

Aus der Charité  
Medizinischen Klinik Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin  
und dem Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin

DISSERTATION

Etablierung eines *in vivo* Mausmodells zur Bewertung der Rolle  
des Nebenhistokompatibilitätsantigens H13 bei der Induktion  
eines “Graft-versus-Leukemia” Effekts mittels *in vivo*  
Biolumineszenz-Imaging

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Branka Čakarun, geb. Bukarica

aus Split, Kroatien

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. T. Daniel  
2. Prof. Dr. rer. nat. W. Uckert  
3. Prof. Dr. med. U. Keilholz

Datum der Promotion: 29.01.2010

*Meinen Eltern*

# INHALTVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. EINLEITUNG .....	3
2.1. Die Zellen des Immunsystems.....	3
2.2. Antigen-Präsentation und Antigenerkennung .....	3
2.3. Transplantation und Transplantat-Typen .....	5
2.4. Nebenhistokompatibilitätsantigene ( <i>mHAg</i> ) und <i>Single Nucleotid</i> -Polymorphismus.....	7
2.5. Graft-versus-Host disease (GvHD) und Leukämie.....	8
2.6. Adoptive Immuntherapie und TCR-Transfer.....	21
2.7. Biolumineszenz Imaging <i>in vivo</i> .....	23
3. FRAGESTELLUNG.....	24
4. MATERIAL UND METHODEN.....	25
<b>4.1. MATERIAL</b> .....	25
4.1.1. Mäuse.....	25
4.1.2. Medikamente.....	25
4.1.3. Chemikalien.....	26
4.1.4. Enzyme und Reaktionspuffers.....	27
4.1.5. Reagenzien.....	27
4.1.6. Puffers.....	28
4.1.7. Antikörper.....	28
4.1.8. Rekombinante MHC-Pentamere.....	28
4.1.9. Hilfsmaterialien.....	29
<b>4.2. METHODEN</b> .....	30
<b>4.2.1. <i>in vivo</i> Experimente:</b>	
4.2.1.1. Knochenmarkvorbereitung.....	30
4.2.1.2. Knochenmarktransplantation.....	30
4.2.1.3. Bestrahlung.....	32
4.2.1.4. Biolumineszenz-Imaging.....	33
<b>4.2.2. Zellkultur:</b>	
4.2.2.1. Zellinkubation.....	34
4.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	35
4.2.2.3. Bestimmung der Zellzahl.....	35
4.2.2.4. Milzzellenvorbereitung .....	36

4.2.2.5. Stimulation der Milzzellen .....	36
4.2.2.6. Vorbereitung der Spenderlymphozyteninfusion (Donor-Lymphozyten Infusion, DLI) .....	36
4.2.2.7. Durchflusszytometrie (FACS).....	39
4.2.2.8. Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse.....	39
4.2.2.9. Färbung von T-Zellen mit Antikörpern und rekombinanten MHC-Pentameren.....	39
4.2.2.10. CFSE <i>in vivo</i> Zytotoxizitätstest.....	40
4.2.2.11. $\beta$ -Galactosidase-Nachweis (X-Gal).....	41

### **4.2.3. Molekularbiologische Methoden:**

4.2.3.1. DNA -Konzentrationsmessung in der Gelelektrophorese.....	43
4.2.3.2. DNA-Konzentrationsmessung am Spektrometer.....	43
4.2.3.3. PCR .....	43
4.2.3.4. Berechnung der Schmelztemperaturen von Primern.....	44
4.2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese.....	44
4.2.3.6. Gelextraktion.....	45
4.2.3.7. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	45

## **5. ERGEBNISSE**

<b>5.1. Der Nachweis, dass das Nebenhistokompatibilitätsantigen H13 beim Empfängerstamm und bei EG 7 und EL 4–Leukämiezellen als H13<sup>a</sup>-Haplotyp bzw. beim Spenderstamm als H13<sup>b</sup>-Haplotyp vorhanden ist.....</b>	<b>46</b>
--	-----------

<b>5.2. Die EG-7-Luc<sup>+</sup>Leukämie-Zelllinie weist eine hohe Expression der MHC-Moleküle H-2D<sup>b</sup> an ihrer Oberfläche auf.....</b>	<b>47</b>
--	-----------

<b>5.3. Tumorfeststellung mittels Biolumineszenz-Imaging ermöglichte die Standardisierung verschiedener Behandlungsgruppen in Bezug auf die TumorgroÙe.....</b>	<b>48</b>
---	-----------

<b>5.4. In der Spenderlymphozyteninfusion, die nach der <i>in vivo</i> Immunisierung gewonnen wurde, konnten die für das H13<sup>a</sup>Nebenhistokompatibilitätsantigen spezifischen CD8<sup>+</sup> Lymphozyten detektiert werden .....</b>	<b>49</b>
---	-----------

<b>5.5. Die Behandlung mit den Spenderlymphozyteninfusionen, die <i>in vivo</i> mit SVL 9 Peptid immunisiert wurden, induzierte Leukämieremission nach allogener Knochenmarktransplantation.....</b>	<b>51</b>
--	-----------

<b>5.6. Die Abwesenheit residualer EG 7-Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen in der Milz konnte mittels <math>\beta</math>-Galaktosidase- Nachweis (X-Gal) bestätigt werden.....</b>	<b>52</b>
--	-----------

<b>5.7. Die Behandlung mit <i>in vitro</i> mit SVL 9 Peptid stimulierten Spenderlymphozyten induzierte Leukämieremission nach allogener Knochenmarktransplantation.....</b>	<b>54</b>
---	-----------

<b>5.8. Die Effektivität der Behandlung mit <i>in vitro</i> immunisierten Spenderlymphozyteninfusionen hing von der Tumormenge ab.....</b>	<b>55</b>
--	-----------

<b>5.9. <i>In vivo</i> Biolumineszenz-Imaging ist eine schnelle und nicht-invasive Technik für die Überwachung des Leukämierückfalls und Remission nach der Behandlung .....</b>	58
<b>5.10. Der <i>in vivo</i> Zytotoxizitätstest wies die Anwesenheit der anti-H13<sup>a</sup> spezifischen CD 8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten bei der Empfängermaus nach, die mit <i>in vitro</i> mit SVL 9 Peptid stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurde, trotz der Abwesenheit der detektierbaren Anzahl der SVL9<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten im peripheren Blut nach der Knochenmarktransplantation und in Spenderlymphozyteninfusionen .....</b>	60
<b>5.11. Regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Lymphozyten konnten <i>in vivo</i> bei den Mäusen mit dem Tumor nicht detektiert werden.....</b>	64
 <b>6. DISKUSSION</b>	
<b>6.1. Spenderlymphozyteninfusion nach einer allogenen Knochenmarktransplantation .....</b>	67
<b>6.2. TAA und mHAGs als Target-Antigene im Vergleich.....</b>	68
<b>6.3. Adoptive T-Zell-Therapie und die T-Zellen mit genetisch modifiziertem TCR .....</b>	69
<b>6.4. Schlussfolgerung.....</b>	71
 <b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	73
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	75
<b>9. DANKSAGUNG.....</b>	80

# 1. ZUSAMMENFASSUNG

Die allogene Knochenmarktransplantation, eine Therapiemodalität für maligne Krankheiten des hämatopoetischen Systems, hat auch bei vollständiger Übereinstimmung innerhalb des MHCs den Nachteil einer *Graft-versus-Host* Erkrankung (GvHD), verursacht durch Nebenhistokompatibilitätsantigene (mHAGs), zusätzlicher Transplantationsantigene, die außerhalb des MHCs existieren. Durch die Identifizierung nur hämatopoetisch exprimierter mHAGs, und durch die Stimulation der Spenderlymphozyten, die anschließend an einer KMT als Therapie angewandt werden (Spenderlymphozyteninfusion) mit den von Transkriptionsprodukten solcher mHAGs prozessierten Peptiden, könnte jedoch ein GvL (Graft versus Leukemia)-Effekt ohne GvHD erreicht werden. Um das zu überprüfen, wurde ein Maus-Modell entwickelt, wobei sich zwei im MHC identische Mäusestämme (C.B10 und B6) in 5 mHAGs voneinander unterscheiden. Das ausgewählte H13 mHAG ist beim C.B10 Stamm (Spender) als H13<sup>b</sup>-Haplotyp bzw. beim B6-Stamm (Empfänger) als Haplotyp H13<sup>a</sup> vorhanden. Die von diesen zwei Haplotypen prozessierten Peptide, SIL9 beim Spenderstamm und SVL9 beim Empfänger, zeigen aufgrund der Substitution einer Methyl-Gruppe die Differenz auf einer Aminosäureposition (Isoleucin statt Valin) und werden beide durch die MHC-Klasse I D<sup>b</sup>-Moleküle präsentiert. Empfängertiere wurden subletal bestrahlt und *i.v.* mit den hämatopoetischen Zellen des Spender in einer Mischung mit vom B6-Stamm-abgeleiteten Leukämiezellen, EL4, bzw. mit ihrer mit Ovalbumin-transfizierte Variante EG7 injiziert. Die Tumorpräsenz und Dynamik seines Wachstums wurden wöchentlich mittels der Biolumineszenz-Imaging Methode untersucht, und die Therapie nach einem der zwei Grundprinzipien angesetzt: entweder wurde Spender *in vivo* durch die B6-Milzzellen und SVL9 Peptid immunisiert und mit SVL9 Peptid anschließend *in vitro* restimuliert, oder die Spenderlymphozyten wurden nur einmal, *in vitro* mit SVL9 stimuliert. Beide therapeutischen Optionen wurden bei den aufgrund der Größe des Tumors standardisierten Mäusegruppen angewandt, und die Anwesenheit der restlichen Tumorzellen nach der Behandlung mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis (Gal-X) untersucht.

Die Behandlung mit der immunisierten Spenderlymphozyteninfusion führte bei beiden therapeutischen Varianten zu einem längeren Überlebens (mehr als die Hälfte der Mäuse überlebte länger als 80 Tagen), im Vergleich mit der Behandlung mit nicht immunisierter Spenderlymphozyteninfusion (39-70 Tagen), bzw. mit der Kontrollgruppe (22.-34. Tagen).

Bei den therapieresistenten Mäusen wurden die regulatorischen CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>/Foxp3 T-Lymphozyten untersucht, und bei den länger als 80 Tagen überlebenden Mäusen die

Anwesenheit die SVL 9-spezifischer CD 8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten mittels CFSE- *in vivo* Zytotoxizitätstest.

## 2. EINLEITUNG

Ein Mensch ist, wie alle anderen Lebewesen auch, ein offenes System und damit verschiedenen Einflüssen seiner Umgebung ausgesetzt.

Der Integritätsschutz dieses offenen Systems ist eine Funktion des Immunsystems.

Dieses Immunsystem spiegelt auch eine starke biologische Individualität jedes Organismus wieder, die durch seine genetische Basis bedingt ist.

Das Immunsystem hat eine sehr komplexe Zusammensetzung und ist aus genetischen, molekularen und zellulären Bestandteilen strukturiert, die dynamisch miteinander interagieren und ein verwickeltes Kommunikationsnetz bilden. Neben seiner Komplexität sollte als eine Besonderheit des Immunsystems auch seine Fähigkeit hervorgehoben werden, aufgrund einer unmittelbaren Erfahrung aus der Umgebung zu lernen.

### 2.1. Die Zellen des Immunsystems

Eine Immunreaktion kann durch Antikörper (*humorale Immunität*) oder durch die Wirkung der Immunzellen (*zelluläre Immunität*) induziert werden. Die freie und intensive Zirkulation dieser Effektormechanismen gewährleistet eine Generalisierung der Immunreaktion bzw. Informationsübertragung, Erkennung und Wirkung schon von einer Distanz aus.

Im Plasma und extrazellulären Flüssigkeiten vorhandene Antikörper (Immunoglobuline) sind lösliche, reaktive Glikoproteine, sezerniert von Plasmazellen. Diese stellen eine durch den Kontakt mit dem Antigen ausdifferenzierte Form von B-Lymphozyten dar.

Die T-Lymphozyten, die die zweite Lymphozythauptgruppe darstellen, entwickeln sich nach dem Kontakt mit dem Antigen zu T-Effektorzellen (zytotoxische T-Zellen), die CD8-Moleküle an ihrer Oberfläche exprimieren, und zu T-Helfer ( $T_H$ -Zellen), die durch CD4-Moleküle gekennzeichnet sind.  $T_H$ -Zellen unterteilen sich in  $T_{H1}$ -Zellen, die Zytokine freisetzen und Makrophagen aktivieren und in  $T_{H2}$ -Zellen, die B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion aktivieren.

### 2.2. Antigen-Präsentation und Antigenerkennung

Aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks entstandene T- und B-Lymphozyten differenzieren sich an verschiedenen Orten. T-Lymphozyten reifen im Thymus heran und durch die somatische Rekombination der Gensegmente entstehen die membranbindenden Proteine bzw. T-Zell-Rezeptoren (TCR) mit außerordentlicher Diversität.

Wenn dieser funktionstüchtige TCR an der Zelloberfläche vorhanden ist, werden T-Lymphozyten selektiert. Autoreaktive T-Zellen werden eliminiert, und nur jene T-Zellen, die einen Komplex aus körpereigenem Peptid und MHC-Molekül binden können, verlassen den Thymus. Jeder TCR ist deshalb spezifisch für eine bestimmte Kombination aus einem Selbst-Peptid und einem MHC-Molekül.

MHC-Moleküle sind hochpolymorphe Glykoproteine, kodiert von Genen in MHC-(*major histocompatibility complex*) oder Haupthistokompatibilitätskomplexe. Sie besitzen eine peptidbindende Furche, die eine Vielzahl verschiedener Peptide innerhalb der Zelle aufnimmt und an die Zelloberfläche befördert, wo sie von geeigneten T-Zellen erkannt werden.

Der TCR erkennt nur einen zusammengesetzten Ligand aus einem körpereigenen MHC-Molekül und einem Peptidfragment aus einem entfalteten, prozessierten Proteinantigen. Jede reife T-Zelle trägt etwa 30 000 Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche, und jeder Antigenrezeptor ist ein Heterodimer, zusammengesetzt aus je einer hochvariablen  $\alpha$ - und  $\beta$ - Glykoproteinkette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden und im Komplex mit den CD3-Ketten in der Zellmembran eingelagert sind. Jede Kette enthält eine konstante (C) und eine variable (V) Region. Nebeneinander liegende variable Domänen bilden eine Antigenerkennungsstelle. (Eine kleine Gruppe von T-Lymphozyten trägt einen anderen, aus  $\gamma$ - und  $\delta$ -Polypeptidketten gebauten, Rezeptor). Zwei Untergruppen von T-Lymphozyten,  $CD4^+$ -Helferzellen und  $CD8^+$ -zytotoxische T-Lymphozyten unterscheiden sich voneinander durch die Zelloberflächenproteine und auch durch die Klassen von MHC-Molekülen (Klasse I oder II), die sie erkennen. Eine bestimmte T-Zelle kann ein bestimmtes Peptidantigen nur dann erkennen, wenn es nur an ein bestimmtes und kein anderes MHC-Molekül gebunden ist-Antigenerkennung ist MHC-restringiert. Die Bindung eines MHC-Moleküls an das  $CD4^+$ -Molekül auf den Helfer-Zellen, bzw. an das  $CD8^+$ -Molekül der zytotoxischen T-Zellen, vergrößert die Bindungsaffinität der T-Zellen für den Antigen-MHC-Komplex.  $CD8^+$ -Molekül und  $CD4^+$ -Molekül agieren als Korezeptoren für TCR und verstärken die T-Zellen-Antwort.  $CD8^+$ -Lymphozyten erkennen den Komplex aus Peptid und MHC-Klasse I-Molekül, während die  $CD4^+$ -Helferzellen die beladenen MHC-Moleküle Klasse II erkennen. MHC-Klasse I-Moleküle binden Peptide aus Zytosol-Proteinen, die im Proteasom abgebaut werden. Diese Peptide werden durch ein ATP-bindendes Protein ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo sie an partiell gefaltete MHC-I-Moleküle gebunden werden.

Durch diese Peptidbindung wird die Faltung des MHC-I-Moleküls vervollständigt, woraufhin ein Peptid-MHC-Komplex das ER verlässt und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert wird. MHC-Moleküle der Klasse II binden Peptide von Erregern, die durch Endozytose in das vesikuläre System von Antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen) aufgenommen werden. Die Aktivierung von T-Zellen durch die fremden Peptide führt zu ihrer Proliferation und zur Differenzierung der Effektorzellen. CD 8<sup>+</sup>-T-Zellen töten die Zellen, die fremde Peptide präsentieren, und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aktivieren andere Zellen des Immunsystems: B-Zellen zu Antikörperproduktion und Makrophagen zur Zerstörung der Krankheitserreger in ihren Vesikeln. Der MHC-Gen ist durch zwei Eigenschaften gekennzeichnet: Er ist polygen, so dass er verschiedene Loci für MHC-Klasse I und MHC-Klasse II enthält. Er ist auch sehr polymorph, da er für jeden Locus mehrere Allele besitzt. Momentan sind die MHC-Gene die Gene mit dem höchsten bekannten Polymorphismus. Der als H-2 Gene bezeichnete Haupthistokompatibilitätskomplex bei Mäusen liegt auf dem Chromosom 17. Der MHC-Komplex bei Menschen, auch HLA (Human Leukocyte Antigen) genannt, enthält über 200 Gene in einer 4 Megabasen großen Region, die auf dem Chromosom 6 liegt. Zu den HLA-Antigenen der Klasse I zählen HLA-A, HLA-B und HLA-Cw, die sich aus einer  $\alpha$ -Kette und dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin zusammensetzen. Die Klasse II-Antigene HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP werden aus einer wenig polymorphen  $\alpha$ -Kette und einer sehr polymorphen  $\beta$ -Kette gebildet. Eine besondere klinische Bedeutung hat der MHC-Komplex bei der Transplantation; er steuert die Abstoßung oder Annahme eines Transplantats.

### **2.3. Transplantation und Transplantat-Typen**

Transplantation ist die Übertragung von lebendigen Zellen, Gewebe oder Organen, von einem Spender (Donor) zum Empfänger (Rezipient), mit dem Zweck, dass das Transplantat im Empfänger eine vollkommene funktionale Integrität entwickelt. Im Bezug auf den Verwandtschaftsgrad zwischen Spender und Empfänger können folgende Transplantat-Typen unterschieden werden:

1. Ein Xenotransplantat (Heterotransplantat) ist ein Transplantat zwischen den Mitgliedern verschiedener Arten.
2. Allotransplantat (Homograft) ist ein Transplantat zwischen den nichtverwandten (allogenen) Mitgliedern gleicher Art. MHC-Allele eines Individuums wirken als

Antigene in einem anderen Individuum; MHC–Antigene werden deshalb Transplantationsantigene genannt.

3. syngene Transplantation (Isograft) ist Transplantation zwischen genetisch identischen Individuen
4. autologe Transplantation ist eine Transplantation von einer an eine andere Stelle desselben Organismus.

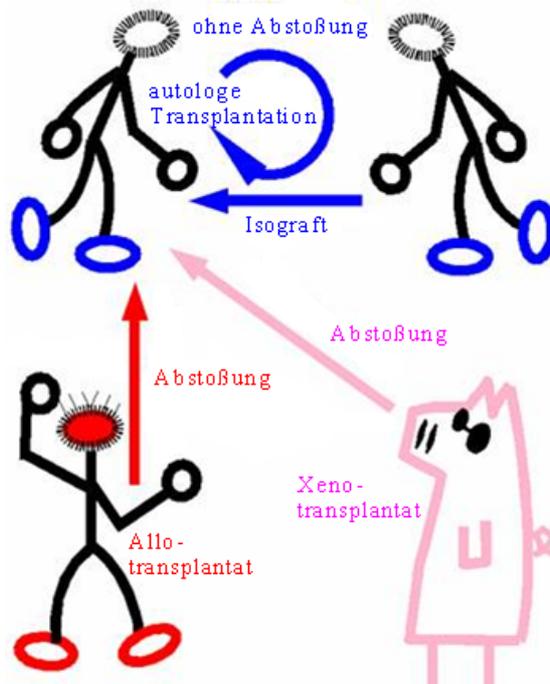


Abbildung 2.1. **Verhältnis zwischen einem Spender und einem Empfänger.**

Ein autologes Transplantat, übertragen von der einen auf die andere Stelle desselben Organismus, oder ein Isograft, gewonnen von einem eineiigen Zwilling, werden nicht abgestoßen werden; ohne Immunsuppression führt die Transplantation zwischen den Mitgliedern verschiedener Arten (Xeno-, Heterotransplantat) oder zwischen den nichtverwandten Mitgliedern gleicher Art (allogenes Graft) immer zur Abstoßung. Dies entsteht aufgrund der genetischen Unterschiede innerhalb der Haupt- und der Nebenhistokompatibilitätsantigene.

Nach: Halling-Brown MD: *Computational Techniques for the Prediction of Minor Histocompatibility and T cell Antigens.*

Die Erfolgswahrscheinlichkeit einer Transplantation hängt vom Übereinstimmungsgrad innerhalb des MHC-Komplexes ab; syngene und autologe Transplantate werden auf Dauer angenommen. Ohne Immunsuppression wird ein Allo- und Xenotransplantat abgestoßen. Die Bestimmung der HLA-Antigene (HLA-Typisierung) wird durch verschiedene serologische und molekularbiologische Techniken durchgeführt, kann aber aufgrund der polymorphen Natur und der Komplexität der menschlichen MHCs nie ganz exakt sein. Eine perfekte Übereinstimmung

innerhalb des MHC-Komplexes ist nur bei einem hohen Verwandtschaftsgrad zwischen Spender und Empfänger möglich, z.B. bei Geschwistern. Aber auch in Fällen, wenn sie verwandt aber keine eineiigen Zwillinge sind, können die genetischen Unterschiede in anderen Loci zur Abstoßung führen. Diese Abstoßung erfolgt hier langsamer und beruht auf Nebenhistokompatibilitätsantigenen (*minor histocompatibility antigens, mHAs*). Nebenhistokompatibilitätsantigene sind zusätzliche Transplantationsantigene, die außerhalb von MHC-Komplexen existieren.

## 2.4. Nebenhistokompatibilitätsantigene (mHAs) und Single Nucleotide-Polymorphismus

Die Nebenhistokompatibilitätsantigene entstehen als Folge von zellulären Mechanismen, durch welche die fremden Proteine prozessiert und den T-Zellen präsentiert werden. Durch diese Mechanismen werden endogene Proteine zu Peptiden proteolytisch abgebaut, und diese wiederum mittels eines Peptid-Transporters in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort können sich prozessierte Peptide an die MHC-Moleküle binden, durch den Golgi-Apparat wandern und an der Zelloberfläche in einem Komplex mit dem MHC-Molekül präsentiert werden.

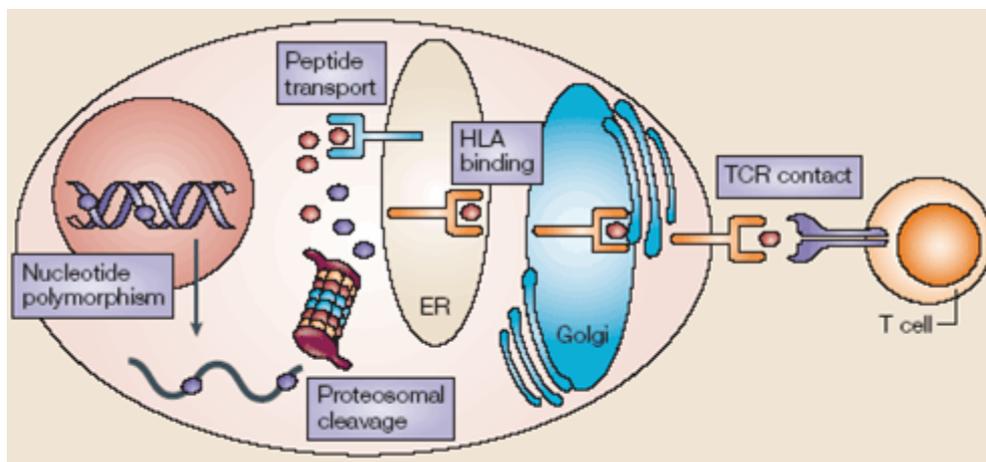


Abbildung 2.2. **Prozessierung und Präsentation von Nebenhistokompatibilitätsantigenen.** Nebenhistokompatibilitätsantigene entstehen als die Folge vom Nukleotidpolymorphismus und stellen eine vielfältige Gruppe der als Alloantigene wirkenden und im Komplex mit MHC-Molekül präsentierten Peptide dar. [www.medscape.com](http://www.medscape.com)

Nebenhistokompatibilitätsantigene entstehen durch den Nukleotidpolymorphismus innerhalb von kodierenden Gensequenzen, was zu Unterschieden in Aminosäuresequenzen homologer Proteine zwischen Empfänger und Spender führt.

Daher werden diese homologen Proteine unterschiedlich abgebaut oder transportiert. Ihre Bindung an das MHC-Molekül oder der Kontakt mit dem TCR kann geändert werden. Deshalb erkennen die Spender-T-Zellen ihre Peptidfragmente, die an gleiche MHC-Allele binden, als fremde Antigene. Die Mehrheit der heute bekannten Nebenhistokompatibilitätsantigene resultiert aus einer nichtsynonymen Nukleotidsubstitution, so dass in Peptidfragmenten nur eine oder wenige Aminosäuren ausgetauscht werden.

Diese Variationen einzelner Basen sind als *Single Nucleotide*-Polymorphismus bekannt (SNPs). Wegen des SNPs haben die Individuen einer Population unterschiedliche Allele in der genomischen DNA. Die SNP gehen auf Mutationen zurück, die sich im Laufe der menschlichen Evolution ereignet haben (Knippers, 8. Auflage) und stellen die häufigste Form von Variationen der DNA-Sequenzen dar (Collins et al., 1998). Da die polymorphen Stellen in dem Genom zahlreich und hoch konserviert sind, kommen sie bei der Gen-Kartierung und Diagnostik zum Einsatz.

Die Anzahl der für die Nebenhistokompatibilitätsantigene spezifischen T-Zellen ist viel niedriger als die Anzahl der alloreaktiven T-Zellen, die nichteigene MHC-Moleküle erkennen, und eine Immunreaktion gegen mHAGs ist meistens weniger schnell und intensiv als Immunantwort auf fremde MHC-Moleküle (Goulmy, 1997).

Viele durch das SNP entstandene mHAGs sind reziproke Antigene; sie können als Selbst-Peptid im Spender und als ein Alloantigen im Empfänger wirken.

In diesem Projekt wurde der Zusammenhang zwischen mHAGs und Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (*Graft-versus-Leukämie (GVL) Effekt*) in einem Mausmodell untersucht.

## **2.5. Graft-versus-Host disease (GvHD) und Leukämie**

GvHD ist die Nebenwirkung einer allogenen hämatopoetischen Stammzellentransplantation. Stammzellen sind unreife Gewebevorläuferzellen mit einem praktisch unbegrenzten Teilungs- und Differenzierungspotenzial. Die Existenz einer adulten, multipotenten Stammzelle für die Blutbildung wurde vor nahezu 100 Jahren von Maximov postuliert (Kröger et al., 2004).

Aus einer hämatopoetischen Stammzelle werden die verschiedenen Blutbestandteile des Immunsystems ständig regeneriert. Wie andere Stammzellen, ist eine hämatopoetische Stammzelle in der Lage, bei der Transplantation den Weg in ihr Mikromilieu (hier im Knochenmark) zu finden. Dieser *homing-Prozess* ermöglicht die Wiederherstellung einer durch die Strahlung oder Chemotherapie zerstörten Hämatopoese. Die allogene hämatopoetische

Stammzellentransplantation (SCT) ist eine etablierte kurative Therapie für eine Vielzahl von hämatologischen malignen und nicht-malignen Erkrankungen. Indikationen für allogene SCT sind:

1. Leukämien: akute myeloische (AML) und akute lymphatische (ALL) Leukämie, chronische myeloische (CML) Leukämie, Myelodysplastisches Syndrom, chronische lymphatische Leukämie (CLL).
2. Lymphoproliferative Erkrankungen: Multiples Myelom, Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphom
3. Nicht-maligne Erkrankungen: aplastische Anämie / Fanconi- Anämie, kombinierte Immundefizite, angeborene Fehler des Knochenmarks.

Leukämie entsteht durch die klonale Expansion von B- oder T-Zellen auf verschiedenen Entwicklungsgraden. Am ursprünglichen Krankheitsbeginn steht die Entartung einer Vorläufer-Zelle der Blutbildung, welche nicht mehr ausreifen kann und sich unkontrolliert vermehrt. Durch diese ungehemmte Vermehrung wird die normale Blutbildung unterdrückt, so dass der lebenswichtige Nachschub an Blutzellen allmählich ausfällt. Im peripheren Blut sind abnormale, unreife Leukozyten vorhanden, die Infektionserreger schwach bekämpfen, nicht aussterben und sich exzessiv multiplizieren.

**Akute lymphatische Leukämie (ALL)** ist eine progressive, maligne Krankheit und häufigste Art der Leukämie bei Kindern (70% von allen kindlichen Leukämiefällen). Sie entsteht durch die klonale Expansion von Lymphoid-Vorläufer-Zellen. Lymphozyten werden nicht reif und vermehren sich in erheblichem Maße.

**Akute myeloische Leukämie (AML)**, zu der 80-90% der akuten Leukämien der Erwachsenen zählen, entwickelt sich aus unreifen Granulozyten.

**Chronische lymphatische Leukämie (CLL)** entsteht durch die klonale Expansion von restlichen B-Gedächtniszellen, in 90% aller Fälle nach dem 50. Lebensjahr.

**Chronische myeloische Leukämie (CML)** stammt aus einer myeloiden Vorläuferzelle, die sich im Knochenmark und im Blut erheblich vermehrt.

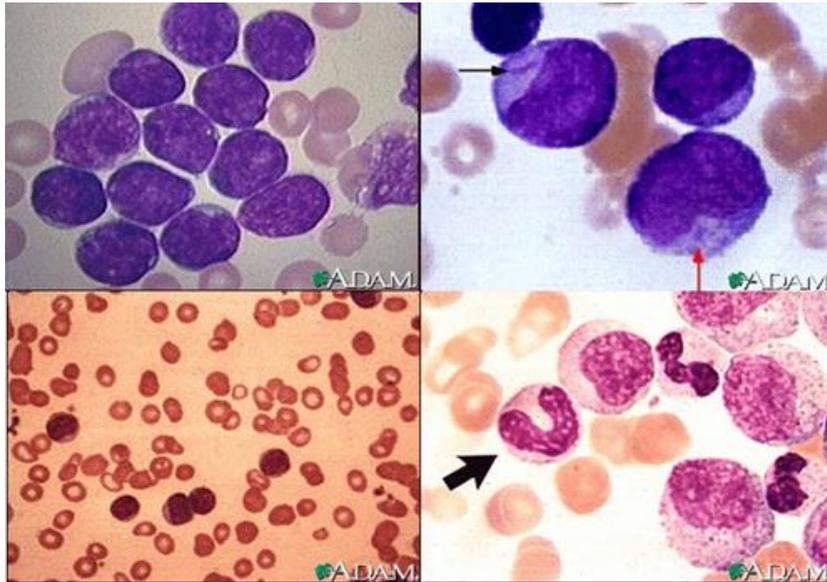


Abbildung 2.3. **Vier Hauptklassen der Leukämie mit ihren histologischen Merkmalen.**

(oben links) Akute lymphatische Leukämie: dunkel gefärbte Lymphoblasten.

(oben rechts) Akute myeloische Leukämie: auffallende Nukleoli und zytoplasmatische Granula.

(unten links) Chronische lymphatische Leukämie: überwiegend kleine, reife Lymphozyten.

(unten rechts) Chronische myeloische Leukämie: intermediär reife Zellen.

Aus: Halling-Brown MD: *Computational Techniques for the Prediction of Minor Histocompatibility and T cell Antigens.*

SCT stellt die durch diese Krankheiten gestörte Hämatopoese wieder her. Das Stammzellentransplantat kann aus drei verschiedenen Quellen gewonnen werden: aus peripherem Blut, aus dem Nabelschnurblut oder aus dem Knochenmark. Hämatopoetische Stammzellen stellen eine 1-2%-ige Fraktion aller mononukleären Zellen des Knochenmarks dar. Sie exprimieren das CD34 Antigen, aber im Unterschied zu den meisten anderen CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimieren sie dabei kein CD38-Antigen. Da diesen Zellen auch andere myeloische oder lymphoide Marker fehlen, werden sie als CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen bezeichnet (Kröger et al., 2004). Der Prozentsatz von hämatopoetischen Stammzellen im peripheren Blut beträgt nur circa 0,05%. Um Knochenmarkzellen zu stimulieren und zu mobilisieren werden hier hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und/oder Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) angewendet. Sie steigern die Konzentration von CD34<sup>+</sup>-Zellen hundertfach, jedoch nur kurzfristig (bis zum 6.-7. Tag).

T-Zellen aus kryokonserviertem Nabelschnurblut zeigen einen deutlich niedrigeren Proliferationseffekt nach allogener Stimulation als T-Zellen aus dem Knochenmark. Deshalb kann bei der Transplantationsauswahl ein höherer Grad von HLA-Inkompatibilität toleriert

werden. Da die Stammzellenzahl im Nabelschnurblut insgesamt relativ niedrig ist, wird diese Nabelschnur-Transplantation klinisch selten eingesetzt.

Nach dem Kontakt des Empfängers mit unterschiedlichen Transplantationsantigenen des Spenders kann sich eine Immunantwort entwickeln, die sich in Form einer GvHD oder HvGR (*Host-versus-Graft-Reaktion*) manifestiert.

In einer HvGR (*Host-versus-Graft-Reaktion*) reagiert das Immunsystem des Empfängers gegen die Transplantatantigene des Spenders. Diese Reaktion, vermittelt durch die Antikörper oder T-Lymphozyten, kann zu hyperakuten, akuten oder chronischen Abstoßungsreaktionen (*graft failure*) des Transplantats führen. Wann es zu diesem Ereignis kommt, das auch bei Transplantation solider Organe entsteht, hängt von den Eigenschaften der Transplantatantigene und vom Immunstatus des Empfängers ab; eine hohe Übereinstimmung im HLA-System und eine immunsuppressive Therapie können sie reduzieren.

Bei hyperakuter Form wird das Transplantat innerhalb weniger Stunden (oder sogar Minuten) durch die schon vorhandenen Antikörper abgestoßen. Diese Antikörper sind nach einer frühen Transfusion oder Transplantation entstanden.

Eine direkte Aktivierung der T-Zellen des Empfängers, in erster Linie zytotoxische T-Lymphozyten, ist der Hauptmechanismus akuter Abstoßungsreaktion, die nach einigen Tagen oder Monaten auftritt. Diese T-Zellen können durch die nächsten Erkennungsmechanismen aktiviert werden: durch eine direkte Erkennung fremder MHC Alloantigene Klasse I und II, oder durch eine indirekte Erkennung von fremden Alloantigenen, die im Komplex mit dem eigenen MHC-Molekül an Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert werden. Diese fremden Alloantigene können vom Allo-MHC-Komplex oder von alloreaktiven mHAGs prozessiert werden.

Die chronische Abstoßungsreaktion, gekennzeichnet durch Vaskulopathie und Fibrose des transplantierten Organs, das progressiv seine Funktion verliert, tritt nach einigen Monaten oder Jahren auf. Sie wird durch die aktivierten Makrophagen vermittelt, die in einer verzögerten Immunreaktion den mesenchymalen Zellwachstumsfaktor sezernieren (Wu et al., 2003).

Die Abstoßungsreaktion eines Stammzellentransplantats wird meistens durch zwei Kriterien definiert: Neutrophilenzahl und Zellularität des Knochenmarks. Bei der akuten Transplantatabstoßung, bzw. dem Versagen ist eine absolute Neutrophilenzahl von  $0,2-0,5 \times 10^9/L$  bis zum Tag 21-42 nicht erreicht, und das Knochenmark ist hypozellulär. Bei chronischem Graft-Versagen, nachdem Graft bereits akzeptiert wurde (Engraftment), kommt es zu einem späteren Abfall der Neutrophilen unter  $0,5 \times 10^9/L$  für mindestens 3 aufeinander folgende Tage.

Auch hier findet man eine Hypo- oder Azellularität des Knochenmarks (Anasetti et al., 1989). Die Versagensrate eines Stammzellentransplantats liegt unter 5%, wobei als Risikofaktoren gelten: die niedrige Zahl der Stammzellen, HLA-Inkompatibilität, unzureichende Immunsuppression vor der Transplantation (unzureichende Konditionierung), Myelofibrose und die Anwendung eines T-Zell-depletierten Transplantats.

Bei der Transplantation der hämaopoetischen Stammzellen tritt als häufige Komplikation Graft-versus-host disease (GvHD) auf. Hierbei geht es um zwei verschiedene Krankheiten: akute GvHD und chronische GvHD, die mit unterschiedlichen Symptomen und nach verschiedenen zeitlichen Abständen auftreten. Dieser pathologische Prozess repräsentiert komplexe Interaktionen zwischen den T-Zellen, Antigen-präsentierenden Zellen, Zytokinen und anderen Effektoren in einem allogenen Empfänger.

Akute GvHD tritt innerhalb der ersten drei Monate nach allogener SCT auf. Die in den Spender-Stammzellen vorhandenen T-Lymphozyten greifen, neben der Hämatopoese und dem Immunsystem, die Haut, Leber, und den gastrointestinalen Trakt des Empfängers an. Erste Symptome akuter GvHD bei Menschen beginnen mit einem lokal begrenzten Exanthem, das innerhalb weniger Tage zunimmt. Später treten Allgemeinsymptome wie Fieber und Übelkeit, sowie Diarrhöen und Zeichen der Cholestase mit Bilirubinanstieg auf. Allen diesen Symptomen liegt eine apoptotische Epithelzellschädigung mit eingewanderten Lymphozyten und inflammatorischen Zellen zugrunde (Ferrara & Deeg, 1991; Paris et al., 2001; Lee et al., 2003). Aus dem Ausmaß der Schädigung einzelner Organe wird ein Organstadium nach Glucksberg definiert, und aus Kombinationen der Organstadien wird der Gesamtschweregrad der GvHD festgelegt (Kröger et al., 2004)

Chronische GvHD ist durch weniger akutes Auftreten und eine zunehmende Beteiligung chronischer inflammatorischer Prozesse in der Haut und inneren Organen gekennzeichnet. Statt einer limitierten, für akute GvHD typischen Form der Haut- und Schleimhautbeteiligung, ist hier eine weiter reichende Form vorhanden, die weitere innere Organe und ausgedehnten Befall der Haut umfasst.



**Abbildung 2.4. Klinische Manifestationen einer Graft-versus-Host-(GvH)-Reaktion.**

*Eine GvHD, vermittelt durch die immunokompetente T-Lymphozyten innerhalb des Transplantats, die die Alloantigene des Empfängers erkennen, tritt als eine akute, eine frühe chronische oder eine spätere chronische Erkrankung auf. Links: Erythema palmare in einer akuten Graft-versus-Host Reaktion.*

*Mitte: hyperpigmentierte lichenoid Papeln und die toxische epidermale Nekrose-ähnliche Hautveränderungen bei einer frühen chronischen Graft-versus-Host Reaktion. Rechts: Ein spätere, chronische Graft-versus-Host Reaktion mit hyperpigmentierten, sklerotischen Plaques auf dem Rücken.*

*Aus: Halling-Brown MD: Computational Techniques for the Prediction of Minor Histocompatibility and T cell Antigens.*

Wie bei Menschen zeigt GvHD auch bei Mäusen einen ausgeprägten Tropismus und greift meistens die Haut, den gastrointestinalen Trakt und die Leber an. Alloreaktive T-Lymphozyten des Spenders können im Empfänger aktiviert werden, dessen Gewebe infiltrieren und anschließend beschädigen, was pathophysiologisch in einer GvHD resultiert.

Diese Alloreaktivität bei Mäusen zeigt sich durch folgende Symptome: Haarausfall und zerzauste Haare, Gewichtsverlust, Diarrhöen, erschwerte, oberflächliche Atmung mit Tachypnoe und eventueller Todesfolge (Negrin and Contag, 2006).

Wie entsteht eine GvHD?

Die drei Voraussetzungen zur Entwicklung der GvHD wurden schon 1966 durch Billingham postuliert:

1. das Transplantat muss immunologisch kompetente Zellen enthalten. Immunkompetente Zellen in einem Transplantat sind CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (zytotoxische Lymphozyten) und Zytokine-produzierende CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten.
2. der Empfänger muss auf seinem Gewebe Oberflächen-Antigene exprimieren, die den Spenderzellen unbekannt sind, und diese dadurch immunologisch stimulieren.
3. der Empfänger ist immunologisch inkompetent und kann durch die eigene Immunantwort die Spenderzellen nicht zerstören (Billingham, 1966).

Viele auf Tiermodellen durchgeführte Versuche haben gezeigt, durch welche Effektorzellen eine GvHD vermittelt werden kann:

1. Durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs), die für Nebenhistokompatibilitätsgene spezifisch sind. Diese mHAgS können ubiquitär oder nur auf malignen Zellen exprimiert werden.
2. Durch die CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, die ihren Antitumoreffekt durch die Zytokinproduktion vermitteln.
3. Durch die zytolytischen T-Zellen, die außerhalb vom MHC-Restriktionsmechanismus wirken.

Interleukin-2 (IL-2) kann die Proliferation und Aktivität dieser Effektorzellen stimulieren.

Da die akute GvHD oft die Organe angreift, die besonders reich an dendritischen Zellen sind, wird impliziert, dass die Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers auch zur Entwicklung des GvHDs beitragen können. (Deeg et al., 1990).

Erste klinische Knochenmarktransplantationen, durchgeführt Ende der sechziger Jahre auf der Basis der HLA-Typisierung, hatten als Zweck die Wiederherstellung der durch die Bestrahlung oder Chemotherapie zerstörten Hämatopoese. Später hat sich in klinischer Praxis gezeigt, dass das Spenderimmunsystem einen Einfluss auf die Leukämie haben könnte, weil die Patienten mit akuter und chronischer GvHD ein deutlich niedrigeres Risiko für einen Leukämierückfall hatten. Schon 1957 hat Barnes mittels eines Mausmodells postuliert, dass die allogene KMT einen antileukämischen Effekt haben könnte, da die allogenen Zellen den Empfänger kolonisieren können und durch eine Immunreaktion die restlichen leukämischen Zellen vernichten (Barnes & Loutit, 1957). In seiner Studie wurden die Mäuse mit transplantierten Leukämie-Zellen subletal bestrahlt und bekamen autologes oder allogenes Knochenmark. Die Empfänger des autologen Knochenmarks starben am Leukämierückfall, während einige Empfänger des allogenen Knochenmarks von der Leukämie geheilt wurden, starben aber später an GvHD.

Aus vielen in den 70er und 80er Jahren durchgeführten Experimenten sind die Ergebnisse entstanden, die hier kurz erwähnt werden:

1. Der Leukämierückfall ist signifikant höher bei den Empfängern eines autologen Knochenmarktransplantats als bei den Empfängern eines allogenen Knochenmarktransplantats, wenn die Patienten in Diagnose und Alter übereinstimmen, bzw. wenn sie die gleiche Konditionierung erhalten (Fefer et al., 1987).
2. Die Rückfallwahrscheinlichkeit ist kleiner als bei den Rezipienten des allogenen Knochenmarks, die GvHD entwickeln, als bei denen, wo die GvHD ausbleibt.

GvHD ist signifikant assoziiert mit der Überlebensrate (Kersey et al., 1987; Sullivan et al., 1989). Dieser Effekt hängt nicht vom Alter, Geschlecht, Vorbereitungsregime, GvHD-Prophylaxe oder von der Länge der *“follow-up“*-Periode ab.

GvHD ist auch der signifikanteste unabhängige Faktor, der mit der Senkung der Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert ist.

Eine klinisch evidente GvHD ist assoziiert mit deutlichem Graft-versus-Leukämie-Effekt (Sullivan et al., 1989). Dieser Effekt ist initiiert, wenn die T-Zellen des Spenders die Leukämie-verbundenen Antigene erkennen, die über MHC-Molekül-Klasse I oder II von Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers erkannt werden.

Der GvL-Effekt ist ausgeprägter in der chronischen Phase der Erkrankung, bei minimaler Resterkrankung, beim Auftreten von GvHD und wenn die medikamentöse GvHD-Vorbeugung gering ist.

3. Die Leukämierückfallrate ist niedriger beim Empfänger des allogenen Knochenmarks die keine GvHD entwickeln, als beim Empfänger eines autologen Knochenmarks (Horowitz et al., 1999).
4. Wurden immunkompetente Zellen (T-Lymphozyten) aus dem Knochenmark entfernt, steigt die Leukämierückfallrate dramatisch an.

Die Leukämierückfallrate ist höher beim Empfänger eines T-Zell-depletierten allogenen Knochenmarks als beim Empfänger eines unmodifizierten Knochenmarks (Horowitz et al., 1999). Aus diesen Ergebnissen folgt: Die Leukämierückfallrate und Inzidenz von GvHD stehen in umgekehrter Proportion zueinander.

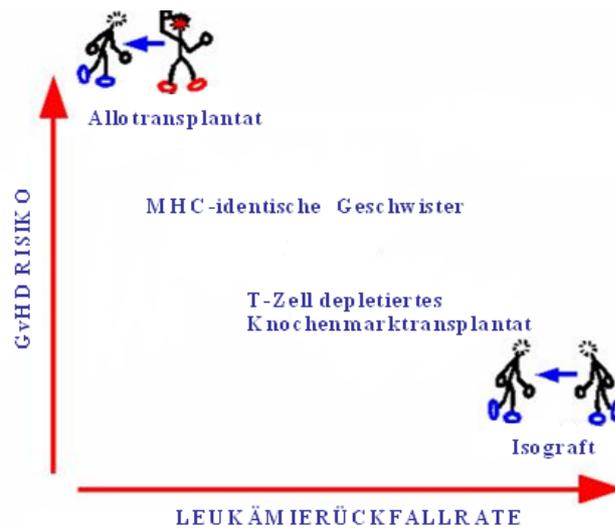


Abbildung 2.5. *Ungeachtet des Übereinstimmungsgrads zwischen dem Empfänger und dem Spender, stehen nach einer Knochenmarkstransplantation das GvHD-Risiko und die Häufigkeit eines Leukämierückfalls in umgekehrter Proportion zueinander.*

*Je mehr ein Knochenmarkstransplantat mit dem Empfänger überein stimmt, desto häufiger kommt es zum Leukämierückfall; ein niedriger Übereinstimmungsgrad erhöht das Risiko einer GvH- Reaktion.*

Eine mögliche Erklärung, warum die GvHD eine supportive Wirkung auf den GvL-Effekt haben könnte, ist auf der Abbildung 2.6. dargestellt.

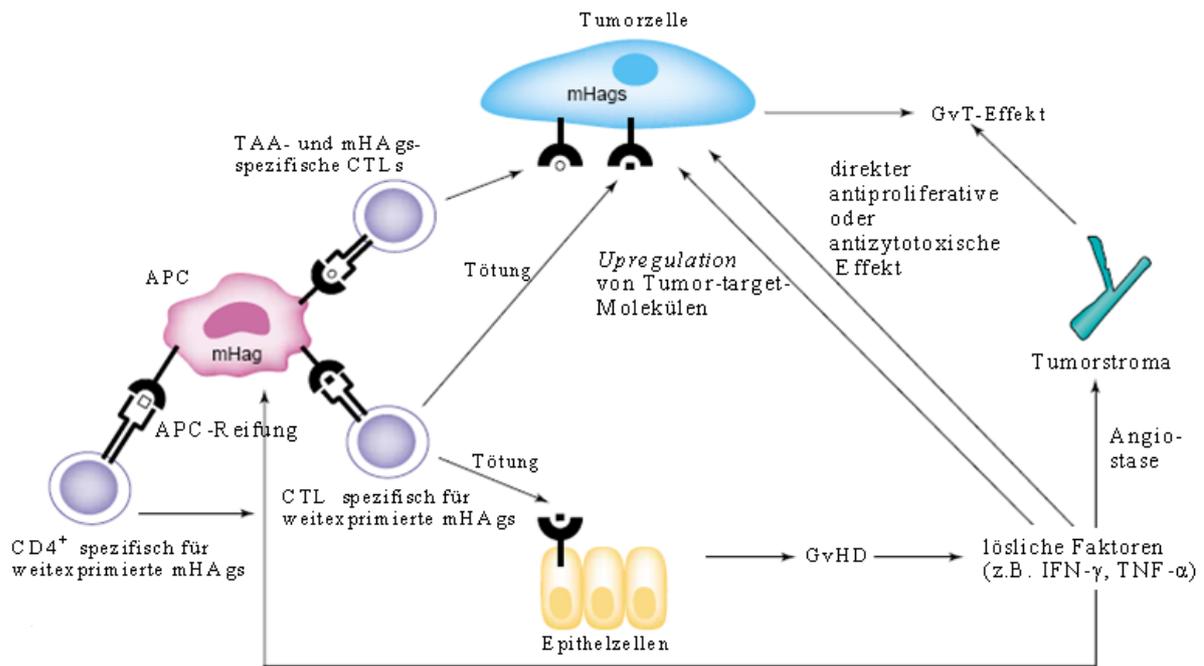


Abbildung 2.6. *Supportive Wirkung einer GvHD auf den GvL-Effekt.*

Der supportive Effekt der GvHD auf den GvL-Effekt kann mittels der löslichen, in einer GvHD freigesetzten Faktoren wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , über die nachfolgenden Mechanismen ausgelöst werden:

- über den direkten antiproliferativen oder zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen,
- durch eine Tumor-nicht-spezifische Inhibition der Angiogenese,
- über die Steigerung der Antigen-Präsentation auf die Tumorzellen oder durch Induktion der APC- Reifung.

Aus: Hambach L, Goulmy E. Immunotherapy of cancer through targeting of minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* 2005.

Diese Beobachtungen haben das therapeutische Konzept für Leukämie geändert. Nach dem früheren therapeutischen Modell wurden myeloablative Bestrahlungsdosen und die Chemotherapie eingesetzt, um die Leukämiezellen zu eliminieren, und eine danach folgende allogene Knochenmarktransplantation sollte die Blutbildung gewährleisten, um den Tod aufgrund des Blutzellenmangels zu vermeiden.

Nach neuen therapeutischen Schemata, die aus oben erwähnten Beobachtungen resultieren, sollten Leukämiezellen mittels allogener Effektorzellen eines Knochenmarktransplantats bekämpft werden. Limitierte Bestrahlungsdosen und Chemotherapie ermöglichen den Stammzellen des Spenders ein Engraftment als Basis für die spätere adoptive Immuntherapie. Eine allogene Knochenmarktransplantation könnte bereits als eine Form der Immuntherapie gesehen werden, da allogene T-Lymphozyten den GvL-Effekt mediiieren.

Ein GvL-Effekt und GvHD sind im Grunde genommen ähnlich, unterscheiden sich jedoch voneinander durch das Gewebe und die Zellen, die sie angreifen. Während GvHD eine Antwort auf die breit oder ubiquitär verteilten MHC- und/oder mHAg- Alloantigene darstellt, entsteht durch eine begrenzte Immunreaktion auf Leukämie-spezifische Antigene und auf nur hämatopoetisch exprimierte mHAg ein GvL-Effekt, was zur Vernichtung der Leukämiezellen führt.

Ein GvL-Effekt kann ohne gleichzeitige GvHD auftreten (Slavin et al., 1990), was impliziert, dass die Antigene bei diesen zwei verschiedenen Immunreaktionen nicht immer identisch sind.

Nach einer Knochenmarktransplantation können drei verschiedene Gruppen von Spender-T-Zellen ein MHC-Antigen-Komplex an der Oberfläche der Empfängerzellen erkennen:

1. Spender-alloreaktive-T-Zellen erkennen Empfänger-MHC-Moleküle. Da die MHC-Moleküle auf normalen Zellen und auf Tumorzellen vorhanden sind, vermitteln diese T-Zellen den GvHD und GvL-Effekt.
2. T-Zellen des Spenders, die spezifisch für mHAg-Antigene des Empfängers sind, führen zum GvHD und zum GvL-Effekt, wenn diese mHAg-Antigene ubiquitär exprimiert sind, bzw. nur zum GvL-Effekt, wenn ihre Distribution hämatopoetisch restringiert ist.
3. einige Tumor-spezifische T-Zellen des Spenders reagieren nur mit Tumor-spezifischen Antigenen, die an Tumorzellen bzw. bei Leukämie an hämatopoetischen Zellen vorhanden sind. Diese Reaktion vermittelt den GvL-Effekt.

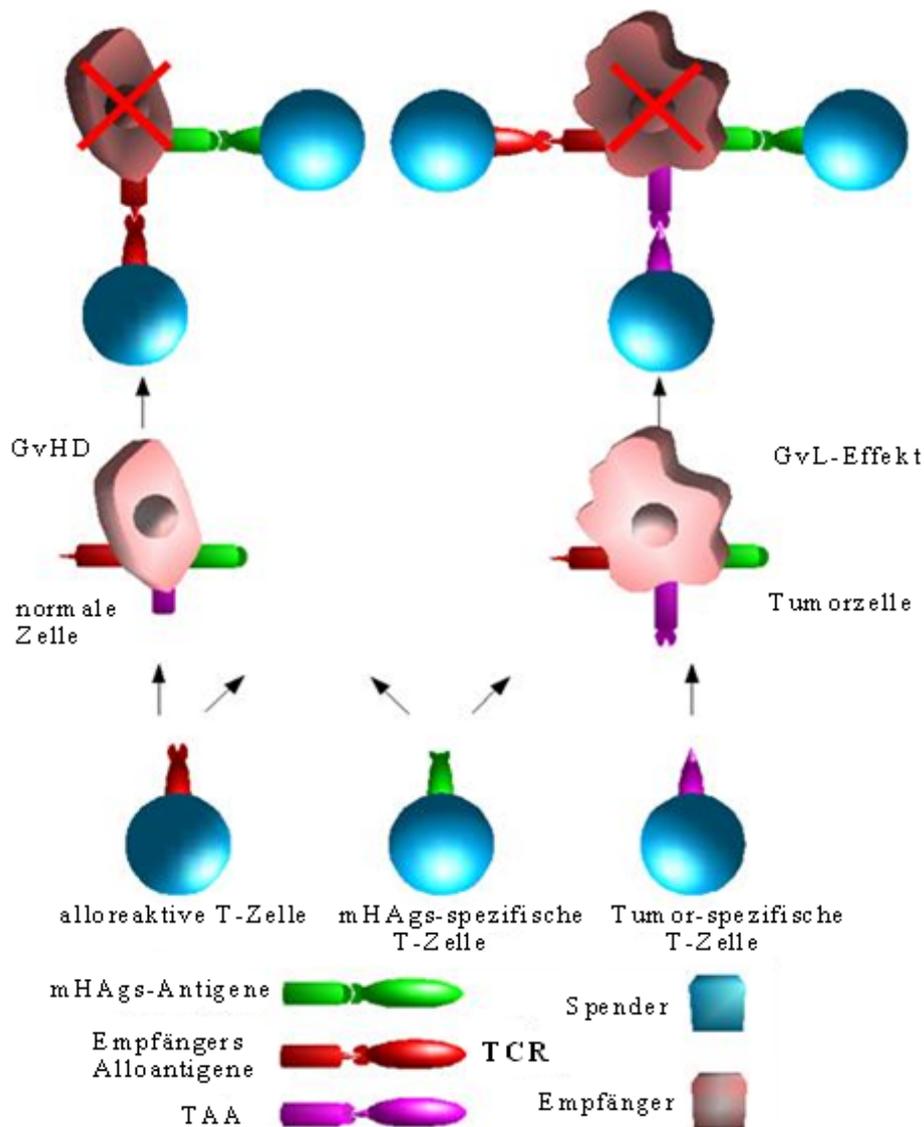


Abbildung 2.7. Zellen, die in einer Immunreaktion nach allogener Knochenmarktransplantation beteiligt sind.

Drei verschiedene Klassen von T-Lymphozyten können einen MHC:Antigen Komplex auf der Oberfläche der Empfängergewebe erkennen.

Nach: Halling-Brown MD: Computational Techniques for the Prediction of Minor Histocompatibility and T cell Antigens.

Durch Manipulation der unter 2. genannten T-Lymphozyten des Spenders sollte es möglich sein, einen GvL-Effekt von unerwünschter GvHD zu trennen. Um diese Trennung zu erreichen, sollten solche mHAgs identifiziert werden, die ausschließlich an hämatopoetischen Zellen exprimiert sind. Ein ideales mHAg sollte auch erforderlich für das Funktionieren der Zelle sein, damit Leukämiezellen durch seine Mutation der Immunerkennung nicht entgehen.

Das Hauptkriterium bei der Selektion eines mHAgS bei der Induktion des GvL-Effekts ist seine Expression an Leukämiezellen.

Um den GvHD und GvL-Effekt nach einer allogenen Knochenmarktransplantation zu untersuchen, wurde in diesem Projekt das Maus-Nebenhistokompatibilitätsantigen H13 ausgewählt. Leukämie-Zellen EG 4, bzw. ihre mit dem Ovalbumin -transfizierte Variante EG 7, stammen vom C57BL/6- Mausstamm. Der H13 Locus auf Chromosom 2, entdeckt 1967 von Snell, ist polymorph und kommt in zwei allelischen Varianten vor: als H13<sup>b</sup> im BALB.B(CB10)-Stamm, der als Spender benutzt wurde und als H13<sup>a</sup> im C57BL/6-Empfängerstamm. Diese Stämme stimmen im MHC-Komplex überein und zeigen beide den H2<sup>b</sup>-Haplotyp (Snell et al., 1967).

Das Genprodukt dieses nicht-dominanten, ubiquitär exprimierten Gens ist ein Protein, das in zwei verschiedene Nonapeptide prozessiert werden kann, je nach Haplotyp. Beide Nonapeptide werden im Komplex mit dem MHC-Klasse I-D<sup>b</sup> Molekül präsentiert.

Das prozessierte Nonapeptid vom BALB.B(CB10)-Stamm enthält die Aminosäure Isoleucin (Abkürzung SIL 9) und auf der gleichen Position beim vom C57BL/6-Stamm prozessierten Nonapeptid befindet sich Valin (Abkürzung SVL 9).

Diese zwei Haplotypen unterscheiden sich voneinander aufgrund der Substitution einer Methyl-Gruppe, da Isoleucin eine zusätzliche Methyl-Gruppe hat. Der H13<sup>a</sup>-Haplotyp enthält eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Hpy 991*.

**Forward primer**

```

1 gacgatgctg acagccatgc cctccttcag gcgctgacag gttgggggtg ggggggcagc
61 ctactctgg ggagtgaact tatctggcct ctctgccag agatcatcaa ctatgagtt
121 gacactaagg acctggtgtg cctgggcct aagcagcgtc/a ttggtgtctg gtaccttctg
181 aggaaggtaa gtcagagcct gcgcagaagg ggaggttggg ctgacaaggg cag
  
```

**Reverse primer**

**SIL 9 ... agc agc gtc att ggt gtc tgg tac ctt ...**

**SVL 9.. agc agc gtc gtt ggt gtc tgg tac ctt ...**

160 bp ←  → 73 bp

*Hpy 991*

Abbildung 2.8. Proteolytische Produkte des H 13 Antigens sind SVL 9- oder SIL 9-Nonapeptid.

Vom Restriktionsenzym Hpy 991 kann die für SVL 9 Nonapeptid kodierende Sequenz erkannt werden; dieses Peptid entsteht durch proteolytischen Abbau des H13<sup>a</sup>-Haplotyps.

Die Leukämie-Zellen EG 4, bzw. ihre mit dem Ovalbumin transfizierte Variante EG 7, stammen vom C57BL/6-Mausstamm und exprimieren mehr als 45 SVL 9 Nonapeptid-Moleküle, die auch im Komplex mit dem MHC-Klasse I-D<sup>b</sup>-Molekül präsentiert werden (Mendoza et al., 1997).

## 2.6. Adoptive Immuntherapie und TCR-Transfer

Obwohl eine allogene Stammzelletransplantation ein hohes therapeutisches Potenzial hat, stellt das Rezidiv des Tumors die Hauptursache für ein Therapieversagen dar (Sullivan et al., 1989). Der kurative Effekt der Spenderlymphozyteninfusion wurde 1990 von Kolb entdeckt. CML-Patienten, die nach einer allogenen Knochenmarktransplantation einen Rückfall erlitten hatten, wurden durch die Infusion von Spenderlymphozyten (DLI, *donor lymphocyte infusion*) vollständig und langfristig geheilt (Kolb et al., 1990).

Bei diesem therapeutischen Ansatz übertragene Zellen sollten nicht fehlendes Gewebe ersetzen, wie bei Transplantation, sondern führen eine unmittelbar therapeutische Effektorfunktion aus.

Was ist Wirkungsprinzip einer adoptiven Immuntherapie?

Viele auf den Tieren durchgeführte Versuche zeigten, wovon die Wirksamkeit einer zellulären Immuntherapie abhängt:

- T-Zellen des Spenders sollten auf Tumor-assoziierte Antigene immunisiert werden und dann immunspezifisch auf sie und auf mit ihnen zugehörige MHC-Antigene reagieren. *Target*-Antigene können auch Nebenhistokompatibilitätsantigene sein, für die ein *mismatch* zwischen Spender und Empfänger besteht und die im Idealfall nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden.
- Infundierte Lymphozyten sollten im Empfänger für längere Zeit proliferieren und persistieren.
- Die Wirksamkeit der adoptiven Therapie ist direkt von der Zahl der infundierten T-Zellen des Spenders abhängig. Der Effekt ist bei größeren Dosen besser.
- Interleukin-2 (IL-2) unterstützt das Wachstum Tumor-spezifischer T-Zellen *in vitro*.
- der IL-2 verstärkt den therapeutischen Effekt dieser adoptiv transferierten Lymphozyten auch *in vivo*.
- Ein therapeutischer Effekt dieser *in vivo* produzierten Zellen ist verstärkt, wenn sie *in vitro* mit entsprechendem Tumorantigen restimuliert werden.

Neben der Antigen-spezifität ist ein Vorteil dieser Methode auch die Fähigkeit der Lymphozyten zu "homing in" im Tumor. Beide Lymphozytenpopulationen in der Spenderlymphozyteninfusion -CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> vermitteln die Vernichtung der Tumorzellen, aber durch die verschiedenen Effektormechanismen. Von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten produzierte Lymphokine aktivieren die anderen Effektorzellen, z.B. Makrophagen, die den Tumor töten. Andererseits, CD8<sup>+</sup>-Zellen erkennen Tumor-Antigene im Komplex mit MHC-Molekül und lysieren den Tumor direkt, mit einer MHC-Klasse I-restringierten Spezifität.

Der gewünschte Graft-versus-Leukämie-Effekt dieser Spenderlymphozyteninfusion kann auch von GvHD begleitet sein. Durch einen adoptiven Transfer nur solcher T-Zellen, die für Tumor-assoziierte Antigene oder für hämatopoetisch restringierte mHAg spezifisch sind, könnte einer Graft-versus-Leukämie-Effekt vom GvHD getrennt werden. Bei dieser Form der adoptiven Therapie ist es aber schwer, eine ausreichende Menge von Antigen-spezifischen T-Zellen zu produzieren und ihre Spezifität nach der Infusion zu kontrollieren.

Eine alternative Strategie dazu wäre es, mittels des Transfers des T-Zellrezeptors eine Spender - T-Zellen-Population zu produzieren, die eine bestimmte Spezifität gegen den Tumor besitzt.

Dass ein TCR-Transfer in die T-Zellen des Empfängers ihre Antigen-spezifität verändern kann, wurde 1986 durch Dembić bewiesen (Dembić et al., 1986).

Andere Gruppen haben gezeigt, dass dies nicht nur für einen Tumorantigen-spezifischen TCR sondern auch für den Virus-spezifischen TCR gilt.

Ein Transfer von für Klasse I-restringiertem- TCR in die CD8<sup>+</sup> T-Zellen, bzw. ein Transfer von für Klasse II restringiertem-TCR in die CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt zu:

1. einer funktionellen Änderung von T-Zellen,
2. einer Antigen-spezifischen zytolytischen Aktivität und
3. zur Antigen-spezifischen Sekretion von Zytokinen.

Bei dieser Methode werden Antigen-spezifische T-Zellrezeptoren kloniert, um diese dann durch retroviralen Gentransfer in die T-Zellen einzuführen. So kann eine große Anzahl von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten in relativ kurzer Zeit generiert werden. Nach retroviralem Gentransfer eines hochreaktiven TCRs in die T-Lymphozyten bleibt seine hohe Reaktivität auch in Tochterzellen erhalten. Im Vergleich zu Elternzellen zeigen sie auch eine unveränderte Peptidspezifität. Durch den TCR-Transfer kann die Selbsttoleranz autologer T-Zellen gegen die Tumor-assoziierten Antigene umgangen werden (Stanislowski et al., 2001).

Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass ein mittels des Retrovirus transferierter TCR mit einem endogen exprimierten TCR sich verbinden und so einen neuen TCR-Komplex mit unerwünschter Spezifität formieren kann. Der Transfer vom TCR  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette in die T-Zellen resultiert in einer Expression von TCR an der Zelloberfläche. Daneben werden auch endogene und gemischte, dimere TCR in nachfolgenden Verhältnissen exprimiert: eingeführter und endogener TCR je 25 % und gemischter TCR 50 % (Heemskerk et al., 2004).

Eine Modifikation des TCR-Transfers benutzt die *in vivo* latent persistierenden Viren: CMV (Cytomegalie -Virus) oder EBV (Epstein-Barr-Virus).

Gegen diese Viren gerichtete T-Zellen können für einen TCR-Transfer benutzt werden, um eine antileukämische Aktivität zu erreichen. Diese Zellen werden auch durch den endogenen, Virus-spezifischen TCR aktiviert.

TCR, der spezifisch für einen mHA<sub>g</sub> ist, wird in Virus-spezifische T-Zellen des Spenders übertragen. Dieser mHA<sub>g</sub> sollte nur an hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, um einen GvL-Effekt ohne GvHD zu erreichen.

## 2.7. Biolumineszenz Imaging *in vivo*

Nichtinvasive Methoden zur Messung und Visualisierung einer Immunreaktion *in vivo* sind:

PET (positron emission tomography),

SPECT (single photon emission computed tomography),

MRI (Magnetresonanztomographie),

BLI (Biolumineszenztomographie) und

FLI (Fluoreszenztomographie).

BLI und FLI sind anwendbar auf Tiermodelle, aber ihre klinische Anwendung ist limitiert.

BLI, Biolumineszenz Imaging, basiert auf der Expression eines lichtemittierenden Enzyms, wie Luciferase, in den Zielzellen oder Organen. Reporter-Gen Luciferase katalysiert Oxydation ihres Substrats Luciferin zum inaktiven Oxyluciferin in der Anwesenheit von Sauerstoff und Magnesium, was zur Lichtproduktion führt. In dieser energieabhängigen Reaktion entsteht Luciferin-Adenylat als Intermediat. Die in dieser Reaktion entstandenen Photonen durchlaufen die Gewebeschichten und werden durch ein sensitives System detektiert. Hier muss eine Zelle mit dem Reporter-gen exprimiert und das Substrat für die enzymatische Reaktion in das Tier injiziert werden.

Luciferase kann entweder von Meer- oder terrestrischen Eukaryoten kloniert werden. Das Substrat, das von der Luciferase benötigt wird, entspricht ihrer Herkunft. Meer-Biolumineszenz-Organismen benutzen Coelenterasin als Substrat, und terrestrische Organismen D-Luciferin. Da D-Luciferin länger zirkuliert als Coelenterasin und durch die Enzyme der Säugetiere weniger katalysiert wird, wird bei der Auswahl dieser Enzym-Substrat-Kombination *in vivo* ein länger anhaltendes Lichtsignal gewonnen. Dieses Signal ist weniger absorbiert von umgebenden Geweben, da es eine größere Wellenlänge als das in Coelenterasin-Luciferase-Reaktion gewonnene Blaulicht-Signal hat. *Biolumineszenz-Imaging* hat folgende Vorteile gegenüber anderen Methoden der Visualisierung einer Immunreaktion: *in vivo* BLI ist hoch sensitiv, vielfältig und nicht invasiv. Durch *in vivo*-BLI können das Tumorswachstum innerhalb von Organen, therapeutischer Effekt, Rezidiv und die kleinste Menge von Tumorzellen (*minimal disease*) detektiert, bzw. ein GvL-Effekt visualisiert werden. Im BLI-Gerät können mehrere Tiere gleichzeitig untersucht werden, die Methode ist ungefährlich für Tiere, einfach auszuführen und auch preiswerter als oben genannte SPEC, MRI und PET. Die *Imaging-Zeit* ist meistens kurz, und die Visualisierung ist nicht mit ionisierender Bestrahlung verknüpft. Es können verschiedene Reporter-Gene und Farben benutzt werden. Diese Methode hat auch ein gutes *Signal-to-noise-Verhältnis* (SNR/ Signal to Noise Ratio) (Troy et al, 2004). Die im Projekt angewendeten Leukämie-Zellen EG 7 und EL 4 wurden mit dem Reporter-Gen Luciferase transfiziert, um diese Methode einsetzen zu können.

### 3. FRAGESTELLUNG

Das Maus-Modell wurde etabliert, um folgendes zu untersuchen:

- die Verbindung zwischen den Nebenhistokompatibilitätsantigenen und dem Graft-versus-Leukämie-Effekt,
- das therapeutische Potenzial von Spenderlymphozyten nach einer allogenen Knochenmarktransplantation, die für Nebenhistokompatibilitätsantigene spezifisch sind.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1. Mäuse:

Herkunft der Tiere:

C57BL/6 Charles River Laboratory, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld.

C.B10 The Jackson Laboratory, 600 Main Street, 04609 Bar Harbor, Maine, USA.

Tabelle 4.1. Unterschiede in Nebenhistokompatibilitätsantigenen zwischen dem BALB.B (C.B10) und dem C57BL/6-Stamm. Beide stimmen im Haupthistokompatibilitätskomplex (H-2b) überein.

(H-2b) BALB.B(C.B10) SPENDER	Nebenhistokompa- tibilitätsantigene	(H-2b) C57BL/6 EMPFÄNGER
<b>b</b>	<b>H 13</b>	<b>a</b>
-	<b>H 7</b>	<b>+</b>
+	H 4	-
+	H 28	-
+	H 60	-

#### 4.1.2. Medikamenten:

Rompun (Xylazine), Bayer AG, DE

Ketamin, Ratiopharm, GmbH, DE

### 4.1.3.Chemikalien:

Tabelle 4. 2.: Chemikalien, Abkürzungen und Hersteller

Chemikalien	Abkürzung	Hersteller
100bp-DNA-Ladder, gene ruler	M	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, DE
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	X-Gal	Roth, Karlsruhe, DE
2-Mercaptoethanol	ME	Roth, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Amp	Sigma, Taifkirchen, DE
Agarose, SeaKem LE		Biozym, Oldendorf, DE
Agarose, Bacto-Agar	Agar	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Bacto-Tryptone		Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Borsäure		Roth, Karlsruhe, DE
Bromphenol Blau		Sigma, Deisenhofen, DE
Cells Resuspensionspuffer	Direct	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Deoxyribonucleoside-5-triphosphate	dNTPs	Bioline, Luckenwalde, DE
Dimethylsulfoxid	DMSO	Roth, Karlsruhe, DE
Dithiothreitol	DTT	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ethanol	EtOH	Roth, Karlsruhe, DE
Ethidiumbromid	EtBr	Roth, Karlsruhe, DE
Ethylendiamin tetraic acid	EDTA	Roth, Karlsruhe, DE
Fötales Kälberserum	FCS	Gibco, Karlsruhe, DE
Glukose		Roth, Karlsruhe, DE
Glycerin		Roth, Karlsruhe, DE
Iscove modified Dulbeccomedium	IMDM	Gibco, Karlsruhe, DE
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG	Roth, Karlsruhe, DE
Lysis enhancer		Invitrogen, Karlsruhe, DE
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Invitek, Berlin-Buch, DE
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe, DE
Nonidet P-40	NP-40	Calbiochem, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin	P/S	Gibco, Karlsruhe, DE
Kaliumchloride	KCl	Roth, Karlsruhe, DE
RNase Out		Invitrogen, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe, DE
Sucrose		Gibco, Karlsruhe, DE
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris	Amersham Biosciences, Freiburg, DE
Tween 20		Roth, Karlsruhe, DE
Yeast Extract		Becton Dickinson, Heidelberg, DE

#### 4.1.4. Enzyme und Reaktionspuffers:

Tabelle 4.3.: Hersteller der Enzyme:

Enzym	Hersteller
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitex, Berlin-Buch, DE
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Roboklon, Berlin-Buch, DE
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim, DE
DNase I	Quiagen, Hilden, DE
Hpy 991	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, DE

Tabelle 4.4.: Hersteller der Reaktionspuffers:

Reaktionspuffer	Hersteller
10x <i>Taq</i> Puffer <i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitex, Berlin-Buch, DE
10x AmpliPufferB, <i>Pfu</i> Polymerase	Roboklon, Berlin-Buch, DE
2X Rapid Ligation Puffer T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim, DE
PufferDD, DNase I	Quiagen, Hilden, DE
Hyp 991 Puffer	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, DE

#### 4.1.5. Reagenzien:

Tabelle 4.5.: Hersteller der Reagenzien:

Reagenzien	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, DE
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Invitex, Berlin-Buch, DE
pGEM-T Easy Vector System	Promega, Mannheim, DE
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim, DE
Invisorb Spin Plasmid Mini Kit	Invitex, Berlin-Buch, DE

#### 4.1.6. Puffers:

Tabelle 4.6.: Zusammensetzung der Puffer:

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Wachstumsmedium	RPMI mit Mercaptoethanol, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	IMDM mit 80% (v/v) FCS, 20% (v/v) DMSO
Trypanblau Lösung	0.4% Trypanblau/ PBS
IPTG/X-gal Lösung	10mM IPTG, 10mg/ml X-Gal
LB Medium	1% (w/v) Bacto-Tryptone, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 10mM NaCl
SOC Medium	2% (w/v) Bacto-Tryptone, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl <sub>2</sub> , 10mM MgSO <sub>4</sub> , 20mM Glukose
10x TBE Puffer	0.89 M Tris/HCl (pH 8.0), 0.89 M Borsäure, 20mM EDTA
DNA Ladepuffer	0,25% (v/v) Bromphenblau, 40% (w/v) Sucrose in Wasser

#### 4.1.7. Antikörper:

Hersteller: Becton Dickinson, Heidelberg, DE

Tabelle 4.7.: Konjugierte Antikörperfluorochrome:

<b>Antikörper</b>	<b>Konjugiert mit</b>
Anti-mouse CD3	FITC
Anti-mouse CD8	PE
Anti-mouse Fox p3	PE
Isotypenkontrolle	FITC, PE

#### 4.1.8. Rekombinante MHC-Pentamere:

H2-K<sup>b</sup>/ SIINFEKL, konjugiert mit PE, ProImmune, Oxford, UK

#### 4.1.9. Hilfsmaterialien:

Tabelle 4.8.: Hersteller der Hilfsmaterialien

Materialien	Hersteller
Zellstrainer (45µm, 100µm )	Schleicher & Schuell, Dassel, DE
Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Cryobox	Nunc, Wiesbaden, DE
Cryotube	Greiner, Solingen, DE
Forceps	Roth, Karlsruhe, DE
Optische Küvetten	Hellma, Müllheim, DE
PCR Platten twin.tec,96-well format	Eppendorf, Hamburg, DE
PCR 8-strips, low-profile	G. Kisker, Steinfurt, DE
PCR caps, 8-strips	G. Kisker, Steinfurt, DE
PCR Softtuben	Biozym, Oldendorf, DE
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensberg, DE
Polypropylen-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, DE
Konische Polypropylen-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Skalpell	B/Braun, Melsungen, DE
Pinzetten	Roth, Karlsruhe, DE
Spritzen(5ml, 25G Nadel)	B/Braun, Melsungen, DE
Zellkulturflaschen(60x16mm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen (96x21mm )	TPP, Trasadingen, Schweiz
Röhrchen (1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg, DE

## 4.2. METHODEN

### 4.2.1. in vivo Experimente:

#### 4.2.1.1. Knochenmarkvorbereitung

Eine Maus wurde durch Dislokation der Halswirbelsäule bei gleichzeitiger Rumpfextension getötet, kurz im 70%-Ethanol getränkt, um die Verschmutzung durch Härchen bei der Präparation zu reduzieren, und die Gewebeschichten wurden getrennt.

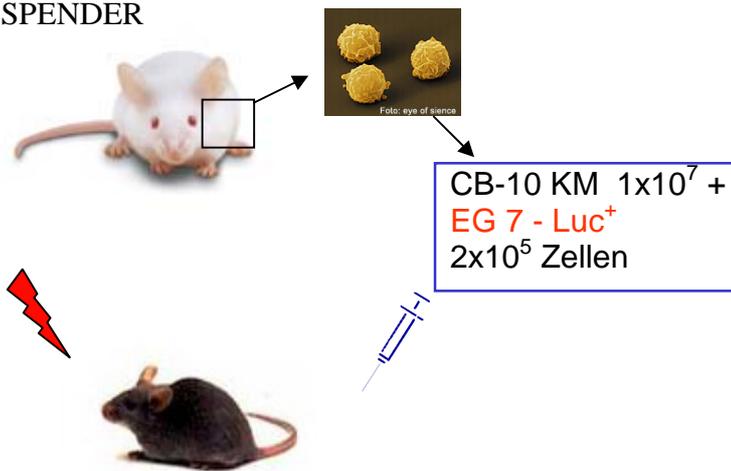
Die Femuren und Tibien sind beidseitig herausgenommen worden, die Muskeln und Reste von Binde- und Fettgewebe wurden entfernt. Das Verfahren wurde unter Einhaltung der Sterilitätsbedingungen durchgeführt. Nach kurzweiliger Tränkung der Knochen im 70%-Ethanol, wurden die oberen und unteren Enden der Femurs und Tibien auf Epiphysenhöhe abgeschnitten. Mit einer mit 1xPBS-Lösung gefüllten Spritze wurde der Inhalt der Femurdiaphyse mehrfach herausgepresst, bis das ganze Diaphysen-Innere für die Nadel vollständig durchlässig und die Diaphyse von außen weißlich-durchsichtig wurde. Das herausgepresste Knochenmark in der PBS-Lösung wurde vorsichtig durch mehrfaches Einziehen und Herauspressen aus der Spritze suspendiert, ohne dabei Schaum zu bilden. Die Suspension wurde dann durch einen Filter durchgelassen und bei 22°C 5-10 Minuten lang 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 500 ml 1xPBS-Puffer resuspendiert und abgezählt. Bis zum Zeitpunkt der *i.v.*-Applikation wurden die Knochenmarkzellen auf Eis gehalten.

#### 4.2.1.2. Knochenmarktransplantation

Den gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Mäusen, die 24 h zuvor bestrahlt wurden, wurden  $1 \times 10^7$  Knochenmarkzellen, zusammen mit EG 7-, bzw. EL 4- Luciferase<sup>+</sup>-Leukämiezellen in eine der beiden lateralen Schwanzvenen injiziert, nach kurzweiliger Tränkung des Schwanzes im warmen Wasser und Desinfektion. Es wurde eine verschiedene Anzahl von Tumorzellen ausprobiert, von  $5 \times 10^3$  bis  $2 \times 10^5$  Zellen, jeweils appliziert in einer Mischung mit Knochenmarkzellen.

BALB.B (C.B10)(H-2b)

SPENDER



C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)  
EMPFÄNGER

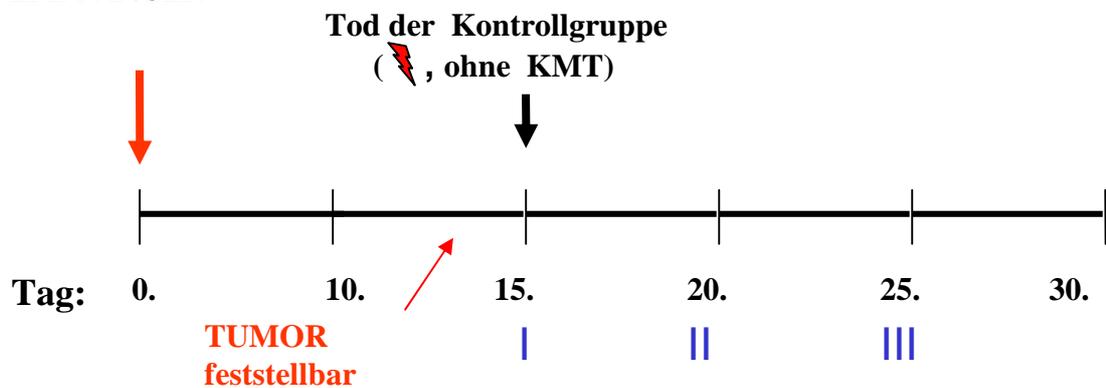


Abbildung 4.1. *Experimentalplan für allogene Knochenmarktransplantation I.*

Der Empfänger wurde am Tag 0. mit 10,5 Gy bestrahlt und injiziert i. V. in die Schwanzvene mit der Mischung aus Knochenmarkszellen ( $1 \times 10^7$ ) des Spenders  $2 \times 10^5$  EG 7-Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen. Der Tumor konnte am 12. oder 13. Tag mit dem BLI Signal detektiert werden; die Behandlung mit Spenderlymphozyteninfusion wurde am Tag 15., 20. und 25. eingesetzt. Die Kontrollgruppe, die nur bestrahlt wurde, ohne ein Knochenmarktransplantat zu bekommen, starb am Tag 15.

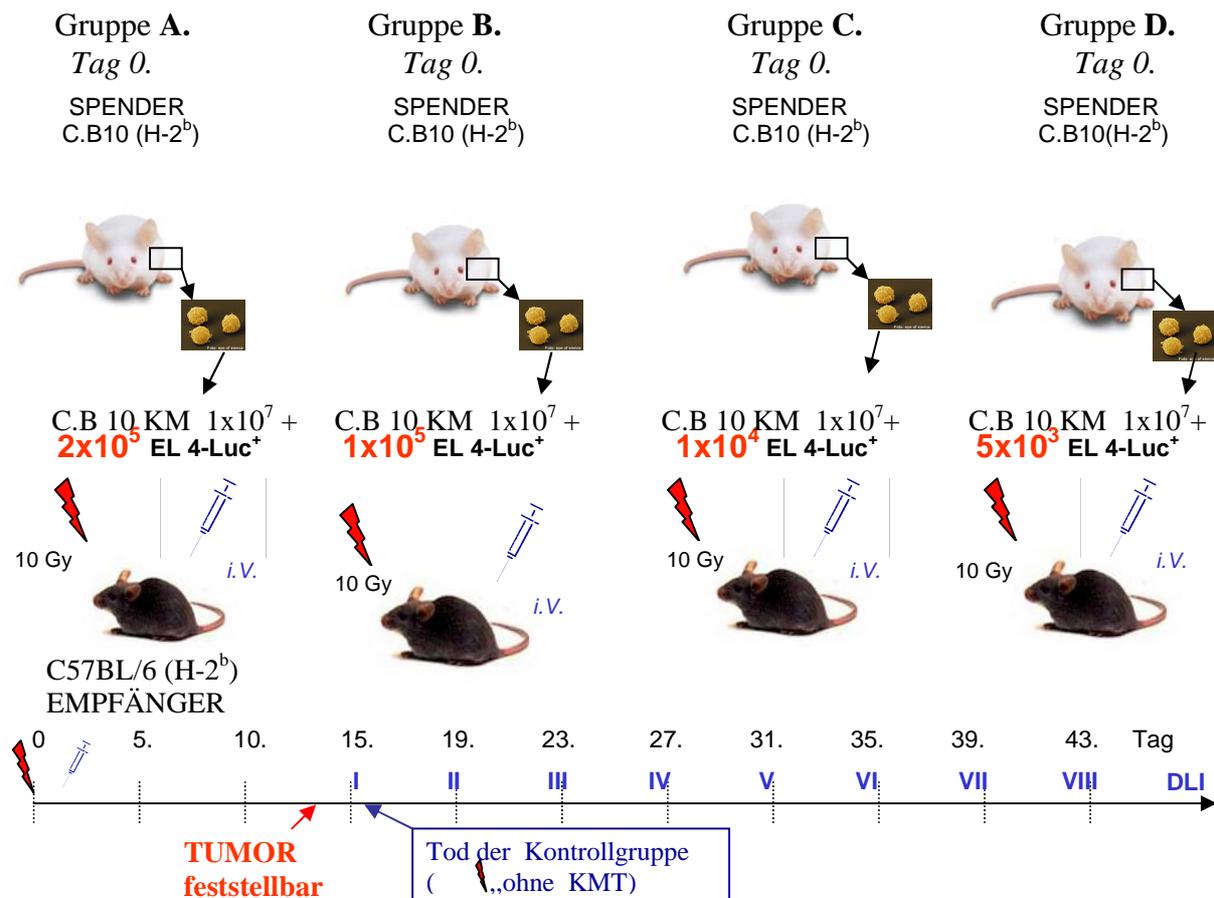


Abbildung 4.2. *Experimentalplan für allogene Knochenmarktransplantation II.*

Die vier hier dargestellten Experimente wurden auf die gleiche Weise durchgeführt, aber jeweils mit anderer Anzahl der verwendeten EL 4 Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen. Am Tag 0. wurde der Empfänger mit 10,5 Gy bestrahlt und i. V. in die Schwanzvene mit der Mischung aus Knochenmarkzellen ( $1 \times 10^7$ ) des Spenders und EL 4-Luc<sup>+</sup> Leukämiezellen gespritzt, und zwar in der Menge, die für jede Gruppe auf dem Schema angegeben ist.

Die Kontrollgruppe, der keine Knochenmarkzellen nach der Bestrahlung transplantiert wurden, starb am 15. Tag.

Der Tumor wurde am 13. Tag mit der BLI visualisiert, und die Mäuse wurden daraufhin unterteilt in Gruppen, die auf drei verschiedene Weisen insgesamt 8 Mal behandelt wurden (+ eine Behandlungskontrollgruppe).

#### 4.2.1.3. Bestrahlung

Die in einer Stahlschüssel, einzeln oder paarweise befindlichen Mäuse wurden dann im Bestrahlungsgerät mit 10,5 Gy bestrahlt.

#### 4.2.1.4. Biolumineszenz –Imaging

Die Intensität des Biolumineszenz-Signals, das oberhalb einer konventionellen schwarz-weißen Fotografie der Maus gefärbt dargestellt wurde, wurde wöchentlich gemessen.

Den Mäusen wurden intraperitoneal mit 100 µl Luciferin injiziert und anschließend, nach 5 Minuten, wurden sie durch eine intramuskulär applizierte Mischung von Ketamin (100mg/kg) und Rompun (Xylazine) (10mg/kg) anästhesiert. Jeweils vier Mäuse wurden in die lichtdichte Kammer des Biolumineszenz-Geräts (Hamamatsu 1394 Aequaria Imager) gesetzt (mit einer vorhergehenden Messung der Kontrollmaus), und als Standardfoto wurde eine graue Skalierung der Körperoberfläche aufgenommen. Das *Imaging* wurde 5 Minuten lang durchgeführt. Die Lichtintensität wurde als eine Übersicht für Lichtintensitäten oberhalb vom Standardfoto mittels des Software-Programms *Living Image* ausgerechnet. Um ein Lichtsignal zu lokalisieren, wurde ein *Pseudocolor*-Bild, das der Lichtintensität entspricht (blau-die kleinste Intensität, rot-die größte Intensität), in *Living Image* generiert und über das grau skalierte Standardbild gelegt (Edinger et al., 2003).

Luciferin wird durch den Energieträger ATP aktiviert und in einem weiteren Schritt durch Sauerstoff oxydiert. Bei der abschließenden Reduktion des oxydierten Luciferins zurück in den Grundzustand wird Licht abgegeben. Die Umwandlung der in der Luciferin-Luciferase-Reaktion produzierten Energie in kaltes Licht ist fast vollständig.

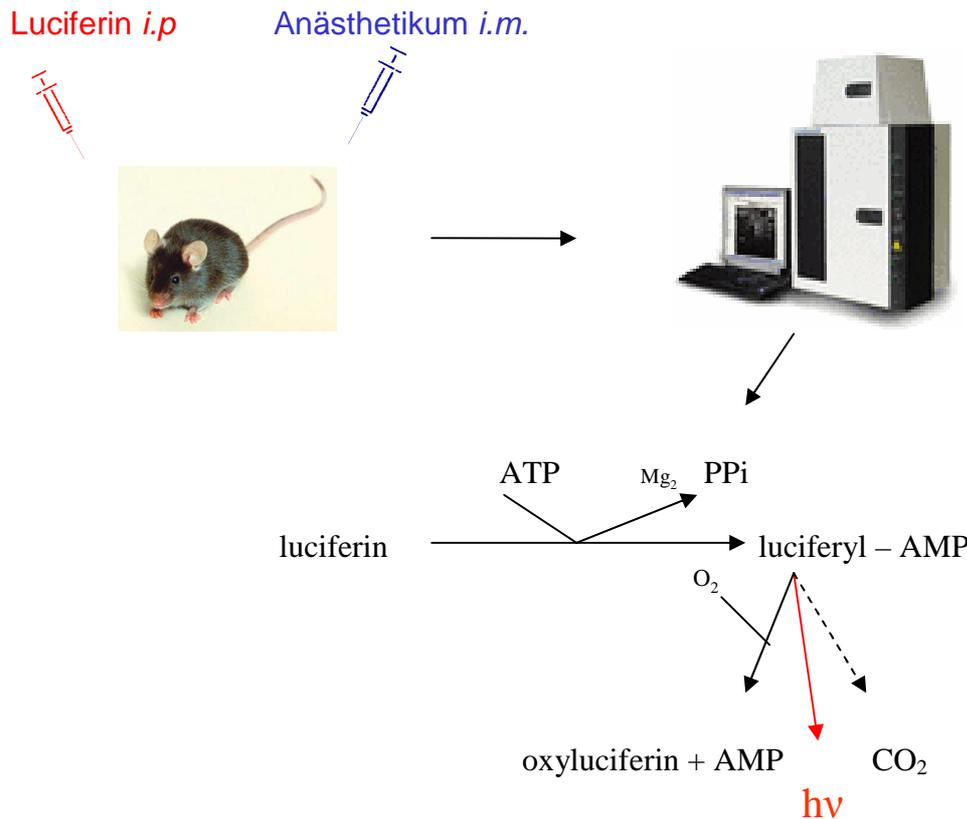


Abbildung 4. 3. *In vivo* Biolumineszenz-Imaging.

Die Maus wurde *i.p.* mit 1 mL Luciferin gespritzt und bekam nach 5 Min *i.m.* 0,5 mL ein Anästhetikum (Ketamin + Rompun). Die anästhesierte Maus wurde im BLI-Gerät auf den Rücken gelegt und das Signal während 5-minütiger Exposition aufgenommen.

#### 4.2.1. Zellkultur:

##### 4.2.2.1. Zelleninkubation

Alle Zellkulturen wurden in einem mit 5 % CO<sub>2</sub> begasten Feuchtbrutschrank bei 37° C inkubiert. Als Kulturgefäße wurden Zellkulturflaschen verschiedener Volumina benutzt.

Falls nicht anders angegeben, wurden 2x10<sup>6</sup> Milzzellen/ml in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) Medium (*Gibco, DE*) mit 10% FCS (*Biochrom, DE*), 100 U/ml Penizillin/Streptomycin, 2 mM Glutamin, 1 mM Hepes, 50 µM 2-Mercaptoethanol und 1 mM Natriumpyruvat kultiviert.

In Abhängigkeit von ihrer Proliferationsrate wurden Monolayer-Zellkulturen mit neuem Medium passagiert. Zur Passage wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellschicht kurz mit 5 ml 0,3% Trypsin/2,7 mM EDTA in PBS überspült. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37° C wurden die Zellen abgelöst und anschließend im Kulturmedium resuspendiert.

Suspensionszellkulturen wurden in Abständen von 3-4 Tagen mit neuem Medium versorgt. Die Zellen wurden zunächst 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und dann in neuem Medium aufgenommen.

#### 4.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Milzzellen 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und das Pellet in 5 ml Medium, dem 10 % DMSO und 10 % FCS zugegeben wurde, resuspendiert. In Aliquots von 0,5 ml ( $1 \times 10^7$ ) wurden die Zellen in Einfrierröhrchen langsam auf -80° heruntergekühlt. Die Proben wurden im flüssigen Stickstoff langzeitgelagert.

Tiefgefrorene Zellen wurden langsam in RPMI 1640-Medium aufgetaut; aus einem mit RPMI 1640-Medium vollgefülltem 50 ml Röhrchen wurden kleinere Mengen (500 µL) vom Medium in die Einfrierröhrchen gegeben und die Mischung zurück in das Röhrchen aufgenommen, bis die gesamte Zellenmenge aufgetaut wurde.

#### 4.2.2.3. Bestimmung der Zellzahl

20 µl der vorhandenen Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:1 mit einer 0,4-prozentigen Trypanblau-Lösung (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH) gemischt, und 10 µl dieser Mischung wurden zwischen Objektträger einer Neubauer-Zählkammer und Deckglas pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden ungefärbte Zellen von 4 großen (16 kleinen) Feldern ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Ein großes Feld enthält ein Volumen von 0,1 µl. Die Zellzahl pro ml Suspension errechnet sich durch Multiplikation des Mittelwertes mit  $10^4$ . Tote Zellen wurden dabei durch den Farbstoff Trypanblau angefärbt und von der Zählung ausgeschlossen.

#### 4.2.2.4. Milzzellenvorbereitung

Eine Maus wurde durch Dislokation der Halswirbelsäule und Rumpfextension getötet und kurz im 70%-Ethanol getränkt. Im linken oberen Bauchquadranten wurde die Bauchhöhle eingeschnitten, die Milz entnommen und durch kreisförmige Bewegungen des Kolbens der sterilen Spritze in 5 ml RPMI 1640 Medium zerquetscht. Die Suspension wurde mehrfach durch eine neue Spritze mit Nadel eingezogen und herausgepresst, dann mit zusätzlichen 5 ml RPMI durch einen Filter in ein 50mm- Röhrchen überführt und 5 Min. bei 1200 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 3 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und bei RT 5 Min. lang stehen gelassen. Die Erythrozytenlyse wurde durch 1x PBS-Puffer unterbrochen, bis eine Gesamtmenge von 50 ml erreicht war. Die Zellen wurden resuspendiert und in der Neubauer-Kammer abgezählt.

#### 4.2.2.5. Stimulation der Milzzellen

Frisch gewonnene Milzzellen wurde entweder mit 10-100 ng/mL SVL 9 Peptid (H13<sup>a</sup> spezifisches, für das MHC-Klasse I-Molekül restringiertes Peptid) oder mit 10-100 ng/mL SIINFEKL-Peptid (Ovalbumin- spezifisches und MHC- Klasse I-Molekül restringiertes Peptid) zur Stimulation der T-Zellen stimuliert. Um die Peptidsensitivität der T-Zellen zu untersuchen, wurden diese in Anwesenheit von verschiedenen Peptidkonzentrationen inkubiert.

#### 4.2.2.6. Vorbereitung der Spenderlymphozyteninfusion (Donor-Lymphozyten Infusion, DLI)

Es wurde einer von zwei folgenden therapeutischen Ansätzen angewendet:

##### **1. *in vivo* Immunisierung und die anschließende *in vitro* Restimulation:**

C.B10 Mäuse (H13<sup>b</sup> Spender) wurden drei Mal *in vivo* immunisiert, zweimal davon mit den  $2 \times 10^6$  bestrahlten Milzzellen des B6 (H13<sup>a</sup>)Empfängers, bzw. das dritte Mal boosted mit einer SVL 9 Peptid (1ng/mL)-K-CpG Adjuvant-Mischung, 10 Tage bevor sie getötet wurden.

## 1. *in vivo* Immunisierung

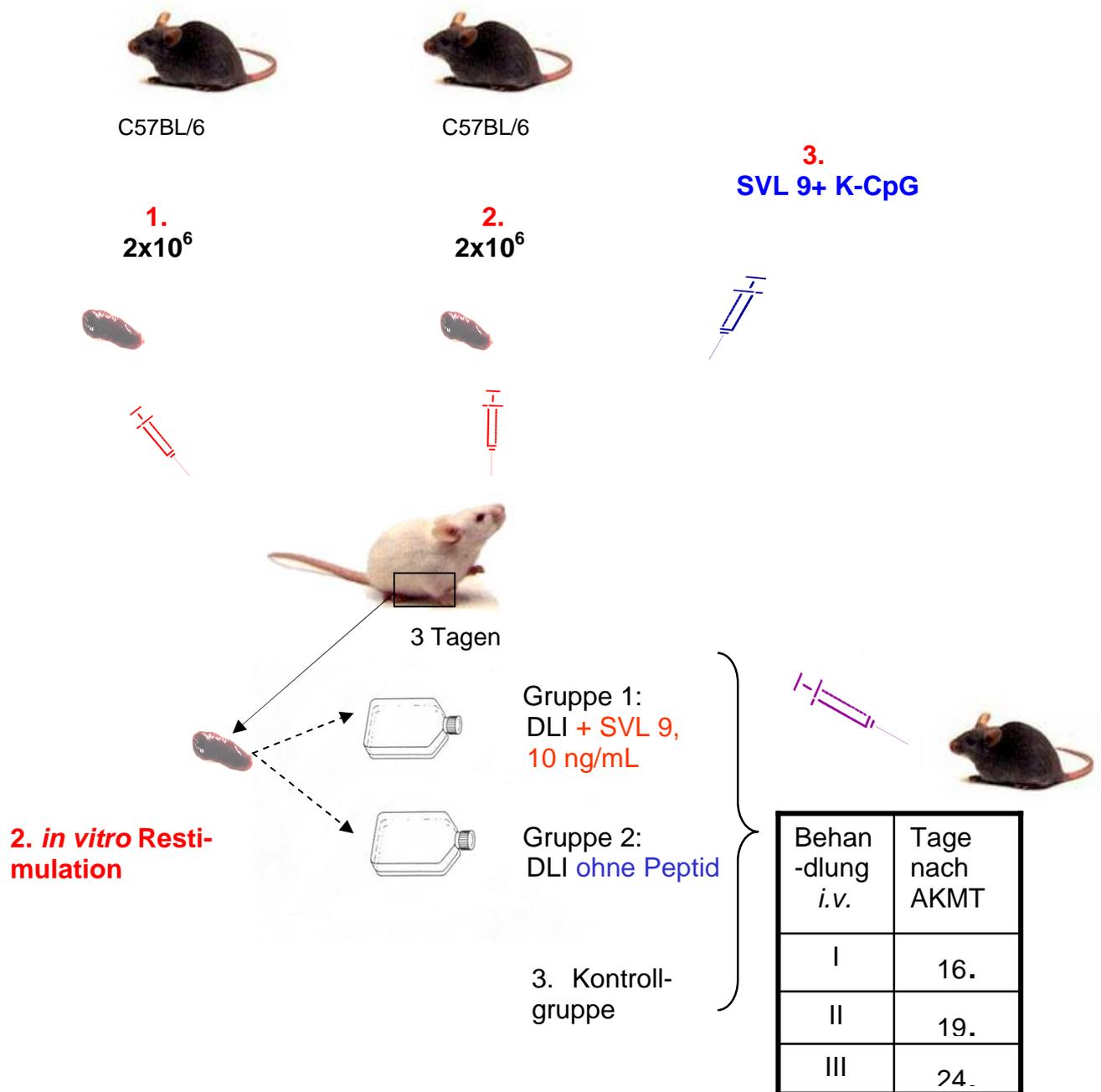


Abbildung 4.4. Vorbereitung der *in vivo* immunisierten Spenderlymphozyteninfusion.

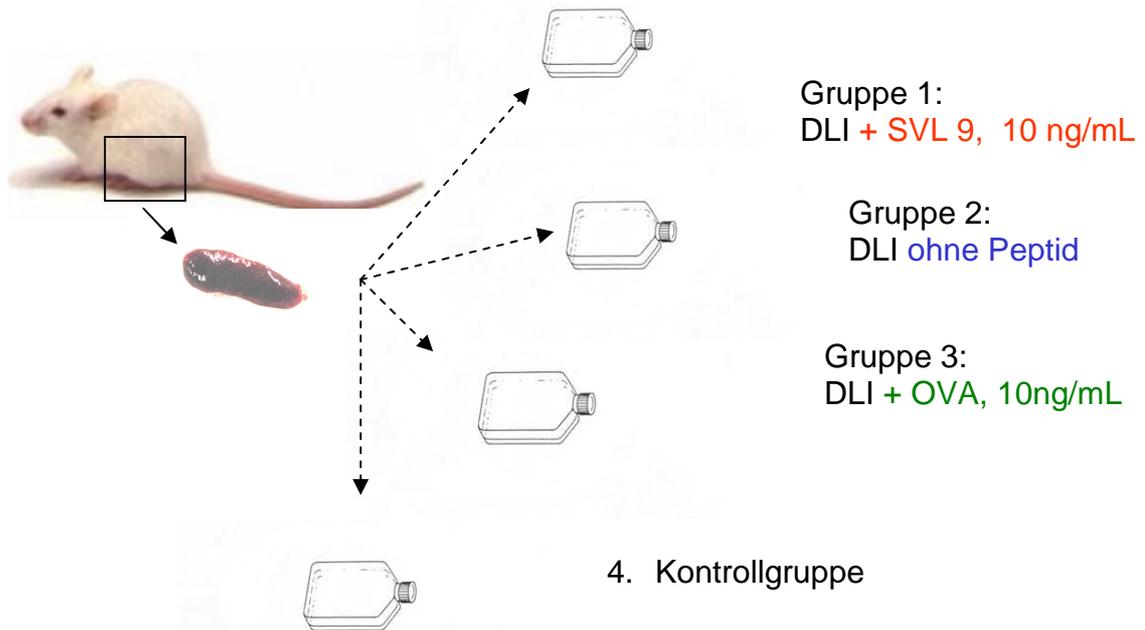
In Abständen von 6 Tagen wurde den Spendertieren zweimal mit  $2 \times 10^6$  Milzzellen des Empfängers, bzw. drittes Mal mit einer Mischung aus SVL 9-Nonapeptid und K-CpG- Adjuvant, (jeweils intraperitoneal und beiderseits subkutan) gespritzt.

Im zweiten Schritt wurde die Hälfte der Spendermilzzellen *in vitro* mit 10 ng/mL SVL 9 Nonapeptid 3 Tage lang zusätzlich restimuliert. Bei der anderen Hälfte der Zellen wurde dieser Schritt weggelassen (Spenderlymphozyteninfusion ohne Peptid).

## 2. *in vitro* Stimulation:

Die Milzen der CB10 Spendermäuse wurden *in vitro* mit 10 ng/ mL SVL 9 Peptid oder mit 10ng/mL SIINFEKL (OVA)-Peptid stimuliert.

nicht immunisierte  
C.B 10 (H-2<sup>b</sup>) Maus



Behandlung <i>i.v./1x10<sup>7</sup></i>	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Tag nach allogener Knochenmarktransplan- tation	15.	19.	23.	27.	31.	35.	39.	43.

Abbildung 4.5. Vorbereitung der *in vitro* stimulierte Spenderlymphozyteninfusion.

Die Spenderlymphozyteninfusion wurde aus den Milzzellen des naiven Spenders vorbereitet. Hier wurden die EL 4-Luc<sup>+</sup>-Leukemiezellen verwendet und die Mäuse 8 Mal behandelt, in Abständen von 4 Tagen, beginnend ab dem 15. Tag nach KMT. Eine Untergruppe bekam die mit 10 ng/mL OVA-stimulierte Spenderlymphozyteninfusionen.

#### 4.2.2.7. Durchflusszytometrie (FACS)

Das Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) misst mittels Laserlichtdetektion im Vorwärts- (forward scatter-) und Seitwärtsstreulicht (side scatter) die Zellpopulation anhand der Zellgröße (Vorwärtssensor) und Granularität (90° versetzter Seitwärtsensor). Je nach Fluoreszenzspektrum des gewählten Zweitantikörpers können Farbkanäle zugeschaltet werden, die spezifisch die emittierte Lichtlänge erkennen. Mit Hilfe der verschiedenen Parameter können Größe und Granularität sowie Fluoreszenzintensität der Zelle bestimmt werden.

Zur Analyse wurde die Zellsuspension in PBS in Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt, die Zellen bis zur Messung bei 4°C gelagert, und vor der Messung durch Mischen resuspendiert. Je Messung wurden 10 000-100 000 Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Tote Zellen wurden durch Nutzung der charakteristischen vorwärts und seitlichen Lichtstreuungsparameter von der Analyse ausgeschlossen.

#### 4.2.2.8. Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse

Das Programm CellQuest 3.3 (Becton Dickinson, Franklin Lanes/USA) analysierte die am Durchflusszytometer vorgenommenen Messungen. Durch spezifische, um ausgewählte Zellpopulationen gelegte *Gates*, wurden einzelne Zellpopulationen im Hinblick auf das Vorhandensein von fluoreszenzgebundenen Antikörpern untersucht. Im Histogramm oder Dotplot wurden die Menge und Intensität der gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper dargestellt. Zwei Farbstoffe ließen sich getrennt voneinander auswerten.

#### 4.2.2.9. Färbung von T-Zellen mit Antikörpern und rekombinanten MHC-Pentameren

T-Zellen wurden in PBS mit PE- (R-Phycoerythrin-) und FITC-(Fluorescein isothiocyanate-) konjugierten mAK bzw. mit Fluorochrom-konjugierten rekombinanten MHC-Pentameren 30 Min bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 1x PBS gewaschen. Als Kontrolle wurden nicht mit mAK gefärbte Zellen benutzt. Die Expression der TCR und Korezeptormoleküle wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt.

#### 4.2.2.10. CFSE *in vivo* Zytotoxizitätstest

Carboxyfluoreszeindiazetat-Succinimidylester (CFDA-SE) ist eine membrangängige Substanz, die intrazellulär nach Abspaltung der Diazetatgruppe (Carboxyfluoreszein- Succinimidylester, CFSE) ihre Permeabilität verliert, fluoreszierend wird und über die Estergruppe kovalent an zytoplasmatische Proteine bindet, ohne dabei die Zellfunktionen wesentlich zu beeinträchtigen, wenn eine bestimmte Konzentration bei der Färbung nicht überschritten wird. Zusätzlich bindet CFSE stabil an intrazelluläre Proteine, sodass die Proteine mit langer Halbwertszeit, z.B. jene des Zytoskeletts, für die lange Haltbarkeit der CFSE-Färbung verantwortlich sind.

Die Milzzellen vom Mausstamm C.B10 wurden auf zwei 50 mL Röhren geteilt und in jedem mit 1x PBS-Puffer auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$ /mL eingestellt. Nachdem in eines von diesen zwei Röhren SVL 9 Peptid in einer Konzentration von 10 ng/mL gegeben wurde, blieben beide Röhren mit Milzzellen 15 Min lang im Brutschrank auf 37° C. Anschließend wurden Zellen 5 Min lang auf 1200 rpm/22° zentrifugiert und eine von zwei Färbelösungen auf das Pellet gegeben: den Zellen mit dem SVL 9 Peptid wurde die Färbelösung in einer Konzentration von 0,75  $\mu$ M gegeben, bzw. den Zellen ohne Peptid die Färbelösung in einer 10-fach schwächeren Konzentration- 0,075  $\mu$ M. Die Ansätze wurden 20 Min. lang auf Raumtemperatur im Dunkeln gehalten und danach 3x gewaschen, erst mit dem RPMI-1640 Medium, dann zweimal mit PBS und 5 Min lang auf 1200 rpm zentrifugiert und dekantiert. Beide Pellets wurden in solchem Volumen des PBSs resuspendiert, sodass die Zellenkonzentration beider Ansätze  $4 \times 10^6$  Zellen/100  $\mu$ L betrug. Beide Zellsuspensionen wurden danach miteinander gemischt, um ein 1:1 Verhältnis von beiden Zellgruppen (mit und ohne Peptid) zu gewinnen, und anschließend intravenös in der Menge von 500  $\mu$ L ( $2 \times 10^7$  Zellen)/Maus gespritzt. Nach 16 Stunden wurden die behandelten Mäuse getötet und ihre Milzzellen für die FACS-Analyse vorbereitet.

## in vivo Zytotoxizitätstest: Schema

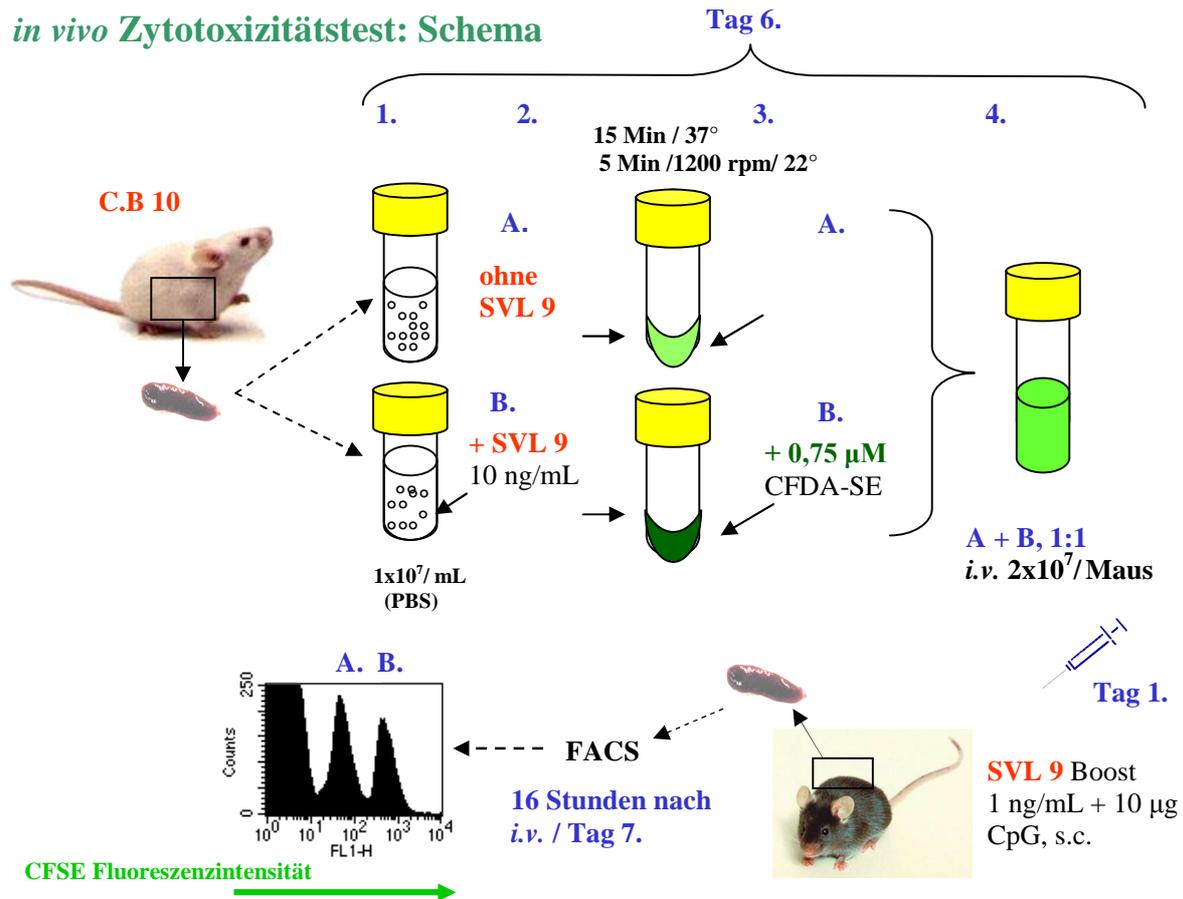


Abbildung 4. 6. *in vivo* Zytotoxizitätstest: Schema.

Milzzellen des Spenders wurden in zwei Röhrchen unterteilt und in beiden auf  $1 \times 10^7$  Zellen/mL eingestellt; im ersten Röhrchen (A) wurden die SVL 9 Peptid-unbeladenen Zellen mit  $0,075 \mu\text{M}$  CFDA-SE gefärbt, bzw. die vorher mit  $10 \text{ ng/mL}$  SVL 9 Peptid beladenen Zellen im zweiten (B) mit zehnfach konzentriertem Farbstoff ( $0,75 \mu\text{M}$  CFDA-SE). Beide Röhrchen wurden 20 Min. im Dunkeln bei Raumtemperatur gehalten und dann im Verhältnis 1:1 gemischt. Diese Mischung wurde in der Menge von  $2 \times 10^7$  i.v. in die Empfängermaus gespritzt, die 5 Tage vorher mit  $1 \text{ ng/mL}$  SVL 9 und  $10 \mu\text{g}$  CpG, s.c. geboostert wurde. Mit ihren Milzzellen wurde am 7. Tag, bzw. 14-16 Stunden nach der Applikation der gefärbten Spenderzellen die FACS-Messung durchgeführt.

### 4.2.2.11.β-Galactosidase Nachweis (X-Gal)

Nach einer AKMT wurde die Suspension von  $1 \times 10^6$  bestrahlten Mausmilz- oder -Leberzellen mit  $1 \times 10^6$  Reporterzellen (B3Z) in  $800 \mu\text{L}$  Medium in einer 24-Loch-Platte gemischt, über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, 15 Min lang bei  $22^\circ\text{C}$  mit  $0,5 \text{ mL}$  Glutaraldehyd ( $0,5\%$ ) fixiert (nachdem das Medium entfernt wurde) und zweimal mit PBS gewaschen.

Danach wurde 0,5mL/Loch der X-Gal- Farblösung dazugegeben und die Platten unter dem Lichtmikroskop evaluiert.

Die B3Z-Zellen exprimieren einen für OVA-abgeleitetes Peptid SIINFEKL spezifischen TCR.

Die TCR-Aktivierung führt zur Transkription des unter der Kontrolle des IL-2-Promotors stehenden  $\beta$ -Gal Gens. Die B3Z-Zellen mit SIINFEKL Peptid wurden als positive Kontrolle, bzw. jene ohne Peptid als negative Kontrolle angewendet.

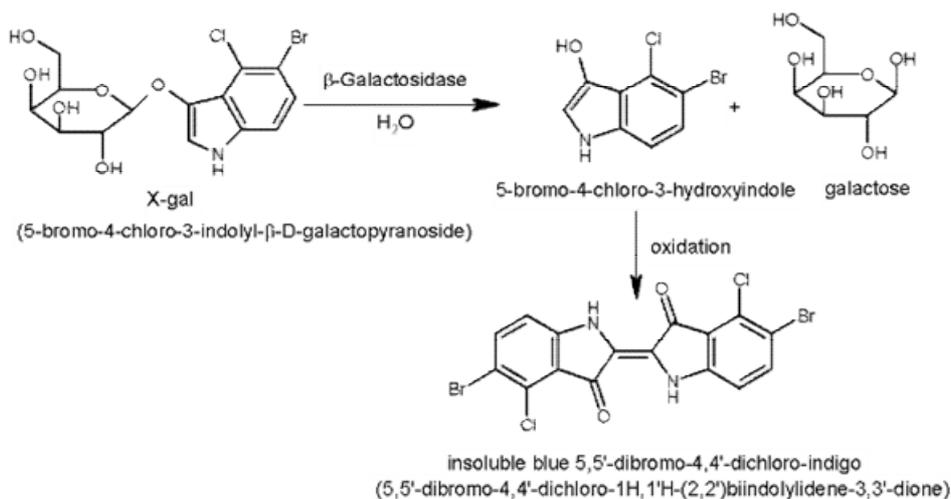


Abbildung 4. 7. *in vivo* Zytotoxizitätstest Kill-Assay: chemische Reaktion.

$\beta$ -Galaktosidase oxydiert und dimerisiert das X-Gal Substrat, es entsteht wasserunlösliches, blaues 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-1H, 1H-biindolyl-idenen-3,3'-dion.

Zusammensetzung der Fixierlösung für X-Gal-Färbung:

2,8 mL Formaldehyd 36%, 0,4 mL Glutaraldehyd 25%, 46,8 mL PBS.

Zusammensetzung der X-Gal-Färbungslösung:

880 $\mu$ L	0,5 M Hepes, pH 7,4
30 $\mu$ L	5 M NaCl
13 $\mu$ L	1 M $MgCl_2$
600 $\mu$ L	30 mM $K_3(Fe(CN)_6)$
600 $\mu$ L	30 mM $K_4(Fe(CN)_6)$
250 $\mu$ L	X-Gal (20 mg/ml in DMF)
7627 $\mu$ L	Aqua dest.

### 4.2.3. Molekulärbiologische Methoden:

#### 4.2.3.1. DNA -Konzentrationsmessung in der Gelelektrophorese

Die ungefähre Konzentration der DNA Probe kann, im Vergleich mit standardisierten Größenmarken, nach elektrophoretischer Auftrennung, im Agarosegel abgeschätzt werden. Ein Band, dessen Intensität mit der des Größenmarkers identisch ist, wurde ausgewählt, um durch die eingesetzten Volumina und Konzentrationen die Probenmenge zu berechnen.

#### 4.2.3.2. DNA-Konzentrationsmessung am Spektrometer

Nukleinsäuren absorbieren Licht einer Wellenlänge bei dem Maximum von 260 nm bis 280 nm, wobei RNA ein von DNA gering abweichendes Absorptionsmaximum besitzt. Durch das Absorptionsspektrum und den Quotient der Werte 260/280 nm können die Qualität und die Quantität der Nukleinsäuren beurteilt werden. Die Proben wurden mit bidestilliertem Wasser 1:50 verdünnt und gegen den Wasserleerwert in einer Küvette gemessen. Eine Absorption ( $A_{260}$ ) von 1,0 entsprach einer Nukleinsäurekonzentration von 50  $\mu\text{g/mL}$  für doppelsträngige DNA. Ist der Quotient  $A_{260}/A_{280}=2$ , gilt die DNA-Lösung als rein.

#### 4.2.3.3. PCR

Mit Hilfe der Polymeraseketten-Reaktion lassen sich bestimmte Bereiche einer beliebigen DNA als Template gezielt vervielfältigen. Das Prinzip der PCR basiert auf Trennung des DNA-Doppelstranges (dsDNA) in zwei Einzelstränge (ssDNA) durch die Hitze (Denaturierung).

Darauf folgt die Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer), an die homologen Bereiche der ssDNA (Annealing) und die anschließende DNA-Synthese durch eine thermostabile DNA- abhängige DNA-Polymerase. Diese verlängert in Gegenwart freier dNTPs die Primer (Elongation) und synthetisiert den zum ssDNA-Molekül komplementären Strang. Die neusynthetisierte DNA dient in den nachfolgenden Zyklen selbst wieder als Template. Mit jedem Durchlaufen eines Zyklus wird die Anzahl der DNA-Moleküle exponentiell amplifiziert ( $2^n$  bei

n Zyklen). Die Standardreaktion der 25 µL Ansätze fand in dünnwandigen PCR-Röhrchen (0,2 mL) in einem Thermocycler statt.

Standardprotokoll:

Puffer (10x ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µL
Primerpaar (10 µM, 1 µM final)	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM final)	2 µL
DMSO (5%)	1,25 µL
dNTP (200 µM jeder)	0,5 µL
AmpliTaq (5 U/µl, 0,7 U final)	0,15 µL
DNA Template	x µL
Bidest. Wasser	ad 25 µL

Standardthermocyclerprogramm:

95°	15 min		Aktivierung der Polymerase
-----			
94°	15 sec	← 40- 45 x	Denaturierung
65°	15 sec		Primeranlagerung (Annealing)
72°	30 sec		DNA-Synthese (Elongation)
-----			
72°	10 min		Strangverlängerung

#### 4.2.3.4. Berechnung der Schmelztemperaturen von Primern

Für die Standard-PCR wurde die Schmelztemperatur der Primer mit  $T_m [°C] = 2x (A+T) + 4x (G+C)$  berechnet.

#### 4.2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die zu analysierende DNA-Probe wurde mit 1/10 Volumen Puffer versetzt und im 3%igen horizontalen Agarose-Gel aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1x TBE Puffer aufgelöst und mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt 1 Stunde lang bei Raumtemperatur.

#### 4.2.3.6. Gelextraktion

Gewünschte DNA-Banden wurden nach Auftrennung in der Gelelektrophorese mit Hilfe des QIAquick ht bei 354 nm mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mittels QIAquick Gel extraction Kits der Firma Qiagen aus dem Agarosegel isoliert. Ausgeschnittene Gel-Fragmente wurden in einem entsprechenden Volumen Puffer QG bzw. Bindepuffer bei 50° gelöst, auf die Säule aufgebracht und dort gebunden. Die Reinigung erfolgte durch die Bindung der DNA an eine Trägermatrix, diverse Waschschrte und letztendlich der Ablösung der DNA von der Trägermatrix mittels eines weiteren Puffers.

#### 4.2.3.7. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA mit Restriktionsenzym *Hpy 991* erfolgte nach den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen unter Zusatz von RNase A (0,5 mg/mL).

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Der Nachweis, dass das Nebenhistokompatibilitätsantigen H13 beim Empfängerstamm und bei EG 7 und EL 4–Leukämiezellen als H13<sup>a</sup>- Haplotyp bzw. beim Spenderstamm als H13<sup>b</sup>-Haplotyp vorhanden ist

Die Polymerasekettenreaktion wies zwei allelische Varianten des Nebenhistokompatibilitätsantigen H13 nach. Dieses Antigen, 233 bp groß, ist beim Empfängerstamm und bei den von diesem abgeleiteten Leukämiezellen EL 4 und EL 7 als H13<sup>a</sup>-Haplotyp bzw. beim Spenderstamm als H13<sup>b</sup>-Haplotyp vorhanden. Als Kontrolle wurden die nachfolgenden Mausstämme verwendet: BALB/C, CE/J und LPJ. Die mittels PCR multiplizierten Proben wurden aus dem Gel eluiert und mit *Hpy 991* Restriktionsenzym verdaut. Da nur das Genprodukt des H13<sup>a</sup>-Haplotyps eine Erkennungssequenz für *Hpy 991* besitzt, konnten nur die PCR-Produkte des Empfängerstamms und solche der Leukämiezellen EL 4 und EL 7 in zwei Segmenten verdaut werden, deren Größen 170 bp und 63 bp betragen. Die Erkennungssequenz für *Hpy991* umfasst die Aminosäure Valin; beim Spenderstamm befindet sich auf dieser Position Isoleucin. So wurde das H13<sup>a</sup>-Haplotyp beim Empfängerstamm, EL 4 und EL 7 Leukämiezellen, bzw. das Haplotyp H13<sup>b</sup>-beim Spenderstamm bestätigt.

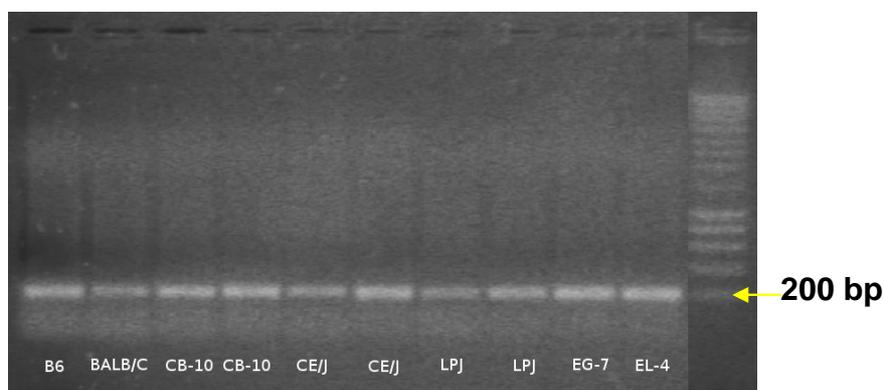


Abbildung 5.1. *Das PCR-Produkt des H13-Antigens ist 233 bp groß.*

*Dieses Genprodukt wurde aus dem Gel eluiert und mit Restriktionsenzym *Hpy 991* verdaut. CE/J, LPJ BALB/C wurden als Kontrollstämme verwendet.*

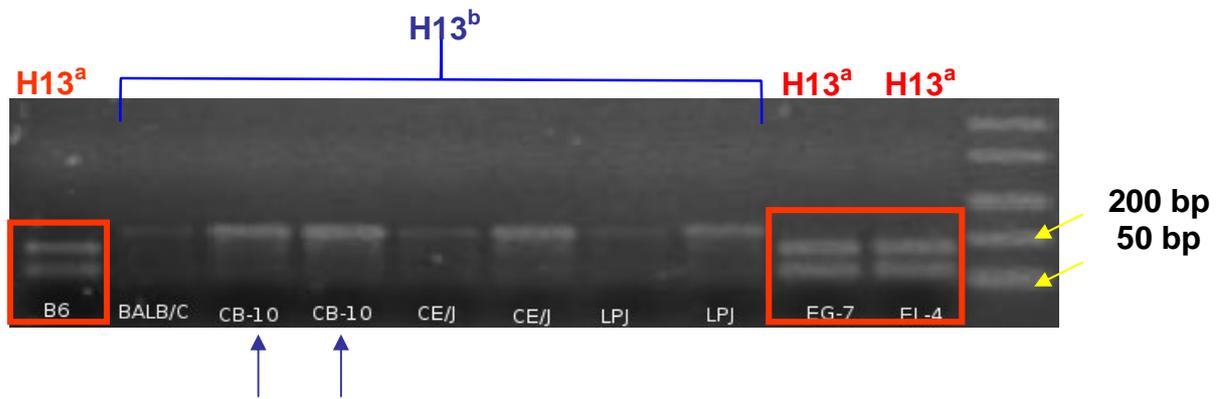


Abbildung 5.2. Beim Empfängerstamm B6, EG 7 und EL 4 -Leukämiezellen ist das Nebenhistokompatibilitätsantigen H13 als Haplotyp H13<sup>a</sup> und beim Spenderstamm CB-10 als Haplotyp H13<sup>b</sup> vorhanden.

Die Sequenz des H13<sup>a</sup> Haplotyps wurde mit dem Restriktionsenzym Hpy 99I in zwei Banden geschnitten, deren Größe 160 bp, und 73 bp betragen. Die Sequenz des H13<sup>b</sup> Haplotyps konnte von diesem Restriktionsenzym nicht erkannt werden.

## 5.2. Die EG-7-Luc<sup>+</sup> Leukämie-Zelllinie weist eine hohe Expression der MHC-Moleküle H-2D<sup>b</sup> an ihrer Oberfläche auf

Dargestellt ist die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung der EL 4 und EG 7 Leukämiezellen, nach der Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen MHC Klasse I, die spezifisch das H-2D<sup>b</sup>-Molekül detektieren. Die Leukämiezellen wurden gemäß Protokoll gefärbt, mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung gemessen und als Histogramm dargestellt.

Damit die zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten *in vivo* die Leukämiezellen EL 4 und EG 7 erkennen und vernichten können, ist es notwendig, dass diese das für die Klasse I restringierte, H 13<sup>a</sup> spezifische Peptid SVL 9 an ihrer Oberfläche exprimieren.

Da dieses Peptid nach seiner Prozessierung ausschließlich durch das H-2D<sup>b</sup> Molekül präsentiert wird, wollten wir überprüfen, ob eine gewisse Anzahl der H-2D<sup>b</sup> Moleküle auf der Tumorzellenoberfläche vorhanden ist.

Die EG 7-Luc<sup>+</sup> -Leukämiezellen exprimieren auf ihrer Oberfläche die MHC-Moleküle H-2D<sup>b</sup>. Im Komplex mit diesem Molekül Klasse I wird das Nonapeptid SVL 9, das proteolytische Abbauprodukt des H13<sup>a</sup>-Haplotyps, präsentiert.

Die H-2D<sup>b</sup> Expression an der Tumorzelloberfläche war die Voraussetzung für die therapeutische Effektivität der mit SVL 9 Nonapeptid immunisierten Spenderlymphozyteninfusion.

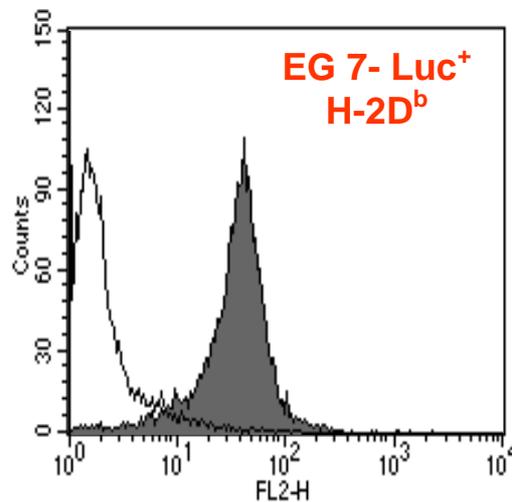


Abbildung 5.3. Die EG-7-Luc<sup>+</sup> Leukämie-Zelllinie mit C57BL/6 -Hintergrund (Empfängerstamm) exprimiert MHC- Moleküle H-2D<sup>b</sup> an ihrer Oberfläche.

Im Komplex mit dem H-2D<sup>b</sup> MHC- Molekül wird das SVL 9 Peptid an der Oberfläche der Leukämiezellen präsentiert. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde die Leukämiebehandlung mit D<sup>b</sup>/SVL 9 spezifischen T-Lymphozyten eingesetzt.

### 5.3. Tumorfeststellung mittels Biolumineszenz-Imaging ermöglichte die Standardisierung verschiedener Behandlungsgruppen in Bezug auf die Tumorgöße

In vorherigen Experimenten wurden die Mäuse nach einer allogenen Knochenmarktransplantation ohne Biolumineszenz-Imaging willkürlich unterteilt in die verschiedenen Behandlungsgruppen. Hiermit konnten wir nach durchgeführtem Biolumineszenz-Imaging, aufgrund des BLI- Signals und zwecks einer Standardisierung der Behandlung, die Mäuse in Gruppen mit nahezu gleicher Tumorgöße unterteilen; dies stellt einen großen Vorzug der Biolumineszenz-Imaging-Methode dar.

Die Mischung aus Spenderknochenmark- und EG 7-Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen wurde, wie schon unter Methoden (4.2.1.2.) erwähnt, 2 - 4 Stunden nach der myeloablativen Bestrahlung injiziert. Aus vielen, vorher durchgeführten FACS-Messungen des Vollblutes nach einer myeloablativen Bestrahlung war bekannt, dass sich die Anzahl der Lymphozyten innerhalb von 5 Tagen stark

abfällt, zwischen den Tagen 8 und 10 unter die Messbarkeitsgrenze fällt und danach (ab dem 10. Tag) mit kontinuierlicher Erholung beginnt.

In regelmäßigen zeitlichen Abständen gewonnene BLI-Signale führten zu Erkenntnissen, die auf dieser grafischen Darstellung jenen gegenübergestellt werden, die die Präsenz des Tumors und dessen Wachstumsdynamik visualisieren.

Die Präsenz der Tumorzellen konnte erst dann detektiert werden, wenn die Erholung der peripheren Lymphozyten begann. Das Tumorwachstum, gemessen über die Intensität des BLI-Signals, und der Anstieg der Blutzellenanzahl sind zeitlich parallel laufende Prozesse.

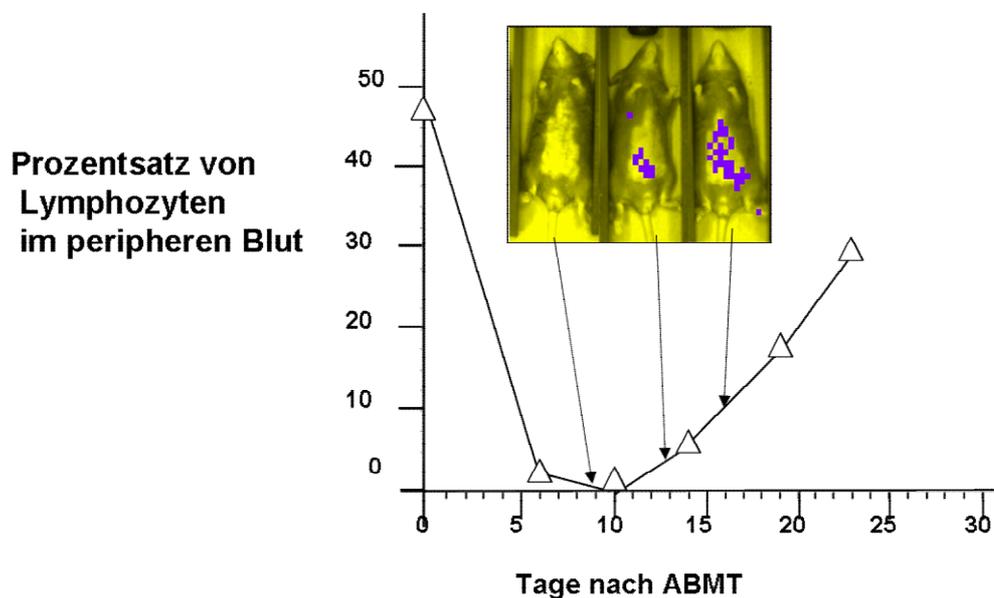


Abbildung 5.4. *Nach der Bestrahlung und Knochenmarktransplantation stimmen die Erholung der Lymphozyten im peripheren Blut und das Tumorwachstum zeitlich überein.*

*Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen dem Prozentansatz der Lymphozyten im peripheren Blut und der Intensität des Biolumineszenz-Imaging-Signals, der der Tumorgroße entspricht. Das BLI-Signal wurde 10 Tage nach Bestrahlung, Knochenmarktransplantation und Tumorapplikation sichtbar, als auch die Lymphozyten, nachdem sie zwischen dem 6. und 10. Tag depletiert wurden, wieder erschienen.*

**5.4. In der Spenderlymphozyteninfusion, die nach der *in vivo* Immunisierung gewonnen wurde, konnten die für das H13<sup>a</sup> Nebenhistokompatibilitätsantigen spezifischen CD8<sup>+</sup> Lymphozyten detektiert werden**

Die Spenderlymphozyteninfusion wurde vorbereitet aus Milzlymphozyten, die aus einer drei Mal *in vivo* immunisierten Maus gewonnen und zusätzlich 3 Tage lang *in vitro* mit 10ng/ml SVL 9 Peptid restimuliert wurden, gemäß dem in der Abbildung 5.4. gezeigten Schema.

Nach doppelter Färbung mit den für  $D^b$ /SVL-9 spezifischen Pentameren und mit FITC-CD8 – Antikörpern, wies die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung die Anwesenheit von 22,1% doppelt positiven Zellen nach, also die Zellen, die den für das Nebenhistokompatibilitätsantigen H 13<sup>a</sup> spezifischen TCR exprimieren.

Diese CD8 Population war CD3 positiv (nicht gezeigt).

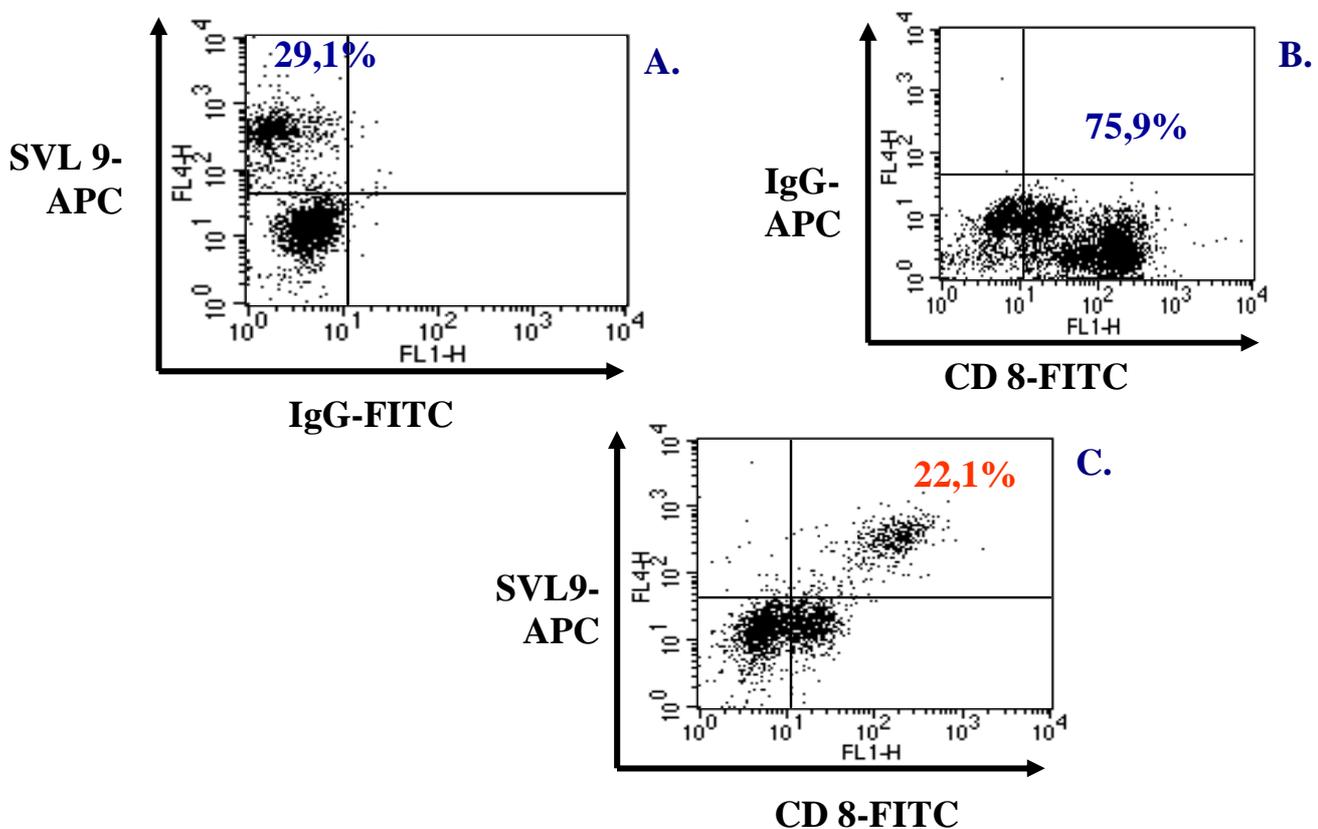


Abbildung 5.5. In Spenderlymphozyteninfusion nach *in vivo* Immunisierung und *in vitro* Restimulation wies fluoreszenzaktivierte Zellsortierung 22,1% für das  $D^b$ /SVL 9 spezifischen  $CD8^+$ -Lymphozyten nach.

Die FACS-Analyse nach der Färbung mit  $D^b$ /SVL9-Pentameren und  $CD8^+$ -FITC wurde mit den Spenderlymphozyten durchgeführt, die zur Therapie angewendet wurden. Innerhalb dieser Zellpopulation wurden 22,1%  $CD8^+$  Lymphozyten gefunden, die SVL9/ $D^b$  exprimieren, deren TCR also für Nebenhistokompatibilitätsantigen H 13<sup>a</sup> spezifisch ist (C). Das Überlebensintervall, der mit diesen Spenderlymphozyten behandelten Mäuse, zeigt die Abbildung 5.6.

### **5.5. Die Behandlung mit den Spenderlymphozyteninfusionen, die *in vivo* mit SVL 9 Peptid immunisiert wurden, induzierte Leukämieremission nach allogener Knochenmarktransplantation**

Überlebenskurven der mit *in vivo* immunisierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelten Mäusen und jene der Kontrollgruppe sind dargestellt. Beide Experimentalgruppen umfassten drei Mäuse.

Die Kontrollgruppe (○-○-○), also die mit 10,5 Gy bestrahlte und mit  $2 \times 10^5$  EG 7-Luc<sup>+</sup>-und Spenderknochenmarkzellen behandelte Mausgruppe, die keine Spenderlymphozyteninfusionen bekam, überlebte kürzer als 34 Tage.

Die Mausgruppe, die mit Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurde, die mit dem SVL 9 Peptid *in vivo* immunisiert und zusätzlich *in vitro* restimuliert wurden (▲-▲-▲), haben ohne Erkrankungssymptome bis zum 120.Tag überlebt, an dem sie getötet wurden.

Sie wurden dreimal therapiert, an den Tagen 15., 20., und 25. nach der Bestrahlung und Knochenmarktransplantation, jeweils mit  $1 \times 10^7$  Spenderlymphozyten, die *i.v.* in die Schwanzvene injiziert wurden.

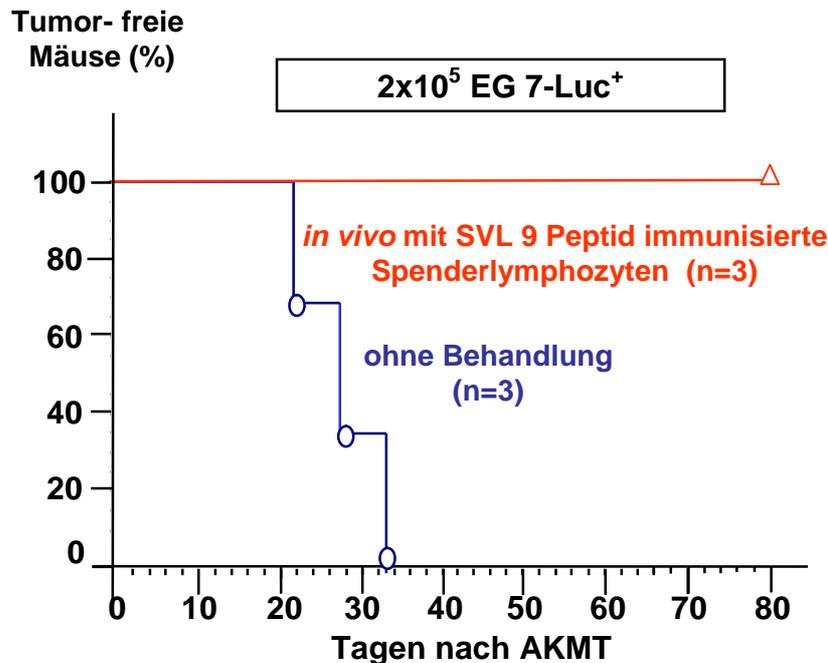


Abbildung 5.6. *Nach der Behandlung mit vivo mit 1 ng/ml SVL 9 Peptid immunisierten Spenderlymphozyteninfusionen, wurde ein Graft-versus-Leukämie - Effekt beobachtet.*

*Nach der Bestrahlung bekam der Empfängerstamm die Knochenmarkzellen des Spenders zusammen mit  $2 \times 10^5$  EG 7-Luc<sup>+</sup> Leukämiezellen. Die Empfängermäuse, die daraufhin mit Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurden, (A) überlebten ohne Tumorsymptome bis zum 120.Tag, während die unbehandelte Gruppe (o-o-o) zwischen dem 22. und 33.Tag starb. Diese Spenderlymphozyteninfusionen wurden vorbereitet wie es in Abb. 4.4. gezeigt ist. Das Ergebnis ist dargestellt als der Prozentsatz der Mäuse ohne Tumor.*

### 5.6. Die Abwesenheit residualer EG 7- Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen in der Milz konnte mittels $\beta$ -Galaktosidase -Assay (X-Gal) bestätigt werden

Für den  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis (X-Gal) wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Milzzellen der unterschiedlich behandelten Empfänger mit  $1 \times 10^6$  bestrahlten B3Z Zellen zusammen inkubiert.

In der Milz der Maus, die mit *in vivo* immunisierten und zusätzlich *in vitro* restimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurde und die keine Krankheitssymptome entwickelte, konnten keine restliche EG 7-Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen detektiert werden (A).Unbehandelte Tiere starben hingegen am 33. Tag nach der Knochenmarktransplantation.(B) Die positive Kontrolle wurde mit Milzzellen, B3Z-Indikator-Zelllinie und SIINFEKL–Peptid (C), bzw. die negative mit B6 Milzzellen und der B3Z -Indikator-Zelllinie (D) durchgeführt.

Die EG 7-Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen, die mit der Ovalbumin (OVA) transfizierten Variante der EL 4-Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen, präsentieren das für OVA spezifische Peptid SIINFEKL im Komplex mit

H2K<sup>b</sup>-Molekül an ihrer Oberfläche. Mittels spezifischer B3Z Indikator Zellen, deren TCR dieses Peptid (SIINFEKL) bindet, können die restlichen EG 7 Zellen innerhalb der Milz der behandelten Empfänger detektiert werden. Die Bindung des SIINFEKL-Peptids am TCR der B3Z Indikator-Zellen führt über die Expression eines unter dem IL-2 Promotor stehenden *lacZ* Genes zur Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase; diese oxydiert und dimerisiert das in diese Mischung gegebene X-Gal-Substrat, sodass ein wasserunlösliches 5,5`-dibromo-4,4` dichloro-1H,1H-biindolyl-idenen-3,3`-dion entsteht, dessen intensive blaue Farbe das Vorhandensein der EG 7 Tumorzellen innerhalb der Milzzellen indiziert.

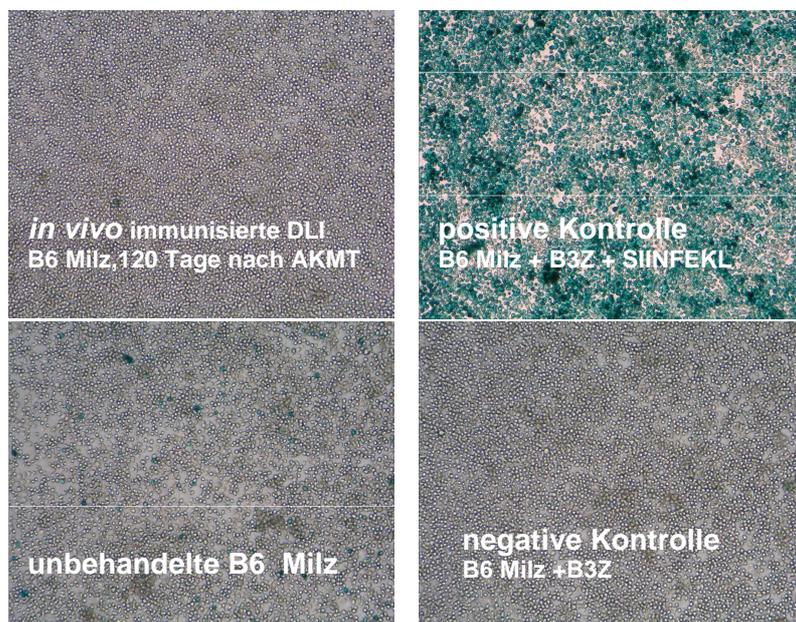


Abbildung 5.7. Die restlichen EG 7-Luc<sup>+</sup> Leukämiezellen konnten nach der Behandlung mit den *in vivo* immunisierten, für H13<sup>a</sup>-spezifischen D<sup>b</sup>/SVL9 positiven CD8<sup>+</sup> Zellen mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Assay (X-Gal) nicht nachgewiesen werden.

Oben links: gezeigt sind die Milzzellen einer repräsentativen Maus aus der Abb. 5.6.; diese wurde mit *in vivo* immunisierten, für H13<sup>a</sup>-spezifischen D<sup>b</sup>/SVL 9 positiven T- Zellen behandelt, überlebte 120 Tagen nach AKMT ohne Erkrankungssymptome und wurde dann getötet. Unten links sind die Milzzellen einer unbehandelten Empfängermaus zu sehen; diese entwickelte klinische Symptome der Leukämie und wurde nach 32 Tagen geötet.

Die restlichen EG 7-Luc<sup>+</sup> Leukämiezellen wurden mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis und Indikatorzellen B3Z detektiert;  $1 \times 10^6$  B3Z Zellen wurden zusammen mit  $1 \times 10^6$  Milzzellen des Empfängers inkubiert. Die positive Kontrolle wurde mit Empfängermilzzellen, B3Z- Indikatorzellen und SIINFEKL- Peptid (oben links) bzw. die negative Kontrolle mit Empfängermilzzellen und B3Z Zellen ohne SIINFEKL Peptid (unten rechts) durchgeführt. Die Methode ergab negative Ergebnisse auch für die Milzen der zwei anderen auf die gleiche Weise behandelten Mäuse aus der Abb. 5.6.

### **5.7. Die Behandlung mit *in vitro* mit SVL 9 Peptid stimulierten Spenderlymphozyten induzierte Leukämieremission nach allogener Knochenmarktransplantation.**

Die Empfängermause wurden mit 10,5 Gy bestrahlt und mit einer Mischung aus  $1 \times 10^7$  Knochenmarkzellen und  $2 \times 10^5$  EG 7-Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen *i.v.* behandelt.

Nachdem der Tumorausbruch mit dem Biolumineszenz-Imaging-Signal registriert wurde, wurden die Mäuse in 3 Gruppen, mit nahezu gleicher Tumorgroße unterteilt, um drei verschiedene therapeutische Varianten anzuwenden. Die Behandlung wurde dreimal durchgeführt, am Tag 15, 20 und 25 nach allogener Knochenmarktransplantation, jeweils mit  $1 \times 10^7$  Spenderlymphozyten, die *i.v.* in die Schwanzvene gespritzt wurden.

Eine Gruppe von 8 Mäusen (■-■-■) bekam die *in vitro* durch 3 Tagen mit 10 ng/mL SVL 9 Peptid stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen und die zweite Gruppe von 8 Mäusen (■-■-■) die gleiche Menge der Peptid-unimmunisierten Spenderlymphozyten. Die dritte Mausgruppe (9), die nach der Bestrahlung und Knochenmarktransplantation (○-○-○) nicht therapiert wurde (Kontrollgruppe), starb zwischen den 32. und 36. Tag nach AKMT. Ergebnisse sind hier dargestellt als der Prozentsatz der Mäuse, die nach AKMT und Behandlung ohne detektierbaren Tumor waren, gemessen mit dem Biolumineszenz-Imaging-Signal von lebendigen Tieren, bzw. postmortal mit Indikator-Zelllinie. Sie wurden bis 120 Tage lang nach der allogenen Knochenmarktransplantation untersucht.

Gezeigt sind hier die gesamten Ergebnisse von 2 getrennten Experimenten, jeweils mit 4 Mäusen (bzw. mit 5 Mäusen in der Kontrollgruppe) in jeder Untergruppe.

In der Gruppe, die mit *in vitro* mit SVL 9 Peptid stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurde, überlebten 4 von 8 Mäusen (50 %) länger als 80 Tage, während in der Kontrollgruppe (ohne Behandlung) alle 9 bis zum 35. Tag der Leukämie unterlagen.

Von Mäusen die mit Peptide-unstimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurden, starben 75 % (6 von 8) Mäusen bis zum Tag 38, eine Maus lebte bis zum 68. Tag.

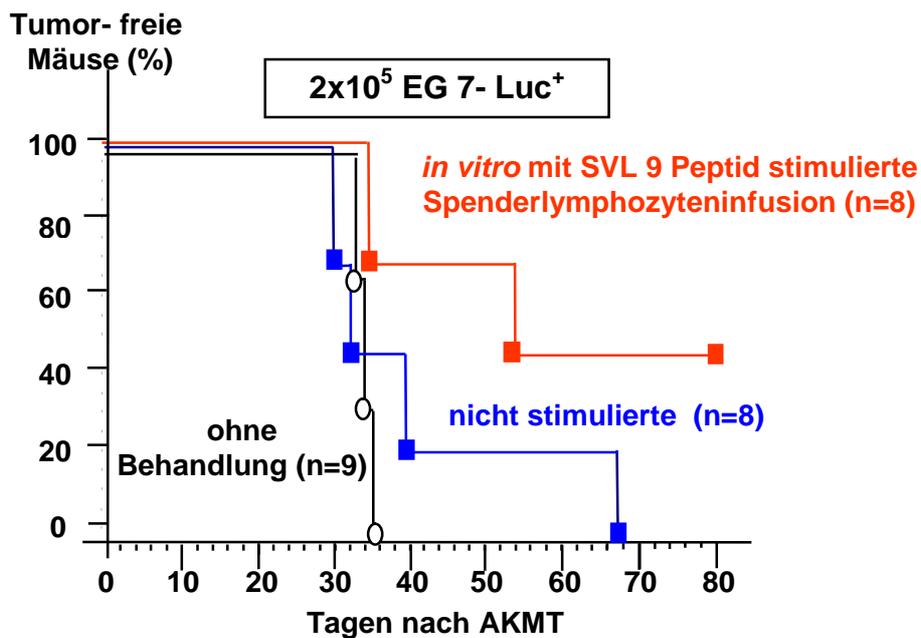


Abbildung 5.8. Nach der Behandlung mit *in vitro* mit 10ng/ml SVL 9 stimulierten Spenderlymphozyteninfusion konnte der Graft-versus-Leukämie Effekt festgestellt werden.

Nach der Bestrahlung bekam der Empfängerstamm die Knochenmarkzellen des Spenders zusammen mit  $2 \times 10^5$  EG 7 - Luc<sup>+</sup> Leukämiezellen.

Die Hälfte der Empfänger, die mit *in vitro* immunisierter Spenderlymphozyteninfusion behandelt wurden (■-■-■), überlebte ohne Tumorsymptome bis zum 120.Tag, als das Experiment beendet wurde. Die andere Hälfte starb bis zum 54.Tag. Die mit nichtimmunisierter Spenderlymphozyteninfusion therapierte Gruppe (■-■-■) starb zwischen dem 30. und 68. Tag. Die Kontrollgruppe (○-○-○) lebte bis zum 36. Tag. Diese Spenderlymphozyteninfusion wurde vorbereitet wie es in Abb. 4.5. gezeigt ist. Das Ergebnis ist dargestellt als der Prozentsatz der Mäuse ohne Tumor.

### 5.8. Effektivität der Behandlung mit *in vitro* immunisierten Spenderlymphozyteninfusionen hing von der Tumormenge ab

Von der Anzahl der verwendeten Leukämiezellen hing sowohl das für die Tumorentwicklung nötige Intervall (Tumor-freies Intervall) als auch die Überlebensdauer und die Antwort auf die Behandlung ab.

Es wurden 4 nachfolgende Mengen von EL 4 Luc<sup>+</sup>Leukämiezellen verwendet:  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ , und  $2 \times 10^5$ , jeweils gespritzt zusammen mit gleicher Menge der Knochenmarkzellen

( $1 \times 10^7$ ). Die Behandlung mit  $1 \times 10^7$  in die Schwanzvene *i.v.* applizierter Spenderlymphozyten wurde 8 Mal durchgeführt, am Tag: 15., 19., 23., 27., 31., 35., 39., 43. und dann eingestellt.

Wurden die Mäuse mit großer Anzahl Leukämiezellen ( $2 \times 10^5$  EL 4 Luc<sup>+</sup>) injiziert, starb die komplette Kontrollgruppe, 6 von 6 (○-○-○) Mäusen bis zum 20. Tag nach der KMT; kein Unterschied wurde bemerkt zwischen den Mäusen, die mit SVL 9 Peptid stimulierten (■-■-■) bzw. mit nicht stimulierten (■-■-■) Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurden, da die beiden Gruppen (je mit 6 Mäusen) nur 10 Tage länger als die Kontrollgruppe lebten und bis zum 30. Tag starben.

Gespritzt mit halb so großer Leukämiezellzahl ( $1 \times 10^5$ ), überlebte 1 von 7 Mäusen, die mit stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurden (■-■-■) bis zum 42. Tag, die anderen 6 starben zwischen dem 22. und 30. Tag, lebten also nur 8 Tage länger als die Kontrollgruppe (○-○-○).

2 von 8 Mäusen, die Peptid-unstimulierte Spenderlymphozyteninfusionen bekamen (■-■-■), entwickelten einen Tumor am Tag 46, also 20 Tage später als die Kontrollgruppe (○-○-○), die komplett zwischen dem 20. und 22. Tag starb. Bezüglich der verwendeten Behandlung, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, die mit SVL 9 Peptid -stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen (■-■-■) bzw. mit nicht stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen (■-■-■) behandelt wurden. Nur bei dieser Tumorzellanzahl ( $1 \times 10^5$ ) wurde das Überlebensintervall am längsten in der Gruppe, die mit Peptid-unstimulierten Spenderlymphozyteninfusionen (■-■-■) behandelt wurde.

Weitere Reduktion der Leukämiezellenanzahl auf  $1 \times 10^4$  (Abb. C) verlangsamte die Tumorentwicklung bei der Kontrollgruppe (○-○-○) bis zum Tag 32 -36. Die erste Behandlung wurde am Tag 15. eingesetzt, als noch bei keiner der behandelten Gruppen der Tumor mittels BLI- Signal sichtbar war.

In der Gruppe, die mit Peptid-unstimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurde (■-■-■), entwickelte 50% der Mäuse (4 von 8 Mäusen) den Tumor bis zum Tag 42., die andere Hälfte binnen 68 Tagen.

Ebenso entwickelten die 50% der Gruppe (4 von 8 Mäusen), die mit OVA Peptid -stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurde (●-●-●), den Tumor am Tag 28 nach KMT. Keine Maus aus diesen zwei Gruppen überlebte länger als 68 Tage.

In der Gruppe der mit SVL 9 Peptid -stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelten Mäusen (■-■-■), entwickelten sich die Tumore frühestens am Tag 42 (6 Tage nachdem die ganze Kontrollgruppe schon tot war) und zwar bei 4 von 10 Mäusen (40%), bei folgenden 20 % Mäusen nach 62. Tag, bzw. bei nachfolgenden 20 % erst am 68. Tag. Bei 20 % der Mäuse dieser

Gruppe wurde die Leukämie geheilt, sodass der Tumor auch nach 120 Tagen, als der Versuch beendet wurde, nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Antwort auf die Behandlung mit *in vitro* mit SVL 9 Peptid-stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen und die Verzögerung der Tumorentwicklung bei allen Gruppen war noch stärker ausgeprägt in der Gruppe, die mit noch kleinerer Anzahl der EL 4 Luc<sup>+</sup> - Leukämiezellen -  $5 \times 10^3$  gespritzt wurde. Die Kontrollgruppe (○-○-○) starb zwischen den 42. und 48. Tag; die Überlebenslänge nach der Behandlung mit unstimulierten Spenderlymphozyteninfusionen (■-■-■), oder jener mit OVA Peptide -stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen (●-●-●) war gleich - alle Mäuse starben binnen 76 Tage nach der KMT.

In der mit *in vitro* SVL 9–Peptid stimulierten Spenderlymphozytinfusionen therapierten Gruppe (■-■-■) entwickelten 2 von 10 Mäusen (20 %) den Tumor am Tag 64. (18 Tage nach dem Tod der gesamten Kontrollgruppe), und weitere 2 (20 %) am 74. Tag. Jedoch die 60 % (6 von 10) der Mäuse dieser Gruppe wurden von Leukämie geheilt. 120 Tagen nach der AKMT (als wir das Experiment beendeten) konnten mittels BLI keine restlichen Leukämiezellen nachgewiesen werden. Die Abbildungen A–D. zeigen die kumulativen Ergebnisse von 2-3 getrennten Experimenten; die Ergebnisse sind als Prozentansatz der Mäuse ohne Tumor im Verhältnis zur Gesamtanzahl der Mäuse dargestellt.

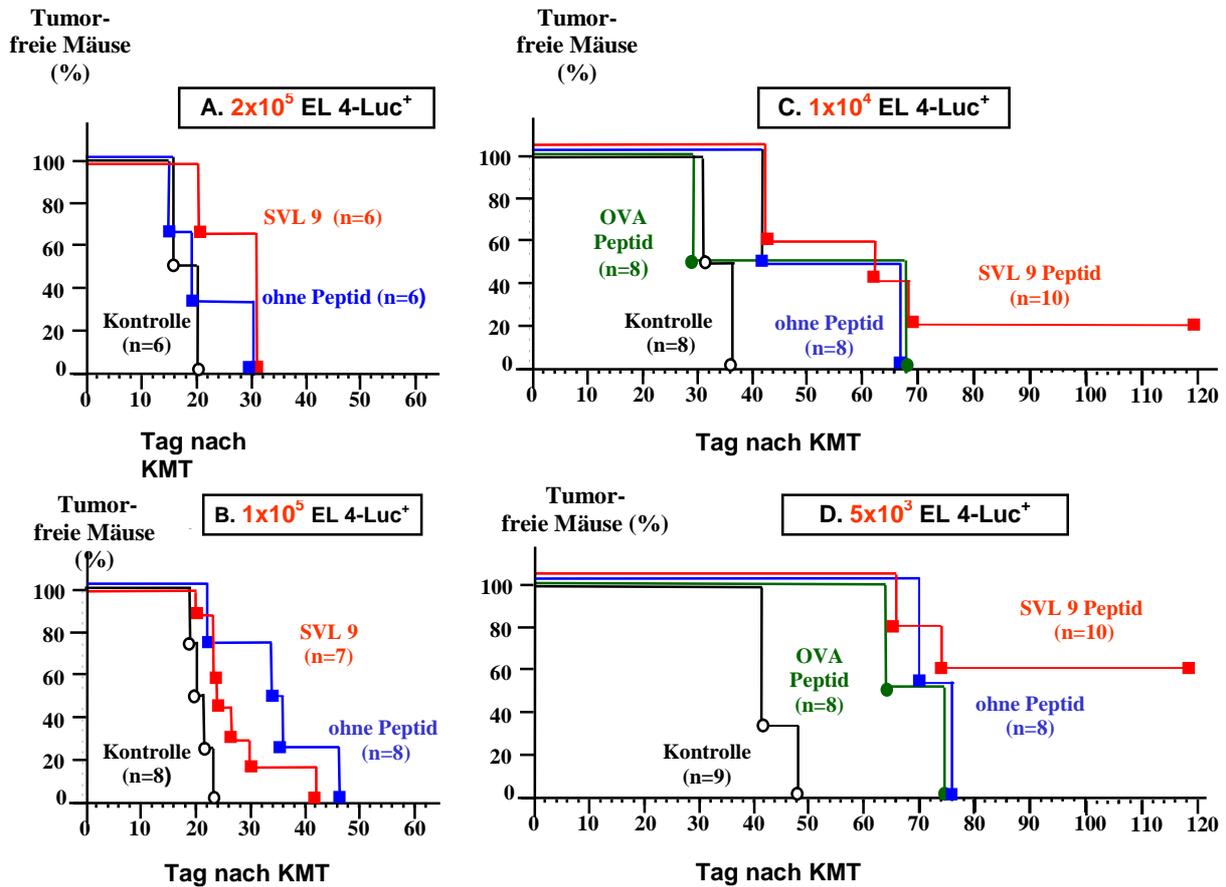


Abbildung 5.9. Zusammengefasste Ergebnisse: Das Überlebensintervall bei verschiedenen Behandlungsvarianten ist abhängig von applizierter Menge der EL-4 Luc<sup>+</sup> Leukämiezellen.

Grafik A.  $2 \times 10^5$  EL 4 - Luc<sup>+</sup> Leukämiezellen: die Kontrollgruppe (○-○-○) starb bis zum 20. Tag. Es gab keinen Unterschied zwischen dem Überlebensintervall der mit SVL 9- stimulierter Spenderlymphozyteninfusion behandelten Gruppe (■-■-■) und jener, die unstimulierte Spenderlymphozyteninfusion bekam (■-■-■).

Grafik B.  $1 \times 10^5$  EL 4 - Luc<sup>+</sup> Leukämiezellen: 6 von 7 mit der stimulierten Spenderlymphozyteninfusion behandelten Mäusen (■-■-■) starben bis zum Tag 30.

Grafik C.  $1 \times 10^4$  EL 4 - Luc<sup>+</sup> Leukämiezellen: 20 % der mit SVL-9- stimulierter Spenderlymphozyteninfusion behandelten Mäusen (■-■-■) überlebten ohne Tumorsymptome bis zum 120. Tag, als das Experiment beendet wurde.

Grafik D.  $5 \times 10^3$  EL 4 - Luc<sup>+</sup> Leukämiezellen: die Überlebensrate (bis zum 120. Tag) stieg bei der auf die gleiche Weise behandelten Gruppe (■-■-■) auf 60 %.

### 5.9. In vivo Biolumineszenz-Imaging ist eine schnelle und nicht-invasive Technik für die Überwachung des Leukämierückfalls und Remission nach der Behandlung

Der größte Vorteil der *in vivo* Biolumineszenz-Imaging Methode ist ihr nicht invasiver Charakter, sodass sie beliebig oft wiederholt werden kann, um Angaben über den

Erkrankungsfortschritt bzw. über die therapeutische Effektivität schnell und präzise zu bekommen. Diese Technik kommt besonders bei der Leukämie hervorragend zum Einsatz, da aufgrund des systemischen Befalls und des disseminierten Wachstums die Tumortastempfindung hier nicht angesetzt werden kann.

Ihr nicht-invasiver Charakter macht hier die *in vivo* Bioluminescence-Imaging-Methode gegenüber klinischen Einschätzungen, Blutbildanalyse oder der Abtötung der Maus, um in den histologischen Präparaten, bzw. in der Zellkultur die restlichen Leukämiezellen zu quantifizieren, überlegen.

Wie es in der Abbildung 5.4. gezeigt ist, konnten mittels *in vivo* Biolumineszenz-Imaging die Leukämiezellen (hier gespritzt in der Menge von  $5 \times 10^3$ /Maus) zwischen dem Tag 13. und 16. detektiert werden, was mit der Erholung der Lymphozyten im peripheren Blut zusammenfällt. Aufgrund dieses *in vivo* BLI-Signals, dessen Intensität mit der Tumormenge korreliert, wurden die Mäuse in die Gruppe mit nahezu gleich großem Tumor unterteilt, um die Objektivität der Behandlung bestmöglichst sicherzustellen. Bei allen in der Abb. 5.10. dargestellten Mäusen, die mit  $5 \times 10^3$  EL 4-Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen gespritzt wurden, wurden diese am 16. Tag sichtbar, wonach sie in drei kleinere Gruppen unterteilen wurden, um drei verschiedene therapeutische Ansätze anzuwenden. Am Tag 43., wie oben erwähnt, wurden die Empfängermäuse (außer Kontrollgruppe) zum letzten Mal therapiert. Bei den Kontrollmäusen entwickelt sich die Erkrankung progressiv, sodass am Tag 42 diese Maus geopfert wurde.

Bei den mit dem Kontrollpeptid OVA *in vitro* stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelten Mäusen kam es (gemessen am Tag 27) zur Leukämieremission, die bis zum Tag 55. andauerte, als der Leukämierückfall bzw. das BLI-Signal wieder deutlich zu sehen waren; der Tumor wuchs danach progressiv und die Tiere wurden am Tag 62 getötet.

Bei zwei Mäusen, die mit dem SVL 9-Nonapeptid *in vitro* stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurden, wurde das BLI-Signal am Tag 16 detektiert und bildete sich danach zurück, und ab der nächsten Messung am Tag 27 (nachdem die Behandlung schon 4 Mal durchgeführt wurde) war es nicht mehr sichtbar.

Auch nachdem die Behandlung am 43. Tag eingestellt wurde, dauerte die Remission an (im Gegensatz zur oben genannten Gruppe). Die Abwesenheit der EL 4-Luc<sup>+</sup>-Leukämiezellen wurde bei diesen zwei Mäusen bei jeder nachfolgenden Messung wieder bestätigt, bis sie am Tag 120 getötet wurden.

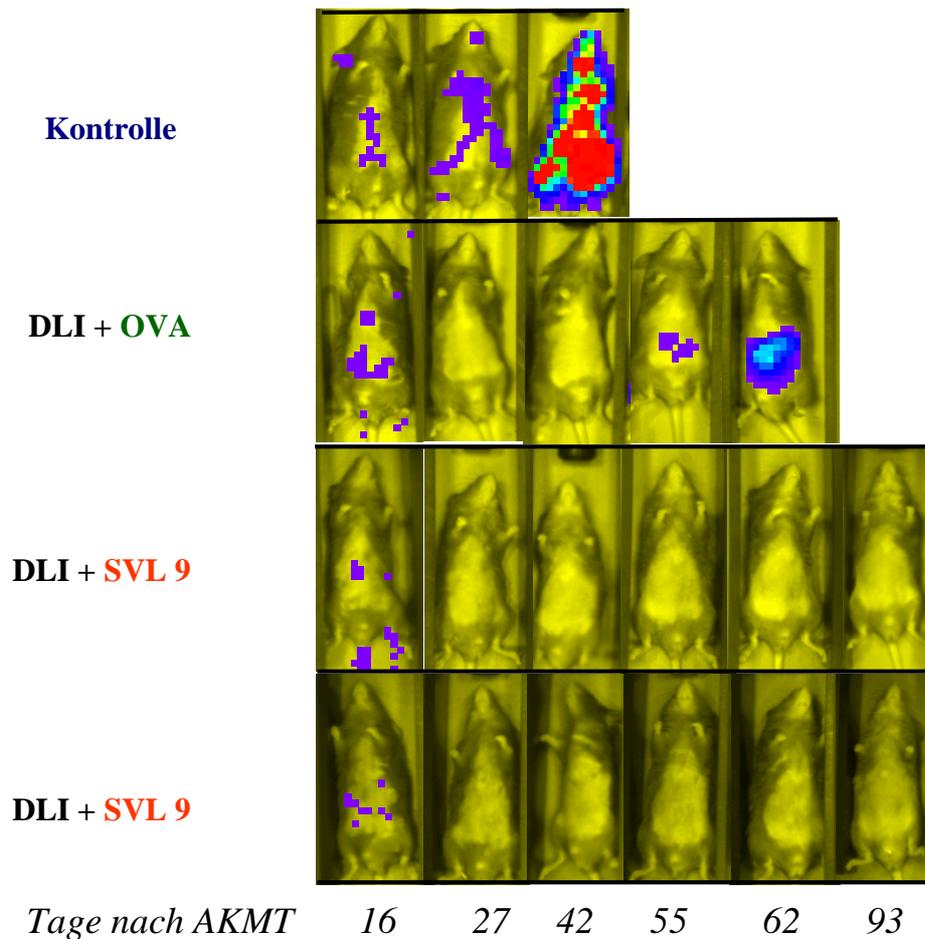


Abbildung 5.10. *Visualisierung des Leukämie-Rückfalls und -Remission durch Biolumineszenz-Imaging-Signal.*

*In der Gruppe, die mit OVA-stimulierter Spenderlymphozyteninfusion behandelt wurde, kam es nach der Therapiebeendigung (42. Tag) zum Leukämierückfall. Dieser konnte mittels Biolumineszenz-Imaging detektiert werden. Bei zwei Mäusen, die SVL 9-in vitro stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen bekamen, konnte kein Leukämierückfall beobachtet werden.*

**5.10. Der *in vivo* Zytotoxizitätstest wies die Anwesenheit der anti-H13<sup>a</sup> spezifischen CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten bei Empfängertieren nach, die mit *in vitro* mit SVL 9 Peptid stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelten wurden, trotz der Abwesenheit einer detektierbaren Anzahl von SVL9<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup> -Lymphozyten im peripheren Blut nach Knochenmarktransplantation und in Spenderlymphozyteninfusionen.**

Bezüglich des Ansprechens von 60% der Mäuse (Abb: 5.9.D. ) auf die Behandlung mit mit *in vitro* H13<sup>a</sup> SVL 9 Nonapeptid stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen, bei denen die Leukämiezellen vollständig vernichtet wurden, wollten wir die Anwesenheit der H13<sup>a</sup> SVL 9

spezifischen zytotoxischen T- Lymphozyten nachweisen, die diesen antileukämischen Effekt vermitteln könnten.

Die Präsenz dieser  $CD8^+$  zytotoxischen T-Lymphozyten haben wir zunächst im peripheren Blut der behandelten Mäuse untersucht. In zeitlich regelmäßigen Abständen nach allogener Knochenmarktransplantation durchgeführte Färbungen von peripheren Lymphozyten mit die für das SVL9/D<sup>b</sup> Komplex spezifischen Pentameren (die solche  $CD8^+$  Zellen detektiert, deren TCRs das Nebenhistokompatibilitätsantigen H 13 erkennen), konnten die SVL 9–spezifischen  $CD8^+$ -Zellen nicht detektiert werden (Abb. 5.12.).

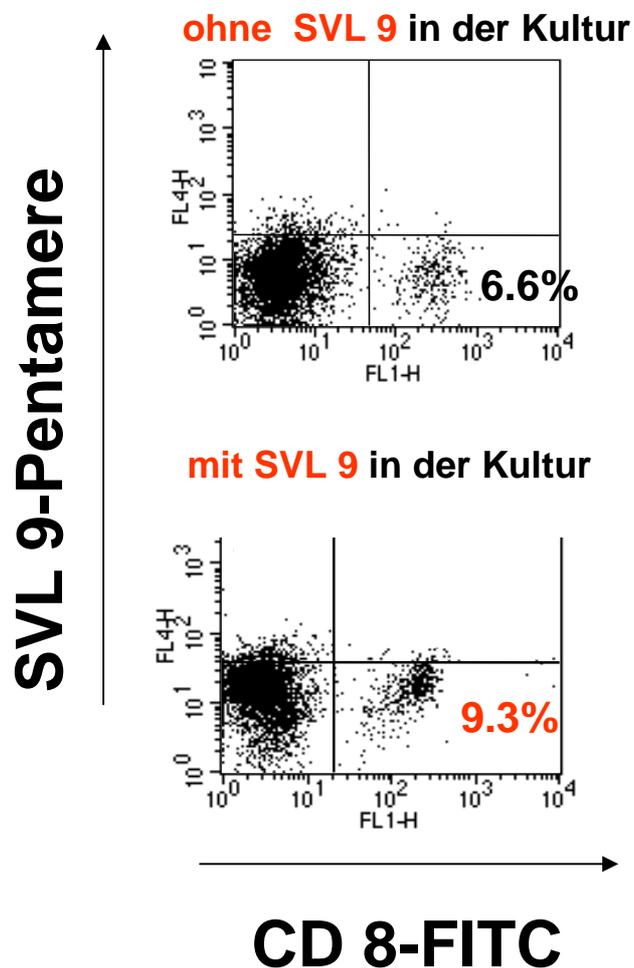


Abbildung 5.11. Die SVL9<sup>+</sup> spezifische CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten konnten im peripheren Blut nach in vitro Stimulation mit SVL 9-Peptid nicht detektiert werden.

Dieses Unvermögen, die SVL 9-spezifischen CD8<sup>+</sup>-Zellen zu detektieren, könnte durch ihre niedrige Frequenz im peripheren Blut erklärt werden, die auch unter der vom FACS detektierbaren Grenze liegen. Ebenso wurde die Anwesenheit der SVL 9-spezifischen CD8<sup>+</sup> Lymphozyten getestet in der Spenderlymphozytenkultur, die für die Behandlung vorbereitet wurde. In jener Zellkultur, die mit dem SVL 9 Peptid *in vitro* stimuliert wurde, wies die durchflußzytometrische Analyse nach doppelter Färbung mit SVL-9/D<sup>b</sup>-MHC spezifischen Pentameren und mit FITC-beladenen CD8-Antikörpern überraschend keine für das D<sup>b</sup>/SVL 9 Komplex spezifische CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten nach. Im Vergleich mit 6,6% CD8<sup>+</sup>/ Db-SVL9<sup>+</sup> positiven Zellen, die innerhalb der unstimulierten Spenderlymphozytenpopulation gemessen wurden, wurden bei *in vitro* mit 10 ng/ml SVL 9 Peptid stimulierten Spenderlymphozyten 9,3% CD8<sup>+</sup>/Db-SVL9<sup>+</sup> positive Zellen gemessen; nach der Stimulation *in vitro* wurde also keinen Anstieg der spezifischen Zellen detektiert.

Dieser unerwartete Befund kann mit möglicher Internalisation des T-Zellrezeptors bei der Temperatur der Zellkulturvorbereitung (also auf 37° C) erklärt werden. Da also hier die FACS-Analyse die Präsenz der H13a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T- Lymphozyten nicht nachweisen konnte, haben wir mit unterschiedlich behandelten Mausgruppen den *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt, um die Anwesenheit dieser Lymphozyten funktionell zu demonstrieren.

*In vivo* Zytotoxizitätstest bestätigte das Vorhandensein der H13a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten innerhalb der Milzzellen des Knochenmarkempfängers durch die spezifische Lyse der mit SVL 9 beladenen Spenderlymphozyten, also in einer Herabsetzung der zweiten Spitze (II) in den als Histogramm dargestellten Ergebnissen (Abb. 5.12.)

Wie in dem Abschnitt 4.2.2.10. beschrieben, wurden die *target*-Milzzellen (von einer H13<sup>a</sup> negativen Spendermaus), unbeladen mit dem SVL 9 Peptid, mit 0.75 µM CFSE (Spitze I) gefärbt, während die SVL 9-beladenen *target*-Milzzellen mit 0.075µM CFSE gefärbt wurden (Spitze II); diese Zellpopulationen wurden danach im Verhältnis 1:1 gemischt und injiziert. Die Herabsetzung der zweiten Spitze (II) im Verhältnis zur ersten Spitze (I), die einer SVL 9-Peptid unspezifischen Elimination von Milzzellen entspricht, ergab also die prozentuelle Größe der SVL 9-Peptid-spezifischen Abtötung lymphatischer Zellen.

In diesem, repräsentativ ausgewählten Beispiel (Abbildung 5.12.), sind die Ergebnisse des *in vivo* Zytotoxizitätstest dargestellt, der bei nachfolgenden, unterschiedlich behandelten Mäusen durchgeführt wurde: bei einer Kontrollmaus (ohne Behandlung) (A), einer 8 Mal mit nicht stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen therapierten Maus (B), bei einer mit OVA-Spenderlymphozyteninfusionen (C) bzw. bei einer mit SVL 9-Spenderlymphozyteninfusionen

behandelten Maus (D). Bei der unbehandelten Maus wurde die anti-H13<sup>a</sup> spezifische Zytotoxizität in 26,8% der Zellen gemessen.

Ein ähnlicher Wert wurde bei der Maus gemessen, die mit nicht stimulierten Spenderlymphozyten behandelt wurde (22,4%) sowie bei jener, die OVA-stimulierte Spenderlymphozyten bekam (28,0%).

Im Gegensatz dazu wurde bei Mäusen, die mit *in vitro* mit SVL 9 stimulierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelt wurden, durch anti -H13<sup>a</sup> spezifische zytotoxische T-Zellen eine spezifische Zytotoxizität von 51,5% erzielt.

Die zytotoxischen T-Lymphozyten, die spezifisch für Nebenhistokompatibilitätsantigen H13<sup>a</sup> des Empfängers sind, waren bei allen Mäusen vorhanden, obwohl sie keine Symptome einer GvHD zeigten. Bei naiven B6 H13<sup>a</sup> Mäusen dagegen, die parallel untersucht wurden, wurde keine spezifische Tötung bemerkt.

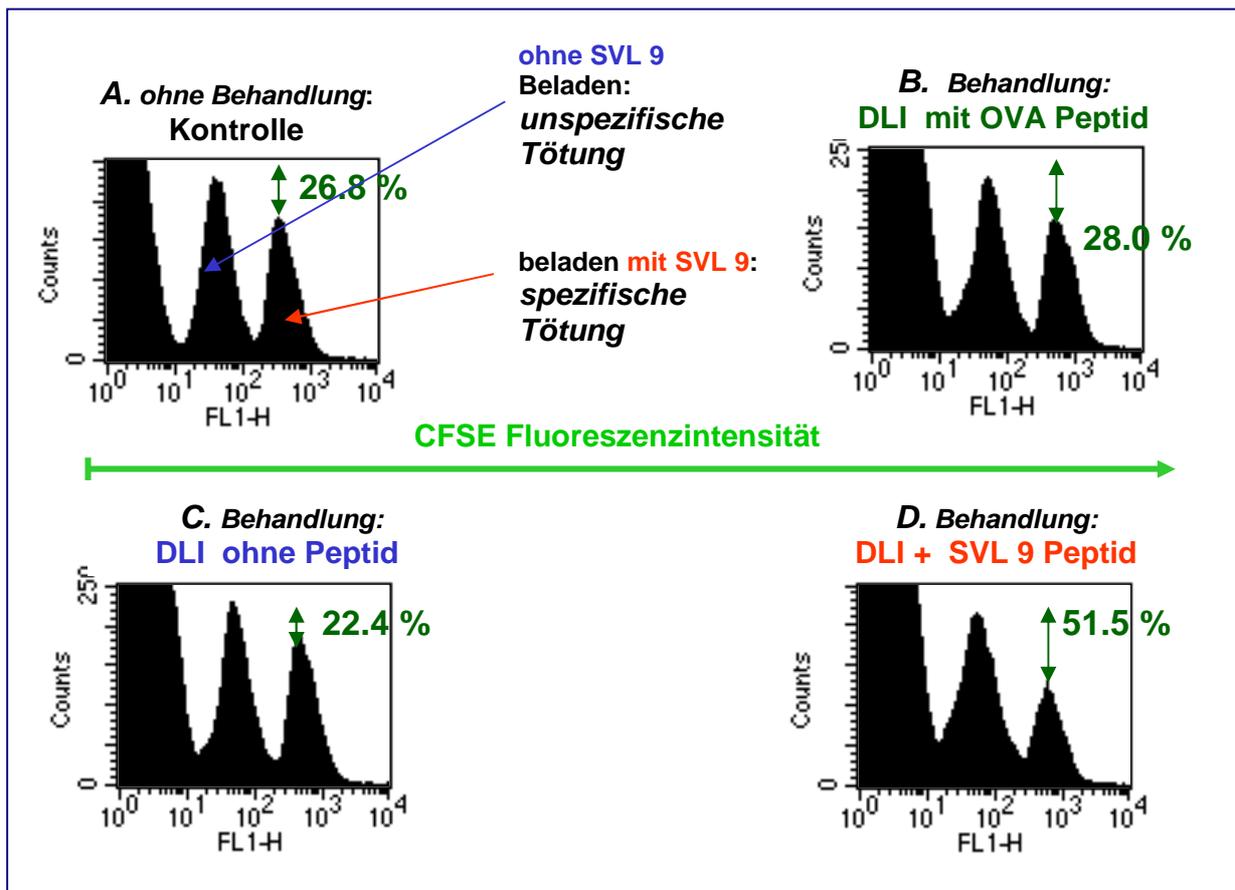


Abbildung 5.12. Nach der Behandlung mit *in vitro* mit SVL 9 immunisierten Spenderlymphozyteninfusionen, wurden *in vivo* H13<sup>a</sup>-spezifische CD 8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen gefunden.

Die zu untersuchenden Empfänger wurden als Vorbereitung auf diese Messung einen Tag vorher mit einer Mischung der Spendermilzzellen behandelt, die die SVL 9-beladenen und die SVL 9-unbeladenen Zellen im Verhältnis 1:1 enthielt. Die mit SVL 9 Nonapeptid beladenen Milzzellen des Spenders wurden mit zehnfach konzentriertem Farbstoff CFSE gefärbt, sodass ihre Menge der rechten Spitze in jeder Abbildung entspricht. Die Herabsetzung der rechten Spitze im Verhältnis zur linken ist ein Maß für die spezifische Zytotoxizität in SVL 9 tragenden Spenderlymphozyten durch die H13<sup>a</sup>-spezifischen CD 8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen des Empfängers. Die spezifische Zytotoxizität bei der Kontrollgruppe (26,8%) Abb. A., bei mit der unstimulierten Spenderlymphozyteninfusion behandelten Mäusen (22,4%) Abb. B., bzw. bei den Mäusen, die mit OVA-stimulierter Spenderlymphozyteninfusion therapiert wurden (28%) (Abb. C). Die spezifische Zytotoxizität der SVL 9-beladenen Milzzellen des Spenders durch die H13<sup>a</sup>-spezifischen CD 8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten beim Empfänger, der mit SVL 9-stimulierter Spenderlymphozyteninfusion therapiert wurde (Abb. D).

### 5.11. Regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Lymphozyten konnten *in vivo* bei den Mäusen mit dem Tumor nicht detektiert werden

Trotz der vorhandenen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> SVL9/Db<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die spezifisch für H13<sup>a</sup> waren, starb eine bestimmte Anzahl der mit diesen Lymphozyten behandelten Mäuse doch an

der Leukämie. Um eine Erklärung dieser Beobachtung herauszufinden, haben wir das periphere Blut der Knochenmarkempfänger auf die Anwesenheit der regulatorischen T-Lymphozyten untersucht.

Lymphozyten aus peripherem Blut der Mäuse mit und ohne Tumor im Bezug auf verschiedene Behandlungen wurden mit Fox p3-, CD4- und CD25-Antikörper doppelt gefärbt und mittels Durchflußzytometrie gemessen. Insgesamt wurden 18 Messungen durchgeführt, pro Behandlungsgruppe (mit je 6 Mäusen) wurde drei Mal in gleichen zeitlichen Abständen getestet. Aufgrund durchgeführter Behandlung wurden die Mäuse in zwei Gruppen unterteilt, von denen beide jeweils 6 Tumor-tragende Mäuse und 6 Mäuse ohne Tumor umfassten.

Die mit nicht immunisierten /mit Kontrollpeptid OVA immunisierten Spenderlymphozyteninfusionen behandelten Mäusen wurden mit jenen verglichen, die mit für SVL 9-spezifischen Spenderlymphozyteninfusionen therapiert wurden.

Die Ergebnisse für die Kontrollgruppe, also für nicht behandelte Mäuse, die alle einen Tumor entwickelt haben, sind auch dargestellt.

Die Messwerte dieser Untergruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede zueinander; das Vorhandensein der regulatorischen T-Zellen mit  $CD4^+CD25^+$  und  $CD4^+Foxp3^+$ -Phänotyp konnte bei Tumor-tragenden Mäusen, ungeachtet der therapeutischen Modalität nicht bewiesen werden. Innerhalb einer Untergruppe gab es keine signifikante Änderung zwischen dem Prozentansatz der regulatorischen Zellen vor und nach dem Tumornachweis.

Es war also nicht möglich zu beweisen, dass die mangelhafte Effektivität der  $CD8^+$  spezifischen T-Zellen durch die Präsenz von regulatorischen T-Zellen verursacht worden ist.

Tabelle 5.1. Regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Lymphozyten können in vivo bei den Mäusen mit dem Tumor nicht detektiert werden.

Phenotyp von regulatorischen T-Zellen	% positive Zellen				
	Kontrollgruppe: <i>ohne Behandlung</i>	nach Behandlung mit DLI			
		ohne Peptid oder mit Kontrollpeptid (OVA)		+ SVL 9 Peptid	
	Tumor vorhanden (6 Mäuse)	Tumor - frei (6 Mäuse)	Tumor vorhanden (6 Mäuse)	Tumor - frei (6 Mäuse)	Tumor-vorhanden (6 Mäuse)
<b>CD4+ CD25+</b>	0.16	0.10	0.08	0.17	<b>0.15</b>
<b>CD4+ Foxp3+</b>	0.01	0.01	0.01	0.02	<b>0.01</b>

## 6. DISKUSSION

### 6.1. Spenderlymphozyteninfusion nach einer allogenen Knochenmarktransplantation

Seit 1990, als Kolb einen kurativen Effekt der Spenderlymphozyten beweisen konnte, wird die Infusion der Spenderlymphozyten (DLI) zur Behandlung von Rezidiven nach allogener Knochenmarktransplantation bei unterschiedlichsten hämatologischen Erkrankungen eingesetzt. (Kolb, 1995).

Da auch bei dieser adoptiven Immuntherapie eine enge Korrelation zwischen dem Auftreten der unerwünschten GvHD und der Antwort auf die Therapie, bzw. dem GvL-Effekt besteht, stellt die Trennung von GvHD und GvL-Effekt eine Herausforderung dar. Beide Effekte werden weitgehend durch die alloreaktiven T-Lymphozyten des Spenders vermittelt, die Nebenhistokompatibilitätsantigene (mHAgs) erkennen (Hambach, Goulmy, 2006), sodass durch einen adoptiven Transfer der Lymphozyten, die spezifisch für die hämatopoetisch restringierten Nebenhistokompatibilitätsantigene sind, ein GvL-Effekt ohne GvHD erzielt werden könnte.

Solche Nebenhistokompatibilitätsantigene, die auf den hämatopoetischen Zellen des Empfängers exprimiert und im Komplex mit MHC-Molekül an der Oberfläche der Zellen des Empfängers einschließlich der APC präsentiert sind, werden vom Spender als allogene erkannt (wobei Spender und Empfänger im MHC-Komplex weitgehend übereinstimmen). In vielen klinischen Studien wurde eine vollständige Rückbildung der chronischen myeloischen Leukämie nach den Infusionen der mHAgs-inkompatiblen T-Zellen erzielt (Collins, 1997; Drobyski, 1999). Diese Erkenntnisse machen die Nebenhistokompatibilitätsantigene sehr attraktiv als Zielantigene einer Spenderlymphozyteninfusion nach allogener Knochenmarktransplantation. In klinischen Studien korrelierte die Remission bei chronischer myeloischer Leukämie und die beim Multiplen Myelom nach der Spenderlymphozyteninfusion-Behandlung mit der Anwesenheit der für hämatopoetisch restringierte HA-1 und HA-2 Nebenhistokompatibilitätsantigene spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) (Heemskerk et al., 2003).

Mit solchen CTLs infiltrierte menschliche Haut zeigte nach 24 h keine oder nur minimale *in situ* GvH-Reaktion im Haut-Explant-Assay. Im Gegensatz dazu, resultierten aus einer Hautinfiltration mit zytotoxischen T-Lymphozyten, die spezifisch für ubiquitär exprimiertes Nebenhistokompatibilitätsantigen H-Y waren, schwere *in situ* GvH-Reaktionen (Stadium III–IV) und hohe  $\gamma$ -Interferonproduktion (Dickinson, et al., 2002). Diese Ergebnisse heben hervor, dass die Zielantigene einer adoptiven Immuntherapie für maligne hämatopoetische Erkrankungen die hämatopoetisch restringierten Nebenhistokompatibilitätsantigene sein sollten. Durch diese

selektive Immuntherapie könnte nach einer allogenen Knochenmarktransplantation die Vernichtung der Leukämiezellen erzielt werden, ohne das gleichzeitige Risiko einer GvHD.

## 6.2. TAA und mHAgS als Target-Antigene im Vergleich

Wenn wir über eine Immuntherapie für an malignen Erkrankungen leidende Patienten nachdenken, wäre eine ideale Behandlung eine solche Therapie, die gezielt gegen die bei jeweiligen Patienten individuell exprimierten Tumor-spezifischen Antigene gerichtet ist. Im klinischen Alltag ist jedoch äußerst schwer, dies als eine Standardbehandlung zu etablieren, da es finanziell und zeitlich sehr aufwendig ist.

Trotz ihrem Nachteil, dass sie als *self*-Antigene wirken, fungieren diese, an der Oberfläche der Tumorzellen exprimierten Tumor-assoziierten Antigene (TAA) größtenteils als *Target*-Antigene einer adoptiven Immuntherapie.

Ein anderes Konzept der adoptiven Immuntherapie, das die Nebenhistokompatibilitätsantigene als *Target*-Antigene anwendet, hat ein besseres kuratives Potential als das erstgenannte, das eine Immunreaktion gegen TAA generiert.

Da die Tumor-assoziierten Antigene für das Immunsystem des Spenders nicht allogene sind sondern für das Immunsystem des Empfängers bzw. des Patienten "*neo-self*-Antigene" darstellen, können diese Antigene von T-Zellen nicht erkannt werden (Fontaine et al., 2001), oder die TAA-reaktiven T-Zellen werden toleriert (Stavely-O`Carrollet al., 1998), da ihre Reaktivität sehr niedrig ist (tolerogene T-Zellen) (Engels, 2005 ).

Sollten die Nebenhistokompatibilitätsantigene jedoch als *Target*-Antigene angewendet werden, könnten sie als *non-self* Epitope eine allogene, über die T-Zellen vermittelte Immunreaktion auslösen, die zum effektiven GvL-Effekt führt.

Dass bei einem GvL-Effekt die Target-Antigene eher Nebenhistokompatibilitätsantigene als Tumor-assoziierte Antigene sind, zeigte eine separate Abschwächung des GvL-Effekts nach der Transplantation eines Isografts, also eines genetisch identischen Transplantats (Barrett et al., 2000). Die Spezifität der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten ist durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelt, einem Heterodimer, das aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammengesetzt ist. Ein adoptiver Transfer der T-Lymphozyten, die für Virus-, Tumor- oder Nebenhistokompatibilitätsantigene spezifisch waren, wurde schon bei der Behandlung einiger maligner und viraler Erkrankungen erfolgreich angewendet (Blattman et al., 2004). Das

therapeutische Potential der TCR-transfizierten T-Lymphozyten wurde in aktuellen klinischen Studien schon demonstriert, wobei der für die Tumorantigene spezifische TCR in die autologen T-Zellen transfiziert wurde, und diese danach in Patienten mit metastatischem Melanom adoptiv transferiert wurden (Morgan et al., 2006).

Die Isolation und *in vitro* Expansion der Antigen-spezifischen T-Zell-Klone ist jedoch eine mühsame und zeitlich aufwendige Methode, die nur bei einer begrenzten Anzahl der Patienten angewendet werden kann.

### **6.3. Adoptive T-Zell-Therapie und die T-Zellen mit genetisch modifiziertem TCR**

Eine alternative Lösung dazu wäre es, die T-Lymphozyten mit den T-Zell-Rezeptoren mit erwünschter Spezifität *in vitro* zu transfizieren, was den Vorteil hätte, jedes beliebige Antigen als *target*-Antigen auswählen zu können.

Es wurde schon gezeigt, dass T-Lymphozyten mit genetisch veränderten TCR Zytokine sezernieren und die Antigen-präsentierenden *-Target* -Zellen lysieren können (Engels, 2007).

Momentan liegen die größten Erwartungen in einer Isolierung des T-Zell-Rezeptors aus den Antigen-spezifischen T-Zellen und in möglichst starker Erhöhung seiner Expressionsrate in humanen T-Lymphozyten. Außerdem wird versucht, ein sichereres Vektorsystem (Kieback *et al.*, 2008) und nicht-virale DNA-Transfer-Systeme zu entwickeln (Huang *et al.*, 2008).

Doch die therapeutische Anwendung der TCR-Gen-modifizierten T-Zellen ist mit einem gewissem Risiko verbunden. Erstens, da die *Target*-Tumorantigene nicht nur tumorspezifisch sondern ubiquitär exprimiert sein können, kann die Erkennung dieser, nicht an den Tumorzellen restringierten Antigene durch die TCR- veränderten T-Zellen zur Autoreaktivität führen.

Zweitens, die eingeführten TCR-Ketten können zusammen mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des endogenen TCRs ein gemischtes Heterodimer bilden (Sommermeyer et al., 2007; Heemstek et al., 2007). Die Spezifität dieser falsch gebundenen T-Zell-Rezeptoren kann nicht vorhergesehen werden, und sie könnten auch ein autoreaktives Potential haben.

Drittens wurde auch gezeigt, dass die Aktivierung des transfizierten TCRs auch zur Aktivierung des endogenen T-Zell-Rezeptors führen kann (Gladow, et al., 2004). Durch die klonale Deletion wird der Großteil der autoreaktiven T-Lymphozyten mit hoher Affinität im Thymus eliminiert, doch jene mit niedrigerer Affinität können dem zentralen Toleranzmechanismus entfliehen (Bach et al., 2001). Werden diese T-Lymphozyten mit einem zusätzlichen, sekundären TCR

transfiziert und aktiviert, können sie gegen eigenes Gewebe reagieren. Schließlich erfordert eine stabile Expression in den transfizierten T-Zellen benötigt eine Integration des TCRs in das Wirtsgenom, was seinerseits ein Risiko der Insertion-Mutagenese birgt. Einige klinische Daten haben gezeigt, dass die adoptive Immuntherapie mit genetisch veränderten oder unveränderten T-Zellen auch ein Risiko autoreaktiver Nebenwirkungen birgt (Lamers et al., 2006). Diese Autoreaktivität ist schwer vorherzusehen und variiert von einem Patienten zum anderen.

Bezüglich der Größe des TCR $\beta$  Genes ist es unwahrscheinlich, dass ein Vektor, der ein zusätzliches Gen trägt, eine T-Zelle effizient transfizieren kann.

Deshalb sollten die Lymphozyten des peripheren Blutes doppelt transfiziert werden-mit einem TCR und mit einem zusätzlichen, für andere Gene kodierenden Vektor, um die Anzahl der retroviralen Integrationen in das Wirtsgenom zu erhöhen (Woods et al., 2003).

Weiterhin sind die Aufreinigung und die Analyse der genetisch veränderten Lymphozyten nach diesem Schritt unerlässlich, um zu überprüfen, ob sie den gewünschten TCR exprimieren, und ob eine prolongierte *in vitro* Kultivierung, die notwendig für den Gewinn einer ausreichenden Anzahl transfizierter Lymphozyten ist, ihre Funktionalität eventuell vermindert hat (Sussman, 2004).

Bei der Anwendung der genetisch modifizierten T-Lymphozyten, die einen transgenen TCR exprimieren, sollten daher zwei Hauptkriterien erfüllt werden: dieser transgene TCR sollte spezifisch wirken und darf nicht mit endogenen TCR interferieren. Diese Behandlung sollte außerdem ihre Effektivität schnell demonstrieren, um eine weitere klinische Anwendung finden zu können.

In den vorherigen Mausmodellen wurde gezeigt, dass ein adoptiver Transfer der gegen ein immundominantes Nebenhistokompatibilitätsantigen *in vivo* immunisierten T-Lymphozyten, effektiv Leukämie behandeln kann, ohne gleichzeitig eine GvHD auszulösen. Dafür wurde das ubiquitär exprimierte H7<sup>a</sup>(B6<sup>dom1</sup>) Maus-Nebenhistokompatibilitätsantigen ausgewählt, dessen Distribution in nicht-hämatopoetischen Geweben, einschließlich jener, die Zielorte einer GvHD sind (Haut, Leber, Darm), sehr niedrig ist (unter 10 %) (Fontaine et al., 2001). Die entscheidende Rolle der Gewebedistribution des Zielantigens für die Wirksamkeit einer adoptiven Immuntherapie, als auch die Effektivität der für H7<sup>a</sup> Nebenhistokompatibilitätsantigen spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten in der Behandlung von soliden Tumoren (Melanom) wurden gezeigt (Meuniers et al., 2003; Meuniers et al., 2005).

In unserem Projekt wurde das autosomale Maus-Nebenhistokompatibilitätsantigen H13 ausgewählt, seit 1967 bekannt als Antigen, das zwischen inzüchtigen Mausstämmen zur Gewebeinkompatibilität führt (Snell, 1967).

Nur durch einzelne konservative Substitution einer Methyl-Gruppe unterscheiden sich das proteolytische Abbau-Produkt dieses Gens beim C57BL/6 Maus-Stamm [Nonapeptid **SSVGVWYL (SVL 9)**] von jenem beim Stamm C.B10 [**SSVIGVWYL (SIL 9)**], da das Nonapeptid SVL 9 an der vierten Position ein Valin statt Isoleucin hat (Mendoza, 1997) (Siehe Einleitung).

Wir haben in diesem Projekt ein Mausmodell etabliert, um die therapeutische Effektivität der T-Lymphozyten zu überprüfen, die spezifisch für das Nebenhistokompatibilitätsantigen H 13 waren. Durch diese Behandlung konnten wir im Mausmodell einen GvL-Effekt erzielen.

Die allogene Knochenmarktransplantation wurde hierbei, zusammen mit der Applikation der Lymphom- oder Thymomzellen EL 4, oder mit ihrer mit Ovalbumin transfizierten Zellvariante EG 7 durchgeführt, wobei die beiden Tumorzelllinien Luciferase exprimierten.

Die Empfängermause wurden mit Spenderlymphozyteninfusionen behandelt, die mit dem H13<sup>a</sup>-abgeleiteten und MHC-Klasse I-restringierten SVL 9 Peptid entweder *in vivo* immunisiert oder *in vitro* stimuliert wurden. Der hierdurch erzielte GvL-Effekt beseitigte die Leukämiezellen bei abwesender GvHD.

Somit stellt dieses Mausmodell ein sehr hilfreiches Mittel für die Analyse der adoptiven Zelltherapie mit solchen T-Lymphozyten dar, die einen für das Nebenhistokompatibilitätsantigen spezifischen TCR exprimieren.

#### **6.4. Schlussfolgerung**

Es ist zu erwarten, dass mit einer kontinuierlich wachsenden Liste der bekannten humanen Nebenhistokompatibilitätsantigene (Spierings *et al.*, 2006) und mit akkumuliertem Wissen über ihre Distribution innerhalb verschiedener menschlicher Populationen (Spierings *et al.*, 2007) es relativ einfach wäre, ein ausschließlich auf Tumorzellen exprimiertes Nebenhistokompatibilitätsantigen gezielt zu finden, als *Target*-Antigen anzuwenden und danach den für dieses Nebenhistokompatibilitätsantigen spezifischen TCR in Lymphozyten zu transferieren. Während einer solchen Behandlung könnten bei Patienten viele unvorhergesehene Schwierigkeiten auftreten, besonders unerwünschte Immunreaktionen und jene Probleme, die sich auf die Verlässlichkeit dieser genetisch veränderten T-Lymphozyten und ihre spätere Elimination beziehen. Einige von diesen Problemen, wie z.B. Entwicklung der Autoreaktivität durch eine Kreuzreaktivität mit Autoantigenen oder die Interferenz des eingeführten mit dem

endogenen TCR werden intensiv erforscht (Engels et al., 2007). Nach der Isolation des T-Zell-Rezeptors aus den für H13<sup>a</sup> spezifischen T-Lymphozyten könnte das hier dargestellte *in vivo* Mausmodell sehr hilfreich sein, um alle Aspekte eines GvL-Effektes zu überprüfen; dieser Effekt wurde hier durch T-Lymphozyten induziert, die einen für das Nebenhistokompatibilitätsantigen spezifischen TCR exprimierten.

Hoffentlich wird es möglich sein, entweder die T-Lymphozyten des Empfängers oder jene des Spenders genetisch so verändern zu können, um einen verbesserten, für die Nebenhistokompatibilitätsantigene spezifischen TCR zu exprimieren, mittels dessen ein GvL-Effekt induziert werden kann und eine GvHD vermieden wird.

## 8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

**AKMT:** allogene Knochenmarktransplantation

**ALL:** Akute lymphatische Leukämie

**AML:** Akute myeloische Leukämie

**APC:** Antigen Presenting Cell (Antigen-präsentierende Zelle)

**BLI:** Biolumineszenz-Imaging

**CLL:** chronische lymphatische Leukämie

**CML:** chronische myeloische Leukämie

**CMV:** Cytomegalie-Virus

**DLI:** Donor Lymphocyte Infusion (Spenderlymphozyteninfusion)

**EBV:** Epstein-Barr-Virus

**ER:** endoplasmatisches Retikulum

**FACS:** durchflusszytometrische Analyse

**G-CSF:** Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor

**GM-CSF:** Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

**GvHD:** Graft- versus-Host Disease (Transplantat -gegen-Wirt Reaktion)

**GvL:** Graft-versus- Leukemia (Transplantat-gegen-Leukämie Reaktion)

**GvT:** Graft-versus-Tumor (Transplantat-gegen-Tumor Reaktion)

**HLA:** Humane Leukozyten Antigene

**IFN- $\gamma$ :** gamma- Interferon

**IL:** Interleukin

**mHAgS:** Nebenhistokompatibilitätsantigene (*minor histocompatibility antigens, mHAgS*)

**MHC:** Major Histocompatibility Complex/Haupthistokompatibilitätskomplex

**TCR:** T-Zell-Rezeptor

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Nekrose Faktor *alpha*

**SCT:** Stammzelltransplantation (SCT)

**SNP:** Single Nucleotid- Polymorphismus

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

Anasetti C, Amos D, Beatty PG, et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med* 1989;**320**:197-204.

Anderson LD, Savary CA, Mullen CA, et al. Immunization of allogeneic bone marrow transplant recipients with tumor cell vaccines enhances graft-versus-tumor activity without exacerbating graft-versus-host disease. *Blood* 2000;**95**:2426-33.

Bach JF, Chatenoud L. Tolerance to islet autoantigens in type I Diabetes. *Annu Rev Immunol* 2001;**19**:131-61.

Barnes DHW, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with X-rays and homologous bone marrow. *Br J Haematol* 1957;**3**:241-52.

Barrett AJ, Ringde'n O, Zhang MJ, et al. Effect of nucleated marrow cell dose on relapse and survival in identical twin bone marrow transplants for leukemia. *Blood* 2000;**95**:3323-7.

Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. In: The Harvey Lectures. New York: Academic Press, 1966:21-78.

Blattman JN, Greenberg PD. Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. *Science* 2004;**305**:200-5.

Blazar BR, Lees CJ, Martin PJ, et al. Host T cells resist graft-versus-host disease mediated by donor leukocyte infusions. *J Immunol* 2000;**165**:4901-9.

Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltzis-Mortari A, et al. Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4<sup>+</sup> T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation. *J Immunol* 1997;**158**:29-39.

Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998;**8**:1229-31.

Collins RH, Spilberg O, Drobyski WR, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1997;**15**:433-44.

Deeg HJ, Henslee-Downey PJ. Management of acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1990;**6**:1-8.

Dembic Z, Haas S, Weiss J, et al. Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature* 1986;**320**:232-8.

Dickinson AM, Wang XN, Sviland L, et al. *In situ* dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Nature Med* 2002;**8**:410-4.

Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex Vivo Isolation and Characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Cells with Regulatory Properties from Human Blood. *J Exp Med* 2001;**193**:1303-10.

Drobyski WR, Hessner MJ, Klein JP, et al. T-cell depletion plus salvage immunotherapy with donor leukocyte infusions as a strategy to treat chronic phase chronic myelogenous leukemia patients undergoing HLA-identical sibling marrow transplantation. *Blood* 1999;**94**:434-41.

Edinger M, Cao YA, Verneris MR, Bachmann MH, Contag CH, Negrin RS. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* 2003;**101**:640-8.

Engels B, Noessner E, Frankenberger B, Blankenstein T, Schendel D, Uckert W. Redirecting Human T Lymphocytes Toward Renal Cell Carcinoma Specificity by Retroviral Transfer of T Cell Receptor Genes. *Hum Gene Ther* 2005;**16**:799-810.

Engels B, Uckert W. Redirecting T lymphocyte specificity by T cell receptor gene transfer—A new era for immunotherapy. *Mol Aspects Med* 2007;**28**:115–42.

Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;**351**:290–6.

Fefer A, Sullivan K, Weiden P, et al. Graft versus leukemia effect in man: the relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic marrow transplantation. In: Truitt R, Gale RP, Bortin MM, eds. Cellular immunotherapy of cancer. New York: Alan R. Liss, 1987:401-8.

Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991;**324**:667-74.

Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron Ch, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nature Med* 2001;**7**:789-94.

Gladow M, Uckert W, Blankenstein T. Dual T cell receptor T cells with two defined specificities mediate tumor suppression via both receptors. *Eur J Immunol* 2004;**34**:1882–91.

Glass B, Uharek L, Gassmann W, et al. Graft- versus-leukemia activity after bone marrow transplantation does not require graft-versus-host disease. *Ann Hematol* 1992;**64**:255-9.

Goulmy E. Minor histocompatibility antigens: from T cell recognition to peptide identification. *Hum Immunol* 1997;**54**:8-14.

Goulmy E. Minor Histocompatibility Antigens: from transplantation problems to therapy of cancer. *Human Immunol* 2006;**67**:433-8.

Greenberg P. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. In: Dixon F, eds. Advances in immunology, vol.49. Orlando, Florida: Academic Press, 1991:281-7.

Greenberg P, Cheever M, Fefer A. Eradication of disseminated murine leukemia by chemo-immunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Lyt-1<sup>+</sup>2<sup>-</sup> T-lymphocytes. *J Exp Med* 1981;**154**:952-63.

Greenfield A, Scott D, Pennisi D, et al. An H-YD<sup>b</sup> epitope is encoded by novel mouse Y chromosome gene. *Nature Genet* 1996;**14**:474-8.

Hambach L, Goulmy E. Immunotherapy of cancer through targeting of minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* 2005;**17**:202–10.

Heemskerk MH, Hagedoorn RS, van der Hoorn MA, et al. Efficiency of T-cell receptor expression in dual-specific T cells is controlled by the intrinsic qualities of the TCR chains within the TCR-CD3 complex. *Blood* 2007;**109**:235–43.

Heemskerk MH, Hoogeboom M, Hagedoorn R, Kester MG, Willemze R, Falkenburg JH. Reprogramming of virus specific T cells into leukemia-reactive T cells using T cell receptor gene transfer. *J Exp Med* 2004;**199**:885–94.

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions following bone marrow transplantation in humans. *Blood* 1990;**75**:555-62.

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;**162**:5317-26.

Johnson BD, Becker EE, Truitt RL. Graft-vs.-host and graft-vs.-leukemia reactions after delayed infusions of donor T-subsets. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;**5**:123-32.

Kersey J, Weisdorf D, Nesbit M, et al. Comparison of autologous and allogeneic bone marrow transplantation for treatment of high-risk refractory acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1987;**317**:461-7.

Kolb HJ, Mittermueller J, Clemm C. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;**76**:2462-5.

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* 1995;**86**:2041-50.

Kröger N. Stammzellquelle. In: Kröger N, Zander A, Ayuk F, eds. *Allogene Stammzelltherapie-Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. 1. Auflage. Bremen, Deutschland: UNI-MED Verlag AG, 2004:30-4.

van Lochem E, de Gast B, Goulmy E. In vitro separation of host specific graft-versus-host and graft-versus-leukemia cytotoxic T cell activities. *Bone Marrow Transplant* 1992;**10**:181-3.

Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG et al. Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With Autologous T-Lymphocytes Genetically Retargeted Against Carbonic Anhydrase IX: First Clinical Experience. *J Clin Oncol* 2006;**24**:e20–e22.

- Lee S, Vogelsang G, Flowers ME. Chronic Graft-versus-Host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;**9**:540-5.
- Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, et al. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995;**86**:1261-8.
- Mendoza LM, Paz P, Zuberi A, Christianson G, Roopenian D, Shastri N. Minors Held by Majors: The *H13* Minor Histocompatibility Locus Defined as a Peptide/MHC Class I Complex. *Immunity* 1997;**7**:461-72.
- Meunier MC, Roy-Proulx G, Labrecque N, Perreault C. Tissue distribution of target antigen has a decisive influence on the outcome of adoptive cancer immunotherapy. *Blood* 2003;**101**:766-70.
- Meunier MC, Delisle JS, Bergeron J, Rineau V, Baron Ch, Perreault C. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nature Med* 2005;**11**:1222-9.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science* 2006;**314**:126-9.
- Ostrov DA, Roden MM, Shi W, et al. How H13 histocompatibility peptides differing by a single methyl group and lacking conventional MHC binding anchor motifs determine self-nonsel self discrimination. *J Immunol* 2002;**168**:283-9.
- Paris F, Fuks Z, Kang A, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;**293**:293-7.
- Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant* 2001;**1**:97-102.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25): Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;**155**:1151-64.
- Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000;**18**:423-49.
- Slavin S, Ackerstein A, Naparstek E, Or R, and Weiss L. The graft-versus-leukemia (GVL) phenomenon: is GVL separable from GVHD? *Bone Marrow Transplant* 1990;**6**:155-61.
- Snell GD, Cudkowicz G, Bunker HP. Histocompatibility genes of mice. VII. H-13, a new histocompatibility locus in fifth linkage group. *Transplantation* 1967;**5**:492-503.
- Smith KA. The interleukin 2 receptor. *Ann Rev Cell Biol* 1989;**5**:397-403.
- Sommermeier D, Neudorfer J, Weinhold M, et al. Designer T cells by T cell receptor replacement. *Eur J Immunol* 2006;**36**:3052-9.
- Stanislowski T, Voss RH, Lotz C, et al. Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat Immunol* 2001;**2**:962-70.

Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J. et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1998;**95**:1178–83.

Sullivan K, Weiden P, Storb R et al. Influence of acute and chronic graft-versus-host-disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood* 1989;**73**:1720-8.

Sussman JJ, Parihar R, Winstead K, Finkelman FD. Prolonged Culture of Vaccine-Primed Lymphocytes Results in Decreased Antitumor Killing and Change in Cytokine Secretion. *Cancer Res* 2004;**64**:9124–30.

Taga K, Kasahara Y, Yachie A, Miyawaki T, Taniguchi N. Preferential expression of IL-2 receptor subunits on memory populations within CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunology* 1991;**72**:15-22.

Taylor PA, Lees J, Blazar BR, et al. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus host disease lethality. *Blood* 2002;**99**:3493-9.

Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) Immune Regulatory Cells Are Required for Induction of Tolerance to Alloantigen via Costimulatory Blockade. *Exp J Med* 2001;**193**:1311-8.

Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;**164**:183-90.

Troy T, Jekic-McMullen D, Sambucetti L, Rice B. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging* 2004;**3**:9-23.

Van Bleek GM, Nathenson SG. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule. *Nature* 1990;**348**:213–6.

Woods NB, Muessig A, Schmidt M, et al. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis *Blood* 2003;**101**:1284–9.

Wu GD, Nolte JA, Jin YS, et al. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation* 2003;**75**:679-85.

## 10. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich sehr bei

Prof. Bernd Dörken und seiner Arbeitsgruppe an der Charité-am-MDC, bei Prof. Peter Daniel und Dr. Sophie Cayeux für ihre Betreuung, bei der Charité-GDL für mein Stipendium und bei der Deutschen José Carreras –Leukämie Stiftung für die weitere finanzielle Unterstützung.

## Erklärung an Eides Statt

Ich, Branka Cakarun erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema :

*Etablierung eines in vivo Mausmodells zur Bewertung der Rolle des  
Nebenhistokompatibilitätsantigens H13 bei der Induktion eines "Graft-versus-  
Leukemia" Effekts mittels in vivo Biolumineszenz-Imaging*

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. Die benutzte Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.