

*Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III-Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann
GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit*

Charakterisierung von CD6-negativen Suppressorzellen im Knochenmark und in G-CSF-mobilisierten Blutzellen.

*Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München*

*Vorgelegt von
Florian Hötzl
aus
München
2006*

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. med. Hans-Jochem Kolb

*Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Mayerhofer
Prof. Dr. A. Borkhardt*

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. nat. Christine Falk

Dekan: Professor Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2006

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	5
1.1 Grundlagen der Transplantationsimmunologie	5
1.2 Das CD6 Antigen und sein Ligand ALCAM	8
1.3 Killer-Inhibitor-Rezeptoren (KIR)	9
<u>2. Material und Methoden</u>	10
<i>2.1 Material</i>	10
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	11
2.1.3 Zellkulturmedien und Reagenzien	11
2.1.4 Zusätze von Zellkulturmedien	11
2.1.5 Seren	12
2.1.6 Zytokine	12
2.1.7 Chemikalien	12
2.1.8 Antikörper	12
2.1.9 Antikörper zur Charakterisierung der Killer Inhibitor-Rezeptoren (KIR)	13 13
2.1.10 Zelllinien	14
<i>2.2 Methoden</i>	14
2.2.1 Extraktion von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut	14
2.2.2 Zählen von Zellen	15
2.2.3 Kryokonservierung von Zellen	15
2.2.4 Auftauen von Zellen	16
2.2.5 Färbung mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern	16
2.2.6 CD6 Depletion von Zellen aus dem Knochenmark und peripheren Stammzellen mittels Antikörper	17
2.2.7 Anreicherung einer CD8 ⁺ Zellpopulation	17
2.2.8 CD 34 ⁺ Anreicherung mit MACS Cell Isolation Kit	18
2.2.9 Gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR)	19

<u>3. Eigene Ergebnisse</u>	21
3.1. <i>Phänotypische Untersuchungen</i>	21
3.1.1 Phänotypische Analyse der Zellen vor und nach CD6Depletion bei Knochenmark und peripheren Stammzellen	21
3.1.2. Untersuchung der CD3 ⁺ /CD4 ⁺ und CD3 ⁺ CD8 ⁺ Zellfraktion	25
3.1.3 Charakterisierung der CD3 ⁺ /CD4 ⁻ /CD8 ⁻ Zellen im unbehandelten KM bzw. PBSC	26
3.1.4 Charakterisierung der CD8 ⁺ Zellen	28
3.1.5 Phänotypische Analyse der CD6 Expression auf CD34 ⁺ Stammzellen	30
3.1.6 Untersuchung des Knochenmarks bzw. PBSC auf Killer – Inhibitor-Rezeptoren (KIR)	31
3.2 <i>Proliferationsassays mittels Mixed Lymphocyte Cultere (MLR)</i>	35
3.2.1 MLR von CD6 depletierten und CD6 undepletierten Zellfraktionen	35
3.2.2 MLR bei CD 6 negativen und gleichzeitig CD 8 positiven Zellen	40
3.2.3 MLR bei CD6-/CD8- Zellpopulationen	42
3.2.4 MLR der CD34 positiven Population	44
<u>4. Diskussion</u>	46
4.1 Phänotypische Untersuchung der CD6-negativen Knochenmark bzw. Stammzellfraktion.	46
4.2 Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) bei verschiedenen Zellpopulationen	48
<u>5. Zusammenfassung</u>	52
<u>6. Summary</u>	53
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	54

1. Einleitung

1.1 Grundlagen der Transplantationsimmunologie

Die Knochenmarktransplantation (KMT) dient der Behandlung von Leukämien und anderen hämatologischen Erkrankungen (Kolb et al. 1986; Gale et Champlin 1986). Durch die KMT entsteht ein Chimärismus im Empfängerorganismus, d.h. der Empfänger nimmt die Hämatopoese des Spenders an; sichtbar z.B. am Wechsel der Blutgruppe. Voraussetzung für den Erhalt des Chimärismus ist eine Transplantationstoleranz. Als erster beschrieb dieses Phänomen Ray Owen 1945 bei Zwillingssäuglingen mit Verbindung der Plazenten (Owen RD 1945). Bereits 1949 veröffentlichte Burnet seine Toleranzhypothese: die Fähigkeit des Immunsystems zwischen selbst und nicht selbst zu unterscheiden. Bei dem Kontakt mit fremden Antigenen vor Geburt kann eine *zentrale Toleranz* entstehen (Burnet et al. 1949). Bei *zentraler Toleranz* und Chimärismus werden Hauttransplantate des anderen Zwillings nach der Geburt nicht abgestoßen (Medawar et al. 1953). Im Gegensatz zur zentralen Toleranz wird die periphere Toleranz beschrieben, bei der reife Lymphozyten, die nicht durch den Thymus gegangen sind, eine spezifische ‚Nicht-Reaktion‘ entfalten. So reagieren zum Beispiel T-Zellen nicht auf ein von APC`s präsentiertes fremdes Antigen, wenn die ko-stimulatorischen Moleküle B7/CD28 nicht gleichzeitig vorhanden sind (Mondino et al. 1996). Ein weiterer Toleranzmechanismus beruht auf dem induzierten Zelltod, der Apoptose. Dabei werden aktivierte Lymphozyten nach ihrer Stimulation mit Alloantigenen durch die Fas-Fas-L Interaktion apoptotisch (Wells AD et al. 1999). Schließlich werden verschiedene Suppressoreffekte im Rahmen der Toleranz beschrieben. So zum Beispiel sind bestimmte T-Zellen (sog. Regulatorische T-Zellen) in der Lage, die Immunantwort zu verhindern. Die immun-supprimierenden Zytokine, die dabei freigesetzt werden, sind TGF- β und Interleukin-10 (IL -10) (Groux et al. 1997).

Als Toleranz-induzierende Zellen werden verschiedene Zellen beschrieben, wie nicht-immunogene Stammzellen, Toleranz-induzierende DC-2 Zellen, Untergruppen von NK- Zellen und Stroma-Zellen (Locatelli F et al. 2000).

Voraussetzung aber für eine lebenslange Toleranz des Empfängers gegenüber dem Spenderorgan, in diesem Falle den hämatopoetischen Zellen, ist die Beherrschung der Komplikationen der KMT selbst, der Graft-versus-Host (GvH) und der Host-versus-Graft (HvG) Reaktion. Diese Reaktionen werden im Wesentlichen von T-Zellen verursacht.

Die GvH- Erkrankung ist die Haupttodesursache nach allogener KMT, bei ihr besteht eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen und viralen Infekten. Dies ist bedingt durch die

mangelnde Interaktion von T- und B-Zellen. Um diesen Effekt auszuschalten, wurden seit den siebziger Jahren Versuche unternommen, die T-Zellen, die als Hauptauslöser der GvHD gelten, aus dem Transplantat zu eliminieren. Die ersten Tierversuche wurden bereits 1968 von K. Dicke et al. (Dicke et al. 1968) durchgeführt. Er konnte bei Mäusen zeigen, dass bei lymphozytenfreien Transplantaten keine GvHD verursacht wird. 1977 wurde hier das absorbierte Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) eingeführt (Rodt et al. 1977). Damit stand erstmals eine Methode zur wirksamen T-Zell-Depletion (TCD) beim Menschen zur Verfügung (Trentin JJ et al. 1973, Rodt et al. 1981). Kurz darauf wurden die ersten monoklonalen Antikörper gegen verschiedene Epitope der T-Zellen entwickelt. Die größte Erfahrung lag mit dem so genannten CAMPATH-1 Antikörper vor, der gegen ein heterogenes 23-30kd Glycoprotein gerichtet ist, das vor allem auf Lymphozyten und Monozyten exprimiert wird (Waldmann et al. 1984). Ein Nachteil der oben genannten Methoden ist, dass die Zerstörung der Zellen von der Aktivität des Komplementes abhängig ist. Erst durch die Einführung von Immunotoxinen und immuno-magnetischen Beads gestaltete sich die in vitro T-Zell Depletion effizienter (Vartdal F et al. 1987). Um die T-Zellen aus dem Transplantat zu entfernen, wurden verschiedene Antikörper wie z.B. Anti-CD3, Anti-CD5, Anti- CD6 oder Anti-CD8 eingesetzt (Antin et al. 1991, Soiffer et al. 1992, Champlin et al 1990). Die Rate der GvHD sank mit der Depletion von CD6-positiven Zellen selbst bei HLA-unterschiedlicher Transplantation auf 18-40% (Soiffer et al. 1997; Horowitz 1990).

Leider wurde in der Folge deutlich, dass die Rate an Rezidiven der Grunderkrankung sowie an ‚graft failure‘ im gleichen Maße anstieg (Horowitz 1990). Damit war allerdings der Beweis erbracht, dass ein wesentlicher Effekt der hämatopoetischen Stammzelltransplantation nicht alleine auf der Konditionierung zur Minimierung der leukämischen Population beruht, sondern ebenso auf einem antileukämischen Effekt der übertragenen T-Zellen, welcher als Graft-versus-Leukämie (GvL) Effekt beschrieben wurde (Weiden et al. 1979; Sullivan et al. 1989).

In der Folgezeit versuchte man, die Effektorzellen von GvH und GvL zu definieren, um die GvHD von der erwünschten GvL-Reaktion trennen zu können. Die Depletion von CD4 und CD8 positiven T-Zellen aus dem Transplantat führte meist nicht zum erwünschten Erfolg. Ein Durchbruch gelang mit der zeitlichen Trennung von GvH und GvL; nach einer Transplantation mit Depletion von T-Zellen und Entstehung von Chimärismus und Toleranz wurden Spender-T-Zellen (donor-lymphocyte-transfusions: DLT) transfundiert (Kolb et al. 1990; Collins et al. 1997).

Leukämie rezidive konnten erfolgreich mit der Transfusion von Spenderlymphozyten behandelt werden. Voraussetzung ist jedoch mindestens der Zustand des gemischten Chimärismus. Der beste antileukämische Effekt wird bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) erzielt, gefolgt von der akuten myeloischen Leukämie (AML). Am schlechtesten wirken Spender-T-Lymphozyten

bei Rezidiven der ALL. Als mögliche Ursache wird neben der hohen Proliferationsrate der leukämischen Blasten die schlechte Präsentation von Antigen vermutet (Kolb 1997).

Ein für die Transplantationsimmunologie interessantes Antigen ist das CD6 Antigen, welches auf Thymozyten und auf den meisten reifen T-Lymphozyten exprimiert wird. Präklinische Versuche deuteten darauf hin, dass die Depletion von CD6 positiven Zellen aus dem Transplantat möglicherweise die GvHD verhindern kann, ohne die Reaktivität gegen virale (z.B. CMV, EBV), bakterielle Antigene und vor allem verbleibende Tumorzellen (GvL) zu beeinträchtigen (Soiffer et al. 1992). Dies hat zu einem neuen Ansatz bei der Transplantation von HLA-haploidentischen Spendern geführt. Nach der Transplantation von unmodifiziertem Knochenmark werden am Tag 6 G-CSF-mobilisierte, CD6-depletierte Blutstammzellen transfundiert, die sowohl die HvG Reaktion als auch die GvH Reaktion unterdrücken sollen.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es deshalb, die Suppression CD6 depletierter Spenderzellen in der gemischten Lymphozytenkultur (MLR) nachzuweisen und die CD6 negative Population phänotypisch zu untersuchen.

1.2 Das CD6 Antigen und sein Ligand ALCAM

Das CD 6 Antigen befindet sich etwa auf 80% der reifen T-Zellen, auf Thymozyten und bei chronisch lymphatischen Leukämien auch auf B-Zellen (Rasmussen 1994).

Es ist ein 100kDa großes Glykoprotein, das zu den Zelloberflächen-Proteinen des Typs I gehört (Whitney et al. 1995). Das CD 6 Antigen gehört zur der scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) Familie; dieser Rezeptor wird normalerweise nur auf Makrophagen und Monozyten exprimiert und dient dort als Ligand für Bakterienantigene mit konsekutiver Cytokinausschüttung (Ulevitch et al. 1995). Die extrazelluläre Domäne des CD6 Antigens besteht aus drei SRCR und aus einer 33 Aminosäuren starken Domäne (Aruffo et al. 1991).

Die Funktion von CD6 ist weitgehend unbekannt. 1995 konnten Aruffo et al. den Liganden des CD6 Antigens als ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) identifizieren (Aruffo et al. 1995) und nachweisen, dass CD6-ALCAM Interaktionen für die Bindung der CD6-positiven Thymozyten am Thymusepithel verantwortlich sind. ALCAM wird außerdem von aktivierten Leukozyten und Neuronen exprimiert und scheint eine Rolle zwischen T-Zellen und aktivierten Leukozyten zu spielen. Dabei haben Versuche gezeigt, dass das CD6 Antigen bei T-Zell Aktivierung als ein zusätzliches Molekül fungieren und eine intrazelluläre Signalkette in Gang setzen kann (Swack et al. 1991; Swack et al. 1989). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch eine Blockade des Epitops 3 des CD6 Antigens mit UMCD6 Antikörper eine antigenspezifische Immunantwort der T-Zellen auf Tetanus Toxoid inhibiert wird (Singer et al. 1996). CD6 und sein Ligand ALCAM scheinen eine immunregulierende Rolle auf T-Lymphozyten zu haben. Insgesamt ist die Funktion des CD6 Antigens und seines Liganden jedoch noch unklar.

1.3 Killer-Immunoglobulin-like-Rezeptoren (KIR)

T-Zellen und NK-Zellen haben zwei Möglichkeiten, auf ein Antigen zu reagieren. Entweder sie töten die entsprechende Zelle mittels Zytotoxizität oder sie werden am Zerstören dieser Zelle gehindert (Lanier et al. 1998). Es gibt mehrere Möglichkeiten eine T-oder NK-Zelle zu **aktivieren** (z.B. calcium-binding-C-type lectins). Ein anderer Typ von Rezeptoren **hindert** NK oder T-Zellen am Killen von normalen Zellen. Dieser Inhibitory-Receptor ist spezifisch für eine Reihe von MHC Klasse I Allelen. Beim Menschen gehören diese **Killer-Immunoglobulin-like-Rezeptoren (KIR)** zur Familie der Immunoglobulinen Superfamily. Diese Rezeptoren werden **p58.1, p58.2 und p70** genannt. Außerdem tragen die humanen NK und T-Zellen zusätzlich die sogenannten ‚C-type lectin–molecules‘ **CD94 und NKG2**. Allen KIR´s gemeinsam ist der Besitz der ‚immune receptor tyrosine based inhibitory motif‘ (ITIM). Dies ist die intrazelluläre Domäne der KIR´s, zuständig für die in diesem Falle inhibierende Signaltransduktion (Moretta et al. 1996). Falls diese KIR´s nun auf den CD 6 negativen Zellen exprimiert würden, könnten diese CD 6 negativen Suppressorzellen sowohl eine HvG als auch eine GvH Reaktion verhindern, wenn Transplantat und Patient HLA-different sind.

2. *Material und Methoden*

2.1 Material

2.1.1 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Firma</u>
Inkubationsschrank für die Zellkultur	Heraeus
Sterile Werkbank	Heraeus
Wasserbad	Grant
Mikroskop Axiowert	Zeiss
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson
Bestrahlungsanlage	Gamma Cell
Topcounter	Packard Dreieich
Cell Harvester	Packard Dreieich
Zentrifuge	Heraeus
Kühlschränke	Liebherr
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	New Brunswick
Stickstofftank für Langzeitlagerung (-196°C)	Messer Griesheim
Vortexer M25 Minishaker	IKA
Eismaschine	Ziegra
Neubauer Zählkammer	Brand
Mikropipetten:	Eppendorf
0.5ul, 2-20ul, 20-200ul, 100-1000ul	
Variopette (Stepper)	Eppendorf
Multipette 4780	Eppendorf
Super MACS-Magnetischer Seperator	Miltenyi
Handmagneten	Dynal

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einweg-Pipetten:

2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Peske OHG
Sterile Einweg-Pasteurpipetten 2ml	Peske OHG
Zellkulturflaschen: 25ml, 75ml, 150 ml	Peske OHG
Zellkulturplatten (24 Well und 6 Well)	Peske OHG
96 Well Rund und Flachbodenplatten	Peske OHG
96 Well -Spitzbodenplatten	Nunc
Sterile Serumfläschchen (60ml)	Nalgene
Pipettenspitzen (2-10ul, 10-200ul, 100-1000ul)	Peske OHG
96 Well-Unifilter Platten	Packard
96 Well-Luma-Platten	Packard
Kyroröhrchen	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15ml und 50ml)	Peske OHG
Zentrifugenröhrchen aus Polysterol (15ml)	Peske OHG
MACS-Säulen (VS/LS)	Miltenyi
Facs-Röhrchen	Peske OHG
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Macs CD-8 Isolation-Kit	Milteny
Macs CD-34 Isolation-Kit	Milteny

2.1.3 Zellkulturmedien und Reagenzien

RPMI 1640	ohne L-Glutamin (Cellconcepts, Umkirch)
PBS	Phosphate-buffered saline, ohne Calcium oder Magnesium, steril filtriert(Cellconcepts, Umkirch)
MACS Puffer	PBS + 2mM EDTA + 0,2% BSA
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin) (Sigma chemicals, Deisenhofen)

2.1.4 Zusätze von Zellkulturmedien

Penicillin-Streptomycin	1000 IU/ml (GIBCO-Life Technologies, Karlsruhe)
L-Glutamin	200 nM (100x) (GIBCO-Life Technologies, Karlsruhe)

2.1.5 Seren

FCS	Fetal calf Serum (Sigma, Deisenhofen)
Humanserum	(PAN Systems)

2.1.6 Zytokine

IL-2	Interleukin -2 (Promocell, Heidelberg)
------	---

2.1.7 Chemikalien

Ficoll-Hypaque	spezifische Dichte 1.078 g/ml, (Bicoll, Biochrom, Berlin)
Trypan Blue Solution 0,4%	0,1% verdünnt zum Gebrauch (Sigma chemicals, Deisenhofen)
³ H-Thymidine	Amersham (Life Science, Buckinghamshire, UK)
Cr-51 (Chromium)	NaCr-51, 185 mBq, (NEN Life Science, Niederlande)
DMSO	Dimethyl-sulfoxide (Sigma, Deisenhofen)
Heparin	25000 IE (Essex Pharma)
Triton X-100	5% (Sigma, Deisenhofen)
EDTA	(Sigma, Deisenhofen)
PHA-M	Phytohämagglutinin M-Form aus Ackerbohnen (Sigma, Deisenhofen)
Hämolytischer Puffer 8,3%	NH ₄ Cl, 1% KHCO ₃ , 0,0372% Mg-EDTA, pH 7,4

2.1.8 Antikörper

CD 6	Maus-anti-Human, Subtyp IgG1, Klon M-T411 (Connex, München)
CD 6 GAM	Goat- anti- mouse moAb, Klon M-T605, PE-konjugiert (Pharmingen)
CD 6 GAM	Polyklonale Goat-anti-Mouse Immunglobuline, Fitc-konjugiert, F(ab') ₂ , (Dako, Denmark)
Magnetic Beads	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
Negative control	Mouse IgG-1/Fitc, Mouse IgG1/RPE, Mouse IgG1/RPE CY-5, Klon DAK-GO1 (Dako, Denmark)
CD 3 / 4	Pe- und Fitc-konjugiert, Klon SK3, SK7, IgG-Isotyp (Becton Dickinson)
CD 3 / 8	Pe- und Fitc-konjugiert, Klon UCHT1 und DK25 (Dako, Denmark)
CD 16 / 56	Fitc- und Pe-konjugiert, Klon SK7, B73.1, My31, IgG-Isotyp (Becton Dickinson)
CD 19	Fitc-konjugiert, Klon 5J25C, IgG-Isotyp (Becton Dickinson)
CD 20	Pe-konjugiert, Klon L27, IgG-Isotyp (Becton Dickinson)
CD 34	Pe-konjugiert, Klon 8G12, IgG-Isotyp (Becton Dickinson)
CD 40	Pe-konjugiert, Klon 5C3 (Pharmingen)
CD 45	RPE-Cy5 konjugiert, Klon T29/33, IgG-Isotyp (Becton Dickinson)

2.1.9 Antikörper zur Charakterisierung der Killer Immunoglobulin-like Rezeptoren (KIR)

CD 85	Fitc-konjugiert, Klon VMP 55, IgG1 kappa (Dako, Denmark)
CD 94	PE- konjugiert, Klon HP 3B1, IgG2a (Immunotech, Marseille)
CD 161	Fitc-konjugiert, Klon Dx12 IgG-Isotyp (Becton Dickinson)
p.58.1	PE-konjugiert, Klon EB6, IgG1-Isotyp (Immunotech, Marseille)
p.58.2	PE-konjugiert, Klon GL183, IgG1-Isotyp (Immunotech, Marseille)
cyt p. 38+	Fitc-konjugiert, Klon C1.7.1, IgG1K-Isotyp(Immunotech, Marseille)
cyt p70	PE-konjugiert, Klon EB6, IgG1-Isotyp (Immunotech, Marseille)

NKG2A+ Fitc-konjugiert, Klon 20d5, IgG2a, (Becton Dickinson)

2.1.10 Zelllinie

HSB2 (Nk-sensitive T- Zelllinie) Dr. Marie Roskrow (Labor Prof.M.Brenner)

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBL)

Das für diese Arbeit verwendete Blut wurde entweder als Vollblut (50-100ml), aus der Armvene von gesunden freiwilligen Spendern entnommen oder stammte von leukozytenhaltigen Präparaten („buffy coats“) des Bayerischen Roten Kreuzes. Das Blut wurde mit sterilen Einmalspritzen entnommen, denen 0,1ml (500 IU) Heparin Novo pro 10 ml Blut beigelegt war, um ein Gerinnen des Blutes zu verhindern. Das so behandelte Blut wurde unmittelbar für die entsprechenden Experimente weiterverarbeitet.

Alle folgenden im Zusammenhang mit Zellseparation und Zellkultivierung beschriebenen Vorgänge wurden unter strikt sterilen Bedingungen vorgenommen. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mittels Ficoll-Hypaque (spezifische Dichte = 1,078) Dichtezentrifugation isoliert. Dabei wurde das Blut zunächst im Verhältnis 1:1 mit Dulbeccos-PBS verdünnt. In 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 20 ml Ficoll-Lösung vorgelegt, auf die das verdünnte Blut vorsichtig mit einer 10 ml Pipette überschichtet wurde. Nach 20- minütigem Zentrifugieren bei 800 g hat sich die mononukleäre Fraktion der Lymphozyten und Monozyten aufgrund ihrer geringen Dichte deutlich von den Erythrozyten abgegrenzt. Während letztere durch das Ficoll-Hypaque hindurch zentrifugiert wurden, bildeten die mononukleären Zellen einen deutlichen Ring, der leicht aus dem Ficoll mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette aufgenommen werden konnte. Diese Zellen wurden dann in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und im Verhältnis 1:1 mit Dulbeccos-PBS gewaschen und 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand wieder abgesaugt, das Pellet kurz aufgeschüttelt und in 10-20ml RPMI-1640 Medium aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sorgfältig durchmischt. Die Zellen wurden anschließend mit einem Hämatozytometer gezählt.

2.2.2 Zählen von Zellen

Die Anzahl lebender Zellen wurde durch Anfärben mit Trypanblau bestimmt. Lebende Zellen nehmen dabei den blauen Farbstoff nicht auf, während sich tote Zellen dunkelblau anfärben. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Das Gemisch wurde dann mehrmals durch auf- und abpipettieren gut gemischt und dann vorsichtig 10 µl der Suspension in die Zählkammer eines Neubauer-Hämatocytopeters gefüllt. Mit Hilfe eines inversen Mikroskops wurde die Anzahl der lebenden ungefärbten Zellen in den vier Zählquadranten, die in 16 Einzelquadrate unterteilt sind, gezählt. Die Zellkonzentration pro ml und die Gesamtzellzahl pro Probe wurde wie folgt ermittelt:

$$\frac{\text{Gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{4} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

4

2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden in einem totalen Volumen von $1-2 \times 10^7$ /ml in 1 ml Einfriermedium pro Kyroröhrchen eingefroren. Das Einfriermedium (90 % FCS und 10 % DMSO) und die Kyrorgefäße wurden vor dem Einfrieren auf schmelzendem Eis gekühlt. Die Zellen wurden in 50- oder 15 ml Zentrifugenröhrchen mittels Zentrifugieren pellettiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet aufgeschüttelt und ebenfalls auf schmelzendem Eis gekühlt. Anschließend wurde das kalte Einfriermedium vorsichtig zu den Zellen gegeben, wobei durch leichtes Schütteln des Röhrchens die Zellen möglichst gleichmäßig mit dem Einfriermedium durchmischt wurden.

Aus dieser Zellsuspension, die auch weiterhin auf Eis gekühlt blieb, wurde jeweils 1 ml in die zuvor ebenfalls gekühlten und beschrifteten Kyroröhrchen gefüllt. Diese wurden dann sofort in eine Spezial-Einfrierbox überführt, bei -80°C für 24 Stunden gelagert und anschließend zur Langzeitkryokonservierung in Behälter mit flüssigem Stickstoff transferiert.

2.2.4 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden 6 ml 37 °C warmes RPMI-1640 + 20 % FCS als Auftaumedium verwendet und in 15 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die Kryogefäße wurden direkt aus dem Behälter mit flüssigem Stickstoff geholt und sofort für kurze Zeit in ein Wasserbad von 37 °C zum Auftauen gebracht. Dabei war zu beachten, dass nicht der gesamte Inhalt des Gefäßes auftaut, sondern sich noch ein kleines gefrorenes Klümpchen im Inneren des Gefäßes befindet.

Ein ml des Auftaumediums wurde nun vorsichtig mit einer Pasteurpipette in das Kryogefäß pipettiert und dabei auch das letzte Klümpchen zum Auftauen gebracht. Die Zellsuspension wurde dann, mit Hilfe der Pasteurpipette tropfenweise in das 15 ml- Zentrifugenröhrchen überführt, das währenddessen leicht geschüttelt wurde. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und dann in ein geeignetes Volumen Komplett- Medium aufgenommen und für weitere Experimente verwendet.

2.2.5 Färbung mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern

Zur Charakterisierung der Zellen mittels direkter Immunfluoreszenz wurden die in Kapitel 2.1.8 und 2.1.9 aufgelisteten monoklonalen Antikörper verwendet, die entweder mit Fluorescein-isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE) oder PE-Cy5 direkt markiert wurden. Indirekt markiert wurde der CD6 Antikörper mit Goat-anti-mouse FITC (GAM-FITC).

Das Anfärben der Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

- Ernten der Zellen durch sorgfältiges Abpipettieren der Zellen vom Plattenboden unter Zuhilfenahme einer Plastikpipette und Transferieren in ein Zentrifugenröhrchen.
- Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen.
- Aufnehmen des Pellets in einer geeigneten Menge von FACS Puffer und Verteilen von jeweils 100 µl der Zellsuspension in FACS-Analyse-Teströhrchen (FACS-tubes) pro Färbung.
- Zugabe von jeweils 2-3 µl des FITC und des PE-konjugierten Antikörpers (moAb).
- Inkubieren der Teströhrchen im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
- Zugabe von 80 µl FACS-Puffer und Zentrifugieren für 5 Min. bei 400 g.

- Verwerfen des Überstandes und erneute Zugabe von 800 µl FACS-Puffer. Zentrifugieren für 5 Min. bei 400 g.
- Aufnahme des Pellets in 500 µl FACS-Puffer und Analyse der Oberflächenmarker in der Durchflußzytometrie.

2.2.6 CD 6 Depletion von Zellen aus dem KM und PBSC mittels Antikörper

Aus den in der Klinik von gesunden Spendern entnommenen Zellpräparaten (PBSC oder KM) wurden mittels Ficoll-Isopaque Lymphozyten gewonnen und mit Inkubationspuffer auf 1×10^8 Zellen pro ml eingestellt. Dann wurden 10-20 µg/ml des CD-6 Antikörpers MT-411 dazugegeben. Das Zell-Antikörpermischung wurde 30 Minuten auf eine Schaukel im Kühlhaus inkubiert. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Suspension nach der Inkubation zweimal mit Waschpuffer bei 400 g gewaschen und anschließend in 5 ml Inkubationspuffer re-suspendiert. Zu je 1×10^6 MNC wurden 1×10^7 Magnetic Beads (M-450) (Fa. Dynal, Hamburg), die mit einem Antikörper gegen Mäuse –Ig beladen sind, dazugegeben. Die Beads wurden zuvor zweimal mit Waschpuffer gewaschen.

Das Zell-Beads-Gemisch wurde für 30 Minuten unter mehrmaligem Schütteln bei 4°C inkubiert. Danach wurde das Zellgemisch über einen Magneten gelegt. Nach fünf Minuten wurde das nicht an den Magneten gebundene Zellgemisch in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Diese negative Zellfraktion wurde einmal 10 Minuten bei 500 g gewaschen, der Überstand verworfen und der Zellknopf in 2 ml resuspendiert.

Nach dem Zählen der Zellen wurden, um die Depletionsrate zu erhöhen, die magnetischen Beads in der gleichen Konzentration ein zweites Mal dazugegeben.

Periphere Blutstammzellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, um die Antikoagulantien zu eliminieren, dann wurde weiter wie oben beschrieben verfahren.

2.2.7 Anreicherung einer CD 8⁺ Zellpopulation

Dieses Verfahren wurde anhand des Protokolls von „MACS CD 8⁺ T Cell Isolation Kit“ (Miltenyi) durchgeführt. Dafür wurden die CD 6 depletierten Zellen auf 80 µl pro 1×10^7 Zellen eingestellt. Dazu wurden 20 µl pro 1×10^7 Zellen des Hapten-Antibody- Cocktails dazugegeben. Dieser Antikörper enthält verschiedene Hapten-konjugierte Antikörper (CD4, CD11b, CD16,

CD19, CD36 und CD56). Nach Inkubation für 10 Minuten bei 4°C wurde das Antikörper-Zellgemisch zweimal gewaschen und wieder auf 80µl pro 1×10^7 Zellen eingestellt.

Jetzt wurden 20µl Macs Anti-Hapten MicroBeads pro 1×10^7 Zellen dazugegeben.

Nach gutem Durchmischen und 15 Minuten Inkubation bei 4°C., wurden die Zellen zweimal gewaschen und das verbliebene Zellpellet in 500 µl pro 1×10^8 Zellen aufgelöst.

Diese Zellsuspension wurde in eine vorher mit MACS-Puffer befeuchtete VS+ MACS-Säule gegeben. Die an einen Magneten (Super MACS) befestigte VS+ Säule enthält feine Stahlwolle, an die sich die Anti-Hapten MicroBeads magnetisch binden.

Die durchlaufende Zellfraktion wurde in einem Röhrchen gesammelt und stellte die hochangereicherte $CD\ 8^+$ -Fraktion dar. Um eine möglichst hohe Ausbeute an separierten Zellen zu bekommen, wurde diese noch viermal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen.

Um die $CD8^-$ Fraktion zu erhalten, wusch man die magnetische Säule außerhalb des Magnetfeldes zwei- bis dreimal mit MACS-Puffer.

2.2.8 $CD\ 34^+$ Anreicherung mit MACS Cell- Isolation- Kit

Um auch ein Proliferationsassay mit $CD\ 34^+$ Zellen durchführen zu können, mussten diese angereichert werden (Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec). Da dies nach dem gleichen Prinzip wie die $CD\ 8^+$ -Anreicherung erfolgte, wird dieses Verfahren nur stichpunktartig wiedergegeben.

- MNC wurde aus Knochenmark bzw. Stammzellen mit Hilfe von Ficoll-Paque gewonnen.
- 100 µl FcR- Blocking Reagents pro 1×10^8 Zellen wurden zur Zellsuspension gegeben, um unspezifisches Binden der CD34 MicroBeads zu nicht Zielzellen zu verhindern.
- 100 µl CD 34 MicroBeads pro 1×10^8 Zellen wurden hinzugefügt, gut gemischt und für 30 Minuten in den Kühlschrank bei 4°C inkubiert.
- Waschen der Zellen und Auflösen in 2×10^8 Zellen pro ml.
- Magnetische Separation in einer VS+ MACS-Säule wie unter „Anreicherung einer $CD\ 8^+$ Zellpopulation“ beschrieben.
- Überprüfung der Anreicherung durch FACS-Analyse.

2.2.9 Gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR = mixed lymphocyte reaction)

Die gemischte Lymphozytenkultur (MLR = mixed lymphocyte reaction) dient zum Nachweis der T-Zell vermittelten Immunität. Ursprünglich wurde dieses Experiment als Modell für Transplantatabstoßung entwickelt.

Bestrahlte Lymphozyten einer Person (= Stimulatorzellen) werden mit unbestrahlten Lymphozyten einer anderen Person (= Responder-T-Zellen) zusammengemischt. Sind Spender und Empfänger in ihren HLA-Antigenen unterschiedlich, dann werden die T-Zellen in der Lymphozytenkultur des Empfängers zur Proliferation angeregt, weil sie gegen diese HLA-Antigene reagieren und entwickeln sich durch die resultierende Zytokinproduktion zu Killerzellen.

Um nun die Suppressor-Aktivität der CD 6⁻ Zellpopulation nachzuweisen, wurde bestrahltes CD 6⁻ depletiertes Knochenmark (bzw. Stammzellen) eines gesunden Spenders, zum obigen Testsystem dazugegeben.

Die T-Zell-Proliferation wird durch den Einbau von ³H-Thymidin in die proliferierenden Zellen und anschließende Messung der inkorporierten Radioaktivität nachgewiesen (Crumpton und Owen 1987).

Die Stimulator- und Responderzellen wurden aus frischem Spenderblut gewonnen. Nach der Isolation der MNC über den Ficoll Gradienten wurden die Zellen gewaschen und gezählt. Um die B- von den T-Zellen zu trennen, wurde eine mit Nylonwatte gestopfte und sterilisierte 2ml Spritze mit RPMI 1640 zweimal gespült und dann bei 37° C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Lymphozyten auf 1×10^7 eingestellt und auf die erwärmte Wattersäule gegeben.

Die Spritze wurde wasserdicht verschlossen und bei 37° C für 30 Minuten inkubiert. Die nicht haftenden T-Lymphozyten wurden mit 10 ml erwärmten RPMI 1640 in ein beschriftetes Zentrifugenröhrchen ausgespült. Es wurde solange gespült, bis die Flüssigkeit klar war. Die getrennten T-Lymphozyten wurden bei 110 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 3ml RPMI 1640 resuspendiert. Die Reinheit der T-Zellen wurde durch Markierung mit einem anti-CD3-Antikörper in der FACS-Analyse evaluiert.

Für den Ansatz in der MLR wurden die nicht bestrahlten *Responder* T-Zellen auf 1×10^6 /ml eingestellt und 100 µl (= 1×10^5 Zellen) in 96-Well-Spitzbodenplatten gesät. Die Antigen-präsentierenden *Stimulatorzellen* wurden bestrahlt (36 Gy) und in verschiedenen Mengenverhältnissen in Dreier-Gruppen (Triplicates) zu den nicht bestrahlten T-Zellen gegeben. Zusätzlich wurden 1×10^5 Zellen des depletierten Knochenmarks dazugegeben. Die Knochenmarkszellen wurden vorher, um eine Proliferation dieser Zellen zu verhindern, mit 18 Gy bestrahlt.

Als negative Kontrolle wurden die T-Zellen alleine, also ohne Knochenmark verwendet, als positive Kontrolle wurde undepletiertes Knochenmark zu den Empfänger- und Stimulatorzellen gegeben.

Nach 6 Tagen in Kultur wurde 1μ Ci von Methyl-(3H)Thymidin der Kultur zugegeben und für weitere 18 Stunden inkubiert. Nur sich replizierende T-Zellen konnten das Methyl-(3H)-Thymidin in ihre DNA einbauen.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die (3H)Thymidin-markierten Zellen in den 96-Well-Rundbodenplatten mit Hilfe eines FilterMate™ Cell Harvester auf speziell entwickelte Uni-Filterplatten transferiert und die Aufnahme des Thymidins wurde als emittierende β -Strahlung im Liquid-Scintillation-Verfahren mit Hilfe eines Packard Topcounters quantifiziert. Als Maß für die Proliferation wurden Counts per Minute (CPM) angegeben, welche die Menge des eingebauten Thymidins repräsentieren.

3. Eigene Ergebnisse

3.1 Phänotypische Analysen

3.1.1 Phänotypische Analyse der Zellen vor und nach CD 6 Depletion bei Knochenmark und peripheren Stammzellen

Die entscheidende Frage ist zuerst einmal, welche Zellen sich in der CD 6-negativen Fraktion befinden, die eventuell für einen Suppressoreffekt verantwortlich sind. Dafür wurden verschiedene Proben von Knochenmark und peripheren Stammzellen nach oben genannten (siehe Kapitel 2.2.6) Verfahren CD 6 depletiert.

Die Proben wurden vor und nach der Depletion entnommen, mit verschiedenen Antikörpern versetzt und in der Durchflusszytometrie ausgewertet.

Zunächst einmal ein Blick auf die Aufteilung der Zellen bei gesundem undepletierten Knochenmark. Der Anteil der CD3-positiven T –Zellen, der CD3-negativen NK-Zellen, der CD34-positiven hämatopoetischen Stammvorläuferzellen, der CD14-hochpositiven und CD45 niedrigpositiven Monozyten, der CD14 und CD45 hochpositiven Lymphozyten und der CD14 und CD45 niedrig-positiven Granulozyten wurde bestimmt.

	CD3 ⁺ / CD4 ⁺	CD3 ⁺ / CD8 ⁺	CD3/ CD15/56 ⁺	CD34 ⁺	CD14 high/ CD45 low	CD14high/ CD45 high	CD14 low/ CD45 low	CD 6 ⁺	CD19 ⁺ /20 ⁺
Mittelwert	15,2%	8,02%	2,01%	3,26%	6,76%	30,77%	34,84%	24,54%	4,86%
Standardabw.	8,09	5,35	1,56	0,73	0,03	8,5	7,8	7,04	3,56
Min	9,89%	2,56%	1,25%	1,14%	3,92%	20,67%	23,58%	15,63%	2,41%
Max	21,4%	13,7%	2,97%	5,10%	12,17%	44,21%	49,16%	36,96%	7,56%
Anzahl der Versuche	10	10	10	10	9	9	9	10	5

Tabelle 3.1: Aufteilung der Zellfraktionen im Knochenmark vor Depletion

Der Anteil der CD 6+ Zellen im Knochenmark beträgt bei 10 Proben etwa 25%.

Im Vergleich zum peripheren Blut liegt der Anteil der aufgelisteten Zellen im Knochenmark niedriger.

Weiter sieht man, dass im Knochenmark mehr Granulozyten (34% zu 20%) und weniger reife Lymphozyten (30,7% zu 45%) als im peripheren Blut vorkommen, also eine Linksverschiebung zu beobachten ist.

Fraktion	CD3+/ CD4+	CD3+ /CD8+	CD3-/ CD16/56+	CD19/ CD20+	CD14- /CD45high	CD14 low/CD45 low	CD14high/ CD45low
Prozent	45%	20%	5%	10%	45%	20%	5%

Tabelle 3.2: Verteilung der Zellfraktionen im peripheren Blut nach Janeway

Das nächste Diagramm (Diagramm 3.1) stellt die Zellverteilung noch einmal übersichtlich dar.

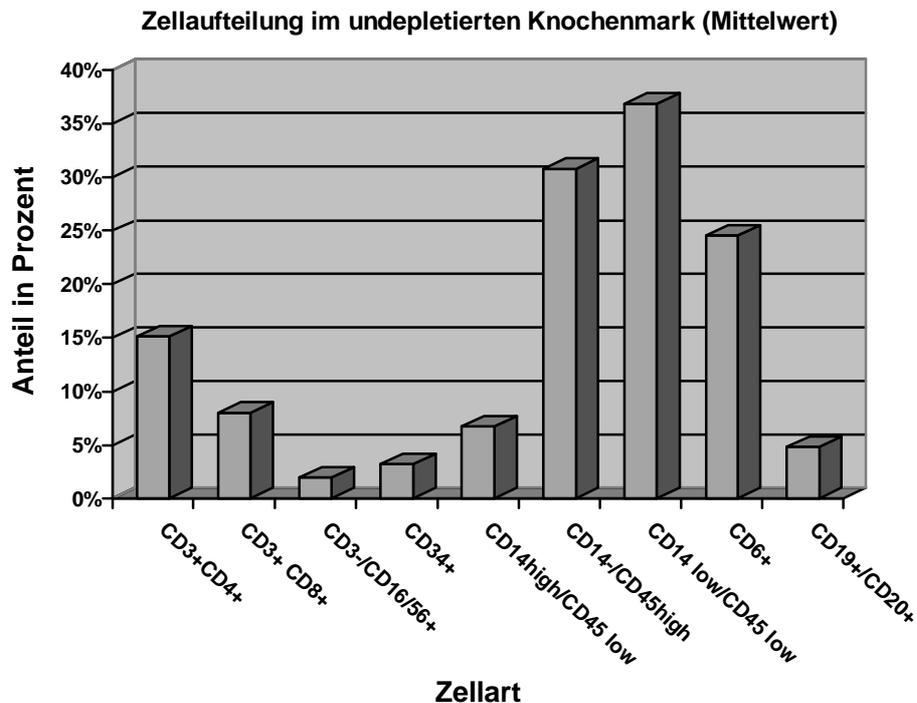


Diagramm 3.1: Zellaufteilung im undepletierten Knochenmark

Ähnlich stellen sich die Verhältnisse in G-CSF mobilisierten peripheren Stammzellpräparationen dar. Auch hier wurde vor Depletion mittels Durchflußzytometrie die Zellpopulation phänotypisch untersucht.

Es ist kein großer Unterschied zur CD6 -Population im Knochenmark festzustellen. Die CD 6 positiven Zellen liegen auch hier bei etwa 25 %.

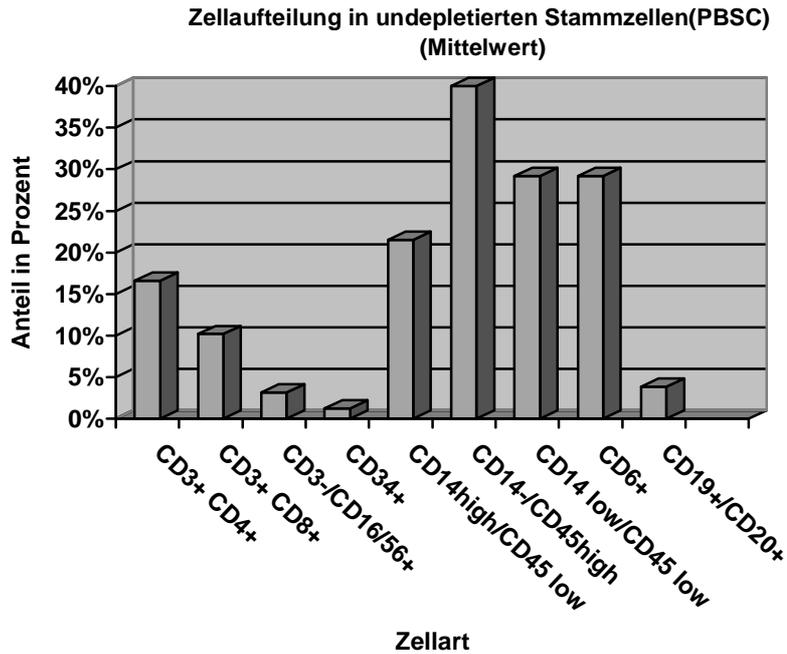


Diagramm 3.2 : Zellaufteilung in mobilisierten Stammzellen (PBSC) vor Depletion (n=4)

Um nun zu sehen, welche Zellen nach CD 6 Depletion noch vorhanden sind, wird die Zellpopulation nach erfolgter Depletion phänotypisch und quantitativ untersucht und mit dem Ausgangswert verglichen. Bei folgender Versuchsreihe wurden nur Proben genommen bei der die Depletionsrate unter 10% und der Zellverlust unter 50% lag.

Um die Zahlen zu vergleichen wurde der Begriff Recovery eingeführt; er gibt an wieviel Prozent der Zellen nach Depletion noch vorhanden und damit CD 6 negativ sind:

$$\frac{\text{Zellzahl nach Depletion}}{\text{Zellzahl vor Depletion}} \times 100 = \text{Recovery in \%}$$

	Mittelwert Recovery KM (n=10 bzw .8)	Mittelwert Recovery PBSC (n=5)
CD 3+/CD4+	0,91%	1%
CD3+/CD8+	6,68%	5%
NK-zellen (CD3-/CD16/56+)	46%	41%
CD34+	60%	83%
Monozyten (CD14high/ CD45 low)	70,25%	n.d.
Lymphozyten (CD14 low/CD45 high)	19,08%	n.d.
Granulozyten CD14low/CD45low	59,96%	n.d.
CD6+	4,87%	3%

Tabelle 3.3: Recovery der MNC von Knochenmark und PBSC nach CD6-Depletion

An obiger Tabelle erkennt man, dass praktisch alle T-Helferzellen (CD3+/CD4+) auch CD6 positiv sind, da nach Depletion fast keine CD3+/CD4+ Zellen mehr vorhanden sind. Die T-Killer-Zellen (CD3+/CD8+) sind immerhin noch mit 6,68% nach CD 6 Depletion zu finden. Etwa 20% aller Lymphozyten (CD14 low/CD45 high) sind CD6-positiv.

Hingegen scheint die Depletion keinen größeren Einfluss auf die Zellpopulationen der Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen und Stammzellen zu haben.

Allerdings konnten wir mit der Methode die CD6-positiven Zellen nicht vollständig depletieren.

3.1.2 Untersuchung der CD3/CD4 positiven und der CD3/CD8 positiven Zellfraktion

Die oben aufgeführten Tabellen zeigen, dass das CD6 Antigen auf allen CD4-positiven T-Zellen, aber nicht auf allen CD8 positiven T Zellen vorhanden ist. Um die CD 6 positive Population besser zu charakterisieren, wurden Doppelmarkierungen für die phänotypische Analyse durchgeführt.

Der Anteil der CD6 positiven mononukleären Zellen im unbehandelten Knochenmark betrug zwischen 18,7% und 24,3 %. Etwa 90 – 95% der CD6-positiven Zellen waren auch CD3-positiv. Dieses wurde anhand von 3 Knochenmarkproben ermittelt (Tabelle 3.4).

<i>Patient</i>	<i>CD6+</i>	<i>CD6+/CD3+</i>	<i>CD6+/CD4+</i>	<i>CD3+/CD4+</i>	<i>CD3+/CD8+</i>
B.B.	24,34%	22,81%	n.d.	13,99%	7,11%
S.C.	20,70%	18,18%	11,12%	12,00%	8,71%
O. K.	18,73%	17,01%	n.d.	15,04%	2,56%

Tabelle 3.4: Immunphänotypische Untersuchung von Knochenmark vor der CD6 Depletion

Unter Berücksichtigung der schwierigeren Methode der Knochenmarksuntersuchung kann man wie folgt zusammenfassen.

Zusammenfassung:

- **Die CD 6 positiven Zellen des Knochenmarks sind zu mehr als 90% positiv für CD3 und stellen somit vor allem T-Zellen dar.**

3.1.3 Charakterisierung der CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻ Zellen im unbehandelten KM bzw. PBSC

Bei der Untersuchung des Knochenmarks und in mobilisierten Blutpräparationen haben wir zudem den Anteil der CD4 und CD8 negativen CD3-positiven Zellen sowie der CD4/CD3 positiven und CD8/CD3-positiven Zellen in einer Dreifachmarkierung versucht darzustellen. Die CD3-positiven Zellen, die für CD4 und CD8 negativ sind (Doppelnegative) sind Kandidaten für Suppressorzellen, die Toleranz induzieren können. Allerdings waren diese in Knochenmark und Blutpräparaten mit 0,4 bis 1,9 % eine geringe Minderheit. Hingegen waren die CD3-positiven T-Zellen, die entweder für CD4 oder CD8 positiv waren in der erwarteten Frequenz vorhanden.

	CD3⁺/CD4⁻/ CD8⁻	CD3⁺/CD4⁺/ CD3⁺/CD8⁺
D.H. KM	0,97%	26,61%
D.M.KM	1,24%	n.d
V.E.PBSC	0,59%	34,31%
F.O.PBSC	0,42%	30,11%
O. KM	0,51%	n.d
S.C.KM	1,28%	18,82%
B.B. KM	1,90%	21,58%
Mittelwert	0,99%	26,29%
Standardabw.	0,53%	6,26%
Min	0,42%	18,82%
Max	1,90%	34,31%

Tabelle 3.5: Charakterisierung der CD3⁺ /CD4⁻ / CD8⁻ Zellen

Im folgenden FACS-Bild sieht man die doppelt negativen T-Zellen in dem linken oberen Quadranten.

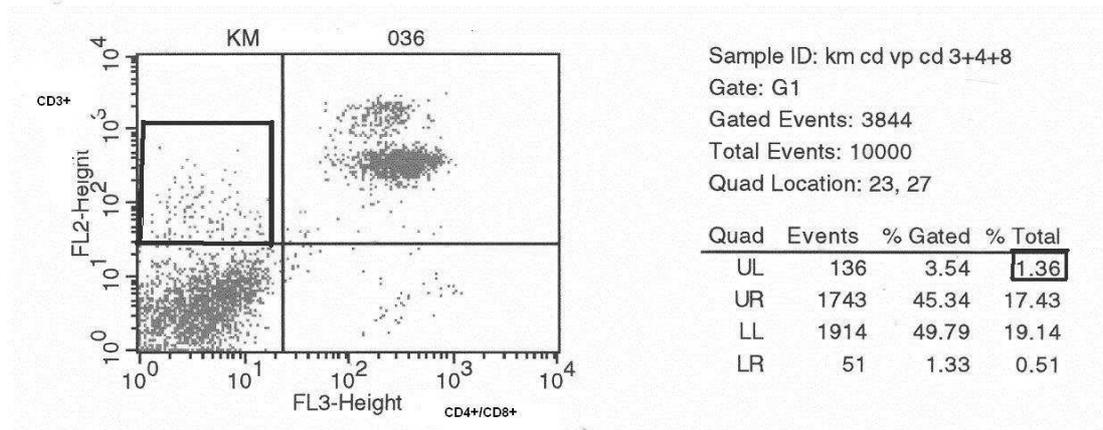


Abbildung 3.1: Die gesuchte $CD3^+/CD4^-/CD8^-$ Population ist **links oben** eingrahmt

Um nun zu sehen, ob die $CD3^+/CD4^-/CD8^-$ Zellfraktion auch positiv für CD6 ist, wurde überprüft, wie viele dieser Zellen nach der Entfernung der CD6 positiven Zellen noch vorhanden sind (Tabelle 3.6).

	$CD3^+/CD4^-/CD8^-$	$CD3^+/CD4^+/CD8^+$
D.H. KM	0,20%	1,08%
D.M. KM	n.d	n.d
V.E.PBSC	0,20%	5,68%
F.O.PBSC	0,01%	0,24%
O. KM	0,46%	n.d
S.C. KM	1,02%	1,18%
B.B. KM	1,00%	0,66%
Mittelwert	0,48%	1,77%
Standardabw.	0,39%	2,21%
Min	0,01%	0,24%
Max	1,02%	5,68%

Tabelle 3.6: $CD3^+/CD4^-/CD8^-$ Zellfraktion nach Depletion

Man sieht an der niedrigen Prozentzahl der $CD3^+/CD4^+/CD8^+$ Zellen nach CD6 Depletion, dass diese Fraktion CD 6 positiv ist. Die Werte für die $CD3^+/CD4^-/CD8^-$ sind nicht so eindeutig. Da die Häufigkeit dieser Zellen vor Depletion bei einem Prozent lag und nach Depletion ein halbes Prozent beträgt, ist hier nur schwer eine Aussage zu treffen, ob diese Zellen das CD6 Antigen

tragen oder nicht. Es könnte entweder am Zellverlust liegen, der bei jeder Depletion auftritt oder aber dieser Wert liegt bereits im Fehlerbereich der FACS Analyse.

Zusammenfassung:

- Die CD6 positiven Zellen, die negativ für CD4 und CD8 sind, liegen mit 0,99 bzw. 0,48% unter der Nachweisgrenze der hier eingesetzten Methode

3.1.4 Charakterisierung der CD 8+ Zellen

Bei der Doppelmarkierung von Knochenmark mit CD3 (mit Cy 5) und CD8 (mit PE) findet man eine geringe Anzahl von Zellen, die CD8-positiv, aber CD3-negativ sind (im linken oberen Quadranten).

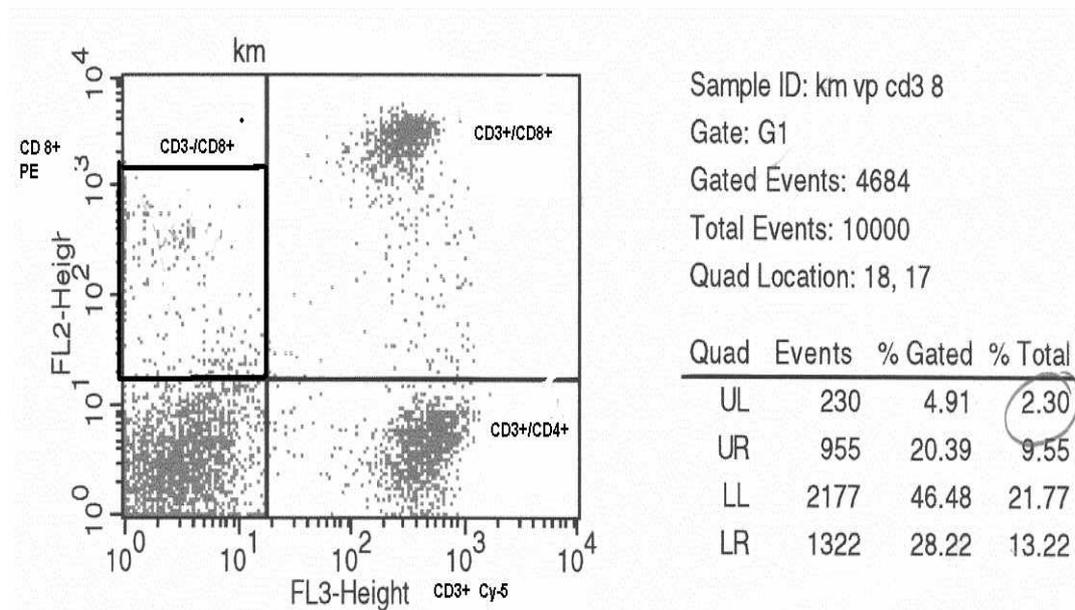


Abbildung 3.2: Eine CD3-/CD8+ Zellpopulation befindet sich im linken oberen Quadranten vor Depletion (2.30% of Total).

Diese Untersuchung wurde bei 12 Patienten durchgeführt, wobei in 8 Fällen Knochenmark und in 4 Fällen Stammzellen untersucht wurden. Dabei ergab sich folgendes Bild:

	Vor Depletion	Nach Depletion
	CD3-/CD8+	CD3-/CD8+
S.Ä. PBSC	3,35%	1,01%
R.S. KM	1,12%	1,39%
H.O. PBSC	4,61%	5,51%
F.O. PBSC	2,14%	0,89%
O. KM	0,36%	0,23%
S.C. KM	0,81%	0,63%
M.E. KM	0,17%	0,17%
S.R. KM	2,30%	2,71%
A.R. KM	0,54%	0,90%
S.W. KM	0,92%	0,68%
R.H.PBSC	1,19%	1,04%
S.O. KM	1,36%	1,02%
Mittelwert	1,57%	1,35%
Min	0,17	0,17%
Max	4,61%	5,51%
Standardabw.	1,32%	1,46%
Range	0,17-416%	0,17-5,51%
	N=12	N=12

Tabelle 3.7: CD3-/CD8+ Zellfraktion vor und nach Depletion.

Mit 1,57 % (Mittelwert) liegt der Wert für die CD3-/CD8+ Zellen vor CD6 Depletion bei 12 Patienten niedrig. Nach CD 6 Depletion sind im Durchschnitt immer noch 1,35% der CD3-/CD8+ Zellen wieder zu finden (Tabelle 3.7).

Auch nach CD 6 Depletion sind noch 1,35% der CD3-/CD8+ positiven Zellen zu finden.

Also sind 85% dieser Zellen CD6 negativ, sonst wären sie nach Depletion noch im Knochenmark bzw. in den peripheren Stammzellen (PBSC) vorhanden.

Die beschriebene Population ist also **CD3-, CD6-und CD8+** Dies bedeutet, dass es nach CD 6 Depletion eine CD8 positive Zellfraktion von 1,57 % gibt, die keine T-Zellen sind (CD3-).

Um herauszufinden ob diese Zellpopulation einen Suppressoreffekt aufweist, wurden verschiedene Proliferationsassays durchgeführt (Kapitel 3.2).

Zusammenfassung:

- Es gibt eine CD3⁻/CD8⁺ Zellpopulation von 1,57%, die für CD6 negativ ist

3.1.5 Phänotypische Analyse der CD6 Expression auf CD 34⁺ Stammzellen

Periphere Stammzellen kommen im normalen Blut in einer nur sehr geringen Konzentration von 0,01% vor. Durch die Mobilisation mit G-CSF (Granulozyten- Colony Stimulating Factor) werden die Stammzellen in das Blut geschwemmt und können mit Hilfe von Apheresen gewonnen werden.

In der folgenden Untersuchung handelt es sich **jedoch** um Knochenmark, das im Durchschnitt etwa 3,26% Stammzellen enthält. Um zu sehen, ob diese Zellen eventuell CD6 positiv sind, werden sie in der Durchflusszytometrie doppelt markiert (CD6 und CD34).

	CD6 ⁺ /CD34 ⁺ vor Depletion	CD6 ⁺ /CD34 ⁺ nach Depletion
KM	0,01%	0,01%

Tabelle 3.8: Anzahl der CD6⁺/CD34⁺ Zellen im Knochenmark in Prozent(n=10)

Die Stammzellen tragen also kein CD 6 Antigen und sind damit CD6 negativ. Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, beträgt die Recovery, also der Prozentsatz der CD34-Zellen, die nach CD6 Depletion immer noch vorhanden sind, 60% (Knochenmark) bzw. 83% (PBSC). Der Verlust von 40% bzw. 17% der CD 34 dürfte am ehesten unspezifisch durch die Zellseparation zu erklären sein, da die CD 34 Zellen für CD6 negativ sind (Doppelmarkierung CD6/CD34). Der unspezifische Zellverlust bei CD6 Depletionen beträgt im Durchschnitt etwa 56% (n=10).

3.1.6 Untersuchung des Knochenmarks bzw. PBSC auf Killer-Immunoglobulin-like Receptor (KIR)

Die Abstossung des Transplantates kann grundsätzlich von T-Zellen und NK-Zellen vermittelt werden. Während die Abstossung durch T-Zellen antigen-spezifisch erfolgt, wird sie von NK-Zellen auch ohne Erkennen spezifischer Histokompatibilitätsantigene erreicht. Ähnlich wie T-Zellen können sie durch Moleküle auf der Zielzelle aktiviert werden (z.B. calcium-binding-C-type lectins), sie werden aber vorwiegend über **Killer-Immunoglobulin-like Receptor (KIR)** an der Zytotoxizität gegen eigene Zellen gehemmt, solange diese eigene HLA-assoziierte Moleküle exprimieren. Die KIR's gehören zur Immunoglobulin-gene Superfamily, zu denen die Rezeptoren **p58.1, p58.2 und p70** gehören, außerdem die sogenannten C-type lectin-molecules; **CD94 und NKG2**, die auf humanen NK und T-Zellen exprimiert werden. Allen KIR's gemeinsam ist das Immunreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM), das intrazellulär für die inhibierende Signaltransduktion zuständig ist.

Es stellt sich nun die Frage, ob diese KIR's auch auf Zellen der CD6 negativen Fraktion des Transplantates vorhanden sind.

Wir untersuchten zunächst die CD 3 positive Lymphozytenpopulation auf die Expression von KIR's **p58.1, p58.2, p70, CD94 und NKG2**. Die Zellen wurden jeweils mit einem CD3 Antikörper und einem KIR Antikörper markiert und in der Durchflußzytometrie analysiert (Tabelle 3.9).

	CD3+/CD94	CD3+/p58.1+	CD3+/p58.2	CD3+/NKG2A	CD3+/p70
SCH. KM	1,55%	0,04%	0,26%	1,82%	n.d
S.W. KM	1,08%	0,15%	0,39%	n.d	0,02%
R.H.PBSC	0,38%	0,09%	0,30%	n.d	0,13%
A.R.KM	1,32%	0,17%	0,23%	n.d	n.d
Mittelwert	1,08%	0,11%	0,30%	1,82%	0,08%
Standardabw.	0,5	0,05	0,06	n.e	n.e
Min	0,38%	0,04%	0,23%	n.e	n.e
Max.	1,55%	0,17%	0,39%	n.e	n.e

Tabelle 3.9: Häufigkeit in % der KIR's vor Depletion

Wie in Tabelle 3.9 zu sehen, sind die KI-Rezeptoren auf den Lymphozyten gering ausgeprägt, da sie alle unter 2% liegen.

Dennoch haben wir die Verteilung der KIR´s nach CD6 Depletion untersucht.

Nach Purge	CD3/CD94	CD3+/p58.1+	CD3+/p58.2	CD3+/NKG2A	CD3+/p70
SCH.KM	0,14%	0,04%	0,05%	0,83%	n.d
S.W. KM	0,28%	0,13%	0,10%	n.d	0,04%
R.H. PBSC	0,16%	0,09%	0,20%	n.d	0,03%
A.R.KM	0,44%	0,06%	0,09%	n.d	n.d

Nach Purge	CD3/CD94	CD3+/p58.1+	CD3+/p58.2	CD3+/NKG2A	CD3+/p70
Mittelwert	0,26%	0,08%	0,11%	0,83%	0,03%
Standardabw.	0,13	0,03	0,06	n.e	n.e
Min	0,14	0,06%	0,05	n.e	n.e
Max.	0,44	0,13%	0,2	n.e	n.e

Tabelle 1 3.10: Häufigkeit der KIR´s nach Depletion

In Tabelle 3.10 sieht man, dass die Zellen nach CD 6 Depletion noch weniger Killer-Immunoglobulin-Rezeptoren an ihrer Oberfläche exprimieren (max.0.83%). Somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass diese Zellen ähnlich wie NK-Zellen gehemmt werden.

Mit Dreifachmarkierungen untersuchten wir Untergruppen von T-zellen wie **CD3+/CD6/p70**, **CD3+/CD56+/p70** und **CD3+/CD8+/p70** (Tabelle 3.11).

Vor Purge	CD3+/CD6+/p70	CD3+/CD56+/p70	CD3+/CD8+/p70
SCH.KM	0,02%	0,05%	0,06
A.R. KM	0,10%	n.d	0,20%

Tabelle 3.11: Dreifachmarkierung mit CD3+-Zellen und KIR´s vor Depletion

Nach Purge	CD3+/CD6+/p70	CD3+/CD56+/ p70	CD3+/CD8+/p70
SCH. KM	0,02%	0,02%	0,02%
A.R. KM	0,10%	n.d	0,19%

Tabelle 3.11: Dreifachmarkierung mit CD3+-Zellen und Kir´s nach Depletion

Vor und nach Depletion ließen sich keine KIR´s auf den CD3-positiven Zellen nachweisen, das betrifft CD6-positive T-Zellen, CD3+/CD8+ T-Zellen wie auch CD56-positive NK-T Zellen.

Schließlich wurden die Zellen von vier gesunden Probanden auf Killer Cell Activatory Receptors (KARS) untersucht. Dieser Rezeptor befindet sich auf NK-Zellen und auf T-Zellen.

vor Purge	CD3+/cytp38+	CD3-/cytp38+
SCH.KM	4,82%	4,93%
A.R. KM	2,74%	3,82%
S.W.KM	3,97%	2,62%
R.H.PBSC	4,02%	3,82%
Mittelwert	3,89%	3,80%
Standardabw.	0,85	0,94
Min	2,74%	2,62%
Max.	4,82%	4,93%

Tabelle 3.12: Häufigkeit von KAR's vor Depletion

Ein Vertreter dieser KAR's ist **p38**. Auch dieser Rezeptor arbeitet intrazellulär mit dem **Immunreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)**. Wenn die NK-Zelle nun an eine Target Zelle bindet und KAR's aktiviert sind, werden zytotoxische Granula freigesetzt, die die Zielzelle zerstören können. KAR-aktivierte Spenderzellen, T-Zellen und NK-Zellen, können Zellen des Empfängers zerstören und damit die Abstossung verhindern, im Falle von T-Zellen aber auch Graft-versus-Host Reaktionen auslösen.

Vor der CD6-Depletion waren im Mittel etwa jeweils 3,8% der CD3-positiven T-Zellen wie der CD3-negativen Zellen für den KAR cyt p38 positiv. Für die Bedeutung der KAR auf Spenderzellen ist natürlich die getrennte Betrachtung von T-Zellen und CD3-negativen Zellen entscheidend.

nach Purge	CD3+/cytp38+	CD3-/cytp38+
SCH.KM	0,91%	4,51%
A.R. KM	0,95%	5,26%
S.W.KM	0,44%	2,37%
R.H.PBSC	0,98%	2,68%

Nach Purge	CD3+/cytp38+	CD3-/cytp38+
Mittelwert	0,82%	3,71%
Standardabw.	0,33	1,46
Min.	0,44	2,37
Max.	0,98	5,26

Tabelle 3.13:Häufigkeit von Kar's nach Depletion

Offensichtlich sind die CD3-positiven, p38-positiven Zellen mit der CD6-Depletion entfernt worden, während die CD3-negativen noch vorhanden sind (Tabelle 3.13). Die Zellen, die nach CD6 Depletion noch positiv für cyt p38 (3.71%) sind, gehören somit nicht zu den T-Zellen (CD3-/cytp38+).

Zusammenfassung:

- **Auf CD6-positiven Zellen lassen sich nur in geringem Maße Killer-Inhibitory-Receptor (KIRS) nachweisen.**
- **CD6-positive T-Zellen besitzen zu 3,82% Killer-Activatory Receptors (KARS).**

3.2 Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) bei verschiedenen Zellpopulationen

3.2.1 MLR der CD6 depletierten und CD6 undepletierten Zellfraktion

Die vorhergegangenen Experimente waren eine durch CD-Oberflächenmarker ermöglichte Beschreibung der potenziellen Suppressorzellen. Die nächsten Experimente sollen zeigen, dass eine Suppressorfunktion (Schumm et al. 1994) von CD6 depletierten Knochenmark auch in vitro nachweisbar ist.

Zunächst wurde das Knochenmark bzw. die peripheren Stammzellen, wie schon in Kapitel 2.2.6 beschrieben, mit einem anti-CD6 monoklonalen Antikörper (M-T411, Mouse IgG1) versetzt. Anschließend wurden mit Maus Antikörper gegen Schaf-Immunglobulin beladene immunomagnetische Beads (Dynabeads, Dynal) dazugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Zellseparation in einem Handmagneten durchgeführt. Alle CD 6 positiven Zellen konnten so aus dem Knochenmark (bzw. PBSC) entfernt werden.

Bei der MLR wird die Proliferation mittels Einbau von ^3H -Thymidin gemessen, wie sie nach einer Stimulation mit immungenetisch fremden Blutzellen auftritt. Die Stimulatorzellen werden mit 36 Gy bestrahlt, um eine eigene Proliferation zu hemmen. Wir verwendeten diesen Test, um eine Hemmung der Reaktion durch Zugabe von CD6-negativen Blut- bzw. Knochenmarkzellen nachzuweisen. Responder-T Lymphozyten wurden von gesunden Spendern gewonnen und mit Nylonwolle angereichert. Etwa 90% der Responderzellen waren T-Zellen. Stimulatorzellen wurden ebenso von gesunden Spendern gewonnen, mit 36 Gy bestrahlt und in gleicher Menge der Kultur zugesetzt. Zur Untersuchung der Suppressoraktivität des CD6 depletierten Knochenmarks (bzw. PBSC) wurden 1×10^5 dieser depletierten Zellen (mit 16 Gy bestrahlt) zur Kultur dazugegeben. Nach sechstägiger Inkubation wurde ^3H -Thymidin hinzugefügt und nach weiteren 18 Stunden wurden die Platten geerntet und der Thymidineinbau im 'scintillation counter' gemessen. Als Kontrolle diente die Reaktion von Responderzellen gegen autologe Stimulatorzellen, die Reaktion gegen die Zellen des Knochenmarks bzw. PBSC des Spenders, sowie die Reaktion der Responderzellen gegen die allogenen Stimulatorzellen.

Da die Einbauraten (cpm = counts per minute) auch bei autologen Kontrollen unterschiedlich hoch waren, wurde der Stimulationsindex (SI) und der Allogene Reaktivitäts-Index (ARI) ermittelt, um die Werte vergleichen zu können.

SI= CPM allogene :CPM autologe Stimulation

ARI= ((CPM allogene-CPM autologe Stimulation):CPM autologe Stim.) X 100

In folgender Abbildung ist der Versuchsansatz noch einmal zusammengefasst (Abb. 3.3):

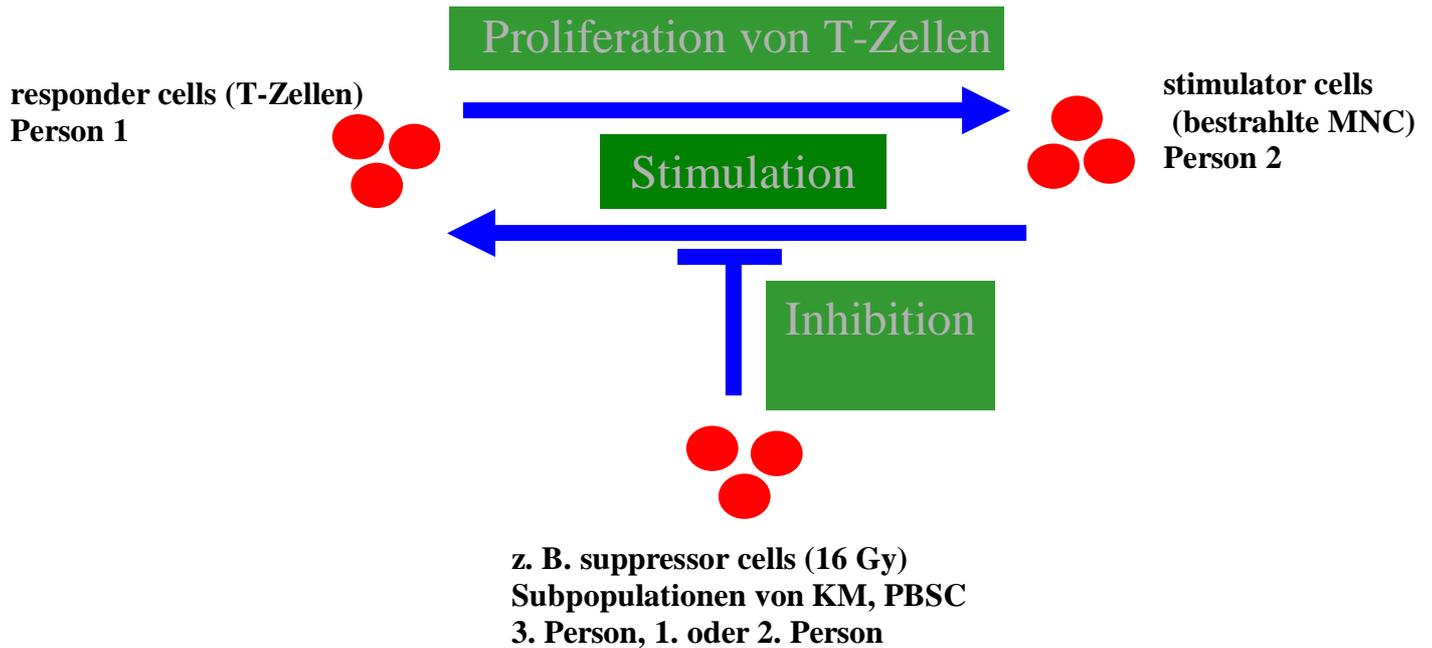


Abbildung 3.3: Versuchsansatz einer MLR mit drei Zellpopulationen

Als Suppressorzellen wurde zum einem undepletiertes Knochenmark bzw. PBSC, zum anderen dieselben Zellen nach CD6 Depletion, CD8 Depletion und CD34-Anreicherung gegeben.

Hier ein Beispiel: natives Knochenmark und CD6 depletiertes Knochenmark wurden in zwei verschiedene 96 well Platten für eine Woche mit bestrahlten Stimulatorzellen und unbestrahlten Responderzellen inkubiert.

Nach Messung der Proliferation mit Hilfe des Thymidineinbaus ergab sich folgendes Bild:

MLR 020300	cpm	SI	<u>ARI</u>
Auto Stimulation	12 504	1	0%
Allo Stimulation	44 411	3,6	100%
Allo Stim.+ PBSC _{voll}	19 446	1,6	21,76%
Allo Stim + PBSC _{CD6⁻}	12 646	1,0	0,45%

Tabelle 3.14: MLR- Proliferation von normalen und CD6 depletierten Peripheral Blood Stem Cells(PBSC)

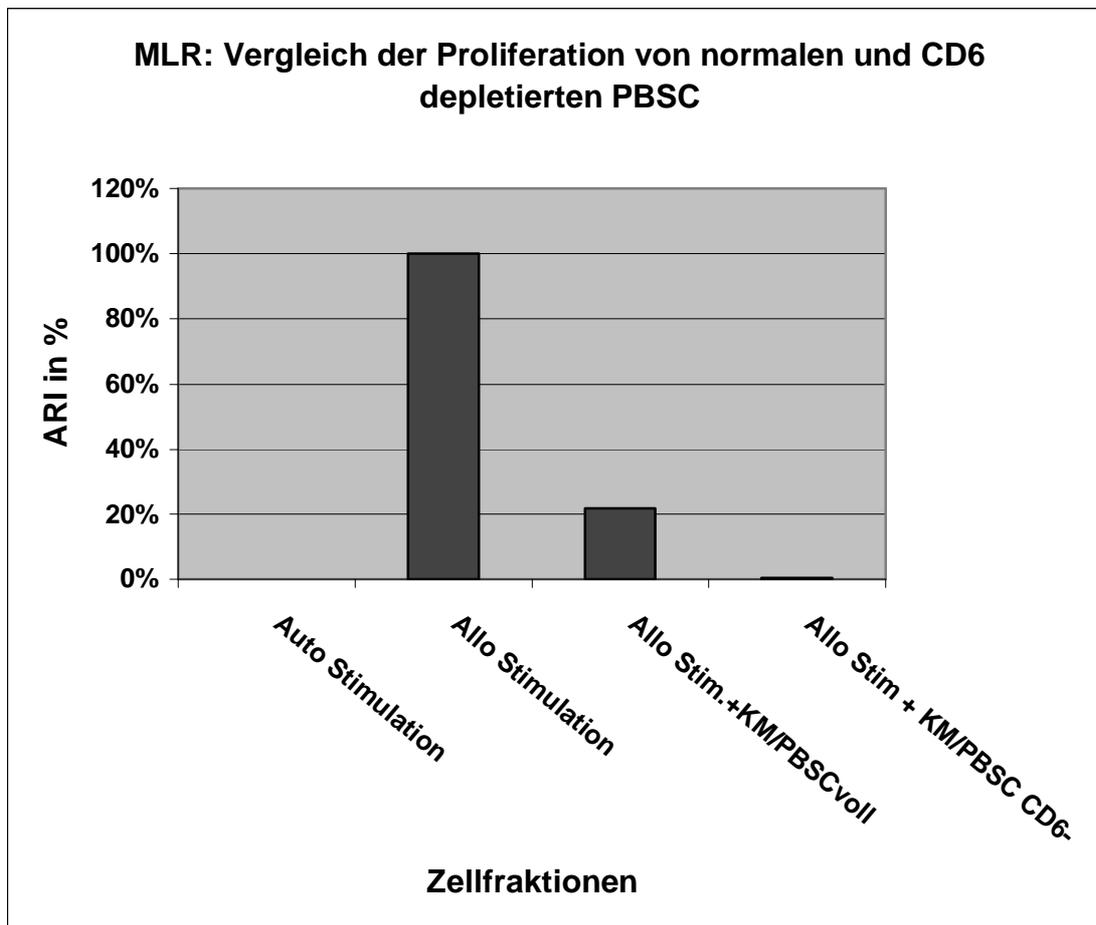


Diagramm 3.3: Stimulation von nicht depletierten und CD 6 depletierten PBSC

In dem obigen Diagramm wurde der Allogene Stimulations Index (ARI) angegeben (Definition siehe oben). Man erkennt, dass undepletierte PBSC den Stimulationsindex auf 21,76% der

Kontrolle supprimierte. CD6- depletierte PBSC supprimierte in diesem Versuch auf unter 1% der Kontrolle.

Es wurden nun mehrere Versuche analysiert, um diesen Effekt zu überprüfen. Insgesamt wurden 12 Teste von unterschiedlichen Personen angesetzt und ausgewertet. In folgender Tabelle sind die Ergebnisse aufgelistet, aus denen der AR- Index ausgerechnet wurde.

	KM/PBSC full cpm	CD6 depletiert cpm	Allo Cpm	Auto cpm
R.S.KM AKB A	33 426	20 703	44 183	9484
D.M. PBSC A	19 446	12 646	44 411	12504
D.M. PBSC B	20 471	15 710	38 547	4362
S.T. PBSC B	4359	5603	21 128	5055
020800 A PBSC	18 488	16 490	25610	4246
020800 B	13 005	12 001	34 253	5064
90800 A PBSC	5635	7836	8230	2152
90800 B PBSC	4275	3346	6710	3758
0908001 A PBSC	18 429	17 539	19 458	3028
0908001 B PBSC	9785	8416	10 305	4608
311000 A PBSC	20 031	11 070	30 258	18 821
311000 B PBSC	29 425	26 361	42 698	18 784

Tabelle 3.15: MLR von depletierten und undepletierten KM und PBSC (n=12) in counts per minute

Signifikanz: allo > auto p=0.002; full < allo: p =0.002; CD6-depl. < allo: p=0.002; CD6-depl.< full: p=0.028 (gepaarter Wilcoxon)

Wie man sieht, war bereits beim Zusatz von undepletiertem Knochenmark im Vergleich zur Allo-Kontrolle ein Suppressionseffekt zu sehen. Der Bereich der einzelnen Werte ist allerdings recht groß. Nach CD6-Depletion war der Suppressionseffekt bis auf zwei Ausnahmen deutlich ausgeprägt. Mittelt man die Werte des Allogenen Reaktivitätsindex (ARI), kommt man zu einer mittleren Suppression auf 46% (Median) nach Zugabe von KM bzw PBSC und 32 % nach Zugabe von CD6-depletierten KM bzw PBSC (Tabelle 3.16).

ARI	Undepl. KM/PBSC	CD 6 depl KM/PBSC.
Median	46%	32%
Range	0 – 93%	0 – 93%

Tabelle 3.16: Allogener Reaktivitätsindex von allen 12 Proben

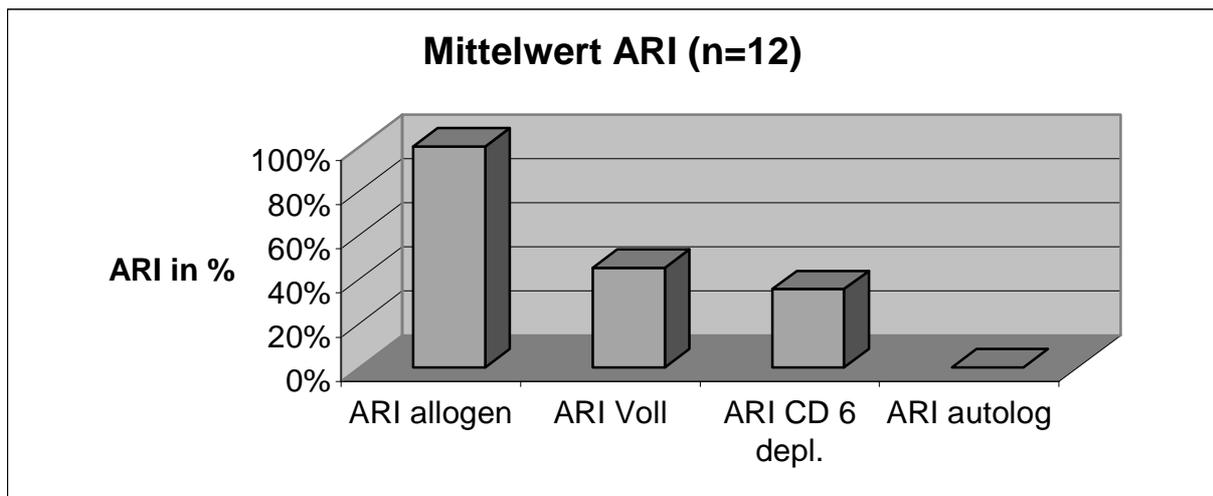


Diagramm 3.4: Mittelwert ARI von allen 12 Proben

Zusammenfassung:

Bei der MLR beträgt der Allogene Reaktivitätsindex (ARI) bei undepletierten Knochenmark 45% und bei CD 6 depletierten Knochenmark 32% der Kontrolle (n=12). Die Suppression der MLR durch KM/PBSC sowie CD6-depl. KM/PBSC ist signifikant (p=0.002), die Suppression durch CD6-depl. KM/PBSC gegenüber vollem KM/PBSC ist ebenfalls signifikant (p=0.028) (paired Wilcoxon).

3.2.2 MLR bei CD 6 negativen und gleichzeitig CD 8 positiven Zellpopulationen

In den vorher durchgeführten FACS Analysen zeigte sich (siehe Kapitel 3.1), dass nach CD 6 Depletion 6,7 % (KM) bzw. 5% (PBSC) der CD3+/CD8+ Fraktion noch vorhanden sind.

Somit könnten diese Zellen für den Suppressor-Effekt verantwortlich sein.

Dazu wurde eine MLR mit CD 6-/CD8 + Zellen durchgeführt. Es wurden die CD6 depletierten Zellen mit einem CD8+ T Cell- Isolation- Kit, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, CD8 angereichert.

Um zu sehen, ob die CD8 angereicherten Zellen einen geringeren GvH Effekt aufweisen, wurde wieder eine MLR mit undepletierten Knochenmark bzw. Stammzellen, eine mit CD 8 angereicherten und eine allogene (nur Responder T-Zellen mit allogenen bestrahlten Zellen) durchgeführt.

Der Versuchsaufbau ist dabei der gleiche wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

Zunächst einmal die Daten von 5 durchgeführten Versuchen. Hier wurden die absoluten counts per minute angegeben.

	PBSC full	PBSC CD6-/ CD8+	allo	auto
D.M. PBSC	5635	3339	8230	3041
Nr.080800	4275	2051	6710	2152
Nr.90800	18429	14626	19458	4608
Nr.311000	20031	8647	30258	8394
Nr.311000/2	29425	10519	42698	8527

Tabelle 3.17: MLR verschiedener Zellpopulationen in counts per minute

Die Aktivität der CD8 angereicherten Stammzellen ist hier deutlich niedriger als die von nativem Knochenmark.

Um die Werte miteinander vergleichen zu können, wurde der allogene Reaktivitätsindex (ARI) ausgerechnet.

Auch diese Mittelwerte ergeben hier ein eindeutiges Bild. Immerhin ist die Aktivität der CD6-/CD8+- Zellen nur ca. 16% der zu 100% definierten allogenen Reaktion.

	% allo voll	% allo CD6-/CD8+
Mittelwert	61%	15,92%
Standardab..	18,9%	28,6%

Tabelle 3.18: Mittelwert ARI verschiedener Zellpopulationen (n=5)

Im folgenden Diagramm ist dieser Zusammenhang graphisch dargestellt.

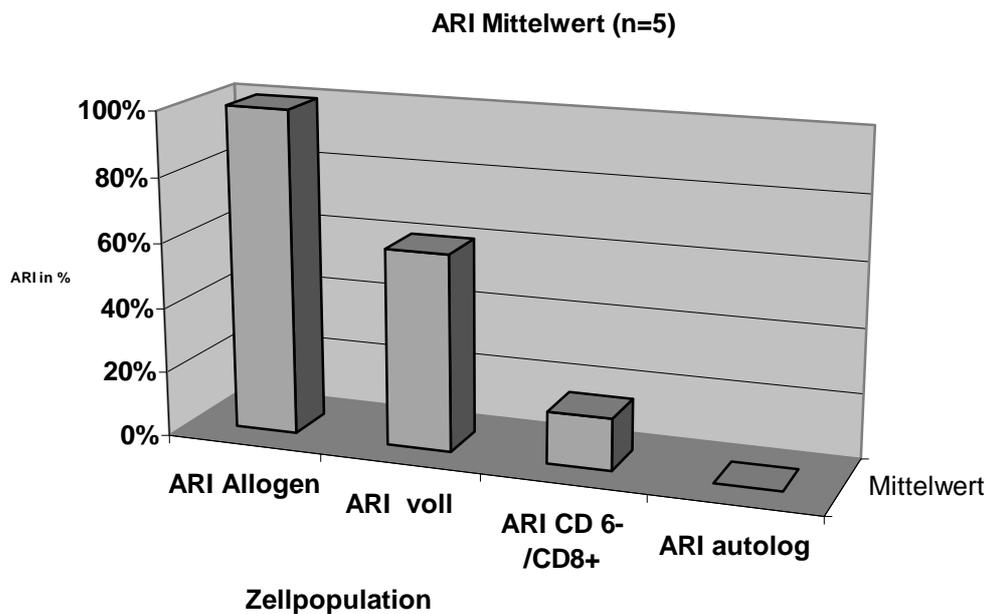


Diagramm 3.5: ARI von nativen und CD8 angereicherten Knochenmark bzw. Stammzellen

Im obigen Diagramm zeigt sich wieder, dass auch native Stammzellpräparate einen gewissen Suppressionseffekt haben (statt 100% nur 61%). Dabei ist nicht geklärt, ob es an der Population per se liegt, oder andere Faktoren wie z. B. G-CSF dafür verantwortlich sind.

Somit würden diese Zellen bei einer allogenen Knochenmarkstransplantation den größten Suppressoreffekt und damit die geringste Abstoßungsreaktion verursachen.

Zusammenfassung:

Der Suppressionseffekt ist bei CD6-negativen und CD8 positiven Zellen am stärksten ausgeprägt. Der AR-Index beträgt im Mittel 16 %.

3.2.3 MLR bei CD6-/CD8-Zellpopulationen

Als Kontrolle zum Effekt der CD6-/CD8+ Subpopulation haben wir als nächstes den Suppressionseffekt von der CD6-/CD8- Zellfraktion untersucht. Bei der CD 8 Anreicherung bleibt automatisch die CD6-/CD8- Zellfraktion übrig, dessen Suppressionseffekt man in einer MLR untersuchen kann.

Der Versuchsaufbau ist identisch mit den vorherigen zwei Versuchen. Es wird wieder eine allogene Kontrolle mit 100% definiert, eine autologe mit 0%, und undepletiertes Knochenmark, in diesem Falle eine CD6-negatives und CD8-negatives Knochenmark, verglichen. Sieben Proben wurden untersucht.

Zuerst die absoluten counts per minute von sieben Proben. Diese wurden dann auf ARI umgerechnet, um die verschiedenen Versuchsreihen besser vergleichen zu können.

	PBSC full	PBSC CD6-/ CD8-	allo	auto
D.M.PBSC	5635	11271	8230	3041
Nr.080800	4275	7498	6710	2152
Nr.090800	18429	25438	19458	4608
Nr.311000	20031	17970	30258	8394
Nr.311000/2	29425	29313	42698	8527
Nr.020800	18488	36860	25610	5064
Nr.020800/2	13005	30197	34253	4246

Tabelle 3.19: MLR CD6-/CD8- Zellen in counts per minute

Auf ARI umgerechnet ergibt sich folgendes Bild:

	ARI voll	ARI CD8-
Mittelwert	56%	111,86%
Stdandarab.	18	46

Tabelle 3.20: ARI von CD6-/CD8- Zellen(n=7)

Auffallend ist hier, dass die CD8- Zellfraktion nicht nur keinen Suppressionseffekt aufweist, sondern eine höhere Stimulation (111%) selbst als die allogene Kontrolle aufweist. Somit ist diese Zellpopulation nicht für den Suppressionseffekt verantwortlich.

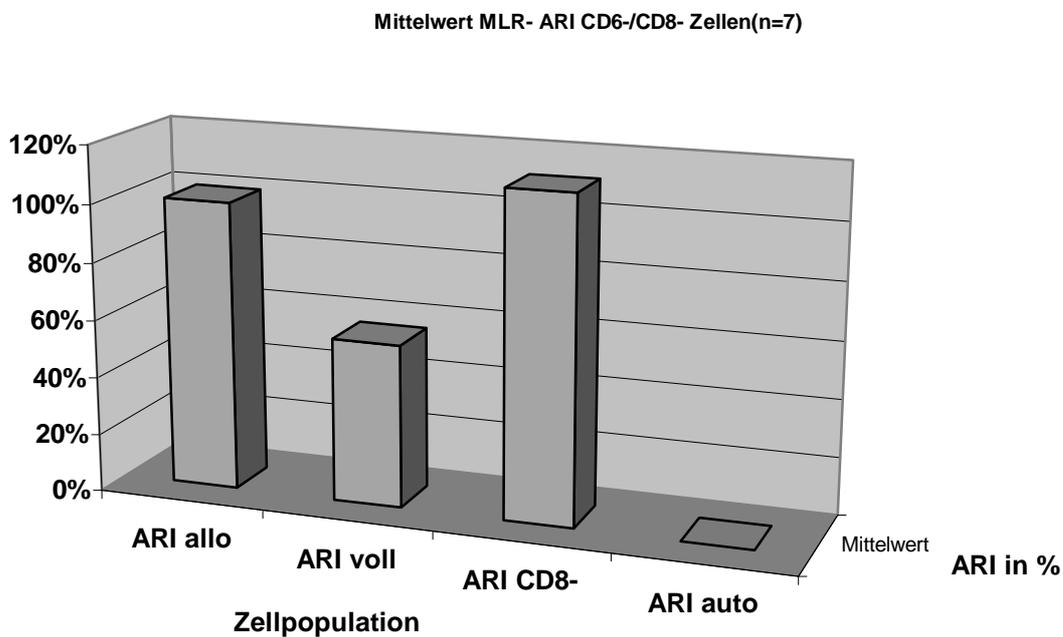


Diagramm 3.6: ARI von undepletierten und CD6/CD8 depletierten Knochenmark bzw. PBSC

Zur besseren Übersicht werden am Schluß dieses Kapitels noch einmal die Arbeitsschritte der Depletion bzw. Anreicherung der verschiedenen Zellfraktionen dargestellt.

Zusammenfassung:

Die CD6-/CD8- Zellfraktion ist nicht für den Suppressionseffekt verantwortlich.

Phänotypisierung von Suppressorzellen

Versuchsordnung:

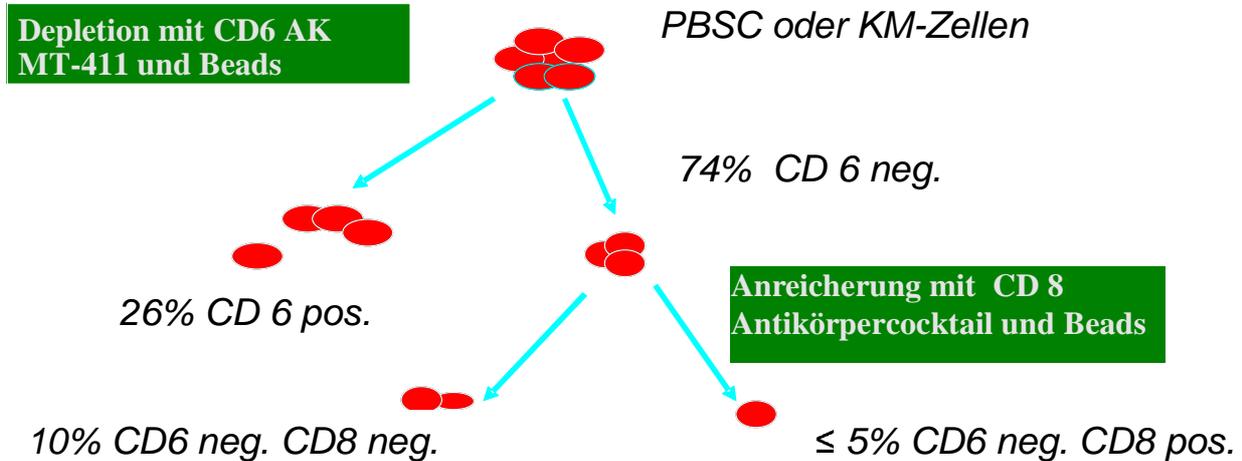


Abbildung 3.4: Man sieht die verschiedenen Trennungsschritte von naiven Stammzellen. Zuerst werden die Zellen mit Hilfe des CD6 Antikörpers in CD6+ und CD6 negative Zellfraktionen aufgeteilt. Die CD6 negativen Zellen werden weiter in CD8+ und CD8 negative Populationen getrennt. Die Prozentangaben sind die Mittelwerte aus mehreren FACS-Analysen (siehe Kap.3.1). Aus den jeweiligen Populationen werden MLR's angelegt.

3.2.4 MLR der CD34 positiven Population

Abschließend wurde auch der Effekt der CD 34 positiven Stammzellen auf den Suppressor-Effekt untersucht. Dazu wurden periphere Stammzellen mit CD34 positiven Stammzellen angereichert (siehe Kapitel 2.2.8). Diese angereicherte Zellpopulation wurde in der MLR getestet. Gemessen wurde wieder in counts per minute und diese dann in den Aktivitätsindex (ARI) umgerechnet.

	PBSC voll	PBSC CD34	PBSC allo	PBSC auto
Nr.20300	19446	34072	44411	12504
Nr.20300/2	20471	42544	38547	4362

Tabelle 3.21: MLR von CD34 angereicherten Zellen in counts per minute

Man erkennt, dass CD34 positive Stammzellen im Vergleich zu undepletierten Stammzellen keine Inhibition aufweisen. Umgerechnet in ARI:

	ARI voll	ARI CD34
Mittelwert	28%	89,80%
Standardabw.	5	22

Tabelle 3.22: MLR von CD34 angereicherten- Zellen ARI (n=2)

Der Reaktivitätsindex vom undepletierten Knochenmark liegt bei 28%, von CD34 angereicherten Stammzellen deutlich darüber. Ein Suppressionseffekt ist damit nicht nachzuweisen.

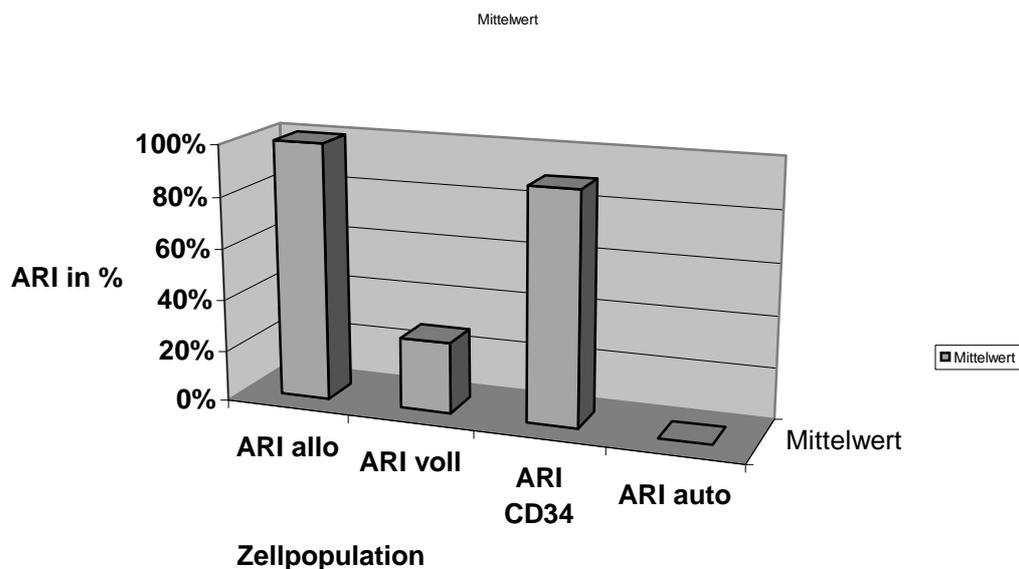


Diagramm 3.7: ARI von undepletiertm und CD34+ angereichertem Knochenmark bzw. Stammzellen

Zusammenfassung:

- Bei der MLR mit CD34⁺Zellen ist der Reaktivitätsindex höher als mit undepletiertem KM.
- Ein Suppressionseffekt kann nicht nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1 Phänotypische Untersuchung der CD6-negativen Knochenmark bzw. Stammzellfraktion.

Die Behandlung von Leukämien ist ein Hauptziel von allogenen Knochenmarkstransplantationen. Üblicherweise war diese Methode Patienten mit einem passenden HLA-identischen Familienspender vorbehalten. Heute kann in bis zu 70% der Fälle ein passender HLA-identischer Fremdspender gefunden werden. In den anderen Fällen, in denen kein passender Spender gefunden wird, werden auch Patienten mit HLA-differenten Spendern transplantiert (Ash et al. 1991), wobei lediglich der Unterschied eines HLA-Antigens akzeptiert wird. Dabei war bei Patienten mit einer HLA-Differenz die Abstoßungsrate höher, die Überlebensrate jedoch etwa gleich wie bei Patienten von HLA-identischen Spendern. Bei Kombinationen von zwei oder drei HLA-Differenzen (HLA-Haploidentität) wuchs das Transplantat weniger oft an (12,3%), die GvHD-Rate war höher (44-67%) und die Überlebensrate geringer als bei der HLA identischen Spender-Empfänger Kombinationen (Anasetti C et al. 1989).

Die akute und chronische GVHD ist eine der Haupttodesursachen nach allogener Knochenmarkstransplantation. Bei klinischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass eine CD6 Depletion der Spenderzellen eine geringere GvH-Rate verursacht, ohne dass die GvL Reaktion eingeschränkt ist (Soiffer et al. 2001).

Ursächlich dafür werden die Suppressorzellen verantwortlich gemacht. Als Suppressorzellen werden Zellen bezeichnet, die die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (Miller 1986) und damit die Entwicklung einer GvH verhindern.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Suppressorzellen in der CD6-negativen Zellfraktion phänotypisch und funktionell zu untersuchen. Daher wurde zunächst eine phänotypische Untersuchung der CD6 negativen Zellen mittels FACS durchgeführt.

Bei unseren Untersuchungen lag der Anteil der CD6 positiven Zellen im Knochenmark bei etwa 25 %. Die restlichen Zellen verteilen sich auf 30% Lymphozyten, 35% Granulozyten und auf 7% Monozyten. Im peripheren Stammzellpräparat stellen sich die Verhältnisse ähnlich dar.

Insgesamt konnte bestätigt werden, dass sich das CD6 Antigen auf etwa 94 % der reifen CD3 positiven Lymphozyten befindet. Aufgrund der erreichten Nachweisgrenze der hier eingesetzten Untersuchungsmethode (FACS) konnten die CD6-negativen Zellen nicht näher beschrieben werden.

Entscheidend ist nun die Recovery (Anzahl der Zellen nach CD 6 Depletion in % der Anzahl vor Depletion) verschiedener Zellfraktionen nach CD6 Depletion, da diese CD6 negativen Zellen für den Suppressoreffekt verantwortlich sind.

Dabei stellte sich heraus, dass T-Helferzellen ($CD3^+/CD4^+$) nach CD6 Depletion fast nicht mehr (0,91%) nachweisbar sind, damit CD-6 positiv sind, und nicht für den Effekt verantwortlich sein können.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Recovery von $CD3^+/CD8^+$ Zellen bei 6,7 % im Knochenmark und bei etwa 5% in mobilisierten Blutzellen liegt. Geht man nun davon aus, dass sich die gesuchte Population in der CD 6 negativen und damit auch CD3 negativen Zellfraktion befindet (also nach Depletion), kann die beschriebene Population als eine CD3 negative, CD 6 negative, aber CD8 positive Zellfraktion phänotypisch charakterisiert werden.

Nun wurde versucht die oben beschriebenen Zellen näher einzugrenzen. Dabei konnte festgestellt werden, dass diese ($CD3^-$, $CD6^-$, $CD8^+$) Zellen vor Depletion 1,57% und nach CD 6 Depletion 1,35% der Gesamtpopulation ausmachen, also eine sehr kleine Population bilden. Um einen Suppressoreffekt dieser Zellen nachzuweisen, wurde ein Proliferationsassay (MLR) durchgeführt (siehe Kapitel 4.2).

Als nächstes wurden CD 34 positive Zellen doppelt markiert ($CD34$ und $CD6$). Dabei waren die $CD34$ positiven Stammzellen nicht positiv für $CD6$ und haben damit am Suppressoreffekt keinen Einfluss.

Als letztes wurden alle Zellen auf die sogenannten Killer-Immunoglobulin-like Receptors (KIR's) und Killer-Activatory-Receptors (KAR's) untersucht. Diese Rezeptoren gehören zur Familie der Immunoglobulin-gene Superfamily. Die T-oder NK-Zellen werden durch diesen Rezeptor am Zerstören einer anderen Zelle gehindert (KIR's) oder werden aktiviert (KAR's). Diese Rezeptoren lassen sich bei den $CD6$ und $CD3$ positiven Zellen weder vor noch nach der Depletion nachweisen.

Zusammenfassend wurde hier also eine $CD6$ und $CD3$ negative, aber $CD8$ positive Zellfraktion nach Depletion von 1,57% gefunden, die weder KIR's noch KAR's trägt und die für den Suppressoreffekt verantwortlich sein könnte.

4.2 Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) bei verschiedenen Zellpopulationen

Während der erste Teil dieser Arbeit sich mit der Phänotypisierung der einzelnen Zellfraktionen beschäftigte, wurden nun funktionelle Tests zum Nachweis eines Suppressoreffekts durchgeführt. Als Testmethode wurde hier die Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) gewählt. Durch Ko-Kultivierung von peripheren Stammzellen und Lymphozyten von zwei verschiedenen Personen, erhält man hier ein exzellentes System zur Untersuchung der allogenen Reaktion und für die Produktion von zytotoxischen T-Zellen in „vitro“ (Crumpton und Owen 1987). Dabei wird der Test mit verschiedenen Zellpopulationen (CD6⁻; CD6⁻/CD8⁺; CD6⁻/CD8⁻ und CD 34⁺ Zellen) durchgeführt, um den Suppressoreffekt spezifischer nachweisen zu können.

Zunächst wurden MLR's mit undepletierten und mit CD 6 depletierten Knochenmark bzw. Stammzellen durchgeführt. Um die absoluten „counts per minute“ besser vergleichen zu können, wurde der Allogene Reaktivitätsindex angegeben (ARI). Bei 12 Patienten betrug der ARI bei undepletiertem Knochenmark 45% und bei CD6-depletiertem Knochenmark 35%. Damit war in diesem Testsystem ein Suppressionseffekt mit CD6 depletierten Stammzellen nachweisbar.

Es war weiterhin auffallend, dass schon undepletiertes Knochenmarks einen suppressiven Effekt aufweist (ARI 45% im Gegensatz zur allogenen Kontrolle 100%). Dies kann durch das bei der Gewinnung von Stammzellen verwendete G-CSF (Colony-Stimulating Factor) erklärt werden. G-CSF ist ein natürlicher hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Proliferation und Reifung der von neutrophilen Vorläuferzellen stimuliert und Vorläuferzellen vom Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert. Es wird zur Gewinnung von peripheren Stammzellen verwendet. Wie Versuche an Mäusen und beim Menschen zeigen konnten, moduliert G-CSF die mobilisierten T-Zellen in Typ2 T-Zellen. Diese Typ 2 T-Zellen produzieren die Interleukine IL-4 und IL-10, die beide entzündungshemmend bzw. immunsuppressiv wirken und damit einer GvHD entgegen wirken bzw. bei einer MLR weniger stimulieren (Pan L 1995).

Die stark voneinander abweichenden autologen Kontrollen von 2152 counts per minute (cpm) bis zu 18784 cpm (siehe Seite 38) erklären sich durch die jeweils verschiedenen gesunden Spender, die jeweils unterschiedlich auf das Knochenmark bzw. auf die Stammzellen reagieren. Dies wird jedoch durch die Bildung des Allogenen Reaktivitätsindex (ARI) verhältnismäßig wieder ausgeglichen.

Die vorliegenden Daten wurden bestätigt durch Versuche am Hund. Dabei zeigte sich, dass beim Hund CD 6 negative Zellen die Entstehung von zytotoxischen T-Zellen verhindern können und damit eine geringere GvHD auslösen (Günther et al. 1994).

Als nächstes wurde ein MLR Testsystem mit CD6 negativen/ CD 8 positiven Zellen durchgeführt. Dazu wurde das bereits CD6 depletierte Knochenmark mit einem CD 8 Isolation-Kit mit CD8+ Zellen angereichert. Auch hier zeigte sich ein Suppressoreffekt. Bei undepletierten Knochenmark betrug der ARI im Mittel 61%, bei CD 6 neg./ CD8 **pos.** Knochenmarkszellen nur 15,92% (n=5). Damit ist die Suppression hier noch höher als bei nur CD 6 depletierten Knochenmark. Obwohl diese Zellfraktion mit 1,57% (of total) sehr klein ist, scheint diese CD6 neg./ CD8 pos. Zellfraktion den stärksten Suppressionseffekt zu haben. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre z.B. die Bildung von Cytokinen (siehe unten). Auf der anderen Seite könnte auch eine Zellfraktion mit CD6 neg./CD8 **neg.** Zellen einen Suppressionseffekt aufweisen. Dazu wurden CD6 neg./ CD8 neg. Zellen zu einer MLR gegeben. Erstaunlicherweise betrug der ARI bei CD6-/CD8- Zellen über 100 % (n=7). Somit ist diese Zellfraktion nicht für den Suppressionseffekt verantwortlich. Die CD8- Zellen scheinen sogar einen stimulierenden Einfluss zu haben, oder aber der hemmende Einfluss der CD6-/CD8+ Zellen fällt weg. Diese Frage war in diesem Versuchsansatz nicht zu beantworten.

Abschließend wurden die CD34+ Stammzellen auf einen Suppressoreffekt untersucht. Es wurde eine MLR mit einer CD34+ Zellfraktion angesetzt. Auch hier zeigte sich ein hoher Allogener Stimulationsindex von im Mittel 89,9% (n=2). CD 34+ positive Stammzellen werden in der Literatur auch als nicht immunogene und sogar als toleranzinduzierende Zellen beschrieben. Dabei sind bis zu 25% der CD34+ *Vorläuferstammzellen*, die kein CD18 (beta-Kette von bestimmten Leukointegrinen) exprimieren, nicht immunogen. Allerdings fungieren 6% der unbehandelten Stammzellen als Antigen-Presenting-Cells (APC`s) (Rondelli et al. 1996 und 1998). Da die hier verwendeten Zellen keine *Vorläuferstammzellen* sind, scheint die immunogene Rolle dieser Zellen zu überwiegen.

Insgesamt wurde also eine CD6- und CD8+ Population von 1,57% (of total gefunden), die in „*vitro*“ (MLR) einen Suppressoreffekt aufweist.

Wie auch bei den Vorversuchen mit Hunden wurde hier eine Population gefunden, die eine MLR supprimieren, unabhängig davon, ob die Stammzellen als Stimulator -oder als Responder-Zellen fungieren (Guenther, Schumm et al. 1994). 1999 konnte bereits Kimberly L. Gandy zeigen, dass bei Mäusen eine CD8+ Zellfraktion für den Suppressor-Effekt verantwortlich ist. Bei Fluoreszenz-Aktivierter-Flow-Cytometrie (FACS) Untersuchungen waren diese Zellen außerdem negativ für TCR- $\gamma\delta$, allerdings ein Teil positiv für TCR- $\alpha\beta$ (Gandy et al. 1999). TCR- $\alpha\beta$ kommt insgesamt auf mehr als 95% der peripheren T-Zellen und auf der großen Mehrheit der TCR-exprimierenden Thymozyten vor. Im Gegensatz dazu kommen T-Zellen, die den TCR- $\gamma\delta$ exprimieren, an bestimmten anatomischen Stellen vor (z.B. Darmepithel, Uterus, Zunge).

Untersuchungen am Rhesusaffen konnten zeigen, dass CD8⁺/CD3⁻ Zellen TGF- β 1 produzieren und damit immunregulatorisch einer GvHD entgegenwirken (Asiedu 1999). TGF- β 1 gehört zu den sogenannten inhibitorischen Zytokinen, die eine Apoptose der zytotoxischen Zelle durch Fas-Fas-Ligand auslösen.

Ein Jahr später wurde diese These bestätigt. Y. Reisner führte Versuche mit transgenen Mäusen durch, bei denen der Suppressoreffekt durch gleichzeitige Expressierung von Fas-Fas-Ligand und das CD8 –Antigen hervorgerufen wird (Reisner 2000).

Eine weitere Phänotypisierung der CD8 positiven Zellen gelang Schuchert. Er konnte zeigen, dass diese Zellen einen neuartigen Rezeptor β -FCp33 tragen. Dieses 33-Kilodalton große Glykoprotein ist mit einer β -Kette des T-Zell-Rezeptors über eine Disulfidbrücke verbunden (Schuchert 2000). Was dieses Protein bewirkt, ist noch unklar.

Letzlich ist also der Mechanismus der Suppressorzellen noch weitgehend ungeklärt. Ziel ist es, diese Zellart soweit zu charakterisieren und deren Mechanismus zu verstehen, dass die Suppressorzellen gezielt zur GvHD-Prophylaxe eingesetzt werden können. Damit werden einerseits Transplantationen bei HLA nicht passenden Spendern mit weniger Komplikationen möglich, andererseits können auch aggressive, neoplastische Erkrankungen mit Erfolg behandelt werden.

Stammzelltransplantationen von nicht HLA-identischen Spendern bergen das Risiko einer erhöhten Abstoßung des Spender-Transplantats und einer erhöhten GvHD Entwicklung.

Klinisch wurde dabei folgendes Modell entwickelt: Knochenmark wird am Tag Null transplantiert und am Tag 6 nach Transplantation werden CD6 depletierte Stammzellen des gleichen Spenders infundiert, die mit G-CSF stimuliert worden sind. Dadurch erhofft man sich ein besseres Anwachsen des Knochenmarks und einen besseren GvL Effekt, aber durch die sich im CD6 depletierten Knochenmark befindlichen Suppressorzellen, eine schwächere GvH -Reaktion. Es wurden dazu 36 Patienten ausgewertet, die eine Transplantation nach oben beschriebenen Protokoll erhalten haben. Bei keinem Patienten erfolgte eine Abstoßung des Knochenmarks, die GvHD war mild bei 9 Patienten, moderat bei sieben und schwer bei einem Patienten. Die 2-Jahres-Überlebensrate betrug 23,4% und die Rezidivrate 56% (Kolb et al. 2003). In Anbetracht der Schwere der Erkrankungen (high risk leukemia) und deren fortgeschrittenen Stadien motivieren die vorliegenden Ergebnisse dazu, die Rolle der CD6⁻/CD8⁺ Zellen als Suppressorzellen weiter zu erforschen.

Außer den CD 8 positiven Zellen gibt es noch andere Arten von Suppressorzellen. 1995 entdeckte die Arbeitsgruppe um Sakaguchi die sogenannten CD4⁺ CD25⁺ Suppressorzellen (Sakaguchi et al. 1995). Er stellte fest, dass die Transfusion von CD4⁺ CD25⁺ depletierten Zellen in

athymischen Mäusen zu einer Reihe von Autoimmunerkrankungen führten, welche durch die Transfusion von CD4+CD25+ Zellen verhindert werden konnte. Dies war der Anfang der Entdeckung von den sogenannten T-regs (T-regulatory cells). Diese Zellen entfalten ihre Suppressoraktivität durch die Ausschüttung der Zytokine IL-10, TGF beta und IL 4 (Seddon et al. 1999). Weiter wurde auch hier (wie bei den CD8+Zellen) ein Foxp3 DNA bindender Transskriptionsfaktor gefunden. Ein Gendefekt dieses Faktors bei CD4+/CD25+ Zellen hatte eine Aufhebung des Suppressoreffekts zur Folge (Chen W. et al. 2003). Damit fällt dem Foxp3 Faktor eine entscheidende, aber bis jetzt nicht geklärte Rolle beim Suppressoreffekt zu. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Suppressorzellen und Responderzellen nicht MHC restringiert ist (Piccirillo und Shevach 2001).

Eine weitere Gruppe von Zellen mit immunregulatorischen Eigenschaften sind die NK-T Zellen. Auch diese Zellen können beim Mäusemodell den Ausbruch von bestimmten Autoimmunerkrankungen verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von NK depletierten Zellen die Entwicklung von Diabetes begünstigt (Frey 1999).

Dabei wirken auch diese Zellen mittels der Zytokine TGF-beta, IL-4, IL 10 und IFN-gamma. Erst jüngst konnte in einem Mäusemodell gezeigt werden, dass es eine CD8 + aber TCR negative Facilitatorpopulation(FC`s) gibt, die regulatorische T-Zellen (T-regs) aktiviert (Anstieg von TGF-beta, Foxp3) und die mit einer geringen Zellzahl (50 000) eine GvHD komplett verhindern kann (Colson et al. 2004).

Damit ergibt sich ein kompliziertes Bild von verschiedenen Suppressorzellarten, die miteinander in Wechselwirkung stehen und auf verschiedenen Ebenen die Immunregulation beeinflussen. Ziel ist es diese Wechselwirkungen und die zugrunde liegenden Mechanismen aufzudecken, um diese Zellen bei Abstoßungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen einsetzen zu können.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die CD 6 negative Zellfraktion in ihrer Funktion als Suppressorzellen bei allogenen Knochenmarkstransplantationen untersucht und charakterisiert werden. Mittels Fluoreszenz-aktivierter-Cell-Sorting (FACS) wurde die CD6 Population phänotypisch untersucht. Die Stammzellen bzw. Knochenmarkszellen stammten dabei von gesunden Spendern. Dabei wurden aus Stammzellen CD 6 Stammzellen durch CD 6 Antikörper und magnetischen Beads CD6 depletiert und dann mittels FACS phänotypisch untersucht. Zusammenfassend waren diese CD6 depletierten Stammzellen CD6 und CD 3 negativ, sowie CD 8 positiv. Diese Population ist mit 1,57% (of total) sehr klein und hatte weder Killer-Immunoglobulin-like noch Killer-Activatory-Rezeptoren (Kir´s und Kar´s). Somit sind diese Zellen TCR (T-Cell-receptor) negativ, aber CD8 positiv.

Als nächster Schritt wurden funktionelle Tests zum Nachweis eines Suppressoreffekts durchgeführt. Als Testmethode wurde hierfür die Mixed-Lymphocyte-Reaction gewählt (MLR). Durch Ko-Kultivierung von peripheren Stammzellen und Lymphozyten von zwei verschiedenen Personen, erhält man hier ein exzellentes System zur Untersuchung der allogenen Reaktion und für die Produktion von zytotoxischen T-Zellen in „vitro“. Dabei wurde der Test mit verschiedenen Zellpopulationen (CD6-; CD6-/CD8+; CD6-/CD8- und CD 34+ Zellen) durchgeführt, um den Suppressoreffekt spezifischer nachweisen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass eine CD6-/CD8+ Zellpopulation den größten Suppressoreffekt aufweist. Im Gegensatz zu einer autologen Stimulation, die 100% stimuliert, erreichte diese Population nur einen Stimulationseffekt von 15%.

Eine CD6 depletierte Population dagegen erreichte einen Stimulationseffekt von 45%. Die CD34+ Zellen konnten als Suppressorzellen mit einem Stimualtionseffekt von 100% ausgeschlossen werden, ebenso die CD6-/CD8- Zellen (100%).

Insgesamt wurde also eine CD6-negative und CD8 positive Population von 1,57% (of total) gefunden, die in „vitro“ einen Suppressoreffekt aufweist.

Damit könnte diese Population mit ihrer Suppressoraktivität gezielt eingesetzt werden, um Abstoßungsreaktionen bei z.B. allogenen Knochenmarkstransplantationen zu verhindern.

6. Summary

The thesis was performed to elucidate the supposed role of CD6-negative suppressor cells. The hematopoietic progenitor cells of peripheral blood (G-CSF stimulated) or bone marrow were drawn from healthy donors. The phenotypic analysis was performed by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) after CD 6 depletion by monoclonal antibody and magnetic beads. The cell population obtained is CD 8 positive and CD 3 and CD6 negative. This small population (1,57%) did not either show Killer-Immunoglobulin-like –receptors nor Killer-Activatory-Receptors and proved to be CD8 positive T-Cell-Receptor (TCR) negative.

In functional assays the suppressor activity was tested in Mixed-Lymphocyte-Reaction (MLR). The co-stimulation of peripheral progenitor cells with allogeneic lymphocytes of two individuals represents an excellent system for the analysis of cytotoxic T-cells in vitro.

To further characterize the supposed suppressor effects co-cultivation with different lymphocyte population (CD6-/-; CD6-/CD8+; CD6-/CD8- and CD 34+ cells) was performed. The CD6-/CD8+ population showed the highest suppressor-effect in MLR. In contrast to the allogeneic control, this population reaches only 15% of stimulation of control. Whereas the CD6 depleted population showed a 45% stimulation. In contrast the CD34+ cells and the CD6-/CD8+ cells did not inhibit the in vitro growth at all.

In conclusion we were able to characterize phenotypically and functionally a very small cell population, CD6-/CD8+ (1,57% of all) with marked suppressor activity in vitro.

This population might out as facilitator cell in haplo-identical, CD6 depleted hematopoietic stem cell transplantation.

7.Literaturverzeichnis

1. 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.
2. Antin JH, Bierer BE, Smith BR et al. Selective depletion of bone marrow T-Lymphocytes with anti-CD5 monoclonal antibodies: effective prophylaxis for graft-versus-host disease in patients with hematologic malignancies. *Blood* 1991; 78:2139-2149.
3. Aruffo A, Melnick MB, Linsley PS et al. The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins. *J Exp Med* 1991; 174:949.
4. Aruffo A, Gena SW, Gary CS et al. The Membrane –proximal Scavenger receptor cysteine- rich domain of CD6 contains the activated leukocyte cell adhesion molecule binding site. *J Biol. Chem.* 1995; 270:18187-90.
5. Ash RC, Horowitz MM, Gale RP et al. Bone marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings: Effect of T-cell depletion. *Bone Marrow Transplant.* 1991; 7: 443-452.
6. Asiedu C, Yuru M, Weila W et al. Immunoregulatory Role of the CD8 in the veto effect. *Transplanatation* 1999; 67:372-380.
7. Burnet FM, Fenner F. The production of antibodies. 2nd edition. Melbourne: Macmillian 1949
8. Champlin R, Ho W, Gajewski J et al. Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft- versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 76:418-423.
9. Chen W. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp.Med.*2003; 198:1875-1886.

10. Collins R, Shpilberg O, Drobyski W et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 1997; 15:433-444.
11. Colson YL, Christopher K, Kenneth C, Perkins D et al. Absence of clinical GVHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells. *Blood.* 2004; 104: 3829-3835
12. Crumpton N, Owen Haupthistokompatibilitätskomplex. In: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie 1987*, Herausgeber: Roitt; Brostoff J und Male D; Stuttgart, New York Thieme, S. 37-48
13. Dicke KA, van Hoot JIM, van Bekkum DW. The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures; mouse spleen cell fractionation on a discontinuous albumin gradient. *Transplantation*, 1968; 6:562-700
14. Frey AB, Rao TD NKT cell cytokine imbalance in murine diabetes mellitus *Autoimmunity*,1999; 29: 201-214
15. Gale, RP und RE Champlin: Bone Marrow transplantation in acute leukaemia. *Clin. Haematol.*1986; 15: 851-872
16. Gandy KL, Domen J, Aguila H et al. CD8⁺ TCR⁺ and CD8⁺ TCR⁻ cells in whole bone marrow facilitate the engraftment of hematopoietic stem cells across allogeneic barriers. *Immunity*, 1999; 11:579-590
17. Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. A CD4⁺ T-Cell subset inhibits antigen specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 1997; 389:737-42
18. Guenther W, Schumm M, Buettner et al.: NK-Activity of canine blood and marrow cells. *Tissue antigens*, 1994; 34:198-201
19. Horowitz MM, Gale RP, Kolb HJ et al. Graft-versus-leukemia Reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 1990; 75:2459-2464.

20. Kolb HJ, Guenther W, Gyurkozca B et al. Tolerance and Chimerism. *Transplantation*, 2003; 75:26-31
21. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldmann JM et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*, 1995; 86:2041-2050.
22. Kolb H.J Allogene Knochenmarktransplantation zur Behandlung von Leukämie. *Der Bayerische Internist*, 1986; 8:31-33
23. Kolb HJ, Holler E Hematopoietic transplantation-State of the art. *Stem Cells*, 1997; 15 Suppl. 1:151-157.
24. Lanier LL NK cell receptors. *Amm. Rev. Immunol.*1998; 187:813-818.
25. Locatelli F, Burgio R et al. Tolerance and hematopoietic stem cell transplantation 50 years after Burnet´s theory. *Experimental Haematology*, 2000; 28: 479-489
26. Marmont A, Horowitz MM, Gale RP et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*, 1991;78:2120-2130
27. Medawar PB, Billingham RE, Brent L Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, 1953; 172:603
28. Miller RG The veto phenomen and T-cell regulation. *Immunol. Today*, 1986; 7/4:112-114
29. Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93:2245
30. Moretta, Bottino A, Vitale M et al. Receptors for HLA-class-1 molecules in human natural killer cells. *Ann Rev Immunol.* 1996; 14:619-648
31. Owen RD Immunogenetic consequences of vascular anastomosis between bovine twins. *Science* 1945; 102:400

32. Pan L, Delmonte J Jr., Ferrara JL et al. Pretreatment of Donor Mice With Granulocyte Colony-Stimulating Factor Polarizes Donor T Lymphocytes Toward Type-2 Cytokine Production and Reduces Severity of Experimental Graft-Versus-Host Disease. *Blood* 1995; 12: 4422-4429
33. Piccirillo CA, Shevach E.M Cutting edge: Control of CD8+ T Cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 2001; 167:1137-1140.
34. Rasmussen RA, Counts SL, Schlossmann SF Isolation and characterization of CD 6 T-cells from peripheral blood. *J.Immunol.* 1994; 152:123-133.
35. Reisner Y, Reich-Zeliger S, Zhao Y et al. Anti-Third Party CTL's as Potent Veto Cells: Coexpression of CD8 and Fasl is a Prerequisite. *Immunity*, 2000; 13:507-515.
36. Rodt H, Kolb HJ, Netzel B et al. Effect of anti-T-cell-globulin on GVHD in leukemic patients treated with BMT. *Transplant Proc.*1981; 13:257-261.
37. Rodt H, Netzel B. Thierfelder S et al. Specific adsorbed antithymocyte globulin for incubation treatment in human bone marrow transplantation. *Tranpl. Proc.*1977; 9:187-191
38. Rondelli D, Anasetti C, Fortuna A et al. T-cell Alloreactivity induced by normal G-CSF-mobilized CD34+ blood cells. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21:1183-91
39. Rondelli D, Andrews RG, Hansen JA, Anasetti C Alloantigen Presenting Function of normal human CD34+ hematopoietic cells. *Blood*, 1996; 88:2619-75
40. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Toda M et al. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25) Breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmum diseases. *J. Immunol.*, 1995; 155:1151-1164 .
41. Schuchert M J, Wright R, Yolonda Colson Characterization of a newly discovered T-cell receptor β -chain heterodimer expressed on a CD8+ bone marrow subpoulation that promotes allogeneic stem cell engraftment. *Nature medicine* 2000; 6:904-908.

42. Schumm M, Guenther W, Kolb HJ et al. Prevention of graft- versus-host disease in DLA-haplotype mismatched dogs and hemopoietic engraftment of CD-6 depleted marrow with and without cG-CSF treatment after transplantation. *Tissue antigens*, 1994; 43:170-178.
43. Seddon B, Mason D Regularory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmun thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD 45RC-cells and CD(4+)CD8(-) thymocytes. *J. Exp. Med.*, 1999; 189:279-288.
44. Singer NG, Richardson BC, Powers D et al. Role of the CD6 glycoprotein in antigen-specific and autoreactive responses of cloned human T-lymphocytes. *Immunol.*1996; 88:53-543.
45. Soiffer RJ, Weller E, Ritz J et al. CD6+ donor marrow T-cell depletion as the sole form of graft-versus-host disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic bone marrow transplant from unrelated donors. *J Clin Oncol.* 2001; 19(4):1152-9. Erratum in: *J Clin Oncol* 2001 May 1;19(9):2583.
46. Soiffer RJ, Mauch P, Fairclough D et al. CD6+ T cell depleted alogeneic bone marrow transplantation from genotypically HLA nonidentical related donors. *Biol Blood Marrow transplant.* 1997; 3:11-17.
47. Soiffer RJ, Murray C, Mauch P et al. Prevention of graft-versus-host disease by selective depletion of CD 6-positive T-lymphocytes from donor bone marrow. *J Clin Oncol.* 1992; 10:1191-2000.
48. Soiffer RJ, Weller E, Ritz J et al. Selective T cell depletion of donor allogeneic marrow with anti-CD6 monoclonal antibody: rationale and results. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12:7-10.
49. Sullivan KM, Weiden PL, Storb R et al. Influence of acute and chronic on graft- versus-disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood.* 1989; 73:1720-1728.
50. Swack, Schlossmann SF et al . Structural characterization of CD6: properties of two distinct epitopes involved in T cell activation. *J Mol Immunol.* 1989; 26(11):1037-49.

51. Swack, Rudd CE et al.; Biosynthesis and post-translational modification of CD6, a T cell signal-transducing molecule. *J Biol Chem.* 1991; 266(11):7137-43.
52. Trentin JJ, Judd KP. Prevention of acute graft -versus- host (GVH) mortality with spleen-absorbed antithymoocyte globulin (ATG). *Transplantation Proc.* 1973; 5:865-868
53. Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanism of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13 :437-457.
54. Vartdal F, Albrechtsen D, Ringden O et al. Immunomagnetic treatment of bone marrow allografts. *Bone Marrow Transplant.* 1987; 2:94-98
55. Waldmann HG, Hale G, Cividalli G et al. Elimination of graft- versus- host disease by in vitro depletion of alloreactive lymphocytes with a monoclonal rat anti-human lymphocyte antibody (Campath -1). *Lancet.* 1984; 2:483-486
56. Weiden PL, Flouromy N, Thomas ED, Prentice R, Buckner CD, Storb R. Antileukemic effect of graft-versus-host-disease in recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med.* 1979; 300:1068-1073
57. Wells AD, Li CX, Li Y et al. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat. Med* 1999; 11:1303-7
58. Whitney G, Bowen M, Neubauer M, Aruffo et al. Cloning and characterization of murine CD6. *Mol.Immunol.*1995; 32:89-92

Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H.J. Kolb, Leiter der Knochenmarkstransplantation der Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern der Universität München, für die Überlassung des Themas, seine unermüdliche Geduld und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Dr. med. B.Gyurkocza für die exzellente und diskussionsfreudige Zusammenarbeit.

Frau Dr. Chris Falk möchte ich danken für die geduldige und kompetente Betreuung während der Versuche, sowie für die Bereitstellung der Antikörper.

Das nächste Dankeschön geht an Frau K. Oettrich. Ohne ihre lange Zellkulturerfahrung und niemals ermüdende Hilfsbereitschaft wären viele Versuche nicht zustande gekommen.

Meiner Schwester Frau Dr.med.Ch.Günther möchte ich für die fachkundige und konstruktive Unterstützung während der gesamten Ausarbeitungszeit danken.

Sybille Regn, Silke Raffegerst und Frau Dr. Marie Roskrow seien ganz herzlich gedankt für das Aufrechterhalten eines entspannten und freundschaftlichen Arbeitsklimas.

LEBENS LAUF

Name	Florian Hötzl
Geburtsdatum /-ort	08.03.1974 in München
Familienstand	ledig
Beruf	Arzt

Schulbildung/ Hochschulbildung

1974-1981	Grundschule: "Deutsche Schule Madrid Colegio San Miguel", Spanien
1981-1984	Grundschule: „Grundschule“, München
1984-1991	Deutsche Schule "Escola Corcovado", Rio de Janeiro, Brasilien
1991-1994	Kollegstufe und Abitur: "Louise-Schroeder-Gymnasium", München
1996-2002	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München
1999-2002	Experimenteller Teil der Dissertation bei Prof. Dr. J. H. Kolb Klin. Kooperationsgruppe Hämatopoetische Zelltransplantation und Inst. für Molekulare Immunologie, GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH.
2001-2002	Praktisches Jahr
März 2001	Präsentation der Ergebnisse beim: EBMT in Maastricht 2001, Holland: „Immune Phenotyping of Suppressor Cells in Marrow and Blood Stem Cell Preparations“ F. Hötzl, W. Günther, B. Gyurkocza, K. Öttrich, H-J. Kolb
November 2002	3.Staatsexamen
Seit März 2003	Chirurgische Klinik Martha-Maria-München

München, im Juni 2006

