

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rekonstitution des adaptiven Immunsystems nach
Immunablation und autologer hämatopoetischer
Stammzelltransplantation bei therapierefraktärem
systemischen Lupus erythematoses

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tobias Alexander

aus Halle/S.

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Falk Hiepe
2. Prof. Dr. med. Martin Aringer
3. Prof. Dr. med. Ina Kötter

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

A Zusammenfassung der Ergebnisse	4
1. Abstract.....	4
2. Einleitung.....	5
3. Material und Methoden.....	6
3.1. <i>Patienten</i>	6
3.2. <i>Stammzelltransplantation</i>	7
3.3. <i>Durchflusszytometrie</i>	7
3.4. <i>Analyse von T-Zell Rezeptor „Excisions Circles“ (TRECs)</i>	8
3.5. <i>Isolierung von regulatorischen T-Zellen und Migrationsassays</i>	8
3.6. <i>Statistik</i>	8
4. Ergebnisse.....	9
4.1. <i>Klinische und serologische Langzeitremissionen</i>	9
4.2. <i>Stabile Thymusreaktivierung</i>	9
4.3. <i>Regeneration von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen</i>	11
4.4. <i>Entwicklung eines diversen T-Zell-Rezeptor-Repertoires</i>	12
4.5. <i>Spezifität der CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen nach ASZT</i>	13
4.6. <i>Normalisierung der initial gestörten B-Zell Homöostase nach ASZT</i>	13
4.7. <i>Migration von Tregs zu hCG-exprimierenden Geweben</i>	14
5. Diskussion.....	16
5.1. <i>ASZT führt zu klinischen Langzeitremissionen bei SLE</i>	16
5.2. <i>Depletion des autoreaktiven Gedächtnisses nach ASZT</i>	16
5.3. <i>Rekonfigurierung des adaptiven Immunsystems nach ASZT</i>	17
5.4. <i>Migration von Tregs zu hCG-exprimierenden Geweben</i>	19
5.5. <i>Aktueller Stellenwert der ASZT bei Autoimmunerkrankungen</i>	20
6. Literaturverzeichnis.....	21
B Anteilserklärung	24
C Ausgewählte Publikationen	25
D Lebenslauf	26
E Komplette Publikationsliste	27
F Selbständigkeitserklärung	31
G Danksagung	32

A Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Abstract

Immunablation mit anschließender Transplantation autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation (ASZT) hat sich in den letzten Jahren zu einer erfolgversprechenden Therapieoption für Patienten mit schweren Verlaufsformen von Autoimmunerkrankungen entwickelt. Die zellulären Mechanismen die den klinischen Remissionen dabei zu Grunde liegen sind allerdings bislang nicht vollständig verstanden. Ziel der Arbeit war es deshalb, bei Patienten die eine ASZT für therapierefrakären systemischen Lupus erythematodes (SLE) erhielten, prospektiv die Rekonstitution des adaptiven Immunsystems zu analysieren.

Bei allen sieben SLE-Patienten, die an der Charité – Universitätsmedizin seit 1998 eine Immunablation mit anschließender ASZT erhielten, konnte eine klinische Remission erzielt werden. Damit verbunden zeigte sich eine Depletion des humoralen Gedächtnisses, gemessen am Verschwinden von Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörpern und einer signifikanten Reduktion protektiver Impftiter im Serum. Die Rekonstitution des adaptiven Immunsystems war gekennzeichnet durch eine *de novo* Generierung thymisch-naiver CD31⁺ CD45RA⁺ CD4⁺ T-Zellen mit hohem Anteil an T-Zell-Rezeptor Excision Circles (TRECs), Regeneration von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen und Normalisierung des initial eingeschränkten T-Zell-Rezeptor-Vβ-Repertoires. Zirkulierende CD4⁺ CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen wiesen nach ASZT eine Spezifität für virale Antigene, nicht aber für Lupus-spezifische Autoantigene (Nukleosomen, SmD1) auf. In ähnlicher Weise zeigte sich eine Normalisierung der initial gestörten B-Zell-Homöostase mit kompletter Regeneration des naiven (IgD⁺ CD27⁻) B-Zell-Kompartments innerhalb eines Jahres nach ASZT.

Die vorliegenden Daten verdeutlichen erstmalig, dass die klinischen Langzeitremissionen nach ASZT bei therapierefraktärem SLE mit einer Depletion des autoreaktiven immunologischen Gedächtnisses und der Neuentwicklung eines naiven, selbst-toleranten adaptiven Immunsystems im Sinne einer kompletten Reprogrammierung der immunologischen Uhr verbunden sind. Diese Ergebnisse unterstreichen das kurative Potential dieser Therapie und weisen darauf hin, dass chronische Autoimmunität zukünftig möglicherweise geheilt werden kann durch eine gezielte Eradikation von spezifischen Gedächtnis/Effektor-Zellen und einer Reaktivierung der Thymusaktivität.

2. Einleitung

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine chronische, schubweise verlaufende systemische Autoimmunerkrankung. Die Erkrankung ist charakterisiert durch die Entwicklung von Autoantikörpern, die gegen eine Vielzahl an nukleären Antigenen, z.B. Nukleosomen, Histonen oder Ribonukleoproteinen, gerichtet sind (1). Die klinischen Manifestationen der Erkrankung sind heterogen und können neben einem Haut- und Gelenkbefall auch chronisch-entzündliche Veränderungen an Nieren, Lunge, Herz oder zentralem Nervensystem umfassen.

Die Erkrankung entwickelt sich auf dem Boden einer genetischen Prädisposition durch initialen Verlust der peripheren Selbst-Toleranz während der Reifung des Immunsystems in früher Adoleszenz. Dieser Prozess ermöglicht die Aktivierung und Expansion autoreaktiver B- und T-Zell-Klone, die - unkontrolliert von intrinsischen Regulationsmechanismen - zu chronischen Autoimmunprozessen mit positiven „Feedback-loops“ führt (2). Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des SLE scheinen langlebige Plasmazellen zu spielen, die in speziellen Nischen im Knochenmark oder entzündeten Gewebe „eingenistet“ kontinuierlich Autoantikörper sezernieren und resistent gegenüber herkömmlichen Immunsuppressiva oder B-Zell-depletierenden Therapien sind (3;4). Auf T-Zell-Ebene wird ein Ungleichgewicht zwischen autoreaktiven Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Tregs) diskutiert, die im Schub der Erkrankung im peripheren Blut erniedrigt nachweisbar sind (5;6).

Standardtherapien für SLE zielen auf eine chronische, unspezifische Immunsuppression und sind nicht selten verbunden mit beträchtlichen Langzeit-Nebenwirkungen. Im Gegensatz dazu bietet die autologe Stammzelltransplantation, die seit 1996 weltweit bei therapierefraktären Autoimmunerkrankungen durchgeführt wird, die Möglichkeit einer dauerhaften Krankheitsremission, wobei die meisten Patienten nicht mehr auf die Fortführung einer chronischen Immunsuppression angewiesen sind. Die Rationale für den Einsatz der ASZT bei Autoimmunerkrankungen basiert auf der Annahme, dass die immunablative Chemotherapie das autoreaktive Gedächtnis komplett eliminieren kann und sich anschließend aus hämatopoetischen Vorläuferzellen ein naives, selbst-tolerantes Immunsystem entwickelt (7).

Ziel der wissenschaftlichen Untersuchungen war es, mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen prospektiv die Rekonstitution des adaptiven Immunsystems bei SLE-Patienten nach ASZT in Korrelation zum klinischen und serologischen Verlauf der Erkrankung zu untersuchen. Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

- Was sind die zellulären Grundlagen für Langzeitremissionen, die nach ASZT bei therapierefraktärem SLE erzielt werden können?
- Ist die ASZT tatsächlich verbunden mit einer Eradikation des autoreaktiven immunologischen Gedächtnisses?
- Welche Rolle spielt die Regeneration der Thymusaktivität nach ASZT für die stabile Erneuerung eines toleranten Immunsystems?
- Warum entwickeln sich Krankheitsrezidive nach ASZT und können Faktoren identifiziert werden die deren Entstehung begünstigen?

3. Material und Methoden

3.1. *Patienten*

Im Rahmen einer klinischen Phase I/II Studie erfolgte an der Charité seit 1998 eine autologe Stammzelltransplantation bei insgesamt 7 SLE-Patienten, die trotz des Einsatzes von Glukokortikoiden und mindestens zwei verschiedenen immunsuppressiven Therapien, einschließlich intravenösem Cyclophosphamid, weiterhin eine erhöhte Krankheitsaktivität aufwiesen. Zusätzlich kam diese Therapie zum Einsatz bei einer Patientin mit therapierefraktärer Polychondritis und 2 Patienten mit Multipler Sklerose (MS). Detaillierte Informationen zu Ein- und Ausschlusskriterien der klinischen Studie und zum individuellen Krankheitsverlauf der Patienten sind den Original-Publikation zu entnehmen (8-10). Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité genehmigt.

Für die Beurteilung der Krankheitsaktivität wurde der Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) herangezogen (11). Antinukleäre Antikörper (ANA) wurden mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests auf humanen Epithelzellen (HEp-2-Zellen) untersucht, die Bestimmung von Anti-dsDNA-Antikörpern erfolgte durch Enzyme-Linked Immunosorbant Assays (ELISA) und Crithidia-luciliae Immunofluoreszenz-Test (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz).

3.2. Stammzelltransplantation

Es erfolgte die Transplantation von mindestens 2×10^6 autologen hämatopoetischen CD34⁺ Stammzellen pro kg Körpergewicht nach Immunablation mit Cyclophosphamid (200mg/kg) und Anti-Thymozyten-Globulin (90mg/kg, Fresenius Biotech, Bad Homburg). Die Mobilisierung der CD34⁺ Stammzellen erfolgte mit Cyclophosphamid (2 g/m^2), gefolgt von täglicher subkutaner Gabe von $10 \mu\text{g/kg}$ „Granulocyte Colony-Stimulating Factor“ (G-CSF, Amgen, Thousand Oaks, CA). Die CD34-Selektionierung erfolgte mit dem CliniMACS[®] Cell Selection System (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) am Institut für Transfusionsmedizin der Charité.

3.3. Durchflusszytometrie

Die Leukozytenfraktion wurde aus heparinisiertem Vollblut durch Ficoll-Dichtezentrifugation (Pharmacia Biotec, Uppsala, Schweden) isoliert. Zur durchflusszytometrischen Analyse der T- und B-Zell-Subpopulationen am FACSCalibur[™] (BD Biosciences) wurden folgende Antikörper verwendet: anti-CD45 (2D1), anti-CD19 (SJ25C1), anti-CD20 (2H7), anti-IgD (IA6-2), anti-CD4 (SK3), anti-CD8 (SK1), anti-CD31 (MEC13.3), anti-CD45RA (L48), anti-CD45RO (UCHL-1) und anti-CD27 (2E4), alle (BD Biosciences, USA). Die FoxP3-Expression zur Identifizierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) erfolgte durchflusszytometrisch mit Hilfe des anti-humanen FoxP3 „Staining-Sets“ (eBioscience, San Diego, USA) und zusätzlicher Analyse des Oberflächenmarkers CD25 (2A3, BD Biosciences). Die Analyse der T-Zell-Rezeptor V β -Expression auf CD4⁺ T-Zellen erfolgte unter Verwendung von 22 TZR-V β -spezifischen Antikörpern (IOTest Beta Mark, Beckman Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich). Für *in vitro* Stimulations-Assays wurde 1ml Vollblut bei 37°C über 6 Stunden inkubiert in Anwesenheit von $1 \mu\text{g/ml}$ anti-CD28 (28.2, BD Pharmingen) und folgenden Antigenen: $1 \mu\text{g/ml}$ Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB) als Positivkontrolle (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), $20 \mu\text{g/ml}$ Nukleosomen (12), $10 \mu\text{g/ml}$ SmD1-Peptid (13), Varizella-Zoster-Virus (VZV) -Lysat and Cytomegalie-Virus (CMV) Lysat (Biodesign International, Cincinnati, Ohio). Nach Erythrozyten-Lyse (FACS Perm 2) und Permeabilisierung (FACS Lysing Solution, BD Biosciences) wurden Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert unter Verwendung folgender Antikörper: anti-CD154 (TRAP1), anti-CD69 (FN-50), anti-CD4 (RPA-T4), anti-CD14 (M5E2) und Interferon-gamma (IB27), alle erworben von BD Biosciences.

3.4. Analyse von T-Zell Rezeptor „Excisions Circles“ (TRECs)

Die Anzahl der T-Zell-Rezeptor „Excisions Circles“ (TRECs) wurde in Zusammenarbeit mit der Universität Greifswald in drei Patienten und vier gesunden Kontrollen mittels „Real-Time“-PCR unter Verwendung des ABI PRISM 7700 Sequence Detector TaqMan (PE Biosystems) ermittelt (10). Es wurden CD31⁺ bzw. CD31⁻ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD4⁺ T-Zellen mittels „Fluorescence Activated Cell Sorting“ isoliert am FACSDivaTM System (BD Biosciences). Die Reinheit der isolierten Zellpopulationen lag jeweils > 95%.

3.5. Isolierung von regulatorischen T-Zellen und Migrationsassays

Für Migrationsassays von regulatorischen T-Zellen (Tregs) zu hCG-exprimierendem Gewebe wurden CD25⁺ CD4⁺ Tregs aus dem Blut von schwangeren Frauen im zweiten Trimester mit magnetischen „beads“ mit einer Reinheit von 92 - 97% isoliert (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Durchschnittlich 82% dieser Zellen exprimierten FoxP3. Migrationsassays wurden durchgeführt in 24-Lochplatten (Costar, Bodenheim) die mit Zellen einer Chorionkarzimon-Zelllinie (JEG-3) oder Trophoblast-Zellen schwangerer Frauen mit vorzeitigem Schwangerschaftsabbruch (jeweils 1 x 10⁵ Zellen/well) über Nacht beschichtet wurden und Transwell-Einsätzen (8µm, BD Falcon) gefüllt mit jeweils 1 x 10⁴ isolierten Tregs in 1ml Opti-MEM-Medium. Als Kontrolle wurde eine Keratinozyten-Zelllinie (HaCat) verwendet. Nach Inkubation über 4, 8, 24 und 48 Stunden wurden die Zellen aus den Überständen der unteren Kammer mit PBS gewaschen und die Anzahl der migrierten Tregs durchflusszytometrisch analysiert am FACSCaliburTM (BD Biosciences).

3.6. Statistik

Die Frequenzen der T- and B-Zell-Subpopulation wurden mit Hilfe von CellQuest Software (BD, Franklin Lakes, NJ) ermittelt. Der t-Test wurde eingesetzt zum Vergleich (pro Patient und Immun-Parameter) von Daten vor und nach ASZT unter Verwendung von Graph Pad Prism 4 Software (Version 4.03, Graph Pad Software Inc.). Ein Mann-Whitney-Test wurde herangezogen zum Vergleich von Daten zwischen Patienten nach ASZT und gesunden Kontrollen bzw. SLE-Patienten unter konventioneller Therapie. Alle *P*-Werte waren zweiseitig, die statistische Signifikanz wurde auf Alpha = 0.05 gesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. *Klinische und serologische Langzeitremissionen*

Bei allen sieben SLE-Patienten konnte innerhalb der ersten 3 Monate nach ASZT eine komplette klinische Remission erzielt werden, definiert als Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) < 3. Eine Patientin verstarb 3 Monate nach Transplantation im Rahmen einer Transplantations-assoziierten Infektion (Aspergillose). Ein Patient entwickelte ein Krankheitsrezidiv 18 Monate nach Transplantation und verstarb 30 Monate nach ASZT im Rahmen einer SLE-assoziierten Lungenembolie. Bei den restlichen fünf Patienten zeigte sich bei einer Nachbeobachtungszeit von bis zu 8 Jahren nach ASZT trotz kompletter Beendigung der immunsuppressiven Therapie eine stabile klinische Krankheitsremission.

Bei allen Patienten fielen die initial erhöhten Titer von Anti-dsDNA-Antikörpern innerhalb von 3 Monaten nach ASZT auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze und waren auch im Verlauf nicht mehr nachweisbar, außer bei dem Patienten der ein Krankheitsrezidiv entwickelte. Zusätzlich zeigte sich bei allen Patienten ein signifikanter Abfall von protektiven Antikörper-Titern für Masern ($P=0.043$), Mumps ($P=0.028$), Tetanus ($P=0.048$), und Diphtherie ($P=0.049$) zum Zeitpunkt 1 Jahr nach ASZT verglichen mit den korrespondierenden Werten vor ASZT.

4.2. *Stabile Thymusreaktivierung*

In den ersten sechs Monaten nach ASZT war eine signifikante Expansion zirkulierender $CD4^+$ T-Zellen mit $CD45RO^+$ $CD45RA^-$ Gedächtnis-Phänotyp nachweisbar (median: 73.3% vs. 53.3% vor ASZT, Abbildung 1A) mit Verdopplung der absoluten Zellzahlen (median: 121/ μ l vs. 51/ μ l, $P=0.027$). Während naive $CD45RA^+$ $CD45RO^-$ $CD4^+$ T-Zellen zu diesem Zeitpunkt kaum in der Peripherie nachweisbar waren, kam es in der Folge zu einem kontinuierlichen Anstieg dieser Zellpopulation mit kompletter numerischer Regeneration 24 Monate nach ASZT mit signifikant höheren Zellzahlen als vor ASZT (median: 244/ μ l vs. 35/ μ l, $P=0.014$).

Um zu analysieren, ob diese phänotypisch naiven $CD45RA^+$ $CD45RO^-$ $CD4^+$ T-Zellen in der Peripherie in Folge einer homöostatischen Proliferation entstanden oder im Thymus neu generiert wurden, erfolgte die durchflusszytometrische Analyse des

Oberflächenmarkers CD31, als Surrogatmarker für „recent thymic emigrants“ (RTEs) (14). Sechs Monate nach ASZT lag die Koexpression von CD31 auf den zirkulierenden naiven $CD45RA^+ CD45RO^- CD4^+$ T-Zellen mit durchschnittlich 89.7% signifikant höher als bei den selben Patienten vor Transplantation (75.3%, $P=0.049$) und im Vergleich mit gesunden, gleichaltrigen Normalspendern (median: 64.2%, $P=0.0004$).

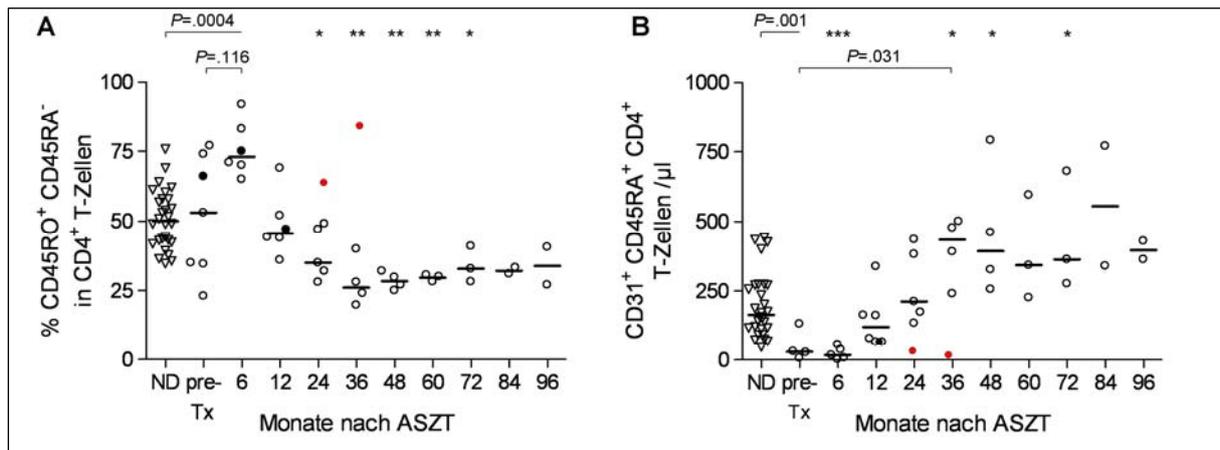


Abbildung 1: Phänotypische Analyse zirkulierender $CD4^+$ T-Zellen nach ASZT. (A) Frequenzen (Median) von $CD4^+$ T-Zellen mit Gedächtnis-Phänotyp ($CD45RO^+ CD45RA^-$) bei sechs Patienten vor und im Verlauf nach ASZT (Kreise) und 28 Normalspendern (ND, Dreiecke). Der Patient mit geschlossenen Kreisen entwickelte einen Krankheitsschub 18 Monate nach ASZT, Daten nach dem Schub (rote Kreise) wurden nicht mehr in die statistischen Berechnungen einbezogen. (B) Absolute Anzahl thymisch-naiver $CD45RA^+ CD31^+ CD4^+$ T-Zellen in sechs Patienten (Kreise) vor und im Verlauf nach ASZT im Vergleich zu 28 gesunden Probanden (ND, Dreiecke).

Die absolute Anzahl dieser „recent thymic emigrants“ (RTEs) stieg kontinuierlich bis 3 Jahren nach ASZT (Abbildung 1B), wobei zu diesem Zeitpunkt die Anzahl der RTEs im Vergleich mit gesunden, gleichaltrigen Probanden durchschnittlich doppelt so hoch lag (median: $435/\mu$ l vs. $164/\mu$ l, $P=0.016$), was auf eine stabile Thymusreaktivierung nach ASZT hindeutet. Auch bei Patienten die eine ASZT bei therapierefraktärer Multipler Sklerose (MS) und Polychondritis erhielten, wurden analoge Ergebnisse erzielt, mit signifikant höherer Anzahl zirkulierender $CD31^+ CD45RA^+ CD4^+$ naiver T-Zellen im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Probanden bereits zwei Jahre nach Transplantation (Abbildung 2A) (10).

Um zu analysieren, ob die $CD31^+ CD45RA^+ CD4^+$ T-Zellen nach ASZT tatsächlich *de novo* im Thymus generiert wurden, erfolgte in ausgewählten Patienten zusätzlich die Analyse von T-Zell-Rezeptor „Excision Circles“ (TRECs) in FACS-sortierten $CD31^+$ sowie $CD31^- CD45RA^+ CD4^+$ T-Zellpopulationen. Die Zellen wurden vier Jahre nach ASZT isoliert bei Patienten mit stabiler klinischer Krankheitsremission (Polychondritis, n=1 und SLE, n=2). Bei allen Patienten konnten in $CD31^+$ thymisch-naiven T-Zellen hohe TREC-Level nachgewiesen werden, vergleichbar mit gleichaltrigen gesunden Probanden, während in $CD31^-$ naiven T-Zellen nur eine geringe Anzahl von TRECs nachweisbar waren (Abbildung 2B).

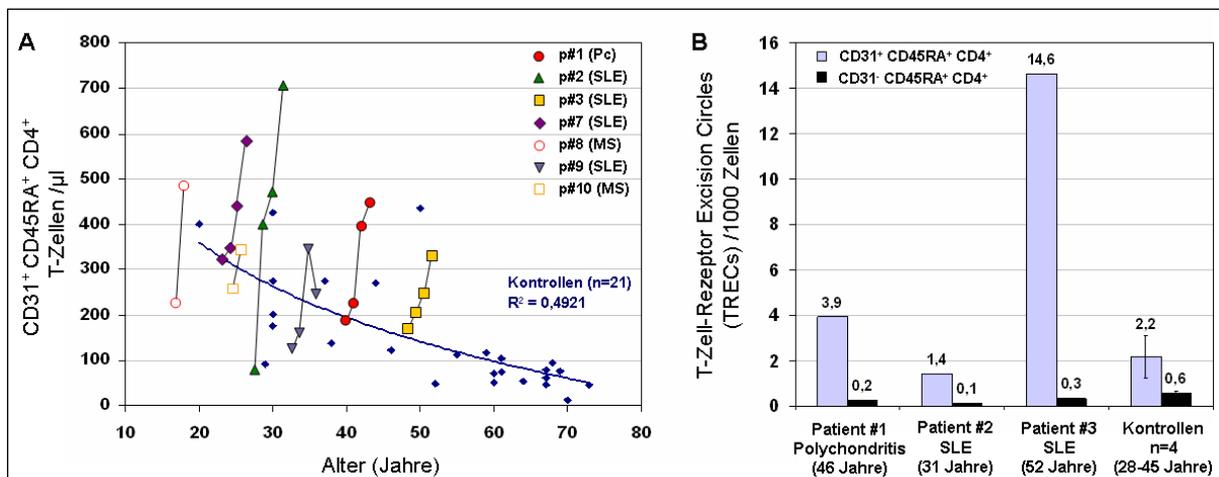


Abbildung 2: Analyse von „Recent Thymic Emigrants“ (RTEs) nach ASZT. (A) Anzahl von $CD31^+ CD45RA^+ CD4^+$ T-Zellen in 5 Patienten mit SLE, zwei Patienten mit Multiple Sklerose und einer Patientin mit Polychondritis jeweils zum Zeitpunkt 1-4 Jahre nach ASZT im Vergleich mit 21 gesunden, gleichaltrigen Probanden in Korrelation zum Alter. (B) Quantifizierung von T-Zell-Rezeptor „Excision Circles“ (TRECs) in aufgereinigten $CD31^+$ und $CD31^- CD45RA^+ CD4^+$ T-Zellen vier Jahre nach ASZT in einer Patientin mit Polychondritis und zwei Patienten mit SLE im Vergleich zu 4 gesunden Probanden mittels RT-PCR.

4.3. Regeneration von $FoxP3^+$ regulatorischen T-Zellen

Es erfolgt zunächst die Analyse von $CD25^+ FoxP3^+$ Tregs bei SLE-Patienten mit konventioneller Therapie im Vergleich zu gesunden Probanden. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit kürzlich publizierten Daten, dass bei aktiven SLE-Patienten

(SLEDAI ≥ 6) signifikant weniger CD4⁺ T-Zellen FoxP3 koexprimierten als bei gesunden Probanden (median: 5.5% vs. 8.0%, $P=0.001$, Abbildung 3B) (15). Nach ASZT war bei allen Patienten zeitgleich zur Repopulation von RTEs eine Regeneration von FoxP3⁺ Tregs im peripheren Blut nachweisbar. Die zirkulierenden Tregs waren dabei bei SLE-Patienten im untersuchten Zeitraum von zwei bis sieben Jahren nach ASZT in durchschnittlich ähnlichen Frequenzen (median: 10.5% vs. 8.5%, Abbildung 3B) und absoluten Zellzahlen (median: 62.8/ μ l vs. 67.2/ μ l, Abbildung 3C) im Vergleich zu gesunden Spendern nachweisbar.

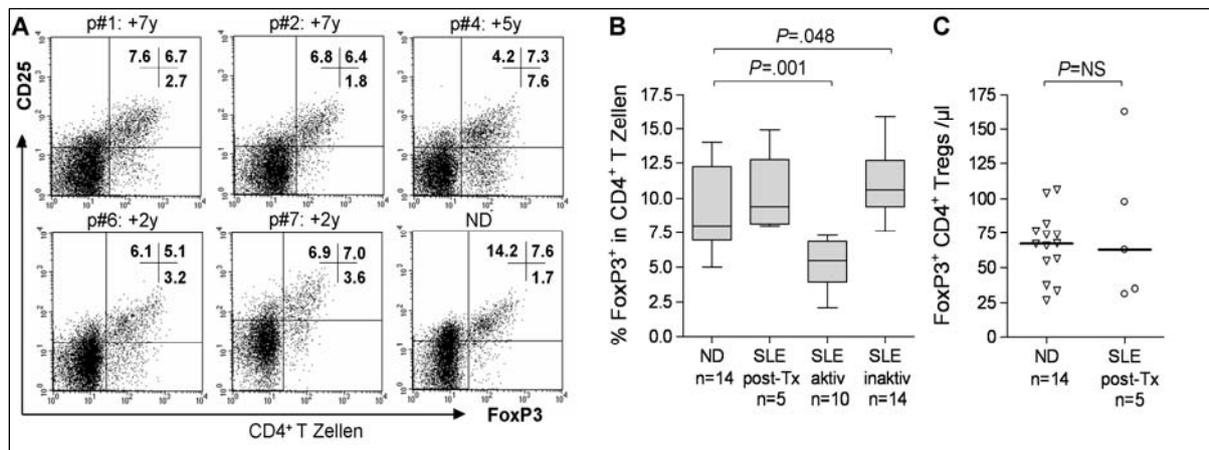


Abbildung 3: Phänotypische Analyse von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen nach ASZT. (A) Dot Plots zeigen die Expression von CD25 und intrazellulärem FoxP3 in CD4⁺ T Zellen in fünf Patienten nach ASZT und exemplarisch einem gesunden Probanden (ND). (B) Frequenz von FoxP3⁺ Tregs innerhalb des CD4⁺ T-Zell-Kompartments (basierend auf durchflusszytometrische Analysen in A) bei 5 SLE-Patienten vs. 14 Normalspendern, 10 konventionell behandelte Patienten mit aktivem SLE (SLEDAI ≥ 6), und 14 konventionell behandelten Patienten mit inaktivem SLE (SLEDAI < 6). (C) Absolute Anzahl FoxP3⁺ CD4⁺ Tregs bei 5 Patienten nach ASZT (basierend auf durchflusszytometrische Analysen in A) im Vergleich zu 14 Normalspendern (ND). Die horizontale Linie repräsentiert den Median.

4.4. Entwicklung eines diversen T-Zell-Rezeptor-Repertoires

Mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen zur Expression von T-Zell-Rezeptor (TZR)-V β -Familien auf CD4⁺ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass alle SLE-Patienten vor ASZT ein eingeschränktes TZR-Repertoire aufwiesen. Im Verlauf nach ASZT waren die Expansionen von CD4⁺ T-Zellen mit spezifischen V β -Familien

rückläufig; durch den kontinuierlichen Influx thymisch-naiver $CD45RA^+ CD31^+ CD4^+$ T-Zellen entwickelten sich bei allen Patienten allmählich ein diverses TZR-Repertoire. Zum Zeitpunkt 3 Jahre nach ASZT wiesen alle Patienten ein normales TZR-Repertoire auf, basierend auf Referenzwerten generiert durch die Analyse von 20 Normalspendern.

4.5. Spezifität der $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen nach ASZT

Das autoreaktive Gedächtnis ist im adaptiven Immunsystem verankert in Gedächtnis- T- und B-Zellen sowie Plasmazellen. Die Spezifität der Gedächtnis-T-Zellen wurde bei 4 SLE-Patienten nach ASZT analysiert durch *in vitro* Stimulation des Vollblutes über 6 Stunden mit viralen Antigenen und SLE-spezifischen Autoantigenen (Nukleosomen, SmD1-Peptide) und Quantifizierung von T-Zellen die den Aktivierungsmarker CD40L und intrazelluläre Effektor-Zytokine (Interferon-gamma) exprimierten. Die Analysen erfolgten in den ersten Monaten nach ASZT, in der überwiegend $CD4^+$ T-Zellen mit $CD45RO^+ CD45RA^-$ Gedächtnis-Phänotyp im Blut nachweisbar waren. Dabei konnten Virus-spezifische $CD4^+$ T-Zellen detektiert werden bei Patienten, bei denen nach ASZT virale Infektionen auftraten (Varizella-Zoster-Virus in Patient #1, CMV in Patient #6). Im Gegensatz dazu waren nach ASZT keine $CD4^+$ T-Zellen mit Spezifitäten für Autoantigene (Nukleosomen oder SmD1-Peptid) nachweisbar.

4.6. Normalisierung der initial gestörten B-Zell Homöostase nach ASZT

Als Zeichen der gestörten B-Zell-Homöostase bei aktivem SLE zeigte sich bei allen SLE-Patienten vor ASZT eine signifikante Prädominanz zirkulierender IgD^- Gedächtnis-B-Zellen (median: 67.2% vs. 23.5%, $P=0.003$), eine Expansion $CD27^{++} CD20^-$ Plasmablasten (median: 10.3% vs. 0.9%, $P=0.006$) und eine naive IgD^+ B-Zell-Lymphopenie (median: 4/ μ l vs. 202/ μ l, $P<0.001$, Abbildung 4) (16).

Nach ASZT wiesen die regenerierten B-Zellen einen überwiegend naiven ($IgD^+ CD27^-$) Phänotyp auf. Es kam zu einer Normalisierung der absoluten Zellzahlen innerhalb eines Jahres mit 50-fach höheren Werten im Vergleich zum Zeitpunkt vor ASZT (median: 196/ μ l vs. 4/ μ l, $P=0.024$). Resultierend aus der kontinuierlichen Repopulation *de novo* generierter naiver B-Zellen entwickelte sich bei allen Patienten ein signifikanter Abfall der initial erhöhten Frequenzen von Gedächtnis-B-Zellen und Plasmablasten innerhalb von 6 Monaten nach ASZT (Abbildung 4). Im weiteren

Verlauf war eine signifikante Expansion zirkulierender Gedächtnis-B-Zellen bzw. Plasmablasten nur bei dem Patienten nachweisbar, der 18 Monate nach ASZT einen Krankheitsschub entwickelte.

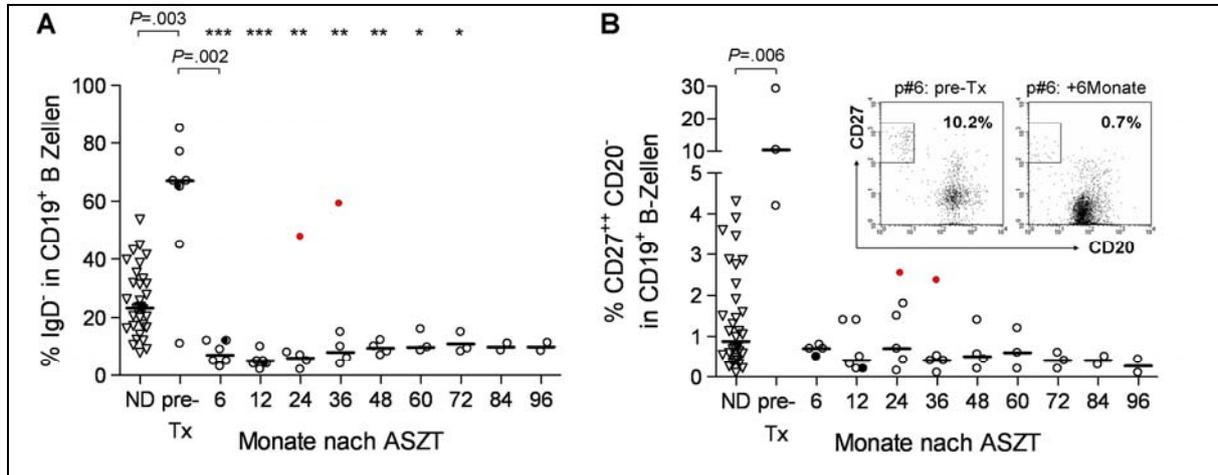


Abbildung 4: Rekonstitution des B-Zell-Kompartments nach ASZT. (A) Frequenzen zirkulierender IgD^+ Gedächtnis-B-Zellen in 6 Patienten vor (pre-Tx) und nach ASZT (Kreise) vs. Normalspender (ND, Dreiecke, $n = 32$). Die horizontale Linie repräsentiert den Median. Der Patient mit geschlossenen Symbolen hatte 18 Monate nach ASZT einen Krankheitsschub entwickelt (Patient #3), Daten nach dem Schub (rote Kreise) wurden nicht in die statistischen Berechnungen einbezogen. (B) Frequenzen von $\text{CD27}^{++} \text{CD20}^-$ Plasmablasten unter zirkulierenden CD19^+ B-Zellen bei 3 Patienten vor ASZT und 6 Patienten nach ASZT im Vergleich zu Normalspendern ($n = 32$). Die Dot Plots zeigen ein repräsentatives Beispiel eines Patienten (Patient #6) vor und 6 Monate nach ASZT.

4.7. Migration von Tregs zu hCG-exprimierenden Geweben

FoxP3^+ Tregs sind nicht nur essentiell zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbstantigenen zur Kontrolle von Autoimmunprozessen. Reproduktionsimmunologische Daten der letzten Jahre weisen vielmehr darauf hin, dass auch die Toleranz gegenüber fetalen Alloantigenen durch FoxP3^+ Tregs vermittelt wird (17).

Um zu untersuchen, durch welche Mechanismen FoxP3^+ Tregs in das „fetomaternale Interface“ gelockt werden, wurde in Kooperation mit den Universitäten Magdeburg und Leipzig die migratorische Kapazität von Tregs zum Schwangerschaftshormon hCG, welches in der Gravidität von Deziduazellen und Trophoblasten-Zellen exprimiert wird, untersucht. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sowohl Tregs

von schwangeren Frauen, als auch Tregs von nicht-schwangeren Frauen nach *in vitro* Inkubation mit hCG-sezernierenden Chorionkarzinom-Zellen (JEG-3) den hCG-Rezeptor auf der Oberfläche exprimierten (Abbildung 5A) (18).

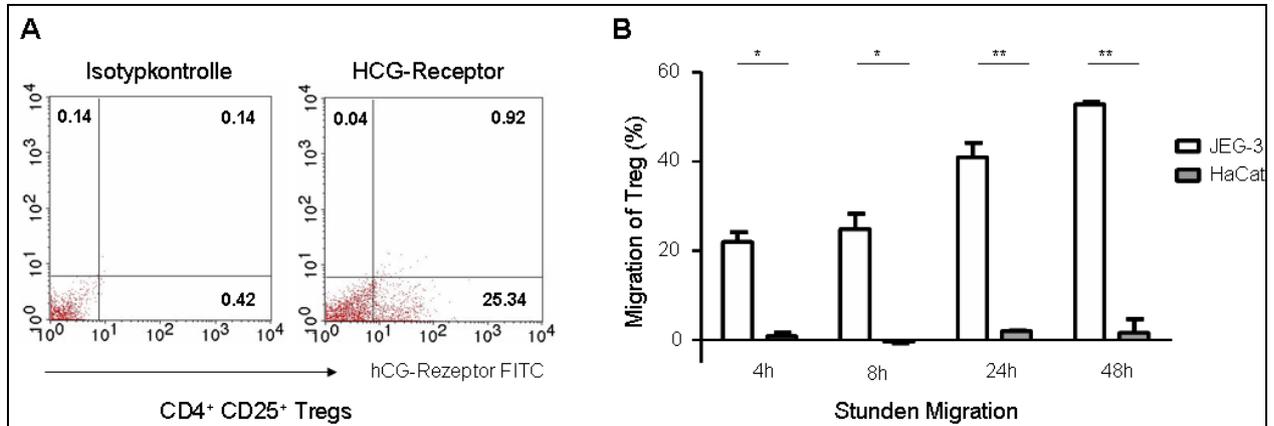


Abbildung 5: Tregs exprimieren den hCG-Rezeptor und migrieren zu hCG-sezernierenden Geweben. (A) Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von hCG-Rezeptor auf CD4⁺ CD25⁺ Tregs schwangerer Frauen nach *in vitro* Inkubation der isolierten Tregs mit hCG-sezernierenden Zellen der JEG-3 Zell-Linie. (B) Migrationsassay von CD4⁺ CD25⁺ Tregs im Zweikammer System. Tregs von schwangeren Frauen im zweiten Trimester (n = 4) migrieren zur hCG-sezernierenden JEG-3 Zelllinie, aber nicht zur Kontrolle (HaCat-Zelllinie).

Die Migration von isolierten CD4⁺ CD25⁺ Tregs schwangerer Frauen zu hCG wurde *in vitro* im Zweikammer System zunächst unter Verwendung von Zellen der hCG-sezernierenden JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie und der Keratinozyten-Zelllinie HaCat als Negativkontrolle untersucht. Es zeigte sich dabei, dass nach 48 Stunden Inkubation durchschnittlich 50% der Tregs zu Zellen der JEG-3 Zelllinie, aber nicht zu Zellen der HaCat-Zelllinie migrieren (Abbildung 5B).

Um eventuelle experimentelle Artefakte auszuschließen, die durch die JEG-3-Chorionkarzinom-Zelllinie verursacht sein könnte, wurde der Assay unter Verwendung von Trophoblast-Zellen schwangerer Frauen mit vorzeitigem Schwangerschaftsabbruch aus dem ersten Trimester wiederholt. Hierbei konnten vergleichbare Resultate erzielt werden (18).

5. Diskussion

5.1. ASZT führt zu klinischen Langzeitremissionen bei SLE

Die Transplantation autologer hämatopoetischer Stammzellen nach Immunablation hat sich in den letzten Jahren zu einer viel versprechenden Therapiealternative für Patienten mit schweren Verlaufsformen von Autoimmunerkrankungen entwickelt, die nicht ausreichend auf Standardtherapien ansprechen.

In Übereinstimmung mit Daten aus publizierten klinischen Studien konnten durch den Einsatz dieses Verfahrens an der Charité – Universitätsmedizin Berlin bei SLE-Patienten klinische und serologische Langzeitremissionen erzielt werden (19-21). Die Effizienz dieser Behandlung wird dadurch verdeutlicht, dass alle Patienten initial eine deutlich erhöhte klinische Krankheitsaktivität mit insgesamt schlechter Krankheitsprognose aufwiesen, gekennzeichnet durch hohe SLEDAI-Werte und persistierend hohe Anti-dsDNA-Antikörper-Titer trotz des Einsatzes immunsuppressiver Therapien, inklusive intravenösem Cyclophosphamid. Während die klinischen Erfahrungen im Einsatz der ASZT bei Autoimmunerkrankungen zunehmend wachsen ist bislang ungeklärt auf welche zellulären Wirkmechanismen die Langzeitremissionen zurückzuführen sind.

Die vorliegenden serologischen und durchflusszytometrischen Analysen zeigen erstmals, dass die klinischen Langzeitremissionen mit einer Eradikation des (autoreaktiven) immunologischen Gedächtnisses und einer kompletten Rekonfigurierung des adaptiven Immunsystems nach ASZT assoziiert sind, im Sinne eines „Resettings“ der immunologischen Uhr.

5.2. Depletion des autoreaktiven Gedächtnisses nach ASZT

Die Depletion des autoreaktiven immunologischen Gedächtnisses nach ASZT wird am besten reflektiert durch das komplette Verschwinden der pathologischen Autoantikörper im Serum, insbesondere der anti-dsDNA-spezifischen Antikörper. Die Eradikation des immunologischen Gedächtnisses schien dabei nicht auf das autoreaktive Gedächtnis beschränkt zu sein. Auch protektive Antikörper im Serum für Masern, Mumps, Tetanus und Diphtherie waren nach ASZT signifikant reduziert.

Die Daten weisen insgesamt darauf hin, dass das zur Immunablation verwendete Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) direkt in der Lage ist, die Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zu depletieren. Im Gegensatz zum Cyclophosphamid

wird dadurch scheinbar auch die *in vivo* Depletierung von langlebigen Plasmazellen ermöglicht, welche in speziellen Nischen im Knochenmark überleben und dort persistierend Autoantikörper sezernieren, wodurch sie zur Aufrechterhaltung der systemischen Autoimmunreaktionen bei SLE beitragen (22). Hierzu passen kürzlich erschienene Publikationen, die in *in vitro* Experimenten zeigen, dass Kaninchen-ATG in der Lage ist, direkt Plasmazellen (CD38⁺ CD138⁺) zu binden und via Apoptose und Komplement-vermittelter Lyse zu depletieren (23).

5.3. Rekonfigurierung des adaptiven Immunsystems nach ASZT

Die T-Zell-Rekonstitution nach ASZT war gekennzeichnet durch die kontinuierliche Generierung von phänotypisch naiven CD45RA⁺ CD4⁺ T-Zellen die CD31 koexprimierten. Diese Zellen konnten kürzlich als „recent thymic emigrants“ (RTEs) identifiziert werden (14). Zur Bestätigung des thymischen Ursprungs dieser Zellen konnte exemplarisch bei 3 Patienten mit klinischer Langzeitremission nach ASZT (Polychondritis n=1, SLE n=2) belegt werden, dass diese periphere Zellpopulation eine hohe Anzahl an T-Zell-Rezeptor „Excision Circles“ (TRECs) aufweist (10). Der kontinuierliche Anstieg von RTEs nach ASZT auf durchschnittlich doppelt so hohe Werte wie bei gleichaltrigen Normalspendern deutet darauf hin, dass das naive T-Zell-Kompartiment im Rahmen einer stabilen Thymus-Reaktivierung *de novo* generiert wurde und nicht Folge einer homöostatischen Proliferation residueller T-Zellen ist.

Durch die Analyse des peripheren T-Zell-Rezeptor-Repertoires konnte zusätzlich gezeigt werden, dass durch die Immunablation klonale Expansionen im CD4⁺ T-Zell-Kompartiment eliminiert wurden und sich durch die Repopulation von RTEs ein neues und diverses TZR-Repertoire entwickelte. Diese Ergebnisse decken sich mit publizierten Daten zur autologen hämatopoetischen Stammzelltransplantation bei multipler Sklerose (MS) bei der gezeigt werden konnte, dass eine stabile Thymusreaktivierung nach ASZT eine Grundvoraussetzung für die Neuentwicklung eines naiven und diversen T-Zell-Kompartments darstellt (24).

Innerhalb des regenerierten CD4⁺ T-Zell-Kompartments entwickelte sich bei den transplantierten SLE-Patienten parallel zum kontinuierlichen Influx von RTEs die Repopulation von CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs), die in Frequenzen und absoluten Zahlen mit denen von Normalspendern vergleichbar sind. Dies lässt

vermuten, dass neben der Wiederherstellung eines naiven T-Zell-Pools gleichzeitig ein neues Repertoire natürlicher FoxP3⁺ Tregs generiert wurde.

Während die Regeneration von RTEs erst mit einer Verzögerung von einem Jahr nach ASZT nachweisbar war, kam es in den ersten Monaten nach ASZT zu einer Expansion von CD4⁺ T-Zellen mit Gedächtnis-Phänotyp und eingeschränktem TZR-Vβ-Repertoire. Wenn sich diese periphere T-Zell-Expansion in Folge einer Lymphopenie-getriebenen Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen durch „low-affinity“ Interaktion zwischen Selbst-Peptid/MHC entwickelt hätte, würde man autoreaktive Klone unter diesen Gedächtnis-T-Zellen erwarten. Es konnten allerdings in dieser ersten Phase nach ASZT keine klonalen Expansionen von autoreaktiven T-Zellen spezifisch für SLE-typische Autoantigene, z.B. Nukleosomen oder SmD1, in Stimulations-Assays detektiert werden. Stattdessen fanden sich Gedächtnis-T-Zellen, die spezifisch für virale Antigene waren, die im Rahmen vorausgegangener viraler Infektionen der Patienten nach ASZT auftraten. Dies impliziert eine Expansion pathogen-spezifischer T-Zellen als Ursache der klonalen T-Zell-Expansion in der ersten Phase nach ASZT. Die Expansion dieser protektiven T-Zellen könnte zur Kontrolle von Autoimmunprozessen nach ASZT durch eine Restriktion des verfügbaren immunologischen „Platzes“ für homöostatische Proliferationen autoreaktiver Effektor/Gedächtnis-T-Zellen beitragen.

Die Regeneration des B-Zell-Kompartments nach ASZT bei SLE war vergleichbar mit der von Patienten die eine ASZT für maligne hämatologische Erkrankungen erhielten (25). Die zirkulierenden B-Zellen nach ASZT zeigten einen überwiegend naiven (IgD⁺ CD27⁻) Phänotyp mit Normalisierung von absoluten Zellzahlen innerhalb eines Jahres nach ASZT, während die komplette Regeneration normaler Zellzahlen von Gedächtnis-B-Zellen (IgD⁻ CD27⁺) durchschnittlich erst drei Jahre nach ASZT abgeschlossen war. Die Regeneration des B-Zell-Kompartments bei SLE ist im Vergleich zu Patienten mit malignen Grunderkrankungen allerdings beachtlich vor dem Hintergrund, dass alle SLE-Patienten vor ASZT Zeichen einer gestörten B-Zell-Homöostase aufwiesen, die durch eine signifikante naive B-Zell-Lymphopenie, Prädominanz von Gedächtnis-B-Zellen und Expansionen von Plasmablasten im peripheren Blut charakterisiert ist. Die zirkulierenden B-Zellen entwickelten sich

scheinbar ebenfalls *de novo* aus hämatopoetischen Vorläuferzellen nach Immunablation und ASZT.

Während bei der Mehrzahl der Patienten nach ASZT eine langfristige Krankheitsremission erzielt werden kann, ist die Entwicklung von Krankheitsrezidiven möglich (26). Bei den an der Charité – Universitätsmedizin Berlin transplantierten 7 SLE-Patienten wurde lediglich ein Krankheitsrezidiv 18 Monate nach ASZT beobachtet. Die Entwicklung dieses Krankheitsschubes könnte a) durch eine insuffiziente Depletion des autoreaktiven immunologischen Gedächtnisses, b) die Präsentation von Autoantigenen zu Zellen des regenerierten Immunsystems oder c) durch einen Neustart der Erkrankung auf dem Boden einer genetischen Prädisposition bedingt sein. Anhand der Daten zur Immunrekonstitution des Patienten ließen sich keine sicheren Faktoren ableiten die den Krankheitsschub begünstigt haben könnten. Die Entwicklung von antinukleären Antikörpern mit unterschiedlichem Muster an extrahierbaren nukleären Antigenen (ENA) im Vergleich zu Daten vor ASZT lässt allerdings vermuten, dass es sich bei dem Krankheitsrezidiv eher um einen Neustart der Erkrankung als um ein Wiederaufflammen residueller autoreaktiver Autoimmunprozesse handelt.

5.4. Migration von Tregs zu hCG-exprimierenden Geweben

Die immunologischen Daten zur Expression von hCG-Rezeptoren auf CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs gesunder schwangerer Frauen und die Migration dieser Zellen zu hCG-exprimierenden Geweben (JEG-3 Zelllinie, Trophoblasten) unterstreichen die Rolle der Tregs nicht nur bei der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Selbstantigenen sondern auch gegen fetale Alloantigene (18). Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass das vom Trophoblasten sezernierte hCG in der frühen Schwangerschaft die Migration der Tregs zur Stelle des Antigenkontaktes zwischen paternalen Antigenen und maternalen Immunzellen gewährleistet, die die Immuntoleranz gegenüber dem Fötus orchestrieren.

Es ist denkbar, dass die immunmodulatorischen Effekte des hCG zukünftig auch in therapeutischen Ansätzen zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz in Autoimmunerkrankungen Anwendung finden. In einer *in vivo* Studie zur Administration von hCG bei NOD-Mäusen konnte kürzlich gezeigt werden, dass die

Entwicklung des autoimmunen Diabetes, resultierend aus einer Zerstörung von pankreatischen β -Zellen, verhindert werden konnte. Dies war assoziiert mit einem signifikanten Anstieg von Tregs in Milz und pankreatischen Lymphknoten der Mäuse und einem Anstieg von IL-10 und TGF- β im Serum (27).

5.5. Aktueller Stellenwert der ASZT bei Autoimmunerkrankungen

Die immunologischen Daten der klinischen Phase I/II Studie zur ASZT bei SLE verdeutlichen, dass durch immunablative Chemotherapie eine komplette Eradikation des autoreaktiven Gedächtnisses möglich ist und sich nach ASZT ein juveniles, selbst-tolerantes Immunsystem aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln kann (28;29). Es resultieren klinische und serologische Remissionen, die über mehrere Jahre persistieren können (bis zu acht Jahren nach ASZT), ohne dass die Patienten auf eine Fortführung der chronischen immunsuppressiven Therapie angewiesen sind. Diese Daten unterstreichen das kurative Potential dieser Therapie und weisen darauf hin, dass chronische Autoimmunität keinen Endpunkt darstellt, sondern künftig möglicherweise geheilt werden kann durch ein spezifisches „targeting“ des autoreaktiven Gedächtnisses in Kombination mit einer Reaktivierung des Thymus. Vor dem Hintergrund der erhöhten Mortalität (ca. 5%) die immer noch mit dieser drastischen Behandlungsmethode verbunden ist, wird die ASZT vorerst Patienten vorbehalten bleiben, die nicht ausreichend auf Standardtherapien ansprechen. Sollte es jedoch zukünftig gelingen, das protektive Immunsystem von der Immundepletion auszusparen, z.B. durch den Einsatz spezifischerer Ansätze oder durch adaptiven Transfer von Gedächtnis-Lymphozyten nach ASZT, könnte sich das Verfahren auch zu einer Erfolg versprechende Behandlungsoption für Patienten mit weniger schwerem Krankheitsverlauf entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 1998; 338(19):1359-1368.
- (2) Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(2):147-153.
- (3) Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(10):741-750.
- (4) Hoyer BF, Moser K, Hauser AE, Peddinghaus A, Voigt C, Eilat D et al. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med* 2004; 199(11):1577-1584.
- (5) Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2005; 175(12):8392-8400.
- (6) Yang J, Chu Y, Yang X, Gao D, Zhu L, Yang X et al. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60(5):1472-1483.
- (7) Sykes M, Nikolic B. Treatment of severe autoimmune disease by stem-cell transplantation. *Nature* 2005; 435(7042):620-627.
- (8) Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood* 2009; 113(1):214-223.
- (9) Rosen O, Thiel A, Massenkeil G, Hiepe F, Haupl T, Radtke H et al. Autologous stem-cell transplantation in refractory autoimmune diseases after in vivo immunoablation and ex vivo depletion of mononuclear cells. *Arthritis Res* 2000; 2(4):327-336.
- (10) Thiel A, Alexander T, Schmidt CA, Przybylski GK, Kimmig S, Kohler S et al. Direct assessment of thymic reactivation after autologous stem cell transplantation. *Acta Haematol* 2008; 119(1):22-27.
- (11) Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992; 35(6):630-640.
- (12) Bruns A, Blass S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43(10):2307-2315.

- (13) Riemekasten G, Langnickel D, Ebling FM, Karpouzas G, Kalsi J, Herberth G et al. Identification and characterization of SmD183-119-reactive T cells that provide T cell help for pathogenic anti-double-stranded DNA antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 48(2):475-485.
- (14) Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Mowes B, Radbruch A et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 2002; 195(6):789-794.
- (15) Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2005; 175(12):8392-8400.
- (16) Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2000; 165(10):5970-5979.
- (17) Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; 5(3):266-271.
- (18) Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M et al. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J Immunol* 2009; 182(9):5488-5497.
- (19) Burt RK, Traynor A, Statkute L, Barr WG, Rosa R, Schroeder J et al. Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. *JAMA* 2006; 295(5):527-535.
- (20) Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood* 2009; 113(1):214-223.
- (21) Jayne D, Passweg J, Marmont A, Farge D, Zhao X, Arnold R et al. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13(3):168-176.
- (22) Hoyer BF, Moser K, Hauser AE, Peddinghaus A, Voigt C, Eilat D et al. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med* 2004; 199(11):1577-1584.
- (23) Zand MS, Vo T, Pellegrin T, Felgar R, Liesveld JL, Ifthikharuddin JJ et al. Apoptosis and complement-mediated lysis of myeloma cells by polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Blood* 2006; 107(7):2895-2903.
- (24) Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med* 2005; 201(5):805-816.

- (25) Bomberger C, Singh-Jairam M, Rodey G, Guerriero A, Yeager AM, Fleming WH et al. Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS-sorted CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 1998; 91(7):2588-2600.
- (26) Burt RK, Traynor A, Statkute L, Barr WG, Rosa R, Schroeder J et al. Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. *JAMA* 2006; 295(5):527-535.
- (27) Khil LY, Jun HS, Kwon H, Yoo JK, Kim S, Notkins AL et al. Human chorionic gonadotropin is an immune modulator and can prevent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetologia* 2007; 50(10):2147-2155.
- (28) Alexander T, Arnold R, Hiepe F. [Immunoablation followed by autologous stem cell transplantation in Lupus : A clinical update.]. *Z Rheumatol* 2009; 68(3):205-213.
- (29) Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood* 2009; 113(1):214-223.

B Anteilserklärung

Publikation 1: Alexander T, Thiel A ,et al. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):214-23. Epub 2008 Sep 29.

Beteiligung: ca. 66%

Beiträge im Einzelnen: Rekrutierung und Aufklärung von Patienten und gesunden Kontrollen, klinische Charakterisierungen, Blutentnahmen, durchflusszytometrische Analysen, Diskussion und Interpretation der Daten, Verfassung der Publikation in der vorliegenden Form.

Publikation 2: Thiel A, Alexander T, et al. *Acta Haematol.* 2008; 119(1):22-7.

Beteiligung: ca. 66%

Beiträge im Einzelnen: Rekrutierung und Aufklärung von Patienten, Blutentnahmen, durchflusszytometrische Analysen von Lymphozyten-Subpopulationen, Diskussion und Interpretation der Daten, Verfassung der Publikation in der vorliegenden Form.

Publikation 3: Schumacher A, Brachwitz N, et al. *J Immunol.* 2009; May 1;182(9):5488-97.

Beteiligung ca. 30%

Beiträge im Einzelnen: Mitentwicklung der wissenschaftlichen Fragestellung und Initiierung des Kooperationsprojektes, Data-Management, Diskussion und Interpretation der Daten.

Tobias Alexander
(Promovend)

Prof. Dr. med. Falk Hiepe
(betreuender Hochschullehrer)

C Ausgewählte Publikationen

1. Publikation:

Alexander T*, Thiel A*, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, Mei H, Radtke H, Gromnica-Ihle E, Burmester GR, Arnold R, Radbruch A, Hiepe F.

Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system.

Blood. 2009 Jan 1;113(1):214-23. Epub 2008 Sep 29.

Impact Factor: 10,869

2. Publikation:

Thiel A*, Alexander T*, Schmidt CA, Przybylski GK, Kimmig S, Kohler S, Radtke H, Gromnica-Ihle E, Massenkeil G, Radbruch A, Arnold R, Hiepe F.

Direct assessment of thymic reactivation after autologous stem cell transplantation.

Acta Haematol. 2008; 119(1):22-7.

Impact Factor: 1,352

3. Publikation:

Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M, Alexander T, Taran A, Malfertheiner SF, Costa SD, Zimmermann G, Nitschke C, Volk HD, Alexander H, Gunzer M, Zenclussen AC.

Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy.

J Immunol. 2009; May 1;182(9):5488-97.

Impact Factor: 6,068

* both authors contributed equally to publication

D Lebenslauf

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

E Komplette Publikationsliste

Publikationen Erstautor

1. Alexander T, Arnold R, Hiepe F. Immunablation in Kombination mit autologer Stammzelltransplantation bei Lupus. *Z Rheumatol*. 2009 Apr 29.
2. Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, Mei H, Radtke H, Gromnica-Ihle E, Burmester GR, Arnold R, Radbruch A, and Hiepe F. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):214-23. Epub 2008 Sep 29.
3. Alexander T, Biesen R, Jacobi A, Hoyer B, Bruns A, and Hiepe F. Systemic lupus erythematosus - Target criteria for treatment. *Z Rheumatol*. 2009 Jan 16.
4. Thiel A*, Alexander T*, Schmidt CA, et al. Direct assessment of thymic reactivation after autologous stem cell transplantation. *Acta Haematol*. 2008; 119(1):22-7. *both authors contributed equally to this work.
5. Alexander T, Klotz O, Feist E, et al. Successful treatment of acute visual loss in Muckle-Wells Syndrome with Il-1-Receptor Antagonist. *Ann Rheum Dis*. 2005 Aug 64: 1245-1246.

Publikationen Koautor

1. Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M, Alexander T, Taran A, Malfertheiner SF, Costa SD, Zimmermann G, Nitschke C, Volk HD, Alexander H, Gunzer M, Zenclussen AC. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J Immunol*. 2009 May 1;182(9):5488-97.

Buchartikel

1. Thiel A, Alexander T, Schmidt CA, Hiepe F, Arnold R, Radbruch A, Verda L and Burt RK: Immune Reconstitution after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Buchkapitel in *Stem Cell Transplantation for Autoimmune Diseases*, 2004.

Meeting Abstracts Vorträge

1. Alexander T, Thiel A, Massenkeil G, et al. Depletion of autoreactive immunological memory followed by autologous haematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system; 2008, 7th European Lupus Meeting,

2. Alexander T, Thiel A, Rosen O, et al. Depletion of autoreactive immunological memory after autologous haematopoietic stem cell transplantation (ASCT) for refractory systemic lupus erythematosus (SLE). *Bone Marrow Transplant*. 2008 (Mar), 41: S2-S3 Suppl.
3. Alexander T, Massenkeil G, Mei H, et al. Autologous Stem Cell Transplantation corrects B-cell disturbances in refractory systemic lupus erythematosus (SLE). *Ann Rheum Dis*. 2007 (Jul) Volume: 66 Pages: 107-108 Supplement: Suppl. 2
4. Alexander T, Massenkeil G, Mei H, et al. Normalisation of Peripheral B Cell Abnormalities after Immunoablation and Autologous Stem Cell Transplantation in Refractory Human Systemic Lupus Erythematosus; 2007, *Lupus 8th International Congress on SLE, Shanghai*
5. Alexander T, Massenkeil G, Burmester GR, et al. Thymic Rebound and Recurrence of Foxp3⁺ regulatory T cells after Autologous Stem Cell Transplantation in SLE. *Arthritis Rheum*. 2006 (Sep) Volume: 54, Issue: 9, Pages: S546-S546 Supplement: Suppl. S
6. Alexander T, Massenkeil G, Burmester GR, et al. Thymic Rebound after Autologous Stem Cell Transplantation in SLE. *Ann Rheum Dis*. 2006 (Jul) Volume: 65 Pages: 82-83 Supplement: Suppl. 2
7. Alexander T, Massenkeil G, Burmester GR, et al. Thymic rebound after autologous CD34-selected haematopoietic stem cell transplantation in SLE patients. *Bone Marrow Transplant*. 2006 (Mar) 37: S17 Suppl. 1
8. Alexander T, Massenkeil G, Gromnica-Ihle E et al. Long-term immune reconstitution in patients treated with autologous CD34-selected hematopoietic stem-cell transplantation for severe autoimmune diseases. 2004, *Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh)*
9. Alexander T, Massenkeil G, Gromnica-Ihle E, et al. Long-term immune reconstitution in patients treated with autologous stem cell transplantation (ASCT) for refractory systemic lupus erythematosus (SLE). 2004, *7th International Congress on SLE, New York*
10. Alexander T, Arnold R, Massenkeil G, et al. Long-term immune reconstitution in patients treated with autologous stem cell transplantation (ASCT) for refractory autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant*. 2004 (Mar) 33: S1-S380 Suppl. 1
11. Alexander T, Massenkeil G, Burmester GR et al. Long-term immune reconstitution in patients treated with autologous stem cell transplantation (ASCT) for refractory autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther*. 2004 (Feb), 6(Suppl 1):1
12. Alexander T, Kimmig S, Kohler S et al. Thymic rebound in patients after autologous stem cell transplantation (ASCT) for the treatment of severe

autoimmune diseases. 2003, 8th *International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity (IWAA), Berlin*

Meeting Abstracts Poster

1. Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Burmester G, Radtke H, Arnold R, Hiepe F. Development of antinuclear antibodies with new specificities in systemic lupus erythematosus after autologous haematopoietic stem cell transplantation suggests de novo development of disease rather than lupus reactivation. *Bone Marrow Transplant.* 2009 (Mar) 43; S272.
2. Alexander T, Schneider S, Ziemer S, Schneider U, Radtke H, Burmester G, Thiel A, Arnold R, Hiepe F. Factor VIII haemophilia acquired as secondary autoimmune disease after haematopoietic stem cell transplantation (ASCT) for refractory systemic lupus erythematosus (SLE) dissolves with relapse of SLE - A case report. *Bone Marrow Transplant.* 2009 (Mar) 43; S274-5.
3. Alexander T, Thiel A, Massenkeil G, *et al.* Depletion of autoreactive immunological memory followed by autologous haematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system; 2008, *Annual Meeting DGRh*
4. Alexander T, Massenkeil G, Gromnica-Ihle E, *et al.* Expansion of memory B- and T cells predicts relapse of systemic lupus erythematosus (SLE) after autologous haematopoietic stem cell transplantation (ASCT); 2008, *EULAR Annual Meeting Paris*
5. Alexander T, Massenkeil G, Sattler A, *et al.* Depletion of autoreactive immunological memory after autologous haematopoietic stem cell transplantation (ASCT) is achieved in systemic lupus erythematosus (SLE) but not systemic sclerosis (Ssc) patients; 2008, *EULAR Annual Meeting Paris*
6. Alexander T, Massenkeil G, Sattler A, *et al.* Changes in serum antinuclear autoantibody pattern in systemic lupus erythematosus (SLE) after autologous haematopoietic stem cell transplantation (ASCT) suggests *de novo* development rather than relapse of disease. *Bone Marrow Transplant.* 2008 (Mar), 41: S137-S137 Suppl. 1
7. Alexander T, Massenkeil G, Sattler A, *et al.* Successful depletion of the autoreactive immunological memory after autologous haematopoietic stem cell transplantation (ASCT) for refractory systemic lupus erythematosus (SLE). *Bone Marrow Transplant.* 2008 (Mar), 41: S137-S137 Suppl. 1
8. Arnold R, Massenkeil G, Alexander T, *et al.*, Stem cell transplantation: special features in autoimmune disease. *Bone Marrow Transplant.* 2008 (Mar), 41: S138-S139 Suppl. 1
9. Arnold R, Massenkeil G, Alexander T, *et al.* Long term remission in severe and refractory lupus (SLE) after autologous stem cell transplantation. *Biology*

of Blood and Bone Marrow Transplant. 2006 (Feb) Volume 12, Issue 2, Pages 91-91,

10. Terwey TH, Alexander T, Tamm I, *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation in a patient with severe, therapy-refractory Takayasu arteritis. 2006, *Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie*
11. Alexander T, Massenkeil G, Gromnica-Ihle E *et al.* Long-term immune reconstitution after autologous stem-cell transplantation for severe autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther.* 2005 (Feb), Volume: 7, Pages: S46-S46 Supplement: Suppl. 1
12. Arnold R, Alexander T, Massenkeil G, *et al.* Long-term immune reconstitution in patients treated with autologous stem cell transplantation for refractory autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2004 (Mar), Volume 33, Pages S143-S144, S1.
13. Alexander T, Massenkeil G, Gromnica-Ihle E *et al.* Autologous stem cell transplantation (ASCT) for refractory systemic lupus erythematosus (SLE): Long-term immune reconstitution. *EULAR Annual Meeting 2004, Berlin.*
14. Alexander T, Massenkeil G, Gromnica-Ihle E, *et al.* Treatment of severe Systemic Lupus Erythematosus (SLE) with Autologous Stem Cell Transplantation: Long-term Clinical Outcome in 6 Cases. *Bone Marrow Transplant.* 2004 (Mar) 33: S145, Suppl. 1.
15. Thiel A, Przybylski G, Alexander T *et al.* Stable reconstitution with CD31⁺CD45RA⁺ "thymic" naive Th-cells after stem cell transplantation for autoimmune diseases indicates reactivation of thymic activity. *Arthritis Rheum.* 2003 (Sep) 48: Suppl. S., S378.
16. Thiel A, Alexander T, Schmidt CA *et al.* Successful treatment of refractory autoimmune diseases with ASCT leads to the long-term resetting of a juvenile tolerant immune system. *Arthritis Rheum.* 2002 (Sep), 46: Suppl. S, S394-5.
17. Thiel A, Alexander T, Rosen O *et al.* Long term immune reconstitution after transplantation of highly purified CD34⁺ cells in patients with therapy-refractory autoimmune diseases. *Blood.* 2001 (Nov), 98: 400B

F Selbständigkeitserklärung

Ich, Tobias Alexander, geboren am 16.02.1974 in Halle/S., erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Rekonstitution des adaptiven Immunsystems nach Immunablation und autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei therapierefraktärem systemischen Lupus erythematodes“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den

Tobias Alexander
(Promovend)

G Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Dr. rer. nat. Andreas Thiel für die Vergabe dieses spannenden Promotionsthemas sowie der engagierten und motivierenden Betreuung bei der Laborarbeit im Deutschen Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) Berlin.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Falk Hiepe danke ich herzlich für die uneingeschränkte fachliche und persönliche Unterstützung dieser Promotionsarbeit und für die Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit.

Besonderer Dank gebührt Prof. Dr. med. Renate Arnold und ihrem Team aus der Abteilung für Knochenmarktransplantation der Charité. Durch ihren persönlichen Einsatz bei der konzeptionellen Mitentwicklung der wissenschaftlichen Ansätze und der aufwändigen klinischen Betreuung der Patienten wurde diese Arbeit erst ermöglicht.

Recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Andreas Radbruch und Prof. Dr. rer. nat. Alf Hamann aus dem DRFZ Berlin für die wertvollen Anregungen und Diskussionen und allen Laborkollegen für die Hilfsbereitschaft und nette Arbeitsatmosphäre.

Für die gute Kooperation bedanke ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Ana C. Zenclussen aus der Universität Magdeburg und meinem Vater Prof. Dr. med. Henry Alexander aus der Universität Leipzig bei der Durchführung der Migrationsanalysen von regulatorischen T-Zellen und Prof. Dr. med. Christian A. Schmidt und Dr. Gregor Przybylski aus der Universität Greifswald für die TREC-Analysen.

Meiner Frau Anja danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Liebe, Geduld und Motivation.

Meinen Eltern danke ich herzlich für die Ermöglichung eines sorgenfreien Studiums, ihre liebevolle Unterstützung und ihr Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit.