzidenz der Abstoßungsreaktion kann u. a. durch Ganzkörperbestrahlung (352), durch selektive Bestrahlung des lymphatischen Gewebes (total lymphoid irradiation – TLI) (415) oder durch Verabreichung von Cyclosporin A (CsA) (153) vermindert, aber nicht eliminiert werden. Die medikamentöse Unterbindung der Abstoßungsreaktion mittels Cyclosporin, FK506 und Methotrexat (MTX) kann zudem zu einem vermehrten Zellschaden in Niere, Leber oder Lunge führen und dadurch die therapeutischen Effekte ebenfalls negativ beeinflussen (422).

1.3.6 Die Graft versus Host Erkrankung (GVHD)

1.3.6.1 Die allgemeine Immunpathophysiologie der GVHD

Die Transplantat-Wirt-Reaktion (engl. Graft versus Host Reaktion) kann bei der Übertragung eines immunkompetenten, allogenen Transplantats auf einen Wirt mit mangelnder Immunabwehr auftreten. Das Auftreten dieser Abwehrreaktion des Transplantats gegen den Wirt, die im Wirtsorganismus Veränderungen, ähnlich denen einer Autoimmunerkrankung zur Folge hat tritt vor allem bei transplantierten Patienten mit vorheriger Chemotherapie und Bestrahlung auf.

Die Alloimmunität repräsentiert dabei eine polyklonale Antwort des Immunsystems gegen Histokompatibilitätsantigene, die von transplantierten Geweben exprimiert werden (242). Heute weist man, dass die, während einer Stammzelltransplantation bzw. Spenderlymphozyteninfusion übertragenen Lymphozyten, für die Entwicklung einer GVHD verantwortlich sind. Als Effektoren, sowohl der akuten, als auch der chronischen GVHD gelten daher in erster Linie reife T-Lymphozyten, d. h. CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten (383, 427, 453, 457). Dabei spielen vor allem CD4⁺-Zellen, die Minor- und Major-Histokompatibilitätsantigene auf verschiedenste Arten erkennen bei der Entwicklung der GVHD eine zentrale Rolle (156, 242, 347). CD4⁺-Zellen erkennen die MHC II Moleküle des allogenen Spenders, die auf ihrer Zelloberfläche Peptidliganden gebunden haben (265, 305, 409). Die CD4⁺-

Lymphozyten lassen sich in T-Helfer-1 (Th1) und T-Helfer-2 (Th2) Zellen unterteilen. Die Th1 Zellen produzieren IL-2, Interferon- γ und den Tumor-Nekrose-Faktor- β und nehmen an der inflammatorischen Immunantwort teil. Th2 Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und unterstützen die humorale Immunantwort. Im Gegensatz zu der transienten Natur der Th2-induzierten GVHD, generiert die Th1 Population eine signifikant länger andauernde GVHD.

1.3.6.2 Die Immunpathophysiologie der akuten GVHD (aGVHD)

Die akute GVHD kann sich klinisch durch Exantheme an der Haut, Veränderungen der Leberfunktionsparameter, Diarrhö und selten durch Dyspnoe manifestieren. Histologisch ähneln die Hauterscheinungen einer lichenähnlichen Reaktion, die Leber weist eine Entzündung der Gallengänge auf und im Gastrointestinaltrakt zeigt sich eine entzündliche Abschilferung der Mukosa. Der Zeitraum der Erkrankung erstreckt sich definitionsgemäß auf die ersten drei Monate nach der Transplantation. Der Schweregrad der Erkrankung wird anhand der entsprechenden Organdysfunktionen eingeteilt. Zusätzlich zu der Schädigung der betroffenen Endorgane ist eine floride GVHD mit Immunsuppression und Infektanfälligkeit assoziiert. In diesem Zusammenhang stellt IFN- γ das primäre Zytokin dar, das für die GVHD bedingte Immunsuppression verantwortlich ist (477, 478).

Antin und Ferrara nahmen an, dass das Zusammenspiel verschiedenster Pathomechanismen nach einer allogenen Knochenmarktransplantation zur Entwicklung einer akuten GVHD führen kann (12). Die GVHD wird dabei bereits während der Konditionierung des Empfängers initiiert und verläuft in zwei Phasen. In der afferenten Phase wird durch die zytotoxische Wirkung der Konditionierungstherapie das Empfängergewebe geschädigt (105). Hiervon betroffen sind in erster Linie die mitotisch aktiven Zellverbände in der Haut und in den Schleimhäuten des Gastrointestinal- und des Respirationstrakts sowie in der Leber. In Folge dieser Veränderungen kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (185, 230, 334, 335, 358, 405, 474, 478). Daneben kann eine akute GVHD, als eine so genannte transfusionsvermittelte GVHD, auch in Abwesenheit eines primären Zellschadens auftreten (12). In einem

weiteren Schritt der afferenten Phase kommt es, unter bereits beschriebenen Bedingungen, neben der Zytokinsekretion zu einer vermehrten Expression von Zelladhäsions- und HLA-Molekülen sowie zur Stimulation reifer T-Lymphozyten des Spenders. Dieser Prozess wird zusätzlich durch eine autokrine Sekretion von IL-2 verstärkt. Schließlich führen die Aktivierung und Rekrutierung zusätzlicher mononukleärer Effektorzellen aus myeloischen Vorläuferzellen des Spenders durch die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine zur Unterhaltung der allogenen Immunantwort.

Die efferente Phase der GVHD umfasst die Aktivierung einer Reihe anderer inflammatorischer Effektorzellen, d. h. zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen (230, 334, 335), die direkt zu Zellschädigungen führen und zudem in der Lage sind, zytopathische Moleküle zu sezernieren. Die Balance zwischen den Zytokinen, die von den Th1 Zellen und den Th2 Zellen sezerniert werden, bestimmt das Ausmaß der inflammatorischen Immunantwort, da Th2 Lymphozyten in der Lage sind, die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-1 und TNF- α zu inhibieren (116).

1.3.6.3 Die Immunpathophysiologie der chronischen GVHD (cGVHD)

Eine chronische GVHD (cGVHD) kann sich entwickeln, ohne dass eine akute GVHD vorliegt. Die cGVHD tritt gewöhnlich mehr als drei Monate nach der Transplantation auf. Sie ist durch Exantheme, Sklerodermatitis, Alopezie, Leberfunktionsstörungen, orale lichenähnliche Läsionen und ein Sicca-Syndrom charakterisiert, kann aber auch eine obliterative Bronchiolitis und gastrointestinale Motilitätsstörungen beinhalten. Die Erkrankung wird von T-Zellen des Spenders vermittelt, von denen die meisten gegen den Minor-Histokompatibilitätskomplex des Empfängers reagieren. Weiterhin können autoreaktive T-Zellen des Spenders vorliegen, die ein Autoantigen, das Spender und Empfänger gemeinsam ist, besonders dann erkennen, wenn eine Gewebeschädigung vorliegt (474). Die aktivierten T-Lymphozyten bilden eine Vielzahl an Zytokinen einschließlich IL-4, von dem man annimmt, dass es ein primärer Mediator der Erkrankung ist. Außerdem wurde, verglichen mit gesunden Kontrollpersonen oder Patienten, die keine cGVHD entwickelten, eine signifikant verminderte IL-10 und eine vermehrte

Interferon Produktion festgestellt. Beide Zytokine scheinen in die Pathogenese der cGVHD involviert zu sein. Die Alloreaktivität kann durch das Zytokin IL-10 inhibiert werden, das vermutlich über eine „Downregulierung“ der HLA-Antigenexpression wirkt (29). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass es durch das Inhibieren endogen gebildeten IL-10 in vitro, zu einer vermehrten Sekretion an IFN- γ kommt. Folglich könnte eine signifikant reduzierte IL-10 Produktion bei Patienten mit einer chronischen GVHD zu einer unkontrollierten Alloreaktivität und einer übermäßigen Produktion an IFN- γ führen, was wiederum für einen Teil der, an der cGVHD beteiligten klinischen Symptome, verantwortlich wäre (12). Anscheinend durchlaufen die neu entwickelten T-Zellen des adoptiven Empfängers keine normale negative Selektion, bei der die autoreaktiven T-Zellen zerstört und eine Selbsttoleranz induziert wird. Die wichtigsten, von einer chronischen GVHD ausgehenden, Komplikationen sind opportunistische Infektionen, die sowohl mit der zugrunde liegenden Autoimmunerkrankung, als auch ihrer Therapie in Zusammenhang stehen.

1.3.6.4 Risikofaktoren der GVHD-Entwicklung nach allogener Transplantation

Nash et al. untersuchten, anhand einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse, die Risikofaktoren, die neben der HLA-Disparität mit dem Grad II-IV der akuten GVHD einhergingen. Dabei spielte ein unterschiedliches Geschlecht, die Tatsache einer früheren Schwangerschaft ($p = 0,001$), eine Zunahme der Strahlendosis bei der Ganzkörperbestrahlung ($p = 0,001$), eine Reduktion der MTX Dosis ($p = 0,02$) oder der CsA Dosis ($p = 0,02$), sowie das Lebensalter, wenn die betreffende Person älter als 40 Jahre war ($p = 0,5$) eine signifikante Rolle (330). Przepiorka et al. berichtete darüber hinaus über ein erhöhtes Risiko der GVHD Entwicklung in Abhängigkeit von der Anzahl CD34⁺ transplantierte Stammzellen (368). Dieser Aspekt ist jedoch kontrovers zu diskutieren, da, trotz Applikation einer Megadosis CD34⁺ Stammzellen, keine GVHD nach entsprechenden allogenen Transplantationen beobachtet werden konnte (159). Daneben ist allerdings die Anzahl der infundierten Lymphozyten unbestritten mit der Entwicklung einer GVHD assoziiert, da gezeigt werden konnte, dass die Zahl der T-Zellen zum Zeitpunkt der Knochenmarktransplantation positiv mit der Inzidenz der GVHD korrelierte (227).

Anhand weiterer klinischer Studien konnte gezeigt werden, dass zwischen der Inzidenz der GVHD Entwicklung und der, im Rahmen der Konditionierung applizierten Strahlendosis (< 1.200 versus > 1.200 cGy), eine Korrelation bestand (79, 330), die allerdings auch bei der myeloablativen Therapie anzutreffen war, wenn Chemotherapie und Bestrahlung in Kombination eingesetzt wurden, verglichen mit einer alleinigen Chemotherapie (80). Auch die Zytotoxizität der myeloablativen Therapie korrelierte mit der Inzidenz der GVHD (97).

1.3.6.5 Vorbeugende therapeutische Maßnahmen zur Vermeidung einer GVHD

Seit 1968 war bekannt, dass die Graft versus Host Erkrankung (GVHD) durch T-Lymphozyten vermittelt wird und mittels Anti-Lymphozyten-Globulinen (461) bzw. einer Vielzahl anderer Methoden, zumindest ansatzweise, behandelt werden kann. So wurde Mitte der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts im Mausmodell, unter Verwendung diskontinuierlicher Dichtegradienten, reife Lymphozyten aus allogenen Knochenmarkspenden entfernt.

Bis heute konnte jedoch noch kein zufriedenstellender Lösungsansatz für das Problem der GVHD gefunden werden (18, 19, 42, 131, 487). Indem man T-Lymphozyten aus dem Transplantat entfernte, konnte das Risiko der GVHD reduziert werden. Dies führte dazu, dass eine Reihe von T-Zelldepletionsverfahren in klinischen und präklinischen Studien getestet wurden (301, 320, 365, 366, 375, 416).

Für die T-Zellelimination stehen daher viele verschiedene Depletionstechniken, sowohl in vivo, als auch in vitro zur Verfügung (365) (476) (301) (96) (422) (475) (180) (203). Die neueren Strategien hierunter, befürworteten dabei eine selektive Depletion von T-Lymphozyten. Dadurch versprach man sich eine deutlich verbesserten „Engraftmentrate“ nach der Transplantation, da durch die übrigen Spenderlymphozyten die, für des Anwachsen des Transplantats nötigen Zytokine, weiterhin produziert werden konnten. Ferner konnte so von den restlichen Lymphozyten ein so genannter „Veto-Effekt“ hervorgerufen werden, der gegen die, in den Abstoßungsmechanismus involvierten CTL des Empfängers, gerichtet war (67). Zusätzlich versprach man sich auf diese Weise eine Beschleunigung der Immunrekonstitution, da gezeigt werden konnte, dass dieser Prozess zur Anzahl

der T-Lymphozyten im infundierten Spenderpräparat direkt proportional ist (288). Retrospektiv gesehen erbrachte dieses therapeutische Vorgehen in der Tat die erwünschten Effekte (92) (67, 312, 377). Allerdings konnte diese Therapie nur durch eine Intensivierung der Konditionierungstherapie vor der Transplantation, sowie der immunsuppressiven Therapie nach der Transplantation bewerkstelligt werden.

Die von uns favourisierte Methode umfasste daneben die Mobilisation peripherer Blutstammzellen nach Applikation von G-CSF mit anschließender Leukapherese und indirekter Depletion von B- und T-Zellen mittels positiver Selektion peripherer CD34⁺ Blutzellen (MACS bzw. CLINIMACS). Aufgrund der ausgesprochen niedrigen T-Zellzahl im Transplantat und des geringen Risikos einer GVHD ließ es dieses Vorgehen zu, auf eine pharmakologische Immunsuppression post Transplantationem zu verzichten. Hinsichtlich des Engraftments des allogenen Transplantats schien die optimale Infusionsdosis CD34⁺ Stammzellen bei $> 10 \times 10^6$ Zellen/kg (Megadosis) zu liegen. Selbst im allogenen Bereich konnten dabei ausgesprochen niedrige Inzidenzen, sowohl der akute (13% = I° und 10% = II°), als auch der chronischen (7%) GVHD beobachtet werden. Allerdings wurde in diesem Zusammenhang auch über die weiterhin bestehende Problematik eines Rezidivs sowie der Immundefizienz nach der Transplantation berichtet (259).

Aus diesem Grund wurden, parallel dazu, Überlegungen laut, die sich mit der Infusion nicht alloreaktiver T-Lymphozyten, im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie, nach einer T-Zell depletierten Transplantation beschäftigten. Die Problematik dieses Vorgehens lag in der Elimination, der in der Infusion enthaltenen alloreaktiven T-Zellen. Der erste Ansatz, um dieses Problem zu lösen, beschäftigte sich damit, die humanen Spenderlymphozyten in das Stadium der Anergie gegenüber spezifischer Empfängerantigene zu versetzen, was unter Verwendung von CTLA4-Ig ohne oder in Kombination mit Cyclosporin A (CsA) durchgeführt wurde. Der zweite Ansatz, um dem Problem der GVHD beizukommen, umfasste die Elimination alloreaktiver Zellen mit Hilfe eines Immunotoxins (37, 67, 312), was allerdings bestimmte Richtlinien für Herstellung und Anwendung im klinischen Alltag erforderlich machte. Als Alternative wurde die Methode des „FACS-Sortierens“ (fluorescence activated cell sorter) angedacht, die

allerdings sehr langsam verläuft und eher hinsichtlich einer positiven Selektion als einer Depletion Verwendung findet (377). Vor kurzem wurde, unter dem gleichen Vorzeichen, von Tiberghien et al. und Bonini et al. ein gentherapeutischer Ansatz diskutiert, der die Verwendung von genetisch modifizierten T-Lymphozyten umfasste, die ein so genanntes Suizidgen exprimierten, das für die Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-tk) kodierte und zur selektiven Elimination alloreaktiver Zellen nach Entwicklung einer GVHD beitragen sollte (45, 452). Die neueste Depletionstechnik alloreaktiver Zellen, die zuvor ex vivo aktiviert worden waren, wurde von Garderet et al. und Koh et al. vorgeschlagen (132, 238). In deren Studien basierte die Depletion auf dem Verfahren des magnetischen Zellsortierens (MACS; magnet activated cell sorter), anstellen des Immunotoxin vermittelten Abtötens alloreaktiver CD25⁺-Zellen. In Analogie zu Cavazzana-Calvo et al. depletierte Garderet et al. ebenfalls alloreaktive Zellen, die den Aktivierungsmarker CD25 exprimierten, während Koh et al. Lymphozyten mit dem CD69 Phänotyp depletierten. Richtete sich die Depletion allerdings gegen beide Aktivierungsantigene, so resultierte, im Hinblick auf die Elimination alloreaktiver Lymphozyten, ein sehr viel effizienteres Verfahren (115), das darüber hinaus durch Depletionsverfahren, die sich gegen drei Aktivierungsmarker gleichzeitig richteten, nämlich CD25, CD69 und HLA-DR optimiert werden konnte (377).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

An der Kinderklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen werden jährlich durchschnittlich 50 Transplantationen durchgeführt. Im Rahmen einer Studie wurde an 30 Patienten mit malignen Grunderkrankungen, mittels hochangereicherter CD34⁺ Stammzellen (durchschnittliche Reinheit: 98,5%; durchschnittliche Zahl der CD34⁺ Zellen: $8,0 \times 10^6$ Zellen/kg und der restlichen T-Zellen: 6000 Zellen/kg) eine allogene Stammzelltransplantation von HLA-identischen, nicht verwandten Fremdspendern (MUD) und haploidentischen Familienmitgliedern durchgeführt. Dabei wurde keine GVHD Prophylaxe verabreicht. Allerdings erfolgte eine Behandlung mit Acyclovir, Fluconazol, Co-Trimoxazol und Metronidazol bis die T-Zellrekonstitution wieder einsetzte. Vom Zeitpunkt der Infusion von 8×10^6 oder 19×10^6 hämatopoetischer Progenitorzellen pro kg Körpergewicht bis zu dem Zeitpunkt, zu dem die Befähigung zur Bildung adäquater Granulozyten-, Thrombozyten-, und Erythrozytenzahlen wiedererlangt wurde, starben acht Patienten an einem Rezidiv und zehn an Infektionen (Viren = 5, Pilze = 2, Bakterien = 1, unbekannt = 2). Darüber hinaus wurde auch die Regenerationsphase der Hämatopoese in Abhängigkeit von der Viruslast verzögert. So zeigten CD3⁺-, CD4⁺- Lymphozyten und CD56⁺-Natürliche Killerzellen, bei hoher Viruslast, eine deutlich verlängerte Regenerationszeit. Während im Allgemeinen die Regeneration CD16⁺/CD56⁺ NK-Zellen mit einem Höhepunkt nach ein bis zwei Monaten nach der Transplantation sehr schnell verlief, setzte die T-Zellregeneration erst nach fünf bis sechs Monaten ein (258, 259).

Ziel dieser Arbeit war es daher, im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie nach allogener Stammzelltransplantation nicht alloreaktive T-Lymphozyten in vitro zu generieren, d. h. T-Zellen, die nicht in der Lage sind, eine Immunantwort gegen die HLA-Antigene des Empfängers zu initiieren, aber dennoch ein antiinfektiöses bzw. gegebenenfalls auch ein antileukämisches Potential aufweisen. Da die, durch das herkömmliche MLC-Verfahren (mixed lymphocyte culture) erreichbare Frequenz an alloreaktiven T-Zellen lediglich bei 1 bis 10% liegt (122, 307, 409) und daher schwer nachzuweisen ist, beabsichtigten wir, die alloreaktive Immunantwort in vitro

zu verstärken. Aus diesem Grund versuchten wir optimale Bedingungen für die Generation alloreaktiver T-Lymphozyten zu schaffen, was unter zu Hilfenahme eines geeigneten Nährmediums und verschiedenster Stimulatorzellarten, nämlich periphere mononukleäre Zellen (PMNC), zytokinaktivierte PMNC und dendritische Zellen bewerkstelligt werden sollte. Ausschlaggebend hierfür, war die Vorgabe, einen Weg zu finden, um die Sensitivität der Standard MLR (mixed lymphocyte reaction) zu verbessern und bislang unerkannt gebliebene Anzeichen der allogenen T-Zellaktivierung zu amplifizieren. In einem nachfolgenden Schritt sollten die generierten alloreaktiven T-Lymphozyten durch die Immunphänotypisierung, das Zytokinmuster sowie das proliferative Verhalten charakterisiert und quantitativ nachgewiesen werden. Die Intension, die hinter diesem Vorgehen stand, orientierte sich, im Hinblick auf die Depletion daran, möglichst alle, potentiell alloreaktiven Zellen in einen Aktivierungsstatus zu versetzen. Anschließend sollte die Methode ausgewählt werden, die diesen Anforderungen am ehesten entsprach. Im Hinblick auf den günstigsten Zeitpunkt für die Depletion alloreaktiver Zellen, die dann erfolgen sollte, wenn es zu einer maximalen Oberflächenexpression einzelner Aktivierungsmarker gekommen war, aber noch keine, durch Kultivierungsprozesse induzierte Zellproliferation, d. h. Amplifikation alloreaktiver Zellen stattgefunden hatte, sollte eine Analyse der Expressionskinetik durchgeführt werden. Dadurch versprach man sich Aufschluß über den Einsatz weiterer Aktivierungsmarker zu erhalten, die neben dem CD25, CD69 und HLA-DR Molekülen, in Bezug auf die selektive immunomagnetische Depletion, zusätzlich in Betracht kommen könnten. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit umfasste folglich die Entwicklung einer möglichst schnell und einfach durchzuführenden, aber dennoch sensitiven immunomagnetischen Depletionsmethode, um die in vitro generierten alloreaktiven Lymphozyten von den nicht alloreaktiven T-Lymphozyten zu separieren. Anschließend sollte die, aus dem Depletionsverfahren resultierende, negative Zellfraktion hinsichtlich ihres Oberflächenphänotyps, des Zytokinprofils und der proliferativen Aktivität im Hinblick auf ihre allogene, spezifische antigene oder mitogene Restimulierbarkeit identifiziert, genauer charakterisiert und diesbezüglich mit der jeweiligen Ausgangspopulation vor der immunomagnetischen Zellseparation verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zusammenstellung von generell benötigten technischen Geräten, Materialien und Reagenzien

Sterile Werkbank, <i>Hera safe</i>	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
CO ₂ Begasungsbrutschrank, <i>Hera cell</i>	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Laborzentrifuge, <i>Rotixa 50 RS</i>	Hettich, Tuttlingen
Drehschüttler	Snijders, Tilburg, Niederlande
Vortexer VF2	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik
Bestrahlungsgerät	MDS Nordion,
<i>GammaCell 1000 Elite CEO120</i>	Science Advancing Health,
(22 x 10 ¹² Bq 607 Ci, Caesium 137)	Ontario, Kanada
Durchflußzytometer, <i>FACSCalibur</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Automatisches Zellzählgerät, <i>Advia120</i>	Bayer, Leverkusen
Lichtmikroskop, Olympus, CX40LF200	Olympus, Japan
und Olympus IX50	Olympus, Japan
Zellkulturmikroskop, Olympus IM	Olympus, Japan
Trypanblau, <i>Trypan blue solution 0,4%</i>	Sigma, Chemical Co, Deisenhofen
Neubauer Zählkammer,	Kästner, München
<i>Neubauer improved Assistent-Bright Line</i>	
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Pipettiergerät, <i>Pipettboy plus</i>	Integra Bioscience, Schweiz
Pipetten	Gilson, Frankreich
	oder Eppendorf, Hamburg
Tansferpipette-8, 20-200 µl	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen, 10 µl, 100µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	und Gilson SA. Villiers-le-Bel,
	Frankreich
Sterile Plastikpipetten, 2-25 ml	Greiner, Sollingen/Frickenhausen
Plastikröhrchen, 14 ml, 50 ml	Greiner, Sollingen/Frickenhausen
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

Einfrierröhrchen, 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
PBS DULBECO'S, <i>Phosphat-gepufferte Saline</i> (nach Sörensen)einfach konzentriert ohne Mg ⁺⁺ und Ca ⁺⁺	GIBCO BRL, Eggenstein
BSA (30%)	Sigma, Deisenhofen
HSA	Blutspendedienst Baden- Württemberg
Natrium-Azid (10%)	Universitätsapotheke Tübingen
ETDA	Universitätsapotheke Tübingen
Wasser, Ampuwa (500 ml)	Fresenius Kabi, Bad Homburg

2.2 Materialien und Reagenzien für die Zellseparation

<i>Butterfly-21</i>	Abbott, Irland
Einmal-Injektions-Kanüle, <i>Micro lance 3</i>	Becton Dickinson, Fraga, Spanien oder Braun Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritze, 1ml - 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Perfusionsspritze, 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Heparin-Natrium, <i>Liquemin, N 25.000, 5 ml,</i> (aus Schweinedarm-Mukosa)	Roche, Grenzach Whylen
Kombi-Stopper	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Biocoll Separating Solution, <i>Ficoll</i>	Biochrom KG, Berlin

2.3 Material und Reagenzien für die Zellkultur

Polystyrenkulturflaschen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Sechs-Loch-Kulturplatten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Cell Scraper

Costa, Corning NY, USA

2.3.1 Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien X-VIVO 15 und RPMI 1640 und AIM-V wurden kommerziell bezogen.

X-VIVO-15

BioWhittaker, Maryland, USA

RPMI 1640

Biochrom, Berlin

AIM-V

GIBCO BRL, Paisley, Scotland

2.3.2 Zusatz von Serum

Zu den T-Zellmedien auf X-VIVO 15 oder RPMI 1640 Basis wurde teilweise fötales Kälberserum (FCS) bzw. humanes AB-Serum (hAB-Serum) hinzugegeben.

Humanes Serum, *Typ AB*

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Seinheim

Fötales Kälber Serum (*FCS*)

Seromed, Biochrom KG, Berlin

2.3.3 Zusammensetzung der Nährmedien

Als Nährmedien dienten X-VIVO 15 Medien mit folgenden Zusätzen:

X-VIVO 15 Medium I:

X-VIVO 15

BioWhittaker, Maryland, USA

ohne Zusätze

X-VIVO 15 Medium II:

mit 10% hAB-Serum, hitzeinaktiviert

X-VIVO 15

BioWhittaker, Maryland, USA

AB-Serum, hitzeinaktiviert

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Seinheim

X-VIVO 15 Medium III:

mit 10% FCS, hitzeinaktiviert

X-VIVO 15

BioWhittaker, Maryland, USA

FCS, hitzeinaktiviert

Seromed, Biochrom KG, Berlin

Als Nährmedien dienten des weiteren RPMI 1640 Medien mit folgenden Zusätzen:

RPMI 1640 Medium IV:

mit 10% hAB-Serum, hitzeinaktiviert

RPMI 1640

Biochrom, Berlin

hAB-Serum, hitzeinaktiviert

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Seinheim

RPMI 1640 Medium V:

mit 10% FCS, hitzeinaktiviert

RPMI 1640

Biochrom, Berlin

FCS, hitzeinaktiviert

Seromed, Biochrom KG, Berlin

2.3.4 Wachstumsfaktoren

Alle eingesetzten Wachstumsfaktoren waren rekombinant human.

Interleukin-4 (*IL-4*)

R&D Systems Inc., Minneapolis USA

Granulozyten-Makrophagen-

Kolonien-stimulierender Faktor, (*GM-CSF*)

R&D Systems Inc., Minneapolis USA

Tumor-Nekrose-Faktor- α , (*TNF- α*)

R&D Systems Inc., Minneapolis USA

Interferon- γ , (*IFN- γ*)

R&D Systems Inc., Minneapolis USA

Phytohämagglutinin, (*PHA-M*)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Seinheim

CMV-Antigen und CMV-Kontrolle

Behringwerke, Bad Homburg

Tetanus Toxoid, *Tetanol*

Behringwerke, Bad Homburg

Die Wachstumsfaktoren wurden in Aliquots unterschiedlicher Größe bei -20°C gelagert, wobei mehrmaliges Auftauen und wieder Einfrieren aufgrund des zu erwartenden Aktivitätsverlustes vermieden wurde. Entsprechende Aliquots wurden daher nach einmaligem Auftauen verworfen.

2.4 Material für die selektive Zellseparation auf Magnetpartikel-Konzentrator-Basis

Tab. 2.4-01

Nichtfluoreszierende Antikörper für die selektive Zellseparation auf Magnetpartikel-Konzentrator-Basis (MPCTM-1)

Antikörper	Bezeichnung	Subtyp	Markierung	Hersteller
CD25	Anti-IL-2R	Maus IgG ₁ , κ Klon: M-A251	nicht- fluoreszierend	Becton Dickinson, Heidelberg
CD69	Early Activation Antigene	Maus IgG ₁ ,κ Klon: FN50	nicht- fluoreszierend	Becton Dickinson, Heidelberg
HLA-DR	MHC Klasse II Antigen	-	nicht- fluoreszierend	DAKO A/S, Dänemark

Dynalbeads M-450,

Dynal AS., Oslo, Norwegen

Sheep anti Mouse IgG

Magnetpartikelkonzentrator, MPCTM-1

Dynal AS., Oslo, Norwegen

2.5 Material und Reagenzien für die Durchflußzytometrie

2.5.1 Puffer und Lösungen

Natrium-Azid-FACS-Puffer:

493,4 ml PBS

GIBCO BRL, Eggenstein

1,6 ml 0,1% BSA

Sigma, Deisenhofen

5 ml 0,1% Natrium-Azid

Universitätsapotheke Tübingen

zugegebenes Volumen: 4 ml/Röhrchen

Propidiumjodid (95%-98%),

Sigma, Deisenhofen

Stock: 2µl/ml,

zugegebenes Volumen: 10 µl/Röhrchen

2.5.2 Allgemein benötigte Kontroll-Antikörper

Vor jeder durchflußzytometrischen Messung wurden Kontroll-Analysen mit folgenden Antikörpern durchgeführt.

Tab. 2.5.2-02

Kontroll-Antikörper für die durchflußzytometrische Analyse

Antikörper	Bezeichnung	Subtyp	Markierung	Hersteller
<i>Simultest™ Control IgG₁/IgG_{2a}</i>	Klon X40 bzw. X39	monoklonale Mausantikörper der IgG ₁ - und IgG _{2a} - Subklassen	FITC, PE	Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Fastimmune™ IgG_{2a}</i>	-	monoklonale Mausantikörper der IgG _{2a} - Subklassen	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Mouse IgG_{2a}</i>	-	monoklonale Mausantikörper der IgG _{2a} - Subklassen Klon: G155-178	PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Mouse IgG₁</i>	-	monoklonale Mausantikörper der IgG ₁ - Subklassen Klon: MOPC-21	APC	Becton Dickinson, Heidelberg

2.5.3 Antikörper zur Expressionsanalyse von Zellpopulationen

Tab. 2.5.3-03

Antikörper zur Expressionsanalyse von Zellpopulationen

Antikörper	Bezeichnung	Subtyp	Markierung	Hersteller
GAM	<i>Goat-anti-Mouse</i> IgG und IgM	-	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD3	Leu TM 4	Maus IgG ₁ , κ Klon: UCHT1	FITC, PE, PerCP, APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8	Leu TM 2a Lyt3	Maus IgG ₁ , κ Klon: HIT8a	FITC, APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD25	IL-2R Tac Antigen	Maus IgG ₁ , κ Klon: M-A251	FITC , PE, APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD28	Leu TM 28 Ligand für CD80 und CD86 T44; Tp44	Maus: IgG ₁ , κ Klon: CD28.2	FITC , PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD56	Leu-19 NKH1 NCAM	Maus IgG ₁ , κ Klon: B159	FITC, PE, APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD69	AIM; EA-1 MLR3; gp34/28 VEA	Maus IgG ₁ ,κ Klon: FN50	APC, PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD71	humaner Transferrin- Rezeptor, T9	Maus IgG _{2a} ,κ Klon: M-A712	FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD90	Thy-1	Maus IgG ₁ ,κ Klon: 5E10	FITC, PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD95	Fas Antigen FAS Apo-1	Maus IgG ₁ ,κ Klon: DX2	FITC, PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD161	NKR-P1A	Maus IgG ₁ ,κ Klon: DX12	FITC, PE	Becton Dickinson, Heidelberg
HLA-DR	MHC Klasse II Antigen	Maus IgG _{2a} , κ Klon: G46-6 (L243)	PE, PercP	Becton Dickinson, Heidelberg

2.5.4 Antikörper und Reagenzien zur Analyse von Interferon- γ produzierenden Zellen

Tab. 2.5.4-04

Antikörper zur Analyse Interferon- γ sezernierender Zellen (Sekretions-Assay, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Antikörper	Bezeichnung	Subtyp	Markierung	Hersteller
IFN- γ Catch Reagent	-	-	nicht- fluoreszierend	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IFN- γ Detection Antibody	-	-	PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>Fastimmune</i> TM <i>IgG2a</i>	-	monoklonale Mausantikörper der IgG _{2a} - Subklassen	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD3	Leu TM 4	Maus IgG ₁ , κ Klon: UCHT1	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD56	Leu-19 NKH1 NCAM	Maus IgG ₁ , κ Klon: B159	APC	Becton Dickinson, Heidelberg

FACS Röhren für BD-FACS,
5 ml Polystyren-Rundbodenröhren

Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Software: *Cell Quest*

Becton Dickinson, Heidelberg

WinMDI (1993-2000), Version 2.8

Joseph Trotter

2.6 Material und Reagenzien für den Elispot-Assay

Multiscreen-HA Platten, *MAHA S4510*

Millipore SA., Molsheim, Frankreich

Antihumaner IFN- γ Antikörper,

Mabtech AB, Hamburg

Clone 1-D1K, Stock: 1 mg/ml

Antihumaner IFN- γ Antikörper, <i>biotiniliert</i>	Mabtech AB, Hamburg
<i>Clone 7B 6-1, Stock: 1 mg/ml</i>	
Avidin-Peroxidase-Komplex,	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim
Vectastain Elite Kit, <i>ABC-Kit</i>	Vector Laboratories, Burlingame
3-Amino-9-Ethylcarbazole-Substrat, <i>AEC-Substrat</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Aldrich Chemical Company, Milwaukee
0,1N Essigsäure-Lösung, C ₂ H ₄ O ₂ (Eisessig), <i>M = 60,05 g/mol, 1l = 1,05 kg,</i> <i>1,33 ml Essigsäure (100%),</i> <i>auf einen Liter auffüllen</i>	Merck, Darmstadt
0,1N Natrium-Acetat, C ₂ H ₃ NaO ₂ , (99% H ₂ O-frei), <i>M = 82,03 g/mol, 250g,</i> <i>16,4 g Na-Acetat,</i> <i>auf einen Liter auffüllen</i>	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Acetatpuffer <i>46,9 ml H₂O (Millipore oder Ampuwa)</i> <i>4,6 ml 0,1 N Essigsäurelösung</i> <i>11 ml 0,1 N Na-Acetat-Lösung</i>	
N,N-Dimethylformamid, C ₅ H ₇ NO, <i>M = 73,10 g/mol, 1l = 0,95 kg</i>	Merck, Darmstadt
H ₂ O: <i>Millipore</i> oder <i>Ampuwa</i>	Milliporeanlage Fresenius Kabi, Bad Homburg
H ₂ O ₂ (30%)	Merck, Darmstadt

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

96-Loch-Mikrotiterplatten, <i>Cellstar</i> , (<i>Rundboden</i>)	Greiner
96-Loch-Mikrotiterplatten, (Rundboden)	Costar, Cambridge, MA, USA
Tritium-Thymidin [6-H ³], 1 mCi/ml	Amersham Pharmacia, Biotech, UK
Szintillationslösung, 1205-440 <i>Betaplate Scint</i>	Wallac, Turku, Finnland
Harvester, <i>Tomtec</i>	Wallac, Turku, Finnland
Filterpapier, 1450-241 <i>Printed Filtermate A</i> , <i>Tomtec</i>	Wallac, Turku, Finnland
Mikrowelle	Siemens
Einschweißgerät, 1295-012 <i>Heat Sealer</i>	Wallac, Turku, Finnland
Folien, 1450-432 <i>Sample Bag</i>	Perkin Elmer, Life Science
Kassetten, 1450- <i>Filtermate Cassette</i>	Wallac, Turku, Finnland
Zählgerät, 1450 <i>MicroBeta Trilux</i> , <i>liquid scintillation and luminescence counter</i>	Wallac, Turku, Finnland
Software	MicroBeta Windows Work Station

2.8 Zellisolierung

2.8.1 Zur Verfügung stehende Blutproben

Sowohl für die Responder-, als auch für die bestrahlten Stimulatorzellen, die in die Lymphozytenmischkulturen (MLC) eingesetzt wurden, stand peripheres Vollblut von gesunden, nicht-HLA-identischen Erwachsenen zur Verfügung.

Voraussetzung für alle Untersuchungen war ferner ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen unter der Projektnummer 14/2001.

2.8.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Die peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wurden mit Hilfe der

Dichtezentrifugation aus heparinisiertem Vollblut (50 i.E./ml) von gesunden Probanden nach dem 1968 von Böyum (50) beschriebenen Verfahren in abgewandelter Form isoliert.

In ein steriles 50 ml Plastikröhrchen (Falcon, Becton Dickinson) wurden 15 ml Ficoll (BIOCILL SEPARATING SOLUTION, BIOCHROM KG Berlin), ein nichtionisches, synthetisches Polymer aus Saccharose mit einer Dichte von 1,077 vorgelegt. Heparinisieretes Vollblut wurde mit PBS DULBECO'S (GIBCO BRL, Eggenstein) im Verhältnis 1:2 verdünnt. 35 ml des verdünnten Blutes wurden mit einer Pipette - möglichst ohne Vermischung der Grenzschichten - auf die Ficoll-Phase aufgeschichtet. Zur Ausbildung eines Dichtegradienten wurde das Röhrchen bei 20°C, einer Umdrehungszahl von 400g und einem mäßigen Auslauf (Bremsstufe 2) 30 Minuten lang zentrifugiert (Rotixa 50 RS, Hettich). An der ursprünglichen Grenzschicht zwischen Ficoll und verdünntem Blut wurde, nach erfolgter Zentrifugation, ein weißer Ring sichtbar. Bei dieser so genannten Interphase handelte es sich um eine Schicht, bestehend aus angereicherten mononukleären Zellen, wie beispielsweise B- und T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und mononukleäre Vorläuferzellen. Während der Überstand oberhalb des Zellrings verworfen wurde, wurde der eigentliche Interphase-Ring großzügig abpipettiert und in ein steriles 50 ml Plastikröhrchen überführt, das anschließend mit PBS bis zur 50 ml Markierung aufgefüllt wurde. Die Zellen wurden abermals abzentrifugiert (10°C, 300g, 10 min, Auslauf mit starker Bremsstufe 9). Das Zellsediment wurde anschließend erneut in 50 ml PBS resuspendiert und ein weiteres Mal gewaschen.

2.9 Zellkultivierung

2.9.1 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Zählkammer nach Neubauer (Neubauer Improved Assistent Bright Line, Germany: Gesamtfläche: 0,025 mm², Tiefe 0,1 mm, 4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten). Die Zellsuspensionen wurden hierzu mit Trypanblau (trypan blue solution 0,4%, sigma chemical co) im

Verhältnis 1:1 verdünnt. Da einige Zellen nach dem Zelltod in der Regel ihre zuvor intakte Membranbarriere verlieren, können sie mit Hilfe des Farbstoffs Trypanblau angefärbt werden. Tote Zellen imponierten in diesen Fällen bei mikroskopischer Betrachtung als schwarz-blaue, unregelmäßig begrenzte Punkte. Mit Hilfe eines Mikroskops (Olympus CX40LF200, Japan) konnten folglich alle vitalen Zellen in je vier Großquadraten ausgezählt werden. Die Zählung umfasste dabei stets mindestens 200 Zellen.

Darüber hinaus wurde die Zellzahl auch mittels eines vollautomatischen Zählgeräts (Advia 120, Bayer, Leverkusen) bestimmt. Durch die Messung des, von jeder einzelnen Zelle ausgesandten Streulichts, sowie der Peroxidaseaktivität, war neben der Zellzahlbestimmung auch eine genauere Zelldifferenzierung möglich. Bei zuvor kultivierten Zellen wurde allerdings weitgehend auf eine vollautomatische Zellzahlbestimmung verzichtet, da einige Zellen durch das Kultivieren morphologische Veränderungen aufwiesen und von dem Messgerät nicht mehr erfasst werden konnten. Die Zellzählung erfolgte in diesen Fällen, wie bereits oben erwähnt, mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer.

2.9.2 Kultursysteme für Stimulatorzellen

2.9.2.1 Kultivierung der Stimulatorzellen in serumhaltigen Medien

Nach dem Isolierungsverfahren und der Zellzahlbestimmung lagen die PMNC zunächst resuspendiert in PBS vor. Um eine Zelldichte von 5×10^6 PMNC/ml in den jeweiligen Zellkulturen zu erreichen, wurde das Volumen des Kulturmediums (X-Vivo 15, BioWhittaker, Maryland, USA versetzt mit 10% hAB-Serum) an die verschiedenen Ausgangszellzahlen angepasst. Die Kultivierung erfolgte in Polystyrenkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Hera cell, Heraeus Instruments GmbH). Die Kulturdauer betrug 12 Stunden.

Während der 12 stündigen Inkubationsphase wurden zu einigen Stimulatorzellen Zytokine (Rekombinanter humaner Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interferon- γ , R&D SYSTEMS) hinzugegeben.

2.9.2.2 Kultivierung der dendritischen Zellen in serumfreien Medien

Insbesondere für die Generierung dendritischer Zellen wurde das gebrauchsfertige Komplettmedium X-Vivo 15 (BioWhittaker, Maryland, USA) eingesetzt. Die PMNC wurden dabei auf eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und auf einer sechs-Loch-Kulturplatte (Falcon, Becton Dickinson) „ausgesät“. Während einer zweistündigen Inkubationsphase unter Standardbedingungen (37°C und $5\% \text{CO}_2$) im Brutschrank heftete sich ein Teil (15-20%) der PMNC, in erster Linie bestehend aus Monozyten und Makrophagen, an das Plastikmaterial der Kulturplatte an. Alle übrigen, nicht adhärenen Zellen wurden in drei aufeinander folgenden Waschsritten abpipettiert und verworfen. Die zytokingesteuerte Differenzierung und Ausreifung aller adhärenen Zellen zu dendritischen Zellen erfolgte durch die Zugabe von GM-CSF und IL-4 an den Tagen 0 und 3 bzw. 4 der Kulturphase, sowie durch die Zugabe von GM-CSF und TNF- α am 6. oder 7. Tag nach dem Ansetzen der Kultur. Acht bis neun Tage nach Kulturbeginn konnten die dendritischen Zellen mit Hilfe eines „cell scrapers“ (Costa, Corning NY, USA) „geerntet“ werden.

2.9.3 Lymphozytenmischkultur MLC (mixed-lymphocyte-culture)

Mit Hilfe einer MLC können T-Lymphozyten durch allogene Stimulatorzellen aktiviert werden. Aus diesem Grund stellt die MLC das in vitro Modell für Erkenntnisse bezüglich der Alloimmunität des Menschen dar. Die Aktivierung der T-Zellen wird dabei durch Unterschiede der HLA-Antigene bewirkt, wobei die Reaktion positiv mit der Diversität der MHC-Moleküle korreliert. Allerdings kommt eine MLR (mixed lymphocyte reaction) auch zwischen HLA-identischen Zellen zustande. Diese Aktivität, basierend auf der Stimulierung durch so genannte Minor-Histokompatibilitätsantigene, ist jedoch in einer Standard-MLC kaum nachweisbar. Um den Aktivitätsnachweis lediglich auf einen Reaktionspartner (Responderzellen) zu beschränken („one-way“ MLC) wurden die Zellen des anderen Partners (Stimulatorzellen) bestrahlt, wodurch die Teilungs- und Reaktionsfähigkeit entsprechender Zellen unterbunden werden konnte.

Angesichts dieser Tatsachen basierten unsere Untersuchungen, hinsichtlich der

Generierung alloreaktiver T-Lymphozyten, zum größten Teil auf einer so genannten „one-way primary mixed-lymphocyte-culture“(MLC).

Die hierfür benötigten Responder- und Stimulatorzellen wurden, wie bereits beschrieben, mittels Ficollseparation gewonnen und in einer Zellkonzentration von 5×10^6 PMNC/ml in verschiedene Medien eingesetzt. Die Stimulatorzellen wurden dabei, abhängig vom jeweiligen experimentellen Ansatz, direkt, d. h. unmittelbar nach Ficollseparation, sowie nach Übernachtinkubation mit jeweils 50 ng/ml Zytokinen (Rekombinanter humaner Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interferon- γ , R&D SYSTEMS), aber auch nach Ausreifung zu dendritischen Zellen in die MLCs eingesetzt. Diese Stimulatorzellen waren dabei zuvor stets mit einer Zentraldosis von 3.000 cGy (30 Gy; 3000 Rad) in einem Bestrahlungsgerät (Gammacell 1000 EliteCEO120, MDS Nordion) bestrahlt worden, wobei ^{137}Cs mit einer Halbwertszeit von 30 Jahren als Strahlenquelle diente. Die Responder- und Stimulatorzellen wurden anschließend - um möglichst optimale Aktivierungsbedingungen zu schaffen, mit Ausnahme der dendritischen Zellen - im Verhältnis 1:1 in die Lymphozytenmischkulturen eingesetzt.

2.9.4 Der Medienvergleich

Im Rahmen eines Medienvergleichs wurde der Einfluss des Nährmediums auf die Aktivierbarkeit der Responderzellen unter standardisierten Stimulationsverfahren getestet. Aus diesem Grund wurde die Aktivität der Responderzellen an sich, nach erfolgter allogener Stimulation in einer MLC und nach maximaler mitogenen Stimulation durch PHA unter bestimmten Kulturbedingungen untersucht. Die jeweilige Stimulierbarkeit wurde dabei anhand von Zellproliferationsraten gemessen.

In diesem Zusammenhang wurden die Nährmedien, die auf Basis des Mediums RPMI 1640, X-Vivo 15 oder AIM-V erstellt worden waren im Hinblick auf eine optimale Kultivierung der PMNC miteinander verglichen. Daneben wurde das jeweilige Medium wahlweise mit 10% humanem AB-Serum bzw. mit 10% FCS versetzt.

2.10 Die Depletion alloreaktiver T-Zellen mit Hilfe des Magnet-Partikel-Konzentrator-Systems (Dynal MPC)

Am dritten Tag nach dem Ansetzen der Lymphozytenmischkultur erfolgte die Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten. Um anschließend Aussagen über die Ausgangssituation vor der Depletion machen zu können, wurden aus jedem Kulturansatz mindestens 5×10^6 Zellen entnommen und bis zum Zeitpunkt der weiteren Verwendung bei Standardbedingungen im Brutschrank aufbewahrt. Der überwiegende Anteil der Zellen wurde anschließend zentrifugiert (Rotixa 50 RS, Hettich; 300g, 10 min, 10°C), der Überstand dekantiert und die Zellen in einem möglichst geringen Volumen gründlich resuspendiert. Anschließend erfolgte die Antikörperzugabe (CD25: 50 µl; CD69: 50 µl; Becton Dickinson, Heidelberg und HLA-DR: 100 µl; DAKO A/S, Dänemark). Während die nichtfluoreszenzmarkierten Antikörper (Becton Dickinson und DAKO A/S), die gegen die Aktivierungsantigene CD25, CD69 und HLA-DR gerichtet waren bei 4°C und unter Lichtabschluss für 30 Minuten im Kühlschrank inkubierten, wurden die IgG-spezifischen Dynabeads M-450 vorgereinigt.

Bei den Dynabeads handelte es sich um gleichförmige, superparamagnetische Partikel mit einem Durchmesser von 4,5 µm. Der magnetische Kern, bestehend aus Fe_2O_3 und Fe_3O_4 ist von einer Hüllschicht aus Polymeren umgeben, die eine Adsorption an andere Moleküle erleichtern und die PMNC vor der Toxizität des Eisenkerns schützen soll.

Pro 20×10^6 zu depletierender Zellen wurden 250 µl Dynabeads eingesetzt. Die Magnetpartikellösung wurde resuspendiert und das entsprechende Volumen in einen 15 ml Falcon überführt und mit 7 ml PBS aufgefüllt. Unter dem Einfluß des Magnetfelds des Magnetpartikelkonzentrators wurden die ferromagnetischen Partikel zwei Minuten lang an der Röhrchenwand gesammelt und die klare Flüssigkeit verworfen. Im Anschluss an zwei weitere Waschschriffe wurden die magnetischen „beads“ in 1 ml Medium (X-Vivo 15, versetzt mit 10% AB-Serum) resuspendiert. Nach der Antikörperinkubation und zwei erneuten Waschschriffen, bei denen der Überstand jeweils verworfen wurde, wurden die vorbereiteten Magnetpartikel zu den einzelnen Kulturansätzen dazu gegeben und für 30 Minuten bei 4°C auf einem Drehschüttler (Snijders, Niederlande) inkubiert. Anschließend

wurden die Probenröhrchen mit Medium beschickt, so dass die Füllhöhe des Röhrchens im Magnetfeld beinahe bis zum oberen Rand des Magnetkonzentrators reichte (resultierendes Volumen 6 ml). Zur Trennung von antikörpermarkierten und nicht markierten Zellen wurde die Zellsuspension für etwa zwei Minuten im Magnetfeld belassen. Der Überstand, der in erster Linie die nicht markierten PMNC umfasste, wurde vorsichtig mit einer 5 ml Pipette entnommen und in ein weiteres 15 ml Probenröhrchen überführt, resuspendiert und erneut in das Magnetfeld eingebracht. Nach dreimaligem Wiederholen des Depletionsvorgangs wurde die Zellsuspension aus dem Magnetfeld entnommen und eine Zellzahlbestimmung der noch verbliebenen PMNC durchgeführt. Im Hinblick auf nachfolgende Analyseverfahren wurden die Zellen auf 5×10^6 PMNC/ml Medium (X-Vivo 15 mit 10% AB-Serum) eingestellt.

2.11 Zellanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)

2.11.1 Grundlagen

Die Durchflußzytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorter) ermöglicht eine Charakterisierung und Quantifizierung einzelner Zellen und Zellpopulationen anhand zellspezifischer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften.

Zur Analyse wird die jeweilige Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in eine Meßküvette eingebracht. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch eine, sie umgebende Trägersubstanz, stark beschleunigt, wodurch Einzelzellen aneinandergereiht sequentiell den Analysepunkt erreichen (hydrodynamische Fokussierung) an dem sie von einem Laser erfasst, analysiert und klassifiziert werden. In der analytischen Durchflußzytometrie werden hierfür zum einen ein luftgekühlter Argon-Ionenlaser, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert und zum anderen ein He-Ne Laser verwendet, der Licht einer Wellenlänge von 635 nm erzeugt.

2.11.2 Messung der Lichtstreuung

Streulicht entsteht immer dann, wenn eine Zelle von dem Laserstrahl getroffen wird und es zu einer Brechung, Beugung oder Streuung des ausgesandten Lichtstrahls kommt. In erster Linie spielen bei diesem Phänomen Faktoren, wie die Zellgröße, die Oberflächenbeschaffenheit und die intrazelluläre Strukturierung einzelner Zellen eine entscheidende Rolle. Die Messung der Lichtstreuung erfolgt dabei mit Hilfe von Photodetektoren, den so genannten Photomultipliern.

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

Forward Scatter (FSC):

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

Sideward Scatter (SSC):

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

2.11.3 Messung der Fluoreszenz

Darüber hinaus ist es möglich, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen genauer zu analysieren, was eine exakte Zuordnung der Einzelzelle zu bestimmten Zellpopulationen und Subpopulationen erlaubt. Dies lässt sich zum Großteil durch Antikörper, die gegen zellspezifische Oberflächenantigene gerichtet und mit einem Farbstoffmolekül gekoppelt sind, direkt erreichen. Bei einigen Analysen besteht allerdings auch die Möglichkeit, unmarkierte, zellgebundene Antikörper indirekt, mit Hilfe eines fluoreszenzgekoppelten Anti-Immunglobulin-Reagenz nachzuweisen. Da abhängig vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff lediglich Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs emittiert wird, ist es möglich, einzelne Zellen zu

detektieren, die maximal mit vier verschiedenen Fluoreszenzantikörpern markiert sein können.

Fluoreszenz 1 (FI-1):

Fluoreszinoisothiocyanat (FITC) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der, angeregt durch einen Argon-Ionen Laser im Wellenlängenbereich von 488 nm, Fluoreszenzen von maximal 520 nm emittieren kann. Unter Verwendung eines Filters, der Farbstoffe mit einer Emissionswellenlänge von 530 ± 15 nm erfasst, kann dieser Farbstoff 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 575 ± 13 nm erfasst, erkannt werden.

Fluoreszenz 3 (FI-3):

Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Propidiumjodid (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 von 650 nm und einem Emissionsmaximum im Bereich von 660 nm, wird durch einen Filter, der Licht im Wellenlängenbereich von 660 ± 10 nm absorbiert, erfasst.

2.11.4 Durchführung

Die zu analysierenden Zellsuspensionen, bestehend aus überwiegend mononukleären Zellen nach Kultivierung in verschiedenen Kultursystemen, wurden in ein Polystyren-Rundboden-Plastikröhrchen überführt und mit 2 ml FACS-Puffer (PBS mit 0,1% BSA und 0,1% Natriumazid) gewaschen (Hettich, Rotixa 50 RS: 4°C, 400g, 5 min). Nach anschließendem Dekantieren des Überstands und

Resuspendieren der Zellen erfolgte die Antikörperzugabe (je 10-20 µl des entsprechenden Antikörpers, gemäß der Instruktionen des Herstellers). Nachdem die Zellen erneut gründlich resuspendiert worden waren, erfolgte eine 30 Minuten dauernde Inkubationsphase bei 4°C unter Lichtabschluss im Kühlschrank. Um freie fluoreszenzmarkierte Antikörper zu entfernen, wurden die einzelnen Zellsuspensionen ein weiteres Mal mit FACS-Puffer gewaschen, der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in vier Tropfen FACS-Puffer erneut resuspendiert. Die Einstellung des Bezugspunkts im FACSCalibur (Fluorescence Activated Cell Analyser, Becton Dickinson) wurde immer mit der entsprechenden Negativ- und Positivkontrolle durchgeführt, da es sich bei den Fluoreszenzsignalen stets um Relativ- und nicht um Absolutwerte handelte.

2.11.5 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). Alle analysierten Zellen wurden daher zunächst entsprechend ihrer Größe und Granularität graphisch dargestellt. Anhand des dabei entstandenen zweidimensionalen Diagramms konnte nun die Lymphozytenpopulation, als Zielgruppe weiterer Analysen, ausgewählt werden. Dabei wurde ein „Gate“ auf die vitalen Lymphozyten gesetzt. Nach 72 stündiger Zellkultivierung hatten sich in der Regel die bestrahlten Stimulatorzellen, auf Grund von Apoptosevorgängen, aus diesem „Gate“ herausbewegt und konnten folglich durch FACS-Analysen von der Responderzellpopulation separiert werden.

Bei der Verwendung von zwei oder mehreren Antikörpern mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen erschienen die Daten ebenfalls als zweidimensionales Streudiagramm, in dem die Fluoreszenz des einen Antikörpers gegen die des anderen Antikörpers aufgetragen wurde. Zur statistischen Datenerfassung wurde die Darstellung in vier Quadranten unterteilt und mit Hilfe einer Quadrantenstatistik

ausgewertet, die den prozentualen Anteil der jeweiligen Fluoreszenzsignale in den einzelnen Quadranten zum Ausdruck brachte.

2.12 Der Interferon- γ Nachweis als Zeichen der T-Zellaktivierung

2.12.1 Sekretions-Assay (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)

Manz et al. entwickelten eine Methode, die eine Analyse und Separation aktivierter T-Zellen hinsichtlich ihrer sekretorischen Aktivität zulässt (299). Hierbei wird, durch die Oberflächenmarkierung mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, eine Affinitätsmatrix für sezernierte Zytokine auf der Zelloberfläche geschaffen. Anschließend ist es den markierten Zellen unter genau definierten Bedingungen erlaubt, Zytokine zu sezernieren, die nachfolgend mittels spezifischer fluoreszenzfarbstoffmarkierter Antikörper sichtbar gemacht werden können.

Interferon- γ gehört zu den Zytokinen, die in einer MLC in erster Linie von aktivierten T-Lymphozyten, d. h. von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen (Th1) sezerniert werden. Mit Hilfe des Sekretions-Assays ist es möglich, vitale, Interferon- γ produzierende PMNC durch Fluoreszenzmarkierung verschiedenster Oberflächenantigene näher zu charakterisieren und zu quantifizieren.

Am Tag der Depletion wurden in diesem Zusammenhang etwa $2 - 5 \times 10^6$ Zellen der jeweiligen MLC, sowohl im depletierten, als auch im nicht depletierten Zustand, 20 Stunden lang durch die gleichen bestrahlten PMNC restimuliert, die bereits bei der Stimulation der jeweiligen primären MLC Verwendung gefunden hatten.

Nach 20 Stunden wurde die erste Inkubationsphase dieser sekundären MLC vorläufig abgebrochen, indem das Kulturmedium, nach erfolgter Zentrifugation (Rotixa RS, bei 4°C, 300g, Bremse 9, 10 min), steril dekantiert und das Zellpellet in 80 μ l kaltem Medium (4°C) resuspendiert wurde. Nun erfolgte die Zugabe und die Inkubation von 20 μ l eines Primärantikörpers (IFN- γ Catch Reagent, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) für einen Zeitraum von 20 Minuten bei 4°C im Kühlschrank. Dieser primäre Antikörper richtete sich mit seinem Fc-Fragment gegen die CD45-Moleküle, Oberflächenantigene, die auf allen lymphatischen Zellen anzutreffen sind. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in einem Volumen

von 15 ml Medium, das zuvor im Wasserbad (Memmert, Schwabach) auf eine Temperatur von 37°C erwärmt worden war, für zwei Stunden inkubiert. Während dieser zweiten Inkubationsperiode, in der entsprechende Zellen (zytotoxische-T-Zellen und TH1-T-Zellen, NK-Zelle, Monozyten und Makrophagen) Interferon- γ produzieren konnten, das von den Fab-Fragmenten der Primärantikörper auf der jeweiligen Zelloberfläche abgefangen und gebunden wurde, wurden die Kulturflaschen im konstanten zeitlichen Abstand über Kopf gewendet, um die Zellen gleichmäßig im Kulturmedium zu verteilen und so eine unspezifische Bindung von Interferon- γ durch benachbarte Zellen zu vermeiden. Im Anschluss an eine erneute Zentrifugation (4°C, 300g und Bremse 9, 10 min) wurden die Zellpellets in einem ml eines 4°C kalten Puffers (PBS mit EDTA und HSA) resuspendiert und die resultierende Zellsuspensionen auf entsprechende FACS-Röhrchen verteilt, die ein weiteres Mal zentrifugiert wurden. Nach der Zugabe von 10 μ l eines PE-gefärbten sekundären Antikörpers, der gegen Interferon- γ gerichtet war, wurden die Zellen durch weitere, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper, die wiederum gegen spezifische Oberflächenantigene einzelner Lymphozytensubpopulationen gerichtet waren, angefärbt. Die anschließende Messung erfolgte, wie bereits beschrieben, mit dem FACS-Gerät.

2.12.2 Elispot-Assay

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

Am Vortag der Depletion wurden die Millipore Nitrocellulose HA-Platten (MAHA S4510, Millipore) mit 50 μ l/well des primären Antikörpers (mAb 1-D1K-monoklonaler Antikörper gegen IFN- γ ; Stock: 1mg/ml; Mabtech), der zuvor mit PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt worden war, beschichtet. In der anschließenden zwölfstündigen Inkubationsphase bei 4°C im Kühlschrank banden die Antikörper mit ihren Fc-Fragmenten an die Nitrocellulosemembran der Kulturplatte. Am Tag

der Depletion wurden die antikörperbeschichteten HA-Platten zunächst viermal mit 200 µl/well PBS gewaschen, wobei das PBS nach jeweils fünf Minuten steril dekantiert wurde. Nachdem das Blockiermedium (X-Vivo 15 mit 10% AB-Serum) mit der Intention, unspezifische Interferon-Bindungen zu vermeiden, zugesetzt worden war, erfolgte eine einstündige Inkubationsperiode bei 37°C im Brutschrank. Das Blockiermedium wurde steril dekantiert und jedes Loch wurde mit 50 µl Medium, das depletierte oder nicht depletierte Responderzellen (Einstellung: 2,5 oder 5×10^6 PMNC/ml, je nach Anzahl der verfügbaren Zellen) aus den verschiedenen MLC-Ansätzen enthielt, für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank auf der Kulturplatte kultiviert. In dieser Phase erfolgte die Präparation der Stimulatorzellen, die zunächst eingestellt ($2,5$ oder 5×10^6 PMNC/ml, entsprechend der jeweiligen Responderzellzahl) und anschließend mit etwa 3.000 cGy bestrahlt wurden. Im Anschluss wurden diese Stimulatorzellen und/oder weitere, stimulatorisch wirkenden Reagenzien zu den Responderzellen auf die Kulturplatte pipettiert, so dass sich im Einzelnen folgendes Belegungsmuster ergab:

Tab. 2.12.2 –05

Belegungsplan für den Elispot-Assay

A/B*-MLC		A/B* _{zytokinstimuliert} -MLC		A/B* _{dendritische Zellen} -MLC	
nicht depletierte PMNC	depletierte PMNC	nicht depletierte PMNC	depletierte PMNC	nicht depletierte PMNC	depletierte PMNC
A/B*	A/B*	A/B*	A/B*	A/B*	A/B*
A/B* +A*	A/B* +A*	A/B* +A*	A/B* +A*	A/B* +A*	A/B* +A*
A/B* +B*	A/B* +B*	A/B* +B*	A/B* +B*	A/B* +B*	A/B* +B*
A/B* +C*	A/B* +C*	A/B* +C*	A/B* +C*	A/B* +C*	A/B* +C*
A/B* +A* +Tetanus Toxoid	A/B* +A* +Tetanus Toxoid	A/B* +A* +Tetanus Toxoid	A/B* +A* +Tetanus Toxoid	A/B* +A* +Tetanus Toxoid	A/B* +A* +Tetanus Toxoid
A/B* +A* +CMV- Antigen	A/B* +A* +CMV- Antigen	A/B* +A* +CMV- Antigen	A/B* +A* +CMV- Antigen	A/B* +A* +CMV- Antigen	A/B* +A* +CMV- Antigen
A/B* +A* +CMV- Antigen- Kontrolle	A/B* +A* +CMV- Antigen- Kontrolle	A/B* +A* +CMV- Antigen- Kontrolle	A/B* +A* +CMV- Antigen- Kontrolle	A/B* +A* +CMV- Antigen- Kontrolle	A/B* +A* +CMV- Antigen- Kontrolle
A/B* +A* +PHA	A/B* +A* +PHA	A/B* +A* +PHA	A/B* +A* +PHA	A/B* +A* +PHA	A/B* +A* +PHA

Legende (ein Kästchen entspricht einem well):

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

Tetanus Toxoid: formalinisiertes Toxin des Bakteriums Clostridium tetani

CMV-Antigen: Zytomegalie-Virus-Antigen

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

Die Platten wurden für mindestens 20 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten vor der Zugabe von 100 µl/well eines 7-B6-1-Biotin-Antikörpers (Mabtech), der mit PBS/0,5% BSA verdünnt worden war (2 µl Antikörper/ml PBS/0,5% BSA), sechs mal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank erfolgten erneut sechs Waschschriffe mit PBS/0,05% Tween 20 und die Zugabe von 100 µl/well des Avidin-Peroxidase-Complexes (Vectastain Elite Kit, Vector) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Während der Inkubationsperiode wurde die AEC-Substrat-Lösung hergestellt. Dazu wurde eine Tablette AEC (Sigma) in 2,5 ml Dimethylformamid gelöst und anschließend 47,5 ml Acetatpuffer hinzugefügt, der zuvor aus 46,9 ml H₂O (Ampuwa), 4,6 ml 0,1 N Essigsäurelösung und 11 ml 0,1 N Na-Acetat-Lösung zusammengestellt worden war. Zu den resultierenden 50 ml wurden im Anschluss 25 µl 30% H₂O₂ ergänzend hinzu pipettiert. Die gesamte Lösung wurde, nachdem sie gemischt worden war, mit Hilfe eines 0,45 µm-Spritzen-Filters filtriert. Anschließend wurde die AEC-Substrat-Lösung mit 100 µl/well auf die Mikrotiterplatte pipettiert und die sofort einsetzende Farbreaktion nach vier Minuten durch die Zugabe von destilliertem Wasser abgestoppt.

2.13 Der [6-H³]-Thymidin-Proliferations-Assay

Eine Analyse der Einbauraten von Thymidin, einem Nukleosidbaustein der DNA, in das zelleigene Genom erlaubt es, eine Aussage über die Proliferationsfähigkeit und damit über die Aktivität von Zellen zu machen. Die Verwendung von radioaktiv markiertem [6-H³]-Thymidin und die davon ausgehende β-Strahlung kann mit Hilfe eines Zählgeräts quantifiziert werden.

Dieser Ansatz vermittelt allerdings nur eine Idee von der Gesamtmenge, an sich in Teilung befindlicher Zellen und lässt keine Information über individuelle Zellen zu. Ferner wird [6-H³]-Thymidin nur von den Zellen eingebaut, die sich in dem Moment, in dem das Kultursystem „gepulst“ wird in Teilung befinden.

Am Tag fünf nach Ansetzen der sekundären MLC wurden in jedes Loch der 96 well Rundbodenplatten 25 µl [6-H³]-Thymidin ([6-H³] Thymidin, Amersham Pharmacia

Biotech, UK), das zuvor mit Medium im Verhältnis von 1:10 verdünnt worden war, gegeben und die Kulturplatten im Anschluss für weitere 15 Stunden im Brutschrank bebrütet. Nach dieser Kulturphase, in der die proliferierende Zellen das radioaktivmarkierte Thymidin in die zelleigene DNA einbauen konnten, wurden die Kulturplatten bei -20°C eingefroren. Durch die Kälteeinwirkung kam es zur Zerstörung der Zellmembranen und somit zur Freilegung der DNA. Die Zellfragmente der einzelnen Kulturansätze wurden anschließend mittels eines Harvesters (Tomtec Harvester, Wallac, Turku Finnland) durch ein 90×120 mm großes Filterpapier (1450-421 Printed Filtermat A, Tomtec) gespült, in dem vornehmlich die DNA einzelner Zellen durch Adhärenz an den GF/C Glasfasern zurückgehalten wurde. Die Filterpapiere wurden nun in einer Mikrowelle (Siemens) getrocknet und nach Zugabe von Scintillationsflüssigkeit (1205-440 Betaplate Scint Scintillation Cocktail, Wallac) in Folien (1450-432 Sample Bag, Perkin Elmer, Life Science) eingeschweißt (1295-012 Heat Sealer, Wallac). Die 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. Mit Hilfe von drei Detektoren, die sich automatisch über die Filterplatten bewegten, konnte die Radioaktivität, die durch die Scintillationsflüssigkeit in Lichtsignale umgewandelt wurde, detektiert werden. Mit der entsprechenden Software (MicroBeta Windows WorkStation) wurden die Messresultate als Zahlenprotokolle auf dem PC gespeichert.

2.14 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm InStat: Copyright 1992-1998 GraphPad Software Inc. (www.graphpad.com) durchgeführt.

Alle Ergebnisse (Messwerte bzw. Indizes) sind als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. Der Mittelwert ist definiert als der Durchschnitt aller ermittelten Werte einer Messreihe. Die Standardabweichung (SD) quantifiziert in diesem Zusammenhang die Verschiedenheit oder die Streuung einzelner Messwerte einer Messreihe. Die Standardabweichung wurde dabei mit Hilfe des t-Tests für ungepaarte Proben errechnet, was voraussetzte, dass die Einzeldaten einem Probenkollektiv entstammten, das der Gaußschen Verteilungskurve folgte. Als Grundlage hierfür wurde ein Probenkollektiv, bestehend aus minimal drei Einzelwerten, die aus unabhängigen Versuchen ermittelt worden waren, gewählt. Bewertung des Unterschiedes zwischen einzelnen Werten erfolgte durch die Berechnung des einseitigen p-Werts (one-way ANOVA). Im Hinblick auf die Signifikanzkriterien galten dabei Werte von < 0.001 (extremely significant ***), von 0.001 bis 0.01 (very significant **) und von 0.01 bis 0.05 (significant *) als signifikant. Werte > 0.05 hingegen wurden als nicht signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultivierung

3.1.1 Medienvergleich

Um den Einfluss des Kulturmediums oder seiner Zusätze auf die allogene Reaktivität und die maximale Stimulierbarkeit isolierter PMNC untersuchen zu können, wurden entsprechende Zellkulturen im Rahmen eines Medienvergleichs angesetzt. Dabei fanden vor allem die Medien X-VIVO 15, RPMI 1640 und AIM-V, ein serumfreies Medium (SFM) Verwendung, die zum Teil mit 10% humanem AB-Serum oder 10% fötalem Kälberserum (FCS) versetzt worden waren. Die, in einer Dichte von 50.000 Responder- und/oder Stimulator-Zellen/well, in die einzelnen Zellkultursysteme eingesetzten PMNC resultierten aus dem nach Böyum beschriebenen Zellseparationsverfahren (siehe auch Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.8.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen). Alle zu vergleichenden Zellkulturansätze (siehe hierzu Tab. 3.1.1-06) wurden für einen Zeitraum von fünf Tagen im Brutschrank unter standardisierten Bedingungen in 96-Lochmikrotiterplatten (Rundboden) kultiviert.

Tab. 3.1.1-06

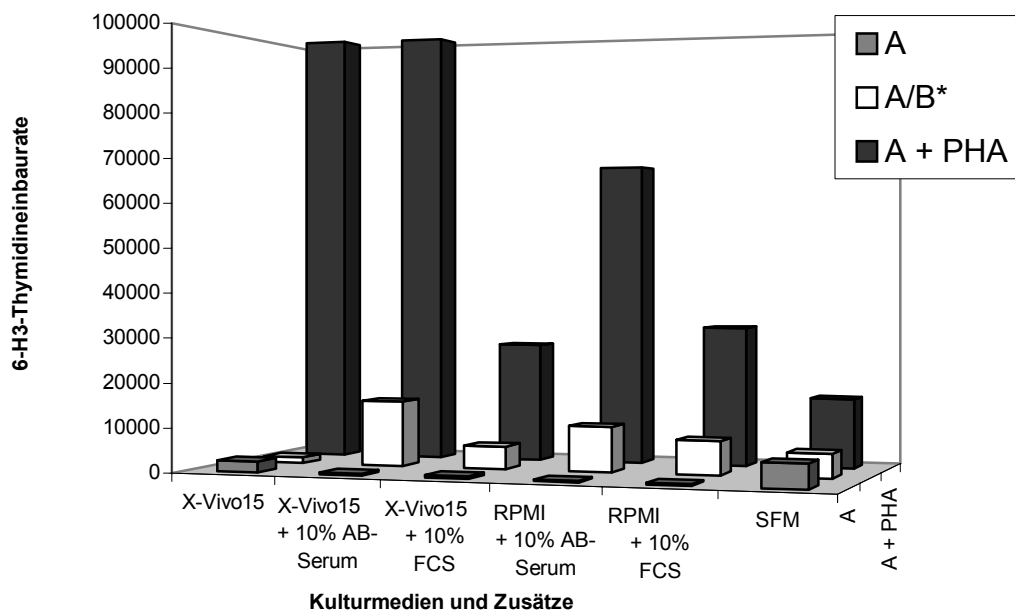
Schematische Übersicht über die Kulturbedingungen

Alleinige Zellkultivierung der Responderzellen (A) als initialer Bezugspunkt der Reaktionsfähigkeit, sowie Ko-Kultivierung der Responderzellen mit bestrahlten allogenen Stimulatorzellen (B) in einer Mikro-MLC und Kultivierung der Responderzellen nach Zugabe von Phythämagglutinin (PHA) als Reagenz für eine maximale T-Zellaktivierung. Kultivierung in X-Vivo 15-, RPMI 1640- und SFM-Komplettmedium, unter Zusatz von humanem AB-Serum oder fötalem-Kälberserum (FCS)*

Zellkultur-ansätze Medien	X-Vivo 15			RPMI 1640		SFM
	ohne Zusatz	+ 10% AB-Serum	+ 10% FCS	+ 10% AB-Serum	+ 10% FCS	ohne Zusatz
Initiale Reaktionsfähigkeit	A	A	A	A	A	A
Allogene Reaktionsfähigkeit	A/B*	A/B*	A/B*	A/B*	A/B*	A/B*
Maximale Reaktionsfähigkeit	A+PHA	A+PHA	A+PHA	A+PHA	A+PHA	A+PHA

Die Reaktionsfähigkeit der Responderzellen wurde anschließend in drei unabhängigen Experimenten mit Hilfe der Einbaurrate von tritiummarkiertem [6-H³]-Thymidin ermittelt. Die Höhe der [6-H³]-Thymidin-Einbaurrate wurde über die Anzahl der radioaktiven Ereignisse definiert, die von dem entsprechenden Messgerät (siehe Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.13 Der [6-H³]-Thymidin-Proliferations-Assay) registrierten wurden (Abb. 3.1.1-01).

Abb. 3.1.1-01

*Säulendiagramm**Stimulierbarkeit der PMNC unter verschiedenen Kulturbedingungen. Vergleichende Darstellung der [6-H³]-Thymidineinbaurrate als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten*

Tab. 3.1.1-07

Mittelwert und Standardabweichung der in Abb. 3.1.1-01 dargestellten $[6\text{-H}^3]$ -Thymidineinbauraten bezogen auf die allogene und die maximale Stimulierbarkeit. Bewertung des Unterschiedes zwischen den Einbauraten

Medien	Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert
allogene Stimulierbarkeit			
X-Vivo 15	1342,56	± 321,28	0,0083 * *
X-Vivo 15 + 10% AB-Serum	14817,89	± 5909,60	0,0135 *
X-Vivo 15 + 10% FCS	5065,89	± 1691,80	0,0108 *
RPMI 1640 + 10% AB-Serum	10096,44	± 4984,80	0,0275 *
RPMI 1640 + 10% FCS	3852,56	± 3221,90	0,1334
SFM	5433,33	± 2676,80	0,9682
maximale Stimulierbarkeit			
X-Vivo 15	358856,67	± 23720,00	< 0,0001 * * *
X-Vivo 15 + 10% AB-Serum	227100,11	± 36530,00	0,0006 * * *
X-Vivo 15 + 10 % FCS	27158,22	± 7260,80	0,0032 * *
RPMI 1640 + 10% AB-Serum	68815,89	± 41661,00	0,0465 *
RPMI 1640 + 10% FCS	32415,22	± 6141,00	0,0008 * * *
SFM	15776,56	± 1426,60	0,0004 * * *

Unter den verwendeten Medien entsprach das Medium X-Vivo15 mit dem Zusatz von humanem AB-Serum in einer Konzentration von 10% am ehesten den Kriterien, die für die Generierung alloreaktiver Zellen ausschlaggebend waren. So wurde, mit der Anzahl von durchschnittlich 14.817,89 registrierten radioaktiven Ereignissen, unter eben diesen Bedingungen die stärkste allogene Immunantwort erzielt, die trotz einer Standardabweichung von ± 5.909,60 signifikant über der Ausgangssituation ohne zusätzlichen Stimuli lag ($p = 0,0135$). Daneben konnten in

diesem Kultursystem auch unter der mitogenen Stimulation mittels PHA durchschnittlich 227.100,11 radioaktive Ereignisse registriert werden, was annähernd der größten maximale Reaktionsfähigkeit entsprach, die in dieser Versuchsreihe erzielt wurde. So konnte, unter gleichen Stimulationsbedingungen, lediglich bei der alleinigen Verwendung von X-Vivo 15 als Nährmedium mit 358.856,67 radioaktive Ereignisse eine geringfügig höhere proliferative Aktivität gemessen werden.

3.1.2 Das Kultursystem der MLC als Methode der allogenen Stimulation von T- Lymphozyten

Um die isolierten peripheren mononukleären Zellen (PMNC) auf ihre allgemeine Reaktionsfähigkeit in Bezug auf einen allogenen Stimulus zu testen, wurden Lymphozytenmischkulturen (MLC) angesetzt. Das hierfür genutzte methodische Vorgehen wurde bereits im Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.9.3 Lymphozytenmischkultur (mixed-lymphocyte-culture) näher erläutert.

3.1.2.1 Vergleichende Gegenüberstellung allogener Stimuli in der MLC

Unter der Vorgabe, dass die Fremdantigenerkennung durch die Responderzellen in der MLC möglichst spezifisch erfolgen und es hinsichtlich des Fremdantigens lediglich zu einem Ansprechen alloreaktiver T-Lymphozyten kommen sollte, wurden drei unterschiedliche Stimulatorzellpopulationen in Bezug auf ihre Potenz zur allogenen Stimulation getestet. Alle drei Stimulatorzellarten sollten dabei die Fähigkeit besitzen, körpereigene Antigene auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren, die von den Responderzellen als „fremd“ erkannt werden und anschließend zur Aktivierung alloreaktiver T-Zellen führen sollten. Hinsichtlich dieser Vorstellungen fanden die im Folgenden erwähnten Zellarten als allogene Stimulatoren der jeweiligen Lymphozytenmischkultur Verwendung (siehe hierzu auch Teil 2. Material/Methoden, 2.9.2 Kultursysteme für Stimulatorzellen):

- (1) „unbehandelte“ periphere mononukleäre Zellen (PMNC),
- (2) PMNC nach Übernachtinkubation mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ ,
- (3) sowie dendritische Zellen monozytären Ursprungs.

Die unter (1) genannten PMNC wurden, nach dem sie durch das von Böyum beschriebene Zellseparationsverfahren (50) gewonnen worden waren, bestrahlt und im Verhältnis 1:1 (Responder- /Stimulatorzellen) in die MLC eingesetzt. Da durch das Bestrahlungsverfahren eine spätere Antigenprozessierung und die damit verbundene anschließende Antigenexpression ausgeschlossen werden konnte, repräsentierten diese Zellen den in vivo anzutreffenden Ausgangszustand der Antigenexpression.

Durch die Zytokininkubation der PMNC (2) versprach man sich eine vermehrte Antigenexpression auf der Zelloberfläche, die zu einer Verstärkung des allogenen Stimulus führen sollte. Auch hier wurden die Responder- und Stimulatorzellen im Verhältnis 1:1 in die MLC eingesetzt.

Eine geringe Anzahl relativ aufwendig gewonnener dendritischer Zellen (3) wurde ebenfalls bestrahlt und in die MLC eingesetzt (Verhältnis Responder-/Stimulatorzellen 3:1). Durch die, in einem mehrwöchigen Kulturverfahren ausgebildeten Zellfortsätze dieser dendritischen Zellen konnten mehrere Lymphozyten gleichzeitig mit einer dendritischen Zelle in Kontakt treten, was so auch durch mikroskopische Analysen bestätigt wurde.

3.1.2.1.1 Die Antigenexpression

Nach drei Tagen wurden aus allen drei MLC-Ansätzen Proben entnommen und die vitalen T-Lymphozyten hinsichtlich ihres Antigenexpressionsmusters mit Hilfe des durchflußzytometrischen Verfahrens untersucht. Die hierbei relevanten Oberflächenmarker sind in Tab. 3.1.2.1.1-08 wiedergegeben.

Tab. 3.1.2.1.1-08

Oberflächenmarker auf allogenen aktivierten T-Lymphozyten

CD-Antigen	Zellen, die das Antigen exprimieren	Funktionen	Verwandschaftsbeziehung
CD25	aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten	IL-2-Rezeptor- α -Kette, assoziiert mit CD122 und der IL-2R- γ -Kette	α -Kette: CCP γ -Kette: Zytokinrezeptor-superfamilie
CD69	aktivierte T- und B-Zellen, aktivierte Makrophagen und NK-Zellen	unbekannt, frühes Aktivierungsantigen	C-Typ-Lektin
HLA-DR	MHC Klasse II Molekül	Oberflächenantigen auf hämatopoetischen Zellen	-
CD71	alle proliferierenden Zellen, aktivierte T-Zellen, Makrophagen	Ligand für CD27, möglicherweise Ko-stimulierung von T- und B-Zellen	TNF-artig
CD95	eine Vielzahl von Zelllinien, in vivo Verteilung unbekannt	bindet TNF-ähnlichen FAS-Liganden, induziert Apoptose	NGF-Rezeptorsuperfamilie
CD161	NK- und T-Zellen	unbekannt	-

Die Oberflächenantigene CD25, CD69 und HLA-DR wurden zunächst durch nicht fluoreszierende Mouse-anti-Human-Antikörper markiert und anschließend indirekt, über einen sekundären Goat-anti-Mouse-Antikörper (GAM), nachgewiesen (nähere Erläuterungen hierzu im Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.11 Zellanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS)). Unter den GAM-positiven Zellen exprimierten etwa 45% das CD25-Molekül auf ihrer Oberfläche. Ein etwas geringerer Prozentsatz entfiel auf die Expression des CD69-Moleküls. Über 60% der Zellen waren HLA-DR-positiv. Einige Zellen exprimierten mehrere Oberflächenantigene gleichzeitig (siehe hierzu auch Ko-Expression der Oberflächenantigene CD25, CD69 und HLA-DR im Abschnitt 3. Ergebnisse, 3.2 Selektive immunomagnetische Depletion von alloreaktiven T-Lymphozyten). In der Tabelle 3.1.2.1.1-09 sind die dazugehörigen Daten aus 18 unabhängigen Versuchen zusammengetragen.

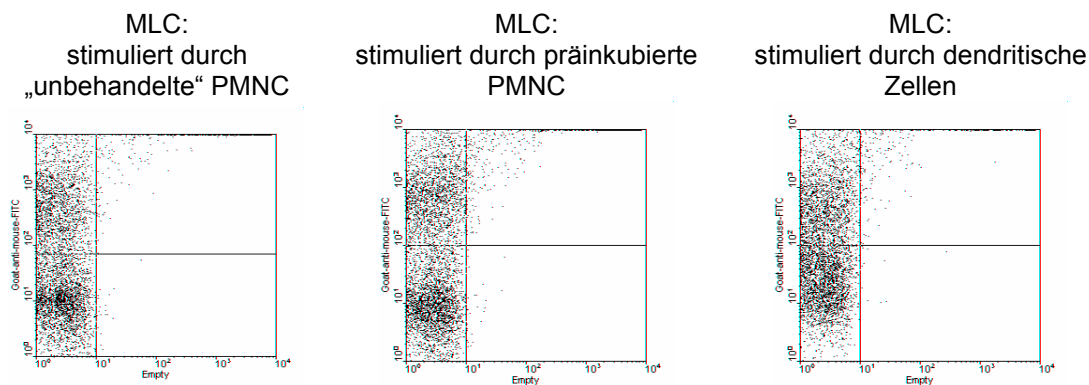
Tab. 3.1.2.1.1-09

Schematische Übersicht über die GAM-positiven Zellen aus 18 unabhängigen Versuchen nach dreitägiger Kultivierung in unterschiedlichen Kultursystemen

	MLC: stimuliert durch „unbehandelte“ PMNC	MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC	MLC: stimuliert durch dendritische Zellen
Anzahl der GAM-positiven Zellen in %	36,79	23,68	31,51
Anzahl der GAM-positiven Zellen in %	14,78	51,54	41,07
Anzahl der GAM-positiven Zellen in %	19,52	34,83	28,11
Anzahl der GAM-positiven Zellen in %	47,89	23,43	48,13
Anzahl der GAM-positiven Zellen in %	35,34	39,81	42,67
Anzahl der GAM-positiven Zellen in %	18,22	-	32,94
Anzahl der GAM-positiven Zellen in %	31,13	-	-
Mittelwert	29,10	34,66	37,41
Standardabweichung	± 12,04	± 11,81	± 7,71
Anzahl der Versuche	7	5	6

Abb. 3.1.2.1.1-02

Darstellung der GAM-positiven Responderzellen einer Versuchsreihe unter verschiedenen Kulturbedingungen



Aus der Tabelle 3.1.2.1.1-09 und der Abbildung 3.1.2.1.1-02 ist zu ersehen, dass innerhalb einer Versuchsreihe, bestehend aus drei verschiedenen MLC-Ansätzen, ein deutlicher Unterschied, hinsichtlich der Expression von Aktivierungsmarkern, zwischen den einzelnen Stimulationsverfahren aufgezeigt werden konnte. So wurden in der MLC, die mit Hilfe von „unbehandelten“ PMNC stimuliert worden war im Durchschnitt 29,10% GAM-positiv T-Lymphozyten nachgewiesen, während hingegen die Stimulation durch präinkubierte PMNC dazu führte, dass durchschnittlich 34,66% der T-Zellen die Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR auf ihrer Oberfläche exprimierten. Dendritische Zellen unterschieden sich von den anderen Kultursystemen nicht nur durch einen deutlich höheren Prozentsatz an GAM-positiven Zellen, der durchschnittlich bei 37,41% lag, sondern auch durch die „Höhe“ der Antigenexpression (siehe auch Abb. 3.1.2.1.1-02).

3.1.2.1.2 Zytokinsekretion

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

Der IFN-Nachweis durch den so genannten ELISPOT (enzyme-linked immunospot) -Assay kann u. a. dazu herangezogen werden, um die Frequenz alloreaktiver T-Lymphozyten zu ermitteln. Die Sensitivität dieser Methode, die sich lediglich auf das Registrieren von sezernierten Zytokinen beschränkt, wurde in diesem Zusammenhang mit 1/4.000 bis 1/20.000 angegeben (303). Die sekretorische Aktivität einzelner Zellen bzw. einzelner Zellklone wird dabei ausschließlich zu dem Zeitpunkt erfasst, an dem der Zytokinnachweis durchgeführt wird.

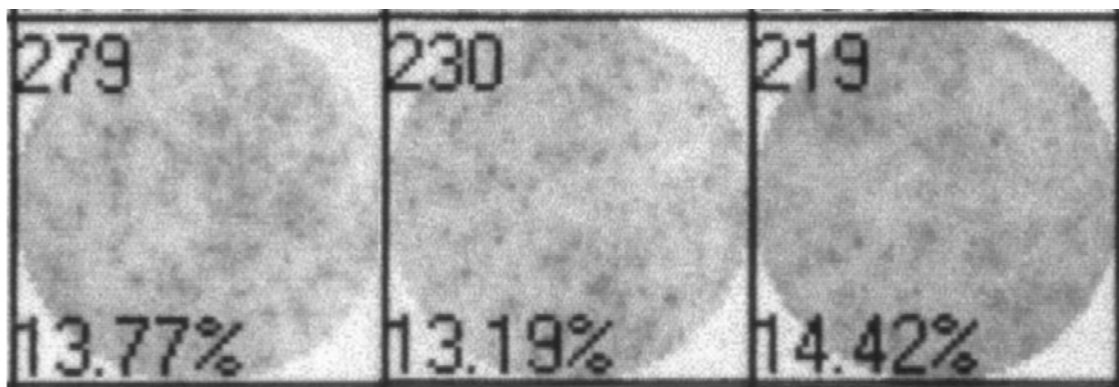
Der, im Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.12.2 Elispot-Assay beschriebene Elispot-Assay erlaubt eine quantitative Aussage bezüglich des sezernierten Interferon- γ . In diesem Zusammenhang wurden insbesondere die, im Kapitel 3.1.2.1 Vergleichende Gegenüberstellung allogener Stimuli in der MLC beschriebenen primären MLC-Ansätze nach dreitägiger Kultivierung und

anschließender zwanzigstündiger Restimulation näher untersucht. Überall dort, wo während der Phase der Restimulation Interferon- γ produziert worden war, erschien ein Punkt auf der Nitrozellulosemembran. Sowohl die absolute Zahl an „spots“ als auch der prozentuale Anteil, der von Punkten bedeckten Gesamtfläche, wurde anschließend von einem Messgerät aufgezeichnet. In der Abbildung 3.1.2.1.2-03 ist eine derartige Versuchsreihe wiedergegeben.

Abb. 3.1.2.1.2-03

Elispot-Assay

Quantitatives Nachweisverfahren von sezerniertem Interferon- γ nach Stimulation von T-Lymphozyten mittels drei verschiedener allogener Stimulatoren, nämlich PMNC, zytokinstimulierter PMNC und dendritischer Zellen



Unter Verwendung von Stimulationsindizes bezogen auf die Messwerte, die in den unbehandelten MLCs erzielt und zur Vereinfachung der Darstellung gleich 100% gesetzt wurden, ergaben sich folgende tabellarisch aufgezeigten Daten.

Tab. 3.1.2.1.2-10

*Elispot-Assay**Interferon- γ Nachweis*

Auflistung der Ergebnisse aus 16 unabhängigen Versuchen. Gemessen wurde jeweils die Anzahl der „spots“

	MLC: stimuliert durch „unbehandelte“ PMNC	MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC	MLC: stimuliert durch dendritische Zellen
Messwerte	2440	607	829
Messwerte	794	471	1186
Messwerte	5	29	63
Messwerte	60	50	140
Mittelwerte	824,75	289,25	554,50
Stimulationsindizes	3128,21	778,21	1062,82
Stimulationsindizes	696,49	413,16	1040,35
Stimulationsindizes	500	2900	6300
Stimulationsindizes	400	333,33	933,33
Mittelwerte der Stimulationsindizes	1181,17	1106,17	2334,13

Durch den Interferon- γ Nachweis, der mit Hilfe des Elispot-Assays geführt worden war, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Stimulationsverfahren durch „unbehandelte PMNC“ oder durch „präinkubierte PMNC“ in Bezug auf die Zytokinfreisetzung aufgezeigt werden (Stimulationsindizes: 1181,17 (1) und 1106,17 (2)). Lediglich die Stimulation mittels dendritischer Zellen führte in den meisten Fällen zu einer höheren Zytokinfreisetzung. Folglich erbrachte der Interferon- γ Nachweis, mit Hilfe des Elispot-Assays, keinen eindeutigen Hinweis darauf, dass die einzelnen Stimulationsverfahren ((1) und (2)) zu einer unterschiedlich starken, allogenen Zellaktivierung führten. Das Ausmaß an störenden Einflüssen durch andere Interferon- γ produzierende Zellen konnte bei diesem Nachweisverfahren allerdings nicht abgeschätzt werden. Um mögliche Interferenzen mit anderen Interferon- γ produzierenden Zellen definitiv ausschließen zu können, wurde daher ein weiteres Nachweisverfahren durchgeführt.

Der von Miltenyi Biotec entwickelte Sekretions-Assay ermöglicht den Nachweis vitaler, interferonproduzierender Zellen mittels eines durchflußzytometrischen Verfahrens (siehe hierzu Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.12.1 Sekretions-Assay

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)). Der Interferon- γ Nachweis auf der Oberfläche einzelner Zellen ließ dabei, im Gegensatz zum Elispot-Assay, eine zusätzliche Phänotypisierung Interferon-produzierender Zelle zu. Wie im Kapitel 2. Material/Methoden, 2.12.1 Sekretions-Assay (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) beschrieben, wurden, nach dreitägiger Inkubationsdauer, 10^7 Zellen aus der primären MLC entnommen und durch die gleichen „Stimulatorzellarten“ restimuliert, die bereits bei der Stimulierung der primären MLC verwendet worden waren. Die anschließende Antikörpermarkierung orientierte sich an dem Nachweis vitaler, Interferon- γ sezernierender CD3-positiver T-Zellen. Die Ergebnisse aus 9 unabhängigen Versuchen sind in folgender Tabelle (Tab. 3.1.2.1.2-11) wiedergegeben.

Tab. 3.1.2.1.2-11

Sekretions-Assay

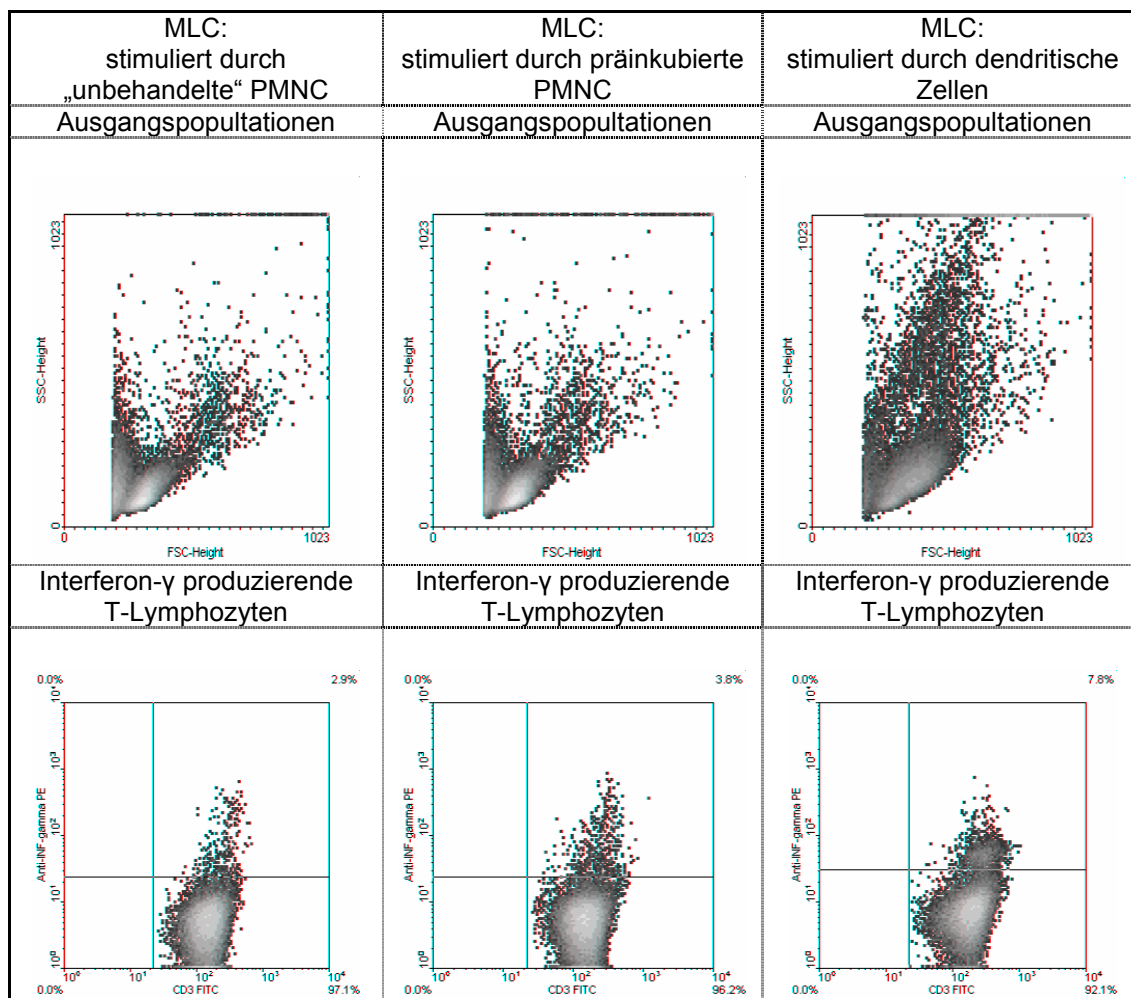
Tabellarische Darstellung des Prozentsatzes an Interferon- γ produzierenden T-Lymphozyten aus 9 unabhängigen Versuchen unter Verwendung unterschiedlicher allogener Stimulatoren

	MLC: stimuliert durch „unbehandelte“ PMNC	MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC	MLC: stimuliert durch dendritische Zellen
Messwerte	2,7	3,5	5,9
Messwerte	2,9	3,8	7,8
Messwerte	2,2	3,7	5,9
Mittelwerte	2,6	3,7	6,5
Standardabweichung	$\pm 0,36$	$\pm 0,15$	$\pm 1,097$
Signifikanz	p = 0,0092 **		
Signifikanz		p = 0,0110 *	
Signifikanz	p = 0,0041 **		
Anzahl der Versuche	3	3	3

Abb. 3.1.2.1.2-04

Sekretions-Assay

Abbildung der Interferon- γ produzierenden T-Lymphozyten einer Versuchsreihe, d. h. nach Stimulation durch PMNC, modifizierte PMNC und Dendriten



Der, anhand des Sekretions-Assays, durchgeführte Interferon- γ Nachweis, erbrachte, im Gegensatz zum Elispot-Assay, einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Stimulationsverfahren. So wurde, mit einem Anteil von durchschnittlich 6,5%, in den MLCs, die durch dendritische Zellen stimuliert worden waren (3), der größte Prozentsatz an Interferon- γ produzierenden T-Lymphozyten erzielt. Im Vergleich dazu wiesen die beiden anderen Stimulationsarten eindeutig geringere prozentuale Anteile hinsichtlich der Interferonproduktion auf (2,6% (1); 3,7% (2)).

3.1.2.1.3 Proliferation

Im Gegensatz zu anderen Zellen zeichnen sich aktivierte T-Lymphozyten, neben der zellspezifischen Zytokinfreisetzung, auch durch die Fähigkeit aus, zu proliferieren und Zellklone zu bilden. Diese T-Zell spezifischen Proliferationseigenschaften lassen sich durch den Nachweis tritiummarkierten [6- H^3]-Thymidins, das im Rahmen dieser Aktivierungsvorgänge als Baustein in die DNA betroffener Zellen eingebaut wird, detektieren.

Wie im Kapitel 2. Material/Methoden, 2.13 Der [6- H^3]-Thymidin-Proliferations-Assay beschrieben, wurden nach dreitägiger Inkubationsdauer jeweils 1000.000 Zellen aus der primären MLC entnommen und in einer sekundären Mikro-MLC für weitere fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart von [6- H^3]-Thymidin für weitere 15 Stunden inkubiert. Die hieraus resultierenden Daten sind in der Tabelle Tab. 3.1.2.1.3-12 zusammengefasst.

Tab. 3.1.2.1.3-12

Proliferations-Assay

Darstellung der Stimulationsindizes ausgehend von der Mikro-MLC in jeder Versuchsreihe, die durch „unbehandelte“ PMNC stimuliert und deren Stimulationsindex gleich 100% gesetzt wurde

	MLC: stimuliert durch „unbehandelte“ PMNC	MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC	MLC: stimuliert durch dendritische Zellen
Stimulationsindizes	100	116	653
Stimulationsindizes	100	106	213
Stimulationsindizes	100	153	1499
Stimulationsindizes	100	112	143
Stimulationsindizes	100	79	347
Stimulationsindizes	100	88	1150
Mittelwerte	100	109	667,5
Standardabweichung	-	10,56	224,26
Signifikanz	p = 0,4224		
Signifikanz		p = 0,0321 *	
Signifikanz	p = 0,0299 *		

Während in den Stimulationsverfahren durch „unbehandelte“ und zytokininkubierte periphere mononukleäre Zellen kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate festzustellen war ($p = 0,4224$ ((1); (2))), differierten die

durchschnittlichen Proliferationsraten von 100% und 109% (entsprechend der einzelnen Stimulationsverfahren) verglichen mit der Stimulation durch dendritische Zellen (667,5%) erheblich ($p = 0,0321$ ((2); (3)) und $p = 0,0229$ ((1); (3))). Diese Resultate ließen die Schlussfolgerung zu, dass, zumindest in den primären MLCs, das Stimulationsverfahren durch dendritische Zellen im Hinblick auf die Proliferationsrate zur stärksten T-Zellaktivierung geführt hatte.

3.1.2.2 Antigenexpression alloreaktiver T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf

Die Responderzellen, sowie die bestrahlten Stimulatorzellen, wurden am Tag 0 in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in die entsprechende Lymphozytenmischkultur eingesetzt. Im Hinblick auf die Antigenexpressionsanalyse dienten ausschließlich dendritische Zellen als Stimulatorzellen. Die in der folgenden Tabelle (Tab. 3.1.2.2-13) aufgelisteten Oberflächenantigene wurden über einen Zeitraum von sechs Tagen hinsichtlich ihrer antigenen Expressionskinetik auf aktivierten T-Lymphozyten untersucht.

Tab. 3.1.2.2-13

Aktivierungsantigene auf der Oberfläche von T-Lymphozyten

CD-Antigen	Zellen, die das Antigen exprimieren	Funktionen	Verwandschaftsbeziehung
CD8	einige Gruppen von Thymozyten, zytotoxische T-Zellen (etwa ein Drittel der peripheren T-Zellen)	Ko-Rezeptor für MHC-Klasse I Moleküle; bindet an der zytoplasmatischen Seite der Membran	Immunglobulin-superfamilie
CD25	aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten	IL-2-Rezeptor- α -Kette, assoziiert mit CD122 und der IL2R- γ -Kette	α -Kette: CCP γ -Kette: Zytokinrezeptor-superfamilie
CD28	Untergruppe von T-Zellen, aktivierte B-Zellen	Aktivierung naiver T-Zellen; Rezeptor für kostimulierendes Signal, bindet CD80 und B7.2	Immunglobulin-superfamilie
CD56	NK-Zellen	Isoform des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM); Adhäsionsmolekül	Immunglobulin-superfamilie
CD69	aktivierte T- und B-Zellen, aktivierte Makrophagen und NK-Zellen	unbekannt, frühes Aktivierungsantigen	C-Typ-Lektin
HLA-DR	antigenpräsentierende Zellen, aktivierte T-Lymphozyten	MHC-Molekül der Klasse II	-
CD71	alle proliferierenden Zellen, aktivierte T-Zellen, Makrophagen	Ligand für CD27, möglicherweise Kostimulation von T- und B-Zellen	TNF-artig
CD90	CD34-positive Prothymozyten; Thymozyten; T-Zellen	Unbekannt	Immunglobulin-superfamilie
CD95	eine Vielzahl von Zelllinien, in vivo Verteilung unbekannt	bindet TNF-ähnlichen FAS-Liganden, induziert Apoptose	NGF-Rezeptorsuperfamilie
CD161	NK- und T-Zellen	Unbekannt	-

Die Antigenexpression wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt. Anhand des Prozentsatzes antigenpositiver Zellen konnten aktivierte T-Lymphozyten auf diese Weise auch quantitativ nachgewiesen werden (Tab. 3.1.2.2-14).

Tab. 3.1.2.2-14

Übersicht über den Verlauf der Antigenexpression auf T-Zellen innerhalb eines Zeitraums von sechs Tagen nach dem Ansetzen der MLC. In folgender Tabelle sind die prozentualen Anteile an Lymphozyten dargestellt, die die entsprechenden Antigene exprimierten

CD-Molekül	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
CD25	12,80	16,36	21,09	41,02	61,94	82,44
CD69	19,97	21,79	24,28	32,09	28,56	16,95
HLA-DR	40,54	44,68	52,99	59,91	63,89	76,57
CD71	16,07	14,19	36,01	46,22	66,90	80,14
CD95	50,39	54,97	61,16	68,14	77,55	85,67
CD161	2,14	7,63	14,75	17,85	8,07	6,92
CD28	64,34	65,23	71,39	73,94	80,80	88,53
CD90	0,39	7,59	8,79	14,11	13,46	10,02
CD8	18,77	17,86	18,67	23,34	28,47	24,90
CD56	1,16	3,35	4,10	3,57	3,05	1,40

Die Abbildung 3.1.2.2-05 und die Abbildung 3.1.2.2-06 zeigen das Expressionsmuster der Oberflächenantigene CD8, CD25, CD28, CD56, CD69, HLA-DR, CD71, CD95, CD90 und CD161 kultivierter T-Lymphozyten in einer MLC, die über einen Beobachtungszeitraum von sechs Tagen allogenen stimuliert worden ware.

Abb. 3.1.2.2-05

Antigenexpression der Oberflächenmarker CD25, CD69 und HLA-DR auf vitalen T-Lymphozyten

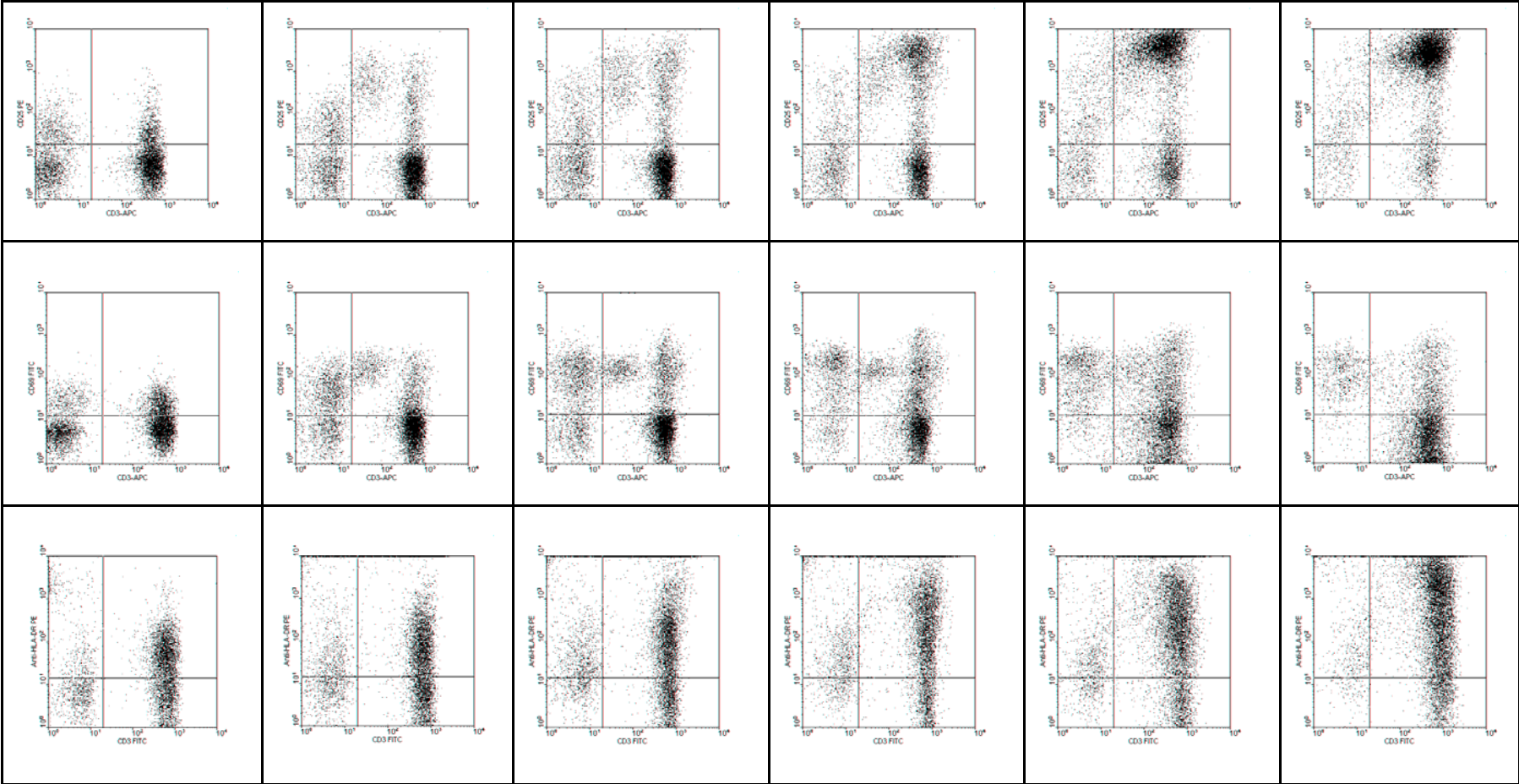
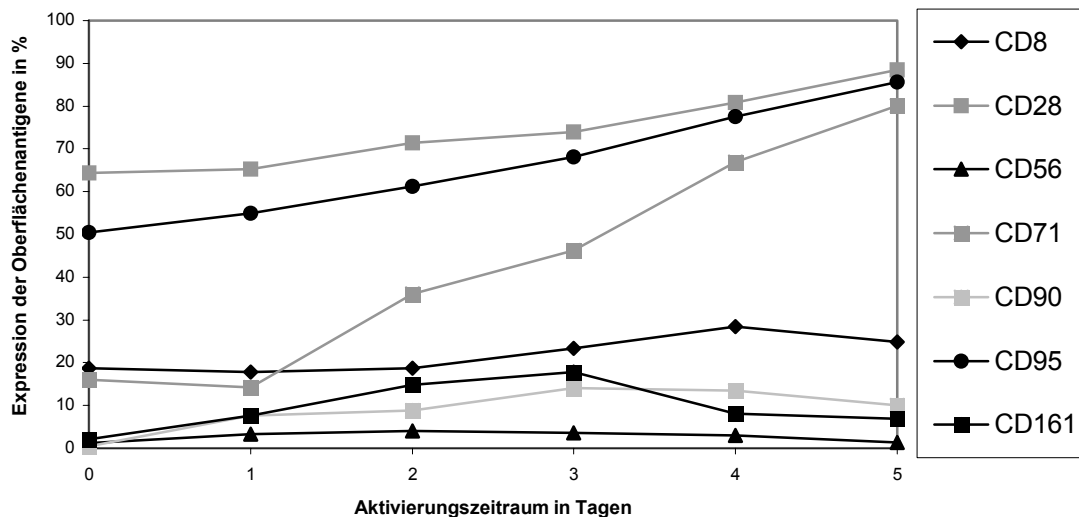


Abb. 3.1.2.2-06

Antigenexpression der zusätzlich untersuchten Oberflächenmarker CD8, CD28, CD56, CD71, CD90, CD95 und CD161 auf vitalen T-Lymphozyten



Unser Augenmerk richtete sich, im Hinblick auf die Depletion, in erster Linie auf das Expressionsmuster der Oberflächenantigene CD25, CD69 und HLA-DR auf aktivierten T-Zellen. Darüberhinaus wurden allerdings auch die Moleküle CD8, CD28, CD56, CD71, CD90, CD95 und CD161 als potentielle Aktivierungsmarker auf alloreaktiven T-Lymphozyten untersucht, die sich sechs Tage lang in einer, durch allogene Dendriten stimulierten MLC befanden.

Betrachtet man die CD3⁺-Lymphozyten aus dem peripheren Blut gesunder Spender als Ausgangspunkt, so waren darin 13% CD25⁺, 20% CD69⁺, 41% HLA-DR⁺, 16% CD71⁺, 50% CD95⁺, 2% CD161⁺, 64% CD28⁺, 0,4% CD90⁺, 19% CD8⁺ und 1% CD56⁺ Zellen enthalten. Weiterführende Analysen der einzelnen Oberflächenantigene ergaben, dass die Expressionskinetik des CD25-Moleküls bereits nach 72 Stunden rapide zunahm und dass nach 120 Stunden 84% der T-Zellen das CD25-Antigen auf der Oberfläche exprimierten. Im Kontrast dazu erreichte die CD69-Expression nach 72 Stunden mit einem Prozentsatz von 32% ihren Höhepunkt und fiel nach 120 Stunden so stark ab, dass hierbei mit 17% CD69⁺ Zellen, Werte erreicht wurden, die unterhalb des Ausgangsniveaus lagen. Die Expression des MHC Klasse II Moleküls, HLA-DR, stieg bis zu dem Beobachtungszeitpunkt von 120 Stunden stetig an und erreichte dort einen

Prozentsatz von 77%. Der Transferrinrezeptor CD71 wies bereits nach 48 Stunden eine rasche Zunahme der Expressionskinetik auf und erreichte nach 120 Stunden mit 80% CD71⁺ Zellen Werte, die denen, des CD25-Moleküls glichen. Die Expression des Oberflächenantigens CD95 nahm langsam aber stetig zu und wies mit 86% CD95⁺ Zellen einen der höchsten Prozentsätze nach 120 stündiger Kultivierung auf. Das CD161 Antigen zeigte im zeitlichen Verlauf eine ähnliche Kinetik, wie das Oberflächenantigen CD69. So konnte auch hier bis zu dem Zeitpunkt von 72 Stunden eine rasche Zunahme in der Antigenexpression verzeichnet werden, doch wurde anschließend, der dabei maximal erzielte Prozentsatz von 18%, auf 7% (nach 120 Stunden) reduziert. Das kostimulatorische Molekül CD28 ebenso, wie das Oberflächenantigen CD90, zeigte über den gesamten Beobachtungszeitpunkt hinweg, eine stetige Zunahme der Antigenexpression. Demgegenüber blieben die Expressionskinetiken der Oberflächenantigen CD8 und CD56 mit Werten von 19 - 25% und 1,2 - 1,4% annähernd konstant.

3.2 Selektive immunomagnetische Depletion von alloreaktiven T-Lymphozyten

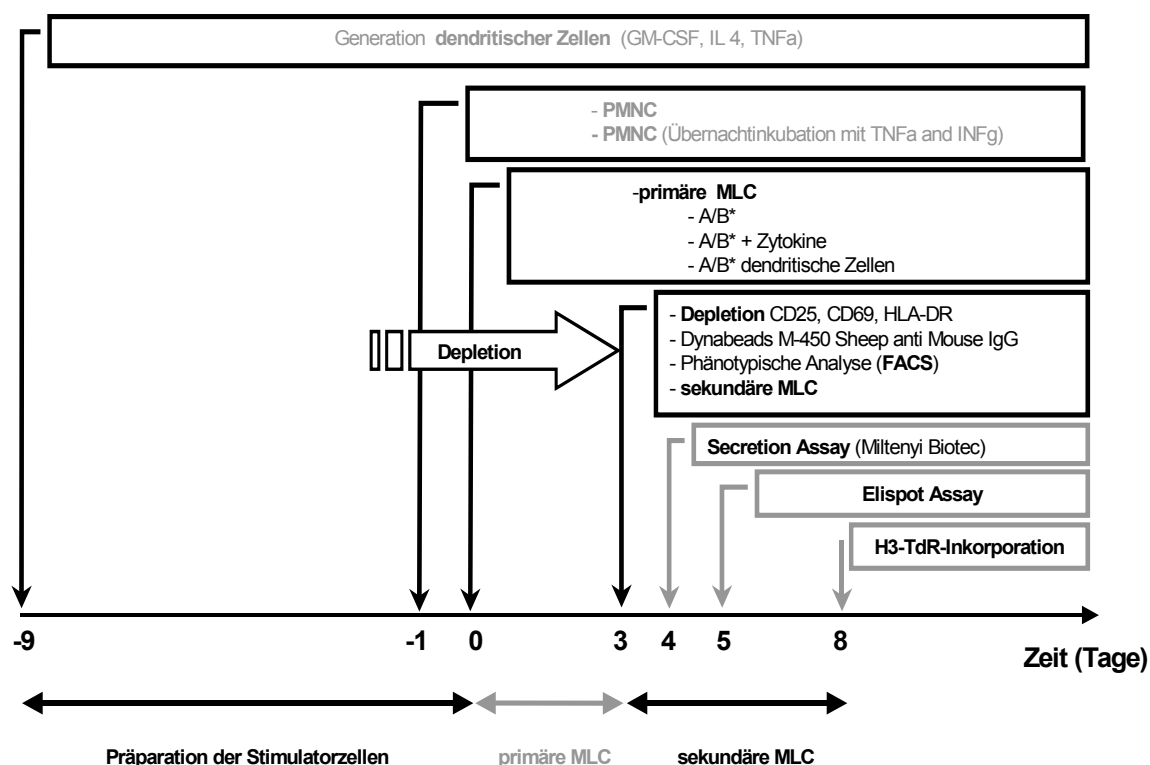
Für die Depletionsversuche standen Blutproben im Volumenbereich von 20 ml bis 100 ml zur Verfügung. Proben mit einem Volumen von mindestens 50 ml wurden für mehrere vergleichende Versuche innerhalb einer Versuchsreihe herangezogen. Die zu untersuchenden Zellen wurden am Tag 0 einer Versuchsreihe, nachdem, im Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.10 Die Depletion alloreaktiver T-Zellen mit Hilfe des Magnetpartikel-Konzentrator-Systems (Dynal MPC) beschriebenen Verfahren, aus den Blutproben isoliert. Der Ausgangswert, im Bezug auf die Anzahl an peripheren mononukleären Zellen (PMNC), die als Responderzellen in die primären MLCs eingesetzt wurden, lag bei allen Versuchen bei durchschnittlich 20 Millionen Zellen. Als Stimulatoren dienten Zellen, die, in einem Zeitraum von bis zu neun Tagen vor dem Ansetzen der primären MLC, separiert und modifiziert worden waren. Die eigentliche Depletion alloreaktiver T-Zellen erfolgte am Tag 3 nach Ansetzen der primären MLC. Dieser Zeitpunkt ergab sich aus den Daten, die

hinsichtlich der Antigenexpression aktivierter T-Zellen erhoben worden waren. Ausschlaggebende Kriterien hierbei waren zum einen, dass sich in diesem Zeitraum eine möglichst große Anzahl an T-Zellen durch allogene Stimuli aktivieren ließ und dass zum anderen die Proliferationsphase d. h. die Vermehrung dieser Zellen noch nicht eingesetzt hatte. Auf diese Weise versprachen wir uns, die Anzahl potentiell GVHD-induzierender T-Zellen vor allem nach der Depletion so gering wie möglich zu halten.

Der gesamte Versuchsablauf, sowie die anschließenden Analyseverfahren sind in der Abb. 3.2-07 wiedergegeben.

Abb. 3.2-07

Zeitlicher Ablauf des Depletionsversuchs

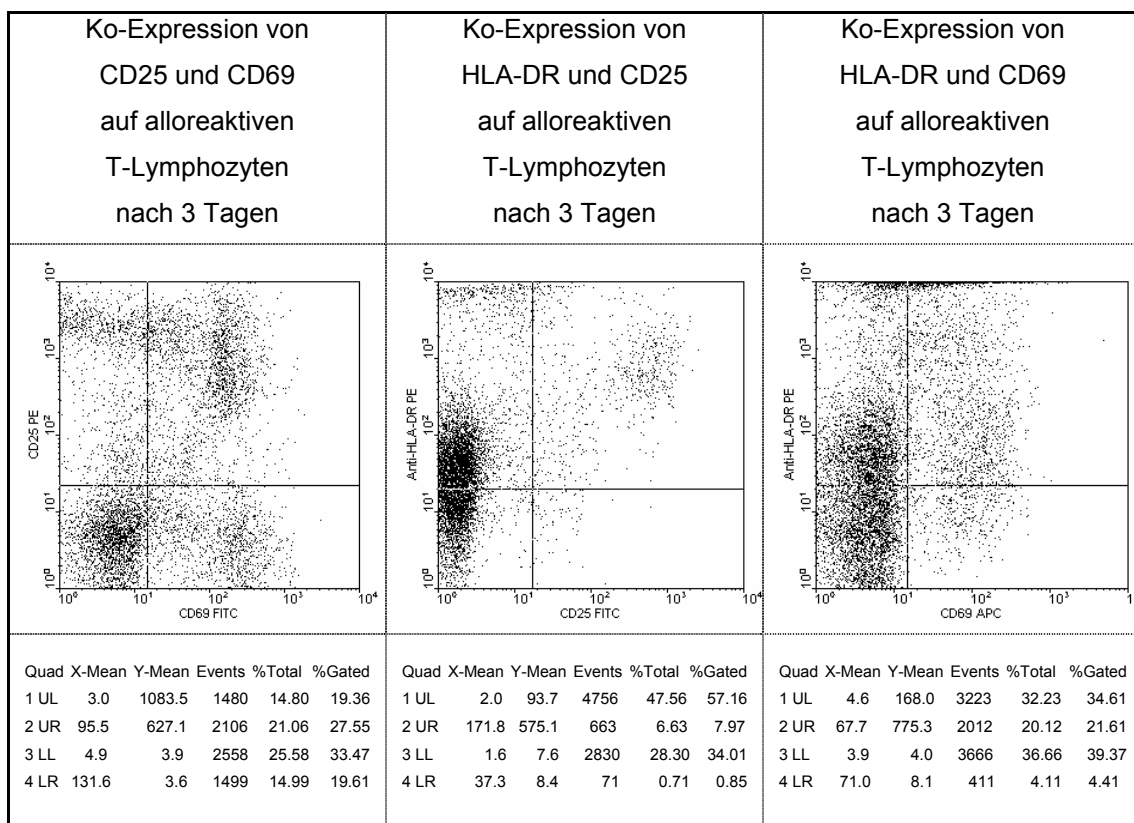


Die Depletion erfolgte, wie im Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.10 Die Depletion alloreaktiver T-Zellen mit Hilfe des Magnetpartikel-Konzentrator-Systems (Dyna MPC) beschrieben, mittels Antikörpern, die gegen die Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR gerichtet waren, sowie mit Hilfe der Dynabeads M-450 Sheep-anti-Mouse IgG. Die Expression der Aktivierungsantigene resultierte, wie in

Abbildung. 3.2-08 dargestellt, nur in wenigen Fällen in einer Ko-Expression mehrerer Marker.

Abb. 3.2-08

Darstellung der Ko-Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR auf alloreaktiven T-Lymphozyten



Um sämtliche alloreaktive T-Zellen unter zu Hilfenahme des Magnetpartikel-Konzentrator-Systems eliminieren zu können, wurden alle CD25, CD69 und HLA-DR positiven Zellen parallel depletiert.

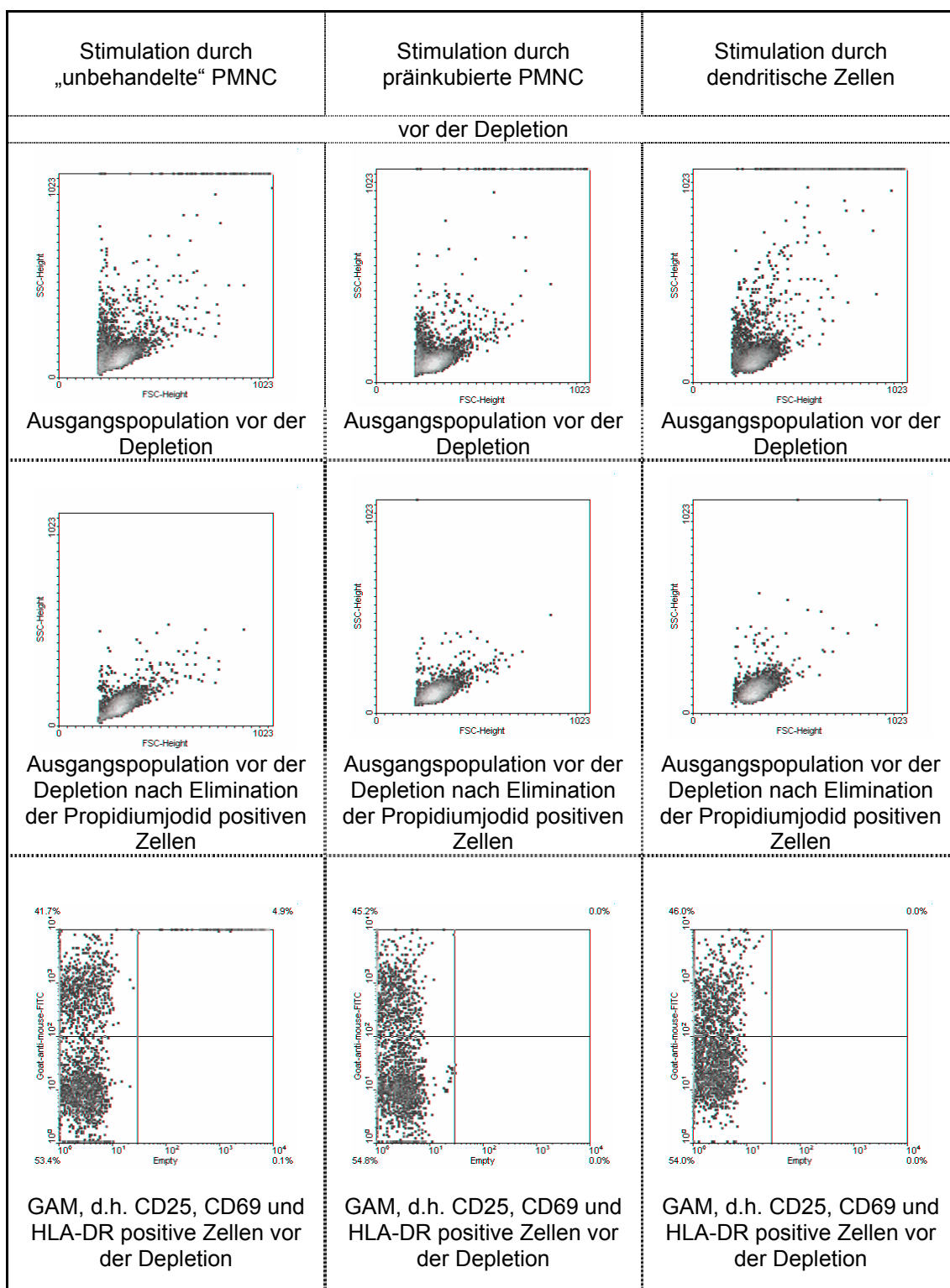
3.2.1 Beurteilung der Effizienz der Depletionsmethode anhand der phänotypischen Zellanalyse

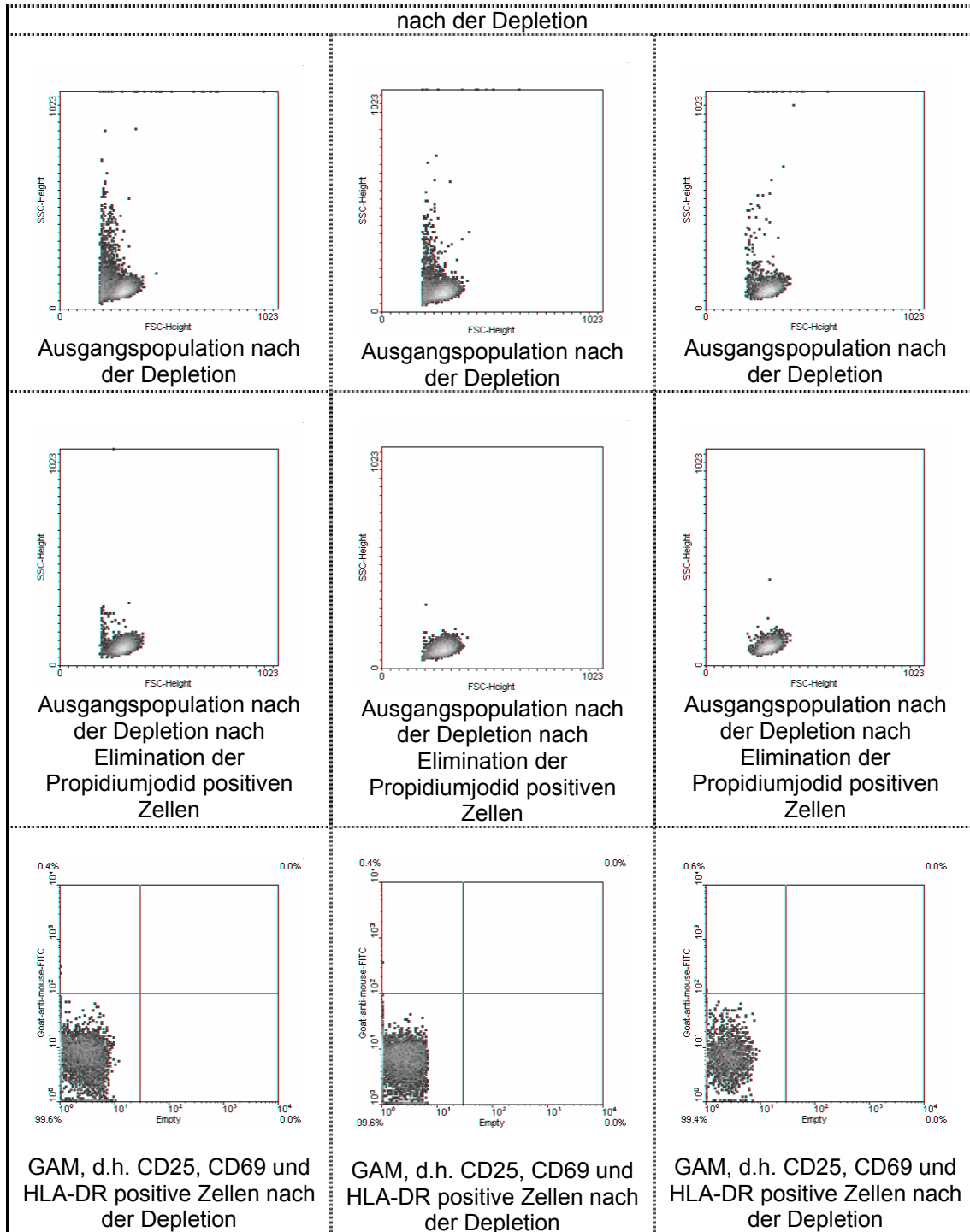
Die durchflußzytometrische Analyse, siehe Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.11 Zellanalyse mittels Durchflußzytometrie (FACS), beschränkte sich auf T-Lymphozyten. Durch logische Verknüpfung vordefinierter Regionen war es möglich, populationsspezifische Aussagen treffen zu können. Das Augenmerk

wurde daher in erster Linie auf die CD3⁺ Zellen mit Lymphozytenmorphologie gelenkt. Unter Zuhilfenahme von Propidiumjodid (PI) konnten darüber hinaus tote Zellen sichtbar gemacht und aus der Analyse ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der phänotypischen Analyse von T-Zellen im nicht depletierten, sowie im depletierten Zustand sind in folgenden Abbildungen Abb. 3.2.1-09 exemplarisch dargestellt.

Abb. 3.2.1-09

Exemplarische Darstellung der Zellpopulationen einer Versuchsreihe vor und nach der Depletion unter verschiedenen Bedingungen





Eine entsprechende Übersicht über alle Versuche bietet die Tabelle Tab. 3.2.1-15.

Tab. 3.2.1-15

Prozentsatz der GAM-positiven Zellen vor und nach der Depletion. Angaben aus insgesamt 54 unabhängigen Versuchen

MLC: stimuliert durch unbehandelte PMNC	MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC	MLC: stimuliert durch dendritische Zellen
29,10% ± 12,04 (n=7)	34,66% ± 11,81 (n=5)	37,41% ± 7,71 (n=6)
Prozentsatz der GAM- positiven Zellen vor der Depletion	Prozentsatz der GAM- positiven Zellen vor der Depletion	Prozentsatz der GAM- positiven Zellen vor der Depletion
0,34% ± 0,27 * * *	0,37% ± 0,26 * * *	0,74 % ± 0,46 * * *
(n=11)	(n=11)	(n=14)
Prozentsatz der GAM- positiven Zellen nach der Depletion	Prozentsatz der GAM- positiven Zellen nach der Depletion	Prozentsatz der GAM- positiven Zellen nach der Depletion

Vergleicht man die verschiedenen Ausgangspopulationen vor und nach der Depletion anhand der durchflußzytometrischen Analysen, so kann davon ausgegangen werden, dass die aktivierten T-Zellen, da sie außerhalb der eigentlichen Lymphozyten Population anzutreffen waren, größer und granulierter sind. Abhängig von der Art der Stimulation waren vor der Depletion 29,10% ± 12,04 ((1); n = 7), 34,66% ± 11,81 ((2); n = 5) und 37,41% ± 7,71 ((3); n = 6) der Zellen positiv für die Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR. Nach der Depletion konnten lediglich 0,34% ± 0,27 ((1); n = 11), 0,37% ± 0,26 ((2); n = 11) und 0,74% ± 0,46 ((3); n = 14) GAM-positive Zellen nachgewiesen werden. Verglichen mit den Ausgangswerten konnte folglich durch das Depletionsverfahren in allen Fällen eine signifikante Reduktion alloreaktiver T-Zellen erzielt werden.

3.2.2 Interferon- γ Nachweis

Wie zuvor bei der phänotypischen Analyse der alloreaktiven Zellen vor und nach der Depletion wurde der, mit Hilfe des Sekretions-Assays durchgeführte IFN-

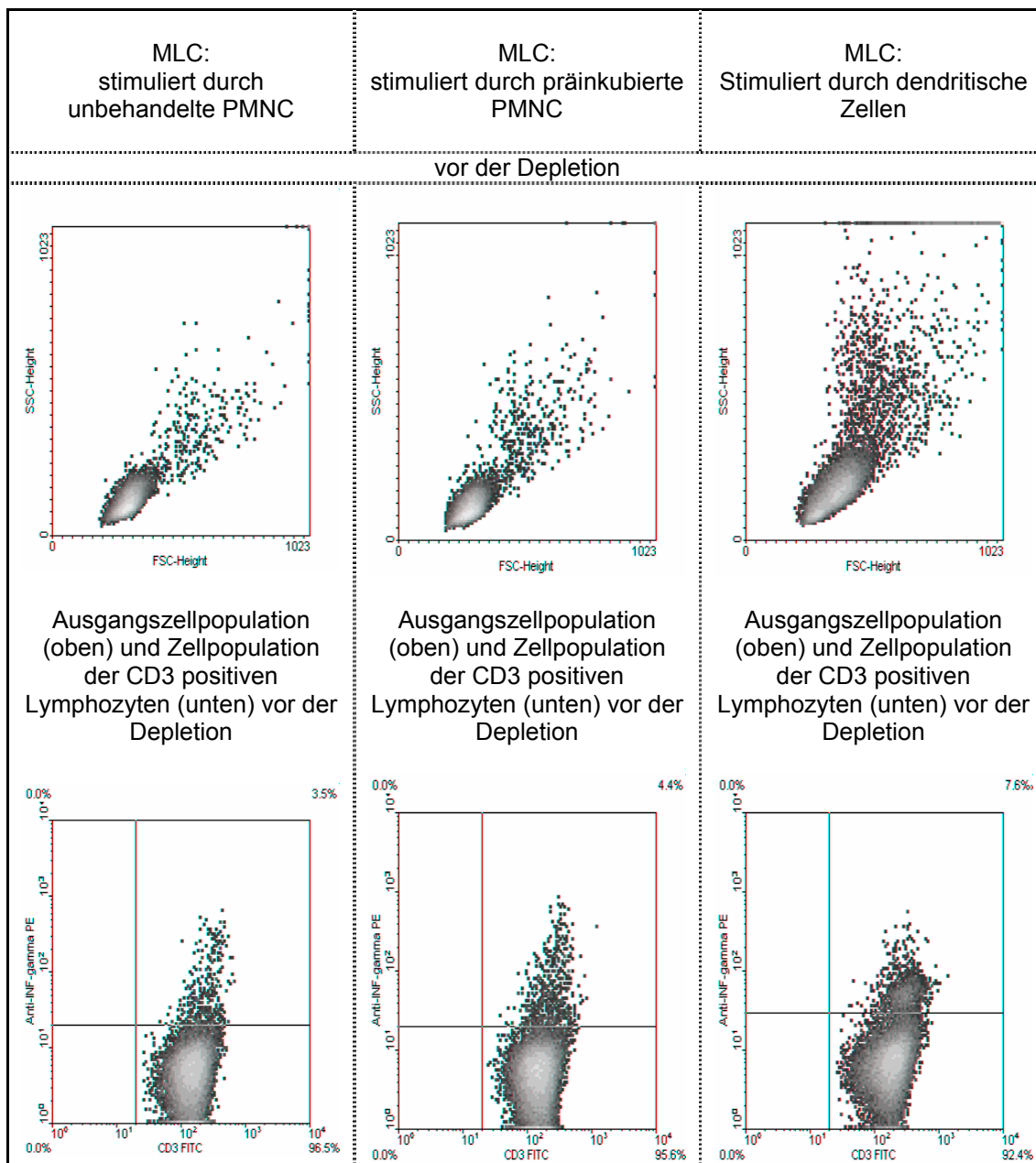
Nachweis auf die Lymphozyten beschränkt, die phänotypisch CD3⁺ und Propidiumjodid⁻ waren (nähere Angaben zu dieser Methode im Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.12.1 Sekretions-Assay (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)). Als Stimulationsverfahren wurde hierbei eine 20 Stunden dauernde Restimulation durch die gleichen Stimulatorzellarten gewählt, die bereits in den jeweiligen primären MLCs Verwendung gefunden hatten.

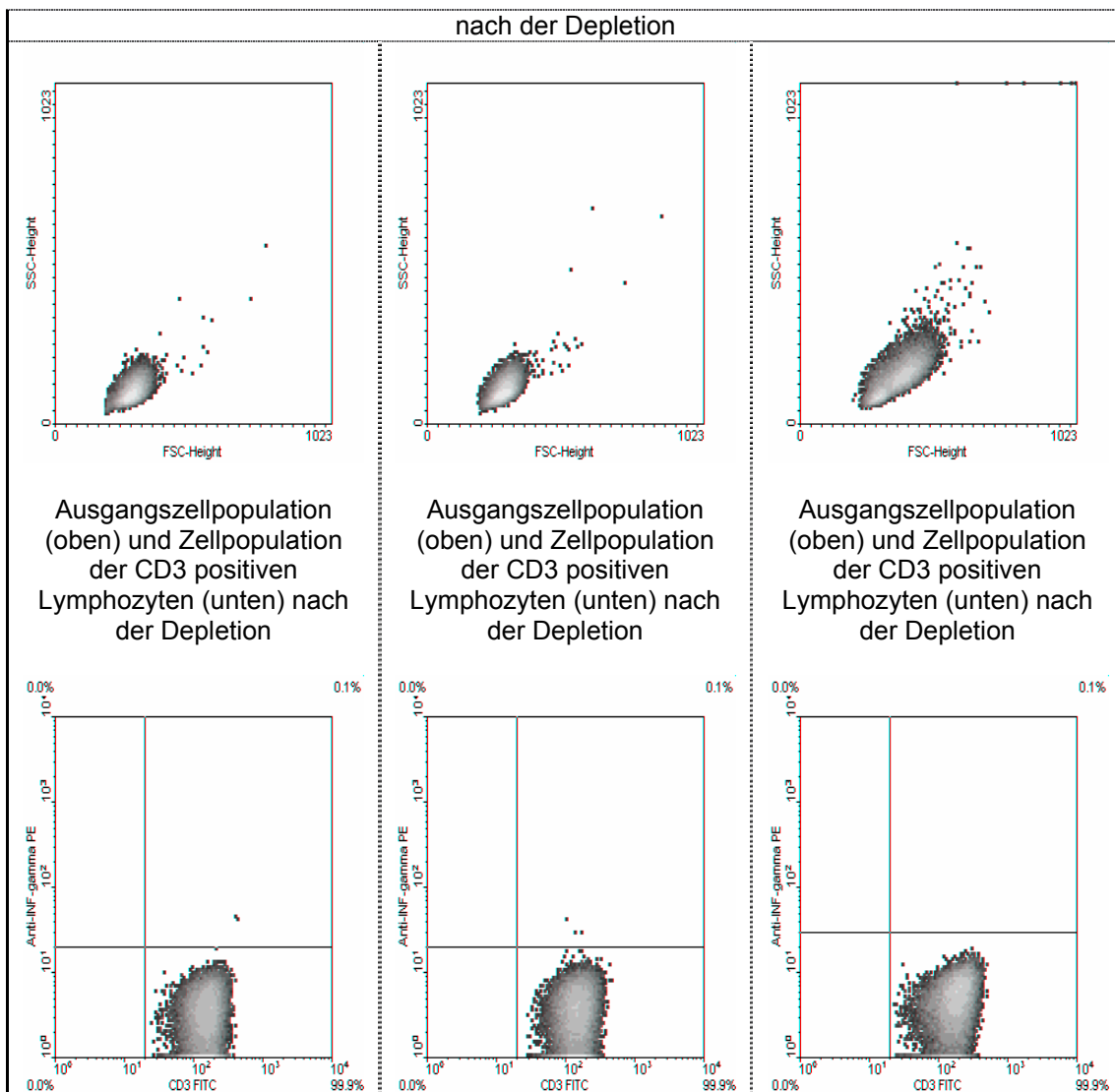
In der Abbildung Abb. 3.2.2-10 sind die Resultate aus einer Versuchsreihe exemplarisch zusammengefasst.

Abb. 3.2.2-10

Sekretions-Assay

Nachweis der Effizienz des Depletionsverfahrens anhand Interferon- γ sezernierender Zellen





Die dazugehörige Übersichtstabelle umfasst die Tab. 3.2.2-16.

Tab. 3.2.2-16

Sekretions-Assay

Tabellarische Übersicht über die Effizienz des Depletionsverfahrens, nachgewiesen, anhand von Interferon sezernierenden Zellen aus zwölf unabhängigen Versuchen mit Hilfe des Sekretions-Assays

	MLC: stimuliert mit „unbehandelten“ PMNC	MLC: stimuliert mit präinkubierten PMNC	MLC: stimuliert mit dendritischen Zellen
vor der Depletion			
Messwerte	2,7	3,5	5,9
Messwerte	3,5	4,4	7,6
Messwerte	3,3	4,9	14,8
Messwerte	2,2	3,7	5,9
Mittelwert	2,925	4,125	8,55
Standardabweichung	0,5909	0,6449	0,4243
nach der Depletion			
Messwerte	0,09	0,09	0,08
Messwerte	0,10	0,10	0,10
Messwerte	0,03	0,14	0,28
Messwerte	0,14	0,04	0,06
Mittelwert	0,09	0,0925	0,13
Standardabweichung	0,04546	0,04113	0,1013
Signifikanz	< 0,0001 * * *	< 0,0001 * * *	0,0074 * *
Anzahl der Versuche	4	4	4

Während vor der Depletion im Durchschnitt $2,925\% \pm 0,5909$ (1), $4,125\% \pm 0,6449$ (2) und $8,55\% \pm 0,4243$ (3) der T-Lymphozyten Interferon produzierten, konnte der Prozentsatz an Interferon produzierenden Lymphozyten, trotz Restimulation, allein durch das Depletionsverfahren drastisch gesenkt werden. So lag der Prozentsatz nach der Depletion durchschnittlich bei unter 0,1% zytokinproduzierender Zellen (Tabelle 3.2.2-16). In Bezug auf die Interferonproduktion wurden, mit durchschnittlich $0,09\% \pm 0,04546$ die besten Depletionsergebnisse in der MLC, die durch unbehandelte PMNC stimuliert worden war, erzielt. Knapp gefolgt von den Resultaten aus der MLC, in der präinkubierte PMNC zur Restimulation verwendet worden waren ($0,0925\% \pm 0,04113$) und denen der MLC, die durch dendritische Zellen aktiviert worden war ($0,13\% \pm 0,1013$). Setzt man diese Angaben in Relation zu den Ausgangswerten vor der Depletion, so unterschieden sich alle,

miteinander vergleichbaren Werte vor und nach Depletion signifikant.

Die γ -Interferon Produktion zum Ausschluss von alloreaktiven Zellen nach der Depletion wurde, neben dem Sekretions-Assay, auch mit Hilfe des Elispot-Assays nachgewiesen. Dieses Nachweisverfahren wurde dabei, neben dem Aufzeigen der Alloreaktivität, auch für den Nachweis der Autoreaktivität, sowie der Reaktivität gegen „third party“-Zellen, Tetanus Toxoid, CMV-Antigen und PHA (nähere Angaben hierzu im Abschnitt 2. Material/Methoden, 2.12.2 Elispot-Assay) genutzt. Die Abbildungen 3.2.2-11 bis 3.2.2-13 zeigen die dabei gewonnen Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchsreihen.

Abb. 3.2.2-11

Elispot-Assay

MLC: stimuliert durch „unbehandelte“ PMNC vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen

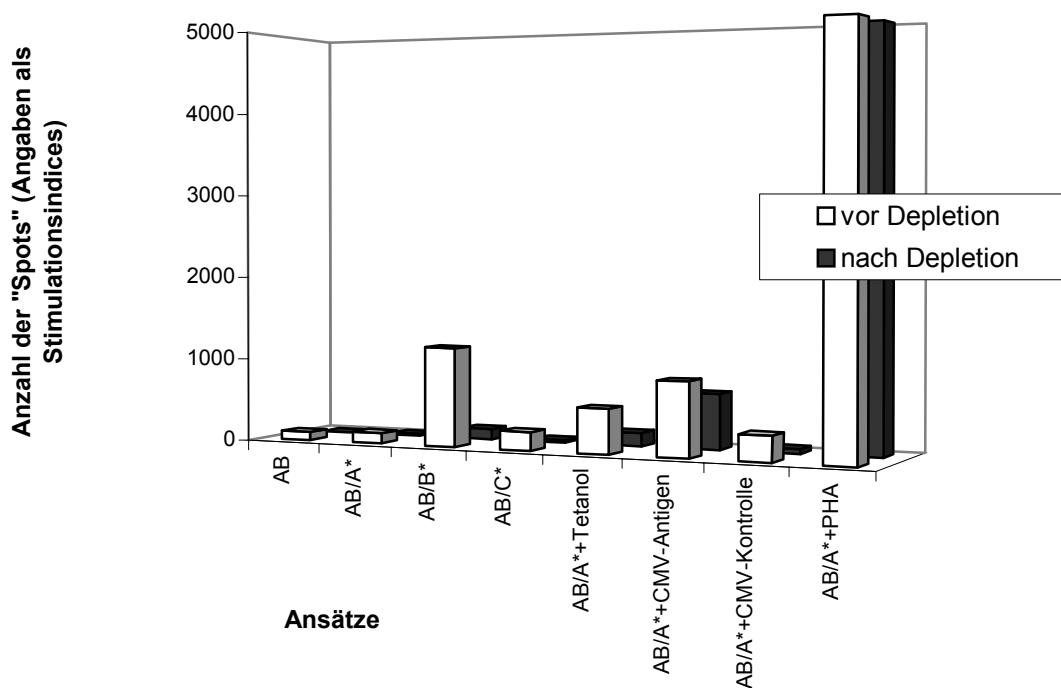


Abb. 3.2.2-12

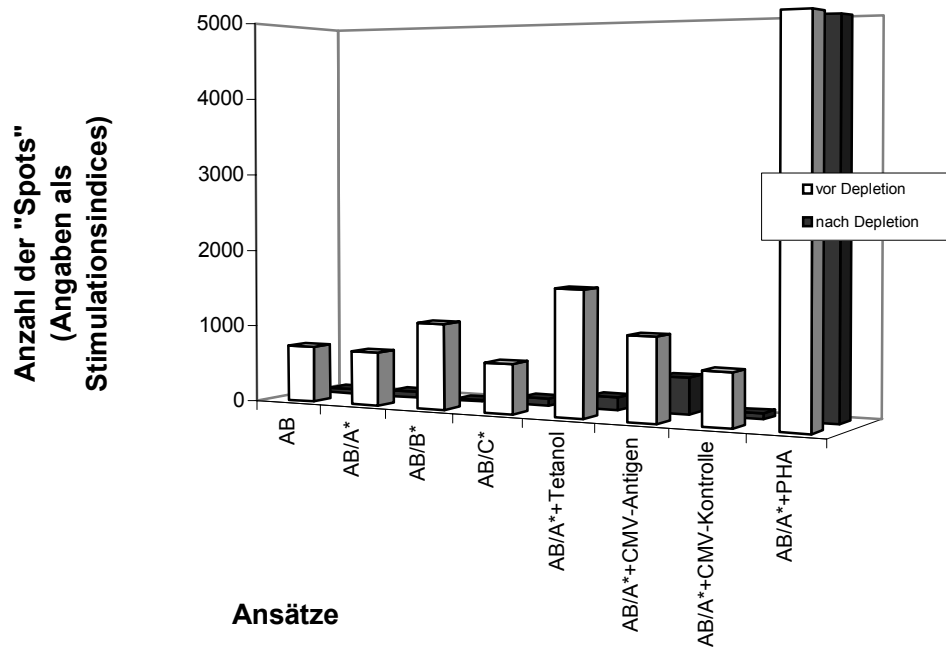
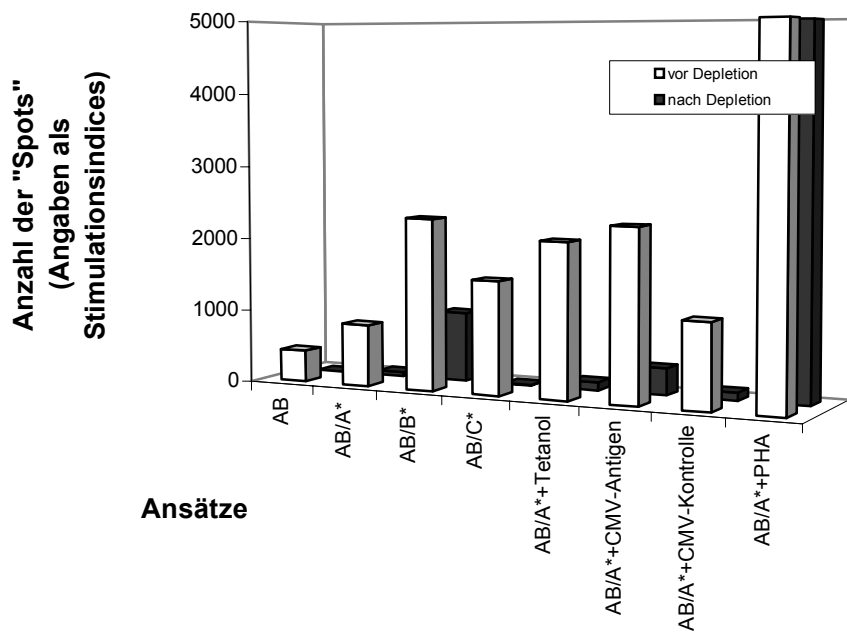
*Elispot-Assay**MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen*

Abb. 3.2.2-13

*Elispot-Assay**MLC: stimuliert durch dendritische Zellen vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen*

Die entsprechende zahlenmäßige Übersicht bietet in diesem Zusammenhang die Tabelle 3.2.2-17.

Tab. 3.2.2-17

Elispot-Assay

Tabellarische Übersicht über die Mittelwerte aller Versuchsreihen, bestehend aus jeweils vier unabhängigen Versuchen. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die durch „unbehandelte“ PMNC stimuliert und gleich 100% gesetzt wurde, wiedergegeben

Zellkultur- system	MLC: stimuliert durch „unbehandelte“ PMNC		MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC		MLC: stimuliert durch dendritische Zellen	
	vor der Depletion	nach der Depletion	vor der Depletion	nach der Depletion	vor der Depletion	nach der Depletion
Depletions- zustand						
AB	100	2	727	58	433	4
AB/A*	125	23	696	74	842	56
AB/B*	1181	126	1106	17	2334	952
AB/C*	222	33	639	95	1537	10
AB/A* +Tetanol	533	160	1614	166	2098	112
AB/A* +CMV- Antigen	885	665	1068	471	2331	364
AB/A* +CMV- Kontrolle	309	57	684	74	1158	106
AB/A* +PHA	36821	16664	50627	18545	51849	16230

In Bezug auf die Alloreaktivität zeigte sich hierbei eine starke Reduktion der γ -Interferon-Produktion durch das Depletionsverfahren (1181% \rightarrow 126%, (1); 1106% \rightarrow 17%, (2)). Die IFN-Produktion konnte allerdings im Falle der Restimulation durch dendritische Zellen lediglich um etwa 50% gesenkt werden (2334% \rightarrow 952%, (2)), während die Autoreaktivität durch die Depletion allgemein stark reduziert wurde (125% \rightarrow 23% (1); 696% \rightarrow 74% (2); 842% \rightarrow 56% (3)). Die Reaktivität gegen „third party“ Zellen (222% \rightarrow 33% (1); 639% \rightarrow 95% (2); 1537% \rightarrow 10% (3)), Tetanus Toxoid (533% \rightarrow 160% (1); 1614% \rightarrow 166% (2); 2098% \rightarrow 112% (3)), CMV-Antigen (885% \rightarrow 665% (1); 1068% \rightarrow 471% (2); 2331% \rightarrow 364% (3)) und PHA (36821% \rightarrow 16664% (1); 50627% \rightarrow 18545% (2); 51849% \rightarrow 16230% (3)) blieb jedoch weitgehend erhalten.

3.2.3 [6-H³]-Thymidineinbau

Im Bezug auf die T-Lymphozytenaktivierung konnte bereits im Abschnitt 3. Ergebnisse, 3.1.2.2 Antigenexpression alloreaktiver T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf gezeigt werden, dass sich an den primären Aktivierungsprozess eine Phase der Zellproliferation anschließt. Zum Nachweis des klonalen Zellwachstums wurde die Messung der Einbaurrate von [6-H³]-Thymidin herangezogen. Hierzu wurden Zellproben aus den primären MLCs entnommen und, sowohl im nicht depletierten, als auch im depletierten Zustand nach drei Tagen in eine sekundäre MLC überführt und dort gemäß der primären MLC restimuliert.

Im folgenden Abschnitt sind die Resultate aus vier Versuchsreihen zusammen gestellt. Um dabei Vergleiche zwischen den einzelnen Daten ziehen zu können, wurden Stimulationsindizes eingeführt, die von der durchschnittlichen Proliferationsrate in der primären MLC, die durch „unbehandelte“ PMNC stimuliert worden war, ausgingen. Dieser Wert wurde mit 100% festgesetzt.

Tab. 3.2.3-18

[6-H³]-Thymidin-Proliferations-Assay

Tabellarische Übersicht über die Mittelwerte aus allen Versuchsreihen bestehend aus jeweils vier unabhängigen Versuchen vor und nach der Depletion. Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der MLC, die durch „unbehandelte“ PMNC stimuliert und 100% gesetzt wurde, wiedergegeben

Zellkultur- system	MLC: stimuliert durch unbehandelte PMNC		MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC		MLC: stimuliert durch dendritische Zellen	
	vor der Depletion	nach der Depletion	vor der Depletion	nach der Depletion	vor der Depletion	nach der Depletion
AB	100	9±16,1	122±21	16±30,4	627±624	13± 23,3
AB/A*	140±77	13± 23,7	223±85	13±23,9	284±208	16±27,2
AB/B*	523±440	22± 20,1	382±335	30±28,2	423±192	283±349,1
AB/C*	553±786	78±1451,8	1200±2016	1159 ± 2195,2	564±414	1116 ± 2140,3
AB/A* +Tetanol	393±227	152±230,9	431±329	249±437,1	520±366	151±231,6
AB/A* +CMV- Antigen	627±722	225±438,7	524±524	385±750,3	1102±1449	483±944,1
AB/A* +CMV- Kontrolle	178±108	20±35,6	223±157	42±79,2	381±171	17±30,9
AB/A* +PHA	15876 ± 30105	566 ± 9427,9	22108 ± 42537	22588 ± 43177,3	21341 ± 41723	15073 ± 29086,2

Abb. 3.2.3-14

[6- H^3]-Thymidin-Proliferations-Assay

MLC: stimuliert durch „unbehandelte“ PMNC vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen

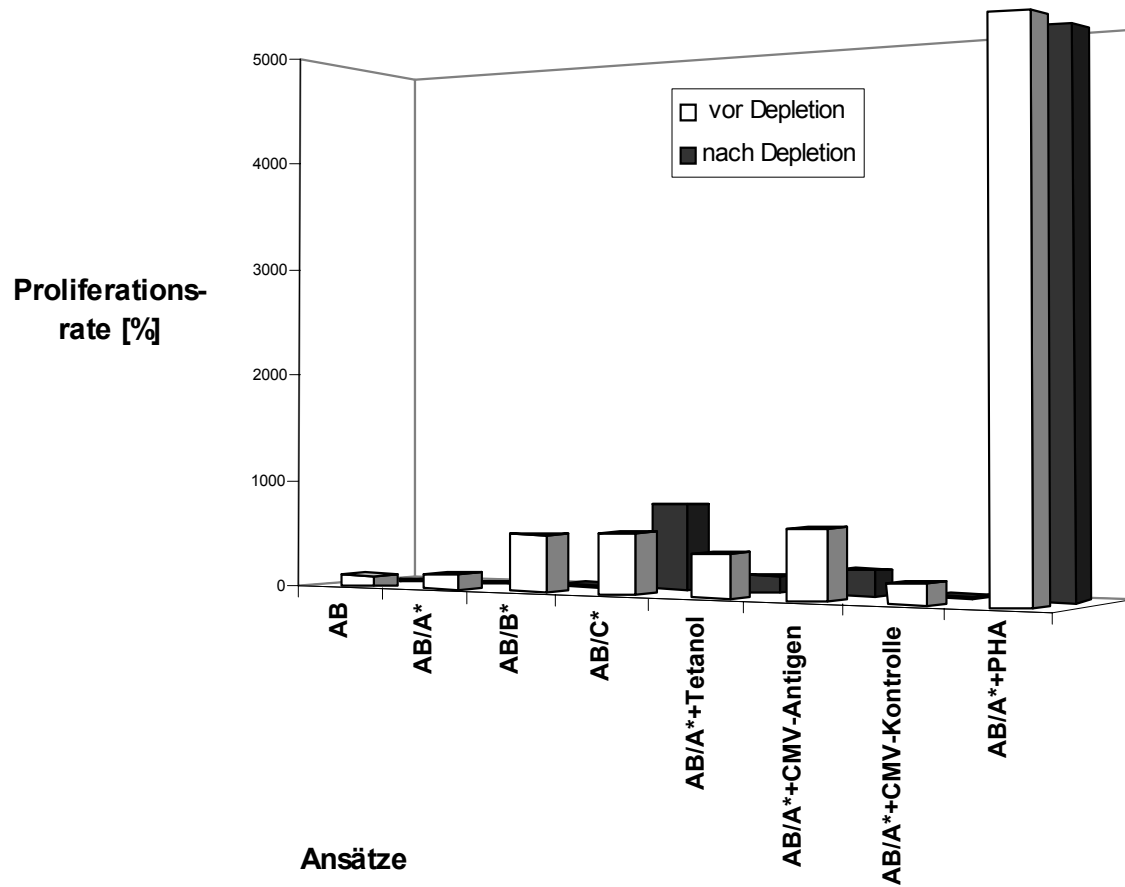


Abb. 3.2.3-15

[6- H^3]-Thymidin-Proliferations-Assay

MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen

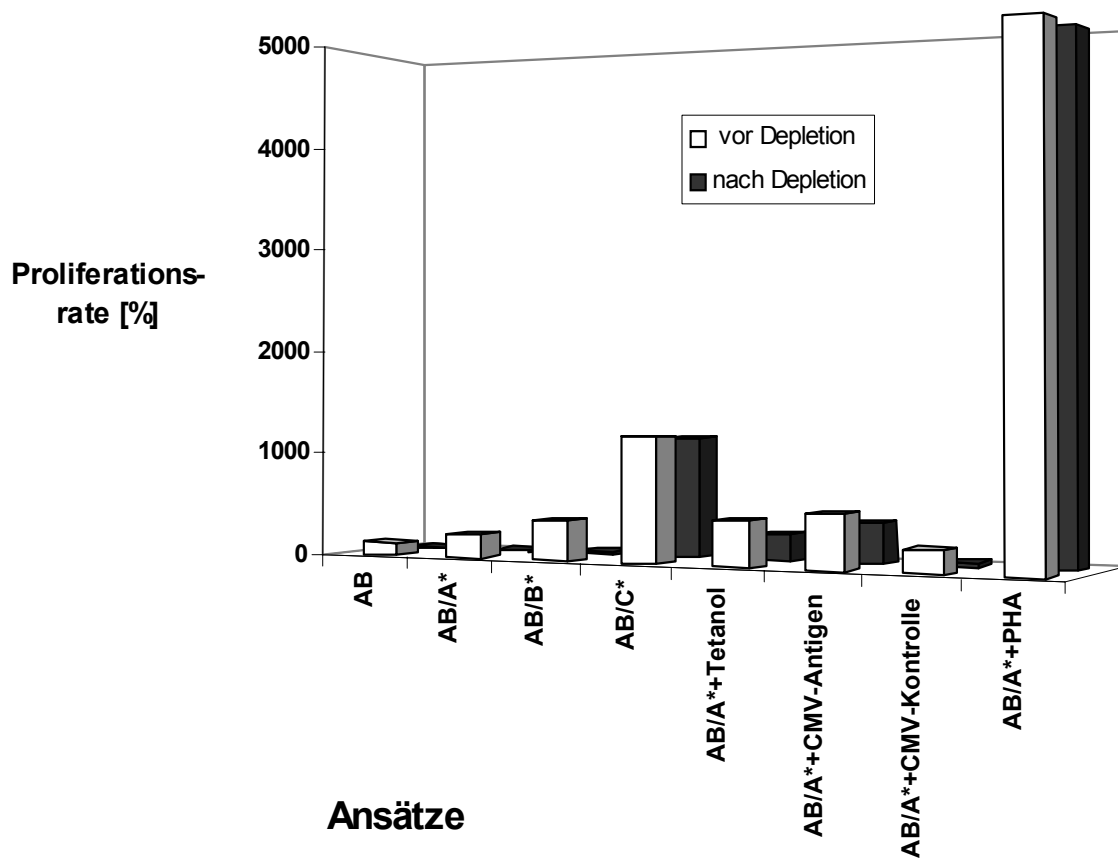
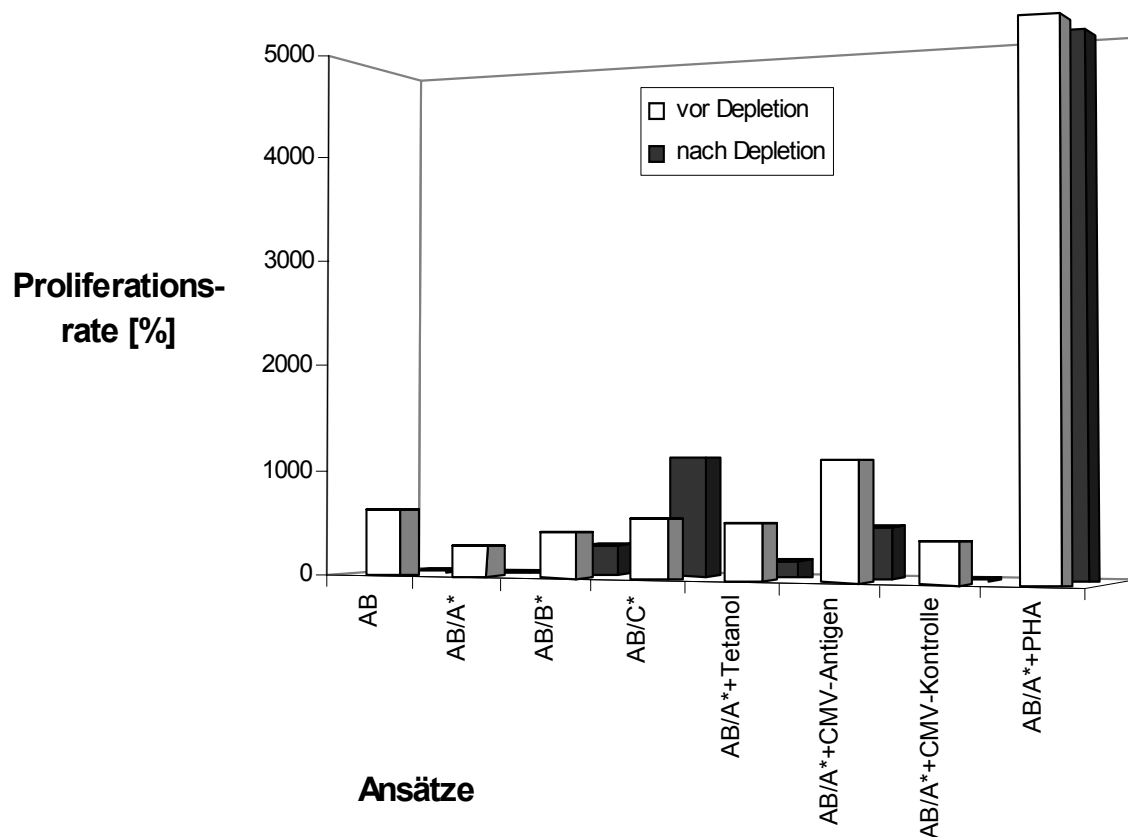


Abb. 3.2.3-16

[6- H^3]-Thymidin-Proliferations-Assay

MLC: stimuliert durch dendritische Zellen vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen



Während die initiale Proliferationsrate vor der Depletion in den einzelnen primären MLC-Ansätzen durch folgende Durchschnittswerte charakterisiert wurden: 100% in der MLC, die durch „unbehandelte“ PMNC stimuliert worden war, 122% \pm 21 in der MLC, die durch präinkubierte PMNC stimuliert worden war, sowie 627% \pm 624 in der MLC, die durch dendritische Zellen stimuliert worden war, umfasste die Situation nach der Depletion erheblich geringere Wachstumsraten. So wurden in den Lymphozytenmischkulturen, in Bezug auf den jeweiligen primären Zellkulturansatz nach der Depletion, 9% \pm 16,1 (1); 16% \pm 30,4 (2) und 13% \pm 23,3 (3) Wachstumsrate erzielt. Ähnlich verhielt es sich mit den Daten, die Hinweise auf

die allogene Reaktivität vor und nach der Elimination aktivierter T-Zellen lieferten, was durch eine Restimulation mit den Stimulatorzellen, die in den primären MLCs verwendet worden waren, simuliert wurde.

Mit Werten von $523\% \pm 440$ (1); $382\% \pm 335$ (2) und $423\% \pm 192$ (3) lag das Ausgangsniveau, was die Alloreaktivität anbelangte, auch noch nach sechs Tagen weit über den Werten nach der Depletion ($22\% \pm 20,1$ (1); $30\% \pm 28,2$ (2) und $283\% \pm 349,1$ (3)). Auch konnte, trotz des Depletionsverfahrens, eine Immunantwort gegen „third party“, Tetanus Toxoid, CMV-Antigen und Phythämagglutinin (PHA), ein unspezifischer T-Zellstimulator, nachgewiesen werden. Wie die tabellarische Übersicht Tab. 3.2.3-18 zeigt, blieb die Proliferationsrate nach der Depletion hinsichtlich der Reaktivierbarkeit gegenüber Tetanus Toxoid, CMV Antigen und PHA partiell erhalten. Betrachtet man dabei insbesondere die Reaktivität gegen die peripheren mononukleären Zellen einer dritten Person, so wurden bei allen Ansätzen nach der Depletion ($785\% \pm 1451,8$ (1); $1159\% \pm 2195,2$ (2) und $1116\% \pm 2140,3$ (3)), verglichen mit der initialen Situation vor der Depletion ($553\% \pm 786$ (1); $1200\% \pm 2016$ (2), sowie $564\% \pm 414$ (3)) sogar höhere Proliferationsraten gemessen. Diese Zahlen belegen, dass durch das Depletionsverfahren eine starke Reduktion der sekundären Immunantwort gegen allogene Stimulatorzellen erzielt werden konnte, während hingegen die primären Immunantworten gegen „third party“, Tetanus Toxoid, CMV Antigen und PHA zum Teil vollständig erhalten blieben.

4. Diskussion

4.1 Vergleichende Gegenüberstellung verschiedener Zellkultursysteme unter dem Gesichtspunkt der spezifischen allo-antigenen und mitogenen Lymphozytenaktivierung

4.1.1 Medienvergleich

Die MLC (mixed lymphocyte culture) ist eine etablierte klinische Methode für die Klasse II Histokompatibilitätstestung in Bezug auf die Alloimmunität im Rahmen von Knochenmark- oder Stammzelltransplantationen. Durch diese Methode können die stimulatorischen Effekte humaner Leukozyten-Antigene (HLA), insbesondere die, der Klasse II, sowie die der Minor-Histokompatibilitätsantigene, nachgewiesen werden.

Lymphozytenproliferations-Assays stellen eine der grundlegenden Möglichkeiten dar, um immunologische Reaktionen *in vitro* zu untersuchen. So ist der Nachweis von proliferativer Aktivität ein etabliertes Verfahren, um Immunantworten hinsichtlich verschiedener Fremdantigene oder anderer Aktivierungseffekte, die beispielsweise durch biochemische Substanzen hervorgerufen werden, quantifizieren zu können. Aus diesem Grund wurden in unseren Versuchen verschiedene Kultursysteme hinsichtlich ihres supportiven Verhaltens gegenüber proliferierenden T-Zellen untersucht, die durch einen allogenen (A/B*) und mitogenen (A + PHA) Stimulus aktiviert worden waren (siehe hierzu auch 2. Material/Methoden, 2.9.4 Der Medienvergleich und 3. Ergebnisse, 3.1.1 Medienvergleich). Als Beobachtungszeitraum wurde eine Kultivierungsdauer von fünf Tagen gewählt.

Unter den genannten Bedingungen zeigte sich, abhängig von dem jeweiligen Kultursystem, eine mehr oder weniger starke Zellproliferationsrate, gemessen an der $[6\text{-H}^3]$ -Thymidineinbaurate. Mit zunehmender Dauer der Kultivierung ließ der Farbumschlag des, im Kompletmedium enthaltenen Indikators, in einigen Kultursystemen (X-Vivo 15 + 10% FCS, sowie RPMI 1640 + 10% FCS jeweils unter Verwendung des mitogenen Stimulus PHA) auf ein stark sauer werdendes

Milieu schließen. Der rasche Abfall des pH-Werts, unterhalb des physiologischen Normbereichs von 7,35-7,45, dürfte auch der Grund für das Absterben einiger kultivierter Zellen gewesen sein, was bei den oben erwähnten Kultursystemen indirekt, über eine verminderte Einbaurrate des tritiummarkierten Thymidins in die zelleigene DNA, in Erscheinung trat. Die Zellsysteme (X-Vivo 15, X-Vivo 15 + 10% AB-Serum, RPMI 1640 + 10% AB-Serum und SFM), die infolge einer geringeren Zelldichte keinen Abfall des pH-Werts verzeichneten, blieben länger stabil und zeigten einen deutlich geringeren Anteil an toten, bzw. nicht zur Proteinbiosynthese befähigten Zellen. Die Entwicklung des pH-Wert-Abfalls wäre zwar durch einen Austausch des Mediums, sowie der jeweiligen Zusätze aufzuhalten gewesen, doch wäre dieses Vorgehen nicht mit den, in der Fragestellung enthaltenen Aspekten bezüglich der Unterschiede im proliferativen Verhalten von PMNC unter den jeweiligen Kulturbedingungen, vereinbar gewesen.

Das seit langem bestehende Interesse an einem chemisch definierten, serumfreien Medium hat, nach Erforschung der nutritiven und hormonellen Ansprüchen von Lymphozyten in Zellkultursystemen (167, 198), zur Entwicklung von so genannten Kompletmediem geführt. Das proliferative Verhalten von Lymphozyten in den Medien X-Vivo 15, RPMI 1640 und einem weiteren serumfreien Medium, dem AIM-V (Gibco), Medien, die auch im Rahmen unserer Studie Verwendung fanden, wurde anhand eines antigenspezifischen Proliferations-Assays untersucht (222). Hierbei wurden bei BALB/c Mäusen, nach Immunisierung mit Ovalbumin, Lymphknotenzellen entnommen und in Antigengegenwart in den Medien AIM-V, X-Vivo 15 und RPMI 1640 kultiviert. Dabei verzeichneten die, im AIM-V Medium kultivierten Lymphozyten, das beste Verhältnis zwischen antigenspezifischer und unspezifischer Proliferationsaktivität. Ferner wurden in diesem experimentellen Ansatz, sowohl die mitogeninduzierte, polyklonale, MHC-unabhängige (277), als auch die allogene und MHC-restringierte Immunantwort durch das Medium AIM-V unterstützt (222). Derartige Erkenntnisse stehen mit der Beobachtung im Einklang, dass RPMI 1640 nur mit einem Zusatz von 10% FCS in gleicher Weise in der Lage ist, die mitogeninduzierte Proliferation von peripheren mononukleären Zellen zu ermöglichen (64). In ähnlicher Weise wurden bei einer größeren Konzentration an

Lymphozyten ($> 5 \times 10^6$ PMNC/ml) nach PHA-Stimulation zwar höhere Zellproliferationsraten im RPMI 1640 Medium erzielt, doch war auch hier das Medium zuvor mit 2% humanem Plasma (Mix-Med) versetzt worden (255). Auch Needleman und Weiler beschrieben eine zellkonzentrationsabhängige Proliferationsrate von Lymphozyten (331). Serumfreie Medien unterstützten hier nur Kultursysteme, die mehr als 1×10^6 Zellen/ml enthielten. Diese Erkenntnis deckte sich mit unserer Beobachtung, nämlich, dass eine Responderzellzahl von 50.000 PMNC/well bei der Verwendung von serumfreien Medien nicht ausreichte, um durch einen mitogenen oder allogenen Stimulus in einem erkennbaren Umfang aktiviert zu werden. Der Grund hierfür ist unklar, doch könnte dabei die insuffiziente Menge an, von den Zellen selbst synthetisierten Metaboliten und Zytokinen, die für die Lebensfähigkeit und Proliferation einzelner Zellpopulationen nötig sind, eine Rolle spielen (41). In einem weiteren Experiment wurde daher, nach OKT3-Stimulation, in X-Vivo 15 Medien, verglichen mit AIM-V Medien, die größte Expansionsrate, sowohl der CD4⁺-, als auch der CD8⁺- T-Lymphozyten erzielt (61). Auch in unserem Fall schien das Medium X-Vivo 15 die allogene und die mitogene T-Zellaktivierung durch PHA optimal zu unterstützen, was auch anhand des Vergleichs entsprechender Stimulationsindizes deutlich wurde.

In Bezug auf die T-Zellproliferation wurden die meisten, in der Literatur beschriebenen Kultursysteme, mit Hilfe von Medien durchgeführt, die zuvor mit Serum versetzt worden waren (181). Durch den Zusatz von Serum bzw. Plasma ergab sich dabei zum einen eine verbesserte Lebensfähigkeit der Lymphozyten *in vitro* (169) und zum anderen eine verstärkte Zellproliferation als Antwort auf einen mitogenen oder antigenen Stimulus (6, 125, 184). Im Kontrast dazu galt bislang die Meinung, dass die Immunantwort der Lymphozyten, die in erster Linie durch den Zusatz von Serum zu dem entsprechenden Medium unterstützte wurde, von dem Ursprung und der Gewinnung (169), der Art der Lagerung (3, 486), sowie von der Konzentration des verwendeten Serums abhängen würde (6, 84) und somit einen erheblichen Unsicherheitsfaktor in der Replizierbarkeit der Ergebnisse darstellte. Ferner besäße das Serum/Plasma selbst die Eigenschaft, Lymphozyten zu stimulieren (211), sie zu inhibieren (76, 199) oder sogar Zellen abzutöten (55, 148). Dieser letzte Aspekt unterstreicht dabei die Wichtigkeit des ausschließlichen

Einsatzes von hitzeinaktiviertem Serum als Zellkulturzusatz. Dadurch konnten die oben beschriebene Interaktionen in allen unseren Experimenten vermieden werden.

In der Gegenüberstellung von humanem AB-Serum und fötalem Kälberserum (FCS) zeigte sich in unseren Kultursystemen tatsächlich, ebenso, wie in der Literatur beschrieben, ein sehr starker, unspezifischer stimulatorischer Effekt durch FCS am Tag drei nach dem Ansetzen der Zellkultur mit 114% vitaler Zellen, verglichen mit 100% vitaler Zellen vor Beginn der Kulturphase (331), sowie 82% vitaler Zellen am Tag 4, verglichen mit 49% vitaler PMNC in serumfreien Systemen (41). In unserem Experiment wurde die starke Hintergrundproliferation (222), ausgelöst durch FCS, als Farbumschlag des Indikators im Medium deutlich. Dieser Farbumschlag, bedingt durch die verminderte Überlebensfähigkeit der PMNC im sauren Milieu, resultierte letztlich auch in einer stark reduzierten Einbaurrate des tritiummarkierten Thymidins. Darüber hinaus ist die Verwendung von FCS, als Komponente im Zellkultursystem, laut GMP-Richtlinie (good manufacturing practice) nicht zugelassen, sofern die kultivierten Zellen für therapeutische Zwecke gedacht sind und anschließend in vivo zum Einsatz kommen sollen (255). Aus diesem Grund schied für uns die Verwendung von FCS als Zusatz zum Kulturmedium von vornherein aus. Anders verhielt es sich diesbezüglich mit humanen Komponenten, wie dem humanen AB-Serum, das, unter zuvor genannten Aspekten, durchaus als Medienzusatz verwendet werden konnte. In unserem Experiment wurde darüberhinaus ein maximaler Stimulationsindex (SI), sowohl in der allogenen, als auch in der mitogen induzierten Immunreaktion gesehen, wenn die PMNC in X-Vivo 15, das zuvor mit 10% AB-Serum versetzt worden war, kultiviert wurden. Diese Ergebnisse konnten in drei unabhängigen Experimenten repliziert werden. Ein Grund für die Unterstützung der Immunantwort durch das AB-Serum schien die Tatsache zu sein, dass einzelne Serumproteine eine wichtige Rolle in der initialen Phase der T-Zellaktivierung (G0- und G1-Phase des Zellzyklus) spielen (181), da, insbesondere durch den Zusatz von Serum, eine optimale Produktion von IL-2 und damit verbunden eine maximale Expression des IL-2-Rezeptors (CD25) auf der Zelloberfläche gewährleistet werden konnte. Den eigentlichen Serumproteinen kam in dieser Phase der Zellaktivierung lediglich die

Aufgabe zu, das sezernierte IL-2 in Lösung zu halten und eine Adsorption zu verhindern. Diese Beobachtung konnte auch von Kristensen et al. bestätigt werden, der, hinsichtlich der T-Zellaktivierung, zwischen einer Aktivierungsphase (G0-/G1-Phase) und Proliferationsprozessen (G1-/S-Phase) unterschied (212, 248). Innerhalb der G1-Phase schien hierbei der Intermediärzustand (Induktion der G1a-G1b Transition) besonders sensitiv auf den IL-2-Effekt zu reagieren (248). Insbesondere bei peripheren mononukleären Zellen von gesunden Spendern, die in Medien kultiviert wurden, die mit autologem Plasma oder AB-Serum angereichert worden waren, wurden dabei die obengenannten Bedingungen erfüllt (248). Da die IL-2 „getriggerte“ T-Zellaktivierung bei der allogenen Immunantwort eine wichtige Rolle spielt (7, 419, 472), was vor allem bei der Generation alloreaktiver T-Lymphozyten ausschlaggebend ist, wurde, besonders im Rahmen unserer Experimente, der Zusatz von humanem AB-Serum zu dem Kulturmedium X-Vivo 15 favorisiert.

Unter der Vorgabe, ein GMP-geeignetes Kultursystem für eine optimale allogene T-Zellaktivierung zu entwickeln, entschieden wir uns, aus bereits beschriebenen Gründen, für die Verwendung des Komplettmediums X-Vivo-15, das zusätzlich mit 10% humanem AB-Serum versetzt wurde. Die Tatsache, dass alle verwendeten Komponenten zum therapeutischen Einsatz am Menschen zugelassen waren und unter den genannten Bedingungen eine maximale allogene und mitogene Zellstimulation erreicht werden konnte, ohne dass es, durch die Veränderung des pH-Werts, zu einer Verschlechterung der Kulturbedingungen gekommen wäre, waren für diese Entscheidung ausschlaggebend.

4.1.2 Die MLC (mixed lymphocyte culture)

Eine allogene Reaktion, ähnlich der Immunreaktion, die während einer GVHD in vivo abläuft, kann in vitro generiert werden. Aus diesem Grund stellt die „mixed lymphocyte reaction“ (MLR) ein wichtiges in vitro Modell dar, wenn es darum geht, die Alloantigenerkennung durch T-Lymphozyten, sowie die nachfolgenden Reaktionen auf zellulärer Basis, verstehen zu können. Bestehen Unterschiede in

den MHC-Allelen der Klasse I und der Klasse II, so kommt es in den entsprechenden Kultursystemen gewöhnlich zu einer Lymphozytenproliferation, die anhand der [6- H^3]-Thymidininkorporation gemessen werden kann (1) (392). Dabei werden insbesondere zwei T-Zellsubklassen stimuliert, nämlich die T-Helfer Zellen, die die MHC-Antigene der Klasse II erkennen, sowie die zytotoxischen T-Zellen, die zwar durch MHC-Antigene der Klasse I aktiviert werden, jedoch keine signifikante Proliferationssteigerung in der herkömmlichen MLC aufweisen (1). Zwei Mechanismen scheinen dabei zu einer spezifischen T-Zellaktivierung in der MLC zu führen. Folglich werden die Responder-T-Lymphozyten, zum einen durch das Erkennen von intakten Fremd-MHC-Molekülen, den so genannten Haupt-Histokompatibilitätsantigenen auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), nämlich den Stimulatorzellen in der MLC, aktiviert, zum anderen kann dies auch durch das Erkennen von prozessierten Fremd-MHC-Peptidfragmenten, den Minor-Antigenen, erfolgen. Die Intensität der allogenen Immunantwort hing dabei, wie bereits zuvor (4. Diskussion, 4.1.1 Medienvergleich) diskutiert, von der Konzentration, der in Kultur befindlichen Zellen ab, da eine Verdünnung der Kultur stets mit einer Abnahme der allogenen Reaktivität einherging (270). Aus diesem Grund entschieden wir uns, die Stimulator- und Responderzellen in einer Dichte von 5×10^6 PMNC/ml in die jeweiligen Kultursysteme einzusetzen.

Naive T-Lymphozyten, die Alloantigene erkennen, treten nur in einer niedrigen Frequenz auf und benötigen spezialisierte, antigenpräsentierende Zellen, um, hinsichtlich des relevanten Antigens, aktiviert werden zu können. Bisher ging man davon aus, dass die T-Zell-Frequenz, im Hinblick auf die Fremdanerkennung, im peripheren Blut zwischen 1 und 10 % liegt (122, 307, 409). Im Gegensatz dazu wurde die Frequenz alloreaktiver T-Zellen in einigen Systemen mit $< 1/10.000$ angegeben, was darauf hinweisen könnte, dass der Nachweis der Alloreaktivität von der jeweiligen Zellspezies oder der Art der Analyse abhängt (39, 406, 479). Auf der anderen Seite könnte, durch Amplifikation der allogenen Immunantwort, mit Hilfe eines geeigneten T-Zellaktivierungsmodells *in vitro*, der Nachweis der Alloreaktivität modifiziert und verbessert werden. Die Induktion der primären, allogenen Immunantwort der Lymphozyten *in vitro* stellt daher noch immer eine Herausforderung an die moderne Forschung dar.

Aus diesem Grund versuchten wir optimale Bedingungen für die Generation alloreaktiver T-Lymphozyten zu schaffen, was unter zu Hilfenahme verschiedenster Leukozytenarten, nämlich periphere mononukleäre Zellen (PMNC), zytokinaktivierte PMNC und dendritische Zellen, als professionelle antigenpräsentierende Stimulatorzellen, bewerkstelligt wurde. Ausschlaggebend hierfür war die Vorgabe, einen Weg zu finden, um die Sensitivität der Standard-MLR zu verbessern und bislang unerkannt gebliebene Anzeichen der T-Zellaktivierung zu amplifizieren. In nachfolgenden Schritten sollten die generierten, alloreaktiven T-Lymphozyten anhand der spezifischen Immunphänotypisierung, des Zytokinmusters und des proliferativen Verhaltens, charakterisiert und quantitativ nachgewiesen werden. Die Intension, die hinter diesem Vorgehen stand, orientierte sich, im Hinblick auf die Depletion, daran, möglichst alle, potentiell alloreaktiven Zellen in einen Aktivierungsstatus zu versetzen. Anschließend sollte die Methode ausgewählt werden, die diesen Anforderungen am ehesten gerecht wurde.

Anhand des prozentualen Anteils an T-Lymphozyten, die die Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR auf der Zelloberfläche exprimierten, konnte indirekt auf die Potenz des jeweiligen allogenen Stimulus geschlossen werden. Im Rahmen unserer Versuche wurde dabei deutlich, dass die dendritischen Zellen (3), gefolgt von zytokinaktivierten PMNC (2) und herkömmlichen PMNC (1), entsprechend unseren Erwartungen, die potentesten allogene Stimulatoren darstellten. Hinsichtlich der Interferon- γ Sekretion waren die Differenzen zwischen den einzelnen Stimuli bei weitem nicht so eindeutig. Während, gemessen an den, im Elispot-Assay erzielten Stimulationsindizes, in der klassischen MLC (1), der zytokinstimulierten MLC (2) und der durch Dendriten aktivierten MLC (3), kein signifikanter Unterschied in der Art der Stimulation verzeichnet werden konnte, war dies anhand der, mit Hilfe des Sekretions-Assays gewonnenen Resultate, durchaus möglich. Die Ursache hierfür könnte zum einen in der Tatsache begründet liegen, dass mit Hilfe des Elispots keine Diskriminierung einzelner interferonproduzierender Zellen möglich war, zum anderen wäre es allerdings auch denkbar, dass die Stimulation durch dendritische Zellen, im Gegensatz zu den anderen Stimulationsarten, durch einen direkten Zell-Zellkontakt zustande kommt

und nicht mediatorvermittelt, d. h. zytokinabhängig, ist. Diese Vermutung deckt sich allerdings nicht mit der Tatsache, dass im Sekretions-Assay, durch selektive Oberflächenmarkierung der CD3⁺-Zellen, durchaus eine Unterscheidung in der allogenen Potenz der einzelnen Stimuli gelang. Die professionellsten allogenen Stimulatoren, gemessen anhand der Interferonproduktion der T-Lymphozyten, waren auch hier vor allem die dendritischen Zellen. Desweiteren war selbst beim Proliferationsnachweis hinsichtlich der Stimulationsverfahren durch „unbehandelte“ (1) und zytokininkubierte periphere mononukleäre Zellen (2) kein signifikanter Unterschied festzustellen, während hingegen die durchschnittlichen Proliferationsraten in der herkömmlichen und der zytokinmodifizierten MLC, verglichen mit der Stimulation durch dendritische Zellen erheblich differierten.

Diese Resultate ließen die Schlussfolgerung zu, dass, zumindest in den primären MLCs, das alloantigeninduzierte Stimulationsverfahren durch dendritische Zellen zur stärksten T-Zellaktivierung geführt hatte.

4.1.2.1 Identifizierung und Charakterisierung alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe der Oberflächenphänotypisierung

Anders, als die zum Nachweis aktiver Zellen allgemein verwendeten Proliferations-Assays, ermöglicht das durchflußzytometrische Verfahren eine zusätzliche Identifizierung dieser Zellen. Aus diesem Grund stellt die Oberflächenphänotypisierung das einzige Verfahren dar, das bei der Klärung der Fragen, nach der Identifizierung alloantigenaktivierter T-Zellsubpopulation, der Potenz einzelner Stimuli und dem eigentlichen Ausmaß der Zellaktivierung, helfen könnte.

Aktivierte und proliferierende T-Zellen exprimieren in erster Linie die Oberflächenmoleküle CD25, CD69, CD71 und HLA-DR, die im Normalfall nur in geringem Umfang auf ruhenden Lymphozyten zu finden sind (70, 98, 236, 329, 411);(128). Im Einklang mit unseren Experimenten, hinsichtlich der Kinetik der Aktivierungsantigene, konnte Fehse et al., anhand eines experimentellen Ansatzes, indem T-Lymphozyten durch eine Schicht adhärerender allogener Stimulatorzellen stimuliert wurden, ebenfalls zeigen, dass diese

Aktivierungsmethode zu einem deutlichen Zuwachs der CD25- und der CD69-, sowie zu einem geringeren, aber dennoch signifikanten Zuwachs der CD71- und der CD40L-Expression auf den Responder-Lymphozyten führte (115). Um die T-Zellsubpopulation näher bestimmen zu können, die den größten Anteil, an der bereits beschriebenen allogenen Reaktion ausmachte, untersuchte Fehse et al. sämtliche CD4⁺- und CD8⁺-Zellen zum einen getrennt voneinander, zum anderen aber auch in Kombination miteinander. Dabei zeigten vor allem die CD4⁺-Zellen eine vermehrte Expression des CD25- und des CD69-Antigens, während die CD8⁺-Lymphozyten in erster Linie das CD69 Molekül exprimierten. Im Gegensatz dazu konnte, bei der Zellpopulation, bestehend aus gereinigten CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, unter vergleichbaren, kulturellen Bedingungen kein Zuwachs hinsichtlich der CD25-Antigenexpression auf CD8⁺-Zellen (bis zu 10% der CD8⁺-Zellen exprimierten in diesem Ansatz das CD25 Molekül) nachgewiesen werden. Dies ließ den Schluss zu, dass die Gegenwart von CD4⁺-Zellen offensichtlich nicht ausreichte, um eine adäquate Alloaktivierung der CD8⁺-Zellen zu generieren (115). Koh et al. konnte, in Übereinstimmung mit bereits Erwähntem, zeigen, dass die CD69-Expression, im Rahmen einer allogenen Aktivierung, hoch reguliert wird und dass dieses Molekül folglich als Marker für die Alloreaktivität herangezogen werden kann (238). Hinsichtlich der, auch für unsere Nachweisverfahren relevanten Frage, ob eine vermehrte Expression von CD69 auf T-Lymphozyten möglicher Weise mit der gesteigerten Zellproliferation und der Zunahme der Sekretionsrate der Zytokine IL-2 und IFN- γ , in Zusammenhang steht (70), konnte, zumindest in Bezug auf die proliferative Aktivität entsprechender Zellen, gezeigt werden, dass die CD69-Expression und die [6-H³]-Thymidininkorporation in der Tat miteinander in Verbindung zu stehen scheinen (286). Eine besonders gute Korrelation ließ sich diesbezüglich zwischen der Anzahl an Zellen, die sich, nach PHA- oder ConA-Stimulation, in der G1-Phase des Zellzyklus befanden und der [6-H³]-Thymidininkorporation feststellen (248). Allerdings konnte, wie auch durch unsere Versuche bestätigt, keine Korrelation zwischen dem Prozentsatz CD69⁺ Zellen und dem Umfang der [6-H³]-Thymidininkorporation nachgewiesen werden (63). Im Vergleich zu der Expression von Aktivierungsmarkern und der Zellproliferation, wurde ferner festgestellt, dass CD69 schon vor der ersten

Teilungsphase in einem hohen Prozentsatz auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten vorzufinden war, während CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) erst nach der ersten Zellteilung vermehrt exprimiert wurde (309). Diese Ergebnisse würden auch mit folgender Überlegung im Einklang stehen, nämlich, dass die CD69-Expression als erstes biochemisches Ereignis vor der Lymphozytenproliferation einsetzt, aber die eigentliche Zellproliferation nicht konditioniert (163, 286). Ferner ließ sich daraus schließen, dass nicht alle Zellen, die den Zustand der Aktivierung erreicht hatten, DNA Synthese betrieben (63, 216);(393) und dass der punktuelle Nachweis, proliferativer Aktivität, nicht ausreichte, um das Vorhandensein aktivierter Zellen zu bestätigen bzw. auszuschließen (siehe hierzu auch 4. Diskussion, 4.1.2.3 Proliferation als Indikator der T-Zellaktivität). Diese These stand allerdings im Kontrast zu der Beobachtung von Maino et al., der, nach der Stimulation von PMNC mit einer Mischung aus anti-CD2/CD2R mitogenen mAb, hinsichtlich der CD69-Expression und der Proliferation entsprechender PMNC, stets positiv korrelierende Ergebnisse erhielt (298).

4.1.2.2 Identifizierung und Charakterisierung alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe des Interferon- γ -Nachweises

Auch Zytokine spielen eine kritische Rolle bei der Erkennung von Alloantigenen und gelten daher neuerdings, im Gegensatz zu den bereits etablierten Proliferations-Assays, als weitaus spezifischere Parameter für die T-Zellaktivierung. Dieser Gesichtspunkt konnte durch folgendes Experiment bestätigt werden. Durch die Zugabe von rIFN zu einer MLC kam es zu einer vermehrten Freisetzung von sCD8-Molekülen, als Hinweis darauf, dass IFN- γ , im Gegensatz zu IL-2, welches vornehmlich an der Zellproliferation beteiligt ist, in erster Linie zur T-Zelldifferenzierung beiträgt. Eine Prospektive Messung von IFN- γ , als quantitativer Parameter für Th1-Zellen- bzw. CTL-Aktivierung, scheint daher, im Hinblick auf den Nachweis von Alloreaktivität, bei weitem spezifischer zu sein, als die herkömmlichen Proliferationsnachweise (410). Danzer et al. konnte darüber hinaus zeigen, dass IFN- γ , im Rahmen der Alloantigenenerkennung, eine zentrale Rolle im Zytokinnetzwerk der MLC einnimmt (91). So wurde, durch Zugabe von

exogenem IFN- γ (rIFN) in einer Konzentration von mehr als 100 U/ml, neben der Zelldifferenzierung auch die proliferative Zellaktivität in der jeweiligen Lymphozytenmischkultur verstärkt (454). Voraussetzung war allerdings, dass IFN- γ von Anfang an in der Kultur vorhanden war. Daneben vermutete man, dass synergistische Effekte durch IL-2 und den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) bei der IFN- γ Produktion eine Rolle spielen würden (482);(223);(357);(145), während IFN- γ alleine einen stimulatorischen Einfluss auf die Expression des IL-2 Rezeptors auf der Oberfläche von Lymphozyten zu haben schien (382). Periphere mononukleäre Zellen, die durch eine allogene MLC stimuliert worden waren, produzierten darüber hinaus, wie von uns bestätigt, große Mengen an IFN- γ . In diesem Zusammenhang war es einigen Arbeitsgruppen möglich, bis zu 600 U/ml IFN- γ nach drei und etwa 400 bis 1500 U/ml IFN- γ nach sieben Tagen MLC-Kultur im Überstand einzelner Kultursysteme nachzuweisen (454). Betrachtete man die Sekretionskinetik von IFN- γ , so stimmten die Literaturangaben mit den von uns durchgeführten Interferonanalysen (nicht gezeigt) auch in einem weiteren Punkt überein. Am Tag drei der Zellkultivierung kam es dabei nämlich zu einem deutlichen Anstieg der IFN- γ Produktion, wobei an den Tagen fünf und sechs der Höhepunkt der Zytokinsekretion erreicht wurde (91). Selbst in der murinen MLR erreichte die IFN- γ Konzentration am Tag drei ihren Höchststand und nahm an den beiden darauffolgenden Tagen nur geringfügig ab. In diesem Zusammenhang konnte, am Tag vier der Kultivierung, ein Maximum an zellulärer Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten festgestellt werden (56). In einer weiteren Studie wurde die Expressionskinetik des 90-kDa IFN- γ -Rezeptors auf der Zelloberfläche von allogenen stimulierten Lymphozyten untersucht (338). Dabei wurde festgestellt, dass das IFN- γ -Rezeptorprotein kaum auf der Oberflächenmembran von ruhenden T-Zellen zu finden war, aber nach dreitägiger Kultur vermehrt exprimiert wurde und nach sechs Tagen rapide abnahm. Parallel dazu ließ sich eine vermehrte Expression der p55 und der p75 Ketten des IL-2 Rezeptors feststellen, die bis über den Tag sechs der Zellkultivierung hinaus andauerte. Folglich setzten die IFN- γ und IL-2 Sekretion nach 24 stündiger Alloaktivierung ein, erreichten am Tag drei ihren Höhepunkt und nahmen ab, sobald die beiden Zytokinrezeptoren vermehrt exprimiert wurden. Die, zur gleichen Zeit einsetzende Zellproliferation,

verzeichnete ihr Maximum allerdings erst am Tag sechs. Dies ließ vermuten, dass die Intensität der Lymphozytenproliferation, sowie die „up-Modulierung“ des IFN- γ -Rezeptors auf der Zellmembran, mit der Sekretion von IL-2 und IFN- γ interagierten (338). Allerdings war IL-2 in diesem Modell, als einziges Lymphokin an der Proliferation und Aktivierung zytotoxischer T-Zellen beteiligt. Entgegen Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen (257, 414), wurde dabei die Zellproliferation durch Zugabe von IFN- γ nicht beeinflusst (56). Das ließ vermuten, dass beim Menschen, hinsichtlich der allogenen Immunantwort, ein Feedbackmechanismus zwischen den beiden Zytokinen IL-2 und IFN- γ bestehen muss, der in der murinen MLC kaum vorhanden ist (56). Dies könnte, entweder auf den Ursprung der Zellen (humane Blutkörperchen gegenüber Splenozyten der Maus), oder auf Kreuzreaktivitäten in den verwendeten Bio-Assays zurückzuführen sein. In Anbetracht ebenerwähnter Beobachtungen, sowie der Tatsache, dass auch durch andere Arbeitsgruppen, mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen gezeigt werden konnte, dass die RNA des IFN- γ -Rezeptors bis zum Tag drei der MLR um das Zwei- bis Dreifache zunahm (338), wählten wir die Tage vier und fünf für den Interferon- γ Nachweis. Damit sollte gewährleistet werden, dass alle alloreaktiven T-Lymphozyten identifiziert werden konnten.

Unabhängig davon konnte, wie bereits erwähnt, gezeigt werden, dass durch den Zusatz von IFN- γ zu einer MLC, neben der Zellproliferationsrate auch die T-Zell vermittelte Zytotoxizität vermehrt nachweisbar war (410). Dies spiegelte sich, in einer vermehrten Expression der CD8 Moleküle, bei gleichbleibender Anzahl an CD4 Molekülen, auf entsprechenden alloreaktiven T-Lymphozyten wieder. Allerdings wurde dabei auch die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR durch die Zugabe von IFN- γ gefördert. Dies implizierte, dass IFN- γ die T-Zellaktivierung in einer MLC beeinflusst. Folglich erstreckten sich die IFN- γ -Effekte direkt auf die T-Lymphozyten, was zur Unterstützung der T-Zelldifferenzierung führte und in erster Linie die Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen förderte (410). In Bezug auf CD8⁺-Zelle konnte auch, anhand eines Mausmodells, gezeigt werden, als CD44^{low} CD8⁺-T-Zellen aus naiven, P-14 TCR transgenen Mäusen mit CFSE markiert und in einer Größenordnung von 0,4 - 1 x 10⁶ Zellen in Empfängermäuse injiziert wurden (326), dass nur sehr wenige, bis gar keine naiven, transgenen CD8⁺

Zellen fähig waren, IFN- γ zu produzieren. Die Mehrheit der transgenen Zellen, die acht Tage lang in bestrahlten Empfängern homeostatisch proliferierte, waren dagegen, nach spezifischer Antigenstimulation, durchaus in der Lage, IFN- γ zu sezernieren. Untersuchte man die Aquisitation der Zytokinantwort, als Funktion der Zelldivisionsrate, so konnte im Mausexperiment gezeigt werden, dass eine vermehrte Produktion von IFN- γ direkt mit der Zellteilungsrate korrelierte. Folglich nahm der Anteil der Zellen, die Interferon sezernierten, sowie der relative Anteil an sezerniertem IFN- γ parallel, mit zunehmender Zellproliferationsrate, ebenfalls zu (326). Dies würde darauf hindeuten, dass, sowohl der Interferon-, als auch der Proliferationsnachweis eine ausreichende Sensitivität besitzt, um alloreaktive Zellen zu detektieren. Folglich würde im Mausmodell lediglich ein Nachweisverfahren, ausreichen, um Alloreaktivität zu verifizieren. Diese Tatsache konnte dagegen durch das Mausexperiment von Maury et al. nicht bestätigt werden. Die T-Lymphozyten, die aus den Lymphknoten, sowie der Milz B6 hCD4 transgener Mäuse entnommen und in semiallogene (B6/D2) und letal bestrahlte (11 Gy) Mäuse übertragen worden waren, um dort acht Tage lang zu proliferieren und anschließend, im Hinblick auf die Fähigkeit zur Interferonsekretion, nach weiterer vierstündiger Stimulation mittels eines anti-CD3 mAb, *in vitro* getestet zu werden, konnten, anders als in unseren und den zuvor erwähnten Experimenten von Murah-Krishna et al., dabei nicht allein anhand der Interferonsekretion identifiziert werden (309). In dem Mausmodell von Fowler et al. erhielten die Empfängermäuse der ersten Filialgeneration eine letale Strahlendosis von 1050 cGy. Das Immunsystem wurden anschließend, mit Hilfe eines T-Zell-depletierten Knochenmarks, rekonstituiert (126). Anhand dieses Mausmodells konnte gezeigt werden, dass CD8⁺-Zellen, die in der Gegenwart von IL-12 (Th1) generiert worden waren, sowohl IL-2 als auch Interferon, im Rahmen der Immunantwort gegen die Splenozyten der ersten Filialgeneration, produzierten. Auch bei der Th2 Subpopulation konnte eine geringe Menge an Interferon im Zellüberstand nachgewiesen werden, doch war die Interferonkonzentration in dieser Kultur signifikant geringer, als das in der Th1 -Kultur der Fall gewesen war (so wurden in der Th1 Kultur 305 U/ml Interferon produziert, während in der Th2 Kultur nur 65 U/ml sezerniert wurden). Die Zytokinproduktion erforderte allerdings in beiden

Kultursystemen eine spezifische allogene Stimulation, da es zu keiner Zytokinproduktion kam, als syngene B6 Milzzellen als Stimulatoren herangezogen wurden (126). Diese Beobachtung deckte sich mit der Tatsache, dass die IFN- γ /IFN- γ -Rezeptor-Interaktionen ein frühes Signal in der T-Zellaktivierung repräsentierte (339) und dass die Intensität der MLR von dem Typ der APC abhing. Weitere Angaben in der Literatur besagen in diesem Zusammenhang, dass die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellblasten durch eine große Vielfalt an HLA-DR⁺-Zellen induziert werden kann (120, 134, 308, 361, 362). Im Vergleich zu der Stimulationspotenz von B-Zellen oder Makrophagen konnte dabei eine stärkere allogene Aktivität aufgezeigt werden, wenn die Lymphozyten durch allogene, lymphoblastoide Zellen aktiviert worden waren. Dabei verliefen die „Hoch-Regulation“ des IFN- γ Rezeptors, die IL-2 und die IFN- γ Sekretion sowie die Zellproliferation parallel. Diese Unterschiede in der Stimulation schienen durch die Menge und die Art der Oberflächenantigene auf den Stimulatorzellen, oder deren Fähigkeit, ko-stimulatorische Signale auszusenden, verursacht worden zu sein (338). Grund für diese Annahme war die Tatsache, dass lymphoblastoide Zellen, im Vergleich zu B-Zellen und Makrophagen, vermehrt HLA-DR-Antigene exprimierten und eine größere Menge an IL-12 produzierten, das entweder alleine oder zusammen mit IL-2, die IFN- γ Sekretion der PMNC stimulieren konnte (338). Im murinen Modell konnten Liu und Janeway zeigen, dass die Präsenz von professionellen, antigenpräsentierenden Zellen zu einer IFN- γ -abhängigen T-Zellproliferation führte, während unprofessionelle APC, die nicht über ko-stimulatorische Signale verfügten, eine Elimination interagierender Lymphozyten bedingte (284). Ellis et al. untersuchte in diesem Zusammenhang, die Rolle der verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen, als Induktoren der sekretorischen Aktivität von T-Zellen, im Rahmen allogener Immunantworten (108). Hierbei waren die dendritischen Zellen die potentesten Induktoren der IL-3 und IFN- γ Sekretion, vorausgesetzt, es handelte sich um primäre Immunantworten. Auch im Hinblick auf die Zellaktivierung im Rahmen einer sekundären Immunantwort wurden, nach einer allogenen Stimulation durch Makrophagen und B-Zellen, deutlich geringere Mengen an sezerniertem IFN- γ im Zellkulturüberstand gemessen, als dies durch die Stimulation mittels dendritischer Zellen der Fall war. Hinsichtlich einer tertiären

Immunantwort kam es diesbezüglich zu keiner Veränderung. Folglich stellten die dendritischen Zellen, Gewebemakrophagen und aktivierten B-Zellen, was auch von uns bestätigt werden konnte, eine Hierarchie in Hinblick auf die allostimulatorische Potenz dar. Dies konnte, anhand der sezernierten Mengen an Zytokinen, namentlich IL-3, IL-2, IL-4 und IFN- γ zum Ausdruck gebracht werden (108). Die in diesen Aktivierungsvorgang ebenfalls involvierten T-Helferzellen konnten, hinsichtlich ihres Zytokinmusters, in zwei Subpopulationen unterteilt werden (2). Die Th1 Zellen ließen sich dabei durch die Sekretion von IL-2 und Interferon- γ charakterisieren, die Th2 Zellen u. a. durch IL-4 und IL-10. Betrachtete man, im Zusammenhang mit zuvor erwähnter IFN-Produktion, die CD4⁺-Lymphozyten, so handelt es sich dabei in der Regel um Th1 Zellen.

Dendritische Zellen besitzen darüber hinaus die Fähigkeit, unter geeigneten Bedingungen, biologisch aktives IL-12 p70 zu sezernieren, das die Differenzierung von T-Helferzellen in Richtung Th1 Zellen lenkt (294) (183, 188). In dem Experiment von Graziutti et al. waren lediglich dendritische Zellen in der Lage, in diesem Fall Abkömmlinge aus Makrophagen gesunder Spender, die zuvor hitzeinaktivierte *Aspergillus Fumigatus* Konidien phagozytiert hatten, die Lymphozyten gesunder Spender zur IFN- γ Produktion anzuregen (147). Auf diese Weise wurden, zuvor aufgestellte Behauptungen bestätigt. Langenkamp et al. (260) konnte, im Gegensatz dazu, zeigen, dass Dendriten das Zytokin IL-12, das für den T-Zell-Polarisierungsprozess ausschlaggebend war, nur vorübergehend, nach Stimulation mit dem Lipopolysaccharid (LPS), sezernierten. Aus diesem Grund wurde zunächst die Th1 Immunantwort unterstützt, während zu einem späteren Zeitpunkt die gleichen Zellen vorzugsweise die Th2, sowie nicht polarisierte Zellen zur Zytokinsekretion anregten. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache scheint die Stimulation durch dendritische Zellen, so wie sie auch in unserem Experiment durchgeführt wurde, lediglich in der Anfangsphase zu einer Aktivierung alloreaktiver Th1 Zellen zu führen. Alle, zu einem späteren Zeitpunkt stattfindenden Nachweisverfahren, z. B. nach Restimulation durch dendritische Zellen im Rahmen einer sekundären Immunantwort, erfassten folglich Immunantworten der Th2 Zellen. Diese Tatsache könnte den hohen Anteil an verbleibender Alloreaktivität nach der immunomagnetischen Depletion und

Restimulation durch Dendriten erklären (siehe 3. Ergebnisse, 3.2.2 Interferon- γ Nachweis und 3.2.3 [6- H^3]-Thymidineinbau sowie 4. Diskussion, 4.3.2.2 Verbleibende Aktivierbarkeit nach der Depletion alloreaktiver Zelle).

Im Einklang, mit zuvor Erwähntem, scheint auch die Beobachtung zu stehen, dass die immunregulatorischen Effekte von IFN- γ in der MLC nicht durch einen direkten Zellkontakt zwischen Responder- und Targetzellen zustande kommen (454), sondern mediatorvermittelt, d.h. zytokinabhängig verlaufen. Dies konnte auch in unseren Versuchen, u. a. durch eine erhöhte Interferonsekretion einzelner T-Lymphozyten, die durch zytokinpräinkubierte PMNC stimuliert worden waren, zum Ausdruck gebracht werden. Aus diesem Grund ist es fraglich, ob durch den Interferonnachweis tatsächlich alloreaktive Zellen erfasst werden, oder ob auf diese Weise generell aktive, interferonsezernierende Zellen nachgewiesen werden, die zuvor nicht notwendigerweise durch Alloantigene stimuliert worden waren.

Da die beiden Zytokine IL-2 und IFN- γ von aktiven T-Zellen sezerniert werden, untersuchte Danzer et al., ob die absolute Menge an genannten Zytokinen durch die T-Zellkonzentration in der Kultur reguliert werden kann (91). Dabei konnte, in Abhängigkeit von der Anzahl an T-Lymphozyten, ein Zusammenhang mit dem Umfang der IFN- γ Produktion hergestellt werden. Dies würde bedeuten, dass der IFN- γ Nachweis, gegenüber oben geäußelter Befürchtung, durchaus eine quantitative Aussage hinsichtlich der Anzahl alloreaktiver Zellen zuließe.

4.1.2.3 Proliferation als Indikator der T-Zellaktivität

Eine herkömmliche Methode, um die zelluläre Immunantwort nach einem spezifischen Antigenkontakt in vitro quantifizieren zu können, besteht im Nachweis der Zellproliferation durch Messung der Inkorporation von tritiummarkierten Thymidin (85). Vergleicht man die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25, mit der Thymidininkorporation, so können beide Methoden zur Erkennung von T-Lymphozyten-Antworten, hinsichtlich verschiedener Mitogene oder spezifischer Antigene, herangezogen werden (63, 249, 298). Dabei geht die Expression beider Aktivierungsmarker, der Zellproliferation voraus und korreliert nicht signifikant mit der Intensität der Proliferation (270).

Es ist allerdings auch bekannt, dass T-Zellen sehr stark proliferieren können, wenn

sie in immundefiziente Empfänger gegeben werden (440). Diese, so genannte „homeostatische“ Proliferation, trat dabei im Tiermodell sofort auf, sobald eine kleine Anzahl an T-Zellen in T-Zell-depletierte syngene, SCID, RAG-defiziente (recombination activating gene) oder bestrahlte Empfänger gegeben worden war (36, 381). In einem weiteren Mausmodell proliferierten Spender-T-Zellen von CD28^{-/-} C57BL/6 Mäusen sehr stark, nachdem sie in C3H/HeJ Empfängermäuse transferiert worden waren, die hinsichtlich der HLA-Moleküle keinerlei Übereinstimmungen aufwiesen. Der Proliferationsbeginn erfolgte dabei sehr rasch, so dass sich die Zellen nach 48 Stunden bereits viermal und nach 72 Stunden sogar sieben- bis achtmal geteilt hatten. Allerdings kam es zu einer Verzögerung der Immunantwort, als die T-Zellen gegen die Minor-Antigene von C3H.SW Mäusen reagieren sollten. Auch die Frequenz alloreaktiver Zellen war in diesem Modell deutlich reduziert (424). Aus diesen Beobachtungen ergab sich die Hypothese, dass die Proliferationsantwort bei allogenen Transplantationen rasch, bei syngenen Transplantationen allerdings bedeutend langsamer bzw. nicht nachweisbar verläuft. Krieger et al. konnten, anhand von Proliferationsnachweisen zeigen, dass CD4^{high} T-Lymphozyten in vitro zunächst auf Alloantigene reagierten und anschließend die Memory/Aktivierungsmarker CD44^{high} und CD69^{high} exprimierten. Auch in vivo, d. h. in BALB/c (H-2d) Empfängermäusen eines Hauttransplantats von C57BL/6 (H-2b) waren diese CD4^{high} Zellen vorhanden (247). Maury et al. untersuchte die proliferative Aktivität von T-Zellen anhand eines Mausexperimentes, in dem T-Lymphozyten aus den Lymphknoten, sowie der Milz B6 hCD4 transgener Mäuse entnommen und in semiallogene (B6/D2), letal bestrahlte (11Gy) Mäuse übertragen wurden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass, sowohl die Subpopulation der CD4⁺, als auch die der CD8⁺-Zellen zu proliferieren begann (309). 40 Stunden nach der DLI hatten sich die Zellen bereits dreimal geteilt, 88 Stunden später sogar durchschnittlich mehr als achtmal. Hinsichtlich dieser Zellteilungskinetik war es möglich, alloreaktive Zellen von Zellen zu unterscheiden, die, auf Grund von homeostatischen Signalen, in lymphopenischen Empfängern proliferierten (309). Ähnliche Ergebnisse wurden in einem weiteren Experiment erzielt, in dem CFSE markierte C57BL/6 (H-2b) Milz- und Lymphknotenzellen auf C57BL/6xDBA F1 (H-2b/d) Empfänger übertragen

wurden. Allerdings verlief die Proliferationsantwort alloreaktiver Zellen in diesem Zusammenhang sehr heterogen. So hatte sich zu diesem Zeitpunkt ein Teil der Zellen achtmal geteilt, während der andere Teil, entweder gar keine, oder nur eine geringe Teilungsrates aufwies. Bei näherer Betrachtung des Proliferationsprofils fiel auf, dass die Mehrheit der Zellen aus einer Subpopulation an CD4⁺-T-Lymphozyten bestand. Um die Alloreaktivität näher zu quantifizieren, wurde 48 Stunden nach dem Zelltransfer, die CD69 Expression näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass 40-50% der alloreaktiven CD4⁺-Spenderzellen nicht in der Lage waren, zu proliferieren (485) (149). Dies lässt vermuten, dass selbst eine, in vivo sehr stark ablaufende allogene Immunantwort, zu einer, individuell unterschiedlichen T-Zellproliferation führen kann. In einem früheren Experiment konnte gezeigt werden, dass Splenozyten, die in vitro mit anti-CD3 und anti-CD8 Antikörpern stimuliert worden waren (485) und dass T-Lymphozyten in Mäusen, die eine adoptive Immuntherapie mit DO11.10 T-Zellen erhalten hatten und einen transgenen OVA-Peptid spezifischen T-Zellrezeptor trugen (149), zum Teil nicht in der Lage waren zu proliferieren. Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass beinahe 100% der mitogenstimulierten Splenozyten in vitro und CO11.10 Zellen, die nach der Immunisierung in den behandelten Mäusen auftraten, die Oberflächenmarker CD25 und CD69 exprimierten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass man, um die Frequenz alloreaktiver Precursoren näher bestimmen zu können, neben der Zellproliferation zumindest die Phänotypisierung in die Identifizierung alloreaktiver Zellen mit einbeziehen muss, da nicht alle alloreaktiven Zellen zum Zeitpunkt des Nachweises proliferieren. Betrachtet man unsere Experimente, mit den, in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, so scheint es in erster Linie dann zu einer gesteigerten Proliferation zu kommen, wenn Responder- und Stimulatorzellen in direkten Kontakt miteinander treten und eine entsprechend hohe Antigendichte auf den Stimulatoren vorhanden ist. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass es bei allen, nicht an der Immunreaktion beteiligten Spenderlymphozyten, den so genannten Bystander-Zellen, zu einem induzierten Zelltod kam (420). Diese Daten belegen, dass diese Zellen keine potentielle Gefahr hinsichtlich der Alloreaktivität

darstellen, auch wenn sie durch den Proliferationsnachweis nicht erfasst werden können.

4.1.2.4 Begründung für den Einsatz zytokinmodifizierter PMNC als antigen-präsentierende Stimulatorzellen

Das Erkennen allogener MHC-Antigene in Kombination mit Peptidliganden löst starke T-Zellantworten gegen Haupt-Histokompatibilitätsantigene aus, was in vitro anhand einer primären MLR nachvollzogen werden kann (215, 307, 409) (90). Dabei werden durch Minor-Histokompatibilitätsantigene im Normalfall keine erkennbaren T-Zellproliferationsraten hervorgerufen (20). Bishara et al. demonstrierte, dass die Vorbehandlung der Stimulatorzellen mit Zytokinen ebenso, wie der nachfolgende Zusatz von Zytokinen zu einer MLC, geringe Unterschiede in den Antigenen HLA-identischer Geschwister anhand der vermehrten mHA-Expression aufdecken konnten (38, 238). Die Behandlung der Stimulatorzellen durch Zytokine scheint dabei neben der Expression von MHC- auch Nicht-MHC-Determinanten auf der Zelloberfläche zu vermehren (253). Diese Unterschiede in den Antigenen, die durch eine verstärkte Alloreaktion in den bereits beschriebenen, modifizierten MLR-Assays in Erscheinung traten, stehen möglicherweise auch mit bisher noch nicht bekannten, polymorphen MHC-Determinanten oder mit dem Minor-Histokompatibilitätssystem (mHA) im Zusammenhang. Die mHA stammen von normalen polymorphen Zellproteinen ab, die auf MHC Molekülen präsentiert werden und auf eine MHC restringierte Weise erkannt werden können (144). So war es möglich, durch den Einsatz von zytokinmodifizierten PMNC als Stimulatoren der allogenen Immunantwort, eine höhere Frequenz an alloreaktiven Lymphozyten zu generieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Resultate der modifizierten MLC, im Bezug auf die Inzidenz der klinischen GVHD nach der Transplantation, prädiktive Aussagekraft besaßen (38, 238).

4.1.2.5 Begründung für den Einsatz dendritischer Zellen als antigen-präsentierende Stimulatorzellen

Dendritische Zellen sind als antigenpräsentierende Zellen bekannt, die auf eine professionelle, antigenspezifische Aktivierung naiver T-Zellen spezialisiert sind (166). Dabei kommt den B-Lymphozyten und Monozyten, als fakultativ antigenpräsentierende Zellen nur eine geringe Bedeutung zu. Dendritische Zellen sind zudem die einzigen antigenpräsentierenden Zellen, die die Fähigkeit besitzen, bei naiven T-Zellen eine primäre Immunantwort hervorzurufen (25, 166), da sie, neben der Antigenpräsentation, ko-stimulatorische Signale, sowie proinflammatorische Zytokine für die T-Zellaktivierung zur Verfügung stellen (431). Die Antigenprozessierung, sowie das Aussenden ko-stimulatorischer Signale hängt dabei vom Aktivierungs- und Differenzierungszustand der dendritischen Zellen ab (193, 306, 336, 385). Der Vorgang der T-Zellaktivierung verlangt folglich nicht nur ein Signal via des T-Zellrezeptors, sondern ein zweites, zusätzliches Signal, das durch die Interaktion der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen mit den CD28 und CTLA-4 Molekülen auf T-Lymphozyten zu Stande kommt (272). Daneben scheinen aber noch weitere Faktoren, die die Stabilität der Zellinteraktionen zwischen Dendriten und T-Zellen (Clusterformation) verstärken, sowie apoptotische Signale, die das Überleben der APC und der Lymphozyten regulieren, eine wichtige Rolle zu spielen (71, 237). Die Clusterformation, bestehend aus dendritischen Zellen und T-Zellen, erfordert ein intaktes Zytoskelett der Dendriten, sowie eine Aktivierung der Proteinkinase C (396), um Adhäsionsinteraktionen zu initiieren (367). Dieser Prozess verläuft anfänglich antigenunabhängig (119). Sobald jedoch eine spezifische Antigenerkennung durch T-Lymphozyten erfolgt, wird dieser Cluster durch weitere Ereignisse stabilisiert. Zu diesen Stabilisatoren zählen zunächst die Adhäsionsmoleküle (195, 233, 367, 428, 490), aber auch ko-stimulatorische Moleküle, die zusätzliche Signale zur Initiierung der T-Lymphozytenaktivierung aussenden, ohne die es zu einer Zellanergie und letztlich zum Zelltod kommen würde (150, 205, 400, 438).

Bisher durchgeführte Experimente haben gezeigt, dass es auf verschiedenen Wegen möglich ist, Monozyten aus dem peripheren Blut zu potenten

allostimulatorischen Zellen in vitro ausdifferenzieren zu lassen (53, 54, 220, 356, 363, 388). Insbesondere eine Zytokinkombination, bestehend aus GM-CSF, IL-4 und TNF- α ermöglichte dabei die Differenzierung von dendritischen Vorläuferzellen zu reifen Dendriten, die für mehrere Wochen kultiviert werden konnten (65, 384, 391). In der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 verloren die Monozyten, die zuvor durch das Adhärenzverfahren gewonnen worden waren, ihre adhärierenden Eigenschaften und erlangten die Morphologie dendritischer Zellen, was sich anhand der vermehrten Expression von CD1a, CD80, CD86, HLA-DR und HLA-DQ zeigte (493). Folglich wurde, in Gegenwart von IL-4, die Entwicklung der Monozyten unterdrückt (204) und die CD14-Expression „herunterreguliert“ (263), was die Monozyten letztendlich dazu veranlasst haben muss, zu Dendriten auszureifen. Durch die Addition von TNF- α zu dem Kultursystem wurde, zum einen der Anteil an CD83⁺-Zellen erhöht, zum anderen zeigte sich nachfolgend ein stärkeres stimulatorisches Potential hinsichtlich der Aktivierung von PMNC unter allogenen Bedingungen (493). Die Begründung hierfür ist in der Tatsache zu sehen, dass TNF- α die Kapazität der Antigenaufnahme, sowie die ko-stimulatorische Aktivität kontrolliert, indem das intrazellulär lokalisierte MHC-Molekül der Klasse II, nach TNF- α Gabe, vermehrt an die Zelloberfläche verlagert wird (391).

4.1.2.6 Vergleichende Gegenüberstellung der stimulatorischen Potenz antigenpräsentierender Zellen

Zu den klassischen Zellen, die MHC-Moleküle der Klasse II auf der Oberfläche besitzen, gehören B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Dendritische Zellen spielen bei der Initiation der T-zellulärvermittelten Immunantwort eine wichtige Rolle, indem sie ko-stimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, die für eine optimale Aktivierung naiver T-Lymphozyten essentiell sind. Im Gegensatz zu anderen antigenpräsentierenden Zellen, wie z. B. den B-Zellen und Makrophagen, denen wichtige Effektorfunktionen zukommen (Antikörperproduktion, Freisetzung von H₂O₂, TNF usw.), spielen dendritische Zellen vor allem in der afferenten oder sensitiven Phase der Immunantwort eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund besitzen Dendriten verschiedene

Eigenschaften, die für diese Funktion wichtig sind. So ist es ihnen beispielsweise möglich, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren (385), sowie naive T-Zellen zu aktivieren (196). Die Langerhanszellen der Haut, als ein Prototyp dendritischer Zellen, sind potente Stimulatoren naiver T-Zellen (385). Die hierfür entscheidenden Veränderungen hinsichtlich des Phänotyps und der Funktion, werden zu einem Teil von dem Zytokin GM-CSF, oder aber IFN- γ , einem Produkt aktivierter T-Zellen, induziert (489). Die Präsentation von Fremdanitigenen durch dendritische Zellen wurde ausführlich in gemischten Lymphozytenkulturen getestet (430, 468). Hansen et al. untersuchte dendritische Zellen hinsichtlich ihrer Potenz zur Allostimulation. Die Dendriten wurden dabei, nach CD2- und CD19-Depletion, aus Monozyten in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF oder GM-CSF und Calciumionophore generiert. Anschließend wurden die mononukleären Responderzellen, zum Teil mit herkömmlichen PMNC, zum anderen aber auch mit dendritischen Zellen in einem Zeitraum von 2 bis 7 Tagen ko-kultiviert. Anhand der Markierung mit Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFDASE), konnte gezeigt werden, dass die Expression der Oberflächenmarker CD25, CD69 und CD134, sowohl auf den proliferierenden, als auch auf den Zellen, die sich noch nicht in Teilung befanden, im Laufe der Allostimulation stark zunahm. Sobald dabei dendritische Zellen zur Allostimulation herangezogen wurden, exprimierten eine größere Anzahl an Responder-PMNC, verglichen mit der alleinigen Stimulation durch PMNC im herkömmlichen Sinne, die untersuchten Aktivierungsmarker auf ihrer Oberfläche. Setzt man die beiden Stimulationsarten in ein direktes Verhältnis zu einander, so exprimierten $3,25 \pm 1,98$ mal mehr dendritenstimulierte T-Lymphozyt den CD25 Marker, $3,22 \pm 3,32$ mal mehr den CD69 Marker und $5,98 \pm 7,50$ mal mehr den CD134 Marker, verglichen mit den CD3⁺-Zellen in der, alleinig durch PMNC stimulierten MLC (160). Cai und Sprent versuchten darüber hinaus, die primäre Immunantwort naiver CD8⁺-Lymphozyten unter verschiedenen Bedingungen zu simulieren, um so festzustellen, ob die Interaktion zwischen T-Zellen und APC noch weitere ko-stimulatorische Signale erforderte (59). Dabei beobachteten sie, dass die primäre Immunantwort CD8⁺-Zellen, in Gegenwart von Alloantigenen der Klasse I, in den meisten Fällen solange nicht nachweisbar war, bis dieser Prozess Unterstützung durch die Zugabe exogener Zytokine erfuhr. Diese, von Helferzellen

abhängige Immunantwort der CD8⁺-Zellen, reflektierte eine schwache Interaktion zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle (59) (170), was durch die Reaktion CD8⁺ C2 Zellen, in Gegenwart wenig potenter Kbm11 Alloantigene, repräsentiert wurde (59). Unter Verwendung potenterer Alloantigene proliferierten die CTL auch in Abwesenheit exogener Zytokine. Diese Immunreaktion konnte dabei sehr heftig ausfallen, war aber in der Regel nur von kurzer Dauer und konnte durch die Zugabe von anti-CD8 Antikörpern bzw. CTLA4 Immunglobulinen blockiert werden (164) (60). Am Tag drei konnte dabei eine Reduktion der proliferativen Aktivität CD8⁺ C2 Zellen, in Gegenwart des hochaffinen QL9 Peptids auf einer Reihe von APC, beobachtet werden. Interessant war dabei, dass die Reduktion bzw. Inhibierung der Immunantwort, sowohl in der Früh-, als auch in der Spätphase der Kultur auftrat und lediglich die proliferative Aktivität, nicht aber die IL-2 Produktion betraf. Aus diesem Grund war eine Assoziation mit dem Zelltod durch Apoptose nicht auszuschließen (404). Die Kinetik der späten Immunantwort gegen das QL9 Peptid korrelierte dagegen mit der Konzentration an IL-2 in der Zellkultur. So konnte die Fähigkeit des QL9 Peptids, nämlich Immunantworten über einen längeren Zeitraum zu unterhalten, durch die unterstützende Produktion des Interleukin-2 erklärt werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass vor allem in der Frühphase der primären Immunantwort ko-stimulatorische Signale durch IL-2 notwendig waren, um die Immunantwort für einen längeren Zeitraum zu unterhalten. In Abwesenheit dieser ko-stimulatorischen Signale kam es initial zu einer sehr heftig verlaufenden Immunantwort, die allerdings nur von kurzer Dauer war und am ehesten auf den Verbrauch an IL-2 in der Zellkultur zurückgeführt werden konnte (60). Die Fähigkeit zur professionellen, antigenspezifischen Stimulation unterscheidet dendritische Zellen folglich von anderen Leukozyten (94, 194, 276, 283, 295, 313, 425, 429). Auch wenn aktivierte B-Lymphozyten, die entweder durch LPS stimuliert, oder EBV-transformiert wurden (110, 197, 246, 314), sowie zytokinaktivierte, differenzierte Monozyten und Endothelzellen (166) ebenfalls eine allostimulatorische Aktivität in vitro besitzen (246, 314), stellen sie, im Vergleich zu den dendritischen Zellen, deutlich schlechtere Stimulatoren dar (102, 449).

Unter dem Gesichtspunkt der Generierung alloreaktiver Zellen konnte, in den von uns durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Phänotypisierung, der Zytokinsekretion und der proliferativen Aktivität alloreaktiver Zellen immer dann ein Maximum an Alloreaktivität nachgewiesen werden, wenn die Responder-PMNC durch Dendriten (3) stimuliert worden waren, gefolgt von der Stimulation durch zytokinaktivierte PMNC (2) und herkömmlichen PMNC (1). Die Stimulation durch zuletzt genannte Zellen reichte häufig, wie in der Literatur hinsichtlich der CD69 Expression (4. Diskussion, 4.2.3 Das CD69 Molekül) oder der IFN- γ Sekretion (4. Diskussion, 4.2.2 Identifizierung und Charakterisierung alloreaktiver T-Lymphozyten mit Hilfe des Interferon- γ -Nachweises) beschrieben, nicht aus, um einen spezifischen und aussagekräftigen Aktivitätsnachweis zu führen. Aus diesem Grund favorisierten wir die Stimulationsverfahren mittels zytokinmodifizierter PMNC oder dendritischer Zellen. Der Vorteil, der zuletzt genannte Stimulationsmethode könnte u. a. darin liegen, dass die entsprechenden Stimulatoren, auf Grund ihrer hohen HLA-DR-Expression, durch das anschließende Depletionsverfahren mit erfasst werden und so keine unkalkulierbaren Reperfusionzwischenfälle bei der späterer Applikation in den Empfänger mit sich bringen würden. Auf der anderen Seite ist dieses Verfahren jedoch sowohl aus zeitlicher, als auch finanzieller Sicht sehr aufwendig und Bedarf zudem einer hohen Ausgangszellzahl, was insbesondere bei pädiatrischen Patienten zum Nachteil gereichen könnte. Das Verfahren der zytokinmodifizierten MLC hingegen ist schnell, einfach in der Durchführung und verfügt, wie von einigen Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte, über eine große prädiktive Aussagekraft, was die Entwicklung einer GVHD in vivo anbelangt.

4.2 Die Expressionskinetik verschiedener Aktivierungsmarker auf alloreaktiven Lymphozyten

Während der Aktivierungsphase treten auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten eine Reihe von Glykoproteinen mit unterschiedlichen Expressionskinetiken in Erscheinung. Meist geht diesem Ereignis eine entsprechende de novo Proteinsynthese voraus. Verschiedene Studien haben sich mit der Expression

einzelner Oberflächenmarker, einschließlich des CD69, des Interleukin-2 Rezeptors (IL-2R, CD25), des CD38, des HLA-DR und des Transferrin Rezeptors (CD71) auf aktivierten T-Zellen beschäftigt (88, 214). Einige Aktivierungsmarker, wie z.B. der IL-2- (CD25), der Transferrin- (CD71) und der Insulin-Rezeptor, 4F2 und das EA-1 Antigen erschienen dabei sehr früh in der Aktivierungsphase, meist noch bevor die DNA-Synthese einsetzt (87, 163, 168, 172, 274, 455). Andere, wie beispielsweise HLA-DR, CB.1, TLIISA1, T10 und VLA-1 erschienen hingegen deutlich später auf aktivierten Zellen (57, 87, 127, 177, 236). Die TCR/CD3- und CD2-Glykoproteine, sowie das CD28-Molekül, das auf einem Teil der TCR $\alpha\beta$ und TCR $\gamma\delta$ T-Zellen zu finden ist, werden von allen T-Lymphozyten exprimiert und fungieren als Rezeptoren für Zellaktivierungssignale. Liganden, die an diese Strukturen binden, triggern eine Kaskade an biochemischen Ereignissen, was die Erhöhung des pH-Werts und des intrazellulären Calciums, die Aktivierung der Phosphokinase C, Proteinphosphorylierungen, sowie nachfolgende Genaktivierungen und letztlich die Zellproliferation beinhaltet (4, 5, 43, 88, 162, 192, 192, 275, 322, 349, 350, 443).

Im Hinblick auf den günstigsten Zeitpunkt für die Depletion alloreaktiver Zellen wurde die Expressionskinetik verschiedenster Oberflächenmarker analysiert. Daneben versprach man sich dadurch auch Aufschluss über weitere Aktivierungsmarker zu erhalten, die neben dem CD25-, CD69- und HLA-DR Molekülen zusätzlich für die immunomagnetische Depletion herangezogen werden könnten. Unser Augenmerk richtete sich dabei in erster Linie auf das Expressionsmuster der Oberflächenantigene CD8, CD25, CD28, CD56, CD69, CD71, CD90, CD95, CD161 und HLA-DR auf aktivierten T-Lymphozyten, die sich sechs Tage lang in einer, durch allogene Dendriten stimulierten MLC befanden. Die Analysen der einzelnen Oberflächenantigene ergaben dabei, dass die Expressionskinetik des CD25 Moleküls nach 72 Stunden rapide zunahm. Im Kontrast dazu erreichte die CD69-Expression nach 72 Stunden ihren Höhepunkt und fiel nach 120 Stunden so stark ab, dass hierbei Werte erreicht wurden, die unter dem Ausgangsniveau lagen. Die Expression des MHC-Klasse II Moleküls, HLA-DR, stieg bis zu dem Beobachtungszeitpunkt von 120 Stunden stetig an. Der Transferrinrezeptor CD71 wies bereits nach 48 Stunden eine rasche Zunahme

hinsichtlich der Oberflächenexpression auf und erreichte nach 120 Stunden Werte, die denen des CD25 Moleküls glichen. Die Expression des Oberflächenantigens CD95 nahm langsam aber stetig zu und erreichte nach 120 Stunden u. a. den höchsten Prozentsatz an entsprechenden Oberflächenmolekülen. Das CD161 Antigen zeigte im zeitlichen Verlauf eine ähnliche Kinetik wie das Oberflächenantigen CD69. Das ko-stimulatorische Molekül, CD28, ebenso, wie das Oberflächenantigen CD90 zeigte, über den gesamten Beobachtungszeitpunkt, eine stetige Zunahme der Antigenexpression. Demgegenüber blieben die Expressionskinetiken der Oberflächenantigen CD8 und CD56 annähernd konstant.

In Übereinstimmung mit unseren Experimenten, was die Kinetik der Aktivierungsantigene betraf, konnte Fehse et al., anhand eines experimentellen Ansatzes, indem T-Lymphozyten durch eine Schicht adhärierender, allogener Stimulatorzellen aktiviert wurden, zeigen, dass diese Methode der allogenen T-Zellaktivierung zu einem deutlichen Zuwachs der CD25- und der CD69-, sowie zu einem geringeren aber dennoch signifikanten Zuwachs der CD71- und der CD40L-Expression auf den Responderlymphozyten führte (115). Die Fluoreszenzintensität, die die Antigendichte auf den jeweils positiven Zellen charakterisierte, nahm nach der allogenen Stimulation im Mittel um den Faktor 1,5 zu. Während der Phase der T-Zellaktivierung konnte dabei bereits nach 48 Stunden, mit durchschnittlich 2,4%, die größte Rate an CD69⁺-Zellen nachgewiesen werden, wobei die CD25 Antigenexpression mit 1,9% nach 72 Stunden ihr Maximum erreichte. Diese Daten hinsichtlich der Antigenexpressionskinetik stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen überein (63) (89). Allerdings konnten in unseren Experimenten deutlich höhere Werte, was die Prozentsätze alloreaktiver Lymphozyten anbelangte, verzeichnet werden. Dies könnte, in der geringfügig differierenden Art der Responderzellenstimulation begründet liegen, da Fehse et al. in seinem experimentellen MLC-Ansatz adhärierende Zellen, als allogene Stimulatoren verwendete, die zu 15-20% aus dendritischen Zellen bestanden, zu einem Prozentsatz von 80% aus T-Lymphozyten und weniger als 2% B-Lymphozyten aufwiesen. Andererseits könnte dies allerdings auch auf Unterschiede in den Zellkonzentrationen bzw. den

verwendeten Zellkulturmedien zurück zu führen sein. Betrachtet man zudem die Ko-Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69, so kam es, lediglich bei einem sehr geringen Anteil alloreaktiver Lymphozyten, zur gleichzeitigen Expression beider Antigene (115), was die Hypothese zuließe, dass der Expression der Oberflächenantigene CD25 und CD69 unterschiedliche Aktivierungsschritte zu Grunde liegen könnten.

Die Expression der Aktivierungsmarker setzte, unter dem Gesichtspunkt der mitogenen Stimulation von PMNC gesunder Spender, gemessen an der Antigenexpression, bereits nach vier Stunden ein, mit Ausnahme des CD69 Moleküls, das schon drei Stunden nach PHA-Stimulation auf 15% der T-Zellen zu finden war. Der Höhepunkt, der de novo Expression von CD69, konnte nach 15 Stunden verzeichnet werden und nahm am Tag vier rapide ab. Im Vergleich dazu zeigten CD25, CD71 und HLA-DR ihren Expressionshöhepunkt erst nach vier- bis achttägiger Stimulation durch PHA (63). Unter diesen Bedingungen betrug der Prozentsatz an CD25⁺-Zellen im Mittel 84,1%, an CD71⁺-Zellen 80,4% an CD69⁺-Zellen 68% und an HLA-DR⁺-Zellen 41% (63).

4.2.1 Das CD4 Molekül

Um die Subpopulation der T-Lymphozyten, die hauptsächlich an der Alloreaktion beteiligt ist, näher bestimmen zu können, wurden CD4⁺- und CD8⁺-Zellen hinsichtlich ihrer allogenen Aktivität zum einen getrennt von einander, zum anderen aber auch in Kombination miteinander untersucht. Dabei zeigten vor allem die CD4⁺-Zellen eine vermehrte Expression des CD25 und des CD69 Antigens, während hingegen die CD8⁺-Lymphozyten in erster Linie das CD69 Molekül exprimierten. Im Gegensatz dazu konnte, nach allogener Stimulation einer gemischten Zellpopulation, bestehend aus gereinigten CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, kein vergleichbarer Zuwachs hinsichtlich der CD25 Antigenexpression auf CD8⁺-Zellen (bis zu 10% der CD8⁺-Zellen exprimierten in diesem Ansatz das CD25 Molekül) nachgewiesen werden, was den Schluss zulässt, dass die Gegenwart von CD4⁺-Zellen offensichtlich notwendig ist, um eine adäquate Alloaktivierung der CD8⁺-Zellen zu erzielen (115).

4.2.2 Das CD8 Molekül

Man nimmt an, dass reife, naive T-Zellen normaler Weise im Ruhezustand verweilen, zumindest so lange, bis sie u. a. durch Fremddantigene aktiviert werden, die auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen vorhanden sind. Diese Sichtweise musste jedoch revidiert werden, da das Überleben naiver Zellen auch im Ruhezustand, eine ständige T-Zellrezeptor (TCR) vermittelte Antwort durch körpereigene MHC/Peptid-Liganden-Komplexe erforderte (in Bezug auf die CD8⁺-Zellen waren dazu MHC-Komplexe der Klasse I und hinsichtlich der CD4⁺-Zellen MHC Moleküle der Klasse II nötig) (52, 234, 327, 333, 386, 437, 439). Auf der anderen Seite proliferieren T-Zellen u. a. dann sehr stark, wenn sie in immundefiziente Empfänger gegeben werden (440). Diese so genannte „homeostatische“ Proliferation tritt auf, sobald eine kleine Anzahl an T-Zellen in T-Zell-depletierte, syngene, SCID, RAG-immundefiziente (recombination activating gene), oder bestrahlte Empfänger gegeben werden (36, 381). Bei immunkompetenten Individuen, die über eine normale Anzahl an Lymphozyten verfügen, können naive CD8⁺-Zellen anhand von TCR vermittelten Signalen, die durch ein exogenes Antigen hervorgerufen werden, zur Proliferation und Ausdifferenzierung zu Effektor- oder Gedächtniszellen veranlasst werden. Die homeostatisch induzierten CD8⁺-Memoryzellen, exprimieren typische Gedächtniszellmarker auf ihrer Oberfläche. Im Rahmen der sekundären Immunantwort, d. h. nach Restimulation eines bereits bekannten Antigens, sind diese Gedächtniszellen in der Lage, Targetzellen, sowohl in vitro, als auch in vivo direkt zu lysieren. Dabei reagieren sie auf geringere Antigen Dosen, als naive Zellen. Darüber hinaus sezernieren sie Interferon mit einer höheren Geschwindigkeit und in einem größeren Umfang (78), als dies bei der primären Immunantwort der Fall wäre. Wie die Differenzierung antigeninduzierter Gedächtniszellen, so verlangt auch der Homeostaseprozess nach dem initialen Vorhandensein von MHC-Komplexen (30, 109, 141, 439, 473), sowie nach der T-Zellproliferation, unterscheidet sich aber darin, dass es nicht zur Entwicklung von Effektorzellen kommt und die Ko-Stimulation durch IL-2, via des CD28 Moleküls, nicht erforderlich ist (78). Im Mausmodell konnte, hinsichtlich der Expressionskinetik der Aktivierungsmarker, gezeigt werden, dass naive CD8⁺-

Zellen, nach antigenspezifischer Stimulierung, mit Beginn der ersten Zellteilung, eine vermehrte Expression von CD44, CD69 und des Transferrinrezeptors (CD71) aufwiesen, die, in diesem Umfang, auch in den nachfolgenden 72 Stunden erhalten blieb. Ebenso verhielt es sich mit der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25). Die Expression der β -Kette des IL-2 und des IL-15 Rezeptors (CD122), sowie die γ -Kette des allgemeinen Zytokinrezeptors (CD132) wurde hierbei erst nach dem dritten Zellzyklus vermehrt exprimiert (326).

4.2.3 Das CD69 Molekül

Das CD69 Molekül, auch bekannt als Aktivierung induzierendes Molekül (AIM) (70), „early activation Antigen“ (EA-1) (163), Leu-23 (261), oder MLR-3 Antigen (86) ist ein phosphorylierter, Disulfid gekoppelter, heterodimerer Proteinkomplex, bestehend aus 27 und 33 kD Polypeptiduntereinheiten (394). Der Hauptkomplex des CD69 Moleküls scheint, wie durch weitere Studien bestätigt werden konnte, aus einer Reihe von Homodimeren zu bestehen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und ebenfalls aus Untereinheiten gleicher Core-Proteine bestehen, die unterschiedlich glykosiliert sind (40). Die Expression von CD69 erfolgt in vivo kurz nach der Expression der Oberflächenmarker CD7 und CD2. Dabei exprimiert die Mehrheit der medullären Thymozyten das CD69 Molekül, was darauf hinweisen könnte, dass CD69 eine wichtige Rolle in der Ontogenität, sowie der Aktivierung der T-Lymphozyten spielt. CD69 wird nicht von kleinen ruhenden T-Zellen im peripheren Blut exprimiert, ist aber auf der Oberfläche von CD3⁺-Thymozyten vorhanden. Unter diesen Gesichtspunkten wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht, ob der Oberflächenmarker CD69 zur Identifizierung alloreaktiver T-Lymphozyten herangezogen werden kann. In diesem Zusammenhang konnte Suchin et al. demonstrieren, dass bereits 24 Stunden nach dem adoptiven Zelltransfer in einen allogenen Spender, die Expression des Oberflächenantigens CD69 auf den Spenderlymphozyten erhöht war, über einen Zeitraum von 48 Stunden andauerte und nach 72 Stunden wieder den Ausgangswert erreichte. Nach 48 Stunden exprimierten hierbei 60% der CD4⁺-Zellen den Aktivierungsmarker CD69 und hatten sich bis zu diesem Zeitpunkt

durchschnittlich zweimal geteilt (435).

Das CD69 Antigen (Leu 23) wird, neben den Thrombozyten, den myeloischen Vorläuferzellen und einer kleinen Subpopulation an Lymphozyten in sekundär lymphatischen Geweben, in erster Linie von aktivierten T-Zellen, aber auch von B- und NK-Zellen nach wenigen Stunden allogener Aktivierung exprimiert und geht der Expression weiterer Aktivierungsmarker, wie beispielsweise CD25, HLA-DR und CD71 voraus (264, 445). Dieses Molekül, das nach der Zellaktivierung das früheste, induzierbare Glykoprotein auf der Zelloberfläche zu sein scheint (86, 163, 261) (70), ist u. a. mit in die Lymphozytenproliferation und die Zytokinsynthese involviert (264), besitzt aber auch die Funktion eines Signal übertragenden Rezeptors auf T-Lymphozyten, NK-Zellen und Thrombozyten. Genauer Proteinsequenzanalysen haben ergeben, dass es sich bei dem CD69 um ein weiteres Mitglied der Ca^{++} abhängigen, Transmembranrezeptoren vom Typ II handelt, die der Superfamilie der (C-Typ) Lektine angehören (442). CD69 weist strukturelle Homologien mit anderen Typ II Lektin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche auf, so z. B. mit dem T-Zellantigen Ly4 bei Mäusen (75, 491), dem IgE Rezeptor (CD23), der bei aktivierten B-Zellen und Monozyten zu finden ist (33, 34, 191, 232, 292) und dem Asialoglykoproteinrezeptor auf Hepatozyten (99). Ferner teilt CD69, hinsichtlich seiner Funktion, charakteristische Eigenschaften mit der C-Typ Lektin Superfamilie, die überwiegend als transmembranöse Signalrezeptoren in der Frühphase der Zellaktivierung fungieren. Während der T-Zellaktivierung, ausgelöst durch eine Vielzahl an Stimuli, wie z. B. anti-CD3/TCR oder anti-CD2 mAb, Aktivatoren der Proteinkinase C oder PHA kommt es, nach der de novo Synthese von CD69, zu einer vermehrten Expression dieses Moleküls auf der Zelloberfläche (40, 69, 70, 162) (163). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass CD69, zusammen mit PMA oder anti-CD3-Antikörpern, auch als kostimulatorisches Molekül fungieren kann (494). CD69 Antikörper können in diesen Zusammenhang intrazelluläre Signale induzieren, was die Mobilisation intrazellulären Calciums sowie die T-Zellproliferation in Verbindung mit einer suboptimalen Dosis an Phorbol Ester umfasst (69). In weiteren Studien wurde demonstriert, dass die Induktion der CD69 Expression zunächst durch die Proteinkinase C (231) erfolgt und die calciumabhängigen Aktivierungsschritte

lediglich eine sekundäre Rolle spielen, aber dennoch notwendig sind, um eine maximale Antigenexpression zu erzielen (40). Studien mit dem synthetischen Analogon des endogenen Phosphokinase C Aktivators, Diacylglycerol (diOG), konnten die Expression von CD69 induzieren (40), was die Beobachtung unterstützt, dass die PKC eine wichtige Rolle beim ersten Schritt der CD69 Expression spielt. Im selben Ansatz sah man, dass monoklonale Antikörper gegen den TCR, sowie Ionomycin, die beide eine Vermehrung des intrazellulären Calciums bewirken, zur Potenzierung der CD69 Expression führten. Die Stimulation von CD69 induzierte darüberhinaus die Genexpression von IL-2 und IFN- γ und führte zu einer vermehrten Expression von CD25 und zu einer IL-2-abhängigen Zellproliferation. Testi et al. berichtete über ähnliche Experimente, in denen es, durch die Aktivierung des CD69 Moleküls, zu einem verlängerten Einstrom von extrazellulärem Ca^{++} kam und, durch die gleichzeitige Aktivierung der Proteinkinase C mittels des Mitogens PMA, eine Zunahme der Genexpression von IL-2 und IFN- γ verzeichnet werden konnte, die letztlich in einer IL-2/CD25 abhängigen T-Zellproliferation resultierte. Die Signaltransduktion via des CD69 Moleküls führte folglich zu einer Aktivierung der Lymphokingenexpression und einer gesteigerten Proliferationsrate, sowohl der CD4^+ -, als auch der CD8^+ -Zellen, nicht aber zu einer Verstärkung zytotoxischer Mechanismen in den Lymphozyten (444). Das CD69 Gen befindet sich im distalen Abschnitt des kurzen Armes des Chromosoms 12 und umfasst die Banden p13-p12 (286). Die Präsenz, schnell wiederkehrender Signale, die einen Genabbau am 3' Ende der CD69 mRNA bewirken (407), könnte für den rapiden Genumsatz verantwortlich sein. Diese strenge Regulation erlaubt nur eine vorübergehende Genaktivierung, was dazu führt, dass eine unkontrollierte Expression des CD69 Rezeptors nicht möglich ist. Diese Art der Genexpression entspricht der Induktion der Protoonkogene oder Lymphozytenzytokine und unterscheidet sich von der Genexpression anderer Aktivierungsmarker, wie den Oberflächenmolekülen CD25 und CD71, die eine langsamere Kinetik, hinsichtlich der RNA-Induktion und des RNA-Abbaus, aufweisen (373, 458). Die Expression von CD69 verlangt nach einer de novo RNA- und Proteinsynthese (329). Dies wird von der Beobachtung gestützt, dass die Expression von CD69 durch Cycloheximid und Actinomycin D inhibiert werden

kann (40). Hinsichtlich des Verlaufs der allogenen T-Zellaktivierung reagiert allerdings nur ein geringer Teil der CD3⁺-Zellen auf einen entsprechenden Stimulus, was anhand der CD69 Expression nachweisbar war. Die CD69 Expression erreichte in diesem Experiment nach 96 Stunden ein Maximum, welches anschließend in eine 168 Stunden andauernde Plateauphase überging und danach rapide abnahm. Selbst am zeitlichen Höhepunkt der Immunantwort exprimierten in diesem Experiment lediglich 3% der CD3⁺-Zellen das Oberflächenantigen CD69 (89). Berichten anderer Autoren zufolge, konnte hingegen, selbst nach sieben Tage langer Stimulation durch Alloantigene, keine vermehrte Expression an CD69 Molekülen auf der Zelloberfläche alloreaktiver T-Lymphozyten nachgewiesen werden (413). Diese Beobachtung steht allerdings in Kontrast zu unseren Ergebnissen und den Resultaten anderer Arbeitsgruppen (89) und lässt sich möglicherweise durch eine Überlagerung der geringen alloantigen spezifischen Aktivierung durch eine parallel stattfindende Hintergrundsaktivierung erklären. In einer weiteren Studie konnte nämlich, ebenfalls nach allogener Stimulation durch bestrahlte Zellen, eine vermehrte CD69 Antigenexpression nachgewiesen werden (163). Hierbei wurde frühestens 60 Stunden nach Initiation der MLC eine Expressionsvermehrung des CD69 Moleküls vorgefunden, die nach 108 bis 156 Stunden ihren Höhepunkt erreichte. Unstimulierte PMNC (0h) wiesen, in Übereinstimmung mit unseren Versuchen, $12 \pm 3\%$ CD69⁺-Lymphozyten auf. Weitere Studien der Expressionskinetik zeigten, dass nach achtstündiger Kultur $15 \pm 2,8\%$, aber nach 18 stündiger Kultur lediglich $12 \pm 1,4\%$ und nach 48 Stunden $10,8\% \pm 0,5\%$ der alloreaktiven Lymphozyten CD69 exprimierten. Diese Abnahme der CD69 Expression über einen Zeitraum von 48 Stunden könnte dafür sprechen, dass es sich bei einigen Zellen um unspezifisch stimulierte Lymphozyten gehandelt hatte (270). Außerdem wäre es denkbar, dass es nach der Zellaktivierung, möglicherweise bedingt durch einen Zytokinmangel zu einem massiven Abfall der CD69 Expression, die zum einen durch das Herunterregulieren der CD69 Expression, zum anderen durch eine vermehrt stattfindende Apoptose, initial aktivierter T-Zellen, erklärt werden könnte.

4.2.4 Das CD28 Molekül

Obwohl die Interaktion des T-Zellrezeptors mit MHC-Antigenen bei der Initiierung der T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle spielt, führt dies bei den meisten T-Zellen nicht zur vermehrten Zellproliferation, sondern zu einer antigenspezifischen Anergie (207, 369, 400), oder sogar zum Zelltod (480). Erst die, über das CD28 Molekül vermittelten Signale verhindern die Induktion der T-Zellanergie (165).

Ko-stimulatorische Moleküle, wie das CD28-Molekül unterstützen das, durch den T-Zellrezeptor vermittelte Signal, indem sie ein unabhängiges Signal produzieren, das für weitere Aktivierungsschritte notwendig ist (216) (217) (450, 484). Das Konzept der Ko-Stimulation wurde erstmals von Bretscher und Cohn beschrieben (51). Während der T-Zellrezeptor die Spezifität der, durch T-Lymphozyten initiierten Immunantwort vermittelt, wird über die An- oder Abwesenheit ko-stimulatorischer Signale die Genexpression der Lymphokine mit nachfolgender Zellproliferation reguliert (137, 239, 243, 281, 324). Darüber hinaus werden ko-stimulatorische Signale bei der Immunantwort gegen Alloantigene in unterschiedlichem Ausmaß benötigt, so dass eine hohe Affinität zwischen T-Zellrezeptor und Alloantigen möglicher Weise keiner weiteren Ko-Stimulation bedarf (21, 60, 250). Ist dies nicht der Fall, so erfordern die Expansion und die funktionelle Differenzierung antigenspezifischer T-Zellen durchaus weitere Signale (400). Diese zusätzlichen Signale können in Adhäsionsmoleküle, Ko-Rezeptormoleküle, akzessorische Moleküle und ko-stimulatorische Moleküle unterteilt werden. Dabei spielen die Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Stabilisierung des Zellkontakts zwischen T-Zelle und APC (408). Zusätzlich zu der Prozessierung und Präsentation von Antigenen im Kontext mit MHC Molekülen müssen antigenpräsentierende Zellen mindestens ein ko-stimulatorisches Signal bereitstellen, um T-Lymphozyten zu aktivieren und die IL-2 Sekretion, sowie die DNA-Synthese zu induzieren (206, 207, 369, 400). Unter der Vielfalt an ko-stimulatorischen Signalen, die bis jetzt gefunden werden konnten (467), existiert in erster Linie ein Molekül das erkennen lässt, ob Signale, die über den CD3-Rezeptor an die jeweilige T-Zelle weitergegeben werden, zu einer vollständigen T-Zellaktivierung oder aber zur T-Zellanergie führen. Dieses Molekül ist das Oberflächeantigen CD28, bzw. das CTLA-4 Molekül auf T-Zellen, das in die

Interaktion mit dem B7-1/B7-2 Molekül auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) involviert ist (137, 165, 280, 282). Das B7 Molekül wird von aktivierten B-Zellen, aktivierten Monozyten und von dendritischen Zellen des lymphatischen und nicht lymphatischen Gewebes exprimiert (469). Wird die Interaktion B7-CD28/CTLA-4 blockiert, so kann, nachdem die T-Zellaktivierung mittels einer MLC initiiert wurde, eine verminderte Immunantwort in Bezug auf das jeweilige Alloantigen beobachtet werden (438) (273, 278). Hakim et al. konnte daher im Mausmodell zeigen, dass eine frühe Blockade der CD28/B7 Ko-Stimulation die alloaggressive T-Zellantwort, im Rahmen einer GVHR, vollständig arretieren konnte (152). Obwohl die Zellen des Spenders in, durch CTLA4-Ig behandelten Mäusen überlebten, konnte eine massive Expansion und Entwicklung zytolytischer Effektoren, die gegen die lymphohämatopoetischen Zellen des Empfängers gerichtet waren, verhindert werden. Yu et al. untersuchte, ebenfalls im Rahmen einer GVHD, die Pathogenität von CD28^{-/-} und CD28^{+/+} Spender-T- Zellen von B6 Mäusen der Eltern generation, die in unbestrahlte BDF1 und bestrahlte Empfängern der ersten Filialgeneration, die MHC Klasse I (bm1) oder MHC Klasse II (bm12) inkompatiblen waren, infundiert worden war (492). In der Abwesenheit des CD28 Moleküls zeigten die Spenderzellen in diesem Experiment, eine deutlich verminderte proliferative und zytolytische Aktivität gegen den Empfänger und induzierten eine leichter verlaufende Graft versus Host Erkrankung, mit nur wenigen fatalen Ausgängen. Dies deutete darauf hin, dass CD28 sehr wohl in die Pathogenes der GVHD involviert war, diese Erkrankung aber nicht initiierte (426). Die Hauptfunktion des CD28 Moleküls umfasste folglich eine Verstärkung des Signals, das durch die Interaktion des T-Zellrezeptors mit dem entsprechenden MHC-Peptidkomplex auf antigenpräsentierenden Zellen zustande kam. Dies spielte allerdings kaum eine Rolle, wenn das initiale Signal von vornherein sehr stark war. Eine weitere Funktion bestand folglich in der Stabilisierung der Immunantwort, was die eigentliche Ko-stimulation beinhaltete.

CD28, ein 44-kD homodimeres Glykoprotein ist ein Adhäsionsrezeptor, der auf der Oberfläche einer großen Untergruppe an T-Zellen exprimiert wird. Der CD28 Rezeptor reguliert die Produktion multipler Lymphokine, eingeschlossen IL-2. Werden CD28⁺-Zellen mittels eines Antigens, mitogenen Lektins, anti-TCR/CD3

mAb oder durch PHA stimuliert, so führt die Ko-Stimulation mit CD28 mAb zu einer vermehrten Produktion an Lymphokinen (IL-2, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α), sowie zu einer verstärkten Zellproliferation (450) (268). Eine Ko-Stimulation via CD28 induziert die Tyrosinphosphorylierung einer Reihe spezifischer Substrate (470), u. a. auch der Phospholipase und stellt „second messenger“ zu Verfügung, die die Proteinkinase C aktivieren, die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen (235) und somit zur T-Zellaktivierung beitragen (450) (217, 463). Im Gegensatz dazu scheint die CD28 Stimulation mit Hilfe bivalenter Antikörper nicht mit einer Erhöhung des intrazellulären Calciums und der PKC Aktivierung vergesellschaftet zu sein (218, 267). Die Aktivierung der T-Zellen via CD28 umfasst darüber hinaus die Stabilisierung der mRNA verschiedenster Lymphokine, wie z. B. IL-2 (269). In diesem Zusammenhang wird allerdings auch eine Regulation auf der Ebene der Transkription diskutiert (128).

Song et al., konnte in einem Mäusexperiment, in dem er Spender T-Zellen von CD28^{-/-} C57BL/6 Mäusen auf C3H.SW Mäuse übertrug, zeigen, dass die proliferative Aktivität der CD4⁺-T-Zellen, als Antwort auf fremde Minor-Antigene, stark von der Ko-Stimulation durch das CD28 Molekül abhing (423). So wurde 84 Stunden nach dem Zelltransfer bei CD28^{-/-} CD4⁺-Zellen nur eine minimale Teilungsrage festgestellt, im Gegensatz zu den CD4⁺-Zellen vom Wild-Typ, die sich bis zu diesem Zeitpunkt bereits sieben bis acht mal geteilt hatten. Dies deutete darauf hin, dass nur ein kleiner Teil an CD4⁺-T-Lymphozyten, für das Erkennen der HLA-Antigenen, eine Ko-Stimulation durch das CD28 Molekül benötigte, während ein viel größerer Anteil an CD4⁺-Zellen besonders für die Alloreaktivität gegen Minor-Antigene eine Ko-Stimulation via CD28 erforderte.

Aus der Bindung an das CD28 Molekül resultieren mindestens zwei verschiedene Signale (218, 266, 341). Das eine Signal scheint dabei zu einem frühen Zeitpunkt in der T-Zellantwort aufzutreten, das andere etwas später. Der Beweis für die Existenz des späteren Signals konnte dabei, durch eine Blockade der T-Zellantwort mit Hilfe von CTLA4 Ig, geführt werden, da diese Blockade auch noch 48 Stunden nach Initiation der Immunreaktion möglich war (282).

Im Rahmen des Aktivitätsverlaufs konnte Lucas et al., indem er Mäusesplenozyten vom Wild-Typ und CD28^{-/-}-Zellen mit 2 μ m cOVA Peptid stimulierte und

anschließende mittels eines humanen B7 Ig und eines sekundären anti-human IgG-FITC Antiköpers markierte, zeigen, dass die B7 Ig Markierung 24 Stunden nach Kulturbeginn nachgewiesen werden konnte und 72 Stunden später ihren Höhepunkt erreichte (291). Weitere Studien, in denen, nach Antigenaktivierung von CD28⁻, CO.10 Zellen und von Wildtypzellen eine Oberflächenphänotypisierung durchgeführt wurde, zeigten, dass es bei den zwei Zelltypen in einem Zeitraum von 48 bis 72 Stunden zu keinem Unterschied in der Expression von TCR, CD18 (LFA-1 α), CD45RB, CD25 (IL-2R α), CD71 (Transferrinrezeptor), CD69, gp39 (CD40 Ligand), CD44 (p α p-1) und CD62L) gekommen war (291). Das stützt die These, dass die T-Zellaktivierung bei CD28⁻ defizienten Zellen in der Anfangsphase der Immunantwort naiver T-Zellen normal abläuft. 72 Stunden danach wurde das CD69 Molekül vor allem von der CD28⁻ Population rapide herunter reguliert, nachdem es bereits vier Stunden nach Antigenstimulation, sowohl auf den CD28⁺-, als auch auf den CD28⁻-Zellen nachgewiesen worden war und nach 24 bis 48 Stunden auf beiden Zelltypen den Höhepunkt der Antigenexpression erreicht hatte. Hinsichtlich des CD25- aber auch des CD71 Moleküls, das ein frühes Aktivierungsmolekül darstellt und in erster Linie in die T-Zellproliferation involviert ist (224), konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Allerdings exprimierten lediglich 56% der CD28⁻- und 70% der CD28⁺-Zellen das CD71 Molekül nach 120 Stunden auf ihrer Oberfläche (291). In früheren Studien konnte zudem, mittels Verwendung von anti-CD28 mAb und CTLA4 Ig gezeigt werden, dass CD28 eine wichtige Rolle bei der Generation der primären Immunantwort in vivo und in vitro spielt (218) (216). Dabei ging man davon aus, dass die Signaltransduktion via CD28 in den späteren Phasen der T-Zellaktivierung eintritt (218). Andere Autoren berichteten im Gegensatz dazu, dass CD28 während der frühen und der späten Immunantwort unterschiedliche Signale überträgt (216) (341). Dies unterstützt die These, eines frühen und eines späten Effekts durch die CD28 Signaltransduktion (291), da die CD28⁻-Zellen 60 Stunden nach Antigenstimulation ihre proliferative Aktivität einstellen. So konnte ferner in früheren Studien gezeigt werden, dass das CD28 Molekül durch eine PI-3 Kinase agiert. Da, sowohl der T-Zellrezeptor, als auch das CD28 Molekül, diesen Aktivierungsschritt vollziehen, scheint die PI-3 Kinaseaktivität in erster Linie für das frühe CD28 Signal verantwortlich zu sein. Die

spätere CD28 Funktion könnte ferner mit einem RNA stabilisierenden Signal (269) und mit einer vermehrten Transkriptionsaktivität (128) assoziiert sein (450) (208, 269). Die nachfolgende, gesteigerte IL-2 Produktion könnte eine Progression von einer ursprünglich autokrine, zu einer parakrinen Immunantwort ermöglichen, was eine Differenzierung der T-Helferzellen zu Effektorzellen nach sich ziehen würde. Zusätzlich zu dem MHC-Peptid-T-Zellrezeptorkomplex, spielen bei der T-Zellaktivierung durch dendritische Zellen verschiedenste Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen eine Rolle. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der B7:CD28/CTLA4-Komplex bei der T-Zellantwort in Gegenwart von Alloantigenen in den Vordergrund rückt (49). Dendritische Zellen regulieren den CTLA4-CR zum einen, in der frühen Phase der Immunantwort, wenn GM-CSF von Zellen des geschädigten peripheren Gewebes produziert wird, zum anderen zu späteren Zeitpunkten, als Antwort auf die Zytokine IFN- γ und GM-CSF, die von aktivierten T-Zellen in den entsprechenden inflammatorisch veränderten Geweben, oder lymphatischen Organen sezerniert werden. Dendriten, die in GM-CSF kultiviert wurden exprimieren, sowohl B7-1, als auch B7-2, während dendritische Zellen, die in Gegenwart von Interferon kultiviert wurden, lediglich das B7-2 Molekül in größerem Ausmaß exprimierten. Dies lässt den Schluss zu, dass eine optimale T-Zellaktivierung, d. h. eine Zunahme der Proliferations- und Zytokinsekretionsrate entsprechender Zellen, eine Beteiligung beider Moleküle voraussetzt, während die selektive Expression von B7-2 lediglich die Aktivierung einer T-Zellsubpopulation (Gedächtnis-/sensitive T-Zellen oder Th1/Th2) induziert.

4.2.5 Das CD25 Molekül

Die Differenzierung zytotoxischer T-Lymphozyten erfordert die Zusammenarbeit einzelner T-Zellsubpopulationen, wobei mindestens eine dieser T-Zellinteraktionen über lösliche Faktoren vermittelt wird (360). Anhand vieler Nachweisverfahren, wurde diesbezüglich besonders ein Mediator entdeckt, der als „Killer assistierender Faktor“ (118), „Killer unterstützender Faktor“ (155), „zellamplifizierender Faktor“ (345) und als „Ko-Stimulator“ (359) bezeichnet wurde. Weitere Studien konnten zeigen, dass dieser Faktor, abhängig vom jeweiligen antigenen Stimulus, in

unterschiedlichem Umfang für die T-Zelldifferenzierung erforderlich ist (343, 344). Bei diesem Faktor handelte es sich um das IL-2. Eine Reihe von Beobachtungen führten zu der Annahme, dass IL-2 die CTL-Differenzierung unterstützt und dass die Helferaktivität in mitogen- oder alloantigenstimulierten Zellkulturen ausschließlich durch das Lymphokin IL-2 induziert wird (225). So konnte die IL-2 Aktivität, die im Zellüberstand des jeweiligen Kultursystems gemessen wurde, ins Verhältnis mit der CTL-Aktivität gesetzt werden. Dabei korrelierten die IL-2 Konzentration und die entsprechende CTL-Aktivität positiv miteinander. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Lymphokin IL-2 die Sekretion anderer Lymphokine, wie z. B. Interferon, das in erster Linie von CTLs produziert wird, fördert (112). Der Zusatz von anti-IL-2 Antikörpern, zu Beginn einer konventionellen MLC, verhinderte in diesen Zusammenhang sowohl die Zellproliferation, als auch die CTL-spezifische IFN-Produktion (136).

Die, mittels spezifischer Antikörper durch den CD3-Rezeptor vermittelte Zellaktivierung führt, in Gegenwart des Makrophagen Lymphokins IL-1, ebenfalls zu einer gesteigerten IL-2 Produktion und IL-2 Rezeptor Expression auf der Zelloberfläche (9, 113, 389, 417). Die nachfolgende T-Zellproliferation wird durch die Interaktion von endogen gebildetem IL-2 mit dem IL-2 Rezeptor auf der Oberfläche der Lymphozyten initiiert und unterhalten (262, 323, 418). Dieses Zytokin unterstützt folglich Langzeitkulturen, sowie das Klonen humaner T-Lymphozyten mit Helfer-, Suppressor- und zytotoxischer Funktion (251, 252, 390). Abnormalitäten in der IL-2 Produktion, sowie in der IL-2 vermittelten Immunantwort, wurden im Zusammenhang mit der Immundefizienz und im weitesten Sinne auch mit der Karzinomentwicklung gesehen (143, 279, 446).

Obwohl man annimmt, dass IL-2 in erster Linie von CD4⁺-Zellen sezerniert wird (374), ist dennoch davon auszugehen, dass die Fraktion CD8⁺-Zellen unter entsprechenden Kulturbedingungen ebenfalls zu einer signifikanten IL-2 Produktion befähigt ist (315). Um die Frequenz IL-2 produzierender, alloreaktiver, humaner T-Helferlymphozyten (*hTPLf*) einschätzen zu können, wurden sogenannte Verdünnungsreihen durchgeführt. Dabei wurde die höchste Frequenz alloreaktiver HTLs zwischen dem Tag drei und fünf der Zellkultur registriert, während längere Kulturperioden zu einer Reduktion des Anteils alloreaktiver Zellen

fürten, was möglicherweise durch den gesteigerten Verbrauch an endogen produziertem IL-2 durch alloreaktive Responderzellen erklärt werden könnte. Dabei wurde in der CD8⁺-Zellpopulation, mit einer Frequenz von 1/440 bis 1/930, ein geringerer Anteil alloreaktiver Zellen gemessen, als das bei der CD4⁺-Population (f = 1/180 - 1/280) der Fall war (214).

Betrachtet man hingegen den Expressionsverlauf des IL-2 Rezeptors auf der Oberfläche der T-Lymphozyten, so zeigte sich bereits nach einer vier- bis sechsständigen Stimulation durch PHA eine vermehrte CD25 Expression (98). Dieser Prozess erforderte eine neue RNA- und Proteinsynthese, wobei hierfür keine DNA-Synthese notwendig war (98). Die Daten dieser intrazellulären Syntheseaktivitäten stimmen dabei nur dann mit der Rezeptorexpression auf der Oberfläche überein, solange die aktivierten T-Lymphozyten noch nicht in die S-Phase des Zellzyklus eingetreten sind (372). Die höchste Anzahl an Rezeptoren wurde dabei in einem Zeitraum von 48 bis 72 Stunden nach mitogener Aktivierung gemessen, anschließend kam es zu einer Reduktion der Rezeptorzahl, die dabei positiv mit der Wachstumsrate der Zellen korrelierte (98).

Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass CD4⁺-CD25⁺-T-Suppressorzellen die Zellproliferation und die Interleukin-2 Produktion in vitro supprimieren können (451). Dieser Prozess hängt dabei nicht von löslichen Faktoren ab, sondern verlangt die direkte Interaktion zwischen CD4⁺-CD25⁻- und CD4⁺-CD25⁺-T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen (451). Diese Suppression in vitro konnte durch den Zusatz von IL-2 oder anti-CD2 Antikörpern zu den entsprechenden Zellkulturen, als Blockade der unterstützenden Faktoren der Ko-Stimulation, unterbrochen werden (451). Diese Beobachtung könnte in erster Linie für die Inhibierung autoimmunologischer, aber auch allogener Prozesse von eminenter Bedeutung sein.

4.2.6 HLA-DR

T-Lymphozyten sind in der Lage, kurze Peptide zu erkennen, die nicht-kovalent in der zentralen Grube bestimmter Proteine gebunden sind. Diese Proteine stellen den Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) dar, der beim Menschen auch unter

der Bezeichnung humanes Leukozytenantigen (HLA) und bei Mäusen als H-2 bekannt ist. Die T-Zellaktivierung wird durch die Bindung des T-Zellrezeptors an das Oberflächenepitop, das vom MHC-Molekül und dem entsprechenden Peptid gebildet wird, initiiert.

MHC-Moleküle der Klasse II sind Heterodimere, die aus zwei transmembranösen Ketten bestehen. MHC-Klasse-II-Moleküle können auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten und professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie z. B. Makrophagen und dendritische Zellen, gefunden werden. Unter dem Einfluss von Interferon- γ (IFN- γ) kann es zu einer Expressionsinduktion von MHC-Klasse-II-Molekülen auf einer Vielzahl von Zellen kommen, was in unserem Fall durch die Zugabe von IFN zu den entsprechenden PMNC ausgenutzt wurde. Der MHC-Komplex der Klasse II besteht aus vier Genfamilien HLA-D, -DR, -DQ und -DP. Die Klasse II Moleküle binden Peptide, die von extrazellulären Proteinen abstammen, die zuvor lysosomal oder endosomal abgebaut wurden.

Die T-Zellaktivierung findet allerdings nur dann statt, wenn T-Lymphozyten mit spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen interagieren, zu denen in erster Linie die Makrophagen, Langerhans Zellen, follikuläre dendritische Zellen, sowie die B-Zellen gehören (353, 483). Die Fraktion an T-Lymphozyten, die in diesem Zusammenhang in der Lage ist, gegen spezifische Antigene zu reagieren, wird als „precursor frequency“ bezeichnet. Im Hinblick auf die Alloreaktivität wurde festgestellt, dass lediglich 1 bis 10% der T-Lymphozyten in einer MLC die Potenz besitzen, gegen die Stimulatorzellen einer anderen, nicht verwandten Person zu reagieren (202). Im Gegensatz dazu wiesen, während einer fünf Tage dauernden primären MLR frisch isolierter humaner T-Zellen, die gegen eine EBV-transformierte, humane B-Zelllinie (ARC oder MM) reagierten, 51% und 31% der alloreaktiven Lymphozyten in zwei unabhängigen Experimenten den Aktivierungsmarker HLA-DR auf. Als Ausgangswerte waren dabei zuvor 2% und 4% an HLA-DR⁺-Zellen gemessen worden (464). Dies impliziert, dass HLA-DR einen sehr sensitiven Marker der allogenen Aktivierung darstellt.

4.2.7 Der FAS Ligand (CD95)

Hsieh und Korngold konnten, anhand eines murinen Modells einer syngenen GVL, die sowohl die Immunantworten CD8⁺-, als auch die, CD4⁺-Zellen gegen die Leukämiezelllinie MMB3.9 repräsentierte, zeigen, dass CD8⁺-Zellen den sogenannten GVL Effekt in erster Linie durch Perforin und nur zu einem sehr geringen Anteil durch den Fas-Liganden bewerkstelligten, während die in vitro Antworten der CD4⁺-Zellen ausschließlich über den Perforin Pfad erfolgten (189). Andere Arbeitsgruppen berichteten, dass die Th1 Subpopulation CD8⁺-Zellen bevorzugt den Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche exprimierten (62) (126). Die Th1-Typ Zellen waren dabei in der Lage, die Leukämieinie L1210, die mit dem Fas-Molekül „L1210-Fas“ transfiziert worden war, zu lysieren, während dies bei der herkömmlichen Zelllinie „L1210“ nahezu unmöglich war (328). Die Th1-vermittelte Lyse der L1210-Fas Targets konnte dabei durch Präinkubation der Targets mit Antikörpern gegen das Fas-Molekül blockiert werden, was die These bestätigte, dass, zumindest im Mausmodell, die Th1-induzierte Zell-Lyse über den Fas Pfad verlief (126). Die Th2 Population war dagegen beim Abtöten allogener Tumorzellen (P210 Target) sehr effizient, während dies für die Lyse Fas-tragender Zellen nicht zutraf (126). Erste Daten weisen darauf hin, dass beide Populationen einen signifikanten Anteil der Perforin- und Granzym-mRNA exprimieren, Moleküle, die vor allem bei der direkten CTL-vermittelten Tumorlyse eine Rolle spielen (175). In diesem Leukämiemodell stellte, in erster Linie die Th1 Subpopulation, eine effektive, GVL vermittelnde Population dar, da die allogenen Th1 Zellen, nach entsprechender Kulturdauer, die größten Überlebensraten aufwiesen und nach dem Zelltod nur wenige Tumorzellen nachgewiesen werden konnten. Aber auch die Th2 Population vermittelte einen GVL-Effekt, doch entwickelten die Empfängermause der Th2 Zellen zum Teil eine ähnliche Tumormasse, wie die leukämische Kontrollgruppe.

Da in unseren Untersuchungen durch das, später zu erläuternde, immunomagnetische Depletionsverfahren der Prozentsatz an CD95⁺-T-Zellen kaum tangiert wurde (nicht gezeigt), ist davon auszugehen, dass durch besagtes Eliminationsverfahren der Graft versus Tumor/Leukaemia Effekt der restlichen Lymphozyten nicht negativ beeinflusst wird.

4.3 Die immunomagnetische Depletion alloreaktiver Zellen

Die Suche nach einem geeigneten Depletionsverfahren, das in der Lage ist, spezifische T-zelluläre Immunantworten, die gegen Empfängerewebe gerichtet sind, vollständig zu eliminieren, während das anti-infektiöse und das anti-leukämische/tumoröse Potential unangetastet bleibt, ist schon länger Gegenstand der Forschung.

Unter diesem Vorzeichen untersuchte Mavilio et al. die Aktivierung von Spenderzellen mit Hilfe spezifischer antigenpräsentierender Empfängerzellen in Gegenwart eines retroviralen Vektors, der einen „Medikamenten-sensitiven Marker“ (human low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR)) enthielt. Dieses Protokoll basierte dabei auf der Annahme, dass Zellen, die sich teilen, häufiger retrovirales Material in ihre DNA integrieren, als das bei ruhenden Zellen der Fall ist. Indem die Responderzellen mit einem „Medikamenten-sensitiven Gen“ markiert wurden, konnte, nach Administration dieses Medikaments, eine GVHD in vivo verhindert werden. Dieser Ansatz verlangte allerdings, dass jede alloreaktive Zelle diesen retroviralen Vektor inkorporierte (310). Unter dem gleichen Gesichtspunkt suchte Helene et al. nach einer Möglichkeit, um die GVHD im Mausmodell kontrollieren zu können. Hierzu wurden transgene B10.A (5R) Milzzellen, die ein Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-Suizidgen enthielten, das mit dem IL-2 Promotor verbunden war, in bestrahlte DBA/2 Mäuse transfundiert. Dieses Vorgehen resultierte dabei in einer schweren akuten GVHD. Wurden die Empfängermause mit Ganciclovir behandelt, so kam es zu einer signifikanten Besserung der GVHD-Symptome (173). Valteau-Couanet et al. stimulierte in diesem Zusammenhang Spenderzellen durch Zellen des Empfängers in Gegenwart eines anti-Interleukin-2-Rezeptorantikörpers, der Toxin gekoppelt war (459). Dabei wurden die Toxine 33B3.1(anti-CD25)-Ricin oder B-B10 (anti-CD25)-Saporin, sowie das Maus-anti-IL-2R- α -Kette spezifische PC61-Immunotoxin (PC61-IT) verwendet (67) (441). Ein weiteres Toxin bestand dabei aus einem Teil des Pseudomonas Exotoxins (PE), das genetisch an den Fv-Abschnitt des monoklonalen Antikörpers, anti-Tac, gekoppelt war, der wiederum eine spezifische Bindungsstelle an der alpha-Kette des IL-2 Rezeptors besaß (77) (245). Das Toxin wiederum, bestand aus drei Domänen, von denen die erste für die Zellbindung und

die zweite für die Translokation zuständig war, und darüber hinaus mit einer proteolytischen Aktivität versehen worden war. Die dritte Domäne besaß dagegen ADP-Phosphorylierungsaktivität. Nach der Zellinternalisierung wurde ein Teil des PE, der zuvor proteolytisch hergestellt worden war, in das Zytosol transloziert, wo die ADP-Phosphorylierung des Elongationsfaktors-2 die Proteinsynthese beendete und den Zelltod herbeiführte (245) (244). Der Erfolg dieser Anwendung beruhte dabei auf der Fähigkeit aktivierter Zellen, das Immunotoxin zu binden (312) (245, 459).

Weitere Verfahren, die sich mit der Elimination alloreaktiver T-Zellen in Hinblick auf die GVHD Reduktion befassen, beinhalten direkte immunomagnetische Depletionsverfahren. Antin et al. unterwarfen Spenderlymphozyten in diesem Zusammenhang einer Behandlung mit anti-CD5-Antikörpern (11). Andere wiederum depletierten das Knochenmark mittels Antikörper, die gegen ein breites und schmales Spektrum an T-Lymphozyten gerichtet waren (422) (421) (74). Ferner kamen, unter oben genannten Aspekten, Campath-Antikörper (153), Dichtegradientenzentrifugation oder Lektinen zum Einsatz.

Alternativ dazu wurde versucht eine T-Zelltoleranz zu induzieren. Dieser Ansatz basierte auf der Blockade der B7-CD28/CTLA-4 Interaktion und der Induktion eines Anergie-Status bei stimulierten T-Lymphozyten (271) (129). Dies konnte mittels anti-B7-Antikörper und Cyclosporin A erzielt werden (464). Dabei wurde allerdings vorausgesetzt, dass während der Phase der Kultivierung keine T-Zellwachstumsfaktoren, wie z. B. IL-2 im Kultursystem vorhanden waren, da diese potentiell dazu in der Lage gewesen wären, den Anergiestatus zu durchbrechen (464). Van Gool et al. untersuchte dabei die Effekte von Cyclosporin A (CsA), sowie der Blockade der B7-CD28/CTLA-4 Interaktion mittels eines B7-24-Antikörpers während einer primären MLR frisch isolierter, humaner T-Zellen gegen eine EBV-transformierte humane B-Zelllinie (ARC oder MM) im Hinblick auf die nachfolgende Restimulation mit den gleichen oder anderen Stimulatorzellen (464). Dabei kam es, nach Behandlung der MLR mit dem B7-24-Antikörper in Kombination mit CsA und Restimulation mit dem gleichen Alloantigen, weder zu einer adäquaten allogenen Immunantwort noch zur IL-2 Sekretion, was den Schluss zuließ, dass es zu einer Induktion der Zellanergie gekommen war, denn

dieser Zustand konnte durch die Zugabe von IL-2 durchbrochen werden (464). Die Techniken der T-Zelldepletion an sich sind, wie bereits zuvor erwähnt, sehr vielgestaltig und umfassen ein aggressives, physikalisches Entfernen aktivierter T-Lymphozyten, ohne dabei Zellen im Zustand der Anergie zurückzulassen, die möglicherweise in einen aktivierten Zustand übergehen könnten (464). Ferner bedarf diese Methode nicht der Frage, ob eine medikamentöse Therapie nach Initiation einer GVHD in vivo auch tatsächlich Effizienz besitzt. Die selektive T-Zelldepletion beruht dabei auf der Identifizierung alloreaktiver T-Lymphozyten anhand spezifischer Aktivierungsantigene auf der Zelloberfläche, sowie auf einer physikalischen Separation alloreaktiver Spenderlymphozyten mit Hilfe immunomagnetischer Depletionsverfahren. Diese neue Depletionstechnik alloreaktiver Zellen, die zuvor ex vivo aktiviert worden waren, wurde von Garderet et al. und Koh et al. vorgeschlagen (132, 238). In deren Studien basierte die Depletion auf dem Verfahren des magnetischen Zellsortierens (MACS:= magnetic cell sorting), anstelle des Immunotoxin-vermittelten Killens alloreaktiver Zellen. In Analogie zu Cavazzana-Calvo et al. depletierte Garderet et al. ebenfalls alloreaktive Zellen, die den Aktivierungsmarker CD25 exprimierten, während Koh et al., Lymphozyten mit dem CD69-Phänotyp depletierte. Richtete sich die Depletion allerdings gegen beide Aktivierungsantigene, so resultierte daraus ein sehr viel effizienteres Verfahren (115). Rencher et al. berichtete kürzlich über eine Depletionsstrategie, ebenfalls ein immunomagnetisches Eliminationsverfahren, das sich gegen drei Oberflächenantigene, nämlich CD25, CD69 und HLA-DR auf alloreaktiven T-Zellen richtete (377).

In letzter Zeit wurden immer häufiger monoklonale Antikörper gegen T-Zellepitope für die in vitro-Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten herangezogen. Champlin et al. rieten zur Infusion CD8⁻ depletierter Lymphozyten um eine GVHD zu vermeiden (74). Im Gegensatz dazu infundierten andere, nach erfolgter Depletion von CD4⁺-T-Zellen, eine minimale Anzahl an CD8⁺-Lymphozyten (178). Daten aus Tierexperimenten sprechen allerdings dafür, dass sowohl CD4⁺-als auch CD8⁺-Zellen für den GVL Effekt erforderlich sind (456) was ausschließt, dass diese Subpopulationen der T-Lymphozyten für ein Depletionsverfahren zur Verfügung stehen.

Die Strategie, die wir für die Elimination des GVHD-Potentials alloreaktiver T-Lymphozyten wählten, umfasste zunächst den Ansatz einer gemischten Lymphozytenkultur (MLC). Die MLC sollte dabei das in vitro Modell der Alloreaktion darstellen. Dieses experimentelle Vorgehen beinhaltete u. a. die Präsentation von HLA-Antigenen entsprechender Stimulatorzellen in Gegenwart mononukleärer Responderzellen, die aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert worden waren. Die Responder-T-Lymphozyten konnten anschließend, auf Grund verschiedenster Merkmale identifiziert und immunomagnetisch depletiert werden. Dieses Verfahren erforderte es allerdings, dass die Stimulatorzellpopulation die Fähigkeit besaß, spezifische HLA-Antigenen im großen Umfang auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, so dass die Responderzellen ausreichend aktiviert werden konnten. Dies konnte u. a. anhand der Oberflächenmarker, die im entsprechenden Umfang auf der Zelloberfläche der Responderzellen erschienen, kontrolliert werden. In einem nächsten Schritt untersuchten wir die Möglichkeit, aktivierte T-Zellen, basierend auf der Expression einzelner Aktivierungsmarker, mit Hilfe eines immunomagnetischen Verfahrens zu depletieren.

Fehse et al. untersuchte die Aktivierungskinetik alloreaktiver Zellen unter Verwendung einer adhärenz Zellschicht bestehend aus allogenen Lymphozyten, die zu 15%-20% aus dendritischen Zellen, zu 80% aus T-Lymphozyten und zu weniger als 2% aus B-Lymphozyten bestand und in der keine Vorläuferzellen nachgewiesen werden konnten (115). Diese Stimulatorzellschicht war dabei zuvor aus peripheren mononukleären Zellen des Spenders in Gegenwart der Zytokine GM-CSF und IL-4 generiert worden (391) (138). Anhand des Durchflußzytometrischen Verfahrens konnten bei diesen Stimulatorzellen sowohl MHC-Antigene der Klasse I, als auch der Klasse II nachgewiesen werden. Dieses Verfahren führte letztlich zu einer effizienten allogenen Aktivierung der Lymphozyten (138). Auf diese Weise konnten die Responderzellen im alleine, d. h. ohne eine potentielle Kontamination mit Stimulatorzellen, näher analysiert und das Reinfusionsrisiko, das möglicherweise von in vitro vorbehandelten Zellen ausgehen könnte, reduziert werden.

4.3.1 Der Zeitpunkt der immunomagnetischen Depletion und die Auswahl entsprechender Antikörper

Um den Einfluss des immunomagnetischen Depletionsverfahrens auf die Alloreaktivität abschätzen zu können und um den besten Zeitpunkt für die Elimination allogene stimulierter T-Lymphozyten festsetzen zu können, wurden die, in der MLC stattfindenden Reaktionen, zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Angesichts des zeitlichen Aspektes depletierte Fehse et al. allogene stimulierte Lymphozyten nach einer Kulturphase von 24 Stunden, sowie nach 48 Stunden, wobei durch das Eliminationsverfahren alloreaktiver Zellen nach 48 Stunden eine größere Effizienz verzeichnet werden konnte (115).

Zur Depletion alloreaktiver Zellen wurde, in unserem Fall, das Zellseparationsverfahren auf immunomagnetischer Basis (Magnetpartikel-Konzentrator, Dynal) eingesetzt. Unabhängig von diesem Zellisoliationsverfahren war zur Elimination der Erythrozyten und der Granulozyten zuvor eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt worden. Die resultierenden mononukleären Zellen wurden dann zur allogenen Aktivierung in verschiedene Kultursysteme eingesetzt. Die anschließende Depletion erfolgte anhand der Aktivierungsmarkerexpression (CD25, CD69 und HLA-DR). Die Effizienz dieser Methode wurde mittels Oberflächenphänotypisierung der jeweiligen Zellfraktion vor und nach der Depletion eingeschätzt. Durch das Zellseparationsverfahren konnten die alloreaktiven T-Lymphozyten in der herkömmlichen MLC, in der zytokinmodulierten MLC und in der, mittels dendritischer Zellen stimulierten MLC deutlich reduziert werden.

Die Leistungsfähigkeit der, zur Depletion alloreaktiver Zellen eingesetzten Systeme, wurde in der Literatur mehrfach diskutiert. Bei dem von uns verwendeten Magnetpartikelkonzentratorsystem (Dynal) (254) handelte es sich um ein Verfahren, durch das die magnetpartikelmarkierten Zellen mit Hilfe eines extern angebrachten Magneten durch den entsprechenden Suspensionszustand aufgelöst wurde und die markierten Zellen an der Gefäßwand eines Polypropylenröhrchens („Batch-Verfahren“) konzentriert werden konnten. Laut Herstellerangaben liegen die eingesetzten Magnetpartikel, mit einem Durchmesser

von 4,5 μm , im Größenordnungsbereich von Erythrozyten und sind daher, verglichen mit anderen Systemen, für Zellseparationsverfahren sehr gut geeignet. Die Effizienz des Depletionsverfahrens, wurde ferner, wie bereits erwähnt, anhand der potentiellen Reaktivierbarkeit der negativen, nicht alloreaktiven Lymphozytenfraktion in Hinblick auf den gleichen Stimulus, der bereits in der primären allogenen MLC Verwendung gefunden hatte getestet. In diesem Zusammenhang wurden, die CD25⁻, CD69⁻ und HLA-DR⁻-depletierten Zellen, im Rahmen einer primären Immunantwort, hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit mittels unterschiedlicher Stimulatoren (autolog, mitogen (PHA), Tetanus Toxoid und CMV-Antigen) untersucht und mit der Ausgangspopulation vor der Depletion verglichen. In Bezug auf die Zytokinsekretion, als spezifisches Zeichen der T-Zellaktivierung, konnte der, mittels Sekretions-Assay nachgewiesene Anteil an IFN- γ produzierenden alloreaktiven Zellen durch die Depletion in allen Kulturansätzen auf durchschnittlich weniger als 0,1% gesenkt werden. Die Reaktivierbarkeit der depletierten Lymphozyten, durch zuvor erwähnte Stimulatoren, wurde anhand des Interferonnachweises u. a. im Elispot-Assay getestet. In Bezug auf die „first party“-Alloreaktivität wurde dabei eine unterschiedlich starke Reduktion der ursprünglichen allogenen Aktivität in den einzelnen Kultursystemen verzeichnet, während die Autoreaktivität durch die Depletion in allen Fällen stark reduziert blieb. Die Reaktivität gegen „third party“, Tetanus Toxoid, CMV-Antigen und PHA blieb dabei jedoch weitgehend erhalten. Als weiteren Hinweis für die Zellaktivierung wurde, unter vergleichbaren Bedingungen, die proliferative Potenz der Lymphozyten in Gegenwart verschiedenster Stimulatoren untersucht. Die Daten, die Hinweise auf die allogene Reaktivität vor und nach der Elimination aktivierter T-Zellen lieferten, zeigten eine signifikante Reduktion der Alloaktivität durch das Depletionsverfahren. Dem Gegenüber konnte jedoch trotz, Depletionsverfahren, eine verbliebene Immunantwort gegen „third party“, Tetanustoxoid, CMV-Antigen und Phythämagglutinin (PHA) nachgewiesen werden. Diese Zahlen belegen folglich, dass durch das Depletionsverfahren eine starke Reduktion der sekundären Immunantwort gegen allogene Stimulatorzellen erzielt werden konnte, während hingegen die primären Immunantworten gegen „third party“, Tetanus Toxoid, CMV Antigen und PHA zu einem großen Teil erhalten blieben.

Hansen et al. beschrieben, im Zusammenhang mit der CD25⁺-Lymphozyten-Depletion, ein fünf- bis siebentägiges Kulturverfahren, sowie die anschließende Depletion mittels anti-CD25 Antikörpern und Schaf-anti-Maus Dynabeads IgG. Die Erfolgsrate dieses Verfahrens lag dabei bei 97,6% ± 2,3 (160). Hinsichtlich der CD69 Depletion konnte Koh et al. anhand der Oberflächenphänotypisierung zeigen, dass, nach Kultivierung von Responder PMNC im gleichen Verhältnis mit bestrahlten „first party“ Stimulatorzellen in einer one-way, primären Lymphozytenmischkultur (MLC) und nachfolgender CD69 Depletion, durch das Zellseparationsverfahren der Ausgangswert von 6% ± 2,4 CD69⁺-Lymphozyten auf 1,5% ± 1,2 CD69⁺-Lymphozyten reduziert werden konnte, während die Werte in den „third party“ MLCs mit 3,9% ± 2,7 in der primären und 4% ± 2,4 in der sekundären MLC konstant blieben (238). Um den Grad der selektiven Depletion festsetzen zu können, setzte Koh et al. die primären Immunantworten gegen die „first party“- und die „third party“- Zellen gleich 100% und errechneten so die Restaktivität nach der Depletion. Diese belief sich dabei im Mittel auf 25,6% ± 17,9 in der allogenen Reaktion, und blieb in der Reaktion gegen „third party“ PMNC mit 115,7% ± 35,9 zum größten Teil erhalten. Die Zellausbeute lag nach der Depletion, die mit einer Reinheit von 97% assoziiert war, im Durchschnitt bei 72,5%. Die Effizienz dieser Depletionsmethode umfasste folglich 75% (238). Anhand weiterer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es möglich war über 90% der alloreaktiven Komponenten (nachweisbare proliferative Aktivität nach der Depletion: 11,5% ± 9,9) mit Hilfe des Magnetseparationsverfahrens gegen das CD69 Antigen zu eliminieren, während mehr als 77,8% ± 20,9 der immunologischen Aktivität erhalten bleibt und anhand einer allogenen Immunreaktion gegen Dritte nachgewiesen werden konnte. Diese Daten implizieren eine Verbesserung in der Immunrestitution sowie ein Fortdauern der antiviralen und möglicherweise auch der antileukämischen Aktivität durch diese Form der Depletion, so dass alle Voraussetzungen für den Einsatz dieses Verfahrens, im Rahmen einer adoptiven Immuntherapie erfüllt wären. Koh et al. wählten das CD69 Molekül als Aktivierungsmarker, da es von den Zellen exprimiert wurde, die im Rahmen der Alloreaktivität von Interesse waren. Zudem wurde dieses Molekül in einer ausreichend hohen Dichte auf der Zelloberfläche

exprimiert, so dass es möglich war die anti-CD69-markierten Zellen mit Hilfe des MACS-Verfahrens zu separieren (238). Bishara et al. und Koh et al. demonstrierten, dass eine modifizierte MLC prädiktive Aussagekraft in Bezug auf die Inzidenz einer klinisch symptomatischen GVHD hat (38, 238). In diesem Zusammenhang konnte Koh et al., alleine durch die Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten, die den Oberflächenmarker CD69 exprimierten, die allogene Immunantwort weit unter den empirischen Schwellenwert, der eine klinisch symptomatische GVHD beinhaltet, senken. Der Aktivierungsmarker CD69 konnte dabei allerdings nicht als Äquivalent für die Proliferation in vitro angesehen werden, d. h. der Alloreaktivitätsnachweis, gemessen anhand der Zellproliferation, war in diesem Fall nicht möglich. Unumstritten war dagegen die Tatsache, dass sowohl die CD69 Expression, als auch die Zellproliferationsrate ansich, die anhand der [6-H³]-Thymidininkorporation nachgewiesen werden kann, spezifische Marker für eine allogene Immunantwort darstellen. Im Kontrast dazu demonstrierte Fehse et al., dass die Depletion CD25 exprimierender T-Lymphozyten mit einem Prozentsatz von über 99% effizienter war, als die CD69 Depletion, da durch die CD69 Depletion lediglich eine Eliminationsrate von 80% verzeichnet werden konnte (115). Die Depletion mit einer Antikörperkombination gegen beide Aktivierungsmarker resultierte hingegen in einer deutlich höheren Reduktionsrate hinsichtlich der Zellzahl der CD25⁺- (99,7%) und der CD69⁺-Zellen (86%) (115). Betrachtete man die alleinige Depletion CD25⁺-Zellen hinsichtlich der gleichzeitig stattfindenden Reduktion CD69⁺-Zellen, so konnte durch dieses Experiment gezeigt werden, dass die CD69 Expression mit einer mittleren Eliminationsrate von 37,4% nur mäßig gesenkt werden konnte, während über 99% der CD25⁺-Zellen eliminiert wurden. In Hinblick auf die CD69 Depletion wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Dies zeigte, dass mittels CD69 Depletion über 80% der CD69⁺-Zellen eliminiert werden können, während parallel dazu lediglich 37,1% der CD25⁺-Zellen depletiert wurden. Rencher et al. setzte in diesem Zusammenhang über einen Zeitraum von zwei bis vier Tagen eine MLC, bestehend aus Lymphozyten des Spenders und den BLCL des Empfängers, an (378) (377). Anschließend wurden die Zellen, unter Verwendung von Antikörpern, die gegen die Oberflächenmarker CD25, CD69 und HLA-DR gerichtet waren, mit Hilfe eines Zellsorters depletiert

und erneut über einen Zeitraum von fünf Tagen mit den bestrahlten BLCL des Empfängers ko-kultiviert, um anschließend ein weiteres Mal depletiert zu werden. Das Resultat dieses Verfahrens umfasste eine geringe Anzahl an Lymphozyten, die die Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR auf der Oberfläche exprimierten. Nachdem Rencher et al. feststellte, dass die spezifische allogene Immunantwort gegen Empfängerantigene nach alleiniger PMNC-Stimulation nicht verlässlich eliminiert werden konnte, verwendete er in erster Linie EBV-transformierte B-Zellen als Stimulatorzellpopulation an Stelle der herkömmlichen PMNC (377). Die Vorteile der BLCL als Stimulatorzellen lagen zum einen in der Zellgröße und zum anderen in einer umfassenden MHC-Expression der Klasse I und II, sowie der Präsentation von Minor-Antigenen (462), was in jedem Falle zu einer besseren Alloaktivierung und daraus resultierend zu einer effizienteren Depletion geführt hatte.

In Übereinstimmung mit den Angaben aus der Literatur und den Ergebnissen unserer Versuche ergab sich der Tag 3 als günstigster Zeitpunkt für die Depletion alloreaktiver Zellen. Da die gleichzeitige Depletion mehrerer Aktivierungsmarker effizienter zu sein schien, verwendeten wir, im Rahmen der Depletion, Antikörper gegen die wichtigsten Oberflächenantigene allogener aktivierter T-Zellen, namentlich die Moleküle CD25, CD69 und HLA-DR. Zusätzlich könnten allerdings, im Rahmen der Depletion, auch Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD71 und CD161 in Betracht kommen.

4.3.2 Evaluation der Effizienz der jeweiligen Depletionsmethode anhand sekundärer Nachweisverfahren

Eine weitere Möglichkeit, um die Aktivität von Lymphozyten nach einem entsprechenden Depletionsverfahren abschätzen zu können, stellt die erneute Ko-Kultivierung der depletierten Lymphozyten mit den ursprünglichen Stimulatorzellen, oder mit „third party“ Zellen dar.

4.3.2.1 Oberflächenphänotypisierung

Hansen et al. depletierte alloreactive T-Zellen, die zuvor durch dendritische Zellen bzw. durch PMNC stimuliert worden waren. Dabei konnte, auch nach erneuter Stimulation mittels dendritischer Zellen in beiden Zellfraktionen nach der Depletion, gemessen an der Induktion der CD25 Expression, eine deutlich schwächere Immunantwort verzeichnet werden. Allerdings fiel hierbei der Nachweis der Immunantwort der Zellfraktion, die zuvor mit mononukleären Zellen stimuliert worden war, deutlich stärker aus, was darauf schließen lässt, dass eine Stimulation mittels herkömmlicher PMNC im allogenen System nicht ausreichend ist und daher auch eine deutlich weniger effiziente Depletion nach sich zieht (160). Koh et al. konnte, anhand der Oberflächenphänotypisierung zeigen, dass durch das Zellseparationsverfahren der Ausgangswert von $6\% \pm 2,4$ CD69⁺-Lymphozyten auf $1,5\% \pm 1,2$ CD69⁺-Lymphozyten reduziert werden konnte, während die Werte in den „third party“ MLCs mit $3,9\% \pm 2,7$ in der primären und $4\% \pm 2,4$ in der sekundären MLC konstant blieben (238). Um dabei den Grad der selektiven Depletion feststellen zu können, setzte Koh et al. die primären Immunantworten gegen die „first party“- und die „third party“-Zellen gleich 100% und errechneten so die noch vorhandene Restaktivität nach der Depletion. Diese belief sich dabei im Mittel auf $25,6\% \pm 17,9$ in der allogenen Reaktion und blieb in der Reaktion gegen „third party“ PMNC mit $115,7\% \pm 35,9$ zum größten Teil erhalten (238). Fehse et al. konnte, nach einer sechstägigen allogenen Kultivierung CD25 depletierter Zellen, nur noch einen sehr geringen Anteil der ursprünglichen CD25 Expression nachweisen, während die Ko-Kultivierung mit „third party“ Zellen die Entwicklung einer neuen Zellpopulation CD25⁺-Zellen ermöglichte. Ähnliche Ergebnisse wurden mit den Depletionsverfahren gegen CD69 alleine, sowie gegen CD25 und CD69 in Kombination erzielt (115). Insgesamt gesehen wurde dabei, trotz Ko-Depletion CD25⁺- und CD69⁺-Zellen, mit bis zu 20% eine relativ hohe Rate an Alloreaktivität gemessen. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass die Depletion CD69⁺-Lymphozyten mit maximal 86% relativ unzureichend ist (115, 238). Da die Expression der Aktivierungsantigene nach 96 Stunden sukzessive ihren Höhepunkt erreichte, war davon auszugehen, dass dies das Erscheinen verschiedener alloreaktiver Zellklone zu unterschiedlichen Zeitpunkten

widerspiegelte. Unter Verwendung einer Antikörperkombination gegen verschiedene Aktivierungsmarker, die alle unterschiedliche Aktivierungsstadien und möglicher Weise auch Differenzen in der Zellaktivierung repräsentieren, könnte, durch die anschließende immunomagnetische Separation eine maximale Anzahl an alloreaktiven Zellen eliminiert werden. Alternativ dazu könnten allerdings auch aufeinanderfolgende Depletionsschritte, die zu definierten Zeitpunkten stattfinden, zu einer vollständigen Depletion alloreaktiver T-Lymphozyten beitragen. Allgemein gesprochen könnten die Depletion dadurch verbessert werden, dass man mehrere Antikörper zur Depletion heranzieht bzw. die Zellfraktion, die bereits depletiert wurde ein weiteres mal über die Separationssäule laufen lässt (377).

Wie in der Literatur und von uns beschrieben, war es, abhängig von der Stärke der allogenen T-Zellaktivierung in Vorfeld der Depletion zu einer mehr oder weniger umfangreichen Expression der Aktivierungsmarker gekommen, die wiederum positiv mit der Effizienz der Depletion korrelierte.

4.3.2.2 Verbleibende Aktivierbarkeit nach der Depletion alloreaktiver Zellen

Um den Grad der selektiven Depletion festlegen zu können, setzte Koh et al., wie bereits beschrieben, die primäre Immunantwort gegen die „first party“ und die „third party“ Zellen gleich 100% und errechnete so die übriggebliebene Aktivität. Die restliche Zellaktivität, nach der CD69 Depletion, belief sich dabei im Mittel auf $25,6\% \pm 17,9$ in der allogenen Reaktion, und blieb in der Reaktion gegen „third party“ PMNC mit $115,7\% \pm 35,9$ zum größten Teil erhalten. Darüber hinaus konnte die zelluläre Aktivität alloreaktive T-Lymphozyten anhand der H^3 -TdR abgeschätzt werde, die daneben auch Aussagen über die Vitalität und die funktionelle Kapazität entsprechender Zellen zuließ. Dabei wurde, nach der Depletion $CD25^+$ -Zellen, eine starke Reduktion der H^3 -TdR Inkorporation beobachtet, während diesbezüglich ein deutlich geringerer Effekt nach der alleinigen Eliminierung $CD69^+$ -Zellen verzeichnet werden konnte. Hinsichtlich der H^3 -TdR Inkorporation konnte nach der Ko-Depletion $CD25^+$ - und $CD69^+$ -Lymphozyten eine maximale Reduktion der allogenen Aktivität verzeichnet werden (115). Rencher et al. demonstrierte

ebenfalls, dass die depletierten Zellen nicht mehr in der Lage waren, gegen Antigene auf der Oberfläche der BLCL des Empfängers zu reagieren, während die Immunantwort gegen „third party“ BLCL in voller Ausprägung erhalten blieb (377). Nachdem erkannt wurde, dass die HSTD Zellpopulation keine Immunantwort gegen die EBV-transformierten B-Zellen des Empfängers zeigte, fragte man, ob periphere mononukleäre Zellen (PMNC) als alternative Antigenquelle in der Lage seien, HSTD zu aktivieren. Selbst in diesem Fall konnte, in Bezug auf die PMNC des Empfängers, keine Immunantwort nachgewiesen werden, während diese gegenüber anderen Fremdanitigenen nachweislich vorhanden war. Selbst nach einer dreiwöchigen Zellexpansion kam es in Gegenwart der Empfängerzellen zu keiner signifikanten Veränderung in der proliferativen Aktivität (377).

4.3.2.3 Trotz T-Zelldepletion werden die T-Zellsubpopulationen bestehend aus CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten beibehalten

Anhand durchflußzytometrischer Analysen konnte gezeigt werden, dass sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-Zellen nach erfolgter Depletion in der negativen Zellfraktion vorhanden waren (377). Hinsichtlich der Zellfunktionen der einzelnen Subpopulationen konnte ferner, mittels ⁵¹Cr Markierung der „third party“, sowie der Empfänger-BLCL, demonstriert werden, dass die CD8⁺-Lymphozyten über eine zytotoxische Aktivität gegen weitere allogene Targets verfügten, während keine spezifische CTL-Aktivität gegen die Empfängerzellen nachgewiesen werden konnte (377). Auch die proliferative Funktion der CD4⁺-Lymphozyten, die mit Hilfe eines „limiting dilution assays“ nachgewiesen wurde, erbrachte die gleichen Erkenntnisse (377).

4.3.2.4 Mausmodell

Hu et al. infundierte insgesamt acht SCID Mäuse mittels 4×10^6 C57BL/6J Milzzellen von Spendermäusen. Mit Hilfe des durchflußzytometrischen Verfahrens konnte dabei gezeigt werden, dass die Transfusionspräparate im Mittel 40%-60% T-Lymphozyten und davon 0,6%-1,7% CD25⁺-Zellen enthielten. Eine akute GVHD manifestierte sich bei diesen Mäusen als so genannte Runt-Krankheit (= immun letaler Kümmerwuchs als Beispiel der GVHD immunologisch unreifer

Versuchsjungtiere auf die Injektion von Immunzellen erwachsener Spendertiere eines genetisch abweichenden Stammes der gleichen Art; analoges Geschehen beim Menschen bei materno-fetalen Zellübertritt). Diese Erkrankung manifestierte sich als Gewichtsverlust, Einnahme einer Hockposition, struppiges Fell, Rotverfärbung der Ohren, periorbitale Ödeme, bloßgelegte Hautareale, sowie durch blutende Wunden in der Analregion. Diese Symptome traten dabei innerhalb von 14 Tagen nach der Transfusion auf und verschlechterten sich im Laufe der Zeit, wobei fünf dieser Mäuse in der 5. Woche starben (190). In einem weiteren Schritt wurden 22 SCID-Mäuse mit 20×10^6 C57BL/6J Milzzellen der Spender transfundiert. Eine, sieben Tage später stattfindende Analyse, ergab anschließend, dass 8%-14% der T-Lymphozyten das CD25 Molekül exprimierten. In diesem Experiment erhielten jeweils elf Mäuse eine Infusion von ebenfalls 4×10^6 Zellen, die z.T. zuvor CD25⁺ depletiert worden waren. Die Depletionseffizienz, mit Hilfe immunomagnetischer Beads (Dynal, Inc., Lake Success, NY), umfasste dabei 87%. Erstaunlicher Weise zeigten alle Empfängermäuse, bis auf eine Maus in der Kontrollgruppe, die acht Wochen nach der Transfusion eine GVHD entwickelte und in der 10. Woche starb, allenfalls milde Symptome einer GVHD (190). Dies impliziert, dass die CD25⁺-T-Zellen nicht in der Lage sind, eine akute GVHD zu initiieren, was entweder auf die in vitro Manipulation der T-Lymphozyten oder aber darauf zurück geführt werden könnte, dass die Zellen am Höhepunkt der Zytokinsekretion, der in der primären und nicht in der sekundären Immunantwort verzeichnet wird (190) und u. a. zur T-Zellaktivierung notwendig ist, vorbeigeführt wurden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein immunomagnetisches Depletionsverfahren alloreaktiver Zellen am effizientesten war, wenn mehrere Aktivierungsmarker parallel bzw. angepasst an das jeweilige Expressionsmaximum des entsprechenden Aktivierungsmarkers depletiert wurden. Der günstigste Zeitpunkt der Depletion schien dabei der dritte Tag nach dem Beginn der primären allogenen Immunantwort zu sein. Durch das immunomagnetische Depletionsverfahren war eine Elimination von mehr als 99% der alloreaktiven Zellen möglich. Dennoch sollte zum Alloreaktivitätsnachweis, auf Grund

verschiedenster biochemischer Ereignisse, die sukzessive im Rahmen der T-Zellaktivierung eintreten, nicht nur ein Nachweisverfahren und ein Zeitpunkt für das Feststellen der restlichen Alloreaktivität gewählt werden. Durch die Depletion wurde der potentielle therapeutische Nutzen der verbliebenen T-Zellen nicht beeinflusst.

5. Zusammenfassung

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) einer Megadosis immunoselektierter CD34⁺ allogener Stammzellen stellt seit 1993 eine allgemein anerkannte Therapieform maligner Erkrankungen oder angeborener Dysfunktionen des hämatopoetischen Systems, sowie des Immunsystems dar. Retrospektive Studien an pädiatrischen Patienten, die haploidentisch transplantiert worden waren, zeigten, dass neben einer Reihe an Vorteilen (beinahe jeder Patient verfügt über ein HLA-haploidentisches Familienmitglied, Engraftmentrate: 100%, GVHD (>1): keine, ANC (absolute neutrophil count) (>500): 12 Tage), die diese Therapieform mit sich bringt, in einigen Fällen auch ernstzunehmende Komplikationen auftreten können. Hierzu zählen insbesondere die Transplantatabstoßung, sowie eine verlängerte Periode der Immundefizienz (CD4⁺ T-Zellen >100), die mit wachsendem Alter des Patienten ebenfalls zunimmt und im Hinblick auf das oben erwähnte pädiatrische Patientenkollektiv (Durchschnittsalter: 9 Jahre) durchschnittlich drei Monate umfasste. Für gewöhnlich beginnt die Problematik der Transplantatabstoßung mit der Entwicklung eines gemischten Chimärismus, und indiziert die Infusion von Spenderlymphozyten. Aber auch das Eintreten lebensbedrohlichen viraler Infektionen und Pilzinfektionen stellt eine Indikation für die Applikation immunkompetenter T-Lymphozyten dar. Die Anzahl, der im Inoculum enthaltenen T-Lymphozyten beschränkt sich derzeit allerdings auf ein Maximum von 3×10^4 T-Lymphozyten/kg, da die Applikation größerer T-Zell-Konzentrationen mit einem höheren Risiko hinsichtlich der Entwicklung einer GVHD verbunden wäre.

Die Infusion immunkompetenter, nicht alloreaktiver T-Zellen könnte folglich in Fällen der Transplantatabstoßung, sowie bei lebensbedrohlichen Infektionen eine therapeutische Option darstellen, die nicht länger mit dem Risiko einer GVHD-Entwicklung behaftet wäre.

Aus diesem Grund entwickelten wir Strategien für eine spezifische Depletion alloreaktiver T-Zellen unter Bewahrung der adoptiven immunologischen Effekte, die durch die restlichen T-Lymphozyten hervorgerufen werden können.

Unter den verwendeten Medien entsprach das Medium X-Vivo15 mit dem Zusatz

von humanem AB-Serum in einer Konzentration von 10% am ehesten den Kriterien, die für die Generierung alloreaktiver Zellen in einer Lymphozytenmischkultur (MLC) ausschlaggebend waren.

Um mit Hilfe einer MLC spezifisch aktivierte, alloreaktive T-Lymphozyten zu generieren, etablierten wir drei verschiedene Methoden der T-Zellstimulation. Aus diesem Grund wurden die potentiell alloreaktiven T-Lymphozyten zusammen mit bestrahlten peripheren mononukleären Zellen (PMNC) (1), mit bestrahlten PMNC nach Übernachtinkubation mit Zytokinen (2), in Anlehnung an die Versuche Bisharas et al., sowie mit bestrahlten Dendriten (3), monozytären Ursprungs, kultiviert. Die Ausgangszellzahl der PMNC vor Kulturbeginn sollte dabei mindestens 20×10^6 periphere mononukleäre Spenderzellen umfassen, da durch die Zellkultivierung und das anschließende Depletionsverfahren durchschnittlich 10-15% der ursprünglichen Lymphozyten verloren gingen. Nach 72 Stunden exprimierten die entsprechenden T-Lymphozyten in unterschiedlichen Prozentsätzen die Aktivierungsantigene CD25, CD69, HLA-DR, CD71, CD95, CD161, CD28, CD90, CD8 und CD56, was mittels FACS-Analyse gezeigt und größten Teils durch Angaben in der Literatur bestätigt werden konnte. Dies zeigte, dass die Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyte in vitro möglich war und dass neben den verwendeten Antigenen weitere Aktivierungsmarker, wie z. B. das CD71- oder CD161-Molekül für die immunomagnetische Depletion herangezogen werden könnten. Betrachtete man die Ko-Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR mit Hilfe eines sekundären GAM-Antikörpers (Goat-anti-Mouse), so wurden, auch von anderen Arbeitsgruppen, die höchsten Aktivierungsraten erreicht, wenn die Responder-T-Lymphozyten mit dendritischen Zellen ko-kultiviert worden waren, gefolgt von zytokinpräinkubierten PMNC und unbehandelten PMNC. Aus diesem Grund favorisierten wir die Stimulationsverfahren mittels zytokinmodifizierte PMNC oder dendritischer Zellen in Hinblick auf die Generierung alloreaktiver Zellen.

Der günstigste Zeitpunkt für die anschließende immunomagnetische Depletion schien, im Hinblick auf die Expressionskinetik der Aktivierungsmarker, in der initialen Phase der T-Zellaktivierung zu liegen, da zu diesem Zeitpunkt die klonale Expansion entsprechender alloreaktiver Lymphozyten noch nicht eingesetzt hatte

und folglich von einer größeren Depletionsreinheit ausgegangen werden konnte. Durch die immunomagnetischen Depletion gegen die Oberflächenmarker CD25, CD69 und HLA-DR mit Hilfe der Dynalbeads konnten die alloreaktiven T-Lymphozyten, effizient depletiert werden. Dabei korrelierte die Effizienz der Depletion positiv mit der vorausgegangenen allogenen Aktivierung. Auch innerhalb der folgenden vierundzwanzigstündigen Restimulation konnte in jeder Versuchsreihe eine Reduktion der Alloreaktivität anhand einer verminderten Interferonsekretion, sowohl im Sekretions-Assay, als auch im Elispot-Assay, verglichen mit der Ausgangssituation vor Depletion bestätigt werden. Auch weitere fünf Tage später zeigte sich in der Aufnahme des tritiummarkierten Thymidins, als Zeichen der proliferativen Zellaktivität, eine deutlich reduzierte Immunantwort nach Restimulation durch die ursprünglich verwendeten allogenen Stimulatoren. Die übrigen T-Zellen besaßen nachweislich weiterhin eine immunologische Aktivität in Gegenwart von „third party“ Zellen, Tetanus Toxoid, CMV-Antigen und PHA (Phythämagglutinin).

Das oben beschriebene Verfahren würde es uns erlauben, die Intensität des Konditionierungsregimes im Vorfeld der Transplantation zu reduzieren, da neben einigen Zellen innerhalb der CD34⁺ Population auch eine Subpopulation der T-Lymphozyten, nämlich die zytotoxischen T-Zellen (CTLs) über eine Veto-Aktivität verfügen und so Toleranz gegen das allogene Transplantat induzieren könnten. Die Durchführung einer intelligenten T-Zell-Depletion, deren Vorzeichen sich nicht länger danach richtet, wie viele T-Zellen im Inoculum maximal enthalten sein dürfen, ohne eine GVHD zu induzieren, sondern, die viel mehr danach fragt, wie viele Lymphozyten nötig sind, um eine Abstoßungsreaktion, bzw. eine Infektion und ein häufig daraus resultierendes Rezidiv der Grunderkrankung therapeutisch anzugehen, könnte einen Fortschritt in der allogenen Transplantation darstellen.

6. Verzeichnis der Abkürzungen

A	Autologe Responderzellen einer Versuchsperson
A*	Bestrahlte autologe Responder- (Spender-) Zellen
AIM	activation inducer molecule
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANC	absolute neutrophil count
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
B	Allogene Stimulatorzellen
B*	Bestrahlte allogene Stimulator- (Empfänger-) Zellen
B6 hCD4	Mausmodell
B6/D2	Mausmodell
B7-1	Ligand für CD28
B7-2	Ligand für CD28
BALB/c (H-2d)	Mausmodell
BSA	Bovines Serumalbumin
C	„third party“ Stimulatorzellen
C*	Bestrahlte „third party“ Stimulatorzellen
C3H/HeJ	Mausmodell
C3H.SW	Mausmodell
C57BL/6	Mausmodell
C57BL/6 (H-2b)	Mausmodell
C57BL/6xDBA F1 (H-2b/d)	Mausmodell
C57BL/6J	Mausmodell
CFDASE	Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester
CD	Cluster of Differentiation
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
ConA	Concanavalin

⁵¹ Cr	Chromisotop
¹³⁷ Cs	Cäsiumisotop
CsA	Cyclosporin A
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA4-Ig	Ligand
diOG	Diacylglycerol
DLI	Donor Lymphocyte Infusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA 1	Early activation Antigen
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Komplexbildner
ELISPOT Assay	Enzyme Linked Immunospot Assay
F1	Erste Filialgeneration
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
Fc	Konstanter Antikörperabschnitt
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
Fv	Variabler Antikörperabschnitt
GAM	Goat-anti-Mouse
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GIT	Gastrointestinaltrakt
GMP	good manufacturing practice
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen 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
He	Helium
high	Hochpositiv

HLA	Human Leucocyte Antigen
HSA	Humanes Serumalbumin
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSTD	Selektiv depletierte T-Lymphozyten
HSV-tk	Herpes Simplex Virus Thymidinkinase
H ³ -TdR	[6-H ³]-Thymidininkorporation
HTLp	Helper T-Lymphocyte Precursor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin 2 Rezeptor
IT	Immunotoxin
KMT	Knochenmarktransplantation
L	Ligand
L1210-Fas	Fas-Molekül
LNGFR	human low-affinity nerve growth factor receptor
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoclonal Antibody
MACS	Magnet activated cell sorter
mHA	Minor-Histokompatibilitätsantigen
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
MIs	Lymphozytenstimulationsantigene
MLC	Mixed Lymphocyte Culture
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
MLR3	CD69 Molekül
MMB3.9	Mausmodell
MPC	Magnetpartikel-Konzentrator
MRD	Minimal Residual Disease
mRNA	Messenger RNA
MTX	Methotrexat
NCAM	Neural cell adhesion molecule
Ne	Neon

NGF	Non-Hodgkin-Lymphom
NKR-P1A	Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMDP	The National Marrow Donor Program
OKT3	Stimulans
OVA	Stimulans
P-14 TCR	Rezeptor
PBMC	Peripher Blood Mononuclear Cells
PE	Phycoerythrin
PE	Pseudomonas Enterotoxin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PHA	Phythämaglutinin
PI	Propidiumiodid
PMA	Stimulans
PMNC	Periphere mononukleäre Zellen
PKC	Proteinkinase C
PI-3 Kinase	Phosphokinase
R	Rezeptor
RAG	Recombination Activating Gene
rIFN	Rekombinantes Interferon
RNA	Ribonukleinsäure
sCD	Im Serum gelöster Cluster of Differentiation
SCID	Severe Combined Immundeficiency
SFM	Serumfreies Medium
SI	Stimulationsindex
SSC	Side Scatter
TBI	Total Body Irradiation
TCR	T-Zellrezeptor
TCR $\alpha\beta$	T-Zellrezeptor $\alpha\beta$
TCR $\gamma\delta$	T-Zellrezeptor $\gamma\delta$
Th	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor Nekrose Faktor

VEA	Very early activation
VLA-1	Very Late Activation Antigen
VZV	Varizella-Zoster-Virus
4F2	Insulinrezeptor
ZKRD	Zentrales Knochenmarkspender Register Deutschland
+	Positiv
-	Negativ

7. Tabellenverzeichnis

- Tab. 2.4-01 Nichtfluoreszierende Antikörper für die selektive Zellseparation auf Magnetpartikel-Konzentrator-Basis (MPCTM-1)
- Tab. 2.5.2-02 Kontroll-Antikörper für die durchflußzytometrische Analyse
- Tab. 2.5.3-03 Antikörper zur Expressionsanalyse von Zellpopulationen
- Tab. 2.5.4-04 Antikörper zur Analyse Interferon- γ sezernierender Zellen (Sekretions-Assay, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Tab.2.12.2-05 Belegungsplan für den Elispot-Assay
- Tab. 3.1.1-06 Schematische Übersicht über die Kulturbedingungen
Alleinige Zellkultivierung der Responderzellen (A) als initialer Bezugspunkt der Reaktionsfähigkeit, sowie Ko-Kultivierung der Responderzellen mit bestrahlten allogenen Stimulatorzellen (B*) in einer Mikro-MLC und Kultivierung der Responderzellen nach Zugabe von Phythämagglutinin (PHA) als Reagenz für eine maximale T-Zellaktivierung. Kultivierung in X-Vivo 15-, RPMI 1640- und SFM-Komplettmedium, unter Zusatz von humanem AB-Serum oder fötalem-Kälberserum (FCS)
- Tab. 3.1.1-07 Mittelwert und Standardabweichung der in Abb. 3.1.1-01 dargestellten [6-H³]-Thymidineinbauraten bezogen auf die allogene und die maximale Stimulierbarkeit. Bewertung des Unterschiedes zwischen den Einbauraten
- Tab. 3.1.2.1.1-08 Oberflächenmarker auf allogenen aktivierten T-Lymphozyten

-
- Tab. 3.1.2.1.1-09 Schematische Übersicht über die GAM-positiven Zellen aus 18 unabhängigen Versuchen nach dreitägiger Kultivierung in unterschiedlichen Kultursystemen
- Tab. 3.1.2.1.2-10 Elispot-Assay
Interferon- γ Nachweis
Auflistung der Ergebnisse aus 16 unabhängigen Versuchen.
Gemessen wurde jeweils die Anzahl der „spots“
- Tab. 3.1.2.1.2-11 Sekretions-Assay
Tabellarische Darstellung des Prozentsatzes an Interferon- γ produzierenden T-Lymphozyten aus 9 unabhängigen Versuchen unter Verwendung unterschiedlicher allogener Stimulatoren
- Tab. 3.1.2.1.3-12 Proliferations-Assay
Darstellung der Stimulationsindizes ausgehend von der Mikro-MLC in jeder Versuchsreihe, die durch „unbehandelte“ PMNC stimuliert und deren Stimulationsindex gleich 100% gesetzt wurde
- Tab. 3.1.2.2-13 Aktivierungsantigene auf der Oberfläche von T-Lymphozyten
- Tab. 3.1.2.2-14 Übersicht über den Verlauf der Antigenexpression auf T-Zellen innerhalb eines Zeitraums von sechs Tagen nach dem Ansetzen der MLC. In folgender Tabelle sind die prozentualen Anteile an Lymphozyten dargestellt, die die entsprechenden Antigene exprimierten

- Tab. 3.2.1-15 Prozentsatz der GAM-positiven Zellen vor und nach der Depletion. Angaben aus insgesamt 54 unabhängigen Versuchen
- Tab. 3.2.2-16 Sekretions-Assay
Tabellarische Übersicht über die Effizienz des Depletionsverfahrens nachgewiesen, anhand von Interferon sezernierenden Zellen aus zwölf unabhängigen Versuchen mit Hilfe des Sekretions-Assays
- Tab. 3.2.2-17 Elispot-Assay
Tabellarische Übersicht über die Mittelwerte aller Versuchsreihen, bestehend aus jeweils vier unabhängigen Versuchen. Die Anzahl der „spots“ ist als Prozentsatz der MLC, die durch „unbehandelte“ PMNC stimuliert und gleich 100% gesetzt wurde, wiedergegeben
- Tab. 3.2.3-18 [[6-H³]-Thymidin-Proliferations-Assay
Tabellarische Übersicht über die Mittelwerte aus allen Versuchsreihen bestehend aus jeweils vier unabhängigen Versuchen vor und nach der Depletion. Die Anzahl der radioaktiven Ereignisse ist als Prozentsatz der MLC, die durch „unbehandelte“ PMNC stimuliert und 100% gesetzt wurde, wiedergegeben

8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 3.1.1.-01 Säulendiagramm
Stimulierbarkeit der PMNC unter verschiedenen Kulturbedingungen. Vergleichende Darstellung der [6-H³]-Thymidineinbaurate als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten
- Abb. 3.1.2.1.1-02 Darstellung der GAM-positiven Responderzellen einer Versuchsreihe unter verschiedenen Kulturbedingungen
- Abb. 3.1.2.1.2-03 Elispot-Assay
Quantitatives Nachweisverfahren von sezerniertem Interferon- γ nach Stimulation von T-Lymphozyten mittels drei verschiedener allogener Stimulatoren, nämlich PMNC, zytokinstimulierter PMNC und dendritischer Zellen
- Abb. 3.1.2.1.2-04 Sekretions-Assay
Abbildung der Interferon- γ produzierenden T-Lymphozyten einer Versuchsreihe, d. h. nach Stimulation durch PMNC, modifizierte PMNC und Dendriten
- Abb. 3.1.2.2-05 Antigenexpression der Oberflächenmarker CD25, CD69 und HLA-DR auf vitalen T-Lymphozyten
- Abb. 3.1.2.2-06 Antigenexpression der zusätzlich untersuchten Oberflächenmarker CD8, CD28, CD56, CD71, CD90, CD95 und CD161 auf vitalen T-Lymphozyten
- Abb. 3.2-07 Zeitlicher Ablauf des Depletionsversuchs
- Abb. 3.2-08 Darstellung der Ko-Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR auf alloreaktiven T-Lymphozyten

- Abb. 3.2.1-09 Exemplarische Darstellung der Zellpopulationen einer Versuchsreihe vor und nach der Depletion unter verschiedenen Bedingungen
- Abb. 3.2.2-10 Sekretions-Assay
Nachweis der Effizienz des Depletionsverfahrens anhand Interferon- γ sezernierender Zellen
- Abb. 3.2.2-11 Elispot-Assay
MLC: stimuliert durch „unbehandelte“ PMNC vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen
- Abb. 3.2.2-12 Elispot-Assay
MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen
- Abb. 3.2.2-13 Elispot-Assay
MLC: stimuliert durch dendritische Zellen vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen
- Abb. 3.2.3-14 [6- H^3]-Thymidin-Proliferations-Assay
MLC: stimuliert durch „unbehandelte“ PMNC vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen
- Abb. 3.2.3-15 [6- H^3]-Thymidin-Proliferations-Assay
MLC: stimuliert durch präinkubierte PMNC vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen
- Abb. 3.2.3-16 [6- H^3]-Thymidin-Proliferations-Assay
MLC: stimuliert durch dendritische Zellen vor und nach der Depletion unter verschiedenen Kulturbedingungen

9. Literaturverzeichnis

1. Abbas, "Cellular and Molecular Immunology", Philadelphia Saunders, (1994).
2. A.K.Abbas, K.M.Murphy, and A.Sher, Functional diversity of helper T lymphocytes, *Nature* 383:787 (1996).
3. W.H.Adler, T.Takiguchi, B.Marsh, and R.T.Smith, Cellular recognition by mouse lymphocytes in vitro. I. Definition of a new technique and results of stimulation by phytohemagglutinin and specific antigens, *J.Exp.Med.* 131:1049 (1970).
4. A.Alcover, D.Ramarli, N.E.Richardson, H.C.Chang, and E.L.Reinherz, Functional and molecular aspects of human T lymphocyte activation via T3-Ti and T11 pathways, *Immunol.Rev.* 95:5 (1987).
5. A.Alcover, M.J.Weiss, J.F.Daley, and E.L.Reinherz, The T11 glycoprotein is functionally linked to a calcium channel in precursor and mature T-lineage cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:2614 (1986).
6. R.H.Alford, The effects of autologous plasma on human lymphocyte transformation, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 133:1443 (1970).
7. R.D.Allen, T.A.Staley, and C.L.Sidman, Differential cytokine expression in acute and chronic murine graft- versus-host-disease, *Eur.J.Immunol.* 23:333 (1993).
8. J.E.Anderson, F.R.Appelbaum, and R.Storb, An update on allogeneic marrow transplantation for myelodysplastic syndrome, *Leuk.Lymphoma* 17:95 (1995).
9. J.Andersson, K.O.Gronvik, E.L.Larsson, and A.Coutinho, Studies on T lymphocyte activation. I. Requirements for the mitogen-dependent production of T cell growth factors, *Eur.J.Immunol.* 9:581 (1979).
10. J.H.Antin, Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomenon, *Blood* 82:2273 (1993).
11. J.H.Antin, B.E.Bierer, B.R.Smith, J.Ferrara, E.C.Guinan, C.Sieff, D.E.Golan, R.M.Macklis, N.J.Tarbell, E.Lynch, and ., Selective depletion of bone marrow T lymphocytes with anti-CD5 monoclonal antibodies: effective prophylaxis for graft-versus-host disease in patients with hematologic malignancies, *Blood* 78:2139 (1991).
12. J.H.Antin and J.L.Ferrara, Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease, *Blood* 80:2964 (1992).
13. Y.Aoki, S.Takahashi, S.Okamoto, and S.Asano, Graft-versus-leukemia after second allogeneic bone marrow transplantation, *Blood* 84:3983 (1994).
14. 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).
15. R.C.Ash, J.T.Casper, C.R.Chitambar, R.Hansen, N.Bunin, R.L.Truitt, C.Lawton, K.Murray, J.Hunter, L.A.Baxter-Lowe, and ., Successful allogeneic transplantation of T-cell-depleted bone marrow from closely HLA-matched unrelated donors, *N.Engl.J.Med.* 322:485 (1990).
16. K.Atkinson, T cell subpopulations defined by monoclonal antibodies after HLA- identical sibling marrow transplantation. II. Activated and functional subsets of helper-inducer and cytotoxic-suppressor subpopulations defined

- by two-colour fluorescence flow cytometry, *Bone Marrow Transplant* 1:121 (1986).
17. K. Atkinson, Chronic graft-versus-host disease, *Bone Marrow Transplant* 5:69 (1990).
 18. K. Atkinson, V. Farewell, R. Storb, M.S. Tsoi, K.M. Sullivan, R.P. Witherspoon, A. Fefer, R. Clift, B. Goodell, and E.D. Thomas, Analysis of late infections after human bone marrow transplantation: role of genotypic nonidentity between marrow donor and recipient and of nonspecific suppressor cells in patients with chronic graft-versus-host disease, *Blood* 60:714 (1982).
 19. K. Atkinson, R. Storb, R.L. Prentice, P.L. Weiden, R.P. Witherspoon, K. Sullivan, D. Noel, and E.D. Thomas, Analysis of late infections in 89 long-term survivors of bone marrow transplantation, *Blood* 53:720 (1979).
 20. H. Auchincloss, Jr. and H. Sultan, Antigen processing and presentation in transplantation, *Curr. Opin. Immunol.* 8:681 (1996).
 21. M.F. Bachmann, K. McKall-Faienza, R. Schmits, D. Bouchard, J. Beach, D.E. Speiser, T.W. Mak, and P.S. Ohashi, Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation, *Immunity*. 7:549 (1997).
 22. P. Bader, J. Beck, P.G. Schlegel, R. Handgretinger, D. Niethammer, and T. Klingebiel, 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 (1997).
 23. P. Bader, W. Holle, T. Klingebiel, 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 (1997).
 24. P. Bader, T. Klingebiel, A. Schaudt, U. Theurer-Mainka, R. Handgretinger, P. Lang, D. Niethammer, and J.F. Beck, Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children, *Leukemia* 13:2079 (1999).
 25. J. Banchereau and R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392:245 (1998).
 26. D.W.H. Barnes and J.F. Loutit, What is the recovery factor in spleen?, *Nucleonics* 12:68 (54 A.D.).
 27. A.J. Barrett and V. Malkovska, Graft-versus-leukaemia: understanding and using the alloimmune response to treat haematological malignancies, *Br.J. Haematol.* 93:754 (1996).
 28. R.J. Barth, Jr., J.J. Mule, P.J. Spiess, and S.A. Rosenberg, Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes, *J. Exp. Med.* 173:647 (1991).
 29. 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).
 30. J. Bender, T. Mitchell, J. Kappler, and P. Murrack, CD4+ T cell division in

- irradiated mice requires peptides distinct from those responsible for thymic selection, *J.Exp.Med.* 190:367 (1999).
31. G.Berke, The CTL's kiss of death, *Cell* 81:9 (1995).
 32. G.Berke, Unlocking the secrets of CTL and NK cells, *Immunol.Today* 16:343 (1995).
 33. B.Bettler, H.Hofstetter, M.Rao, W.M.Yokoyama, F.Kilchherr, and D.H.Conrad, Molecular structure and expression of the murine lymphocyte low-affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII), *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:7566 (1989).
 34. B.Bettler, R.Maier, D.Ruegg, and H.Hofstetter, Binding site for IgE of the human lymphocyte low-affinity Fc epsilon receptor (Fc epsilon RII/CD23) is confined to the domain homologous with animal lectins, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:7118 (1989).
 35. E.Beutler, K.G.Blume, K.J.Bross, R.K.Chillar, O.B.Ellington, J.L.Fahey, M.J.Farbstein, G.M.Schmidt, W.E.Spruce, and M.A.Turner, Bone marrow transplantation as the treatment of choice for "good risk" adult patients with acute leukemia, *Trans.Assoc.Am.Physicians* 92:189 (1979).
 36. U.Beutner and H.R.MacDonald, TCR-MHC class II interaction is required for peripheral expansion of CD4 cells in a T cell-deficient host, *Int.Immunol.* 10:305 (1998).
 37. R.E.Billingham and L.Brent, Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease., *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 242: (54 A.D.).
 38. A.Bishara, C.Brautbar, A.Nagler, S.Slavin, B.Leshem, I.Cohen, and E.Kedar, Prediction by a modified mixed leukocyte reaction assay of graft-versus- host disease and graft rejection after allogeneic bone marrow transplantation, *Transplantation* 57:1474 (1994).
 39. D.K.Bishop and C.G.Orosz, Limiting dilution analysis for alloreactive, TCGF-secretory T cells. Two related LDA methods that discriminate between unstimulated precursor T cells and in vivo-alloactivated T cells, *Transplantation* 47:671 (1989).
 40. J.M.Bjorndahl, S.Nakamura, T.Hara, L.K.Jung, and S.M.Fu, The 28-kDa/32-kDa activation antigen EA 1. Further characterization and signal requirements for its expression, *J.Immunol.* 141:4094 (1988).
 41. H.Blaehr and J.Ladefoged, Mitogen-induced lymphocyte transformation in four different serum-free media, *J.Immunol.Methods* 111:125 (1988).
 42. D.Blaise, G.Gravis, and D.Maraninchi, Long-term follow-up of T-cell depletion for bone marrow transplantation, *Lancet* 341:51 (1993).
 43. L.K.Bockenstedt, M.A.Goldsmith, M.Dustin, D.Olive, T.A.Springer, and A.Weiss, The CD2 ligand LFA-3 activates T cells but depends on the expression and function of the antigen receptor, *J.Immunol.* 141:1904 (1988).
 44. J.G.Bodmer, S.G.Marsh, E.D.Albert, W.F.Bodmer, R.E.Bontrop, D.Charron, B.Dupont, H.A.Erlich, B.Mach, and W.R.Mayr, Nomenclature for factors of the HLA system, 1995, *Tissue Antigens* 46:1 (1995).
 45. C.Bonini, G.Ferrari, S.Verzeletti, P.Servida, E.Zappone, L.Ruggieri, M.Ponzoni, S.Rossini, F.Mavilio, C.Traversari, and C.Bordignon, HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia, *Science* 276:1719 (1997).

46. M.M.Bortin, M.M.Horowitz, and A.A.Rimm, Increasing utilization of allogeneic bone marrow transplantation. Results of the 1988-1990 survey, *Ann.Intern.Med.* 116:505 (1992).
47. G.J.Bosch, A.M.Joosten, J.H.Kessler, C.J.Melief, and O.C.Leeksa, Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide, *Blood* 88:3522 (1996).
48. 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).
49. V.A.Boussiotis, G.J.Freeman, G.Gray, J.Gribben, and L.M.Nadler, B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance, *J.Exp.Med.* 178:1753 (1993).
50. A.Boyum, Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction, *Scand.J Clin.Lab Invest Suppl* 97:7 (1968).
51. P.A.Bretscher and M.Cohn, Minimal model for the mechanism of antibody induction and paralysis by antigen, *Nature* 220:444 (1968).
52. T.Brocker, Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells, *J.Exp.Med.* 186:1223 (1997).
53. P.Brossart, F.Grunebach, G.Stuhler, V.L.Reichardt, R.Mohle, L.Kanz, and W.Brugger, Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Blood* 92:4238 (1998).
54. P.Brossart, A.Zobywalski, F.Grunebach, L.Behnke, G.Stuhler, V.L.Reichardt, L.Kanz, and W.Brugger, Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells, *Cancer Res.* 60:4485 (2000).
55. R.H.Buckley, R.I.Schiff, and D.B.Amos, Blocking of autologous and homologous leukocyte responses by human alloimmune plasmas: a possible in vitro correlate of enhancement, *J.Immunol.* 108:34 (1972).
56. R.P.Bucy, D.W.Hanto, E.Berens, and R.D.Schreiber, Lack of an obligate role for IFN-gamma in the primary in vitro mixed lymphocyte response, *J.Immunol.* 140:1148 (1988).
57. G.F.Burns, T.Triglia, J.A.Werkmeister, C.G.Begley, and A.W.Boyd, TLiSA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors, *J.Exp.Med.* 161:1063 (1985).
58. 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).
59. Z.Cai and J.Sprent, Resting and activated T cells display different requirements for CD8 molecules, *J.Exp.Med.* 179:2005 (1994).
60. Z.Cai and J.Sprent, Influence of antigen dose and costimulation on the primary response of CD8+ T cells in vitro, *J.Exp.Med.* 183:2247 (1996).
61. S.Carlens, M.Gilljam, M.Remberger, J.Aschan, B.Christensson, and

- M.S.Dilber, Ex vivo T lymphocyte expansion for retroviral transduction: influence of serum-free media on variations in cell expansion rates and lymphocyte subset distribution, *Exp.Hematol.* 28:1137 (2000).
62. L.L.Carter and R.W.Dutton, Relative perforin- and Fas-mediated lysis in T1 and T2 CD8 effector populations, *J.Immunol.* 155:1028 (1995).
 63. 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).
 64. A.L.Causey, R.M.Wooten, L.W.Clem, and J.E.Bly, A serum-free medium for human primary T lymphocyte culture, *J.Immunol.Methods* 175:115 (1994).
 65. C.Caux, C.Dezutter-Dambuyant, D.Schmitt, and J.Banchereau, GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells, *Nature* 360:258 (1992).
 66. M.Cavazzana-Calvo, D.Bensoussan, N.Jabado, E.Haddad, E.Yvon, M.Moskwa, C.A.Tachet des, M.Buisson, P.Morand, J.M.Virion, F.Le Deist, and A.Fischer, Prevention of EBV-induced B-lymphoproliferative disorder by ex vivo marrow B-cell depletion in HLA-phenotypical or non-identical T-depleted bone marrow transplantation, *Br.J.Haematol.* 103:543 (1998).
 67. 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).
 68. J.A. Cavins, S.C. Scheer, and E.D. Thomas, The recovery of lethally irradiated dogs given infusions of autologous leukocytes preserved at -80°C , *Blood* 23:38 (1964).
 69. M.Cebrian, R.J.Miguel, A.Lopez-Rivas, G.Rodriguez-Tarduchy, M.O.de Landazuri, and F.Sanchez-Madrid, Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C, *Eur.J.Immunol.* 19:809 (1989).
 70. M.Cebrian, E.Yague, M.Rincon, M.Lopez-Botet, M.O.de Landazuri, and F.Sanchez-Madrid, Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes, *J.Exp.Med.* 168:1621 (1988).
 71. M.Cella, D.Scheidegger, K.Palmer-Lehmann, P.Lane, A.Lanzavecchia, and G.Alber, Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation, *J.Exp.Med.* 184:747 (1996).
 72. R.Champlin, Allogeneic bone marrow transplantation using unrelated donors, *Leuk.Lymphoma* 11 Suppl 2:149 (1993).
 73. R.Champlin, Bone marrow transplantation for Hodgkin's disease--recent advances and current issues, *Leuk.Lymphoma* 10 Suppl:103 (1993).
 74. R.Champlin, W.Ho, J.Gajewski, S.Feig, M.Burnison, G.Holley, P.Greenberg, K.Lee, I.Schmid, J.Giorgi, and ., Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation, *Blood* 76:418 (1990).
 75. P.Y.Chan and F.Takei, Molecular cloning and characterization of a novel

- murine T cell surface antigen, YE1/48, *J.Immunol.* 142:1727 (1989).
76. P.S.Chase, The effects of human serum fractions on phytohemagglutinin- and concanavalin A-stimulated human lymphocyte cultures, *Cell Immunol.* 5:544 (1972).
 77. V.K.Chaudhary, C.Queen, R.P.Junghans, T.A.Waldmann, D.J.FitzGerald, and I.Pastan, A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin, *Nature* 339:394 (1989).
 78. Cho B.K., Rao V.P., Ge Q., Eisen H.N., and Chen J., Homeostasis-stimulated Proliferation Drives Naive T Cells to Differentiate Directly into Memory T Cells, *J.Exp.Med.* (2000).
 79. R.A.Cliff, C.D.Buckner, F.R.Appelbaum, S.I.Bearman, F.B.Petersen, L.D.Fisher, C.Anasetti, P.Beatty, W.I.Bensinger, K.Doney, and ., Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens, *Blood* 76:1867 (1990).
 80. R.A.Cliff, C.D.Buckner, E.D.Thomas, W.I.Bensinger, R.Bowden, E.Bryant, H.J.Deeg, K.C.Doney, L.D.Fisher, J.A.Hansen, and ., Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide, *Blood* 84:2036 (1994).
 81. R.A.Cliff, 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).
 82. R.H.Collins, Jr., Z.R.Rogers, M.Bennett, V.Kumar, A.Nikein, and J.W.Fay, Hematologic relapse of chronic myelogenous leukemia following allogeneic bone marrow transplantation: apparent graft-versus-leukemia effect following abrupt discontinuation of immunosuppression, *Bone Marrow Transplant* 10:391 (1992).
 83. R.H.Collins, Jr., O.Shpilberg, W.R.Drobyski, D.L.Porter, S.Giralt, R.Champlin, S.A.Goodman, S.N.Wolff, W.Hu, C.Verfaillie, A.List, W.Dalton, N.Ognoskie, A.Chetrit, J.H.Antin, and J.Nemunaitis, Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation, *J.Clin.Oncol.* 15:433 (1997).
 84. S.R.Cooperband, J.A.Green, M.A.Kennedy, and M.M.Grant, Dissociation and inhibition of the stimulatory effect of phytohaemagglutinin on protein and DNA synthesis in human lymphocyte cultures, *Nature* 214:1240 (1967).
 85. G.Corradin, H.M.Etlinger, and J.M.Chiller, Lymphocyte specificity to protein antigens. I. Characterization of the antigen-induced in vitro T cell-dependent proliferative response with lymph node cells from primed mice, *J.Immunol.* 119:1048 (1977).
 86. M.E.Cosulich, A.Rubartelli, A.Risso, F.Cozzolino, and A.Bargellesi, Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:4205 (1987).
 87. T.Cotner, J.M.Williams, L.Christenson, H.M.Shapiro, T.B.Strom, and J.Strominger, Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content, *J.Exp.Med.* 157:461 (1983).
 88. G.R.Crabtree, Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte

- activation, *Science* 243:355 (1989).
89. R.Craston, M.Koh, D.A.Mc, N.Ray, H.G.Prentice, and M.W.Lowdell, Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells, *J.Immunol.Methods* 209:37 (1997).
 90. C.Daniel, S.Horvath, and P.M.Allen, A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR, *Immunity*. 8:543 (1998).
 91. S.G.Danzer, C.aCampo, and L.Rink, Interferon-gamma plays a key role in the human mixed lymphocyte culture, *Bone Marrow Transplant* 18:991 (1996).
 92. A.R.Datta, A.J.Barrett, Y.Z.Jiang, A.Guimaraes, D.A.Mavroudis, F.van Rhee, A.A.Gordon, and A.Madrigal, Distinct T cell populations distinguish chronic myeloid leukaemia cells from lymphocytes in the same individual: a model for separating GVHD from GVL reactions, *Bone Marrow Transplant* 14:517 (1994).
 93. J. Dausset, Iso-leuco-anticorps, *Acta Haematol.* 20:156 (1958).
 94. M.L.De Bruijn, J.D.Nieland, T.N.Schumacher, H.L.Ploegh, W.M.Kast, and C.J.Melief, Mechanisms of induction of primary virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, *Eur.J.Immunol.* 22:3013 (1992).
 95. 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).
 96. T.de Witte, J.Hoogenhout, B.de Pauw, R.Holdrinet, J.Janssen, J.Wessels, W.van Daal, T.Hustinx, and C.Haenen, Depletion of donor lymphocytes by counterflow centrifugation successfully prevents acute graft-versus-host disease in matched allogeneic marrow transplantation, *Blood* 67:1302 (1986).
 97. H.J.Deeg, T.R.Spitzer, M.Cottler-Fox, R.Cahill, and L.W.Pickle, Conditioning-related toxicity and acute graft-versus-host disease in patients given methotrexate/cyclosporine prophylaxis, *Bone Marrow Transplant* 7:193 (1991).
 98. J.M.Depper, W.J.Leonard, M.Kronke, P.D.Noguchi, R.E.Cunningham, T.A.Waldmann, and W.C.Greene, Regulation of interleukin 2 receptor expression: effects of phorbol diester, phospholipase C, and reexposure to lectin or antigen, *J.Immunol.* 133:3054 (1984).
 99. K.Drickamer, Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins, *J.Biol.Chem.* 263:9557 (1988).
 100. W.R.Drobyski, C.A.Keever, M.S.Roth, S.Koethe, G.Hanson, P.McFadden, J.L.Gottschall, R.C.Ash, P.van Tuinen, M.M.Horowitz, and ., Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose, *Blood* 82:2310 (1993).
 101. W. Ebell, J. Kühl, D. Castanien, G. Gaedicke and et al, MMR-Minitransplants in children with refractory leukaemias, EBMT, Hamburg, Gemany (1999).
 102. W.Egner, R.Andreesen, and D.N.Hart, Allostimulatory cells in fresh human blood: heterogeneity in antigen-presenting cell populations, *Transplantation* 56:945 (1993).
 103. H.Einsele, E.Roosnek, N.Rufer, C.Sinzger, S.Riegler, J.Loffler, U.Grigoleit, A.Moris, H.G.Rammensee, L.Kanz, A.Kleihauer, F.Frank, G.Jahn, and H.Hebart, Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment

- of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy, *Blood* 99:3916 (2002).
104. H.Einsele, M.Steidle, A.Vallbracht, J.G.Saal, G.Ehninger, and C.A.Muller, Early occurrence of human cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain reaction technique, *Blood* 77:1104 (1991).
 105. 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).
 106. G.J.Elfenbein, P.N.Anderson, R.L.Humphrey, G.M.Mullins, L.L.Sensenbrenner, J.R.Wands, and G.W.Santos, Immune system reconstitution following allogeneic bone marrow transplantation in man: a multiparameter analysis, *Transplant Proc.* 8:641 (1976).
 107. G.J.Elfenbein, Y.J.Ashkenazi, and K.C.Barth, Further phenotypic characterization of T cells after human allogeneic bone marrow transplantation, *Transplantation* 39:97 (1985).
 108. J.Ellis, B.M.Chain, D.H.Davies, M.A.Ibrahim, D.R.Katz, P.M.Kaye, and E.Lightstone, Antigen presentation by dendritic cells provides optimal stimulation for the production of interleukin (IL) 2, IL 4 and interferon-gamma by allogeneic T cells, *Eur.J.Immunol.* 21:2803 (1991).
 109. B.Ernst, D.S.Lee, J.M.Chang, J.Sprent, and C.D.Surh, The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery, *Immunity.* 11:173 (1999).
 110. A.E.Faassen and S.K.Pierce, Cross-linking cell surface class II molecules stimulates Ig-mediated B cell antigen processing, *J.Immunol.* 155:1737 (1995).
 111. L.M.Faber, H.J.van der, E.Goulmy, A.L.Hoofman-den Otter, S.A.Luxemburg-Heijs, R.Willemze, and J.H.Falkenburg, Recognition of clonogenic leukemic cells, remission bone marrow and HLA- identical donor bone marrow by CD8+ or CD4+ minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes, *J.Clin.Invest* 96:877 (1995).
 112. J.J.Farrar, J.Fuller-Farrar, P.L.Simon, M.L.Hilfiker, B.M.Stadler, and W.L.Farrar, Thymoma production of T cell growth factor (Interleukin 2), *J.Immunol.* 125:2555 (1980).
 113. W.L.Farrar, M.C.Birchenall-Sparks, and H.B.Young, Interleukin 2 induction of interferon-gamma mRNA synthesis, *J.Immunol.* 137:3836 (1986).
 114. M.Favrot, G.Janossy, N.Tidman, H.Blacklock, E.Lopez, M.Bofill, I.Lampert, G.Morgenstein, R.Powles, H.G.Prentice, T cell regeneration after allogeneic bone marrow transplantation, *Clin.Exp.Immunol.* 54:59 (1983).
 115. B.Fehse, O.Frerck, M.Goldmann, M.Bulduk, and A.R.Zander, Efficient depletion of alloreactive donor T lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69), *Br.J.Haematol.* 109:644 (2000).
 116. J.L.Ferrara, K.R.Cooke, L.Pan, and W.Krenger, The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease, *Stem Cells* 14:473 (1996).
 117. J.L.Ferrara and H.J.Deeg, Graft-versus-host disease, *N.Engl.J.Med.* 324:667

- (1991).
118. J.H.Finke, C.G.Orosz, and J.R.Battisto, Splenic T-killer cells can be generated by allogeneic thymic cells in conjunction with assisting factor, *Nature* 267:353 (1977).
 119. E.R.Flechner, P.S.Freudenthal, G.Kaplan, and R.M.Steinman, Antigen-specific T lymphocytes efficiently cluster with dendritic cells in the human primary mixed-leukocyte reaction, *Cell Immunol.* 111:183 (1988).
 120. A.Fontana, W.Fierz, and H.Wekerle, Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines, *Nature* 307:273 (1984).
 121. C.E. Ford, J.L. Hamerton, and D.W.H. Barnes, Cytological identification of radiation-chimaeras, *Nature* 177:452 (1956).
 122. 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).
 123. S.J.Forman and K.G.Blume, Allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia, *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 4:517 (1990).
 124. S.J.Forman, P.Nocker, M.Gallagher, J.Zaia, C.Wright, J.Bolen, B.Mills, and T.Hecht, Pattern of T cell reconstitution following allogeneic bone marrow transplantation for acute hematological malignancy, *Transplantation* 34:96 (1982).
 125. D.R.Forsdyke, Serum factors affecting the incorporation of (3H)thymidine by lymphocytes stimulated by antigen. 3. Evidence for a role of complement from studies with specific complement inhibitors, *Immunology* 25:613 (1973).
 126. D.H.Fowler, J.Breglio, G.Nagel, M.A.Eckhaus, and R.E.Gress, Allospecific CD8+ Tc1 and Tc2 populations in graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease, *J.Immunol.* 157:4811 (1996).
 127. D.A.Fox, R.E.Hussey, K.A.Fitzgerald, O.Acuto, C.Poole, L.Palley, J.F.Daley, S.F.Schlossman, and E.L.Reinherz, Ta1, a novel 105 KD human T cell activation antigen defined by a monoclonal antibody, *J.Immunol.* 133:1250 (1984).
 128. J.D.Fraser, B.A.Irving, G.R.Crabtree, and A.Weiss, Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28, *Science* 251:313 (1991).
 129. G.J.Freeman, F.Borriello, R.J.Hodes, H.Reiser, K.S.Hathcock, G.Laszlo, A.J.McKnight, J.Kim, L.Du, D.B.Lombard, and ., Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice, *Science* 262:907 (1993).
 130. 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).
 131. R.P.Gale and Y.Reisner, Graft rejection and graft-versus-host disease: mirror images, *Lancet* 1:1468 (1986).
 132. 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).

133. 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).
134. T.D.Geppert and P.E.Lipsky, Antigen presentation by interferon-gamma-treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression, *J.Immunol.* 135:3750 (1985).
135. A.M.Gianni, S.Siena, M.Bregni, C.Tarella, A.C.Stern, A.Pileri, and G.Bonadonna, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation, *Lancet* 2:580 (1989).
136. S.Gillis, R.Mertelsmann, and M.A.Moore, T-cell growth factor (interleukin 2) control of T-lymphocyte proliferation: possible involvement in leukemogenesis, *Transplant.Proc.* 13:1884 (1981).
137. C.D.Gimmi, G.J.Freeman, J.G.Gribben, K.Sugita, A.S.Freedman, C.Morimoto, and L.M.Nadler, B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:6575 (1991).
138. G.Girolomoni and P.Ricciardi-Castagnoli, Dendritic cells hold promise for immunotherapy, *Immunol.Today* 18:102 (1997).
139. E. Gluckman, H.A. Broxmeyer, A D. Auerbach, et al, Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling, *N Engl J Med* 321:1174 (1989).
140. J.M.Goldman, R.P.Gale, M.M.Horowitz, J.C.Biggs, R.E.Champlin, E.Gluckman, R.G.Hoffmann, S.J.Jacobsen, A.M.Marmont, P.B.McGlave, Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion, *Ann.Intern.Med.* 108:806 (1988).
141. A.W.Goldrath and M.J.Bevan, Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts, *Immunity.* 11:183 (1999).
142. J.W. Goodman and G.S. Hodgson, Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice, *Blood* 19:702 (1962).
143. J.E.Gootenberg, F.W.Ruscetti, J.W.Mier, A.Gazdar, and R.C.Gallo, Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor, *J.Exp.Med.* 154:1403 (1981).
144. E.Goulmy, Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy, *Immunol.Rev.* 157:125 (1997).
145. K.Grabstein, S.Dower, S.Gillis, D.Urdal, and A.Larsen, Expression of interleukin 2, interferon-gamma, and the IL 2 receptor by human peripheral blood lymphocytes, *J.Immunol.* 136:4503 (1986).
146. 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).
147. M.Grazziutti, D.Przepiorka, J.H.Rex, I.Braunschweig, S.Vadhan-Raj, and C.A.Savary, Dendritic cell-mediated stimulation of the in vitro lymphocyte response to *Aspergillus*, *Bone Marrow Transplant.* 27:647 (2001).
 148. F.C.Grumet and B.G.Leventhal, Inhibition of the response in mixed leukocyte cultures by alloimmune plasma, *Transplantation* 9:405 (1970).
 149. H.Gudmundsdottir, A.D.Wells, and L.A.Turka, Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity, *J.Immunol.* 162:5212 (1999).
 150. E.C.Guinan, J.G.Gribben, V.A.Boussiotis, G.J.Freeman, and L.M.Nadler, Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity, *Blood* 84:3261 (1994).
 151. E.Haddad, P.Landais, W.Friedrich, B.Gerritsen, M.Cavazzana-Calvo, G.Morgan, Y.Bertrand, A.Fath, 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).
 152. F.T.Hakim, R.Cepeda, G.S.Gray, C.H.June, and R.Abe, Acute graft-versus-host reaction can be aborted by blockade of costimulatory molecules, *J.Immunol.* 155:1757 (1995).
 153. G.Hale and H.Waldmann, Control of graft-versus-host disease and graft rejection by T cell depletion of donor and recipient with Campath-1 antibodies. Results of matched sibling transplants for malignant diseases, *Bone Marrow Transplant* 13:597 (1994).
 154. 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).
 155. T.Hamaoka, K.Takatsu, K.Okuno, and T.Tsuchida, Functional characterization of the killer-helper factor responsible for the induction of cytotoxic T lymphocytes from thymocytes, and evidence for the nature of this factor as distinct from T cell-replacing factor (TRF) in regard to B cell triggering, *J.Immunol.* 126:659 (1981).
 156. 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).
 157. R.Handgretinger, T.Klingebiel, 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(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children, *Bone Marrow Transplant.* 27:777 (2001).
 158. R.Handgretinger, P.Lang, M.Schumm, M.Pfeiffer, S.Gottschling, B.Demirdelen, P.Bader, S.Kuci, T.Klingebiel, and D.Niethammer, Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children, *Ann.N Y.Acad.Sci.* 938:340 (2001).

159. 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).
160. M. Hansen, A. Schaeffer, J. Tseng-Law, J. Bender, D. Van Epps and M. Luqman, Use of Recipient-Derived Dendritic Cells for Selective Depletion of Alloreactive T Cells from Allografts. *Bone Marrow Transplantation* 27, 127-128. 2001.
161. 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).
162. T.Hara, S.M.Fu, and J.A.Hansen, Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen), *J.Exp.Med.* 161:1513 (1985).
163. T.Hara, L.K.Jung, J.M.Bjorndahl, and S.M.Fu, Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o- tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens, *J.Exp.Med.* 164:1988 (1986).
164. F.A.Harding and J.P.Allison, CD28-B7 interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help, *J.Exp.Med.* 177:1791 (1993).
165. F.A.Harding, J.G.McArthur, J.A.Gross, D.H.Raulet, and J.P.Allison, CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones, *Nature* 356:607 (1992).
166. D.N.Hart, Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response, *Blood* 90:3245 (1997).
167. I.Hayashi and G.H.Sato, Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium, *Nature* 259:132 (1976).
168. B.F.Haynes, M.E.Hemler, D.L.Mann, G.S.Eisenbarth, J.Shelhamer, H.S.Mostowski, C.A.Thomas, J.L.Strominger, and A.S.Fauci, Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes, *J.Immunol.* 126:1409 (1981).
169. P.Hayry and V.Defendi, I. Cultivation conditions and mixed lymphocyte interaction of mouse peripheral lymphocytes, *Clin.Exp.Immunol.* 6:345 (1970).
170. W.R.Heath, L.Kjer-Nielsen, and M.W.Hoffmann, Avidity for antigen can influence the helper dependence of CD8+ T lymphocytes, *J.Immunol.* 151:5993 (1993).
171. H.Hebart, S.Daginik, S.Stevanovic, U.Grigolet, A.Dobler, M.Baur, G.Rausser, C.Sinzger, G.Jahn, J.Loefler, L.Kanz, H.G.Rammensee, and H.Einsele, Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation, *Blood* 99:3830 (2002).
172. J.H.Helderman and T.B.Strom, Specific insulin binding site on T and B lymphocytes as a marker of cell activation, *Nature* 274:62 (1978).

173. M.Helene, V.Lake-Bullock, J.S.Bryson, C.D.Jennings, and A.M.Kaplan, Inhibition of graft-versus-host disease. Use of a T cell-controlled suicide gene, *J.Immunol.* 158:5079 (1997).
174. C.Helg, E.Roux, P.Beris, C.Cabrol, P.Wacker, R.Darbellay, M.Wyss, M.Jeannet, B.Chapuis, and E.Roosnek, Adoptive immunotherapy for recurrent CML after BMT, *Bone Marrow Transplant* 12:125 (1993).
175. P.A.Henkart, Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules, *Immunity.* 1:343 (1994).
176. 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).
177. T.Hercend, J.Ritz, S.F.Schlossman, and E.L.Reinherz, Comparative expression of T9, T10, and Ia antigens on activated human T cell subsets, *Hum.Immunol.* 3:247 (1981).
178. C.Herrera, A.Torres, J.M.Garcia-Castellano, J.Roman, C.Martin, J.Serrano, M.Falcon, M.A.Alvarez, P.Gomez, and F.Martinez, Prevention of graft-versus-host disease in high risk patients by depletion of CD4+ and reduction of CD8+ lymphocytes in the marrow graft, *Bone Marrow Transplant.* 23:443 (1999).
179. B.Hertenstein, M.Wiesneth, J.Novotny, D.Bunjes, M.Stefanic, B.Heinze, G.Hubner, H.Heimpel, and R.Arnold, Interferon-alpha and donor buffy coat transfusions for treatment of relapsed chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation, *Transplantation* 56:1114 (1993).
180. P.Herve, M.Flesch, J.Y.Cahn, E.Racadot, E.Plouvier, B.Lamy, A.Rozenbaum, A.Noir, R.L.Des Floris, and A.Peters, Removal of marrow T cells with OKT3-OKT11 monoclonal antibodies and complement to prevent acute graft-versus-host disease. A pilot study in ten patients, *Transplantation* 39:138 (1985).
181. V.L.Herzberg and K.A.Smith, T cell growth without serum, *J.Immunol.* 139:998 (1987).
182. 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).
183. C.Heufler, F.Koch, U.Stanzl, G.Topar, M.Wysocka, G.Trinchieri, A.Enk, R.M.Steinman, N.Romani, and G.Schuler, Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells, *Eur.J.Immunol.* 26:659 (1996).
184. H.Hirschberg and E.Thorsby, The role of serum in human mixed lymphocyte cultures, *Cell Immunol.* 16:115 (1975).
185. E.Holler, H.J.Kolb, J.Mittermuller, 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).
186. 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, Graft-versus-leukemia reactions

- after bone marrow transplantation, *Blood* 75:555 (1990).
187. C.W.S. Howe and T. Radde-Stepaniak, Hematopoietic cell donor registries. Hematopoietic Cell Transplantation, Thomas E.D., Blume K.G., and Forman S.J., eds., Blackwell Science, Boston (1999).
 188. C.S.Hsieh, S.E.Macatonia, C.S.Tripp, S.F.Wolf, A.O'Garra, and K.M.Murphy, Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages, *Science* 260:547 (1993).
 189. M.H.Hsieh and R.Korngold, Differential use of FasL- and perforin-mediated cytolytic mechanisms by T-cell subsets involved in graft-versus-myeloid leukemia responses, *Blood* 96:1047 (2000).
 190. H.Z.Hu, J.Y.New, B.Li, S.H.Chan, and E.H.Yap, Depletion of activated alloreactive T cells in prevention of acute graft-versus-host disease, *Transplant.Proc.* 32:2456 (2000).
 191. K.Ikuta, M.Takami, C.W.Kim, T.Honjo, T.Miyoshi, Y.Tagaya, T.Kawabe, and J.Yodoi, Human lymphocyte Fc receptor for IgE: sequence homology of its cloned cDNA with animal lectins, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:819 (1987).
 192. J.B.Imboden and J.D.Stobo, Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores, *J.Exp.Med.* 161:446 (1985).
 193. K.Inaba, M.Inaba, M.Naito, and R.M.Steinman, Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo, *J.Exp.Med.* 178:479 (1993).
 194. K.Inaba, J.P.Metlay, M.T.Crowley, and R.M.Steinman, Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ, *J.Exp.Med.* 172:631 (1990).
 195. K.Inaba, N.Romani, and R.M.Steinman, An antigen-independent contact mechanism as an early step in T cell-proliferative responses to dendritic cells, *J.Exp.Med.* 170:527 (1989).
 196. K.Inaba and R.M.Steinman, Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release, *J.Exp.Med.* 160:1717 (1984).
 197. K.Inaba and R.M.Steinman, Monoclonal antibodies to LFA-1 and to CD4 inhibit the mixed leukocyte reaction after the antigen-dependent clustering of dendritic cells and T lymphocytes, *J.Exp.Med.* 165:1403 (1987).
 198. N.N.Iscove and F.Melchers, Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes, *J.Exp.Med.* 147:923 (1978).
 199. L.Ivanyi, S.J.Challacombe, and T.Lehner, The specificity of serum factors in lymphocyte transformation in periodontal disease, *Clin.Exp.Immunol.* 14:491 (1973).
 200. K.T.Izutsu, K.M.Sullivan, M.M.Schubert, E.L.Truelove, H.M.Shulman, G.E.Sale, T.H.Morton, J.C.Rice, R.P.Witherspoon, R.Storb, and E.D.Thomas, Disordered salivary immunoglobulin secretion and sodium transport in human chronic graft-versus-host disease, *Transplantation* 35:441 (1983).
 201. L.O. Jacobson, E.K. Marks, and M.J. Robson, Effect of Spleen Protection on Mortality Following X-Irradiation, *J.Lab.Clin.Med.* 34:1538 (1949).
 202. C.A.Janeway, Jr., Thymic selection: two pathways to life and two to death,

- Immunity. 1:3 (1994).
203. J.Jansen, S.Hanks, L.Akard, M.Martin, J.Thompson, Q.Chang, R.Ash, P.Garrett, F.Figg, and D.English, Selective T cell depletion with CD8-conjugated magnetic beads in the prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant* 15:271 (1995).
 204. J.H.Jansen, G.J.Wientjens, W.E.Fibbe, R.Willemze, and H.C.Kluin-Nelemans, Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4, *J.Exp.Med.* 170:577 (1989).
 205. M.K.Jenkins, The ups and downs of T cell costimulation, *Immunity.* 1:443 (1994).
 206. M.K.Jenkins, E.Burrell, and J.D.Ashwell, Antigen presentation by resting B cells. Effectiveness at inducing T cell proliferation is determined by costimulatory signals, not T cell receptor occupancy, *J.Immunol.* 144:1585 (1990).
 207. M.K.Jenkins and R.H.Schwartz, Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo, *J.Exp.Med.* 165:302 (1987).
 208. M.K.Jenkins, P.S.Taylor, S.D.Norton, and K.B.Urdahl, CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells, *J.Immunol.* 147:2461 (1991).
 209. Y.Z.Jiang, D.Mavroudis, S.Dermime, N.Hensel, D.Couriel, J.Moldrem, and A.J.Barrett, Alloreactive CD4+ T lymphocytes can exert cytotoxicity to chronic myeloid leukaemia cells processing and presenting exogenous antigen, *Br.J.Haematol.* 93:606 (1996).
 210. 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).
 211. G.J.Johnson and P.S.Russell, Reaction of human lymphocytes in culture to components of the medium, *Nature* 208:343 (1965).
 212. F.Joncourt, F.Bettens, F.Kristensen, and A.L.de Weck, Age-related changes of mitogen responsiveness in different lymphoid organs from outbred NMRI mice, *Immunobiology* 158:439 (1981).
 213. R.J.Jones, R.F.Ambinder, S.Piantadosi, and G.W.Santos, Evidence of a graft-versus-lymphoma effect associated with allogeneic bone marrow transplantation, *Blood* 77:649 (1991).
 214. J.Jooss, B.Zanker, H.Wagner, and D.Kabelitz, Quantitative assessment of interleukin-2-producing alloreactive human T cells by limiting dilution analysis, *J.Immunol.Methods* 112:85 (1988).
 215. S.Joyce and S.G.Nathenson, Alloreactivity, antigen recognition and T-cell selection: three diverse T-cell recognition problems with a common solution, *Immunol.Rev.* 154:59 (1996).
 216. C.H.June, J.A.Bluestone, L.M.Nadler, and C.B.Thompson, The B7 and CD28 receptor families, *Immunol.Today* 15:321 (1994).
 217. C.H.June, J.A.Ledbetter, M.M.Gillespie, T.Lindsten, and C.B.Thompson, T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression, *Mol.Cell Biol.* 7:4472 (1987).
 218. C.H.June, J.A.Ledbetter, P.S.Linsley, and C.B.Thompson, Role of the CD28

- receptor in T-cell activation, *Immunol.Today* 11:211 (1990).
219. 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).
220. P.J.Kabel, M.Haan-Meulman, H.A.Voorbij, M.Kleingeld, E.F.Knol, and H.A.Drexhage, Accessory cells with a morphology and marker pattern of dendritic cells can be obtained from elutriator-purified blood monocyte fractions. An enhancing effect of metrizamide in this differentiation, *Immunobiology* 179:395 (1989).
221. D.Kagi, F.Vignaux, B.Ledermann, K.Burki, V.Depraetere, S.Nagata, H.Hengartner, and P.Golstein, Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity, *Science* 265:528 (1994).
222. E.P.Kaldjian, G.H.Chen, and K.B.Cease, Enhancement of lymphocyte proliferation assays by use of serum-free medium, *J.Immunol.Methods* 147:189 (1992).
223. T.Kasahara, J.J.Hooks, S.F.Dougherty, and J.J.Oppenheim, Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets, *J.Immunol.* 130:1784 (1983).
224. J.D.Kemp, J.A.Thorson, T.H.McAlmont, M.Horowitz, J.S.Cowdery, and Z.K.Ballas, Role of the transferrin receptor in lymphocyte growth: a rat IgG monoclonal antibody against the murine transferrin receptor produces highly selective inhibition of T and B cell activation protocols, *J.Immunol.* 138:2422 (1987).
225. D.E.Kern, S.Gillis, M.Okada, and C.S.Henney, The role of interleukin-2 (IL-2) in the differentiation of cytotoxic T cells: the effect of monoclonal anti-IL-2 antibody and absorption with IL-2 dependent T cell lines, *J.Immunol.* 127:1323 (1981).
226. N.A.Kernan, G.Bartsch, R.C.Ash, P.G.Beatty, R.Champlin, A.Filipovich, J.Gajewski, J.A.Hansen, J.Henslee-Downey, J.McCullough, and ., Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program, *N.Engl.J.Med.* 328:593 (1993).
227. N.A.Kernan, N.H.Collins, L.Juliano, T.Cartagena, B.Dupont, and R.J.O'Reilly, Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease, *Blood* 68:770 (1986).
228. N.A.Kernan, N.Flomenberg, B.Dupont, and R.J.O'Reilly, Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. Identification of host-derived antidonor alloreactive T lymphocytes, *Transplantation* 43:842 (1987).
229. J.H.Kersey, Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia, *Blood* 90:4243 (1997).
230. K.Kichian, F.P.Nestel, D.Kim, P.Ponka, and W.S.Lapp, IL-12 p40 messenger RNA expression in target organs during acute graft-versus-host disease. Possible involvement of IFN-gamma, *J.Immunol.* 157:2851 (1996).
231. U.Kikkawa and Y.Nishizuka, The role of protein kinase C in transmembrane signalling, *Annu.Rev.Cell Biol.* 2:149 (1986).
232. H.Kikutani, S.Inui, R.Sato, E.L.Barsumian, H.Owaki, K.Yamasaki, T.Kaisho, N.Uchibayashi, R.R.Hardy, T.Hirano, Molecular structure of human

- lymphocyte receptor for immunoglobulin E, *Cell* 47:657 (1986).
233. P.D.King and D.R.Katz, Human tonsillar dendritic cell-induced T cell responses: analysis of molecular mechanisms using monoclonal antibodies, *Eur.J.Immunol.* 19:581 (1989).
 234. J.Kirberg, A.Berns, and H.von Boehmer, Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules, *J.Exp.Med.* 186:1269 (1997).
 235. R.D.Klausner and L.E.Samelson, T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection, *Cell* 64:875 (1991).
 236. H.S.Ko, S.M.Fu, R.J.Winchester, D.T.Yu, and H.G.Kunkel, Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen- and antigen-activated T cells, *J.Exp.Med.* 150:246 (1979).
 237. F.Koch, U.Stanzl, P.Jennewein, K.Janke, C.Heufler, E.Kampgen, N.Romani, and G.Schuler, High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10, *J.Exp.Med.* 184:741 (1996).
 238. 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).
 239. K.Kohno, Y.Shibata, Y.Matsuo, and J.Minowada, CD28 molecule as a receptor-like function for accessory signals in cell-mediated augmentation of IL-2 production, *Cell Immunol.* 131:1 (1990).
 240. H.J.Kolb, J.Mittermuller, 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).
 241. 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).
 242. R.Korngold and J.Sprent, T cell subsets and graft-versus-host disease, *Transplantation* 44:335 (1987).
 243. L.Koulova, E.A.Clark, G.Shu, and B.Dupont, The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells, *J.Exp.Med.* 173:759 (1991).
 244. Kreitman, "Clinical Bone Marrow Transplantation", Press.Cambridge, Cambridge University (1994).
 245. R.J.Kreitman, P.Bailon, V.K.Chaudhary, D.J.FitzGerald, and I.Pastan, Recombinant immunotoxins containing anti-Tac(Fv) and derivatives of Pseudomonas exotoxin produce complete regression in mice of an interleukin-2 receptor-expressing human carcinoma, *Blood* 83:426 (1994).
 246. J.I.Krieger, R.W.Chesnut, and H.M.Grey, Capacity of B cells to function as stimulators of a primary mixed leukocyte reaction, *J.Immunol.* 137:3117 (1986).
 247. N.R.Krieger, C.G.Fathman, M.K.Shaw, and W.M.Ridgway, Identification and characterization of the antigen-specific subpopulation of alloreactive CD4+ T cells in vitro and in vivo, *Transplantation* 69:605 (2000).

248. F.Kristensen, C.Walker, F.Joncourt, F.Bettens, and A.L.de Weck, Human lymphocyte proliferation. I. Correlation between activated and proliferating T-lymphocytes, *Immunol.Lett.* 5:59 (1982).
249. J.F.Krowka, B.Cuevas, D.C.Maron, K.S.Steimer, M.S.Ascher, and H.W.Sheppard, Expression of CD69 after in vitro stimulation: a rapid method for quantitating impaired lymphocyte responses in HIV-infected individuals, *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.Hum.Retrovirol.* 11:95 (1996).
250. T.M.Kundig, A.Shahinian, K.Kawai, H.W.Mittrucker, E.Sebzda, M.F.Bachmann, T.W.Mak, and P.S.Ohashi, Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells, *Immunity.* 5:41 (1996).
251. J.T.Kurnick, K.O.Gronvik, A.K.Kimura, J.B.Lindblom, V.T.Skoog, O.Sjoberg, and H.Wigzell, Long term growth in vitro of human T cell blasts with maintenance of specificity and function, *J.Immunol.* 122:1255 (1979).
252. J.T.Kurnick, F.Pandolfi, and H.Wigzell, Separation of mitogen-induced suppressor cells of human antibody-producing cells, *Cell Immunol.* 54:373 (1980).
253. Kurzrock, "Biologic therapy of cancer", Lippincott, Philadelphia (1991).
254. G.Kvalheim, O.Fodstad, A.Pihl, K.Nustad, A.Pharo, J.Ugelstad, and S.Funderud, Elimination of B-lymphoma cells from human bone marrow: model experiments using monodisperse magnetic particles coated with primary monoclonal antibodies, *Cancer Res.* 47:846 (1987).
255. C.H.Lamers, R.J.van de Griend, E.Braakman, C.P.Ronteltap, J.Benard, G.Stoter, J.W.Gratama, and R.L.Bolhuis, Optimization of culture conditions for activation and large-scale expansion of human T lymphocytes for bispecific antibody-directed cellular immunotherapy, *Int.J.Cancer* 51:973 (1992).
256. 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).
257. S.Landolfo, F.Cofano, M.Giovarelli, M.Pratt, G.Cavallo, and G.Forni, Inhibition of interferon-gamma may suppress allograft reactivity by T lymphocytes in vitro and in vivo, *Science* 229:176 (1985).
258. P. Lang, R. Handgretinger and P.G. Schlegel, Viral infections after transplantation of allogeneic purified peripheral CD34⁺ stem cells in children, *Bone Marrow Transplantation* 27: (2001).
259. 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⁺ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia, *Blood* 101:1630 (2003).
260. A.Langenkamp, M.Messi, A.Lanzavecchia, and F.Sallusto, Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells, *Nat.Immunol.* 1:311 (2000).
261. L.L.Lanier, D.W.Buck, L.Rhodes, A.Ding, E.Evans, C.Barney, and J.H.Phillips, Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen, *J.Exp.Med.* 167:1572 (1988).

262. E.L.Larsson, Mechanism of T cell activation. II. Antigen- and lectin-dependent acquisition of responsiveness to TCGF is a nonmitogenic, active response of resting T cells, *J.Immunol.* 126:1323 (1981).
263. R.P.Lauener, S.M.Goyert, R.S.Geha, and D.Vercelli, Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes, *Eur.J.Immunol.* 20:2375 (1990).
264. P.Lauzurica, D.Sancho, M.Torres, B.Albella, M.Marazuela, T.Merino, J.A.Bueren, A.Martinez, and F.Sanchez-Madrid, Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice, *Blood* 95:2312 (2000).
265. R.I.Lechler, G.Lombardi, J.R.Batchelor, N.Reinsmoen, and F.H.Bach, The molecular basis of alloreactivity, *Immunol.Today* 11:83 (1990).
266. J.A.Ledbetter, J.B.Imboden, G.L.Schieven, L.S.Grosmaire, P.S.Rabinovitch, T.Lindsten, C.B.Thompson, and C.H.June, CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways, *Blood* 75:1531 (1990).
267. J.A.Ledbetter, C.H.June, P.J.Martin, C.E.Spooner, J.A.Hansen, and K.E.Meier, Valency of CD3 binding and internalization of the CD3 cell-surface complex control T cell responses to second signals: distinction between effects on protein kinase C, cytoplasmic free calcium, and proliferation, *J.Immunol.* 136:3945 (1986).
268. J.A.Ledbetter, P.J.Martin, C.E.Spooner, D.Wofsy, T.T.Tsu, P.G.Beatty, and P.Gladstone, Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain proliferative responses of activated T cells, *J.Immunol.* 135:2331 (1985).
269. J.M.Leiden, L.H.Yang, G.D.Morle, C.H.June, T.Lindsten, C.B.Thompson, and B.Karpinski, The 4F2 heavy chain gene: a molecular model of inducible gene expression in human T cells, *J.Autoimmun.* 2 Suppl:67 (1989).
270. L.E.Leiva, O.Regueira, and R.U.Sorensen, Peripheral blood mononuclear cell sonicates as an alternative to irradiated allogeneic cells to stimulate a mixed lymphocyte reaction and to enumerate CD69+ alloreactive T cells, *Hum.Immunol.* 56:49 (1997).
271. D.J.Lenschow and J.A.Bluestone, T cell co-stimulation and in vivo tolerance, *Curr.Opin.Immunol.* 5:747 (1993).
272. D.J.Lenschow, T.L.Walunas, and J.A.Bluestone, CD28/B7 system of T cell costimulation, *Annu.Rev.Immunol.* 14:233 (1996).
273. D.J.Lenschow, Y.Zeng, J.R.Thistlethwaite, A.Montag, W.Brady, M.G.Gibson, P.S.Linsley, and J.A.Bluestone, Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg, *Science* 257:789 (1992).
274. W.J.Leonard, J.M.Depper, T.Uchiyama, K.A.Smith, T.A.Waldmann, and W.C.Greene, A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor, *Nature* 300:267 (1982).
275. W.Lesslauer and H.Gmunder, Biochemical characterization of the 9.3 antigens of human T-cells: simultaneous expression of disulfide-bonded 90-kilodalton dimers and free subunits at the cell surface, *Mol.Immunol.* 23:271 (1986).
276. D.Levin, S.Constant, T.Pasqualini, R.Flavell, and K.Bottomly, Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo, *J.Immunol.* 151:6742 (1993).

277. F.Licastro, L.J.Davis, and M.C.Morini, Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses, *Int.J.Biochem.* 25:845 (1993).
278. 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).
279. M.Linker-Israeli, A.C.Bakke, R.C.Kitridou, S.Gendler, S.Gillis, and D.A.Horwitz, Defective production of interleukin 1 and interleukin 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), *J.Immunol.* 130:2651 (1983).
280. P.S.Linsley, W.Brady, L.Grosmaire, A.Aruffo, N.K.Damle, and J.A.Ledbetter, Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation, *J.Exp.Med.* 173:721 (1991).
281. P.S.Linsley, W.Brady, M.Urnes, L.S.Grosmaire, N.K.Damle, and J.A.Ledbetter, CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7, *J.Exp.Med.* 174:561 (1991).
282. P.S.Linsley, P.M.Wallace, J.Johnson, M.G.Gibson, J.L.Greene, J.A.Ledbetter, C.Singh, and M.A.Tepper, Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule, *Science* 257:792 (1992).
283. L.M.Liu and G.G.MacPherson, Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo, *J.Exp.Med.* 177:1299 (1993).
284. Y.Liu and C.A.Janeway, Jr., Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance, *J.Exp.Med.* 172:1735 (1990).
285. R.M.Locksley, N.Flournoy, K.M.Sullivan, and J.D.Meyers, Infection with varicella-zoster virus after marrow transplantation, *J.Infect.Dis.* 152:1172 (1985).
286. M.Lopez-Cabrera, A.G.Santis, E.Fernandez-Ruiz, R.Blacher, F.Esch, P.Sanchez-Mateos, and F.Sanchez-Madrid, Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors, *J.Exp.Med.* 178:537 (1993).
287. E. Lorenz., D. Uphoff., and T.R. Reid, Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections, *J.Natl.Cancer Inst.* 12:197 (51 A.D.).
288. 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).
289. G.Lucarelli, C.Giardini, and E.Angelucci, Bone marrow transplantation in thalassemia, *Cancer Treat.Res.* 77:305 (1997).
290. 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).
291. P.J. Lucas, I. Negishi, K-I. Nakayama, L.E. Fields, and D.Y. Loh, Naive

- CD28-Deficient T- Cells Can Initiate but Not Sustain an In Vitro Antigen-Specific Immune Response, The American Association of Immunologists (1995).
292. C.Ludin, H.Hofstetter, M.Sarfati, C.A.Levy, U.Suter, D.Alaimo, E.Kilchherr, H.Frost, and G.Delespesse, Cloning and expression of the cDNA coding for a human lymphocyte IgE receptor, *EMBO J.* 6:109 (1987).
 293. 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).
 294. S.E.Macatonia, N.A.Hosken, M.Litton, P.Vieira, C.S.Hsieh, J.A.Culpepper, M.Wysocka, G.Trinchieri, K.M.Murphy, and A.O'Garra, Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells, *J.Immunol.* 154:5071 (1995).
 295. S.E.Macatonia, S.C.Knight, A.J.Edwards, S.Griffiths, and P.Fryer, Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies, *J.Exp.Med.* 166:1654 (1987).
 296. 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).
 297. J.M. Main and R.T. Prehn, Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow, *J.Natl.Cancer Inst.* 15:1023 (1955).
 298. V.C.Maino, M.A.Suni, and J.J.Ruitenber, Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation, *Cytometry* 20:127 (1995).
 299. R.Manz, M.Assenmacher, E.Pfluger, S.Miltenyi, and A.Radbruch, Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:1921 (1995).
 300. 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).
 301. 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).
 302. P.J.Martin, G.Schoch, L.Fisher, V.Byers, C.Anasetti, F.R.Appelbaum, P.G.Beatty, K.Doney, G.B.McDonald, J.E.Sanders, and ., A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment, *Blood* 76:1464 (1990).
 303. D.Matesic, P.V.Lehmann, and P.S.Heeger, High-resolution characterization of cytokine-producing alloreactivity in naive and allograft-primed mice, *Transplantation* 65:906 (1998).
 304. 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).
305. L.A.Matis, S.B.Sorger, D.L.McElligott, P.J.Fink, and S.M.Hedrick, The molecular basis of alloreactivity in antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell clones, *Cell* 51:59 (1987).
 306. K.Matsuno, T.Ezaki, S.Kudo, and Y.Uehara, A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph, *J.Exp.Med.* 183:1865 (1996).
 307. P.Matzinger and M.J.Bevan, Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?, *Cell Immunol.* 29:1 (1977).
 308. D.H.Maurer, W.E.Collins, J.H.Hanke, M.Van, R.R.Rich, and M.S.Pollack, Class II positive human dermal fibroblasts restimulate cloned allospecific T cells but fail to stimulate primary allogeneic lymphoproliferation, *Hum.Immunol.* 14:245 (1985).
 309. S.Maury, B.Salomon, D.Klatzmann, and J.L.Cohen, Division rate and phenotypic differences discriminate alloreactive and nonalloreactive T cells transferred in lethally irradiated mice, *Blood* 98:3156 (2001).
 310. F.Mavilio, G.Ferrari, S.Rossini, N.Nobili, C.Bonini, G.Casorati, C.Traversari, and C.Bordignon, Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector-mediated gene transfer, *Blood* 83:1988 (1994).
 311. 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).
 312. 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).
 313. C.J.Melief, Dendritic cells as specialized antigen-presenting cells, *Res.Immunol.* 140:902 (1989).
 314. J.P.Metlay, E.Pure, and R.M.Steinman, Distinct features of dendritic cells and anti-Ig activated B cells as stimulators of the primary mixed leukocyte reaction, *J.Exp.Med.* 169:239 (1989).
 315. S.C.Meuer, R.E.Hussey, A.C.Penta, K.A.Fitzgerald, B.M.Stadler, S.F.Schlossman, and E.L.Reinherz, Cellular origin of interleukin 2 (IL 2) in man: evidence for stimulus-restricted IL 2 production by T4+ and T8+ T lymphocytes, *J.Immunol.* 129:1076 (1982).
 316. Meyers and Atkinson, *Clinics in Haematology*, in: "Bone Marrow Transplantation", Nathan D., ed., WB Saunders Co Ltd, London (1983).
 317. J.D.Meyers, N.Flournoy, and E.D.Thomas, Nonbacterial pneumonia after allogeneic marrow transplantation: a review of ten years' experience, *Rev.Infect.Dis.* 4:1119 (1982).
 318. E. Mickelson and E.W. Petersdorf, *Histocompatibility*, in: "Hematopoietic Cell Transplantation", Thomas E.D., Blume K.G., and Forman S.J., eds., Blackwell Science, Boston (1999).
 319. P.A. Miescher and M. Fauconnet, Mise en évidence de différents groupes

- leucocytaires chez l'homme., *Schweiz.Med.Wochenschr.* 84:597 (1954).
320. R.T.Mitsuyasu, R.E.Champlin, R.P.Gale, W.G.Ho, C.Lenarsky, D.Winston, M.Selch, R.Elashoff, J.V.Giorgi, J.Wells, and ., Treatment of donor bone marrow with monoclonal anti-T-cell antibody and complement for the prevention of graft-versus-host disease. A prospective, randomized, double-blind trial, *Ann.Intern.Med.* 105:20 (1986).
 321. J.J.Molldrem, P.P.Lee, C.Wang, K.Felio, H.M.Kantarjian, R.E.Champlin, and M.M.Davis, Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia, *Nat.Med.* 6:1018 (2000).
 322. A.Moretta, G.Pantaleo, M.Lopez-Botet, and L.Moretta, Involvement of T44 molecules in an antigen-independent pathway of T cell activation. Analysis of the correlations to the T cell antigen-receptor complex, *J.Exp.Med.* 162:823 (1985).
 323. D.A.Morgan, F.W.Ruscetti, and R.Gallo, Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows, *Science* 193:1007 (1976).
 324. D.L.Mueller, M.K.Jenkins, and R.H.Schwartz, Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy, *Annu.Rev.Immunol.* 7:445 (1989).
 325. R.Munker, M.Lubbert, S.Yonehara, A.Tuchnitz, R.Mertelsmann, and W.Wilmanns, Expression of the Fas antigen on primary human leukemia cells, *Ann.Hematol.* 70:15 (1995).
 326. K.Murali-Krishna and R.Ahmed, Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells, *J.Immunol.* 165:1733 (2000).
 327. K.Murali-Krishna, L.L.Lau, S.Sambhara, F.Lemonnier, J.Altman, and R.Ahmed, Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice, *Science* 286:1377 (1999).
 328. S.Nagata and P.Golstein, The Fas death factor, *Science* 267:1449 (1995).
 329. S.Nakamura, S.S.Sung, J.M.Bjorndahl, and S.M.Fu, Human T cell activation. IV. T cell activation and proliferation via the early activation antigen EA 1, *J.Exp.Med.* 169:677 (1989).
 330. R.A.Nash, M.S.Pepe, R.Storb, G.Longton, M.Pettinger, C.Anasetti, F.R.Appelbaum, R.A.Bowden, H.J.Deeg, K.Doney, and ., Acute graft-versus-host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate, *Blood* 80:1838 (1992).
 331. B.W.Needleman and J.M.Weiler, Human lymphocyte transformation induced by mitogens and antigens in a serum-free tissue culture system, *J.Immunol.Methods* 44:3 (1981).
 332. 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).
 333. D.Nesic and S.Vukmanovic, MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants, *J.Immunol.* 160:3705 (1998).
 334. F.P.Nestel, R.N.Greene, K.Kichian, P.Ponka, and W.S.Lapp, Activation of macrophage cytostatic effector mechanisms during acute graft-versus-host disease: release of intracellular iron and nitric oxide-mediated cytostasis,

- Blood 96:1836 (2000).
335. 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).
 336. H.W.Nijman, M.J.Kleijmeer, M.A.Ossevoort, V.M.Oorschot, M.P.Vierboom, K.M.van de, P.Kenemans, W.M.Kast, H.J.Geuze, and C.J.Melief, Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells, *J.Exp.Med.* 182:163 (1995).
 337. 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).
 338. F.Novelli, M.Giovarelli, R.Gentz, M.Zucca, F.di Pierro, G.Garotta, and G.Forni, Modulation of interferon-gamma receptor during human T lymphocyte alloactivation, *Eur.J.Immunol.* 23:1226 (1993).
 339. F.Novelli, M.Giovarelli, R.Reber-Liske, G.Virgallita, G.Garotta, and G.Forni, Blockade of physiologically secreted IFN-gamma inhibits human T lymphocyte and natural killer cell activation, *J.Immunol.* 147:1445 (1991).
 340. N.Novitzky, V.Thomas, G.Hale, and H.Waldmann, Ex vivo depletion of T cells from bone marrow grafts with CAMPATH-1 in acute leukemia: graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect, *Transplantation* 67:620 (1999).
 341. J.Nunes, M.Bagnasco, M.Lopez, C.Lipcey, C.Mawas, and D.Olive, Dissociation between early and late events in T cell activation mediated through CD28 surface molecule, *Mol.Immunol.* 28:427 (1991).
 342. L.Ochs, X.O.Shu, J.Miller, H.Enright, J.Wagner, A.Filipovich, W.Miller, and D.Weisdorf, Late infections after allogeneic bone marrow transplantations: comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients, *Blood* 86:3979 (1995).
 343. M.Okada and C.S.Henney, The differentiation of cytotoxic T cells in vitro. II. Amplifying factor(s) produced in primary mixed lymphocyte cultures against K/D stimuli require the presence of Lyt 2+ cells but not Lyt 1+ cells, *J.Immunol.* 125:300 (1980).
 344. M.Okada and C.S.Henney, The differentiation of cytotoxic T cells in vitro. III. The role of helper T cells and their products in the differentiation of cytotoxic cells from "memory" cell populations, *J.Immunol.* 125:850 (1980).
 345. M.Okada, G.R.Klimpel, R.C.Kuppers, and C.S.Henney, The differentiation of cytotoxic T cells in vitro. I. Amplifying factor(s) in the primary response is Lyt 1 + cell dependent, *J.Immunol.* 122:2527 (1979).
 346. J.P.OKunewick, R.F.Meredith, B.J.Brozovich, P.R.Seeman, and K.Magliere, Exponential relationship between spleen cell concentration and fatal graft-versus-host response after transplantation of allogeneic spleen- marrow cell mixtures, *Transplantation* 29:507 (1980).
 347. J.P.OKunewick, R.F.Meredith, R.B.Raikow, M.J.Buffo, and D.L.Jones, Possibility of three distinct and separable components to fatal graft- vs-host reaction, *Exp.Hematol.* 10:277 (1982).
 348. R.J. O'Reilly, W. Friedrich and T.N. Small, Transplantation approaches for

- severe combined immunodeficiency disease, Wiskott-Aldrich syndrome, and other lethal genetic disorders, *in*: "Bone Marrow Transplantation", Foreman S., Blume K., and Thomas E.D., eds., Blackwell Scientific, (1994).
349. G.Pantaleo, D.Olive, D.Harris, A.Poggi, L.Moretta, and A.Moretta, Signal transducing mechanisms involved in human T cell activation via surface T44 molecules. Comparison with signals transduced via the T cell receptor complex, *Eur.J.Immunol.* 16:1639 (1986).
350. G.Pantaleo, D.Olive, A.Poggi, W.J.Kozumbo, L.Moretta, and A.Moretta, Transmembrane signalling via the T11-dependent pathway of human T cell activation. Evidence for the involvement of 1,2-diacylglycerol and inositol phosphates, *Eur.J.Immunol.* 17:55 (1987).
351. 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).
352. J.Patterson, H.G.Prentice, M.K.Brenner, M.Gilmore, G.Janossy, K.Ivory, D.Skeggs, H.Morgan, J.Lord, H.A.Blacklock, and ., Graft rejection following HLA matched T-lymphocyte depleted bone marrow transplantation, *Br.J.Haematol.* 63:221 (1986).
353. W.E.Paul and R.A.Seder, Lymphocyte responses and cytokines, *Cell* 76:241 (1994).
354. 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).
355. G.Pawelec, H.Max, T.Halder, O.Bruserud, A.Merl, P.da Silva, and H.Kalbacher, BCR/ABL leukemia oncogene fusion peptides selectively bind to certain HLA-DR alleles and can be recognized by T cells found at low frequency in the repertoire of normal donors, *Blood* 88:2118 (1996).
356. J.H.Peters, S.Ruhl, and D.Friedrichs, Veiled accessory cells deduced from monocytes, *Immunobiology* 176:154 (1987).
357. R.Philip and L.B.Epstein, Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1, *Nature* 323:86 (1986).
358. P.F.Piguet, G.E.Grau, B.Allet, and P.Vassalli, Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease, *J.Exp.Med.* 166:1280 (1987).
359. L.M.Pilarski, P.A.Bretscher, and L.L.Baum, Helper T cells are required for the polyclonal stimulation of cytotoxic T cells by concanavalin A, *J.Exp.Med.* 145:1237 (1977).
360. J.M.Platt, Soluble factors substitute for T-T-cell collaboration in generation of T-killer lymphocytes, *Nature* 260:329 (1976).
361. J.S.Pober, T.Collins, M.A.Gimbrone, Jr., R.S.Cotran, J.D.Gitlin, W.Fiers, C.Clayberger, A.M.Krensky, S.J.Burakoff, and C.S.Reiss, Lymphocytes recognize human vascular endothelial and dermal fibroblast Ia antigens induced by recombinant immune interferon, *Nature* 305:726 (1983).
362. J.S.Pober, T.Collins, M.A.Gimbrone, Jr., P.Libby, and C.S.Reiss, Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the

- immunogenicity of vascular endothelium, *Transplantation* 41:141 (1986).
363. S.Porcelli, M.B.Brenner, J.L.Greenstein, S.P.Balk, C.Terhorst, and P.A.Bleicher, Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocytes, *Nature* 341:447 (1989).
364. D.L.Porter, M.S.Roth, C.McGarigle, J.L.Ferrara, and J.H.Antin, Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia, *N.Engl.J.Med.* 330:100 (1994).
365. H.G.Prentice, H.A.Blacklock, G.Janossy, K.F.Bradstock, D.Skeggs, G.Goldstein, and A.V.Hoffbrand, Use of anti-T-cell monoclonal antibody OKT3 to prevent acute graft-versus-host disease in allogeneic bone-marrow transplantation for acute leukaemia, *Lancet* 1:700 (1982).
366. H.G.Prentice, H.A.Blacklock, G.Janossy, M.J.Gilmore, L.Price-Jones, N.Tidman, L.K.Trejdosiewicz, D.B.Skeggs, D.Panjwani, S.Ball, and ., Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients, *Lancet* 1:472 (1984).
367. T.C.Prickett and D.N.Hart, Anti-leucocyte common (CD45) antibodies inhibit dendritic cell stimulation of CD4 and CD8 T-lymphocyte proliferation, *Immunology* 69:250 (1990).
368. D.Przepiorka, T.L.Smith, J.Folloder, I.Khoury, N.T.Ueno, R.Mehra, M.Korbling, Y.O.Huh, S.Giralt, J.Gajewski, M.Donato, K.Cleary, D.Claxton, I.Braunschweig, K.Van Besien, B.S.Andersson, P.Anderlini, and R.Champlin, Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation, *Blood* 94:1465 (1999).
369. H.Quill and R.H.Schwartz, Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness, *J.Immunol.* 138:3704 (1987).
370. G.V.Quinnan, Jr., W.H.Burns, N.Kirmani, A.H.Rook, J.Manischewitz, L.Jackson, G.W.Santos, and R.Saral, HLA-restricted cytotoxic T lymphocytes are an early immune response and important defense mechanism in cytomegalovirus infections, *Rev.Infect.Dis.* 6:156 (1984).
371. G.V.Quinnan, Jr., N.Kirmani, A.H.Rook, J.F.Manischewitz, L.Jackson, G.Moreschi, G.W.Santos, R.Saral, and W.H.Burns, Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T- lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients, *N.Engl.J.Med.* 307:7 (1982).
372. D.Redelman, H.G.Bluestein, A.H.Cohen, J.M.Depper, and S.Wormsley, Deoxyadenosine (AdR) inhibition of newly activated lymphocytes: blockade at the G0-G1 interface, *J.Immunol.* 132:2030 (1984).
373. J.C.Reed, J.D.Alpers, P.C.Nowell, and R.G.Hoover, Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:3982 (1986).
374. E.L.Reinherz and S.F.Schlossman, The differentiation and function of human T lymphocytes, *Cell* 19:821 (1980).
375. Y.Reisner, N.Kapoor, D.Kirkpatrick, M.S.Pollack, B.Dupont, R.A.Good, and R.J.O'Reilly, Transplantation for acute leukaemia with HLA-A and B nonidentical parental marrow cells fractionated with soybean agglutinin and

- sheep red blood cells, *Lancet* 2:327 (1981).
376. Y.Reisner and M.F.Martelli, Stem cell escalation enables HLA-disparate haematopoietic transplants in leukaemia patients, *Immunol.Today* 20:343 (1999).
 377. 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).
 378. S.D.Rencher, K.S.Slobod, F.S.Smith, and J.L.Hurwitz, Activity of transplanted CD8+ versus CD4+ cytotoxic T cells against Epstein-Barr virus-immortalized B cell tumors in SCID mice, *Transplantation* 58:629 (1994).
 379. S.R.Riddell, K.S.Watanabe, J.M.Goodrich, C.R.Li, M.E.Agha, and P.D.Greenberg, Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones, *Science* 257:238 (1992).
 380. O.Ringden, M.Remberger, J.Mattsson, J.Aschan, S.Carlens, H.Hagglund, B.Lonnqvist, E.Sparrelid, and P.Ljungman, Transplantation with unrelated bone marrow in leukaemic patients above 40 years of age, *Bone Marrow Transplant* 21:43 (1998).
 381. B.Rocha, N.Dautigny, and P.Pereira, Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo, *Eur.J.Immunol.* 19:905 (1989).
 382. M.A.Rodriguez, J.B.De Sanctis, A.M.Blasini, M.Leon-Ponte, and I.Abadi, Human IFN-gamma up-regulates IL-2 receptors in mitogen-activated T lymphocytes, *Immunology* 69:554 (1990).
 383. H.Rodt, S.Thierfelder, and M.Eulitz, Anti-lymphocytic antibodies and marrow transplantation. 3. Effect of heterologous anti-brain antibodies on acute secondary disease in mice, *Eur.J.Immunol.* 4:15 (1974).
 384. N.Romani, S.Gruner, D.Brang, E.Kampgen, A.Lenz, B.Trockenbacher, G.Konwalinka, P.O.Fritsch, R.M.Steinman, and G.Schuler, Proliferating dendritic cell progenitors in human blood, *J.Exp.Med.* 180:83 (1994).
 385. N.Romani, S.Koide, M.Crowley, M.Witmer-Pack, A.M.Livingstone, C.G.Fathman, K.Inaba, and R.M.Steinman, Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells, *J.Exp.Med.* 169:1169 (1989).
 386. R.Rooke, C.Waltzinger, C.Benoist, and D.Mathis, Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses, *Immunity.* 7:123 (1997).
 387. C.M.Rooney, C.A.Smith, C.Y.Ng, S.Loftin, C.Li, R.A.Krance, M.K.Brenner, and H.E.Heslop, Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein- Barr-virus-related lymphoproliferation, *Lancet* 345:9 (1995).
 388. G.Rossi, N.Heveker, B.Thiele, H.Gelderblom, and F.Steinbach, Development of a Langerhans cell phenotype from peripheral blood monocytes, *Immunol.Lett.* 31:189 (1992).
 389. F.W.Ruscetti and R.C.Gallo, Human T-lymphocyte growth factor: regulation of growth and function of T lymphocytes, *Blood* 57:379 (1981).
 390. F.W.Ruscetti, D.A.Morgan, and R.C.Gallo, Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro, *J.Immunol.* 119:131 (1977).
 391. F.Sallusto and A.Lanzavecchia, Efficient presentation of soluble antigen by

- cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha, *J.Exp.Med.* 179:1109 (1994).
392. R.Salom, P.Brookes, P.Hornick, and R.Lechler, High frequency of alloreactive T cells is a consequence of the presentation of many peptides by allogeneic MHC molecules, *Transplant.Proc.* 27:3579 (1995).
393. S.Salvadori, A.Pizzimenti, S.Cohen, and K.S.Zier, The control of class II expression on T cells is independent of the regulation of Tac and the induction of proliferation, *Clin.Exp.Immunol.* 86:544 (1991).
394. P.Sanchez-Mateos and F.Sanchez-Madrid, Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69, *Eur.J.Immunol.* 21:2317 (1991).
395. R.Saral, W.H.Burns, O.L.Laskin, G.W.Santos, and P.S.Lietman, Acyclovir prophylaxis of herpes-simplex-virus infections, *N.Engl.J.Med.* 305:63 (1981).
396. R.A.Scheeren, G.Koopman, B.S.Van der, C.J.Meijer, and S.T.Pals, Adhesion receptors involved in clustering of blood dendritic cells and T lymphocytes, *Eur.J.Immunol.* 21:1101 (1991).
397. 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).
398. 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).
399. M.Schumm, P.Lang, G.Taylor, S.Kuci, T.Klingebiel, H.J.Buhring, A.Geiselhart, D.Niethammer, and R.Handgretinger, Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device, *J Hematother.* 8:209 (1999).
400. R.H.Schwartz, A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy, *Science* 248:1349 (1990).
401. M.Seddik, T.A.Seemayer, and W.S.Lapp, T cell functional defect associated with thymid epithelial cell injury induced by a graft-versus-host reaction, *Transplantation* 29:61 (1980).
402. M.Seddik, T.A.Seemayer, and W.S.Lapp, The graft-versus-host reaction and immune function. I. T helper cell immunodeficiency associated with graft-versus-host-induced thymic epithelial cell damage, *Transplantation* 37:281 (1984).
403. 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).
404. W.C.Sha, C.A.Nelson, R.D.Newberry, J.K.Pullen, L.R.Pease, J.H.Russell, and D.Y.Loh, Positive selection of transgenic receptor-bearing thymocytes by Kb antigen is altered by Kb mutations that involve peptide binding, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:6186 (1990).
405. M.R.Shalaby, B.Fendly, K.C.Sheehan, R.D.Schreiber, and A.J.Ammann, Prevention of the graft-versus-host reaction in newborn mice by antibodies to

- tumor necrosis factor-alpha, *Transplantation* 47:1057 (1989).
406. C.E.Sharrock, S.Man, W.Wanachiwanawin, and J.R.Batchelor, Analysis of the alloreactive T cell repertoire in man. I. Differences in precursor frequency for cytotoxic T cell responses against allogeneic MHC molecules in unrelated individuals, *Transplantation* 43:699 (1987).
407. G.Shaw and R.Kamen, A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation, *Cell* 46:659 (1986).
408. S.Shaw, G.E.Luce, R.Quinones, R.E.Gress, T.A.Springer, and M.E.Sanders, Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T-cell clones, *Nature* 323:262 (1986).
409. L.A.Sherman and S.Chattopadhyay, The molecular basis of allorecognition, *Annu.Rev.Immunol.* 11:385 (1993).
410. J.P.Siegel, Effects of interferon-gamma on the activation of human T lymphocytes, *Cell Immunol.* 111:461 (1988).
411. J.P.Siegel, M.Sharon, P.L.Smith, and W.J.Leonard, The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities, *Science* 238:75 (1987).
412. J.Sierra, B.Storer, J.A.Hansen, J.W.Bjerke, P.J.Martin, E.W.Petersdorf, F.R.Appelbaum, E.Bryant, T.R.Chauncey, G.Sale, J.E.Sanders, R.Storb, K.M.Sullivan, and C.Anasetti, Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: the effect of leukemic burden, donor HLA- matching, and marrow cell dose, *Blood* 89:4226 (1997).
413. P.E.Simms and T.M.Ellis, Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation, *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 3:301 (1996).
414. M.M.Simon, U.Hochgeschwender, U.Brugger, and S.Landolfo, Monoclonal antibodies to interferon-gamma inhibit interleukin 2-dependent induction of growth and maturation in lectin/antigen-reactive cytolytic T lymphocyte precursors, *J.Immunol.* 136:2755 (1986).
415. S.Slavin, R.Or, E.Naparstek, G.Cividalli, Z.Weshler, L.Weiss, M.Mumcuoglu, D.Engelhard, M.Aker, A.Pollack, and ., New approaches for the prevention of rejection and graft-vs.-host disease in clinical bone marrow transplantation, *Isr.J.Med.Sci.* 22:264 (1986).
416. S.Slavin, R.Or, E.Naparstek, L.Weiss, M.Mumcuoglu, Z.Weshler, H.Brautbar, G.Cividalli, M.Glikson, G.Hale, and ., Allogeneic bone marrow transplantation without graft-v-host disease: true tolerance of graft against the host through depletion of donor T lymphocytes pregrafting in malignant and nonmalignant disorders, *Transplant Proc.* 19:2614 (1987).
417. K.A.Smith, T-cell growth factor, *Immunol.Rev.* 51:337 (1980).
418. K.A.Smith, S.Gillis, P.E.Baker, D.McKenzie, and F.W.Ruscetti, T-cell growth factor-mediated T-cell proliferation, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 332:423 (1979).
419. S.R.Smith, C.Terminelli, L.Kenworthy-Bott, and D.L.Phillips, A study of cytokine production in acute graft-vs-host disease, *Cell Immunol.* 134:336 (1991).
420. M.J.Smyth, Fas ligand-mediated bystander lysis of syngeneic cells in response to an allogeneic stimulus, *J.Immunol.* 158:5765 (1997).
421. R.J.Soiffer, D.Fairclough, M.Robertson, E.Alyea, K.Anderson, A.Freedman,

- L.Bartlett-Pandite, D.Fisher, R.L.Schlossman, R.Stone, C.Murray, A.Freeman, K.Marcus, P.Mauch, L.Nadler, and J.Ritz, CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission, *Blood* 89:3039 (1997).
422. R.J.Soiffer, E.Weller, E.P.Alyea, P.Mauch, I.L.Webb, D.C.Fisher, A.S.Freedman, R.L.Schlossman, J.Gribben, S.Lee, K.C.Anderson, K.Marcus, R.M.Stone, J.H.Antin, and J.Ritz, CD6+ donor marrow T-cell depletion as the sole form of graft-versus- host disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic bone marrow transplant from unrelated donors, *J.Clin.Oncol.* 19:1152 (2001).
423. H.K. Song, H. Noorchashm, Y.K. Lieu, S. Rostami, S.A.S. Greeley, C.F. Barker and A. Najj, Cutting Edge: Alloimmune Responses Against Major and Minor Histocompatibility Antigens: Distinct Division Kinetics and Requirement for CD28 Costimulation, *The American Association of Immunologists* (1999).
424. H.K.Song, H.Noorchashm, Y.K.Lieu, S.Rostami, S.A.Greeley, C.F.Barker, and A.Najj, Cutting edge: alloimmune responses against major and minor histocompatibility antigens: distinct division kinetics and requirement for CD28 costimulation, *J.Immunol.* 162:2467 (1999).
425. T.Sornasse, V.Flamand, G.De Becker, H.Bazin, F.Tielemans, K.Thielemans, J.Urbain, O.Leo, and M.Moser, Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo, *J.Exp.Med.* 175:15 (1992).
426. D.E.Speiser, M.F.Bachmann, A.Shahinian, T.W.Mak, and P.S.Ohashi, Acute graft-versus-host disease without costimulation via CD28, *Transplantation* 63:1042 (1997).
427. 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).
428. G.C.Starling, A.D.McLellan, W.Egner, R.V.Sorg, J.Fawcett, D.L.Simmons, and D.N.Hart, Intercellular adhesion molecule-3 is the predominant costimulatory ligand for leukocyte function antigen-1 on human blood dendritic cells, *Eur.J.Immunol.* 25:2528 (1995).
429. R.M.Steinman, The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Annu.Rev.Immunol.* 9:271 (1991).
430. R.M.Steinman and M.D.Witmer, Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75:5132 (1978).
431. R.M. Steinmann, Dendritic Cells, *in: "Fundamental Immunology"*, Paul W.E., ed., Lippincott-Raven, (1999).
432. R.Storb, T.C.Graham, R.B.Epstein, G.E.Sale, and E.D.Thomas, Demonstration of hemopoietic stem cells in the peripheral blood of baboons by cross circulation, *Blood* 50:537 (1977).
433. 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).
434. J.Storek, T.Gooley, M.Siadak, W.I.Bensinger, D.G.Maloney, T.R.Chauncey, M.Flowers, K.M.Sullivan, R.P.Witherspoon, S.D.Rowley, J.A.Hansen, R.Storb, and F.R.Appelbaum, Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation may be associated with a high risk of chronic graft-versus-

- host disease, *Blood* 90:4705 (1997).
435. E.J.Suchin, P.B.Langmuir, E.Palmer, M.H.Sayegh, A.D.Wells, and L.A.Turka, Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question, *J.Immunol.* 166:973 (2001).
 436. K.M.Sullivan, P.L.Weiden, R.Storb, R.P.Witherspoon, A.Fefer, L.Fisher, C.D.Buckner, C.Anasetti, F.R.Appelbaum, C.Badger, and ., Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia, *Blood* 73:1720 (1989).
 437. S.Takeda, H.R.Rodewald, H.Arakawa, H.Bluethmann, and T.Shimizu, MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span, *Immunity.* 5:217 (1996).
 438. P.Tan, C.Anasetti, J.A.Hansen, J.Melrose, M.Brunvand, J.Bradshaw, J.A.Ledbetter, and P.S.Linsley, Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1, *J.Exp.Med.* 177:165 (1993).
 439. C.Tanchot, F.A.Lemonnier, B.Perarnau, A.A.Freitas, and B.Rocha, Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells, *Science* 276:2057 (1997).
 440. C.Tanchot, M.M.Rosado, F.Agenes, A.A.Freitas, and B.Rocha, Lymphocyte homeostasis, *Semin.Immunol.* 9:331 (1997).
 441. P.L.Tazzari, A.Bolognesi, D.De Toter, S.Pileri, R.Conte, J.Wijdenes, P.Herve, M.Soria, F.Stirpe, and M.Gobbi, B-B10 (anti-CD25)-saporin immunotoxin--a possible tool in graft-versus-host disease treatment, *Transplantation* 54:351 (1992).
 442. R.Testi, D.D'Ambrosio, R.De Maria, and A.Santoni, The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells, *Immunol.Today* 15:479 (1994).
 443. R.Testi and L.L.Lanier, Functional expression of CD28 on T cell antigen receptor gamma/delta-bearing T lymphocytes, *Eur.J.Immunol.* 19:185 (1989).
 444. R.Testi, J.H.Phillips, and L.L.Lanier, Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C, *J.Immunol.* 142:1854 (1989).
 445. R.Testi, J.H.Phillips, and L.L.Lanier, T cell activation via Leu-23 (CD69), *J.Immunol.* 143:1123 (1989).
 446. M.L.Thoman and W.O.Weigle, Cell-mediated immunity in aged mice: an underlying lesion in IL 2 synthesis, *J.Immunol.* 128:2358 (1982).
 447. 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).
 448. E.D.Thomas, R.Storb, A.Fefer, S.J.Slichter, J.I.Bryant, C.D.Buckner, P.E.Neiman, R.A.Clift, D.D.Funk, and K.E.Lerner, Aplastic anaemia treated by marrow transplantation, *Lancet* 1:284 (1972).
 449. R.Thomas, L.S.Davis, and P.E.Lipsky, Comparative accessory cell function of human peripheral blood dendritic cells and monocytes, *J.Immunol.* 151:6840 (1993).

450. C.B.Thompson, T.Lindsten, J.A.Ledbetter, S.L.Kunkel, H.A.Young, S.G.Emerson, J.M.Leiden, and C.H.June, CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:1333 (1989).
451. A.M.Thornton and E.M.Shevach, CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production, *J.Exp.Med.* 188:287 (1998).
452. 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).
453. J.J.Trentin and K.P.Judd, Prevention of acute graft-versus-host (GVH) mortality with spleen- absorbed antithymocyte globulin (ATG), *Transplant Proc.* 5:865 (1973).
454. J.Troppmair, J.Aubock, D.Niederwieser, D.Schonitzer, and C.Huber, Interferons (IFNs) and tumor necrosis factors (TNFs) in T cell-mediated immune responses against alloantigens. I. Influence on the activation of resting and antigen-primed T cells, *Immunobiology* 176:236 (1988).
455. I.S.Trowbridge and M.B.Omary, Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78:3039 (1981).
456. R.L.Truitt and A.A.Atasoylu, Contribution of CD4+ and CD8+ T cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC-compatible bone marrow, *Bone Marrow Transplant.* 8:51 (1991).
457. M.L.Tyan, Modification of severe graft-versus-host disease with antisera to the (theta) antigen or to whole serum, *Transplantation* 15:601 (1973).
458. K.S.Ullman, J.P.Northrop, C.L.Verweij, and G.R.Crabtree, Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link, *Annu.Rev.Immunol.* 8:421 (1990).
459. D.Valteau-Couanet, M.Cavazzana-Calvo, F.Le Deist, C.Fromont, and A.Fischer, Functional study of residual T lymphocytes after specific elimination of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor Bk chain immunotoxin, *Transplantation* 56:1574 (1993).
460. D.W. van Bekkum and M.J. DeVries, "Radiation Chimeras", N.Y., Academic Press., New York (1967).
461. D.W. van Bekkum, H.Balner, K.A.Dicke, F.G.van den Berg, G.H.Prinsen, and C.F.Hollander, The effect of pretreatment of allogeneic bone marrow graft recipients with antilymphocytic serum on the acute graft-versus-host reaction in monkeys, *Transplantation* 13:400 (1972).
462. C.A.van Els, J.D'Amaro, J.Pool, E.Blokland, A.Bakker, P.J.van Elsen, J.J.van Rood, and E.Goulmy, Immunogenetics of human minor histocompatibility antigens: their polymorphism and immunodominance, *Immunogenetics* 35:161 (1992).
463. S.W.Van Gool, M.de Boer, and J.L.Ceuppens, CD28 ligation by monoclonal antibodies or B7/BB1 provides an accessory signal for the cyclosporin A-resistant generation of cytotoxic T cell activity, *J.Immunol.* 150:3254 (1993).

464. S.W.Van Gool, M.de Boer, and J.L.Ceuppens, The combination of anti-B7 monoclonal antibody and cyclosporin A induces alloantigen-specific anergy during a primary mixed lymphocyte reaction, *J.Exp.Med.* 179:715 (1994).
465. F.van Rhee, F.Lin, J.O.Cullis, A.Spencer, N.C.Cross, A.Chase, B.Garicochea, J.Bungey, J.Barrett, and J.M.Goldman, Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse, *Blood* 83:3377 (1994).
466. J.J. van Rood, J.G. Eernisse and A. van Leeuwen, Leukocyte antibodies in sera from pregnant women, *Nature* 181:1735 (1958).
467. G.A.van Seventer, Y.Shimizu, and S.Shaw, Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation, *Curr.Opin.Immunol.* 3:294 (1991).
468. W.C.Van Voorhis, J.Valinsky, E.Hoffman, J.Luban, L.S.Hair, and R.M.Steinman, Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication, *J.Exp.Med.* 158:174 (1983).
469. P.Vandenberghe, J.Delabie, M.de Boer, C.Wolf-Peeters, and J.L.Ceuppens, In situ expression of B7/BB1 on antigen-presenting cells and activated B cells: an immunohistochemical study, *Int.Immunol.* 5:317 (1993).
470. P.Vandenberghe, G.J.Freeman, L.M.Nadler, M.C.Fletcher, M.Kamoun, L.A.Turka, J.A.Ledbetter, C.B.Thompson, and C.H.June, Antibody and B7/BB1-mediated ligation of the CD28 receptor induces tyrosine phosphorylation in human T cells, *J.Exp.Med.* 175:951 (1992).
471. L.F.Verdonck, A.W.Dekker, H.M.Lokhorst, E.J.Petersen, and H.K.Nieuwenhuis, Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma, *Blood* 90:4201 (1997).
472. C.S.Via, Kinetics of T cell activation in acute and chronic forms of murine graft-versus-host disease, *J.Immunol.* 146:2603 (1991).
473. C.Viret, F.S.Wong, and C.A.Janeway, Jr., Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition, *Immunity.* 10:559 (1999).
474. G.B.Vogelsang and A.D.Hess, Graft-versus-host disease: new directions for a persistent problem, *Blood* 84:2061 (1994).
475. J.E.Wagner, G.W.Santos, S.J.Noga, S.D.Rowley, J.Davis, G.B.Vogelsang, E.R.Farmer, B.A.Zehnauer, 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).
476. H.Waldmann, A.Polliak, G.Hale, R.Or, G.Cividalli, L.Weiss, Z.Weshler, S.Samuel, D.Manor, C.Brautbar, and ., Elimination of graft-versus-host disease by in-vitro depletion of alloreactive lymphocytes with a monoclonal rat anti-human lymphocyte antibody (CAMPATH-1), *Lancet* 2:483 (1984).
477. 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).
478. D.A.Wall and K.C.Sheehan, The role of tumor necrosis factor and interferon gamma in graft-versus- host disease and related immunodeficiency, *Transplantation* 57:273 (1994).
479. X.N.Wang, L.Sviland, A.J.Ademokun, J.Dunn, G.Cavanagh, S.J.Proctor, and

- A.M.Dickinson, Cellular alloreactivity of human cord blood cells detected by T-cell frequency analysis and a human skin explant model, *Transplantation* 66:903 (1998).
480. S.Webb, C.Morris, and J.Sprent, Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity, *Cell* 63:1249 (1990).
481. P.L.Weiden, N.Flournoy, E.D.Thomas, R.Prentice, A.Fefer, C.D.Buckner, and R.Storb, Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts, *N.Engl.J.Med.* 300:1068 (1979).
482. D.A.Weigent, M.P.Langford, W.R.Fleischmann, Jr., and G.J.Stanton, Potentiation of lymphocyte natural killing by mixtures of alpha or beta interferon with recombinant gamma interferon, *Infect.Immun.* 40:35 (1983).
483. A.Weiss and D.R.Littman, Signal transduction by lymphocyte antigen receptors, *Cell* 76:263 (1994).
484. A.Weiss, B.Manger, and J.Imboden, Synergy between the T3/antigen receptor complex and Tp44 in the activation of human T cells, *J.Immunol.* 137:819 (1986).
485. A.D.Wells, H.Gudmundsdottir, and L.A.Turka, Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response, *J.Clin.Invest* 100:3173 (1997).
486. D.B.Wilson, Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. I. Conditions and parameters of response, *J.Exp.Med.* 126:625 (1967).
487. J.R.Wingard, Advances in the management of infectious complications after bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant* 6:371 (1990).
488. R.P.Witherspoon, R.Storb, H.D.Ochs, N.Flournoy, K.J.Kopecky, K.M.Sullivan, J.H.Deeg, R.Sosa, D.R.Noel, K.Atkinson, and E.D.Thomas, Recovery of antibody production in human allogeneic marrow graft recipients: influence of time posttransplantation, the presence or absence of chronic graft-versus-host disease, and antithymocyte globulin treatment, *Blood* 58:360 (1981).
489. M.D.Witmer-Pack, W.Olivier, J.Valinsky, G.Schuler, and R.M.Steinman, Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells, *J.Exp.Med.* 166:1484 (1987).
490. H.Xu, U.Friedrichs, R.K.Gieseler, J.Ruppert, G.Ocklind, and J.H.Peters, Human blood dendritic cells exhibit a distinct T-cell-stimulating mechanism and differentiation pattern, *Scand.J.Immunol.* 36:689 (1992).
491. W.M.Yokoyama, L.B.Jacobs, O.Kanagawa, E.M.Shevach, and D.I.Cohen, A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type II integral membrane proteins, *J.Immunol.* 143:1379 (1989).
492. X.Z.Yu, P.J.Martin, and C.Anasetti, Role of CD28 in acute graft-versus-host disease, *Blood* 92:2963 (1998).
493. Z.Zheng, M.Takahashi, M.Narita, K.Toba, A.Liu, T.Furukawa, T.Koike, and Y.Aizawa, Generation of dendritic cells from adherent cells of cord blood by culture with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha, *J.Hematother.Stem Cell Res.* 9:453 (2000).
494. S.F.Ziegler, F.Ramsdell, and M.R.Alderson, The activation antigen CD69, *Stem Cells* 12:456 (1994).
495. M.M.Zutter, P.J.Martin, G.E.Sale, H.M.Shulman, L.Fisher, E.D.Thomas, and

D.M.Durnam, Epstein-Barr virus lymphoproliferation after bone marrow transplantation, *Blood* 72:520 (1988).

10. 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. Auch Herrn Prof. Dr. med. R. Handgretinger, Memphis, USA gilt mein besonderer Dank für die Mitwirkung bei der Ausarbeitung dieser Dissertation.

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.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. med. C. Müller, Sektionsleiterin der Sektion Transplantationsimmunologie/Immunhämatologie der Medizinischen Klinik II, Frau Dr. med. B. Gückel aus der Frauenheilkunde und den Mitarbeitern der Fakultät für Immunologie bei Herrn Prof. Dr. med. H.-G. Rammensee, sowie Frau F. Frank, wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor von Prof. Dr. med. Einsele der Medizinischen Klinik II für die beratende und tatkräftige Unterstützung bei der Entwicklung und Auswertung der Elispot-Assays.

Auch Herrn Dr. med. G. Stuhler, aus der Abteilung Hämatologie/Onkologie der Medizinischen Klinik II, danke ich für die Hilfe bei der Generation von dendritischen Zellen.

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

11. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Eva Rettinger
Geburtsdatum/-ort:	28.11.1976 in Erlangen
Eltern:	Edeltraud Rettinger, geborene Wieser Prof. Dr. med. Gerhard Rettinger

Schulbildung:

1983 – 1987	Grundschule Möhrendorf bei Erlangen
1987 – 1996	Städtisches Marie-Therese-Gymnasium Erlangen
1996	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

08/1996 – 10/1996	Visiting Medical Student, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA
10/1996 – 04/1997	Studium der Architektur Universität Stuttgart
04/1997 – 11/2003	Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
20.03.1999	Ärztliche Vorprüfung
23.03.2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
16.09.2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07.11.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

1.Tertial	Unfallchirurgische Klinik, BG-Klinik Universität Tübingen Kinderchirurgie der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Universität Tübingen
2.Tertial	Hämatologie/Onkologie der Medizinische Klinik II der Universität Tübingen Aufnahmestation der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
3.Tertial	Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Universität Tübingen