

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Veränderung der Verteilung von T-Helfer- und B-Zell-Subpopulationen
nach G-CSF-Mobilisierungstherapie**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katayoun Asadi

aus Ramsar (Iran)

Datum der Promotion: 17. September 2021

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	4
Abstrakt	9
Abstract	10
1 Einleitung	11
1.1 Entwicklung der T-Lymphozyten.....	11
1.1.1 Spezifische Untergruppen	12
1.2 Entwicklung der B-Lymphozyten.....	16
1.2.1 Zentrale und periphere Entwicklung der B-Zellen/Spezifische Untergruppen.....	17
1.2.2 Immunoglobuline und ihre Funktion	20
1.3 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation	21
1.4 G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor).....	23
1.5 Fragestellungen der Arbeit	24
2 Material	26
2.1 Gesunde Stammzellspender.....	26
2.2 Hüftkopfsponder	26
2.3 Geräte.....	26
2.4 Verbrauchsmaterialien.....	27
2.5 Reagenzien und Chemikalien	28
2.6 Puffer und Medien	29
2.7 Antikörper.....	30
2.8 B-Zell-ELISpot.....	31
2.9 Software.....	32
3 Methoden	33
3.1 Isolierung von PBMC und BMMC aus peripherem Blut und Hüftköpfen.....	33
3.2 Durchflusszytometrie.....	34
3.2.1 Immunfärbungen zur phänotypischen Charakterisierung von T- und B-Zell-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie	35
3.2.2 In vitro Antigenstimulationen mit anschließenden Immunfärbungen zur funktionellen Charakterisierung von T-Zellen mittels Durchflusszytometrie	37
3.3 B-Zell-ELISpot Assay	39

3.3.1	In vitro B-Zell-Stimulation	39
3.3.2	Beschichtung der Platten.....	40
3.3.3	Entwicklung der Spots	41
3.3.4	Proliferations-Assay.....	41
3.4	Statistische Analysen	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Phänotypische Charakterisierung von Lymphozyten	43
4.1.1	Differentialblutbild.....	43
4.1.2	T-Zell-Subpopulationen	45
4.1.3	B-Zell-Subpopulationen.....	49
4.2	Funktionelle Charakterisierung von T- und B-Zellen	53
4.2.1	Zytokinproduktion der T-Zellen nach <i>in vitro</i> Antigenstimulation	54
4.2.2	Proliferation von B-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie.....	57
4.2.3	Antikörper-sezernierende Zellen im ELISpot Verfahren nach <i>in vitro</i> Stimulationen	58
5	Diskussion	61
5.1	Leukozytensubpopulationen	61
5.2	T-Zell-Subpopulationen - Phänotypische Charakterisierung	61
5.2.1	T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen	62
5.3	Antigenspezifische T-Zellen.....	66
5.4	Unterschiede im Phänotyp der Zellpopulationen – Direkte Effekte von G-CSF?.....	68
5.5	B-Zell-Subpopulationen - Phänotypische Charakterisierung	69
5.6	Antikörper-sezernierende Zellen	71
5.7	Proliferationsverhalten der B-Zellen	72
5.8	Limitationen der Arbeit	73
6	Fazit	75
7	Ausblick.....	77
8	Literaturverzeichnis.....	78
	Eidesstattliche Versicherung	88
	Lebenslauf	89
	Danksagung.....	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 4: Kits

Tabelle 5: Puffer und Medien

Tabelle 6: Fluorochrom-konjugierte Antikörper

Tabelle 7: Immunoglobuline und Antigene

Tabelle 8: Software

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zentrale Entwicklung der B-Lymphozyten im Knochenmark und periphere Entwicklung über die Migration zum Blut und zu den sekundär lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphknoten.

Abbildung 2: Durchflusszytometrische phänotypische Charakterisierung von T-Helferzell-Subpopulationen.

Abbildung 3: Durchflusszytometrische phänotypische Charakterisierung der folliculären T-Helferzellen.

Abbildung 4: Durchflusszytometrische Charakterisierung von B-Zell-Subpopulationen.

Abbildung 5: Funktionelle Charakterisierung von T-Zellen.

Abbildung 6: B-Zell-ELISpot Platte zur funktionellen Charakterisierung der B-Zell-Subpopulation.

Abbildung 7: Absolute und prozentuale Zellzahlen innerhalb der Leukozytenpopulation bei Stammzellspendern vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie.

Abbildung 8: Durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Helferzell-Subpopulationen.

Abbildung 9: Anteil der T-Helferzell-Subpopulationen an den CD4⁺ T-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender und bei Knochenmarksspendern.

Abbildung 10: Durchflusszytometrische Charakterisierung von TH1-Zellen.

Abbildung 11: Anteil der regulatorischen T-Zellen (Tregs) an CD4⁺ T-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender und bei Knochenmarksspendern.

Abbildung 12: Anteil der folliculären T-Helferzellen an den CD4⁺ T-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie bei Stammzellspendern und bei Knochenmarksspendern.

Abbildung 13: Durchflusszytometrische Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen.

Abbildung 14: Anteil der B-Zellen und Plasmablasten an Lymphozyten vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender und bei Knochenmarksspendern.

Abbildung 15: Anteil der B-Zell-Subpopulationen an den B-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender und bei Knochenmarkspendern.

Abbildung 16: Anteil der IgA-, IgM- und IgG-produzierenden B-Zellen an den Isotyp gewechselten- (SM) bzw. Doppel Negativen (DN) B-Zellen.

Abbildung 17: Durchflusszytometrische Identifizierung von $\text{TNF}\alpha$ -, $\text{IFN}\gamma$ -, IL17 -produzierenden T-Zellen nach in vitro Antigenstimulation mit SEB.

Abbildung 18: Durchflusszytometrische Identifizierung von $\text{TNF}\alpha$ -, $\text{IFN}\gamma$ -, IL17 -produzierenden CD4^+ T-Zellen nach in vitro Antigenstimulation mit Tetanus Toxoid.

Abbildung 19: Antigenstimulation der CD4^+ T-Zellen mit SEB, AL, CL, Influenza und TT.

Abbildung 20: Antigenstimulation der CD8^+ T-Zellen mit SEB, AL, CL, Influenza und TT.

Abbildung 21: Durchflusszytometrische Identifizierung des Proliferationsmarkers Ki67 in CD19^+ B-Zellen.

Abbildung 22: Antikörper-sezernierende B-Zellen im ELISpot Verfahren nach in vitro Stimulationen an PBMCs vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie und an BMMCs.

Abbildung 23: Antikörperproduktion von B-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie bei Stammzellspendern vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie und bei Knochenmarksspendern.

Abkürzungsverzeichnis

AB-Serum	Humanserum der Blutgruppe AB
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AF	Aspergillus Fumingatus
Ag-spez.	Antigenspezifisch
a- oder c-GVHD	akute oder chronische Graft versus Host Erkrankung
ähnl.	ähnlich
allo-HSZT	allogene hämatopoietische Stammzelltransplantation
APC	engl. <i>Antigen presenting cells</i> (Antigen-präsentierende Zellen)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASZ	Antikörper-sezernierende Zellen
AVK	Auguste-Viktoria-Klinikum
BAFF	engl. <i>B Cell Activating Factor of the TNF-α Family</i>
Bcl6	engl. <i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
BM	engl. <i>Bone Marrow</i> (Knochenmark)
BMDCs	engl. <i>Bone marrow mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des KM)
BSA	engl. <i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BTLA	engl. <i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
BZR	B-Zell Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
C-Region	konstante Region
CCR	C-C Chemokinrezeptor
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CFU-GM	engl. <i>Granulocyte-monocyte Colony forming unit</i>
CL	Candida Albicans Lysat
CLA	engl. <i>Cutaneous Lymphocyte Antigen</i>
CMV	Cytomegalie Virus
CpG	Cytosin/Guanin-reiche DNA-Motive
CRTH2	engl. <i>Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2</i>
CTL	engl. <i>Cytotoxic T-cells</i> (zytotoxische T-Zellen)

CXCR	C-X-C Chemokinrezeptor
d.h.	das heisst
DC	engl. <i>Dendritic cells</i> (Dendritische Zellen)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppel-negative B-Zellen
EDTA	Di-Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure
ELISpot	engl. <i>Enzyme linked Immuno Spot Assay</i>
engl.	english
et al.	et alia
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell-sorting</i>
FcR	engl. <i>Crystallisable Fraction Receptor</i>
FCS	engl. <i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kalbserum)
FSC	engl. <i>Forward Scatter</i>
g	Gramm
g	Schwerebeschleunigung
G (0..)	engl. <i>Gap</i> (Lücke)
G-CSF	engl. <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
GC	engl. <i>Germinal center</i> (Keimzentrum)
GvHD	engl. <i>Graft vs Host Disease</i>
GZ	Gedächtniszellen
h	Stunde
HEV	engl. <i>High endothelial venules</i>
hi	engl. <i>high</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
Hüft-TEP	Totale Endoprothese des Hüftgelenks
ICOS	engl. <i>Inducible costimulatory molecule</i>
IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
im Vgl.	im Vergleich
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
kDa	Kilodalton

KM	Knochenmark
L	Liter
M.	Mobilisierung
mg	Miligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRD	engl. <i>Matched related donors</i>
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Boten Ribonukleinsäure)
MZ	Marginal Zonen ähnliche B-Zellen
NK	Natürliche Killerzelle
P/S	Penicillin-Streptomycin
PB	Peripheres Blut
PBMCs	engl. <i>Peripheral Blood monuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des PB)
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline
PBSC	engl. <i>Peripheral Blood Stem Cells</i> (Stammzellen des PB)
PD-1	engl. <i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PEB	engl. <i>Protein Extraction Buffer</i>
PHA	Phytohaemagglutinin
PI	Propidiumiodid
PNPS	engl. <i>Pneumococcal Polysacharides</i>
pTFH	periphere TFH
PWM	Pokeweed Mitogen
rhG-CSF	rekombinates humanes G-CSF
ROR- γ t	engl. <i>Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma</i>
rpm	engl. <i>Revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S. aureus	Staphylococcus Aureus
S1P	Sphingosine 1-phosphat
SAC	Staphylokokkus aureus Cowan strain I

SAP	engl. <i>SLAM-associated protein</i>
SEB	Staphylococcus aureus Enterotoxin Typ B
sec.	Sekunden
SEM	engl. <i>Standard error of mean</i> (Standardfehler)
SLAM	engl. <i>Signaling lymphocytic activation molecules</i>
SM	engl. <i>switched memory B cells</i> (Isotyp gewechselte B-Zellen)
sog.	sogenannte
SSC	engl. <i>Sideward Scatter</i>
Streptavidin-HRP	engl. <i>horseradish peroxidase conjugated Streptavidin</i>
SZ	Stammzellen
SZT	Stammzelltransplantation
TCM	engl. <i>Central memory T-cells</i>
TEM	engl. <i>Effector memory T-cells</i>
TEMRA	engl. <i>RA positive effector memory T-cells</i>
TFH-Zelle	Follikuläre T-Helferzelle
TH-Zelle	T-Helferzelle
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tregs	regulatorische T-Zellen
TT	Tetanus Toxoid
TZ	T-Zell
TZR	T-Zell-Rezeptor
UCB	engl. <i>umbilical Cord Blood</i> (Nabelschnurblut)
(VLA)-4	engl. Very Late Antigen 4
V-Region	variable Region
v.a.	vor allem
VCAM1	engl. <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
verd.	verdünnt
z.B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer

°C

Grad Celsius

Abstrakt

Im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation und der davor geschalteten Konditionierungstherapie kommt es bei den Empfängern zum Untergang des immunologischen Gedächtnisses. Die dabei vermehrt auftretenden Infektionskrankheiten sorgen für eine erhöhte Mortalitäts- und Morbiditätsrate. Immunkompetente Zellen, die mit den hämatopoetischen Stammzellen vom allogenen Spender über die Applikation von dem Wachstumsfaktor G-CSF mobilisiert werden, können zum Schutz der Empfänger in ihrer vulnerablen Phase nach Transplantation beitragen. Sie spielen zudem eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung (GvHD, *Graft-versus-Host-Disease*) und können so den Erfolg der Therapie mitbeeinflussen. Das Wissen über die Zusammensetzung der verschiedenen Subpopulationen im Transplantat ist daher essenziell.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte aus diesem Grund die Identifizierung von T-Helfer- und B-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut von Stammzellspendern vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie. Zudem wurde das Knochenmark als eine mögliche Quelle für mobilisierte immunkompetente Zellen mituntersucht.

Die durchflusszytometrische phänotypische Charakterisierung der T-Zellen von 9 Stammzellspendern über die Expression von Chemokinrezeptoren ergab bei den Stammzellspendern einen signifikanten Abfall an T-Helfer-1-Zellen nach G-CSF-Mobilisierungstherapie. In Knochenmarkszellen waren T-Helfer-1-Zellen kaum repräsentiert. Neben der phänotypischen Untersuchung erfolgte analog dazu die Analyse von antigenspezifischen T-Zellen über in vitro Stimulation mit SEB, Aspergillus Lysat, Candida Lysat und Tetanus Toxoid. In der funktionellen Analyse von zytokinproduzierenden T-Zellen nach in vitro Antigenstimulation konnte allerdings kein Rückgang der TH1-Zellen bei Stammzellspendern nach G-CSF-Mobilisierungstherapie festgestellt werden. Die Diskrepanz der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von T-Helfer-Zellen könnte unter anderem über einen direkten G-CSF Effekt auf die Chemokinrezeptorexpression erklärt sein.

Im Stammzelltransplantat zeigte sich hinsichtlich der Gesamt-B-Zellen eine Verdopplung der absoluten Zellzahl, so auch bei den naiven B-Zellen. Hinsichtlich antigenspezifischer B-Zellen ergaben sich keine signifikanten Veränderungen, wobei eine endgültige Aussage wegen zu kleiner Stichprobenzahl zunächst ausbleibt.

Abstract

Under the conditioning regimen, administered before any allogeneic stem cell transplantation, patients undergo a depletion of competent and antigen-experienced immune cells and a downfall of the immunological memory occurs. This leads to an increased risk for infections that are a major cause of mortality and morbidity. In the context of hematopoietic stem cell transplantation and the application of G-CSF to the donors, not only stem cells are being recruited but also immunocompetent cells are being mobilized. These might help the immune reconstitution post-transplant and impact host immunity, but they can also impact the patient's recovery by inducing a syndrome called Graft-versus-host-disease (GvHD). The knowledge of the immune cell composition in the graft is therefore crucial.

This paper engaged with a characterization of peripheral blood of the donors before and after G-CSF application concerning T-helper and B-cell populations. Furthermore, the bone marrow was analysed as a source for the mobilized immunocompetent cells.

The phenotypic identification of T-cell subsets of 9 donor grafts by flow cytometry through a determined combination of chemokine receptor expression led to the identification of the T-helper cells. Under this phenotypic aspect a significant decrease in the T-helper 1 subset was seen. These cells were also poorly represented in the bone marrow.

In addition to the phenotypic characterisation, a functional characterisation was conducted through in vitro stimulation with SEB, Aspergillus Lysat, Candida Lysat and Tetanus Toxoid to identify antigen-specific T-cells. Within this functional analysis of cytokine-producing T cells no decrease in T-helper 1 cells occurred, as initially observed with the phenotypic characterization. Direct effects of G-CSF on chemokine receptor expression could, amongst other things, explain this discrepancy between the phenotypic and functional characterization.

B-cells were increased twofold in numbers, as were follicular helper B-cells, which made up for the biggest B-cell population in peripheral blood. Unlike the absolute cell numbers there were no significant changes within the antibody production, detected through B-cell ELISpot, though the latter still needs confirmation, because of the low number of samples.

1 Einleitung

1.1 Entwicklung der T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind neben den B-Lymphozyten die zentralen Mitspieler in der humoralen Immunabwehr. Sie bewerkstelligen die zellvermittelte Immunabwehr und werden in zwei Fraktionen unterteilt. Die T-Helfer-Lymphozyten, die den CD4 Rezeptor tragen, auch CD4⁺ T-Zellen genannt und die zytotoxischen Lymphozyten, die aufgrund ihres CD8 Moleküls auch CD8⁺ T-Zellen genannt werden. Zu diesen zwei Gruppen gesellen sich die kleine Fraktion der regulatorischen T-Zellen, welche die Aktivität anderer Abwehrzellen dämpfen oder unterdrücken [1]. Ausschlaggebend in der T-Zell-Entwicklung ist der Prozess der Positiv- und Negativselektion von T-Zellen in der Thymusdrüse während der Ontogenese. T-Zell-Vorläufer, welche sich im Knochenmark (KM) entwickeln und zum Thymus wandern besitzen zunächst weder charakteristische T-Zell-Antigene noch antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren. Nach Expression dieser Strukturen erfolgt in der kortikalen Zone des Thymus eine positive Selektion. T-Zellen, die über ihre T-Zell-Rezeptoren Selbst-MHC-Strukturen binden können, werden ausgewählt. Diejenigen Zellen, die dazu nicht in der Lage sind, unterliegen der Apoptose. In der Medulla erfolgt dann eine Negativselektion derjenigen T-Lymphozyten, die wiederum mit hoher Affinität an Selbst-MHC Moleküle des Stromas (Epithelzellen, dendritische Zellen, Makrophagen) binden, die mit Autoantigenen beladen sind. Diese unterliegen folglich ebenfalls der Apoptose. Insgesamt überleben bei diesen Vorgängen weniger als 5% der Thymozyten. So wird eine immunologische Toleranz erreicht, welche als zentrale Toleranz von T-Lymphozyten bezeichnet wird [2]. Die T-Zell-Aktivierung über deren TZR läuft über antigenpräsentierende Zellen, die Antigene erkennen, phagozytieren und über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl. Major Histocompatibility Complex) präsentieren. MHC-Proteine sind Oberflächenproteine, die zur Präsentation von Antigenfragmenten nötig sind und sie werden in MHC-Klasse I und Klasse II aufgeteilt. MHC-Klasse I werden auf allen kernhaltigen Zellen, so auch auf Thrombozyten exprimiert, nicht jedoch auf Erythrozyten. Hierüber erfolgt die Antigenpräsentation für CD8⁺/zytotoxische T-Zellen, es werden körpereigene Antigene präsentiert. Sollten hier aufgrund einer Virusinfektion oder Entartung von Zellen bei der Präsentation neue Peptide hinzukommen, so werden sie von CD8⁺ T-Zellen als fremd erkannt und bekämpft. MHC Klasse II werden von dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen

exprimiert. Diese APCs (antigenpräsentierende Zellen) können somit Pathogene erkennen und die prozessierten Peptidfragmente über MHC-II den $CD4^+$ T-Zellen darlegen, welche nach Erkennung durch das passende T-Zell-Rezeptor aktiviert werden. Es folgt die klonale Expansion dieser $CD4^+$ T-Zellen, welche folglich B-Zellen aktivieren, die das gleiche Antigen über ihr BZR erkennen, und die humorale Immunantwort initiieren [3].

1.1.1 Spezifische Untergruppen

Anhand phänotypischer und funktioneller Merkmale, sowie charakteristischer Transkriptionsfaktoren können unterschiedliche Lymphozytensubpopulationen identifiziert werden. Humane $CD4^+$ T-Zellen stellen kritische Regulatoren des Immunsystems dar. Dies wird bei bestimmten Krankheiten, wie bei der HIV-Infektion deutlich. Dabei sind infizierte Menschen vermehrt empfänglich für opportunistische Infektionen und Krebs aufgrund der virusabhängigen Depletion der $CD4^+$ T-Zellen [4]. Im Menschen stellen die $CD4^+$ T-Zellen eine sehr heterogene Gruppe dar. Die verschiedenen Untergruppen definieren sich vor allem über ihre Zytokinproduktion und oder über die Expression ihrer charakteristischen Transkriptionsfaktoren. Eine phänotypische Charakterisierung wird ebenfalls von verschiedenen Autoren angeboten, welche in dieser Arbeit herangezogen wurde. Folgende Untergruppen lassen sich zunächst unterscheiden: T-Helfer 1- (TH1), T-Helfer 2- (TH2), T-Helfer 17- (TH17) Zellen, welche bestimmte Pathogene anzielen [5-7], regulatorische T-Zellen, welche für die Selbsttoleranz wichtig sind [8] und folliculäre T-Helferzellen (TFH), die mit B-Zellen interagieren und bei der Antikörperproduktion helfen [9]. Die Heterogenität dieser Zellgruppe ergibt sich aus dem T-Zell-*Priming*. Naive T-Zellen haben stammzellähnliche Fähigkeiten und können nach Antigenkontakt in die verschiedenen Untergruppen differenzieren. Antigenerfahrene T-Zellen sind zunächst weniger flexibel, einige besitzen nach Restimulation jedoch noch eine gewisse Plastizität und können die Fähigkeit zur Produktion weiterer Zytokine erlangen [10]. In welche Richtung sie sich differenzieren hängt vom Zellmilieu und der Zytokinproduktion ab. Unvoreingenommene naive T-Zellen, die von dendritischen Zellen (engl. *dendritic cells*, DC), die IL-12 produzieren, aktiviert werden, erlangen somit beispielsweise die Fähigkeit $IFN\gamma$ zu produzieren [11, 12]. Diese sogenannten TH1-Zellen werden zur Bekämpfung intrazellulärer Bakterien und Viren induziert und können Makrophagen aktivieren, die diese intrazellulären Keime abtöten. Im Gegensatz hierzu differenzieren naive T-Zellen in der Gegenwart von IL-4 in die sogenannten TH2-Zellen und produzieren IL-4, IL-10, IL-5, IL-13, jedoch nicht $IFN\gamma$. Diese T-Zellen haben ihre Bedeutung bei der Bekämpfung extrazellulärer Parasiten, wie Helminthen

und auch im Auslösen von Allergien, da sie die IgE Produktion bei B-Zellen induzieren können [13]. T-Zell-Untergruppen besitzen einen unterschiedlichen Grad an Plastizität und erlangen neue Charakteristika, Funktionen im Rahmen sekundärer und chronischer Immunantworten. Die Plastizität und Heterogenität von TH1/TH2-Zellen wurde bereits beschrieben. In vitro-Studien zeigten, dass TH1-Zellen durchaus simultan $\text{IFN}\gamma$ und IL-4 produzieren konnten [14]. Manche T-Zellen sollen zudem auch die TH1- und TH2-Marker CXCR3 und CCR4 co-exprimieren, so auch die Transkriptionsfaktoren Gata-3 und T-bet koproduzieren [15].

Die TFH-Zellen unterscheiden sich unter anderem durch ihren Transkriptionsfaktor Bcl6 und durch ihre Expression von CXCR5, PD-1, SAP, IL-21 und ICOS. Sie sind wichtig für die Formation und Erhaltung des Keimzentrums. Dort regulieren sie die B-Zell-Differenzierung zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen [9]. IL-21 wird dabei als Unterscheidungsmerkmal angesehen, ist jedoch kein Alleinstellungsmerkmal. Viele CD4^+ T-Zellen, die keine TFH-Zellen sind, so TH17-Zellen, produzieren IL-21 [16, 17]. Die TFH-Differenzierung wird kontrovers diskutiert. Unterschiedliche Modelle werden hierzu vorgeschlagen. Bei dem von Shane Crotty vorgeschlagenem Modell handelt es sich bei der TFH-Differenzierung um ein mehrstufiges und multifaktorielles Geschehen, welches unabhängig von der TH1/TH2/TH17-Differenzierung abläuft [9]. Bcl6 stellt den zentralen Transkriptionsfaktor dar, die Expression korreliert dabei stark mit der Expression von CXCR5. In TFH-Zellen zeigte sich die höchste kombinierte Expression von Bcl6 und CXCR5 [18]. Die Differenzierung kann zunächst durch TZR-Aktivierung über dendritische Zellen erfolgen, im weiteren Schritt zur Komplettierung und Erhaltung der TFH-Differenzierung braucht es die Interaktion mit B-Zellen [19]. Die Entwicklung von TFH- und B-Zellen des Keimzentrums ist eng miteinander verbunden, TFH-Zellen induzieren die Expression von Bcl6 in B-Zellen, um die Keimzentrums-B-Zell-Differenzierung zu induzieren und beizubehalten. B-Zellen induzieren wiederum die Expression von Bcl in CD4^+ T-Zellen und sorgen für deren Differenzierung in TFH-Zellen [20].

Im Rahmen des T-Zell-Primings ist für die Expression von Bcl6, neben dem Einfluss von Zytokinen, wie IL-21 [21], die Expression von ICOS auf CD4^+ T-Zellen notwendig [9]. Erst durch die Migration der TFH-Zellen an die T-B-Zell Grenze, unter anderem über eine CXCR5-CXCL13 Interaktion in sekundär lymphatischen Organen, wie der Tonsille, kann es zur kritischen Phase der B-Zell-abhängigen TFH-Differenzierung kommen [9]. Aktivierte B-Zellen exprimieren den ICOS-Liganden, welcher zur Differenzierung in der initialen Phase des DC-*Primings* gebraucht wird [22]. Die Expression von ICOS auf CD4^+ T-Zellen funktioniert dabei

über CD28-abhängige und unabhängige Schritte [23, 24]. In dieser Zellpopulation erfolgt die Unterscheidung zwischen TFH- und GC- (Keimzentrum) TFH-Zellen (hier existieren auch andere Nomenklaturen). Sie haben ein ähnliches Gen-Expressionsprofil, GC TFH-Zellen sollen dabei weiter polarisiert sein. TFH-Zellen exprimieren unter anderem hohe Spiegel an CXCR5, PD-1, ICOS, BTLA, CD200 und SAP [25, 26].

In der menschlichen Tonsille exprimiert eine Fraktion der TFH-Zellen den TH2-Marker, CCR2 und produziert IL-4 [27]. Die Überlebenssignale an GC B-Zellen laufen über verschiedene Wege, die CD40L, IL-4, IL-21, PD-1 und BAFF einschließen [9]. GC B-Zellen sind höchst proapoptotisch und benötigen ständige Überlebens- und Proliferationssignale [28]. Hierfür spielt CD40 und CD40L, der auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird, eine Rolle, ein Mangel an CD40L oder CD40 blockiert die Keimzentrumsentwicklung [29], sowie die Entwicklung von Plasmazellen oder bestimmten Immunglobulinklassen in vivo [30]. Nach Bindung an seinem Rezeptor CD40, internalisiert CD40L, sodass es als Oberflächenmarker jedoch schwer zu quantifizieren ist [31].

Die TH17-Zellen produzieren IL-17 und exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR- γ t in Mäusen und RORC2 in Menschen [32, 33]. TH17-Zellen sind wichtig bei der Bekämpfung von extrazellulären Bakterien und Fungi. Bei Patienten mit einem Mangel an TH17 zeigten sich vermehrt Infektionen mit *Candida albicans* und *Staphylococcus aureus* [34]. Die Voraussetzungen, welche zur TH17-Differenzierung führen sind multipel, sie können auf eine Kombinationen von verschiedenen Zytokinen basieren und scheinen komplexer als bei TH1- und TH2-Zellen zu sein. Im Menschen sollen dabei IL-1 β , IL-6 und IL-23 dabei eine Rolle spielen [35, 36]. Das Bekanntwerden dieser eigenständigen Zellgruppe veranlasste Untersuchungen zu den dazugehörigen Chemokinrezeptoren. Frisch isolierte CD4⁺ T-Gedächtniszellen wurden dabei nach ihrer Zytokinproduktion und der gleichzeitigen Expression verschiedener Chemokinrezeptoren untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl im peripheren Blut von gesunden Spendern, als auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis, CCR6⁺ Zellen IL-17 produzierende Zellen waren, welche auch die RORC mRNA exprimierten. Zudem spielten bei der Antwort auf eine *Candida albicans* Infektion v.a. die doppel positiven CCR6⁺ CCR4⁺ Zellen eine Rolle. Sie machten den Großteil der antigenspezifischen Gedächtniszellen aus, nach Proliferation produzierten sie auch große Mengen IL-17 [37]. Auch bei dieser Zellgruppe wurde eine gewisse Variabilität belegt. T-Zellen, welche von entzündetem Gewebe isoliert wurden, produzierten simultan IL-17 und IFN- γ und co-exprimierten ROR γ t

und T-bet, was das Vorhandensein einer weiteren Untergruppe mit TH17/TH1-Phänotypen belegte [38]. Humane CCR6⁺ TH17-Zellen sind in T_{CM} und T_{EM} (s. unten) vorhanden, welches zeigt, dass sie in der Lage sind sowohl zu lymphatischen als auch zu nicht lymphatischen Geweben zu migrieren. Eine kleine Gruppe der CCR6⁺ Zellen exprimiert den hautspezifischen Rezeptor CCR10 [39]. Diese CCR6⁺CCR10⁺ Zellen produzieren jedoch weder IL-17, noch exprimieren sie RORγt, sie produzieren in großen Mengen IL-22 [39, 40]. Diese sogenannten TH22-Zellen werden zum heutigen Stand als eine Subgruppe der TH17-Zellen angesehen und könnten aufgrund ihrer *Homing*-Eigenschaften und ihrer selektiven Beeinflussung der Keratinfunktion eine Rolle in der Homöostase der Haut und in Inflammationsprozessen spielen [41, 42].

Mit der Einteilung von Gedächtnis-T-Zellen in Central Memory T-Zellen (T_{CM}) und Effektor Memory T-Zellen (T_{EM}) ergibt sich eine weitere Unterteilung des zirkulierenden Immunsystems. Um ihre Funktionen auszuüben, müssen Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen zu spezifischen Geweben wandern, wobei spezielle Chemokinrezeptoren dabei eine besondere Rolle spielen [43]. Diese sind auf den jeweiligen Untergruppen unterschiedlich exprimiert. CCR7 ist beispielsweise charakteristisch für Central Memory T-Zellen (T_{CM}), was sie von Effektor Memory T-Zellen (T_{EM}) unterscheidet [44]. T_{CM} sind CD45RO⁺/RA⁻ Zellen und exprimieren CCR7 und CD62L, welche für die Extravasation durch *high endothelial venules* (HEV) und für die Migration zu T-Zell-Bereichen von sekundär lymphatischen Organen wichtig sind, ebenfalls charakteristisch für die CD45RA⁺ naiven T-Zellen [45, 46]. Im Vgl. zu den naiven T-Zellen haben die T_{CM} jedoch eine höhere Sensitivität für eine Antigenstimulation, sie regulieren den CD40L in einem größeren Ausmaß hoch, was für ein effektiveres stimulatorisches Feedback der dendritischen Zellen und B-Zellen sorgt. Nach einer Stimulation über ihr TZR produzieren die T_{CM} v.a. IL-2, nach ihrer Proliferation durch Antigenstimulation, differenzieren sie zu T_{EM} und produzieren v.a. IFNγ oder IL-4. Humane T_{EM} haben die konstitutive Expression von CCR7 verloren und sind für die Expression von CD62L heterogen. T_{EM} unterscheiden sich zudem über ihre schnellen Effektor-Funktionen. Im Menschen soll die T_{EM} Untergruppe von TH1-, TH2- und CTL-Zellen gebildet werden. CD8⁺ T_{EM} besitzen viel Perforin und sowohl CD4⁺ als auch die CD8⁺ T-Zellen produzieren wenige Stunden nach Antigenstimulation IFNγ, IL-4 und IL-5. Zudem exprimieren einige CD8⁺ T_{EM} Zellen CD45RA, diese werden auch T_{EMRA} Zellen genannt. Diese Gruppe besitzt am meisten Perforin. Im peripheren Blut unterscheidet sich die relative Proportion von T_{CM} und T_{EM} in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. T_{CM} dominieren in CD4⁺ T-Zellen

und T_{EM} dafür in $CD8^+$ T-Zellen. Im Gewebe hingegen soll es eine vergleichbare Aufteilung geben. T_{CM} finden sich v.a. in Lymphknoten, Tonsillen, T_{EM} v.a. in Lunge, Leber, Darm [47]. Antigen-spezifische T-Zellen können sich ebenfalls auf die T_{CM} und T_{EM} verteilen. Tetanus Toxoid spez. $CD4^+$ T-Zellen konnten in T_{CM} und T_{EM} noch 10 Jahre nach der Antigenstimulation gefunden werden, nach einer Auffrischungsimpfung erhöhte sich zudem ihre Frequenz [44]. Ähnlich ist es bei $CD8^+$ T-Zellen, antigen-spezifische T-Zellen können in beiden Zellgruppen detektiert werden, wobei die Antigen-spezifität anders zu sein scheint. HIV-spezifische T-Zellen sind beispielsweise v.a. T_{EM} ($CD45RA^-CCR7^-$), CMV-spezifische Zellen scheinen hingegen v.a. T_{EMRA} ($CCR7^+CD45RA^+$) Zellen zu sein. Mehrere Studien konnten bereits belegen, dass antigen-spezifische T-Zellen in Form von T_{CM} und T_{EM} lange persistieren können. Seit der ersten Beschreibung dieser Zellgruppen wurde verdeutlicht, dass es sich bei ihnen hinsichtlich der Expression von Chemokinrezeptoren, Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen um eine heterogene Gruppe handelt [48, 49]. Je nach Expression dieser verschiedenen Faktoren können T_{EM} in die bereits weiter oben genannten Subpopulationen wie den TH1- oder TH2-Zellen unterteilt werden [50]. In den T_{CM} befindet sich eine beträchtliche Portion an $CXCR5^+$ T-Zellen, den sogenannten TFH-Zellen, welche nach Aktivierung IL-2 und IL-10 und in den Tonsillen zudem CD40L und ICOS produzieren, wodurch sie eine B-Zell-Helferfunktion erfüllen [19, 51, 52].

1.2 Entwicklung der B-Lymphozyten

B-Lymphozyten gehören neben den T-Lymphozyten zum adaptiven Immunsystem. Sie übernehmen dabei die spezifische humorale Immunabwehr. Sie produzieren Antikörper (Immunoglobuline), die Pathogene antigen-spezifisch binden und unschädlich machen können. Das kann entweder direkt durch die Bindung geschehen, z.B. durch die Neutralisierung eines Toxins oder durch Komplementaktivierung und Opsonierung von Bakterien zwecks Phagozytose durch Leukozyten. Nach Ausdifferenzierung können sie verschiedene Immunoglobulinklassen sezernieren, welche den erwähnten Mechanismen dienen. In der T-Zell-abhängigen und unabhängigen B-Zell-Aktivierung spielen neben den T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und natürliche Killer T-Zellen eine wichtige Rolle [1]. Je nach Differenzierung können sich B-Zellen schließlich zu Gedächtnis-B-Zellen, zu Plasmablasten, welche die Antikörper sezernieren, oder zu anderen Subpopulationen entwickeln. Hierüber entscheiden die jeweiligen zellulären oder löslichen Einflussfaktoren [53].

1.2.1 Zentrale und periphere Entwicklung der B-Zellen/Spezifische Untergruppen

Die zentrale Entwicklung der B-Zell Vorläufer pro und pre B-Zellen aus pluripotenten Stammzellen läuft antigenunabhängig im Knochenmark ab. Pro B-Zellen ($CD19^-CD10^{+/-}CD20^-CD22^+CD24^-vpreB^-I\alpha^{-/+}$) stellen die erste Entwicklungsstufe dar und können über den Oberflächenmarker CD22 charakterisiert werden. Durch somatische Rekombination leiten sie die Bildung des BZRs ein, es folgt das Immunoglobulin-Gen-*Rearrangement* bzw. die Umlagerung von Gensegmenten auf einem Allel des Immunoglobulin-schwere Ketten-Locus, wobei es zu einer Verknüpfung eines D- mit einem J-Segment kommt und später zu einer V- zu DJ-Verknüpfung. Die komplette Umlagerung der schweren Ketten und anschließende Paarung mit den vorläufigen leichten Ketten auf der Zelloberfläche, als sogenannter Pre BZR charakterisiert das Pre B-Zell-Stadium [54]. Das Erscheinen des Pre BZR auf Pre B-Zellen ($CD19^+CD10^+CD20^-CD24^{++}vpreB^+I\alpha^+$ intracellular μ^+) stellt den ersten Selektionspunkt in der B-Zell-Entwicklung dar, sie erfahren eine positive Selektion für Proliferation und weitere Differenzierung (große, sich teilende Prä-B-Zelle) [55]. Verläuft das Immunoglobulin-Gen-*Rearrangement* fehlerhaft und der Rezeptor wird nicht ausgebildet, so wird das *Rearrangement* auf dem zweiten Allel wiederholt, wenn ebenfalls misslungen, leitet die Zelle die Apoptose ein. Gelingt der Prozess, startet die sog. kleine, ruhende Prä-B-Zelle das *Rearrangement* des Immunoglobulin-leichte-Ketten Locus. Die Gensegmente des $Ig\kappa$ -Locus werden verknüpft, wenn es nicht gelingt die des $Ig\lambda$ -Locus. Die Bindung der Ig -leichte- und schwere Kette führt nun zur Oberflächenexpression eines B-Zell-Rezeptors, dem IgM . Die nun unreifen B-Zellen ($CD19^+CD10^+CD20^+CD24^{++}IgM^+$) durchlaufen zum ersten Mal eine antigenspezifische negative Selektion, während dessen Zellen, die einen autoreaktiven B-Zell-Rezeptor exprimieren, in die Apoptose gehen. An diesem Punkt endet die zentrale Entwicklung der B-Zellen. Die sogenannten transitionalen B-Zellen verlassen nun das KM, um in sekundären lymphatischen Organen, in der Milz zu reifen. Im Normalfall finden sich in der Blutzirkulation gesunder Menschen weder Pro-, Prä- noch unreife B-Zellen [56]. Insgesamt erreichen nur ungefähr 10-20% der unreifen B-Zellen die Milz [57]. Nach dem Austreten aus dem KM passieren murine periphere B-Zellen verschiedene Entwicklungsstufen und werden folgendermaßen bezeichnet: Transitional Typ 1-2 oder 3 B-Zellen [58, 59]. T1 ähneln der unreifen B-Zellen des KMs, in der Milz differenzieren sie zu T2 B-Zellen, neben IgM exprimieren sie ebenfalls IgD . Als Überlebenssignal scheinen neben dem BZR, Signale über BAFF (engl. B Cell Activating Factor of the TNF-a Family) und dem BAFF-Rezeptor [60], welcher als erstes auf den T2-Zellen

exprimiert wird, wichtig zu sein [61, 62]. Diese Entwicklung scheint sich in Teilen auch im Menschen so abzuspielen [63]. Nach dem Durchlaufen dieses Stadiums besteht das reife B-Zell-Reservoir aus MZ (marginal Zonen ähnlichen) und den folliculären B-Zellen [56]. MZ B-Zellen machen 15-25% des B-Zell Pools aus [64]. Aufgrund ihrer BZR-Spezifitäten für Polysaccharide, zeigte sich bei einem Mangel dieser Subpopulation z.B. eine schwache PNPS (Pneumococcal Polysaccharides) Impfantwort [65].

Folliculäre B-Zellen, nach ihrer Lokalisation in Follikeln der Milz und Lymphknoten benannt, machen die Haupt-B-Zellpopulation im Blut und sekundär lymphatischen Organen aus. Vor Antigenkontakt exprimieren diese naiven folliculären Zellen IgD, doch kein CD27. Sie wandern durch sekundär lymphatische Organe bis ein passendes Antigen über ihr BZR bindet. Ihre BZRs erkennen v.a. Proteine, so werden sie typischerweise über eine T-Zell-abhängige Reaktion rekrutiert. Kommt es über den BZR zur Antigenbindung und Aktivierung, so führt das zur Differenzierung der B-Zelle. Je nach Stärke des Aktivierungssignals und abhängig von Stimulation, kostimulatorischen Rezeptoren und anderen Faktoren [56], entstehen entweder frühe IgM-sezernierende Plasmazellen oder sie wandern in Follikel ein und werden zu Keimzentrums-B-Zellen [66]. Keimzentren sind hoch spezifische Nischen, besonders wichtig für den Isotypenwechsel, Affinitätsreifung, Selektion und Expansion von antigenspezifischen B-Zell-Klonen [67]. Zusätzliche Signale über T-Zellen, v.a. durch CD40L ermöglichen das Überleben dieser Zellen und das Erlangen von Gedächtniszell-Merkmalen. Andere Stimuli, wie IL-10, IL-21 [68] induzieren dabei einen anderen Weg der Differenzierung und generieren dabei Plasmazellen [69]. Im Kontext der Keimzentrumsreaktion gehen die B-Zellen durch mehrere Etappen (BM1-5), von denen nur Prä- (Naive, BM 1-2) und Post-Keimzentrums- (Gedächtnis, BM5) Etappen in der Zirkulation zu finden sind [70]. Die Abbildung 1 fasst über eine schematische Darstellung die zentrale und periphere Entwicklung der B-Lymphozyten zusammen.

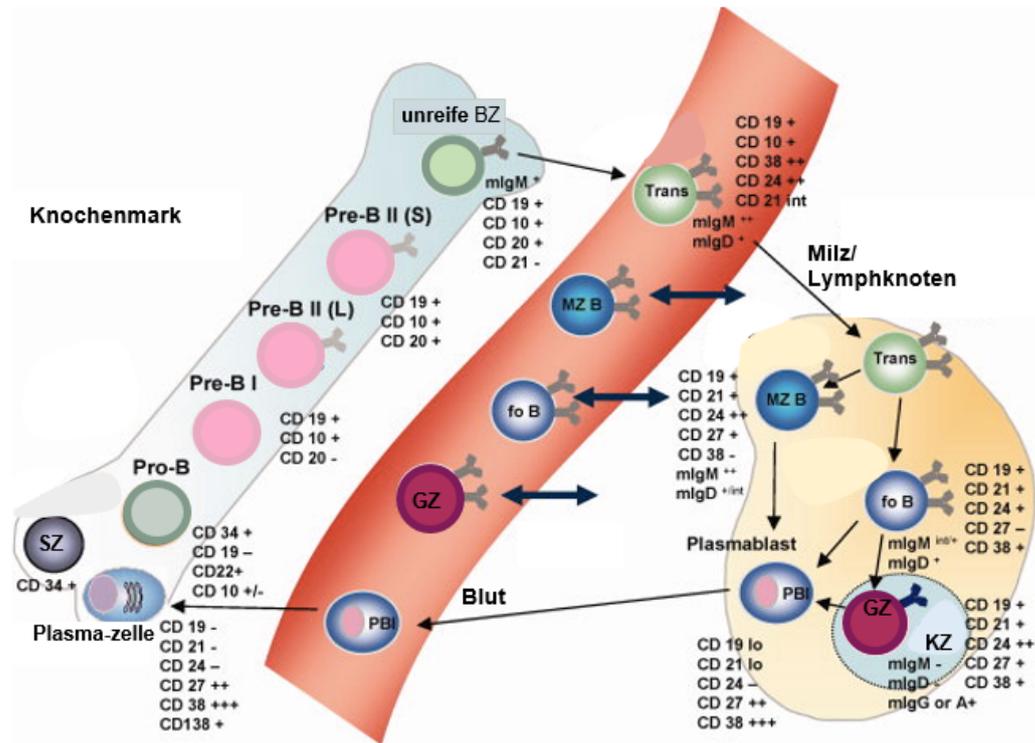


Abbildung 1: Zentrale Entwicklung der B-Lymphozyten im Knochenmark und periphere Entwicklung über die Migration zum Blut und zu den sekundär lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphknoten. Über Vorstufen aus dem KM entwickeln sich die transitionalen B-Zellen (Trans), die sich in sekundär lymphatischen Organen zu follikulären-, naiven B-Zellen (fo B), Marginalzonen-ähnliche B-Zellen (MZ B) und nach Antigenkontakt zu Gedächtniszellen (GZ) und Plasmablasten (PBI) entwickeln. MZ B, fo B und GZ zirkulieren zwischen Blut und den sekundär lymphatischen Organen. Plasmablasten wandern über das Blut ins KM. Plasmazellen hingegen zirkulieren nicht im Blut. KZ= Keimzentrum. Neben den verschiedenen Differenzierungsschritten sind einige wichtige Oberflächenmarker hier dargestellt, nach Warnatz et al. [56]

Schließlich erlaubt die Kombination verschiedener Marker, wie dem CD27 und IgD die Bestimmung der verschiedenen B-Zell-Untergruppen, welche in dieser Arbeit zur Unterscheidung der Subpopulationen angewendet wurden. CD27 ist dabei der verbreitetste Marker für GZ, welche sie von den naiven B-Zellen unterscheidet [71]. 16-55% (5-95% Konfidenzintervall) der zirkulierenden B-Zellen sind CD27⁺, wovon um die 50% IgM und IgD exprimieren, der Rest erlebt einen Klassenwechsel während der Keimzentrumsreaktion [56]. CD27⁺IgD⁻ GZ sind Isotyp-gewechselte GZ (engl. Switched Memory B Cells), sie sollen die wahrhaften Post-Keimzentrums Gedächtnis-B-Zellen sein [56] und sind aktivierungsfreudiger als naive B-Zellen. Menschen mit einer defekten Keimzentrumsreaktion aufgrund von CD40L- oder ICOS-Defekt mangelt es komplett an dieser Population [72]. Der Klassenwechsel während der Keimzentrumsreaktion geht dabei normalerweise mit einem Verlust der IgM-Expression

einher, welcher obligat auf naiven B-Zellen exprimiert wird. Nichtsdestotrotz existiert eine $\text{IgM}^+\text{IgD}^-\text{CD27}^+$ GZ-Subpopulation, welche aufgrund einer somatischen Hypermutation IgM weiter exprimieren [73]. Sie werden auch als IgM-only B-Zellen ($\text{IgM}^+\text{IgD}^-\text{CD27}^+$) bezeichnet und machen einen niedrigen Prozentsatz der GZ aus [56]. Zudem können CD27^- Isotyp-gewechselte B-Zellen als Doppel negative (DN, $\text{CD27}^-\text{IgD}^-$) bezeichnet werden und lassen sich in IgG^+ , IgM^+ , IgA^+ DN unterteilen [74, 75]. Wie auch die Isotyp-gewechselten B-Zellen ist diese Zellpopulation an Impfantworten beteiligt, sie können z.B. zur Sekretion von Anti-Influenza-, Anti-Tetanus-Antikörpern angeregt werden [76]. $\text{CD27}^+\text{IgD}^+\text{IgM}^+$ repräsentieren die MZ B-Zellen [64], sie sind meist nahezu komplett IgM positiv und spielen eine Schlüsselrolle in der Infektabwehr von *Streptococcus pneumoniae* [65].

Nach entsprechender Antigenstimulation werden Plasmablasten $\text{CD19}^{+/\text{lo}}\text{CD24}^-\text{CD27}^{\text{hi}}\text{CD38}^{\text{hi}}$ extrafollikulär und im Rahmen von Keimzentrumsreaktionen gebildet [77]. Letzteres führt zur Entstehung einer langlebigen humoralen Immunität über Plasmazellen, die für das Bestehen eines Antikörper-Titers sorgt. Sie befinden sich hauptsächlich im KM und zirkulieren nicht im peripheren Blut. Ihre Vorläufer, die Plasmablasten sind in geringen Mengen im Blut vorhanden. Deren Anzahl hängt von vorheriger Aktivierung ab, einen Peak gibt es an Tag 6 einer Impfung, wonach sie auf Werte von unter 2% sinken [78].

Eine weitere Untergruppe, welche in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde, ist die der regulatorischen B-Zellen. Sie stellen das Äquivalent zu den regulatorischen T-Zellen (Tregs) dar und sorgen für eine Immuntoleranz, indem sie inflammatorische Reaktionen eindämmen. Ihr zentraler Mediator ist IL-10, welches die Differenzierung von Tregs fördert und die Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen inhibiert [79]. Zudem inhibieren sie die Differenzierung von naiven T-Zellen in TH1- und TH17-Zellen und unterdrücken die Sekretion von Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interferon- γ (IFN γ) [80].

1.2.2 Immunoglobuline und ihre Funktion

Antikörper/Immunoglobuline verschiedener Isotypen haben verschiedene Funktionalitäten. Sie sind wichtig für die Kontrolle verschiedener Klassen an Pathogenen. TFH-Zellen produzieren dabei bestimmte Zytokine, wie IL-4, IL-21, die für den Klassenwechsel nötig sind [9].

Über die verschiedenen Isotypen entscheidet die C-Region der schweren Ketten und nicht die Antigenpezifität (die antigenbindende Region der Isotypen bleibt unverändert). Jede Kette besitzt dabei eine C- (konstante) und eine V- (variable) Region. Bekannte Ig-Isotypen sind IgM,

IgG, IgA, IgE, IgD, IgM ist ein Antigenrezeptor auf naiven B-Zellen, es wird bei der T-Zell-unabhängigen B-Zell-Antwort und zu Beginn der T-Zell-abhängigen primären B-Zell-Antwort sezerniert. Es ist durch ein Bindungsprotein zu Pentameren gekoppelt (5 IgM) und zählt zu den wirksamsten Igs für die Agglutination von Bakterien und anderen Partikeln. IgG stellt im Blutplasma die größte Ig-Fraktion dar. Es dient in erster Linie der Komplementaktivierung, Opsonierung von Pathogenen und Neutralisation von Toxinen. Mittels Transzytose wird es zudem durch die Plazentaschranke transportiert und dient somit der passiven Immunität des Neugeborenen. IgA wird von subepithelialen Plasmazellen sezerniert und dient dem Schutz der Schleimhäute und exokrinen Drüsen. In der Muttermilch enthalten, dient es dem Schutz des Verdauungstraktes des Säuglings. IgE dient u.a. der Opsonierung von Wurmlarven (Erkennung durch eosinophile Granulozyten). Zudem ist es mit dem Fc-Rezeptor auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen gebunden, bei der Antigenbindung kommt es folglich zu der Auslösung der allergischen Sofortreaktion [1].

1.3 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die Knochenmarkstransplantation bzw. die hämatopoetische Stammzelltransplantation (SZT), stellt die älteste Form der Anti-Krebs Immunotherapie in der Klinik dar. Dabei werden hämatopoetische Stammzellen entweder autolog d.h. von dem Patienten selbst oder allogon d.h. von einem verwandten oder fremden Spender, bei nachgewiesener Histokompatibilität transplantiert. Bei der autologen Stammzelltransplantation werden zuvor eigens kryokonservierte Stammzellen dem Patienten nach einer hohen Dosis Chemotherapie zurückgeführt. Das geschieht beispielsweise bei Patienten mit Lymphomen oder multiplen Myelomen und soll die Knochenmarksfunktionen wieder herstellen [81, 82]. Die allogene SZT kommt dabei auch bei der Wiederherstellung der Hämatopoese und der Immunfunktion bei Patienten mit Knochenmarksfehlfunktionen und Immundefiziten zum Einsatz, doch vorwiegend dient sie der zellulären Therapie von Patienten mit hämatopoetischen Malignomen [83, 84]. Initial wurden die hämatopoetischen Zellen für die autologe und allogene Transplantation über eine Punktion des Beckenkammes in allgemeiner Anästhesie der Spender gewonnen. Im Verlauf zeigten präklinische, dann klinische Studien, dass der *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) in ausreichender Menge hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisieren kann, mehr als es bei der traditionellen Entnahme über das Beckenkamm möglich war. Post-Transplantation führe das zu einem schnelleren Anstieg an Neutrophilen und Thrombozyten auf klinisch sichere Spiegel [85]. Eine prospektiv randomisierte Studie von Favre,

G. et al. zeigte zudem signifikante Unterschiede zwischen der Transplantation der peripheren Stammzellen (PBSC, Peripheral Blood Stem Cells) und der des Knochenmarks. Das PBSC (*peripheral blood stem cell*)-Transplantat lieferte dabei eine zweifach höhere Anzahl an CD34⁺ Zellen und eine fast achtfach höhere Anzahl an T- und NK-Zellen. Ungeachtet der Methode bleibt die Stammzelltransplantation ein invasives Verfahren, welches mit Komplikationen und Einschränkung der Lebensqualität verbunden sein kann. Nichtsdestotrotz stellt die PBSC-Spende ein grundsätzlich weniger invasives, traumatisches Verfahren dar. Eine Allgemeinanästhesie wird dabei nicht benötigt und es werden weniger Krankenhaustage dokumentiert als bei der klassischen Spende über das Knochenmark [86].

Nach der Konditionierungstherapie, als Vorbereitung auf die allogene Stammzelltransplantation, geht das immunologische Gedächtnis der Stammzellempfänger überwiegend verloren. Diese Patienten sind daraufhin stark anfällig für Infektionskrankheiten. Das Wiederherstellen der Immunität dauert mehrere Monate und ist zudem durch die Schädigung der primären und sekundären lymphatischen Organe gestört. Einige Studien beschreiben bereits einen Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung des Transplantats und dem klinischen Verlauf bei Patienten. Vermehrte B-Zellen im Spendertransplantat waren demnach mit einem besseren klinischen Verlauf assoziiert, eine erhöhte Anzahl an naiven Zellen korrelierte dagegen mit einer GvHD (*graft-versus-host disease*) [87].

Der potentielle Nutzen des transferierten Immunsystems für die Patienten wurde zudem auch angenommen, weil die Vakzinierung der Spender für eine bessere Wiederherstellung der antigenspezifischen Antwort im Empfänger sorgte [88, 89]. CMV-seropositive Patienten, die Transplantate von CMV-seropositiven Spendern erhielten, hatten klinisch gesehen einen Vorteil gegenüber den Patienten mit seronegativen Spendern [90]. Weitere Studien zeigten, dass die transferierten CMV-spezifischen Gedächtniszellen der Spender im Empfänger bestehen und diesen gegen einer erneuten CMV-Reaktivierung schützen [91, 92]. Die klinische Anwendung von CMV-spezifischen T-Zellen zeigte einen effektiven Schutz für die Patienten, ohne eine GvHD zu triggern [93, 94]. Diese Erkenntnisse steigern die Hoffnung, dass der Immunstatus von Patienten über den Transfer von passenden Gedächtniszellen mit dem Stammzelltransplantat verbessert werden könnte.

1.4 G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor)

Der *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) gehört zu den ersten Zytokinen, welcher identifiziert wurde und schnell Einzug in die klinische Medizin fand. Zunächst erfolgte damit die Behandlung von Patienten mit Neutropenien, infolge einer Chemotherapie. Später fand es Einzug in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation, nachdem bekannt wurde, dass es hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisieren kann. G-CSF hat eine zentrale Bedeutung in der Granulopoese, bei der Produktion von neutrophilen Granulozyten. Er sorgt für deren Anstieg nach Infektionen oder nach Schädigungen der Knochenmarksfunktion, wie nach einer Behandlung mit Chemotherapeutika [95]. Hierbei konnten in Mäuse, welche einen Mangel an G-CSF oder an seinem Rezeptor aufwiesen, schwere Neutropenien beobachtet werden [96].

Die körpereigene G-CSF Plasmakonzentration ist normalerweise unter der Nachweisgrenze oder stark erniedrigt. Infolge einer Infektion steigt sie schnell an, nach Erholung sinkt sie wieder ab [97, 98]. Mehrere Gewebetypen sind in der Lage G-CSF zu produzieren, wenn sie angemessen stimuliert werden. Wenn es einmal in die Blutzirkulation gelangt ist, kann es die Produktion der Neutrophilen im Knochenmark stimulieren und zu dessen Mobilisierung führen. Zudem kann das lokal produzierte G-CSF am Ort der Infektion auf die Funktion der Neutrophilen einwirken und deren Apoptose z.B. verhindern [99]. Mittlerweile wird G-CSF routinemäßig bei vielen Patienten mit malignen Erkrankungen eingesetzt, so auch bei Patienten mit kongenitalen, isolierten Neutropenien und in einigen Fällen auch bei dem myelodysplastischen Syndrom und der akquirierten aplastischen Anämie. Bei Patienten mit einer isolierten Neutropenie konnte G-CSF die Symptome verringern, es zeigten sich weniger Ulzera an der Mundschleimhaut, weniger febrile Episoden und Infektionen [100].

Diese Eigenschaften eines rekombinanten G-CSFs machte man sich folglich in der Stammzelltransplantation zu Nutze. Zu den Mechanismen der Mobilisierung der hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) ist folgendes bekannt: Es wird bereits lange die Behauptung vertreten, dass HSZ in einer bestimmten Nische im KM zu finden sind, wo deren Wachstum, Überleben, Differenzierung kontrolliert wird [101]. Um die Mobilisierung zu erreichen, müsste also folglich die Verbindung zwischen HSZ und der Nische unterbrochen werden. Retentionsfaktoren, welche diese Verbindung ermöglichen, sind u.a. (VLA)-4/VCAM1 und CXCL12/CXCR4. Es konnte gezeigt werden, dass diese Interaktionen während der G-CSF

induzierten Mobilisierung von HSZ unterbrochen waren [102, 103]. Doch auch wenn die Inhibition der CXCL12/CXCR4 Axis einen Schlüsselmechanismus in der HSZ-Mobilisation darstellen soll, sind CXCR4 Antagonisten zunächst nur moderate Mobilisierer, wenn sie isoliert eingesetzt werden. In Kombination mit G-CSF jedoch, zeigt sich eine viel größere Wirkung [104]. G-CSF müsste demnach verschiedene Mechanismen parallel triggern, welche zur Mobilisierung beitragen. Die Bedeutung der Expansion von Neutrophilen und deren Vorläufer wird diskutiert. Durch eine proteolytische Umgebung könnten dabei Retentionsfaktoren degradieren [102, 103]. CD169⁺ Knochenmarksmakrophagen [105], das periphere Nervensystem, Osteozyten, Osteomacs [106] sollen ebenfalls eine Rolle in der Mobilisierung spielen. Sie sollen entweder direkt oder indirekt Osteoblasten unterdrücken, welche zur optimalen Retention von HSZ in der KM-Nische wichtig sind oder unterstützende Knochenmarksfaktoren, wie CXCL12 unterdrücken [107]. Zusammengefasst führen diese Effekte zu einer Veränderung der KM-Nische, was die Emigration der HSZ in die periphere Zirkulation zur Folge hat, dies unter dem potentiellen Einfluss eines Lipid Sphingosine 1-phosphat (S1P) Gradienten [108, 109]. Die genaue Kontribution von S1P1 in der G-CSF geleiteten HSZ-Mobilisation bleibt jedoch unklar. Es wurden bisher keine erhöhten Konzentrationen nach der G-CSF-Mobilisierung im Plasma vorgefunden [108]. Dies müsste durch weitere Studien aufgeklärt werden.

1.5 Fragestellungen der Arbeit

Komplikationen wie Infektionen oder die Entstehung einer GvHD stellen häufige Gründe für die Mortalität und Morbidität nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (allo-HSZT) dar. Es wird angenommen, dass der Transfer des immunologischen Gedächtnisses zusammen mit dem Stammzelltransplantat der Spender zum immunologischen Schutz der Patienten in den ersten Monaten nach Transplantation beiträgt. Da die Zusammensetzung des Transplantats mitunter den Erfolg der Therapie beeinflussen kann, ist die Kenntnis über ihre Zusammensetzung nach G-CSF-Mobilisierungstherapie von essenzieller Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es über eine detaillierte phänotypische und funktionelle Charakterisierung die Zusammensetzung des Stammzelltransplantats auf T-Helfer- und B-Zell-Subpopulationen hin zu untersuchen und eine Aussage über die Effektivität der eingesetzten Methoden zur Identifizierung dieser Zellen zu treffen. Eine gepaarte Analyse am Spenderblut vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie wurde durchgeführt, um die mobilisierten Populationen zu

identifizieren und zu quantifizieren. Das Knochenmark als eine mögliche Quelle für mobilisierte T- und B-Zell-Populationen wurde analog zum Stammzelltransplantat untersucht.

Fragestellung 1: Welche Veränderungen können in der Zusammensetzung von T-Helfer- und B-Zell-Subpopulationen nach G-CSF-Mobilisierungstherapie abgezeichnet werden?

Die mononukleären Zellen des Spenderblutes (PBMCs) wurden vor und nach G-CSF-Mobilisierung isoliert und gleichermaßen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt. Mittels Vielfarben-Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell-sorting, FACS) wurden anschließend die verschiedenen T- und B-Zell-Subtypen erfasst. Mithilfe des Blutbildes konnten daraufhin die absoluten T- und B-Zell-Subtypenzahlen pro μl Blut bestimmt werden.

Fragestellung 2: Welche Veränderungen in antigenspezifischen T- und B-Zellen werden beobachtet? Stimmen diese Ergebnisse mit denen der phänotypischen Charakterisierung von T-Helfer-Subpopulationen überein?

Dafür wurden die isolierten mononukleären Zellen der Spender über Nacht im Brutschrank kultiviert und am folgenden Tag mit verschiedenen Antigenen, Tetanus Toxoid, Candida Lysat, Aspergillus Fumingatus Lysat, Influenza Peptide und einer Positivkontrolle mit SEB (Staphylococcus aureus, Enterotoxin Type B) für fünf Stunden stimuliert. Durch extra- und intrazelluläre Färbung wurde die Zytokinproduktion (TNFa, IFNg, IL-17) der naiven- und der Gedächtnis-T-Zellen erfasst. Zur Quantifizierung von spezifischen Antikörper-sezernierenden B-Zellen erfolgte ein B-Zell ELISpot.

Fragestellung 3: Ist das Knochenmark als eine Quelle für die T-Helfer- und B-Zell-Subpopulationen bzw. für die antigenspezifischen T- und B-Zellen denkbar?

Dafür wurden die BMBC's (Bone marrow monuclear cells) aus Hüftköpfen von Patienten, die eine totale Endoprothese des Hüftgelenks erhalten haben, entnommen und analog zu den PBMCs analysiert. Die Hüftköpfe wurden uns aus dem Auguste-Viktoria-Klinikum geliefert.

2 Material

2.1 Gesunde Stammzellspender

Insgesamt wurde peripheres Blut (in EDTA Röhrchen) von 9 gesunden Stammzellspendern im Alter von 18 bis 72 Jahren zu zwei Zeitpunkten entnommen, die erste Blutentnahme erfolgte dabei bei der Voruntersuchung zur Spende. Die Spender bekamen danach die Anleitung sich über fünf Tage G-CSF subkutan zu injizieren. Am Tag der Spende erfolgte die zweite Blutentnahme.

2.2 Hüftkopfspender

Um die phänotypische und funktionelle Untersuchung an isolierten Knochenmarkszellen durchzuführen, waren humane Hüftköpfe nötig (hier ungepaart zu den Stammzellspendern), die aus dem Auguste-Viktoria-Klinikum geliefert wurden. Dort wurden die Hüftköpfe von Patienten, die eine totale Endoprothese des Hüftgelenkes erhalten haben, entnommen und mit dem Einverständnis der Patienten und vorliegenden Ethikvoten (ek208.13 und EA4/051/12, EA4/069/14) weitergeleitet.

Für die phänotypischen und funktionellen Analysen wurden insgesamt 6 bis 8 Hüftköpfe verwendet. Alle phänotypischen Untersuchungen erfolgten umgehend nach Erhalt der Hüftköpfe. Die Aufarbeitung des Blutes und der Hüftköpfe erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem gentechnischen S1 Labor.

2.3 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Durchflusszytometer LSR II Fortessa	BD Biosciences, New Jersey, USA
Brutschrank Forma Steri-Cycle	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Gefrierschrank Premium NoFrost GN2553	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C UF755G	Dometic Medical Systems, Hosingen, Luxemburg
Kühlschrank	Lec, Prescot, United Kingdom
Kühl-/Gefrierschrank Kombination	Liebherr, Bulle, Schweiz

KGK2833	
Kühl-/Gefrierschrank Kombination	Siemens, Berlin/München, Deutschland
Mikropipetten (0.5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop BX300	Will, Wetzlar, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus® Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Schüttler KM-2 Akku	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Sterilbank HERAsafe® (Klasse II)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Sterilbank LaminAir 2010 1.2 (Klasse II)	Heto-Holten, Allerød, Dänemark
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Vortexer Reax top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad WBT12	Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Zellzählkammer Neubauer	Laboroptik, Lancing, United Kingdom
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Filterspitzen SafeSeal-Tips® (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filterspitzen Biosphere® (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) Falcon®	BD Biosciences, New Jersey, USA
Transferringpipette (3.5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße SafeSeal® (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsieb (100 µm) Falcon®	BD Biosciences, New Jersey, USA

EDTA-Röhrchen Vacutainer® (10 ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Konische Zentrifugenröhrchen Falcon® (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Kulturröhrchen (FACS Tubes) (5ml, Polystyrene)	BD Biosciences, New Jersey, USA
SEALPlate® Filme sterile	Sigma-Aldrich #Z369667
MicroAmp® clear adhesive film	Applied Biosystems, California, USA
MultiScreenHTS-IP Filter Plate	Milipore, Cat.#MSIPS4510
Rundbodenplatte 96-Loch (Polystyrene)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland/BD Biosciences, New Jersey, USA
Flachbodenplatte 96-Loch	Sarstedt, Inc. Newton, NC 28658, USA
Flachbodenplatte 6 Loch	Sarstedt, Inc. Newton, NC 28658, USA
Cryotubes (1.6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präzisionstücher Kimberly Clark® professional	Kimtech Science, Georgia, USA

2.5 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien

Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
PBS (1x) Dulbecco	PAA, New Jersey, USA
IMDM Medium (+L-Glutamin)	PAA, New Jersey, USA
FCS (Hitze inaktiviert)	PAA, New Jersey, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA, New Jersey, USA
Flebogamma, humanes IgG	BioTest, Dreieich, Deutschland
AB Serum (human)	Valley Biomedical, Virginia, USA
BSA (Rinderserumalbumin 30%)	PAA, New Jersey, USA
Cyclosporin A (25 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Dimethylsulfoxid (100 %)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Ampuwa Wasser für Injektionszwecke	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Ethanol, absolut (>96 %)	J.T. Baker, Pennsylvania, USA
Propidiumiodid	Biologend, California, USA

Trypanblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACS Flow	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, New Jersey, USA
Tween	BD Biosciences, New Jersey, USA
AEC Tablette (20mg)	Sigma-Aldrich, A6926
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
3% H ₂ O ₂	AG Volk, 4°C
CpG	- -20°C
SAC	-
PWM	-
β-Mercaptoethanol	-

Tabelle 4: Kits

Compensation Beads, anti-mouse Igκ	BD Biosciences, New Jersey, USA
------------------------------------	---------------------------------

2.6 Puffer und Medien

Tabelle 5: Puffer und Medien

IMDM-Stimulationsmedium	IMDM, 10% FCS, 1% P/S
FACS-Puffer	1xPBS, 2% Flebogamma
Einfriermedium	IMDM, 40% AB Serum, 10% DMSO
PBS++	PBS, 0,05% Tween, 1% BSA
PEB-Puffer	1xPBS/ 2 mM EDTA, 0.5% FCS
Medium (Ag.-Stim.)	RPMI1640/ 5% FCS/1% PenStrep
Annexin-Binding-Puffer	1:10 in H ₂ O verdünnt
eBioscience Fix/Perm Puffer	aus FoxP3 Kit = 1:4 mit Fix/Perm Diluent verdünnen (1+3)
Permeabilisation Puffer	aus FoxP3 Kit, verd. 1:10 in Aqua dest
AEC-Lösung	AEC Tablette (20mg), gelöst in 2ml Dimethylformamid
0.1M Acetatpuffer pH 5.0	0.1M Essigsäure, pH5.0

Stimulationsmedium des B-Zell ELISpots	6ml IMDM/10% FCS/1% P/S + 9,3µl CpG (6µg/ml) + 60µl SAC (zuvor 1:100 mit PBS vorverdünnen) + 6µl PWM (zuvor 100 µl PWM Stock (1 mg/ml) mit 900 µl Medium vorverdünnen) + 6 µl β-Mercaptoethanol (zuvor 3,5 µl β-Me in 1 ml PBS vorverdünnen, entspricht einer Endkonzentration von 50µM
--	---

2.7 Antikörper

Tabelle 6: Fluorochrome-konjugierte Antikörper

Antikörper	Fluorochrome	Verdünnung	Spezies	Hersteller
CD3	Pacific Blue	1:30	Maus	Miltenyi Biotec
CD4	FITC	1:20	Maus	Miltenyi Biotec
CD4	APC-Vio770	1:20	Maus	Miltenyi Biotec
CD8	VioGreen	1:20	Maus	Miltenyi Biotec
CD45RA	PE-Cy5	1:100	Maus	Miltenyi Biotec
CXCR3	PE-Vio770	1:10	Maus	Miltenyi Biotec
CXCR3	APC	1:20	Maus	Miltenyi Biotec
CCR4	PE	1:10	Maus	Miltenyi Biotec
CXCR5	PE	1:10	Maus	Miltenyi Biotec
CCR7	BV711	1:20	Maus	BioLegend
CCR7	BV421	1:20	Maus	BioLegend
CCR6	BV421	1:70	Maus	BioLegend
CCR10	APC	1:20	Maus	Miltenyi Biotec
CD69	FITC	1:20	Maus	Miltenyi Biotec
CD25	BV711	1:50	Maus	BioLegend
CD127	BV605	1:20	Maus	BioLegend
CD19	V500	1:20	Maus	Miltenyi Biotec

CD27	BV650	1:30	Maus	BD Biosciences
IgD	APC-H7	1:50	Maus	BD Biosciences
IgM	APC	1:30	Maus	BioLegend
IgG	PE	1:20	Maus	Miltenyi Biotec
IgA	FITC	1:20	Maus	Miltenyi Biotec
CD38	PE-Vio770	1:20	Maus	Miltenyi Biotec
CD24	PerCP-Cy5.5	1:50	Maus	BioLegend
Ki67	FITC	1:10	Maus	BioLegend
Streptavidin	BV421	1:200	Maus	BioLegend
TNF alpha	APC-Vio770		Maus	Miltenyi Biotec
IFN gamma	BV711		Maus	BioLegend
IL-17	APC		Maus	BioLegend
BFA	Stock: 500 µg/ml → 2 µl 1:10 vorverdünnt/well			
Inside Fix Solution	Inside stain Kit, Miltenyi			
50 µl Perm wash buffer	Inside stain Kit, Miltenyi			

2.8 B-Zell-ELISpot

Tabelle 7: Immunoglobuline und Antigene

	Verdünnung in PBS/PBS++		
Goat-anti-human IgG Fc-Teil	1:1000	Jackson Immuno Research	Cat.# 109-005- 098, 4°C
Goat-anti-human IgA	1:160	Jackson Immuno Research	Cat.# 109-005- 011, 4°C
Tetanus Toxoid 1750-3000 µg/ml	1:150 10µg/ml	Statens Serum Institute	-
Aspergillus Lysat 1mg/ml	1:20 50µg/ml	Miltenyi	-
Candida Lysat	1:50	Greer Labs	-

Influenza Peptid Mix MP1/MP2/NP jeweils 50µg/ml	1:50 jeweils 1µg/ml	Miltenyi	-
Goat Anti-Human IgG (H&L) Antibody Biotin Conjugate, cross- adsorbed, F(ab') ₂	1:540	Life Technologies Thermo Scientific	A24492, -20°C -
Pierce ® Goat-anti-human IgA Biotin	1:500	Thermo Scientific	#FA1-86082, 4°C
Streptavidin-HRP	1:200	Biolegend	#405210
SEB	1-3µg/ml	MyBioSource	Positivkontrolle

2.9 Software

Tabelle 8: Software

GraphPad Prism Version 5.0.0.288	GraphPad Software, California, USA
FACSDiva™ Software Version 6.2	BD Biosciences, New Jersey, USA
Kaluza Analysesoftware	Beckman Coulter Life Sciences
ImmunoCapture™ 6.4	CTL Analyzers, Ohio, USA
ImmunoSpot® 5.1	CTL Analyzers, Ohio, USA
Microsoft Power Point 2013	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microsoft Word 2013	Microsoft Corporation, Washington, USA

3 Methoden

3.1 Isolierung von PBMC und BMMC aus peripherem Blut und Hüftköpfen

Periphere mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC*) und mononukleäre Zellen des Knochenmarks (*bone marrow mononuclear cell, BMMC*) wurden steril aus EDTA-Blut, bzw. aus Hüftköpfen durch eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde vorher mit PBS-verdünntes Vollblut, bzw. verdünnte Knochenmarkszellen auf eine Biocoll-Trennlösung gebracht (Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Die verwendete Biocoll-Trennlösung enthält Polysucrose, ein Polymer mit einem Molekulargewicht von etwa 400 kDa und einer spezifischen Dichte von 1,08 g/ml. Die Dichte der Trennlösung ist größer als die vom Plasma und der mononukleären Zellen, jedoch geringer als die Dichte der toten Zellen, Granulozyten und Erythrozyten, weswegen diese sich am Boden absetzen. Somit kann durch die Zentrifugation eine Trennung der verschiedenen Komponenten im Blut bzw. Knochenmark entlang des Dichtegradienten erfolgen. Das EDTA-Blut wurde zunächst im Verhältnis 1:1 mit 1x PBS gemischt, anschließend vorsichtig auf 15 ml Biocoll-Trennlösung überschichtet, und bei 2000 rpm ohne Bremse für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Die Knochenmarkszellen der Hüftköpfe wurden hierfür zunächst, unter sterilen Bedingungen, mit einem sterilen Metalllöffel isoliert und in 25 ml warmes IMDM-Stimulationsmedium (IMDM, 10% FCS, 1% P/S) überführt und 10 min auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension über einen 100 µl Filter in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und auf 35 ml mit PBS aufgefüllt, welches ebenfalls vorsichtig auf 15 ml Biocoll-Trennlösung überschichtet wurde und identisch zu dem überschichteten Vollblut abzentrifugiert wurde. Die PBMC- bzw. BMMC-Interphase, die sich zwischen Plasma- und Biocollschicht gebildet hatte, wurde vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen und zum Waschen mit 1xPBS in ein neues 50 ml Tube überführt. Die Zentrifugation hierfür erfolgte bei 1300 rpm bei RT für 10 min. Die Waschung der PBMC und BMMC erfolgte zweimal. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in 10ml 1xPBS aufgenommen, wovon anschließend 5 µl mit 5 µl Trypanblau (1:2 verdünnt) versetzt wurden, um die Zellzahl mithilfe einer Zellkammer von Neubauer (0.1 mm/0.0025 mm²) unter dem Lichtmikroskop zu ermitteln. Alle Phänotypisierungen erfolgten stetig im Anschluss hierzu. Für die funktionelle Charakterisierung der B- und T-Zellen wurden die Zellen in Medium aufgenommen, über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, am

nächsten Tag mit den entsprechenden Stimulanzen/Antigenen inkubiert und anschließend für die Durchflusszytometrie gefärbt.

Für spätere Analysen, wie z.B. dem B-Zell-ELISpot, wurden PBMCs und BMMCs kryokonserviert. Die PBMCs und BMMCs wurden in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml mit kaltem Einfriermedium versetzt und in Kryoröhrchen in einem Kryo-Einfriergerät bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können die verschiedenen B- und T-Zell-Populationen des Blutes und des Knochenmarks nach vorhergehender Antikörperfärbung relativ-quantitativ bestimmt werden. Durch ein externes Labor (Labor-Berlin, Charité Vivantes GmbH, Berlin) wurde separat eine Zellzahlbestimmung (Differentialblutbild) durchgeführt, wodurch anschließend die absolut-quantitativen Werte errechnet werden konnten. Die Messungen erfolgten am Fortessa LSR II und die entstandenen Daten wurden anschließend mit dem Computerprogramm Kaluza analysiert und mit der GraphPad Prism Software statistisch untersucht. Es wurde stets darauf geachtet die *Dot-Plot- Gates* der Stammzellspender nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie respektive der *Gates* vor der G-CSF-Mobilisierungstherapie zu setzen unter Berücksichtigung der natürlichen Populationsgrenzen, um eine möglichst präzise Aussage zu Populationsveränderungen vor und nach G-CSF treffen zu können.

Bei der Durchflusszytometrie werden an Zellen gekoppelte Fluorochrom-konjugierte Antikörper durch monochromatisches Licht angeregt, wodurch eine Fluoreszenz messbar wird. Bei der Messung werden die Zellen einzeln durch eine Kapillare gesaugt und gelangen dann in die Durchflusszelle, wo sie durch Laserlicht angeregt werden. Trifft der Laser auf eine Zelle, so streut sie Licht in verschiedene Richtungen. Das Streulicht wird in der Regel an zwei Stellen gemessen. Der Detektor des Vorwärtstreulichtes (engl. *Forward Scatter*, FSC) misst die Beugung des Lichtes im flachen Winkel, woraus sich die Größe der Zelle und das Zellvolumen ergibt. Der Detektor für das Seitwärtstreulicht (engl. *Sideward side scatter*, SSC) misst im rechten Winkel zum Laser, woraus sich die Granularität der Zelle bestimmen lässt. Das Ergebnis sind quantitative Informationen über jede analysierte Zelle. Weitere Laser, Spiegel, Filter und Detektoren und der Einsatz verschiedener Fluorochrome ermöglichen die Messung der Fluoreszenzsignale und die simultane Analyse multipler Zelleigenschaften, die einem

repräsentative Informationen über Zellpopulationen auf sehr schnelle Weise (>1000 Zellen/sec) liefern. Da sich beim Einsatz mehrerer Fluorochrome die Emissionsspektren überschneiden können, muss vor einer Messung eine Kompensation durchgeführt werden. Die Streuung verschiedener Farben in das Spektrum anderer Farben wird dadurch erkannt und korrigiert [110].

3.2.1 Immunfärbungen zur phänotypischen Charakterisierung von T- und B-Zell-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Über verschiedene Färbeprotokolle zur Durchflusszytometrie und über die Expression von Chemokinrezeptoren lassen sich die unterschiedlichen T-Zell-Subpopulation voneinander unterscheiden. Die Abbildung 2 zeigt das erste Färbepanel zur Charakterisierung der T-Helferzellen. Die Fluorochrom-konjugierten Antikörper sind dabei gegen bestimmte Oberflächenproteine, wie hier Chemokinrezeptoren gerichtet, die zur Charakterisierung jeder Zelle beiträgt.

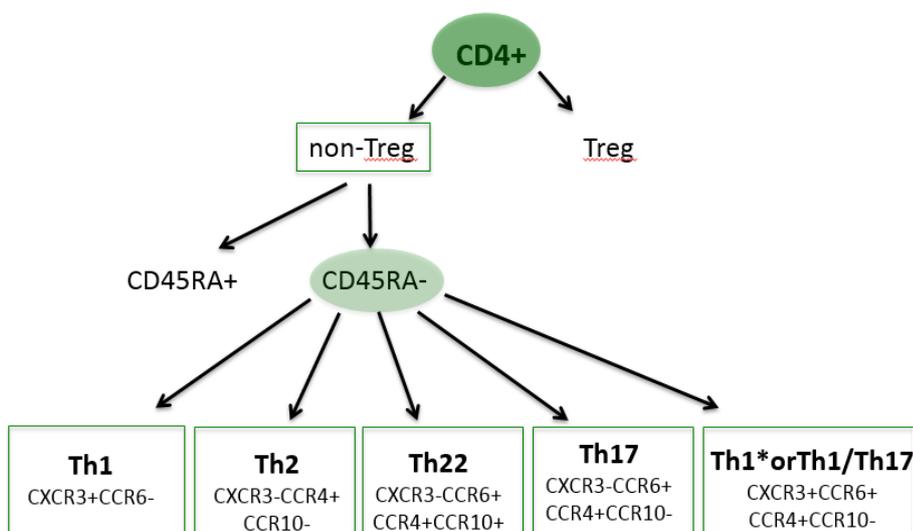


Abbildung 2: Durchflusszytometrische phänotypische Charakterisierung von T-Helferzell-Subpopulationen. Die Abbildung zeigt schematisch die *Gating*-Strategie zur Identifizierung der CD4⁺ T-Helferzellen. Zunächst erfolgt die Trennung in regulatorische T-Zellen (Treg) und nicht regulatorische T-Zellen (non-Treg). Weiter erfolgt die Aufteilung der non-Tregs in naive und Gedächtniszellen. T-Helferzellen sind vorwiegend CD45RA⁻ Gedächtniszellen, sie werden über die dargestellten Chemokinrezeptor-Kombinationen identifiziert.

Die phänotypische Charakterisierung der T-Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut erfolgte jeweils am selben Tag der Blutentnahme bei Stammzellspendern vor und nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie bzw. am selben Tag der BMMC-Aufbereitung aus den gelieferten Hüftköpfen. Hierfür wurden die isolierten PBMCs/BMMCs, $1-2 \times 10^6$ Zellen an der Zahl pro Färbung in 100 μ l FACS-Puffer (1xPBS/2% Flebogamma) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf jeweils ein Loch einer 96-Rundboden-Platte verteilt und 1 Minute bei 1500 rpm abzentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit 50 μ l Antikörpermix pro Loch der entsprechenden Panels für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln. Anschließend wurde die Platte für 1 min abzentrifugiert bei 1500 rpm, mit 100 μ l FACS-Puffer gewaschen und mit 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert, um die Messung am FACS Gerät zu starten. Unmittelbar vor der Messung wurde Propidiumiodid zugegeben, um die toten von den lebenden Zellen zu unterscheiden und um sicherzustellen, dass nur letztere in die Analysen aufgenommen werden. Propidiumiodid wirkt als ein Nukleinsäureinterkalator, welches die perforierte Zellmembran von toten Zellen, allerdings nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen kann. Für die Kompensation am FACS-Gerät wurden ungefärbte Zellen verwendet sowie Beads (BD Biosciences, New Jersey, USA), welche zuvor mit Antikörpern separiert nach Fluorophoren gefärbt wurden. Die *Gating*-Strategie zur Charakterisierung der folliculären T-Helferzellen ist in Abbildung 3 dargestellt.

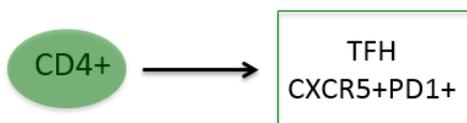


Abbildung 3: Durchflusszytometrische phänotypische Charakterisierung der folliculären T-Helferzellen. Die Abbildung zeigt schematisch die *Gating*-Strategie zur Abgrenzung der CD4⁺ folliculären T-Helferzellen. Zunächst wird auf CD3⁺ Zellen *gated* (hier nicht dargestellt), dann auf CD4⁺ T-Zellen. Folglich werden die beiden Marker CXCR5 und PD-1 einander gegenübergestellt, die folliculären T-Helferzellen sind dabei die doppelpositiven Zellen, CXCR5⁺ PD1⁺.

Bei den B-Gedächtniszellen unterscheiden wir zwischen Isotyp-gewechselten Gedächtnis- (CD27⁺IgD⁻IgM⁻IgG⁺/IgA⁺), Marginalzonen-ähnlichen- (CD27⁺IgD⁺IgM⁺), doppelt negativen

Gedächtniszellen ($CD27^{-}IgD^{-}IgM^{+}/IgG^{+}/IgA^{+}$) und Plasmablasten ($CD27^{++}CD38^{++}$). Hierfür erfolgte die Färbung über das B-Zell-Panel mit den in der Abbildung 4 aufgeführten Antikörpern analog zu der T-Zell-Färbung in Punkt 3.2.1 anfangs erläutert.

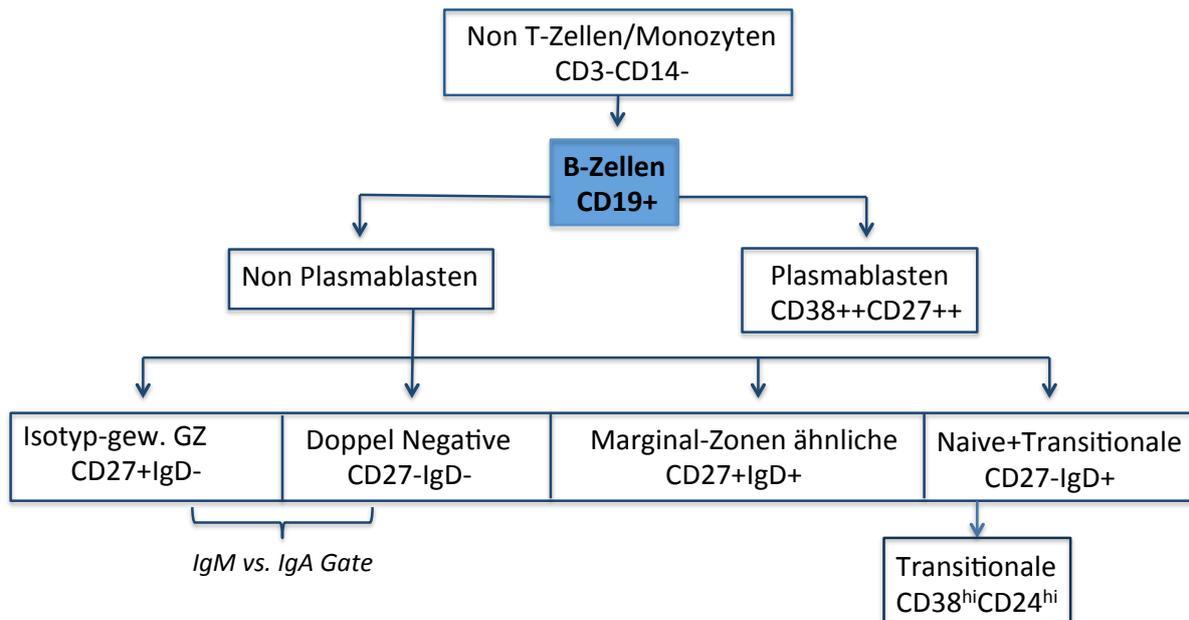


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Charakterisierung von B-Zell-Subpopulationen. Die Abbildung zeigt schematisch die *Gating*-Strategie der B-Zell-Subpopulationen. Zunächst erfolgt die Trennung der Lymphozyten in CD3/CD14 positiv und negativ, so werden T-Zellen und Monozyten aus den Analysen rausgenommen. Weiter wird auf CD19⁺ B-Zellen *gated* und die Plasmablasten werden rausgenommen. Weiter erfolgt die Aufteilung der B-Zell-Subpopulationen mithilfe der Marker CD27 und IgD. Bei den ersten zwei Subpopulationen werden zudem IgM-, IgA- und IgG- (IgA^{-}/IgM^{-}) positive Zellen identifiziert.

3.2.2 In vitro Antigenstimulationen mit anschließenden Immunfärbungen zur funktionellen Charakterisierung von T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Nach der Isolierung von PBMCs und BMBCs wie oben bereits beschrieben, wurden die Zellen aufgeteilt. Als erstes erfolgte die phänotypische Charakterisierung (s. oben), dann die funktionelle Charakterisierung, in Abbildung 5 dargestellt. Für die Antigenstimulation wurden 6×10^6 Zellen rausgenommen. Diese wurden in 700 μ l RPMI1640/5% FCS/1% P/S aufgenommen, davon jeweils 100 μ l in ein Schacht/Loch (*engl. well*) einer flachen 96-Loch Platte. Die Zellen kamen über Nacht in den Brutschrank, am nächsten Tag kamen die Antigene hinzu. Als

Negativkontrolle wurde dem ersten Schacht nichts hinzugefügt, in Schacht 2 bis 6 folgten die Positivkontrolle mit SEB, Tetanus Toxoid, Candida Lysat, Influenza Peptidpool (H1N1 MP1/MP2/NP) und Aspergillus Lysat (für Konzentration s. Methoden). Zusätzlich kamen in Loch 3 bis 6 1µg/ml *CD28 functional pure grade* hinzu, welches die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion stimulieren sollte. Folglich wurden die Zellen für 5h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gelagert. Nach 3h wurde zu allen *wells* 1µg/ml BFA zugegeben (Stock: 500 µg/ml → 2 µl 1:10 vorverdünnt/*well*). Nach 2 h hatten sich die Zellen am Ende der Platte abgesetzt, der Überstand konnte abpipettiert werden. Nach der Zugabe der AK-Mischung für die extrazelluläre Färbung, kam die Platte für zwei min. auf einen Plattenschüttler, dann auf Eis, im Dunkeln für 10 min. Folglich wurden allen *wells* 10 µl Inside Fix Solution (inside stain Kit, Miltenyi) hinzugefügt, nach dem Plattenschüttler kamen sie wieder für 10 min auf Eis im Dunkeln. Es folgte die Zugabe von 50 µl Perm Wash Puffer (Inside Stain Kit, Miltenyi) in allen *wells*, die Platte wurde 5min bei 400 g abzentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Ak-Mixtur zur intrazellulären Färbung wurde hinzugefügt (pro *well* TNFα, IFN γ, IL17). Nach 2 min. auf dem Plattenschüttler und 10 minütiger Inkubation im Dunkeln, auf Eis wurden die Zellen einmal mit PEB gewaschen und in dem gleichen PEB-Puffer in FACS-Röhrchen aufgenommen und gemessen.

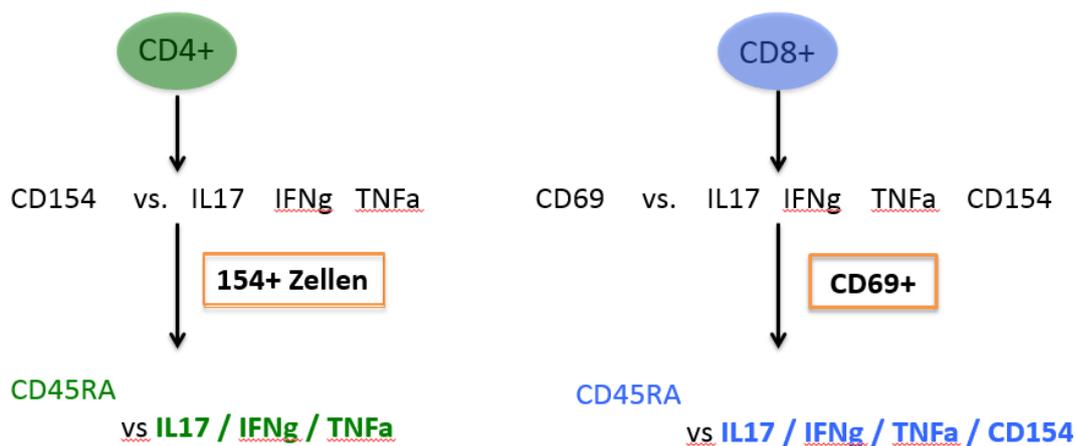


Abbildung 5: Funktionelle Charakterisierung von T-Zellen. Die Abbildung zeigt schematisch die *Gating*-Strategie zur funktionellen Charakterisierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Gedächtniszellen. Bei den CD4⁺ T-Zellen (links) wird auf die CD154⁺ Zellen *gated*, folglich werden die Marker für IL17, IFN γ und TNFα gegen CD45RA dargestellt, um die Verteilung auf den naiven- und Gedächtniszellen zu sehen. Bei CD8⁺ T-Zellen (rechts) wird auf die CD69⁺ Zellen *gated* und es erfolgt ebenfalls die Gegenüberstellung von CD45RA zu IL17, IFNγ, TNFα und CD154.

3.3 B-Zell-ELISpot Assay

Ein B-Zell-ELISpot-Assay (Enzyme-linked-Immuno-Spot-Assay) wurde zur Quantifizierung Antikörper-sezernierender B-Zellen durchgeführt. Das Verfahren ist sehr sensitiv, um die Zellaktivierung und das dadurch bedingte Sekretionsverhalten auf Einzelzellniveau *in vitro* zu messen. Dabei können Sekretionsprodukte fixiert und detektiert werden. Die selektive Bindung der sezernierten Proteine erfolgt auf einer Polyvinylidenfluorid-Membran einer ELISpot-Platte mit immobilisierten Antikörpern (engl. coating antibody) oder mit bestimmten Antigenen. Nachdem die Mikrotiterplatte mit den stimulierten/sezernierenden Zellen versehen wurde, konnte die Fixierung der Sekretionsprodukte erfolgen, entweder über die Bindung des Antigens durch spezifische Antikörper oder des immobilisierten Erstantiköpers an das Sekretionsprodukt. Nach einer Inkubationszeit wurden die Zellen durch mehrere Waschschrte von der Platte entfernt. Die Detektion erfolgte dann über die selektive Bindung eines sekundären Antikörpers, meistens biotinyliert, gegen ein anderes Epitop des zu untersuchenden Zytokins, gefolgt von der Bindung eines Streptavidins. Über eine an Streptavidin-Biotin-Komplex spezifisch gebundene Peroxidase ergab sich über ein Farbumschlag eine visuelle Detektion der Sekretionsstellen.

Für diese Arbeit wurde die Zahl der ASZ für IgG und IgA ermittelt, sowie die Produktion spezifischer Antikörper gegen Aspergillus Lysat (AL), Influenza Peptid Mix (MP1/MP2/N2), Tetanus Toxoid (TT), Candida Lysat (CL). Die Zahl der ASZ wurde dann auf die B-Zellen insgesamt hochgerechnet.

3.3.1 In vitro B-Zell-Stimulation

Sowohl eingefrorene PBMCs der Stammzellspender, jeweils vor und nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie, als auch zuvor eingefrorene BMBCs der Hüftkopfspenden wurden für den ELISpot aufgetaut. Der Auftauvorgang sollte hierbei zügig erfolgen, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO für die Zellen giftig sein kann. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. 6×10^6 Zellen wurden in 6ml Stimulationsmedium (s. Materialien) aufgenommen und in einer 6-well Platte, mit pro well 3 ml Medium verteilt. Die Platte wurde mit Plastikfolie umwickelt und über 7 Tage im Brutschrank aufbewahrt.

3.3.2 Beschichtung der Platten

Nachdem das Auftauen der Zellen an Tag 0 stattgefunden hat, wurde an Tag 6 die ELISpot Platte *gecoated* bzw. mit den Primärantikörpern, Anti-Human IgG Fc-Teil, Anti-Human IgA und den Antigenen (s.oben) beschichtet (s. Materialien 2.8). Zwei *wells* wurden für die Negativkontrolle mit reinem PBS belegt, das weitere Vorgehen blieb identisch zu den anderen *wells*. Insgesamt wurde 75µl der Antikörper/ Antigen Lösung pro Loch auf die ELISpot Platte, wie in Abbildung 6 ersichtlich, verteilt und über Nacht in Alufolie im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

AL → (IgG)	-	AL → (IgA)	PBS → (IgA)
Influ. → (IgG)	-	Influ. → (IgA)	PBS → (IgG)
1:80 IgA	1:160 IgA	1:320 IgA	TT → (IgA)
1:80 IgA	1:160 IgA	1:320 IgA	CL → (IgA)
1:160 IgG	1:320 IgG	1:640 IgG	TT → (IgG)
1:160 IgG	1:320 IgG	1:640 IgG	CL → (IgG)

Abbildung 6: B-Zell-ELISpot Platte zur funktionellen Charakterisierung der B-Zell-Subpopulation. Die Abbildung zeigt schematisch eine ELISpot-Platte zur Quantifizierung Antikörper-sezernierender B-Zellen. Im grauen Feld ist die antigenspezifische (AL: Aspergillus Lysat, Infl.: Influenza Peptide, TT: Tetanus Toxoid, CL: Candida Lysat) Produktion von Immunoglobulinen (in Klammern) angegeben. Die Antigen-unspezifische IgA-, IgG-Produktion ist im orangenen Feld dargestellt (2-fache Messung). Die abnehmende Farbstärke steht für die zunehmende Verdünnung der Zellen. IgA: erste Spalte (1:80 = 12500 Zellen); zweite Spalte (1:16 = 6250 Zellen); dritte Spalte (1:32 = 3125 Zellen). IgG: erste Spalte (1:160 = 6250 Zellen); zweite Spalte (1:320 = 3125 Zellen); dritte Spalte (1:640 = 1562 Zellen).

Am Folgetag wurde die ELISpot Platte dreimal mit 200µl sterilem PBS gewaschen. Jedes *well* wurde für 30 Minuten im Brutschrank mit 200 µl RPMI/10% FCS/1% P/S blockiert, um den Anteil unspezifischer Bindungen zu verringern. Die über sieben Tage stimulierten Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert und in RPMI/10%FCS/1% P/S resuspendiert (1×10^6 Zellen/100µl).

Die antigenunspezifischen *wells* wurden über eine dreistufige Verdünnungsreihe mit einer definierten Zellzahl beschichtet (s. Abb.6). Die verbleibenden Zellen wurden auf die 10 Antigen/PBS-*gecoateten wells* gleichmäßig verteilt, 100 µl pro *well*. Die beschichtete Platte wurde nun 3h im Brutschrank aufbewahrt. Anschließend wurde die Platte in sechs Waschrufen mit 200 µl PBS⁺⁺ (s. Materialien) pro Loch gründlich gewaschen, um Zellen und ungebundene Sekretionsprodukte zu entfernen, um dann die Bindung der sekundären Antikörper (IgA, IgG Biotin) im nächsten Schritt nicht zu verhindern. Die sekundären Antikörper wurden auf die Platte verteilt (s.Abb.6, s. für die Ag.-Spez. Produktion in Klammern), 100 µl pro Loch,

respektive der jeweiligen Verdünnung wurden sie in PBS⁺⁺ angesetzt (durch ein 0,2µm Whatman-Spritzenfilter wurden sie vorher steril filtriert). Die Platte wurde mit Alufolie umwickelt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

3.3.3 Entwicklung der Spots

Am nächsten Tag wurde die Platte sechs Mal mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit 100 µl Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin (2.5 µg/ml in PBS⁺⁺ verdünnt und ebenfalls steril filtriert) pro *well* benetzt und 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach 3 Waschschrritten mit PBS ohne Zusätze, kam zur Entwicklung 100µl der folgenden Lösung pro Loch hinzu: Acetatpuffer, 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC 1:30 verdünnt), ebenfalls steril filtriert durch einen 0,2 µm Whatman-Spritzenfilter, dann kam 3 prozentiges H₂O₂ (1:100) dazu. Die über den Streptavidin-Biotin-Komplex spezifisch gebundene Peroxidase ermöglicht innerhalb von 3 bis 5 min. im Dunkeln eine Einfärbung der Membran und einzelne Punkte/Spots werden sichtbar. Zum Unterbrechen der Reaktion wurde die Lösung ausgekippt, die Plastikbeschichtung der Platte wurde abgezogen und mit fließendem Wasser mehrfach abgespült. Die Platte wurde an die Luft zum Trocknen gelegt und anschließend am ELISpot Reader ImmunoSpot® mithilfe der ImmunoSpot® 5.1 und ImmunoCapture™ 6.4 Software eingelesen. Die zuvor ebenfalls durchgeführten FACS-Analysen der verwendeten Zellen ermöglichten die Berechnung in Spots/10⁶ B-Zellen.

3.3.4 Proliferations-Assay

Mit dem Proliferations-Assay sollte anhand des Markers Ki-67 untersucht werden, ob die B-Zellen der Stammzellspender vor und nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie einen Unterschied in ihrer Proliferationsrate aufzeigten. Und wie auch bei den bereits geschilderten phänotypischen und funktionellen Charakterisierungen, wurden die BMNCs der Hüftkopfspender ebenfalls daraufhin analysiert. Hierfür wurden sowohl an Tag 0 unstimuliert, als auch an Tag 7 der Stimulation für den ELISpot jeweils insgesamt 3x10⁶ PBMCs und BMNCs für diesen Assay verwendet. Für die Proliferationsraten der PBMCs ergibt sich ein Stichprobenumfang von n=4, bei BMNCs n=3. Für das Färben der B-Zellen wurde wie in Punkt 3.2.1 beschrieben, vorgegangen, die Färbungen wurden in einer 96-*well* Rundbodenplatte vorgenommen, außer bei der Ki67 Färbung, hier erfolgen sie in Reagiergefäßen (1,5-2ml), denn es handelte sich dabei um eine intrazelluläre Färbung. Hier erfolgte nach der extrazellulären Färbung die Waschung mit 1 ml PBS + 2% Flebogamma, und Abzentrifugation bei 3600 rpm und 4°C für 2 min. Im nächsten

Schritt wurden sie mit 1 ml eBioscience Fix/Perm Puffer (aus FoxP3 Kit = 1:4 mit Fix/Perm Diluent verdünnt (1+3)) resuspendiert und 45 min auf Eis, im Dunklen inkubiert. Es folgte die zweite Waschung, identisch zur ersten. Nach der Abzentrifugation erfolgte die zweimalige Waschung mit 1 ml 1xPermeabilisation Puffer (aus FoxP3 Kit, 1:10 in Aqua dest. verd.). Folglich wurden die Zellen in 100µl 1x Permeabilisation Puffer (1:10 in Aqua dest. verd.) resuspendiert, 10µl Ki67 wurde hinzugegeben und 30 min auf Eis im Dunklen inkubiert. Nach zwei weiteren Waschungen mit dem Permeabilisationspuffer wurden die Zellen in 100µl PBS+2% Flebogamma resuspendiert, in FACS Röhrchen überführt und am FACS-Gerät gemessen.

3.4 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 5.00.288). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ gilt als statistisch schwach signifikant (*), $p \leq 0,01$ als signifikant (**) und $p \leq 0,001$ (***) als stark signifikant.

Statistische Signifikanzen wurden mit dem T-Test, für gepaarte Proben mit dem *Wilcoxon matched pairs signed rank Test* und für die ungepaarten Proben mit einem *Mann-Whitney-U-Test* untersucht. Die Daten wurden einzeln, als Median oder als Mittelwert plus/minus dem Standardfehler angegeben. Die graphische Darstellung erfolgte durch Balkendiagramme und Punkt-Diagramme, die in GraphPad Prism generiert wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Phänotypische Charakterisierung von Lymphozyten

4.1.1 Differentialblutbild

Sowohl im Rahmen der Voruntersuchung der Stammzellspender, als auch zum Zeitpunkt ihrer Spende, wurde ein Differentialblutbild des peripheren Bluts erstellt, anhand dessen die Berechnung absoluter Zellzahlen erfolgte. Die Zellzahl der Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile) wurde bestimmt. In Abbildung 7 sind die durch Prism generierten Box-Plots und Balkendiagramme zur Darstellung der verschiedenen Leukozytenpopulationen, sowohl prozentual, als auch in absolute Zellzahlen (Zellen/ μl) vor und nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie dargestellt. Die Daten werden hier als Mittelwert plus/ minus Standardfehler angegeben.

Bei den Stammzellspendern führte die G-CSF Vorbehandlung, neben einer Stammzellmobilisierung, zu einem knappen 8-fachen Anstieg der Leukozytenzahl im peripheren Blut. Die Leukozytenzahl betrug im Mittel \pm Standardfehler vor G-CSF 5659 ± 563 Zellen/ μl . Danach waren es 39226 ± 2586 Zellen/ μl . Die absolute Lymphozytenzahl betrug im Mittel 1649 ± 153 Zellen/ μl vor G-CSF und 3578 ± 289 Zellen/ μl danach. Hier kam es zu einer zweifachen Erhöhung. Nach der Mobilisierung ergab sich ein prozentualer Anstieg der Granulozyten. Diese machten vor der G-CSF-Mobilisierung $61,21 \pm 1,232\%$ der Leukozyten aus, nach der Mobilisierung machten sie $81,75 \pm 0,971\%$ der Population aus.

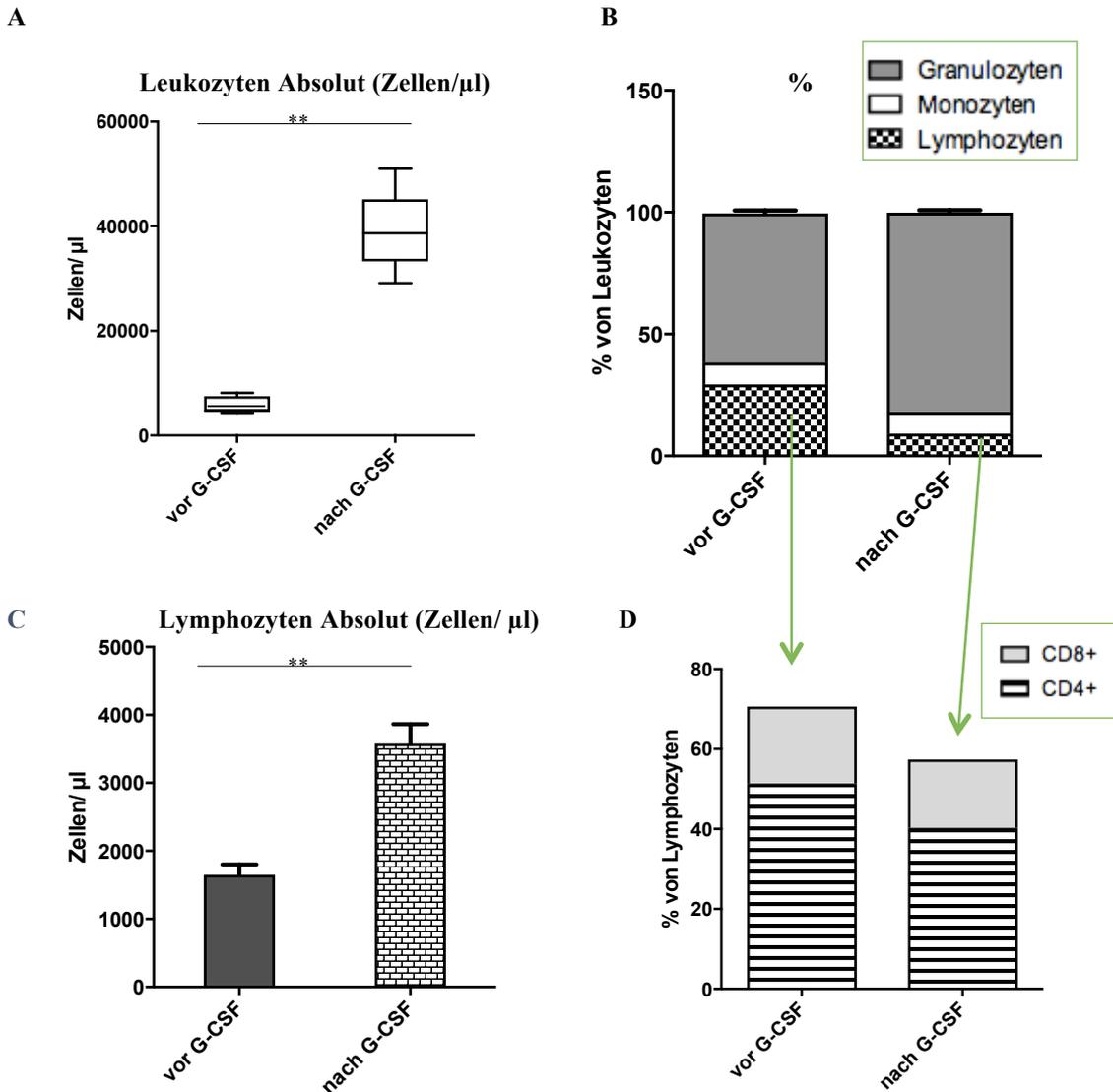


Abbildung 7: Absolute und prozentuale Zellzahlen innerhalb der Leukozytenpopulation bei Stammzellspendern vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie. Die Abbildung zeigt A) die absoluten Leukozytenzahlen in Zellen/ μ l), B) die Balkendiagramme zur Aufteilung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten und ihren jeweiligen prozentualen Anteil an der Gesamtleukozytenpopulation, C) die Balkendiagramme der absoluten Lymphozytenzahl in Zellen/ μ l und D) die Balkendiagramme zur prozentualen Verteilung der CD8⁺ u. CD4⁺ T-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation. n=8

Der Monozytenanteil blieb weitgehend konstant. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten sank um 20% mit $29,4 \pm 1,23\%$ vor und $9,208 \pm 0,643\%$ nach G-CSF-Mobilisierungstherapie. Beim Betrachten der absoluten Lymphozytenzahl hingegen sahen wir eine knapp zweifache Erhöhung nach G-CSF. Das Verhältnis von CD8⁺ zu CD4⁺ blieb hierbei nahezu unverändert.

4.1.2 T-Zell-Subpopulationen

Die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen wurden über die vorgestellten Färbe-Panels identifiziert. Die Abbildung 8 zeigt über beispielhafte *Dot-Plots* die *Gating*-Strategie der T-Helferzell-Subpopulationen an PBMCs.

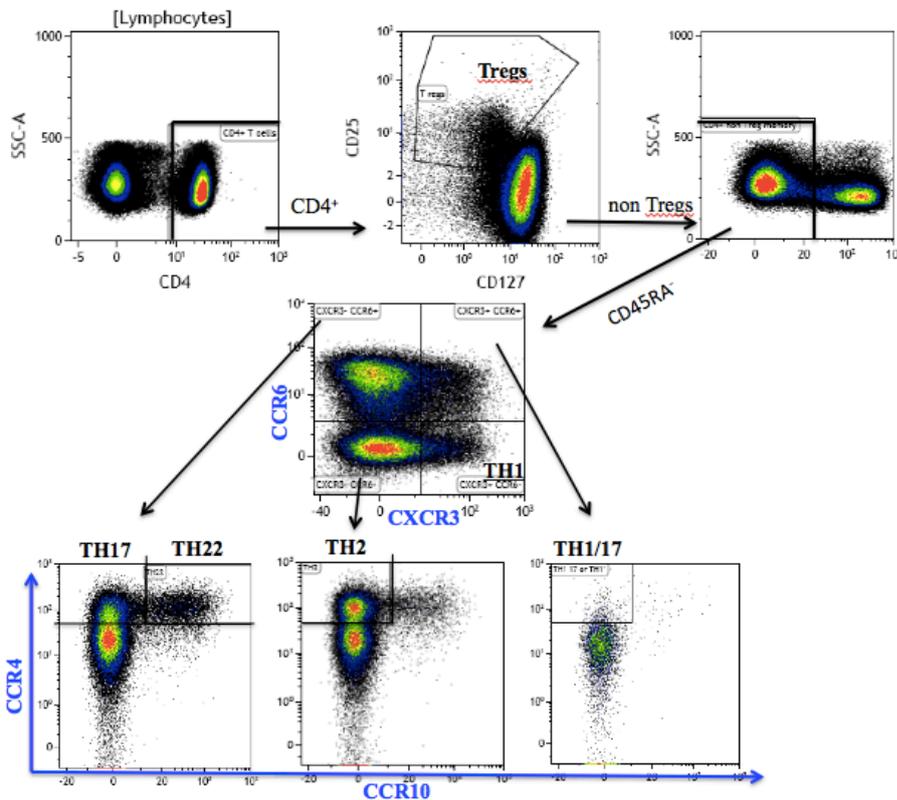


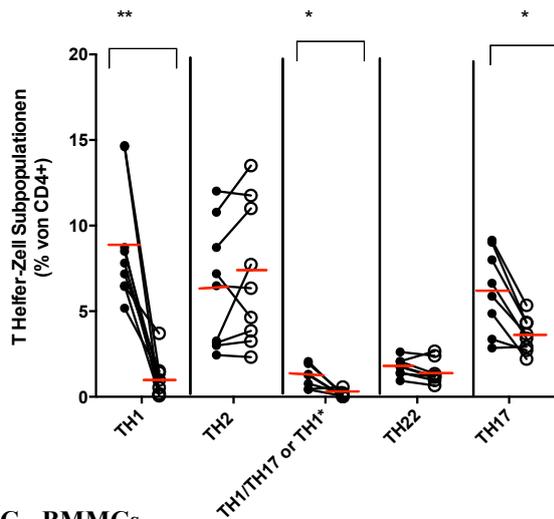
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Helferzell-Subpopulationen. Die Abbildung zeigt über beispielhafte Färbungen und *Dot-Plots* der PBMCs die *Gating*-Strategie zur Abgrenzung der non-Treg CD4⁺ T-Gedächtniszellen und der darin abgrenzbaren Subpopulationen. Beim *Gating* der BMMCs wurde analog vorgegangen.

Die Abbildung 9 fasst die Ergebnisse der T-Helferzell-Subpopulationen TH1, TH2, TH22, TH17 und TH1/17 zusammen, dabei wird ihr prozentueller Anteil an den CD4⁺ T-Zellen wiedergegeben und ihre absoluten Zellzahlen pro μl bei den PBMCs dargestellt.

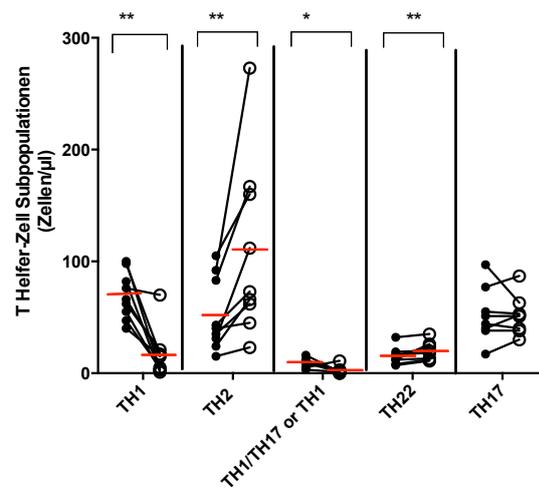
Signifikant war die Senkung der TH1-Zellen, sowohl prozentual, als auch absolut, mit $8,846 \pm 1,155\%$ von $CD4^+$ T-Zellen vor und $1,11 \pm 0,38\%$ von $CD4^+$ T-Zellen nach der G-CSF-Mobilisierung ($p < 0,01$). Absolut waren es 70 ± 7 Zellen/ μ l vor und 17 ± 7 Zellen/ μ l nach G-CSF ($p < 0,01$). In Abbildung 10 sind die beispielhaften *Dot-Plots* der TH1-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender und in BMNCs dargestellt. Dabei zeigt sich, dass sie in BMNCs, sowie in PBMCs nach G-CSF-Mobilisierungstherapie kaum vorhanden waren. Ähnlich verhielt es sich mit den TH1/17 or TH1* Zellen (vor G-CSF: $1,191 \pm 0,218\%$; nach G-CSF: $0,154 \pm 0,065\%$; $p < 0,05$), absolut waren es vor G-CSF 10 ± 1 und danach 2 ± 1 Zellen/ μ l ($p < 0,05$).

Prozentual betrachtet waren die TH17-Zellen (vor G-CSF: $6,22 \pm 0,86\%$; nach G-CSF: $3,62 \pm 0,36\%$; $p < 0,05$) ebenfalls signifikant erniedrigt. Absolut waren neben den TH1- und TH1/17-Zellen auch die TH2- und TH22-Zellen signifikant verändert. Diese waren nach der G-CSF-Mobilisierung signifikant gestiegen, TH2-Zellen (vor G-CSF: 52 ± 11 Zellen/ μ l; nach G-CSF: 109 ± 26 Zellen/ μ l; $p < 0,01$), TH22-Zellen (vor G-CSF: 15 ± 3 ; nach G-CSF: 20 ± 3 Zellen/ μ l; $p < 0,01$). Insgesamt gab es zwischen dem peripheren Blut und dem ungepaarten Knochenmark ebenfalls signifikante Unterschiede. Bei den BMNCs waren mit $0,34 \pm 0,14\%$ von $CD4^+$ T-Zellen kaum TH1-Zellen zu identifizieren, diese waren um ein fast 30-faches weniger als in PBMCs vor G-CSF vorhanden ($P < 0,001$). Ähnlich verhielt es sich mit den TH1/17- ($0,06 \pm 0,03\%$), TH22-Zellen ($0,24 \pm 0,06\%$), TH17-Zellen ($2,82 \pm 0,8\%$), diese waren im Vergleich zum peripheren Blut vor der Mobilisierung der Stammzellen erniedrigt mit $P < 0,001$, $P < 0,001$ und $P < 0,05$ respektive. Die TH2-Zellen machten mit $6,725 \pm 0,912\%$ den größten Anteil der $CD4^+$ T-Zellen im Knochenmark aus.

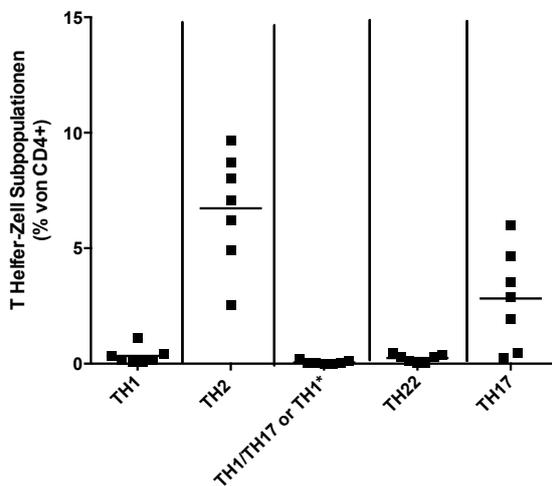
A - PBMCs



B - PBMCs



C - BMBCs



vor G-CSF
 nach G-CSF

Abbildung 9: Anteil der T-Helferzell-Subpopulationen an den CD4⁺ T-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender und bei Knochenmarksspendern. Es wurden gepaarte Proben von Stammzellspendern vor und nach G-CSF und ungepaarte Knochenmarkssproben durchflusszytometrisch untersucht. Die Werte der gepaarten Proben werden durch eine Linie miteinander verbunden. Die Abbildung zeigt A) den prozentualen Anteil an CD4⁺ T-Zellen, PBMCs, n=8 (n=9 bei TH2, TH1), B) die absoluten Zellzahlen/µl, C) den prozentualen Anteil der Subpopulationen an den CD4⁺ T-Zellen innerhalb der BMBCs, n=7. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test (gepaarte Proben) und dem Mann-Whitney-U-Test (ungepaarte Knochenmarksspendern) berechnet *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01. Die waagerechten Linien in A,B (rot), C stellen den Mittelwert der jeweiligen Gruppen dar.

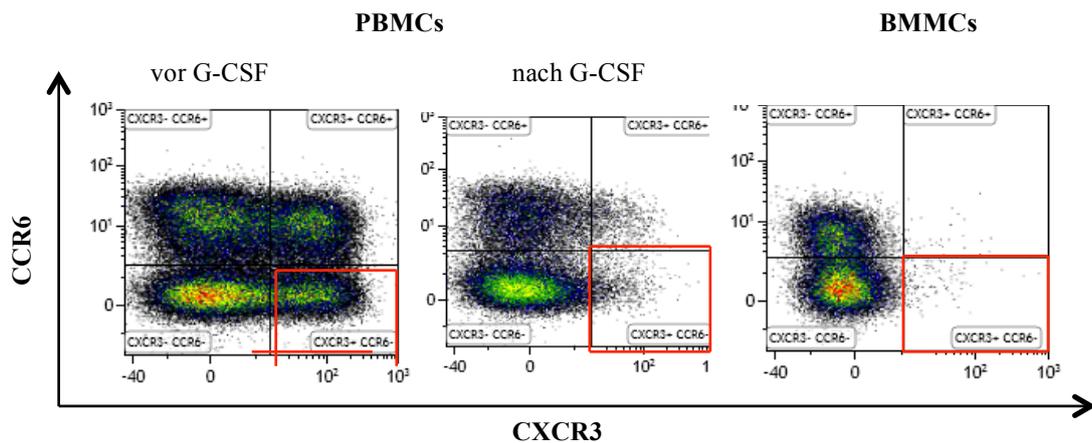


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Charakterisierung von TH1-Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentative *Dot-Plots* zu TH1-Zellen vor und nach G-CSF in PBMCs von Stammzellspendern und in BMMCs von Hüftkopfspendern. Dabei fällt auf, dass in PBMCs nach G-CSF weniger TH1-Zellen vorhanden sind, die in BMMCs wiederum fast komplett fehlen.

Die regulatorischen T-Zellen, welche separat betrachtet wurden, sind in Abbildung 11 dargestellt. Sie unterscheiden sich vor und nach G-CSF sowohl prozentual von den CD4⁺ T-Zellen, als auch absolut und zu den BMMCs nicht signifikant.

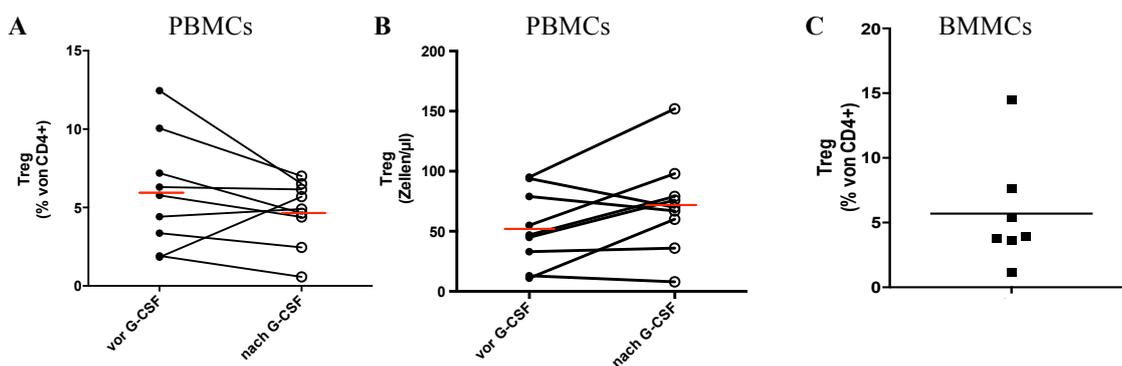


Abbildung 11: Anteil der regulatorischen T-Zellen (Tregs) an CD4⁺ T-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender und bei Knochenmarkspendern. Die Abbildung zeigt A) den prozentualen Anteil an der CD4⁺ T-Zellpopulation, PBMCs, n=9, B) die absolute Treg-Zellzahl pro µl, PBMCs und C) den prozentualen Anteil an der CD4⁺ T-Zellpopulation innerhalb der BMMCs, n=7. Es werden die Mittelwerte ± SEM dargestellt (in A und B in rot). Der Mittelwert regulatorischer T-Zellen beträgt vor G-CSF Applikation $5,92 \pm 1,2\%$, nach G-CSF $4,7 \pm 0,69\%$. Absolut waren das 52 ± 11 Zellen vor G-CSF und 72 ± 13 Zellen nach G-CSF. Der Mittelwert mit Standardfehler lag bei den BMMCs bei $5,698 \pm 1,638\%$ von CD4⁺ T-Zellen.

Eine weitere Gruppe zur phänotypischen Charakterisierung von T-Zellen waren die folliculären T-Helferzellen (*T-follicular helper cells*, TFH). Diese waren bei Stammzellspendern nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie signifikant erniedrigt, prozentual mit $1,68 \pm 0,25\%$ vor und $0,56 \pm 0,09\%$ der $CD4^+$ T-Zellen nach G-CSF ($p < 0,01$) und absolut 16 ± 2 Zellen/ μl vor und 9 ± 2 Zellen/ μl nach G-CSF ($p < 0,05$). In Knochenmarkszellen machten die TFH-Zellen $1,32 \pm 0,34\%$ der $CD4^+$ T-Zellen aus, s. Abbildung 12.

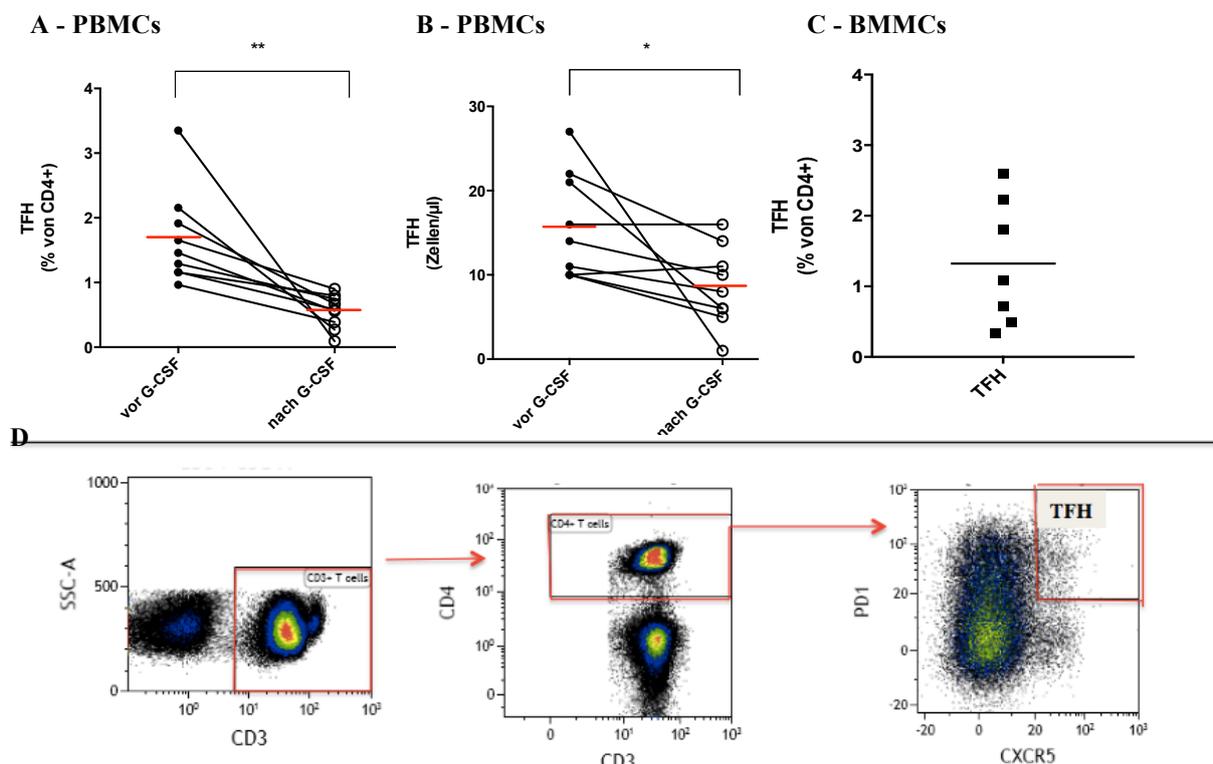


Abbildung 12: Anteil der folliculären T-Helferzellen an den $CD4^+$ T-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie bei Stammzellspendern und bei Knochenmarksspendern. Die Abbildung zeigt A) den prozentualen Anteil der folliculären T-Helferzellen an den $CD4^+$ T-Zellen, PBMCs, n=9, B) die absoluten Zellzahlen/ μl in PBMCs, C) den prozentualen Anteil an den $CD4^+$ T-Zellen innerhalb der BMMCs und D) beispielhafte *Dot-Plots* zur Darstellung der *Gating*-Strategie (s. rote Kästen und Pfeile). Die waagerechten Linien in A, B (rot), C stellen den Mittelwert der jeweiligen Gruppen dar. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$.

4.1.3 B-Zell-Subpopulationen

Um zu erfahren welche B-Zell-Subpopulation möglicherweise durch G-CSF mobilisiert werden, wurden respektive des Vorganges bei den T-Zellen, PBMCs von gesunden Stammzellspendern

vor und nach G-CSF-Mobilisierung und ungepaarte BMMCs durchflusszytometrisch untersucht und in folgende B-Zell-Subpopulationen aufgeteilt: Naive, Transitionale, Doppelt-negative, Isotyp-gewechselte und Plasmablasten. Für die beispielhafte Darstellung der *Gating*-Strategie über *Dot-Plots* siehe Abbildung 13. Die Ergebnisse der Plasmablasten und Gesamt-B-Zellzahlen werden in Abbildung 14 zusammengefasst. Signifikant war die Erhöhung der Zellzahl der B-Zellen mit 194 ± 50 Zellen/ μl vor und 375 ± 93 Zellen/ μl nach G-CSF ($p < 0,05$). Prozentual gab es keine signifikanten Unterschiede. Bei den Plasmablasten gab es absolut gesehen keine signifikanten Unterschiede, prozentual waren sie nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie leicht erniedrigt mit $0,26 \pm 0,07\%$ vor und $0,14 \pm 0,03\%$ der Lymphozyten nach G-CSF, jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). In BMMCs machten die B-Zellen im Mittel $20,79 \pm 5,46\%$ der Lymphozyten aus und die Plasmablasten $0,31 \pm 0,04\%$ der Lymphozyten.

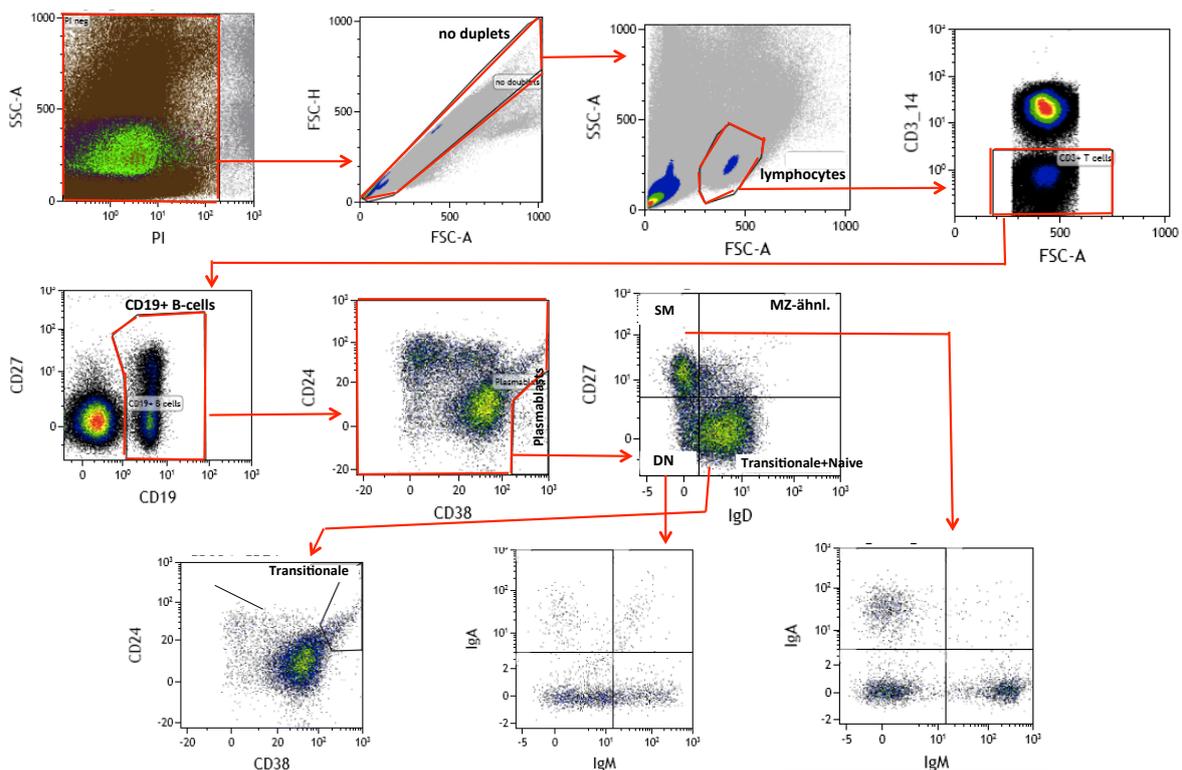


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Charakterisierung der B-Zell-Subpopulationen. Die Abbildung zeigt beispielhafte *Dot-Plots* zur Darstellung der *Gating*-Strategie der B-Zellen. Die toten Zellen (PI^+) werden stets aus den Analysen ausgeschlossen, so auch die Dupletten, es folgt ein Lymphozyten *Gate*, folglich werden die $\text{CD}3$ und $\text{CD}14$ positiven Zellen rausgenommen und es wird auf $\text{CD}19^+$ B-Zellen *gated*. Anhand der Marker $\text{CD}24$ und $\text{CD}38$ werden die Plasmablasten bestimmt und bei den weiteren *Gates* zur Darstellung der Subpopulationen ausgeschlossen. Anhand der Marker $\text{CD}27$ und IgD werden folgende Subpopulation unterschieden: $\text{CD}27^- \text{IgD}^+ \text{CD}38^+ \text{CD}24^{+/-}$ Naive, $\text{CD}27^- \text{IgD}^+ \text{CD}38^{\text{hi}} \text{CD}24^{\text{hi}}$ Transitionale, $\text{CD}27^+ \text{IgD}^-$ Isotyp-gewechselte Gedächtniszellen (Switched Memory, SM), $\text{CD}27^+ \text{IgD}^+$ Marginal-Zonen-ähnliche (MZ-ähnliche) und $\text{CD}27^- \text{IgD}^-$ Doppelt negative Gedächtniszellen (DN).

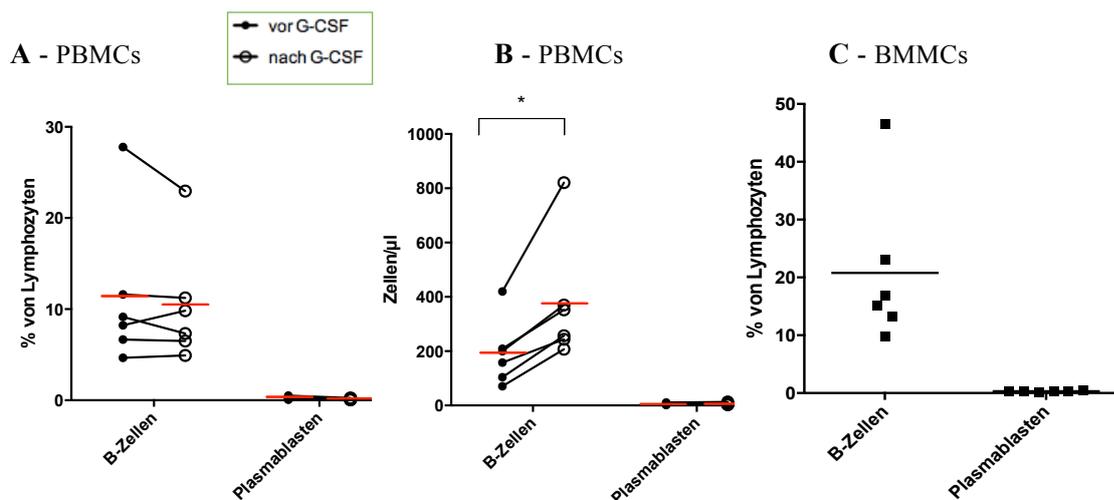


Abbildung 14: Anteil der B-Zellen und Plasmablasten an Lymphozyten vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender und bei Knochenmarksspendern. Die Abbildung zeigt A) den prozentualen Anteil der Subpopulationen an Lymphozyten, PBMCs, B) die absolute Zellzahl/ μl der Populationen, PBMCs und C) den prozentualen Anteil an Lymphozyten innerhalb der BMMCs. Die waagerechten Linien in A, B (rot), C stellen den Mittelwert der jeweiligen Gruppen dar. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet, $*p < 0,05$, $n = 6$.

Prozentual gab es bei den B-Zell-Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede vor und nach G-CSF, s. Abbildung 15. Die DN B-Zellen zeigten prozentual nur einen geringfügigen Anstieg mit $9,25 \pm 1,54\%$ vor und $13,67 \pm 2,61\%$ der B-Zellen nach G-CSF ($p > 0,05$). Signifikant stiegen dafür die Zellzahlen der naiven B-Zellen (vor: 71 ± 13 Zellen/ μl , nach G-CSF: 142 ± 19 Zellen/ μl ; $p < 0,05$), der SM (vor: 37 ± 10 Zellen/ μl , nach: 61 ± 12 Zellen/ μl ; $p < 0,05$) und der DN B-Zellen (vor: 15 ± 3 Zellen/ μl , nach: 39 ± 6 Zellen/ μl ; $p < 0,05$).

Bei den BMMCs kamen im Mittel die DN B-Zellen mit $47,61 \pm 8,19\%$ der B-Zellen am meisten vor. Das Vorkommen der anderen Subpopulationen mit den Mittelwerten können der Abbildung 15 (C) entnommen werden.

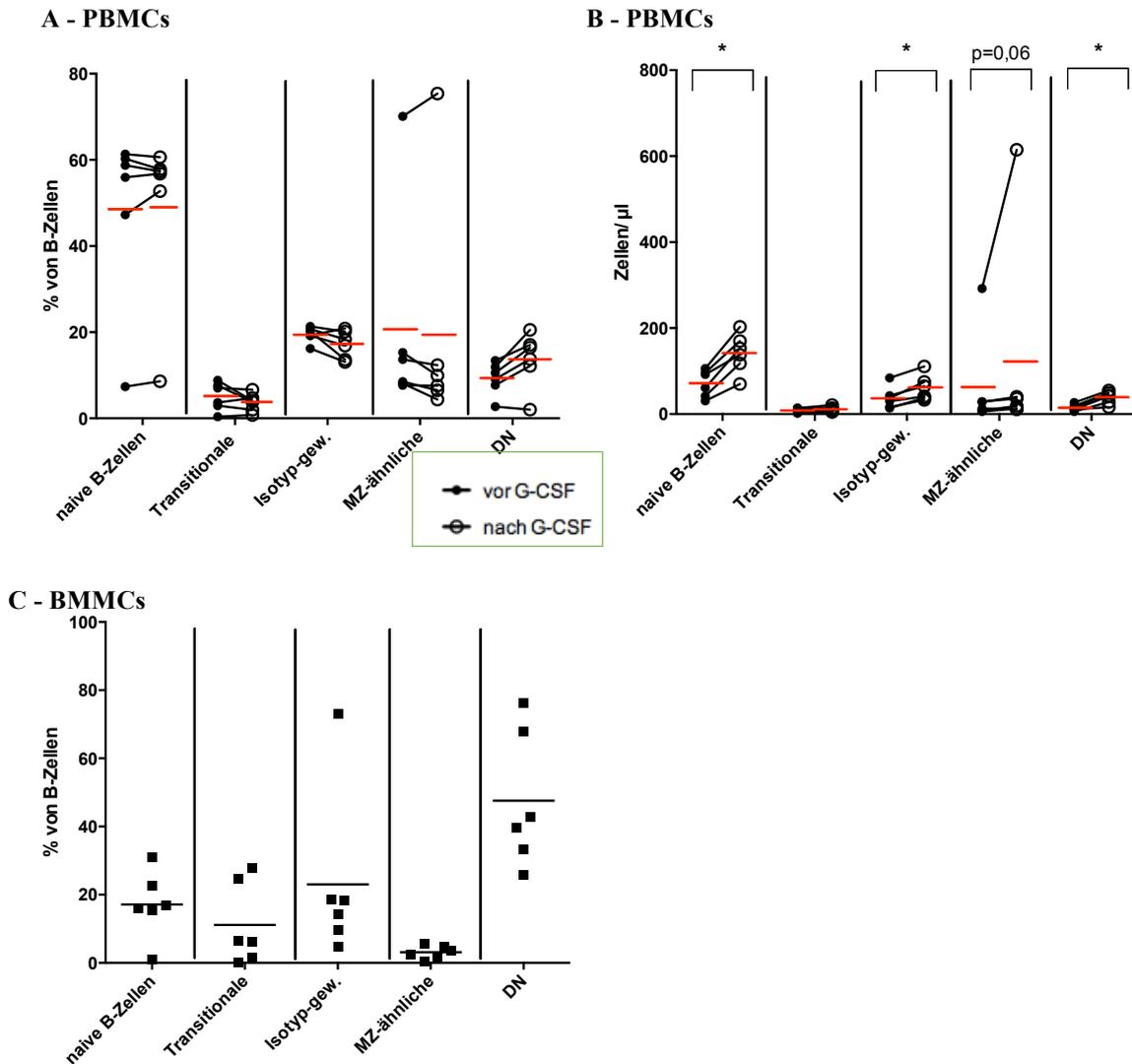
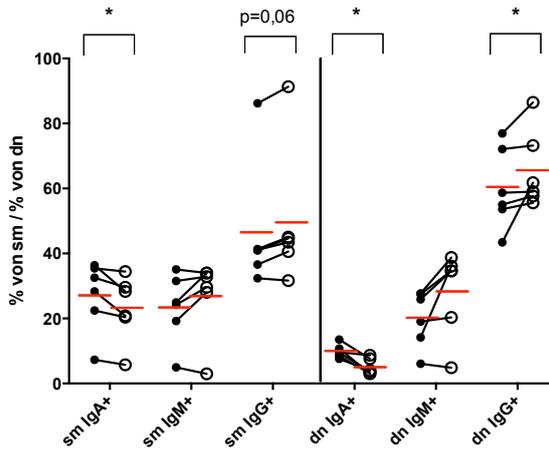


Abbildung 15: Anteil der B-Zell-Subpopulationen an den B-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender und bei Knochenmarkspendern. Aus CD19⁺ B-Zellen wurden die hier aufgeführten Subpopulationen von Stammzellspendern zu zwei Zeitpunkten, vor und nach der G-CSF-Mobilisierung und von ungepaarten Knochenmarkszellen, BMMCs bestimmt. Die Abbildung zeigt A) den prozentualen Anteil an den CD19⁺ B-Zellen, PBMCs, B) die absoluten Zellzahlen/μl, PBMCs und C) den prozentualen Anteil an CD19⁺ B-Zellen innerhalb der BMMCs. Die waagerechten Linien in A, B (rot), C stellen den Mittelwert der jeweiligen Gruppen dar. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet, *p<0,05, n=6.

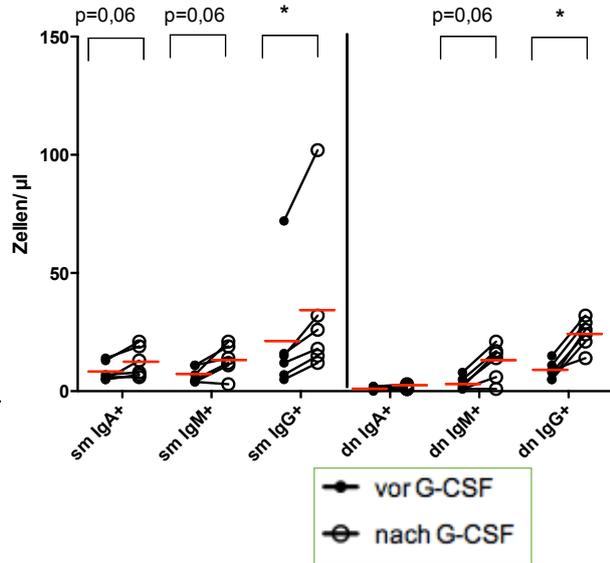
SM und DN B-Zellen sind in Abbildung 16 dargestellt. Sie exprimierten in PBMCs vor allem IgG. SM IgG⁺ erfuhren eine tendenziell leichte Erhöhung mit 46,43±8,08% vor und 49,46±8,61% nach G-CSF (p>0,05). Bei den DN zeigte sich eine signifikante Erhöhung (p<0,05) mit 59,96±5,08% vor und 65,63±4,88% nach G-CSF-Mobilisierungstherapie. Absolut zeigten sie ebenfalls signifikante Erhöhungen, mit 21±10 vor und 34±14 Zellen/μl nach G-CSF (p<0,05) bei SM und 9±2 vor, 24±3 Zellen/μl nach G-CSF bei DN (p<0,05). IgA⁺ Anteile der SM u. DN waren nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie signifikant erniedrigt. In BMMCs zeigten die SM

und DN B-Zellen im Vergleich zu den anderen Immunglobulinen einen erhöhten Anteil an IgG⁺ Zellen mit 18,5±10,81% der SM u. 38,8±6,68% der DN. Weitere Mittelwerte sind den waagerechten Linien der Abb. 16 zu entnehmen.

A - PBMCs



B - PBMCs



C - BMMCs

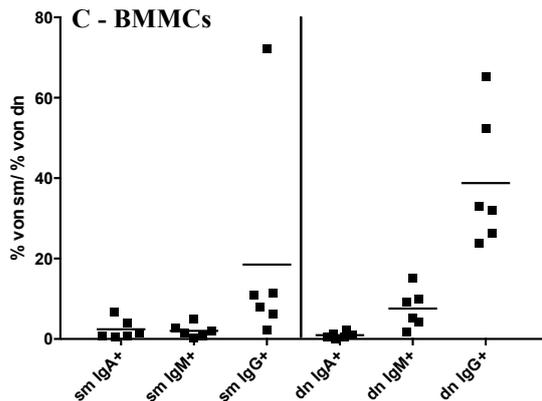


Abbildung 16: Anteil der IgA-, IgM- und IgG-produzierenden B-Zellen an den Isotyp gewechselten- (SM) bzw. Doppel Negativen (DN) B-Zellen. Der Anteil oberflächlich IgA-, IgM-, IgG-exprimierender SM u. DN B-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt in den jeweiligen Graphiken links des senkrechten Strichs SM und rechts davon die DN B-Zellen und A) den prozentualen Anteil den jeweils die IgA⁺, IgM⁺, IgG⁺ Zellen an den jeweiligen Populationen ausmachen, PBMCs, n=6, B) die Zellzahlen/µl, PBMCs und C) den prozentualen Anteil der B-Zellen innerhalb der BMMCs, n=6. Die waagerechten Linien in A,B (rot), C stellen den Mittelwert der jeweiligen Gruppen dar. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet, *p<0,05.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von T- und B-Zellen

Zur funktionellen Charakterisierung wurden die isolierten mononukleären Zellen der Stammzellspender und der Hüftköpfe im Brutschrank kultiviert und mit den Antigenen Tetanus

Toxoid, Candida Lysat, Aspergillus Fumigatus Lysat, Influenza Peptide und einer Positivkontrolle mit SEB stimuliert. Durch extra- und intrazelluläre Färbung wurde bei den T-Zellen die Zytokinproduktion ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL17) erfasst. Bei den B-Zellen erfolgte zur Quantifizierung Antikörper-sezernierender B-Zellen, ein ELISpot. Zudem wurde die extrazelluläre und intrazelluläre Färbung mit dem Proliferationsmarker (Ki67) durchgeführt.

4.2.1 Zytokinproduktion der T-Zellen nach *in vitro* Antigenstimulation

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen beispielhaft über *Dot-Plots* die *Gating*-Strategie zur durchflusszytometrischen Identifizierung von $\text{TNF}\alpha$ -, $\text{IFN}\gamma$ -, IL17- produzierenden T-Zellen nach einer *in vitro* Antigenstimulation mit SEB und Tetanus Toxoid.

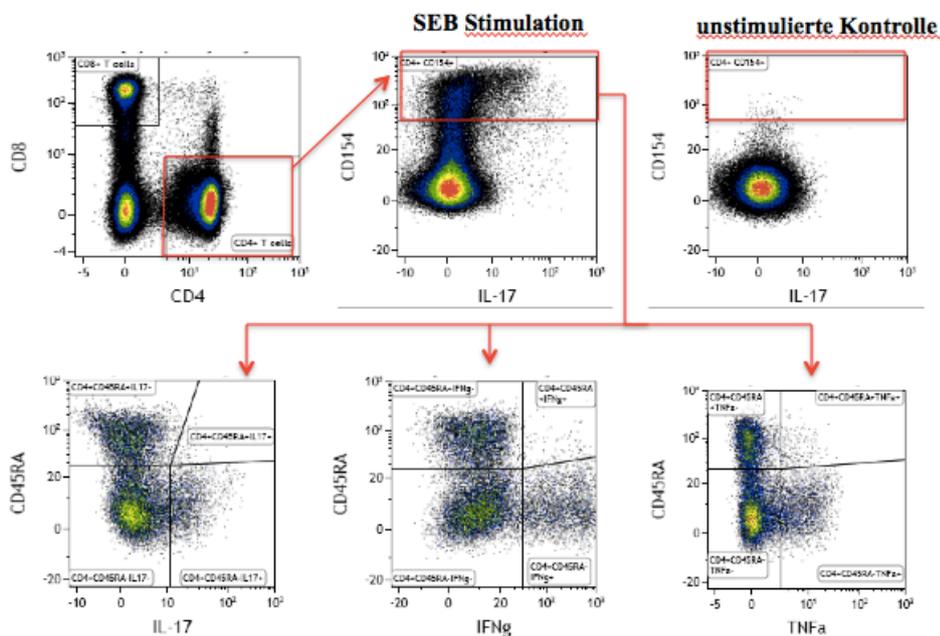


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Identifizierung von $\text{TNF}\alpha$ -, $\text{IFN}\gamma$ -, IL17- produzierenden T-Zellen nach *in vitro* Antigenstimulation mit SEB. Die Abbildung zeigt beispielhafte *Dot-Plots* zur Antigenstimulation mit SEB als Positivkontrolle und einer unstimulierten Negativkontrolle. Durch extra- und intrazelluläre Färbung wurde die Zytokinproduktion ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL17) der naiven- und Gedächtnis-T-Zellen erfasst. Diese Zytokine werden dabei fast ausschließlich von den Gedächtniszellen produziert.

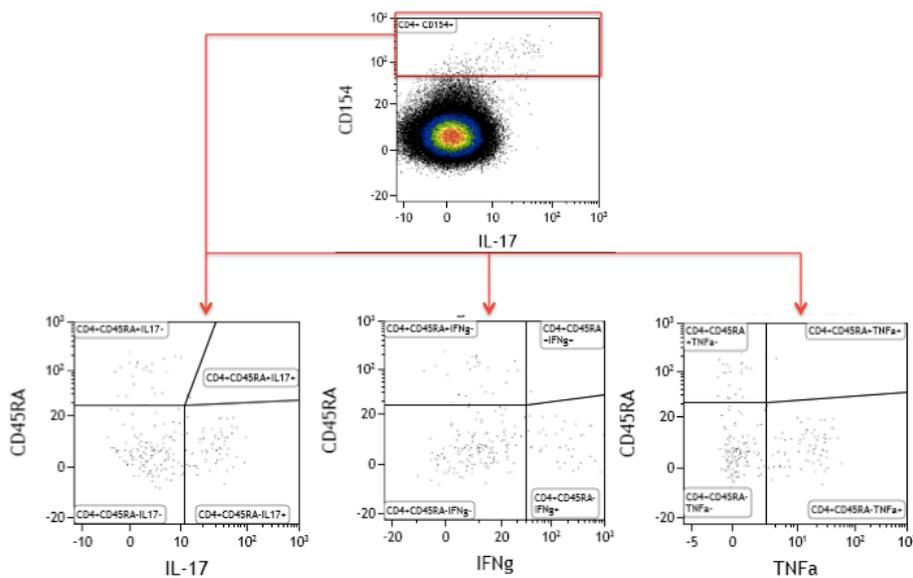


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Identifizierung von TNF α -, IFN γ -, IL17- produzierenden CD4⁺ T-Zellen nach in vitro Antigenstimulation mit Tetanus Toxoid. Diese Abbildung zeigt die *Dot-Plots* und *Gating-Strategie* von PBMCs vor der G-CSF-Mobilisierungstherapie nach in vitro Stimulation mit dem Tetanus Toxoid. Die Zytokine werden gegen CD45RA dargestellt, so wird die Verteilung auf naive- und T-Gedächtniszellen ersichtlich. Hierbei produzierten vor allem die T-Gedächtniszellen (CD45RA⁻) die genannten Zytokine TNF α , IFN γ und IL17, weswegen sie bei der weiteren Auswertung betrachtet werden.

Die Ergebnisse der Antigenstimulationen der CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen werden in den Abbildungen 19 und 20 zusammengefasst. Aufgrund der variierenden und teils zu niedrigen N-Zahlen, werden zur besseren Darstellung der Ergebnisse für die Auswertung der funktionellen Charakterisierung der T-Zellen, die Mediane angegeben. Vor und nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie gab es innerhalb CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulation keine signifikanten Unterschiede. Bei den CD4⁺ T-Zellen gab es tendenziell mehr antigenspezifische Zellen, somit mehr aktivierbare (CD154⁺) Zellen (s. Abb. 19; A). Bei der SEB Positivkontrolle waren es im Median vor G-CSF 13,13% danach 17,2%, bei AL 0,06% vor und 0,6% danach, bei CL 0,17% vor, 0,8% nach G-CSF und bei TT 0,19% vor und 1,08% der CD4⁺ T-Zellen nach der G-CSF-Mobilisierung. Unter diesen CD154⁺ Zellen gab es jedoch nicht mehr oder weniger IFN γ , TNF α oder IL-17 prozierende Zellen (s. Abb. 19; B, C, D).

Bei den BMMCs gab es nach der SEB-Stimulation im Median 25,9% CD154⁺ Zellen von CD4⁺ T-Zellen. Andere antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen waren kaum vorhanden, mit 0,13% CD154⁺ Zellen nach AL-, 0,39% nach CL-, 0,21% nach der Influenza-Stimulation und 0,39% nach der Tetanus Toxoid-Stimulation.

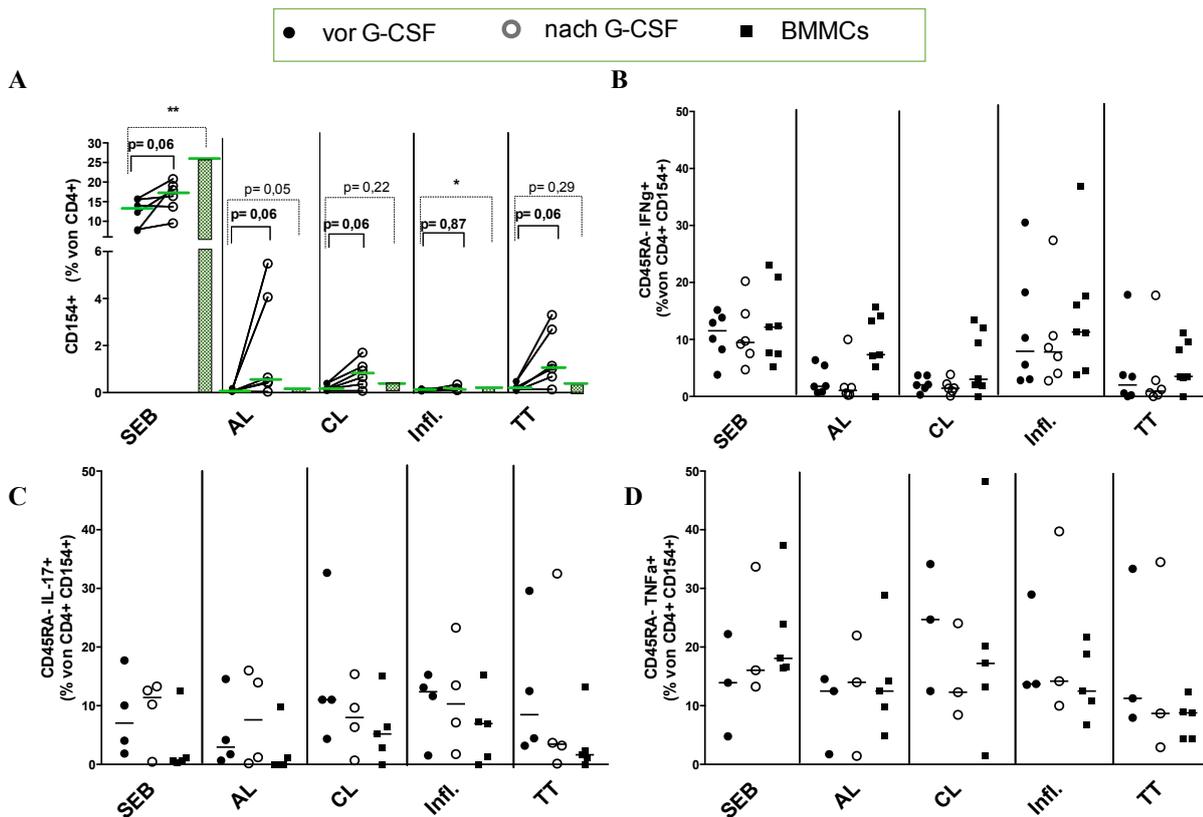


Abbildung 19: Antigenstimulation der CD4⁺ T-Zellen mit SEB, AL, CL, Influenza und TT. Die Abbildung zeigt A) den prozentualen Anteil der CD154⁺ T-Zellen an CD4⁺ T-Zellen nach Antigenstimulation vor und nach G-CSF, PBMCs n=6, den prozentualen Anteil innerhalb der BMMCs (grüne Baken), n=5, B) den prozentualen Anteil der IFN γ positiven Zellen von CD45RA⁺CD154⁺ T-Zellen, PBMCs n=6 (Kreise), BMMCs n=7 (Kästchen), C) den prozentualen Anteil der IL-17 positiven Zellen, PBMC's n=4, BMMCs n=5 und D) den prozentualen Anteil der TNF α positiven Zellen, PBMC's n=3, BMMCs n=5. Aufgrund der variierenden und teils zu niedrigen N-Zahl, werden hier die Mediane angegeben. Dies erfolgte einheitlich für die gesamte Auswertung der funktionellen Charakterisierung der T-Zellen. Der Median stellt sich als waagerechte Linie in A (grün), B, C, D dar. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test (gepaarte Proben der Stammzellspender) und dem Mann-Whitney-U-Test (ungepaarte Knochenmarksspende) berechnet, *p<0,05, **p<0,01.

Bei den CD8⁺ T-Zellen wurde anstatt CD154, CD69 als Stimulationsmarker verwendet. Die Ergebnisse hierzu werden in Abbildung 20 dargestellt. Bei den PBMCs gab es hinsichtlich CD69⁺ Zellen von CD8⁺ T-Zellen nach in vitro Antigenstimulation vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender keine signifikanten Unterschiede. Bei der Zytokinproduktion gab es ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede vor und nach G-CSF (Abb. hierzu nicht dargestellt). Bei den BMMCs gab es bereits im unstimulierten Zustand 53,2% CD69⁺ Zellen, da CD69 ebenfalls ein Gewebemarker der BMMCs ist. So gab es mit dieser Zahl als Basiswert so gut wie keine AL-, TT- und Influenza-spezifische Zellen in BMMCs. Nach der

Stimulation mit SEB waren es insgesamt 71,5% CD69⁺ Zellen und nach CL 58,3% CD69⁺ Zellen (s. Abb. 20 B).

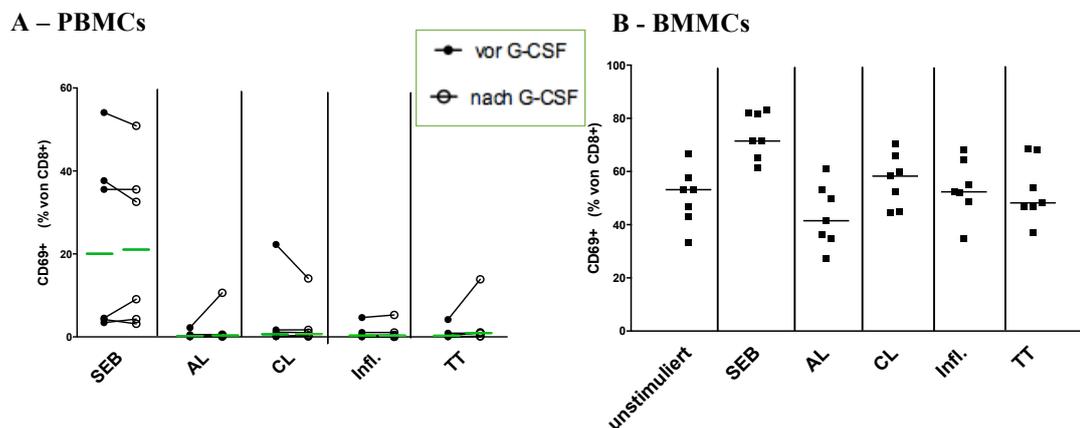


Abbildung 20: Antigenstimulation der CD8⁺ T-Zellen mit SEB, AL, CL, Influenza und TT. Die Abbildung zeigt A) den prozentualen Anteil der CD69⁺ T-Zellen an CD8⁺T-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender (über eine Linie miteinander verbunden), PBMCs, n=6 und B) den prozentualen Anteil innerhalb der BMMCs. Die waagerechten Linien in A (grün) und B stellen den Median dar. Da CD69 als Gewebemarker in BMMCs vorhanden ist und bei CD8⁺ T-Zellen aber ebenfalls als Aktivierungsmarker gesehen wird, liegt der CD69⁺ Anteil von CD8⁺ T-Zellen innerhalb unstimulierter Zellen bei 53%. Dieser Wert konnte dementsprechend als Basiswert genommen werden.

4.2.2 Proliferation von B-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie

Für die funktionelle Analyse der B-Zellen wurden die isolierten mononukleären Zellen der Stammzellspender und der Hüftköpfe auf den Proliferationsmarker Ki67 hin untersucht. Die *Gating*-Strategie mit beispielhaften *Dot-Plots* wird in Abbildung 21 dargestellt. Im Median gab es nach der G-CSF-Mobilisierung mit 34,01% Ki67 von B-Zellen im Vgl. zu 28,15% vor G-CSF, eine tendenzielle Erhöhung der Ki67 positiven Zellen, jedoch nicht signifikant. Bei den BMMCs gab es im Median 28,19% mit einer großen Streubreite von 8,7% bis 45,49%.

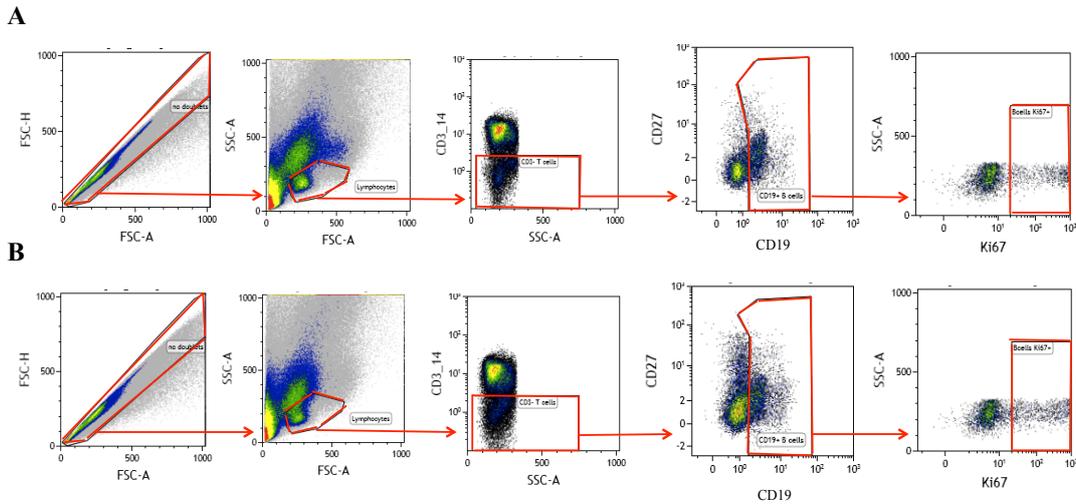


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Identifizierung des Proliferationsmarkers Ki67 in CD19⁺ B-Zellen. Die Abbildung zeigt über beispielhafte *Dot-Plots* die *Gating-Strategie* zur Darstellung der Ki67 positiven Zellen an CD19⁺ B-Zellen in PBMCs A) vor und B) nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender (s. rote Kästen und Pfeile). Die durchflusszytometrischen Analysen hierzu erfolgten an Tag 7 der Stimulation nach dem Protokoll für den B-Zell ELISpot, n=4.

4.2.3 Antikörper-sezernierende Zellen im ELISpot Verfahren nach *in vitro* Stimulationen

Mit dem ELISpot Verfahren wurden B-Zellen nachgewiesen, die unspezifisch IgG, IgA und spezifisch IgG, IgA gegen SEB, Tetanus Toxoid, Candida Lysat, Aspergillus Fumigatus Lysat und Influenza Peptide sezerniert haben. Über ein ELISpot Reader/Detektor wurden am Tag der Stimulation auf den Platten sogenannte Spots ausgezählt, die für die Antikörper-sezernierenden Zellen (ASZ) stehen, in Abbildung 22 dargestellt. Die ASZ/Spots (hier Synonym) wurden durch die durchflusszytometrische Ermittlung der Zellzahl der B-Zellen nach erfolgter Stimulation an Tag 7, auf eine bestimmte B-Zellzahl, hier 10^6 bezogen. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 23 zusammengefasst. In dieser funktionellen Analyse von B-Zellen gab es hiermit kaum signifikante Unterschiede. In Abbildung 23 ist der Mittelwert (engl. Mean) \pm dem Standardfehler angegeben, um auch die teilweise sehr große Streubreite im Diagramm darzustellen. Die unspezifische IgG-Sezernierung betrug im Mittel vor G-CSF-Mobilisierung $329228/10^6$ B-Zellen, nach G-CSF $193552/10^6$ B-Zellen. Bei dem IgA lag die Rate der ASZ bei 173938 pro 10^6 vor und 76334 pro 10^6 B-Zellen nach G-CSF-Mobilisierungstherapie. Die weiteren Werte zur spezifischen Immunglobulinproduktion können der Abb. 23 entnommen werden. Einzig bei der Rate der spezifischen IgA-ASZ gegen CL zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)

zwischen dem peripheren Blut und dem Knochenmark. In PBMCs vor G-CSF waren $622/10^6$ und in BMMCs dafür $184/10^6$ Zellen zu sehen. In PBMCs nach G-CSF war hier allerdings keine Steigerung der IgA-ASZ gegen CL zu beobachten.

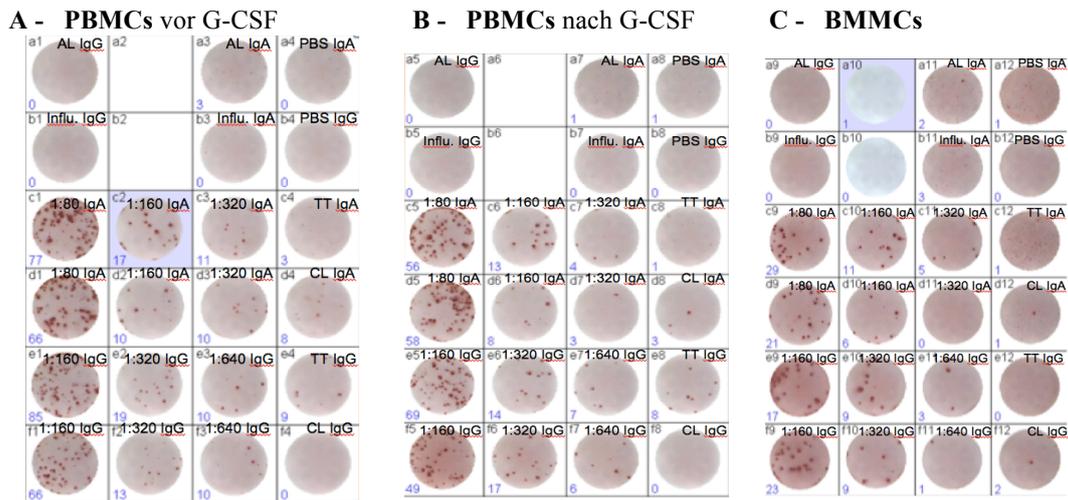


Abbildung 22: Antikörper-sezernierende B-Zellen im ELISpot Verfahren nach in vitro Stimulationen an PBMCs vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie und an BMMCs. Die Abbildung zeigt die ELISpot Platten mit den entwickelten Spots, A) vor und B) nach G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender, n=5 und C) bei den Knochenmarksspendern, BMMCs, n=3. Bei der antigenspezifischen Antikörperproduktion wird vor dem Immunglobulin das jeweilige Antigen, mit dem die Zellen stimuliert wurden beschriftet. Bei der unspezifischen Stimulation sehen wir den Namen des Immunglobulins und die jeweilige Verdünnung davor geschrieben, es sind dabei 3 Verdünnungsreihen durchgeführt worden. Für die Negativkontrolle wurden 2 Löcher der Platte mit reinem PBS belegt, folglich waren in diesen *wells* (jeweils oben rechts) auch kaum bis keine Spots zu sehen, wenn vorhanden wurden sie von den Spots der jeweiligen Immunglobulinen abgezogen.

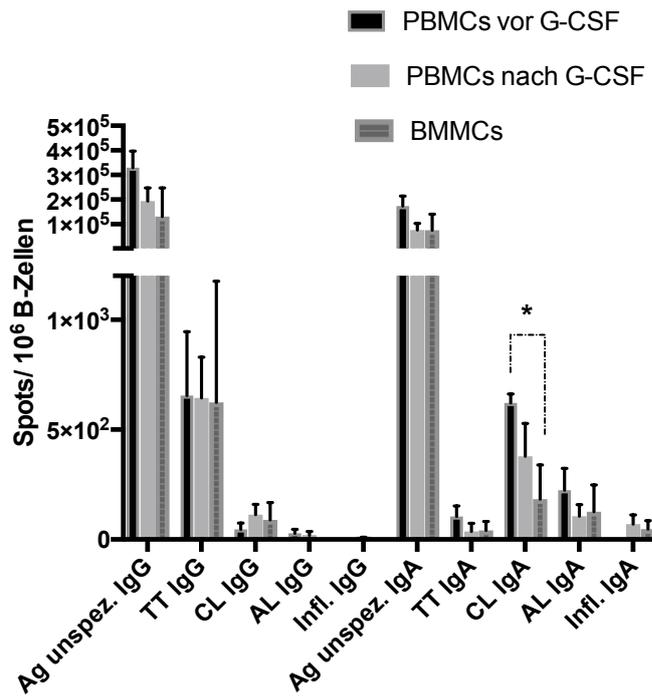


Abbildung 23: Antikörperproduktion von B-Zellen vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie bei Stammzellspendern vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie und bei Knochenmarksspendern. In dieser Abbildung werden die Ergebnisse der B-Zell-ELISpots zusammengefasst. Die ASZ (Antikörpersezernierenden Zellen)/Spots wurden auf 10⁶ B-Zellen hochgerechnet, angegeben ist der Mittelwert ± SEM. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test (gepaarte Proben der Stammzellspender) und dem Mann-Whitney-U-Test (ungepaarte Knochenmarksspenders) berechnet, PBMCs: n=5, BMMCs: n=3. *p<0,05.

5 Diskussion

Zur immunologischen Charakterisierung von gesunden Stammzellspendern vor und nach ihrer Behandlung mit dem *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um mehr über die Zusammensetzung der T-Helfer- und B-Zell-Subpopulationen im Stammzelltransplantat zu erfahren. In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zunächst zusammengefasst, kritisch hinterfragt und ihre Relevanz für weitergehende Forschung in diesem Gebiet erörtert werden.

5.1 Leukozytensubpopulationen

Die Zellzahlen der Leukozytensubpopulationen (Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten) zeigten im Mittel vor und nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie signifikante Unterschiede auf. Insgesamt gab es eine fast 7-fache Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl. Granulozyten stellten erwartungsgemäß die größte mobilisierte Gruppe dar. Sie waren im Mittel nach Mobilisierung 10-fach erhöht. Monozyten waren 7-fach und Lymphozyten 2-fach erhöht. Diese Ergebnisse spiegelten die bereits bekannten Effekte von G-CSF wider. Dazu zählen u.a. die Stimulation zum Überleben und zur Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen und Progenitorzellen (CFU-GM), wie in der Einleitung genauer erörtert. Weiter wurde die Lymphozytenpopulation über die phänotypische und funktionelle Charakterisierung der T- und B-Zellen auf weitere Subpopulationen und deren Eigenschaften untersucht. Damit sollte erkundet werden, welche Veränderungen es in der Verteilung der Subpopulationen gab und ob G-CSF möglicherweise zur Mobilisierung bestimmter Populationen mit bestimmten Eigenschaften und Antigenespezifitäten beiträgt. In Zukunft könnte das die Grundlage dafür sein, die Entwicklung dieser Zellen im Empfänger weiter zu verfolgen und ihre Bedeutung für einen möglichen adoptiven Zelltransfer zu untersuchen.

5.2 T-Zell-Subpopulationen - Phänotypische Charakterisierung

Anders als bei den Ergebnissen von Sun et al. [111] waren T-Zellen ($CD4^+$ und $CD8^+$) im Stammzelltransplantat prozentual von Lymphozyten weniger vorhanden. Sie machten im Mittel etwa 70% der Lymphozyten vor und etwa 57% der Lymphozyten nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie aus. Die prozentuale Erniedrigung der T-Zellen könnte auf eine stärkere

Mobilisierung von B-Zellen und NK-Zellen zurückgeführt werden, wobei die Untersuchung letzterer den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätte. Innerhalb der T-Zellen war das Verhältnis zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vor und nach der Mobilisierung annähernd gleich geblieben, 2,6:1 vor und 2,3:1 nach G-CSF. Das Verhältnis entspricht dem, welches in der Literatur beschrieben ist [111, 112].

5.2.1 T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen

Die phänotypische Charakterisierung der T-Zellen erfolgte über die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren, wie in der Einleitung erörtert. Die Unterteilung erfolgte in folgende T-Helfer-Subpopulationen: TH1-, TH2-, TH22-, TH17-, TH1/17orTH1*-, folliculäre T-Helferzellen (TFH), sowie regulatorische T-Zellen (Tregs).

TH1-Zellen werden hier über ihren Phänotypen CD4⁺CD45RA⁻CXCR3⁺CCR6⁻ charakterisiert. Sie waren nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie im Stammzelltransplantat kaum noch vorhanden. Im Mittel machten sie 1% der CD4⁺ T-Zellen aus. Das waren 7% weniger als vor der Mobilisierung, welches einen signifikanten Unterschied darstellte. In der absoluten Zellzahl zeigte sich nach G-CSF-Mobilisierung eine 4-fache Senkung. Bei den TH2-Zellen (CD4⁺CD45RA⁻CXCR3⁻CCR10⁻CCR4⁺) war nach G-CSF eine 2-fache Erhöhung in der absoluten Zellzahl zu beobachten, prozentual gesehen machte das keinen signifikanten Unterschied. Dies würde für eine Verschiebung im Gleichgewicht zugunsten der TH2-Zellen sprechen.

Neben ihren unterschiedlichen phänotypischen Eigenschaften werden TH1- und TH2-Zellen ebenfalls basierend auf das Profil ihrer Zytokinproduktion voneinander unterschieden [113]. TH1-Zellen produzieren v.a. TNF α , IFN γ . TH2-Zellen produzieren hingegen v.a. IL-4, IL-10. Das Gleichgewicht zwischen beiden Untergruppen ist in bestimmten pathophysiologischen Situationen, wie Infektionen oder autoimmunen Geschehen verändert [114, 115]. Einige Studien deuten hierbei darauf hin, dass die akute GVHD von TH1-Zellen vermittelt wird. TH2-Zellen sollen dabei eventuell protektiv wirken, wobei ihnen eine Rolle in der Entstehung der chronischen GVHD zugesprochen wird [116]. Bezüglich der hier verwendeten Chemokinrezeptoren zeigten Li-Xia Sun et al. eine erniedrigte Expression von CXCR3, CCR6 nach der Applikation von rhG-CSF bei gesunden Spendern [111]. Das spiegelte sich in den Ergebnissen dieser Arbeit hinsichtlich der Chemokinrezeptoren, bzw. der phänotypischen Charakterisierung der T-Zellen zunächst wider. In diesem Kontext stellte sich die Frage, ob es

einen tatsächlichen prozentualen und absoluten Rückgang in der TH1-Zell-Population gegeben hat oder nur einen Rückgang des Oberflächenmarkers CXCR3, welches zur phänotypischen Charakterisierung der TH1-Zellen verwendet wurde. Interessant war hierbei der Vergleich mit den BMMCs. Hier zeigte sich das gleiche Bild, wie nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender. Die TH1-Zellen machten hier 0,34% der CD4⁺ T-Zellen aus. Bei den TH2-Zellen waren es im Mittel 6,7%. Im Gegensatz zu den TH1-Zellen gab es bei den TH2-Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen BMMCs und PBMCs vor und nach G-CSF.

Ähnlich der TH1-Zellen war die Entwicklung der TH1/17-Zellen, die eine 5- bis 6-fache Erniedrigung, sowohl prozentual als auch absolut, erfuhren. TH1/17-Zellen scheinen, wie die TH17-Zellen, bei der Immunabwehr von bestimmten Pathogenen eine besondere Rolle zu spielen. Monozyten, die *C. albicans* oder *S. aureus* exponiert waren, sorgten für die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in TH17-Zellen, die je nach Pathogen und mit dem Einfluss von IL-1 β , unterschiedliche Charakteristika aufwiesen. Zellen, die dabei über *C. albicans* differenzierten hatten vor allem einen TH17/TH1-Phänotypen und produzierten somit sowohl IL-17 als auch IFN γ und exprimierten CCR6 und ROR γ t. Zellen, die über die Stimulation von *S. aureus* proliferierten, produzierten hingegen alleinig IL-17 und wenn stark aktiviert für einen kurzen Zeitraum auch IL-10 [117].

TH17-Zellen variierten in ihrer Zellzahl vor und nach der Mobilisierung kaum. Prozentual waren sie nach der Mobilisierung weniger repräsentiert, im Mittel um 3%. Die Ergebnisse von Li-Xia Sun et al., wonach es nach G-CSF mehr IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen gibt [111], konnten hier rein nach der phänotypischen Charakterisierung nicht bestätigt werden. Wie in der Einleitung beschrieben zeigen Patienten mit einem Mangel an TH17-Zellen vermehrt Infektionen mit *C. albicans* und *S. aureus*. Sie sind von Bedeutung bei der Bekämpfung von extrazellulären Bakterien und Fungi, weswegen auch hier die Verfolgung dieser Zellen im Empfänger von Bedeutung wäre. Bahr et al. zeigten in ihrer prospektiven Studie zur Rekonstitution von TH17-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation eine verzögerte Erholung, so auch der TH1/17- und TH1-Zellen. Die verzögerte Erholung galt für die ersten drei Monate nach Transplantation, vor allem dann wenn das Antithymozytenglobulin während der Konditionierung appliziert wurde. Eine Relation zur akuten GVHD konnten sie dabei nicht herstellen [118]. Studien zur Rolle von TH17-Zellen in der Entstehung von GVHD bleiben noch inkonklusiv.

TH22-Zellen erfuhren nach G-CSF-Mobilisierung eine 1,3-fache Erhöhung der Zellzahl pro μl . Prozentual machte das keinen signifikanten Unterschied. TH22-Zellen produzieren große Mengen IL22. Wie bereits erwähnt kann der Erfolg einer allogenen SZT durch die Entstehung einer *Graft-versus-Host* Erkrankung limitiert werden [119]. Dabei spielen die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen eine gesonderte Rolle, wobei vieles, so auch die Rolle von IL-22 in der GVHD, nicht abschließend geklärt ist. Neben der potenziellen Beeinflussung einer GVHD, haben T-Zellen, so auch TH22-Zellen bzw. IL-22 eine besondere Rolle in der Immunabwehr und in der antiinflammatorischen- und Infektionstherapie. Barthelemy et al. fanden in diesem Kontext heraus, dass IL-22 die bakterielle Verbreitung infolge einer Influenzainfektion reduziert [120]. Schwere bakterielle (Pneumokokken-) Infektionen sind häufig mit Influenza assoziiert und beeinflussen stark die Morbidität und Mortalität der an Influenza erkrankten Patienten. An Influenza erkrankten Mäusen zeigten Barthelemy et al., dass die Behandlung mit rekombinantem IL-22 einen positiven Einfluss auf die Integrität des Lungenepithels hatte. Dies führte zu einer verminderten bakteriellen Ausbreitung über die Lunge hinaus und somit zu einem verminderten Auftreten von Post-Influenza Superinfektionen [120]. Diese Eigenschaften könnten für frisch Transplantierte von besonderer Bedeutung sein.

Die chronische Graft-versus-Host Erkrankung (cGvHD) stellt eine der Hauptkomplikationen der hämatopoetischen SZT dar. In der cGvHD partizipieren alloreaktive T-Zellen und Keimzentrum-B-Zellen in Keimzentrumsreaktionen, um pathogenetische Antikörper zu produzieren. Regulatorische T-Zellen können diese Reaktionen unterbinden, sie sind allerdings in der cGvHD in ihrer Zahl reduziert, wodurch sie sich indirekt an der Krankheit beteiligen [121]. So sind regulatorische T-Zellen und TFH-Zellen, die maßgeblich an der B-Zell-Aktivierung und Entstehung des Keimzentrums beteiligt sind, in diesem Kontext von Bedeutung.

Regulatorische T-Zellen von Stammzellspendern vor und nach G-CSF wurden hier über ihren Phänotypen $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^-$ charakterisiert. Es zeigte sich im Mittel eine tendenzielle Erhöhung um 20 Zellen/ μl nach Mobilisierung, prozentual machte das keinen Unterschied, beides war nicht signifikant. Im KM machten sie fast 6% der CD4^+ T-Zellen aus. Bei Zou et al. lag die Frequenz von $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ T-Zellen im humanem Knochenmark bei $5,5\pm 3,5\%$ der $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ T-Zellen, höher als in den von ihnen untersuchten Thymus, Lymphknoten und Blut [122], was für das Knochenmark als Quelle der Mobilisierung sprechen könnte.

TFH-Zellen waren 1,8-fach in ihrer Zellzahl nach der Mobilisierung erniedrigt, prozentual gesehen ebenfalls um ein fast 3-faches. Da die Charakterisierung von TFH-Zellen ausschließlich unter einem phänotypischen Aspekt erfolgte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Marker zur Charakterisierung, CXCR5 und PD-1, nach Mobilisierung runterreguliert wurden oder ob es einen tatsächlichen Rückgang in der Population gegeben hat. Letzteres könnte unter anderem angenommen werden, da die TFH-Zellen ebenfalls vermindert im KM zu finden waren und somit auch nicht hätten mobilisiert werden können. Ersteres kann zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht ausgeschlossen werden. TFH-Zellen sollen vermehrt in Follikeln von sekundär lymphatischen Organen zu finden sein [19], hier bieten sich in Zukunft weitere Gewebe, wie der Milz und Lymphknoten zur Charakterisierung an. Diese Zellen sind wichtig für die Formation und Erhaltung des Keimzentrums. Ein Mangel an dieser Population kann folglich zu Defekten im Keimzentrum führen, was wiederum zu einer verlangsamten Regeneration von Isotyp-gewechselten CD27⁺ Zellen beitragen kann [123, 124]. Würde ein Mangel an TFH-Zellen bzw. eine verzögerte Erholung dieser bei Empfängern einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation bestehen, könnte es darin begründet sein, dass sie wegen einer Stromastörung nicht nachgebildet werden können. Es könnte jedoch ebenfalls daran liegen, dass sie vom Spender nicht mitgeliefert wurden.

Im Mausmodell zeigte sich, dass TFH-Zellen durch ihre erhöhte Anzahl an der Entstehung von cGVHD beteiligt seien, indem sie eine pathologische B-Zell-Antwort unterstützten [125]. So nahmen sich Knorr et al. der Frage an, ob vergleichbare Mechanismen im Menschen ablaufen [126]. Sie charakterisierten die Wiederherstellung von peripheren folliculären T-Helferzellen, ihren unterschiedlichen Quellen entsprechend. In UCB- (*umbilical cord Blood*) Empfängern erfolgte eine langsamere Wiederherstellung als in Empfängern von MRD (*Matched related donors*). Dies wurde dadurch erklärt, dass das UCB keine pTFH beinhalten, dafür aber naive T-Zellen, welche über weitere Differenzierungsschritte zu TFH-differenzieren könnten. Ein Jahr nach Transplantation waren allerdings schon eine ähnliche Anzahl an TFH-Zellen in beiden Gruppen abzuzeichnen. Bei den Patienten, die eine cGVHD entwickelten, wurden im Gegensatz zum Mausmodell eine erniedrigte Anzahl an TFH-Zellen gefunden, unabhängig von der Quelle dieser Zellen. Folgende Erklärungsansätze wurden dafür von ihnen in Betracht gezogen: ein Homing der Zellen vom Blut in sekundär lymphatische Organe, die Zerstörung der TFH-Zellen innerhalb des cGvHD Prozesses selbst (über eine Stromastörung) oder eine Reaktion auf die

immunsuppressive Therapie. Diese könnten nach ihnen Gründe für den erniedrigten Anteil an TFH-Zellen in Transplantationspatienten mit einer cGvHD gewesen sein [126].

Auch wenn die TFH-Zellen im Menschen wahrscheinlich eine Rolle in der Entstehung der cGVHD spielen könnten, bleiben die genauen Effekte und Mechanismen weitestgehend ungeklärt und bedürften in Zukunft weiterer Untersuchungen.

5.3 Antigen-spezifische T-Zellen

Infektionen, seien sie durch Viren oder Pilze verursacht, stellen u.a. die größten Risikofaktoren für Morbidität und Mortalität bei Patienten nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation dar [127]. In diesem Kontext sind immuntherapeutische Strategien, sowie der adoptive Zelltransfer, von besonderer Bedeutung. Die Wirksamkeit der adoptiven Immunotherapie in Empfängern der HSZT Post-Transplantation konnte bereits gezeigt werden [128]. So war es im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls wichtig, das Stammzelltransplantat hinsichtlich der Antigen-spezifität zu untersuchen und zu erfahren, ob nach G-CSF-Mobilisierungstherapie bei den Spendern vermehrt antigen-spezifische T-Zellen ins Blut mobilisiert werden, welche dem Empfänger zu Gute kommen könnten. Weiterhin stellte sich die Frage, ob das KM eine Quelle für diese Mobilisierung darstellt. Hierfür erfolgte die Stimulation von PBMCs vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie und von BMDCs mit folgenden Antigenen: Aspergillus Lysat, Candida Lysat, Influenza Peptide, Tetanus Toxoid und SEB als Positivkontrolle. CD154 diente bei CD4⁺ T-Zellen als Aktivierungsmarker, über diesen Marker wurden CD4⁺ T-Zellen, welche auf die genannten Antigene reagierten identifiziert [129]. Analog diente CD69 für die CD8⁺ T-Zellen als Aktivierungsmarker. CD69 gehört in die Lektin-Superfamilie und ist ein calciumabhängiger Typ-II-Transmembranrezeptor [130]. Die CD69 Expression wird u.a. durch die Aktivierung von T-Zellen induziert, dieser Marker wird daher auch zu den Aktivierungsmarkern gezählt [131].

CD154⁺CD4⁺ T-Zellen erfuhren in PBMCs nach G-CSF, im Anschluss der in vitro Antigenstimulation mit SEB, Aspergillus Lysat, Candida Lysat und Tetanus Toxoid zunächst einen leichten Anstieg, wenn auch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Okhrimenko et al. beschreiben in ihrer Arbeit zur detaillierten funktionellen Charakterisierung von T-Zellen, dass das Repertoire an CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen im KM im Gegensatz zum peripheren Blut mit CMV-pp65-, TT-, Masern-, Mumps- und Rubella-spezifischen T-Zellen

angereichert ist. Dem KM mangelt es aber an *Vaccinia Viren*, *Candida albicans* MP65 oder typischen Pathogenen der Haut oder der Mukosa. CD4⁺ Gedächtniszellen für Masern sollen fast ausschließlich im KM gehalten werden. CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen des KM könnten somit für einen langlebigen Schutz gegen systemische Pathogene sorgen [132].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zunächst zu dem vermehrten Vorhandensein von TT-, Aspergillus- und CL-spezifischen T-Zellen im KM oder ihrer vermehrten Mobilisierung ins Blut nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Anders war es bei SEB und den Influenza Peptiden. Nach der *in vitro* Stimulation mit SEB gab es im KM signifikant mehr CD154⁺ T-Zellen als im peripheren Blut vor G-CSF ($p < 0,01$), dies galt ebenfalls für die Influenza Peptide ($p < 0,01$). So wäre es denkbar gewesen, eine erhöhte Mobilisierung im peripheren Blut zu beobachten. Allerdings war dies für Influenza nicht der Fall ($p > 0,05$). Für SEB und die anderen Peptide gab es wie oben beschrieben einen tendenziellen Anstieg der CD154⁺ T-Zellen nach G-CSF-Mobilisierung ($p > 0,05$).

Beim Betrachten der Ergebnisse stellte sich die Frage, ob eine tatsächliche Anreicherung von antigenspezifischen Zellen stattgefunden hat. Die Antigene, die einen Anstieg nach G-CSF erfuhren, waren im KM im Vergleich zum peripheren Blut nicht vermehrt vorzufinden. Da es sich allerdings bei dem Knochenmark um ungepaarte Proben handelte, sind nachfolgende Vergleiche mit dem peripheren Blut der Stammzellspender mit Vorsicht zu bewerten. Neben dem KM stellt sich ebenfalls die Frage nach anderen Quellen, wie sekundär lymphatische Organe, die für die Mobilisierung dieser Zellen in Frage kommen könnten. Neben der Möglichkeit einer Mobilisierung könnte eine reine Erhöhung der Reaktivität derselben Zellen ebenfalls angenommen werden. In diesem Kontext wurde hier nicht untersucht, ob der Unterschied in der Frequenz der reaktiven CD154⁺ T-Zellen auch durch Faktoren wie eine unterschiedliche Anzahl oder Typen an Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) in Blut und KM zustande gekommen sein könnte. Okhrimenko et al. (s. oben) stellten sich der Frage und untersuchten dafür die Frequenzen von reaktiven Zellen, sowohl in Mischkulturen von Blut und KM, als auch in reinen Kulturen mit jeweils nur Blut oder KM. Die Frequenz der reaktiven Zellen auf eine Antigenstimulation war in beiden Gruppen dieselbe, was zeigte dass APCs vom Blut und KM in der Präsentation von Antigenen gleichermaßen effizient sind [132]. Dies könnte für die Versuchsreihen dieser Arbeit ebenfalls angenommen werden.

Innerhalb der CD154⁺ aktivierten Zellen erfolgte über intrazelluläre Immunofluoreszenz die Unterscheidung zwischen IFN γ -, TNF α - und IL17-produzierende Zellen. Hier stellte sich die

Frage, ob die Ergebnisse in der phänotypischen Charakterisierung dieser Zellen sich auf der funktionellen Ebene widerspiegeln. Zu erwarten wäre beispielsweise eine Senkung der IFN γ -produzierenden Zellen gewesen, welche v.a. von TH1-Zellen sezerniert werden. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit über die funktionelle Untersuchung nicht bestätigt werden.

5.4 Unterschiede im Phänotyp der Zellpopulationen – Direkte Effekte von G-CSF?

Nachdem Unterschiede in der T-Zellpopulation festgestellt wurden, sollte untersucht werden, ob sich das Bild der vorhandenen Zellen durch die tatsächliche oder auch fehlende Mobilisation ergab, oder ob G-CSF direkte Effekte auf die Zellen und deren Phänotypen aufweisen konnte. Hierzu wurden zwei in vitro-Versuche mit G-CSF durchgeführt. PBMCs gesunder Spender wurden erstens ohne und zweitens mit G-CSF in vitro (GRANULOCYTE 13 Millionen I.E./ml/Lenograstim) inkubiert und anschließend nach dem gleichen Färbeprotokoll zur Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen weiter verarbeitet. Nach diesen Versuchen zeigten sich kaum Veränderungen in den verschiedenen T-Helfer-Subpopulationen. Diese Versuchsreihe an zwei Spendern ist allerdings aufgrund des zu kleinen Stichprobenumfangs nicht aussagekräftig. Hierzu sollten in Zukunft weitere Untersuchungen angestrebt werden.

In diesem Zusammenhang untersuchten Sloand et al. auf funktioneller Ebene die Effekte von G-CSF auf die IFN γ und IL-4 Expression in CD4⁺ T-Zellen, sowohl in vivo als auch in vitro. CD4⁺ T-Zellen, die in vitro mit G-CSF co-kultiviert wurden und mit PHA oder dem monoklonalen Antikörper CD3 stimuliert wurden, zeigten eine Senkung in der IFN γ -Expression und einen Anstieg in IL-4. Diese Verschiebung zugunsten der TH2-Zellen soll dabei direkt gewesen sein. Sowohl Monozyten als auch eine erhöhte Apoptoserate sollen dabei keine Rolle gespielt haben [133]. Nawa et al. hingegen erklären den Th2-*Shift* über indirekte Effekte durch die Veränderung der Monozyten-Funktion [134].

In den Versuchsreihen zu dieser Arbeit konnte keine Senkung IFN γ -produzierender Zellen beobachtet werden, welches nicht für eine Verschiebung zugunsten der TH2-Zellen spricht.

Auf phänotypischer Ebene kann die Erniedrigung der TH1-Zellen auf die erniedrigte Expression des Chemokinrezeptors CXCR3, welcher zur Charakterisierung herangezogen wurde, zurückgeführt werden. Sun et al. zeigten ebenfalls die erniedrigte Expression von CXCR3 nach

der Applikation von rhG-CSF bei gesunden Spendern [111]. In vitro Versuche mit G-CSF, die direkte Effekte auf Chemokinrezeptoren untersuchen würden, fehlen zum heutigen Stand allerdings.

Die direkte Wirkung von G-CSF auf die T-Helferzellen und Chemokinrezeptoren konnte im Rahmen dieser Arbeit über den in vitro-Versuch leider nicht endgültig geklärt werden, weil die Versuche hierfür an einer zu kleinen Stichprobenanzahl durchgeführt wurden und die Positivkontrolle zur Validierung des Versuchs gefehlt hat.

Die signifikante prozentuale und absolute Abnahme der CXCR3⁺ T-Zellen (phänotypische Charakterisierung-TH1-Zellen) im Rahmen der G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender und dazu vor allem die Diskrepanz zur funktionellen Charakterisierung, welche keinen Rückgang von TH1-Zellen zeigte könnte auf direkte Effekte von G-CSF hindeuten. In Anbetracht dieser Ergebnisse wäre demnach eine phänotypische Charakterisierung von T-Helferzell-Subpopulationen über deren Chemokinexpression nach Einsatz von G-CSF als Mobilisierungstherapie mit Vorsicht zu bewerten.

5.5 B-Zell-Subpopulationen - Phänotypische Charakterisierung

Die phänotypische Charakterisierung der B-Zellen erfolgte analog zu der phänotypischen Charakterisierung der T-Zellen an frisch gepaarten PBMCs vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie und an aus Hüftköpfen isolierten BMMCs, hier ungepaart. Wie bereits erwähnt, spielen Komplikationen, wie Infektionen, eine wichtige Rolle im Rahmen der allo-HSCT. Da bereits einige Studien den Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung des Transplantats und dem klinischen Verlauf bei Patienten beschreiben [87], war es im Rahmen dieser Arbeit relevant auch die Zusammensetzung des B-Zell-Kompartiments vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie zu analysieren und mögliche Ursprungsgewebe, wie das KM, mit zu untersuchen. Im Rahmen der Charakterisierung wurden insgesamt B-Zellen, Plasmablasten und die weiteren Subpopulationen, Marginal-zonen ähnliche B-Zellen, naive folliculäre und transitionale B-Zellen, Isotyp-gewechselte und doppel negative B-Zellen untersucht, sowohl prozentual als auch absolut. Letztere zwei Untergruppen wurden auf ihre IgM-, IgG- und IgA-Produktion hin ebenfalls untersucht.

Die Anzahl der B-Zellen veränderte sich prozentual zu den Lymphozyten nicht; absolut gesehen erfuhren sie eine ungefähre Verdopplung ihrer Zellzahl/ μ l. Die Zahl der Plasmablasten

verringerte sich, wenngleich auch nicht signifikant ($p > 0,05$). Verglichen zum peripheren Blut (PBMC) lagen sie im KM nicht vermehrt vor. In den BMMCs waren die B-Zellen an der Lymphozytenpopulation im Vergleich zu PBMCs vor G-CSF im Mittel mehr vorhanden (PBMCs vor G-CSF: $11,4 \pm 3,4\%$, BMMCs $20,8 \pm 5,5\%$; $p > 0,05$). Da es bei B-Zellen absolut zu einer Verdopplung kam und diese auch im KM vermehrt vorhanden sind, könnte das KM als Quelle der Mobilisierung für diese B-Zellen nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie angenommen werden. Hinsichtlich der weiteren Subpopulationen war ersichtlich, dass naive folliculäre B-Zellen mit im Mittel fast 50% der B-Zellen in PBMCs die größte Gruppe unter ihnen ausmachten. Dies korrelierte mit vorhergehenden Erwartungen. Wie in der Einleitung erwähnt, macht diese Subpopulation die Hauptpopulationen der B-Zellen im Blut und sekundären lymphatischen Organen aus [56]. Im Rahmen dieser Untersuchungen waren sie im KM signifikant weniger als im peripheren Blut vor G-CSF vorhanden. Nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie der Stammzellspender verdoppelten sich die naiven folliculären B-Zellen in ihrer Zellzahl nach Mobilisierung, prozentual waren sie gleichbleibend. Sie könnten möglicherweise aus Milz oder Lymphknoten mobilisiert worden sein.

Ähnlich war es bei den MZ-ähnlichen Zellen. Sie machten im Mittel 20% des B-Zell-Pools in PBMCs vor G-CSF aus, signifikant mehr als im KM vorhanden. Nach G-CSF erfuhren sie im Blut absolut eine fast zweifache Zellzahlverdopplung ($p > 0,05$), so könnte ihre Mobilisierung ebenfalls aus der Milz erfolgt sein.

Isotyp-gewechselte B-Zellen waren nach Mobilisierung im Blut absolut gesehen signifikant erhöht. Im KM machten sie im Mittel die zweitgrößte B-Zell-Population aus.

Die größte B-Zell-Subpopulation im Knochenmark machten die Doppel negative B-Zellen aus mit im Mittel 48% der B-Zellen. Sie waren im Vergleich zum peripheren Blut vor G-CSF signifikant erhöht. Von allen beschriebenen B-Zell-Subpopulationen erfuhren sie den größten Anstieg in PBMCs nach G-CSF-Mobilisierungstherapie, mit einem 1,5-fachen prozentualen Anstieg ($p > 0,05$) und einem 2,6-fachen signifikanten Anstieg der absoluten Zellzahl/ μl , was für das KM als ihre Quelle sprechen könnte.

Weiterhin zeigte sich im Hinblick auf die IgM-, IgG- und IgA-Produktion, dass im DN und MZ-ähnlichen B-Zell Kompartiment das IgG-Isotyp vorherrschte, welches im Blutplasma grundsätzlich die größte Immunoglobulin(Ig)-Fraktion darstellt [1], so auch im KM. Nach G-CSF-Mobilisierungstherapie erfuhren sie die größte Steigerung sowohl prozentual ($p > 0,05$), als auch

absolut signifikant ($p < 0,05$). DN IgM⁺ und MZ IgM⁺ erfuhren ebenfalls einen Anstieg nach G-CSF, wenn auch nicht signifikant.

Die IgA-Spiegel waren hingegen in beiden Subpopulationen prozentual nach G-CSF signifikant gesunken. Schulenburg et al. untersuchten in ihrer Arbeit zur Erholung des Immunsystems nach konventioneller und nicht-myeloablativer SZT die Ig-Spiegel (IgM, IgG, IgA) bei Empfängern 3, 6, und 12 Monate nach Stammzelltransplantation (SZT). IgM-Spiegel erfuhren nach hämatopetischer/nicht-myeloablativer SZT eine schnellere Erholung. IgA-Spiegel waren bei beiden Gruppen verzögert wieder hergestellt [135]. Die Gründe für die unterschiedliche Regeneration verschiedener Zellgruppen sind bislang nicht hinreichend geklärt. Der Grund für verminderte IgA-Spiegel könnte im für den Class-switch nicht vorteilhaften Zell- und Zytokin-Milieu liegen, welches bislang nicht geklärt ist. Es könnte allerdings ebenso daran liegen, dass diese Immunoglobulin-Klasse von Beginn an im Stammzelltransplantat minder repräsentiert war. Wie oben beschrieben waren IgA⁺ B-Zellen als einzige nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie signifikant sowohl prozentual als auch absolut gesunken. Zur endgültigen Klärung dieser Fragestellung müssten weitere Untersuchungen erfolgen, sowohl beim Spender in einem größeren Umfang als es im Rahmen dieser Arbeit erfolgte, als auch prospektive Untersuchungen am Empfänger zur Weiterverfolgung der transplantierten immunologischen Zellen und der Bestimmung verschiedener Störfaktoren für die mangelhafte Regenerierung bestimmter Zellgruppen.

5.6 Antikörper-sezernierende Zellen

Nachdem die phänotypische Charakterisierung der B-Zellen erfolgte, wurde die Antikörpersekretionsleistung der B-Zellen, welche in vitro stimuliert wurden per ELISpot überprüft. Das ELISpot ermittelt wie hoch der Anteil Antikörper-sezernierender Zellen ist. Es ermöglicht quantitative Aussagen auf Einzelzellebene. Nach dem Zusetzen eines Stimulationsmediums (s. Kapitel 2) wurden B-Zellen nachgewiesen, die unspezifisch IgG, IgA sezernierten. Hier gab es keine signifikanten Unterschiede vor und nach G-CSF-Mobilisierung. Wenn allerdings die Verdopplung der Gesamt-B-Zellzahl mit in Betracht gezogen wird, dann könnte ebenso eine Verdopplung dieser Antikörper-sezernierenden Zellen nach G-CSF-Mobilisierungstherapie angenommen werden. Diese Aussage kann jedoch nur mit großer Vorsicht getroffen werden, da es sich bei dem B-Zell-ELISpot um ein in vitro Assay handelt, bei dem eine definierte Zellzahl kultiviert und stimuliert wird, was in vivo vor und nach G-CSF und

individuell sehr unterschiedlich sein kann. Zudem sollte darauf hingewiesen werden, dass die N-Zahl mit 5 Proben für das periphere Blut und 3 für das Knochenmark zu klein war und individuell große Schwankungen bestanden. Per ELISpot wurden ebenfalls TT-, CL-, AL-, Influenza-spezifische ASZ nachgewiesen und vor und nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie miteinander verglichen. Die Anzahl TT-spezifischer IgG/IgM-ASZ war nach G-CSF kaum verändert. Auch bei den anderen Antigenen gab es keine signifikante Veränderung in der Anzahl der spezifischen ASZ, mit der Ausnahme von CL-spez. IgA-ASZ. Sie waren im peripheren Blut vor G-CSF signifikant mehr als im KM vorhanden.

In diesem Kontext stellt sich die Frage nach der allgemeinen Verteilung von antigenspezifischen Gedächtnis-B-Zellen bzw. Antikörper-sezernierenden Zellen in anderen Geweben als peripheres Blut (PB) und Knochenmark (KM), wie der Milz und Tonsillen aussieht.

Giesecke et al. erläutern diesen Punkt in ihrer Arbeit zur Verteilung und zum Phänotypen humaner antigenspezifischer Gedächtnis-B-Zellen, v.a. bezogen auf TT in verschiedenen Geweben, wie dem PB, Milz, Tonsillen und KM. Insgesamt soll dabei die Milz die größte Population an Gedächtnis-B-Zellen beherbergen, gefolgt von den Tonsillen, KM und PB. Tetanus-spezifische Zellen, welche im peripheren Blut vorhanden waren, zeigten nach ihrer absoluten Zellzahl, dass die Milz, gefolgt von den Tonsillen als ihr größtes Reservoir angenommen werden kann [136].

Für weiterführende Untersuchungen wäre es somit wichtig neben dem Knochenmark andere Gewebearten, wie Milz und Tonsillen, die als Quelle für die Mobilisierung immunkompetenter Zellen in Betracht kommen im Kontext des adoptiven Zelltransfers auf antigenspezifische ASZ hin zu untersuchen. Abschließende Aussagen zur Mobilisierung bestimmter ASZ nach G-CSF und dem KM als eine mögliche Quelle zur Mobilisierung konnten nicht getroffen werden, dafür bieten sich weitere Untersuchungen mit einem größeren Stichprobenumfang an.

5.7 Proliferationsverhalten der B-Zellen

Mit dem Ziel mögliche Unterschiede hinsichtlich des Proliferationsverhaltens von B-Zellen herauszustellen, erfolgten die Analysen am peripheren Blut von 4 Stammzellspendern vor und nach G-CSF und an 3 Hüftkopfspendern. Aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs und der großen individuellen Unterschiede/Spannbreite kann trotz einer tendenziell leicht höheren Proliferationsrate nach G-CSF keine abschließende Aussage zu diesem Punkt getroffen werden. Zudem können Vergleiche zwischen dem peripheren Blut vor G-CSF und dem Knochenmark zu

diesem Zeitpunkt, im Rahmen dieser Arbeit nicht gezogen werden, unter anderem weil 3 BMMC Proben, die eine ebenfalls große Streubreite aufwiesen, nicht als repräsentativ für das Knochenmark erachtet werden konnten.

5.8 Limitationen der Arbeit

In diesem Abschnitt sollen Stärken und Schwächen der vorliegenden Arbeit herausgearbeitet werden. Einschränkungen und Fehlerquellen sollen aufgezeigt werden, welche beim Betrachten der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten.

Zwei Messverfahren, welche hier zum Einsatz kamen waren die Durchflusszytometrie und der B-Zell-ELISpot. Streitz et al. zeigten, dass es bei der Durchflusszytometrie über bestimmte Einflüsse zu einer unterschiedlich ausgeprägten Variabilität kommt. Im Rahmen der Charakterisierung von Leukozytenpopulationen in verschiedene Zentren kam es zu einer Variabilität von 0,05% bis 30%. Bei Intra-Assay Tests betrug die Variabilität 0,05% bis 20%. Der Zeitfaktor spielt in diesem Kontext ebenso eine große Rolle. Damit die Variabilität gering gehalten wird, sollen Proben innerhalb von 4 Stunden bearbeitet und gefärbt werden [137]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Proben zur phänotypischen Charakterisierung frisch innerhalb von 4 Stunden bearbeitet werden. Andere Versuchsansätze, wie die Antigenstimulation, bei der die Zellen über Nacht im Brutschrank kultiviert werden mussten ließen dies nicht zu. Allerdings erfolgte die Färbung nach Protokoll für alle Proben unter den gleichen Bedingungen. Zellen, die für die B-Zell-ELISpots verwendet wurden, wurden kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt untersucht. Einwirkzeit und Temperatur sind ebenso Faktoren, welche die Ergebnisse beeinflussen können [138]. Diese wurden für die Versuche dieser Arbeit stets einheitlich gehalten. Für die Messungen am Durchflusszytometer muss eine Kompensation erfolgen. Im Rahmen der Auswertung sind zudem Unterschiede im *Gating* wichtig, da sie die Variabilität mitbeeinflussen [138]. Die Kompensation erfolgte hier durch automatische Berechnungen und *Beads*. Beim Setzen der Gates wurde stets darauf geachtet diese vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie identisch zu setzen, ohne dabei jedoch natürliche Populationsgrenzen zu missachten. Um die Variabilität so gering wie möglich zu halten, wurden zudem alle Auswertungen von einer Person durchgeführt. In diesem Kontext wäre die parallele Ermittlung von Transkriptionsfaktoren über PCR- (*engl. Polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion) Verfahren interessant gewesen, um die Ergebnisse, die über die Durchflusszytometrie generiert wurden, zu untermauern. Dies könnte in Zukunft ergänzt werden.

Das zweite Messverfahren ist der B-Zell-ELISpot Assay. Es gilt als eine sehr sensitive Methode zur Darstellung von Antikörper-sezernierenden B-Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierunter das periphere Blut von fünf Stammzellspendern vor und nach G-CSF-Mobilisierungstherapie und drei ungepaarte Knochenmarksproben untersucht. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass der Stichprobenumfang zu klein war, um Unterschiede zum Knochenmark herauszustellen. Dies sollte in Zukunft weitergeführt und ergänzt werden.

Bei allen Untersuchungen zu dieser Arbeit wäre es interessant gewesen gepaarte Knochenmarksproben zu analysieren. Leider ist dies praktisch nicht umzusetzen, da eine Knochenmarkspunktion ein invasives Verfahren darstellt, welches Risiken birgt, die ansonsten gesunde Stammzellspender unnötig gefährden könnte. Bezüglich des Proliferationsverhaltens von B-Zellen konnten hier Tendenzen aufgezeigt werden. Es sollten allerdings weitere Versuche mit größeren Stichproben erfolgen, um aussagekräftige Ergebnisse zu liefern. Zudem waren die Untersuchungen zur Mobilisierung antigenspezifischer T- und B-Zellen auf eine kleine Anzahl an Antigenen beschränkt, die für weitere Versuche auf andere Antigene ausgeweitet werden sollten.

6 Fazit

Die Kenntnis über die Zusammensetzung des Stammzelltransplantats ist von besonderer Bedeutung, da sie den Therapieerfolg einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation mitbeeinflussen kann. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte die detaillierte phänotypische Charakterisierung der T-Helferzellen eine prozentuale und absolute Erniedrigung von TH1-Zellen. TH2-Zellen erfuhren eine absolute Steigerung ihrer Zellzahl. Dieses Bild ähnelte dem im Knochenmark. Diese Ergebnisse spiegelten sich auf funktioneller Ebene, über die Sekretion von $\text{IFN}\gamma$, IL-17 und $\text{TNF}\alpha$ nicht wider und der TH1 zu TH2 *Shift*, in der Literatur mehrmals beschrieben, konnte somit nicht bestätigt werden. Es gab keinen Rückgang der $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden T-Zellen, was dafür sprechen könnte, dass TH1-Zellen eventuell aus dem Knochenmark oder anderen sekundär lymphatischen Organen mobilisiert wurden, sich ihr Phänotyp jedoch womöglich änderte. Ob sich das über direkte Effekte von G-CSF erklärt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert und kann zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden. Der Rückgang von CXCR3 nach G-CSF-Mobilisierungstherapie von Stammzellspendern (in vivo Versuch) wurde in der Literatur bereits beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit fand der starke Rückgang bestimmter Subpopulationen, wie TH1-Zellen, die CXCR3 positiv sind, sowohl prozentual als auch absolut statt. Die Diskrepanz zur funktionellen Charakterisierung, wonach $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IFN}\gamma$ -positive T-Zellen nach G-CSF-Mobilisierungstherapie vorzufinden sind könnte auf direkte Effekte von G-CSF auf den Chemokinrezeptoren hindeuten, weitere in vitro Versuche mit G-CSF müssten dies allerdings noch bestätigen.

B-Zellen erfuhren nach der G-CSF-Mobilisierungstherapie der Spender eine Verdopplung ihrer Zellzahl, sie könnten aus dem KM mobilisiert worden sein. B-Zellen machten im KM um die 20% der Lymphozyten aus. Die naiven folliculären B-Zellen erfuhren beispielsweise ebenfalls eine absolute Verdopplung ihrer Zellzahl nach G-CSF-Mobilisierungstherapie. Im KM waren sie allerdings verglichen zu den PBMCs der Spender vor G-CSF-Mobilisierungstherapie signifikant weniger vorhanden. So kann es sein, dass diese Zellen ebenso aus sekundär lymphatischen Organen, wie der Milz und Lymphknoten mobilisiert worden sein könnten. Wie bereits in Kapitel 5.5 erwähnt, stellen naive folliculäre B-Zellen eine der Hauptpopulationen der B-Zellen im Blut und sekundären lymphatischen Organen dar. Hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der B-Zellen bei Spendern nach G-CSF-Mobilisationstherapie gab es zwar eine tendenzielle

Erhöhung, eine endgültige Aussage aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs und der großen individuellen Schwankungen bleibt zu diesem Zeitpunkt aus.

7 Ausblick

In dieser Arbeit konnten bereits zahlreiche Erkenntnisse zur Zusammensetzung des Stammzelltransplantats im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation gewonnen werden. Im Rahmen der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von B- und T-Zellen konnten Unterschiede zum KM herausgearbeitet werden.

Aufgrund der teilweise zu niedrigen Anzahl an Probanden, sollten weitere Untersuchungen, basierend auf den hier gewonnenen Daten angestrebt werden. Eine weitergehende Bewertung des T-Helferzellstatus wäre weiterhin von besonderem Interesse.

Eine phänotypische Charakterisierung mithilfe der genannten Chemokinrezeptoren im Rahmen der hämatopoetischen SZT, mit dem Einsatz von G-CSF, wäre aufgrund der vermeintlichen Effekte von G-CSF auf diese Chemokinrezeptoren nicht weiter ratsam. Hier bietet sich vor allem die funktionelle Charakterisierung von T-Helferzellen an. So empfiehlt es sich, die Bestimmung weiterer Zytokine, wie IL-4, IL-22 vorzunehmen, die unter anderem von TH2-Zellen sezerniert werden und die jeweiligen Transkriptionsfaktoren parallel zu bestimmen.

Hinsichtlich der Mobilisierung antigenspezifischer T-Zellen konnte ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Anstieg der CD4⁺ CD154⁺ T-Zellen nach G-CSF-Mobilisierungstherapie, nach in vitro-Stimulation beobachtet werden. Weitere Untersuchungen, so auch mit einer größeren Stichprobe und dem Hinzuziehen weiterer Antigene sollten erfolgen, um diese Ergebnisse zu überprüfen.

Aufgrund des vermehrten Auftretens bestimmter Zellgruppen nach der G-CSF-Mobilisierung, wie u.a. von naiven T-Zellen oder folliculären naiven B-Zellen, doppelt negativen B-Zellen, könnten andere Gewebe neben dem KM, wie die Milz, Lymphknoten oder die Haut als weitere Quellen für mobilisierte Zellen angenommen werden. Diese sollten in Zukunft in die Untersuchungen miteingeschlossen werden.

Zudem sollten Versuche, welche das Proliferations- und Apoptoseverhalten von T- und B-Zellen untersuchen, in einem größeren Umfang durchgeführt werden. Hierbei sollten zudem in vitro-Versuche mit G-CSF ausgebaut werden, um direkte Effekte von G-CSF auf T- und B-Zell-Subpopulationen weiter herauszustellen. In diesem Kontext sollte über weitere immunologische Untersuchungen die G-CSF-Mobilisierungstherapie mit anderen Regimen, wie der Mobilisierung von Stammzellen über die Applikation von CXCR4-Antagonisten, wie Plerixafor verglichen werden, um mögliche Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden aufzuzeigen.

8 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch, R., ed. *Taschenlehrbuch Histologie*. Vol. 4. 2012. 694.
2. Kamradt, T. and N.A. Mitchison, *Tolerance and autoimmunity*. N Engl J Med, 2001. **344**(9): p. 655-64.
3. Nutt, S.L. and D.M. Tarlinton, *Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends?* Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 472-7.
4. Jung, A.C. and D.S. Paauw, *Diagnosing HIV-related disease: using the CD4 count as a guide*. J Gen Intern Med, 1998. **13**(2): p. 131-6.
5. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
6. Romagnani, S., *The Th1/Th2 paradigm*. Immunol Today, 1997. **18**(6): p. 263-6.
7. Korn, T., M. Oukka, V. Kuchroo, and E. Bettelli, *Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties*. Semin Immunol, 2007. **19**(6): p. 362-71.
8. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
9. Crotty, S., *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 621-63.
10. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
11. Nizzoli, G., J. Krietsch, A. Weick, S. Steinfeldler, F. Facciotti, P. Gruarin, A. Bianco, B. Steckel, M. Moro, M. Crosti, C. Romagnani, K. Stolzel, S. Torretta, L. Pignataro, C. Scheibenbogen, P. Neddermann, R. De Francesco, S. Abrignani, and J. Geginat, *Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses*. Blood, 2013. **122**(6): p. 932-42.
12. Shortman, K. and W.R. Heath, *The CD8+ dendritic cell subset*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 18-31.
13. Robinson, D.S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsiocopoulos, J. Barkans, A.M. Bentley, C. Corrigan, S.R. Durham, and A.B. Kay, *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 298-304.
14. Messi, M., I. Giacchetto, K. Nagata, A. Lanzavecchia, G. Natoli, and F. Sallusto, *Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 78-86.
15. Peine, M., S. Rausch, C. Helmstetter, A. Frohlich, A.N. Hegazy, A.A. Kuhl, C.G. Grevelding, T. Hofer, S. Hartmann, and M. Lohning, *Stable T-bet(+)/GATA-3(+)/Th1/Th2 hybrid cells arise in vivo, can develop directly from naive precursors, and limit immunopathologic inflammation*. PLoS Biol, 2013. **11**(8): p. e1001633.
16. Suto, A., D. Kashiwakuma, S. Kagami, K. Hirose, N. Watanabe, K. Yokote, Y. Saito, T. Nakayama, M.J. Grusby, I. Iwamoto, and H. Nakajima, *Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells*. J Exp Med, 2008. **205**(6): p. 1369-79.
17. Wei, L., A. Laurence, K.M. Elias, and J.J. O'Shea, *IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 34605-10.
18. Ma, C.S., S. Suryani, D.T. Avery, A. Chan, R. Nanan, B. Santner-Nanan, E.K. Deenick, and S.G. Tangye, *Early commitment of naive human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12*. Immunol Cell Biol, 2009. **87**(8): p. 590-600.

19. Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp, and R. Forster, *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production.* J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1545-52.
20. Johnston, R.J., A.C. Poholek, D. DiToro, I. Yusuf, D. Eto, B. Barnett, A.L. Dent, J. Craft, and S. Crotty, *Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation.* Science, 2009. **325**(5943): p. 1006-10.
21. Linterman, M.A., L. Beaton, D. Yu, R.R. Ramiscal, M. Srivastava, J.J. Hogan, N.K. Verma, M.J. Smyth, R.J. Rigby, and C.G. Vinuesa, *IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses.* J Exp Med, 2010. **207**(2): p. 353-63.
22. Nurieva, R.I., Y. Chung, D. Hwang, X.O. Yang, H.S. Kang, L. Ma, Y.H. Wang, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong, *Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages.* Immunity, 2008. **29**(1): p. 138-49.
23. Tan, A.H., S.C. Wong, and K.P. Lam, *Regulation of mouse inducible costimulator (ICOS) expression by Fyn-NFATc2 and ERK signaling in T cells.* J Biol Chem, 2006. **281**(39): p. 28666-78.
24. Linterman, M.A., R.J. Rigby, R. Wong, D. Silva, D. Withers, G. Anderson, N.K. Verma, R. Brink, A. Hutloff, C.C. Goodnow, and C.G. Vinuesa, *Roquin differentiates the specialized functions of duplicated T cell costimulatory receptor genes CD28 and ICOS.* Immunity, 2009. **30**(2): p. 228-41.
25. Yusuf, I., R. Kageyama, L. Monticelli, R.J. Johnston, D. Ditoro, K. Hansen, B. Barnett, and S. Crotty, *Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150).* J Immunol, 2010. **185**(1): p. 190-202.
26. Haynes, N.M., C.D. Allen, R. Lesley, K.M. Ansel, N. Killeen, and J.G. Cyster, *Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation.* J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5099-108.
27. Johansson-Lindbom, B., S. Ingvarsson, and C.A. Borrebaeck, *Germinal centers regulate human Th2 development.* J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1657-66.
28. Klein, U. and R. Dalla-Favera, *Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 22-33.
29. Han, S., K. Hathcock, B. Zheng, T.B. Kepler, R. Hodes, and G. Kelsoe, *Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers.* J Immunol, 1995. **155**(2): p. 556-67.
30. Renshaw, B.R., W.C. Fanslow, 3rd, R.J. Armitage, K.A. Campbell, D. Liggitt, B. Wright, B.L. Davison, and C.R. Maliszewski, *Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice.* J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1889-900.
31. Yellin, M.J., K. Sippel, G. Inghirami, L.R. Covey, J.J. Lee, J. Sinning, E.A. Clark, L. Chess, and S. Lederman, *CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function.* J Immunol, 1994. **152**(2): p. 598-608.
32. Ivanov, II, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman, *The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.* Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
33. Unutmaz, D., *RORC2: the master of human Th17 cell programming.* Eur J Immunol, 2009. **39**(6): p. 1452-5.

34. Ma, C.S., G.Y. Chew, N. Simpson, A. Priyadarshi, M. Wong, B. Grimbacher, D.A. Fulcher, S.G. Tangye, and M.C. Cook, *Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1551-7.
35. Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 942-9.
36. Cosmi, L., R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato, *Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor*. J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1903-16.
37. Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani, *Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 639-46.
38. Sallusto, F., C.E. Zielinski, and A. Lanzavecchia. *Human Th17 subsets*. Eur J Immunol 2012 Sep [cited 42 9]; 2215-20].
39. Duhon, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 857-63.
40. Trifari, S., C.D. Kaplan, E.H. Tran, N.K. Crellin, and H. Spits, *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 864-71.
41. Eyerich, S., J. Wagener, V. Wenzel, C. Scarponi, D. Pennino, C. Albanesi, M. Schaller, H. Behrendt, J. Ring, C.B. Schmidt-Weber, A. Cavani, M. Mempel, C. Traidl-Hoffmann, and K. Eyerich, *IL-22 and TNF-alpha represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with Candida albicans*. Eur J Immunol, 2011. **41**(7): p. 1894-901.
42. Eyerich, S., K. Eyerich, D. Pennino, T. Carbone, F. Nasorri, S. Pallotta, F. Cianfarani, T. Odorisio, C. Traidl-Hoffmann, H. Behrendt, S.R. Durham, C.B. Schmidt-Weber, and A. Cavani, *Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3573-85.
43. von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, *T-cell function and migration. Two sides of the same coin*. N Engl J Med, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
44. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia, *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
45. Campbell, J.J., E.P. Bowman, K. Murphy, K.R. Youngman, M.A. Siani, D.A. Thompson, L. Wu, A. Zlotnik, and E.C. Butcher, *6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7*. J Cell Biol, 1998. **141**(4): p. 1053-9.
46. Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp, *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
47. Campbell, J.J., K.E. Murphy, E.J. Kunkel, C.E. Brightling, D. Soler, Z. Shen, J. Boisvert, H.B. Greenberg, M.A. Vierra, S.B. Goodman, M.C. Genovese, A.J. Wardlaw, E.C. Butcher, and L. Wu, *CCR7 expression and memory T cell diversity in humans*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 877-84.

48. Dunbar, P.R., C.L. Smith, D. Chao, M. Salio, D. Shepherd, F. Mirza, M. Lipp, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, A. Evans, R. Russell-Jones, A.L. Harris, and V. Cerundolo, *A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6644-52.
49. Valmori, D., C. Scheibenbogen, V. Dutoit, D. Nagorsen, A.M. Asemissen, V. Rubio-Godoy, D. Rimoldi, P. Guillaume, P. Romero, D. Schadendorf, M. Lipp, P.Y. Dietrich, E. Thiel, J.C. Cerottini, D. Lienard, and U. Keilholz, *Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1743-50.
50. Sallusto, F., A. Lanzavecchia, and C.R. Mackay, *Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses*. Immunol Today, 1998. **19**(12): p. 568-74.
51. Schaerli, P., K. Willimann, A.B. Lang, M. Lipp, P. Loetscher, and B. Moser, *CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1553-62.
52. Kim, C.H., L.S. Rott, I. Clark-Lewis, D.J. Campbell, L. Wu, and E.C. Butcher, *Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(12): p. 1373-81.
53. Kaminski, D.A., C. Wei, Y. Qian, A.F. Rosenberg, and I. Sanz, *Advances in human B cell phenotypic profiling*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 302.
54. Melchers, F., E. ten Boekel, T. Seidl, X.C. Kong, T. Yamagami, K. Onishi, T. Shimizu, A.G. Rolink, and J. Andersson, *Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 33-46.
55. Rolink, A.G., C. Schaniel, J. Andersson, and F. Melchers, *Selection events operating at various stages in B cell development*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(2): p. 202-7.
56. Warnatz, K. and M. Schlesier, *Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency*. Cytometry B Clin Cytom, 2008. **74**(5): p. 261-71.
57. Rolink, A.G., J. Andersson, and F. Melchers, *Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity*. Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3738-48.
58. Loder, F., B. Mutschler, R.J. Ray, C.J. Paige, P. Sideras, R. Torres, M.C. Lamers, and R. Carsetti, *B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals*. J Exp Med, 1999. **190**(1): p. 75-89.
59. Allman, D., R.C. Lindsley, W. DeMuth, K. Rudd, S.A. Shinton, and R.R. Hardy, *Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6834-40.
60. Mackay, F., P. Schneider, P. Rennert, and J. Browning, *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 231-64.
61. Ng, L.G., A.P. Sutherland, R. Newton, F. Qian, T.G. Cachero, M.L. Scott, J.S. Thompson, J. Wheway, T. Chtanova, J. Groom, I.J. Sutton, C. Xin, S.G. Tangye, S.L. Kalled, F. Mackay, and C.R. Mackay, *B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 807-17.
62. Meyer-Bahlburg, A., S.F. Andrews, K.O. Yu, S.A. Porcelli, and D.J. Rawlings, *Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation*. J Exp Med, 2008. **205**(1): p. 155-68.

63. Carsetti, R., M.M. Rosado, and H. Wardmann, *Peripheral development of B cells in mouse and man*. Immunol Rev, 2004. **197**: p. 179-91.
64. Weller, S., M.C. Braun, B.K. Tan, A. Rosenwald, C. Cordier, M.E. Conley, A. Plebani, D.S. Kumararatne, D. Bonnet, O. Tournilhac, G. Tchernia, B. Steiniger, L.M. Staudt, J.L. Casanova, C.A. Reynaud, and J.C. Weill, *Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3647-54.
65. Carsetti, R., M.M. Rosado, S. Donnanno, V. Guazzi, A. Soresina, A. Meini, A. Plebani, F. Aiuti, and I. Quinti, *The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(2): p. 412-7.
66. Goodnow, C.C., C.G. Vinuesa, K.L. Randall, F. Mackay, and R. Brink, *Control systems and decision making for antibody production*. Nat Immunol, 2010. **11**(8): p. 681-8.
67. MacLennan, I.C., *Germinal centers still hold secrets*. Immunity, 2005. **22**(6): p. 656-7.
68. Liu, Y.J. and J. Banchereau, *Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells*. Semin Immunol, 1997. **9**(4): p. 235-40.
69. Arpin, C., J. Dechanet, C. Van Kooten, P. Merville, G. Grouard, F. Briere, J. Banchereau, and Y.J. Liu, *Generation of memory B cells and plasma cells in vitro*. Science, 1995. **268**(5211): p. 720-2.
70. Liu, Y.J., C. Arpin, O. de Bouteiller, C. Guret, J. Banchereau, H. Martinez-Valdez, and S. Lebecque, *Sequential triggering of apoptosis, somatic mutation and isotype switch during germinal center development*. Semin Immunol, 1996. **8**(3): p. 169-77.
71. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers, *Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells*. J Exp Med, 1998. **188**(9): p. 1679-89.
72. Warnatz, K., A. Denz, R. Drager, M. Braun, C. Groth, G. Wolff-Vorbeck, H. Eibel, M. Schlesier, and H.H. Peter, *Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)/IgM(-)/IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1544-51.
73. Klein, U., R. Kuppers, and K. Rajewsky, *Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1288-98.
74. Berkowska, M.A., G.J. Driessen, V. Bikos, C. Grosserichter-Wagener, K. Stamatopoulos, A. Cerutti, B. He, K. Biermann, J.F. Lange, M. van der Burg, J.J. van Dongen, and M.C. van Zelm, *Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2150-8.
75. Wu, Y.C., D. Kipling, and D.K. Dunn-Walters, *The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood*. Front Immunol, 2011. **2**: p. 81.
76. Wirths, S. and A. Lanzavecchia, *ABCBI transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells*. Eur J Immunol, 2005. **35**(12): p. 3433-41.
77. MacLennan, I.C., K.M. Toellner, A.F. Cunningham, K. Serre, D.M. Sze, E. Zuniga, M.C. Cook, and C.G. Vinuesa, *Extrafollicular antibody responses*. Immunol Rev, 2003. **194**: p. 8-18.
78. Bernasconi, N.L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia, *Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2199-202.
79. Mauri, C. and A. Bosma, *Immune regulatory function of B cells*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 221-41.

80. Flores-Borja, F., A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M.R. Ehrenstein, D.A. Isenberg, and C. Mauri, *CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(173): p. 173ra23.
81. Benekou, K. and S. Montoto, *Role of stem cell transplant in lymphoma in the era of new drugs*. *Curr Opin Oncol*, 2017.
82. Hari, P.N. and P.L. McCarthy, *Multiple myeloma: future directions in autologous transplantation and novel agents*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2013. **19**(1 Suppl): p. S20-5.
83. Cavazzana-Calvo, M., I. Andre-Schmutz, and A. Fischer, *Haematopoietic stem cell transplantation for SCID patients: where do we stand?* *Br J Haematol*, 2013. **160**(2): p. 146-52.
84. Parmar, S. and D.S. Ritchie, *Allogeneic transplantation as anticancer immunotherapy*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **27**: p. 38-45.
85. Russell, N.H. and J.L. Byrne, *Allogeneic transplantation using peripheral blood stem cells*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2001. **14**(4): p. 685-700.
86. Favre, G., M. Beksac, A. Bacigalupo, T. Ruutu, A. Nagler, E. Gluckman, N. Russell, J. Apperley, J. Szer, K. Bradstock, A. Buzyn, J. Matcham, A. Gratwohl, N. Schmitz, B. European Group for, and T. Marrow, *Differences between graft product and donor side effects following bone marrow or stem cell donation*. *Bone Marrow Transplant*, 2003. **32**(9): p. 873-80.
87. Panse, J.P., S. Heimfeld, K.A. Guthrie, M.B. Maris, D.G. Maloney, B.B. Baril, M.T. Little, T.R. Chauncey, B.E. Storer, R. Storb, and B.M. Sandmaier, *Allogeneic peripheral blood stem cell graft composition affects early T-cell chimaerism and later clinical outcomes after non-myeloablative conditioning*. *Br J Haematol*, 2005. **128**(5): p. 659-67.
88. Kwak, L.W., R. Pennington, and D.L. Longo, *Active immunization of murine allogeneic bone marrow transplant donors with B-cell tumor-derived idotype: a strategy for enhancing the specific antitumor effect of marrow grafts*. *Blood*, 1996. **87**(7): p. 3053-60.
89. Ljungman, P., R. Brand, H. Einsele, F. Frassoni, D. Niederwieser, and C. Cordonnier, *Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis*. *Blood*, 2003. **102**(13): p. 4255-60.
90. Peggs, K.S., S. Verfuert, A. Pizzey, N. Khan, M. Guiver, P.A. Moss, and S. Mackinnon, *Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines*. *Lancet*, 2003. **362**(9393): p. 1375-7.
91. Scheinberg, P., J.J. Melenhorst, J.M. Brenchley, B.J. Hill, N.F. Hensel, P.K. Chattopadhyay, M. Roederer, L.J. Picker, D.A. Price, A.J. Barrett, and D.C. Douek, *The transfer of adaptive immunity to CMV during hematopoietic stem cell transplantation is dependent on the specificity and phenotype of CMV-specific T cells in the donor*. *Blood*, 2009. **114**(24): p. 5071-80.
92. Peggs, K.S., K. Thomson, E. Samuel, G. Dyer, J. Armoogum, R. Chakraverty, K. Pang, S. Mackinnon, and M.W. Lowdell, *Directly selected cytomegalovirus-reactive donor T cells confer rapid and safe systemic reconstitution of virus-specific immunity following stem cell transplantation*. *Clin Infect Dis*, 2011. **52**(1): p. 49-57.
93. Melenhorst, J.J., A.M. Leen, C.M. Bollard, M.F. Quigley, D.A. Price, C.M. Rooney, M.K. Brenner, A.J. Barrett, and H.E. Heslop, *Allogeneic virus-specific T cells with HLA allelreactivity do not produce GVHD in human subjects*. *Blood*, 2010. **116**(22): p. 4700-2.
94. Chevallier, P., N. Robillard, M. Illiaquer, J. Esbelin, M. Mohty, C. Bodin-Bressollette, T. Guillaume, V. Stocco, F. Auffray, S. Derenne, L. Planche, M.C. Bene, and B.M. Imbert-

- Marcille, *Characterization of various blood and graft sources: a prospective series*. Transfusion, 2013. **53**(9): p. 2020-6.
95. Bendall, L.J. and K.F. Bradstock, *G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(4): p. 355-67.
 96. Lieschke, G.J., D. Grail, G. Hodgson, D. Metcalf, E. Stanley, C. Cheers, K.J. Fowler, S. Basu, Y.F. Zhan, and A.R. Dunn, *Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization*. Blood, 1994. **84**(6): p. 1737-46.
 97. Cebon, J., J.E. Layton, D. Maher, and G. Morstyn, *Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection*. Br J Haematol, 1994. **86**(2): p. 265-74.
 98. Kawakami, M., H. Tsutsumi, T. Kumakawa, H. Abe, M. Hirai, S. Kurosawa, M. Mori, and M. Fukushima, *Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections*. Blood, 1990. **76**(10): p. 1962-4.
 99. Colotta, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani, and A. Mantovani, *Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products*. Blood, 1992. **80**(8): p. 2012-20.
 100. Dale, D.C., A.A. Bolyard, B.G. Schwinger, G. Pracht, M.A. Bonilla, L. Boxer, M.H. Freedman, J. Donadieu, G. Kannourakis, B.P. Alter, B.P. Cham, J. Winkelstein, S.E. Kinsey, C. Zeidler, and K. Welte, *The Severe Chronic Neutropenia International Registry: 10-Year Follow-up Report*. Support Cancer Ther, 2006. **3**(4): p. 220-31.
 101. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
 102. Levesque, J.P., Y. Takamatsu, S.K. Nilsson, D.N. Haylock, and P.J. Simmons, *Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1289-97.
 103. Levesque, J.P., J. Hendy, Y. Takamatsu, P.J. Simmons, and L.J. Bendall, *Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide*. J Clin Invest, 2003. **111**(2): p. 187-96.
 104. Broxmeyer, H.E., C.M. Orschell, D.W. Clapp, G. Hangoc, S. Cooper, P.A. Plett, W.C. Liles, X. Li, B. Graham-Evans, T.B. Campbell, G. Calandra, G. Bridger, D.C. Dale, and E.F. Srouf, *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist*. J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1307-18.
 105. Chow, A., D. Lucas, A. Hidalgo, S. Mendez-Ferrer, D. Hashimoto, C. Scheiermann, M. Battista, M. Leboeuf, C. Prophete, N. van Rooijen, M. Tanaka, M. Merad, and P.S. Frenette, *Bone marrow CD169⁺ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche*. J Exp Med, 2011. **208**(2): p. 261-71.
 106. Winkler, I.G., N.A. Sims, A.R. Pettit, V. Barbier, B. Nowlan, F. Helwani, I.J. Poulton, N. van Rooijen, K.A. Alexander, L.J. Raggatt, and J.P. Levesque, *Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs*. Blood, 2010. **116**(23): p. 4815-28.
 107. Ferraro, F., S. Lymperi, S. Mendez-Ferrer, B. Saez, J.A. Spencer, B.Y. Yeap, E. Masselli, G. Graiani, L. Prezioso, E.L. Rizzini, M. Mangoni, V. Rizzoli, S.M. Sykes, C.P. Lin, P.S. Frenette, F. Quaini, and D.T. Scadden, *Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function*. Sci Transl Med, 2011. **3**(104): p. 104ra101.
 108. Juarez, J.G., N. Harun, M. Thien, R. Welschinger, R. Baraz, A.D. Pena, S.M. Pitson, M. Rettig, J.F. DiPersio, K.F. Bradstock, and L.J. Bendall, *Sphingosine-1-phosphate*

- facilitates trafficking of hematopoietic stem cells and their mobilization by CXCR4 antagonists in mice.* Blood, 2012. **119**(3): p. 707-16.
109. Ratajczak, M.Z., H. Lee, M. Wysoczynski, W. Wan, W. Marlicz, M.J. Laughlin, M. Kucia, A. Janowska-Wieczorek, and J. Ratajczak, *Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex.* Leukemia, 2010. **24**(5): p. 976-85.
 110. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview.* Curr Protoc Immunol, 2018. **120**: p. 511-511.
 111. Sun, L.X., H.Y. Ren, Y.J. Shi, L.H. Wang, and Z.X. Qiu, *Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor significantly decreases the expression of CXCR3 and CCR6 on T cells and preferentially induces T helper cells to a T helper 17 phenotype in peripheral blood harvests.* Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(7): p. 835-43.
 112. Westermann, J. and R. Pabst, *Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body.* Clin Investig, 1992. **70**(7): p. 539-44.
 113. Krenger, W. and J.L. Ferrara, *Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm.* Immunol Res, 1996. **15**(1): p. 50-73.
 114. Lafaille, J.J., *The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases.* Cytokine Growth Factor Rev, 1998. **9**(2): p. 139-51.
 115. Gately, M.K., L.M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D.H. Presky, *The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 495-521.
 116. Krenger, W., K.M. Snyder, J.C. Byon, G. Falzarano, and J.L. Ferrara, *Polarized type 2 alloreactive CD4+ and CD8+ donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease.* J Immunol, 1995. **155**(2): p. 585-93.
 117. Zielinski, C.E., F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta.* Nature, 2012. **484**(7395): p. 514-8.
 118. Bahr, F., R. Wehner, U. Platzbecker, M. Wermke, N. Shayegi, J.M. Middeke, C. Rollig, J. Schetelig, G. Ehninger, M. Schmitz, M. Bornhauser, and S. Tuve, *Reconstitution of interleukin-17-producing T helper cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(3): p. 357-65.
 119. Gartlan, K.H., H. Bommiasamy, K. Paz, A.N. Wilkinson, M. Owen, D.K. Reichenbach, T. Banovic, K. Wehner, F. Buchanan, A. Varelias, R.D. Kuns, K. Chang, Y. Fedoriw, T. Shea, J. Coghill, M. Zaiken, M.W. Plank, P.S. Foster, A.D. Clouston, B.R. Blazar, J.S. Serody, and G.R. Hill, *A critical role for donor-derived IL-22 in cutaneous chronic GVHD.* Am J Transplant, 2018. **18**(4): p. 810-820.
 120. Barthelemy, A., V. Sencio, D. Soulard, L. Deruyter, C. Faveeuw, R. Le Goffic, and F. Trottein, *Interleukin-22 immunotherapy during severe influenza enhances lung tissue integrity and reduces secondary bacterial systemic invasion.* Infect Immun, 2018.
 121. McDonald-Hyman, C., R. Flynn, A. Panoskaltis-Mortari, N. Peterson, K.P. MacDonald, G.R. Hill, L. Luznik, J.S. Serody, W.J. Murphy, I. Maillard, D.H. Munn, L.A. Turka, J. Koreth, C.S. Cutler, R.J. Soiffer, J.H. Antin, J. Ritz, and B.R. Blazar, *Therapeutic regulatory T-cell adoptive transfer ameliorates established murine chronic GVHD in a CXCR5-dependent manner.* Blood, 2016. **128**(7): p. 1013-7.
 122. Zou, L., B. Barnett, H. Safah, V.F. Larussa, M. Evdemon-Hogan, P. Mottram, S. Wei, O. David, T.J. Curiel, and W. Zou, *Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory*

- T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals.* Cancer Res, 2004. **64**(22): p. 8451-5.
123. Mensen, A., K. Johrens, I. Anagnostopoulos, S. Demski, M. Oey, A. Stroux, P. Hemmati, J. Westermann, O. Blau, F. Wittenbecher, K. Movassaghi, M. Szyska, S. Thomas, B. Dorken, C. Scheibenbogen, R. Arnold, and I.K. Na, *Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT.* Blood, 2014. **124**(6): p. 963-72.
 124. Avanzini, M.A., F. Locatelli, C. Dos Santos, R. Maccario, E. Lenta, M. Oliveri, S. Giebel, P. De Stefano, F. Rossi, G. Giorgiani, G. Amendola, S. Telli, and M. Marconi, *B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells.* Exp Hematol, 2005. **33**(4): p. 480-6.
 125. Flynn, R., J. Du, R.G. Veenstra, D.K. Reichenbach, A. Panoskaltis-Mortari, P.A. Taylor, G.J. Freeman, J.S. Serody, W.J. Murphy, D.H. Munn, S. Sarantopoulos, L. Luznik, I. Maillard, J. Koreth, C. Cutler, R.J. Soiffer, J.H. Antin, J. Ritz, J.A. Dubovsky, J.C. Byrd, K.P. MacDonald, G.R. Hill, and B.R. Blazar, *Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans.* Blood, 2014. **123**(25): p. 3988-98.
 126. Knorr, D.A., H. Wang, M. Aurora, M.L. MacMillan, S.G. Holtan, R. Bergerson, Q. Cao, D.J. Weisdorf, S. Cooley, C. Brunstein, J.S. Miller, J.E. Wagner, B.R. Blazar, and M.R. Verneris, *Loss of T Follicular Helper Cells in the Peripheral Blood of Patients with Chronic Graft-versus-Host Disease.* Biol Blood Marrow Transplant, 2016. **22**(5): p. 825-33.
 127. Cho, S.Y., H.J. Lee, and D.G. Lee, *Infectious complications after hematopoietic stem cell transplantation: current status and future perspectives in Korea.* Korean J Intern Med, 2018. **33**(2): p. 256-276.
 128. Lausen, B.F., L. Hougs, L. Schejbel, C. Heilmann, and T. Barington, *Human memory B cells transferred by allogeneic bone marrow transplantation contribute significantly to the antibody repertoire of the recipient.* J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3305-18.
 129. Frentsch, M., O. Arbach, D. Kirchhoff, B. Moewes, M. Worm, M. Rothe, A. Scheffold, and A. Thiel, *Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression.* Nat Med, 2005. **11**(10): p. 1118-24.
 130. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, K.A. Hjerrild, R.J. Armitage, K.H. Grabstein, K.B. Hennen, T. Farrah, W.C. Fanslow, E.M. Shevach, and M.R. Alderson, *Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens.* Eur J Immunol, 1993. **23**(7): p. 1643-8.
 131. Testi, R., J.H. Phillips, and L.L. Lanier, *T cell activation via Leu-23 (CD69).* J Immunol, 1989. **143**(4): p. 1123-8.
 132. Okhrimenko, A., J.R. Grun, K. Westendorf, Z. Fang, S. Reinke, P. von Roth, G. Wassilew, A.A. Kuhl, R. Kudernatsch, S. Demski, C. Scheibenbogen, K. Tokoyoda, M.A. McGrath, M.J. Raftery, G. Schonrich, A. Serra, H.D. Chang, A. Radbruch, and J. Dong, *Human memory T cells from the bone marrow are resting and maintain long-lasting systemic memory.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(25): p. 9229-34.
 133. Sloand, E.M., S. Kim, J.P. Maciejewski, F. Van Rhee, A. Chaudhuri, J. Barrett, and N.S. Young, *Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo.* Blood, 2000. **95**(7): p. 2269-74.
 134. Nawa, Y., T. Teshima, K. Sunami, Y. Hiramatsu, Y. Maeda, T. Yano, K. Shinagawa, F. Ishimaru, E. Omoto, and M. Harada, *G-CSF reduces IFN-gamma and IL-4 production by*

- T cells after allogeneic stimulation by indirectly modulating monocyte function.* Bone Marrow Transplantation, 2000. **25**(10): p. 1035-1040.
135. Schulenburg, A., M. Fischer, P. Kalhs, M. Mitterbauer, W. Rabitsch, H.T. Greinix, and G. Leitner, *Immune recovery after conventional and non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation.* Leuk Lymphoma, 2005. **46**(12): p. 1755-60.
136. Giesecke, C., D. Frolich, K. Reiter, H.E. Mei, I. Wirries, R. Kuhly, M. Killig, T. Glatzer, K. Stolzel, C. Perka, P.E. Lipsky, and T. Dorner, *Tissue distribution and dependence of responsiveness of human antigen-specific memory B cells.* J Immunol, 2014. **192**(7): p. 3091-100.
137. Streitz, M., T. Miloud, M. Kapinsky, M.R. Reed, R. Magari, E.K. Geissler, J.A. Hutchinson, K. Vogt, S. Schlickeiser, A.H. Kverneland, C. Meisel, H.D. Volk, and B. Sawitzki, *Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study.* Transplant Res, 2013. **2**(1): p. 17.
138. Maecker, H.T., J.P. McCoy, Jr., F.H.I. Consortium, M. Amos, J. Elliott, A. Gaigalas, L. Wang, R. Aranda, J. Banchereau, C. Boshoff, J. Braun, Y. Korin, E. Reed, J. Cho, D. Hafler, M. Davis, C.G. Fathman, W. Robinson, T. Denny, K. Weinhold, B. Desai, B. Diamond, P. Gregersen, P. Di Meglio, F.O. Nestle, M. Peakman, F. Villanova, J. Ferbas, E. Field, A. Kantor, T. Kawabata, W. Komocsar, M. Lotze, J. Nepom, H. Ochs, R. O'Lone, D. Phippard, S. Plevy, S. Rich, M. Roederer, D. Rotrosen, and J.H. Yeh, *A model for harmonizing flow cytometry in clinical trials.* Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 975-8.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katayoun Asadi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Veränderung der Verteilung von T-Helfer und B-Zell-Subpopulationen nach G-CSF-Mobilisierungstherapie/ Change in the distribution of T-helper and B-cell populations after G-CSF-Mobilization, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich als erstes bei Prof. Dr. med. Il-Kang Na bedanken. Sie hat mir die Möglichkeit gegeben unter sehr guter Betreuung in ihrer Arbeitsgruppe diese Dissertation zu verfassen. Ich habe dadurch sehr viele Einblicke in die Forschertätigkeit bekommen, insbesondere im Bereich der Tumorimmunologie. Durch die stets enge Betreuung, wurde mir bei praktischen und fachlichen Fragen immer weitergeholfen.

Ich danke Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen, so auch der gesamten Arbeitsgruppe Na und Scheibenbogen, dafür, dass sie stets ein sehr gutes Arbeitsumfeld geschaffen haben und, dass sie bei aufkommenden praktischen Fragen im Labor stets hilfsbereit waren.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Angela Mensen für die methodische Einarbeitung und weitere Hilfestellung und weiter an Sonya Becker, die mich bis zum Schluss meiner Tätigkeit im Labor begleitet und unterstützt hat. Sei es bei der Beschaffung der Proben, bei der Verarbeitung dieser im Labor, als auch bei der Auswertung meiner Ergebnisse, sie stand mir bei Fragen stets behilflich und geduldig zur Seite. Danken möchte ich zudem Mathias Streitz und Martin Szyska, die mich bei der Auswertung meiner Daten ebenfalls unterstützt haben.

Darüber hinaus möchte ich den Mitarbeitern der Stem Cell Facility und des Labor Berlins für die Bereitstellung der Proben und Erstellung der benötigten Differentialblutbilder danken.

Und nicht zuletzt danke ich allen beteiligten Spendern für das Teilnehmen an dieser Arbeit, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meiner ganzen Familie und Freunden danke ich aus tiefstem Herzen, sie unterstützen mich in allen Lebenslagen und sind immer für mich da.