

Aus der III. Medizinischen Klinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Das Auftreten funktionell eingeschränkter  
GPI-Anker negativer Gedächtnis-T-Zellen nach  
Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Caroline Siefer  
aus Dresden

Riesa, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	7
1 Einleitung.....	10
2 Literaturdiskussion.....	12
2.1 Das Immunsystem.....	12
2.1.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem.....	12
2.1.2 T-Lymphozyten.....	13
2.1.2.1 Kostimulatorische Moleküle .....	14
2.1.2.2 T-Helferzellen .....	15
2.1.2.3 Die zytotoxischen T-Zellen .....	16
2.1.2.4 Reifungsstadien der T-Zelle: Naive T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen .....	17
2.2 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation .....	18
2.2.1 Grundlagen.....	18
2.2.2 Konditionierung und dosisreduzierte Therapieregime .....	19
2.2.3 Zwei Phänomene der Stammzelltransplantation – GvHD und GvL .....	19
2.2.4 Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation .....	21
2.2.5 Gabe von Donor-Lymphozyten-Infusionen.....	22
2.2.6 Was versteht man unter T-Zelldepletion (TCD)?.....	23
2.3 Alemtuzumab.....	23
2.3.1 Charakterisierung .....	23
2.3.2 Virale Infektionen nach Alemtuzumab-Therapie.....	24
2.4 Eine klinische Studie der Universitätsmedizin Mainz.....	25
3 Material.....	27
3.1 Medien.....	27
3.2 Zusätze.....	27
3.3 Zytokine.....	27
3.4 Geräte und Software.....	28
3.5 Verbrauchsmaterial.....	28
3.6 Glaswaren .....	29
3.7 Chemikalien.....	29
3.8 Kits .....	30
3.9 Peptide .....	30
3.10 FACS-Antikörper .....	30
3.11 Übersicht Studienpatienten.....	32

4	Methoden.....	34
4.1	Dichtegrad-Zentrifugation .....	34
4.1.1	Separation mononukleärer Zellen aus Leukozytenfilmen und peripherem Blut („Ficoll“) (100).....	34
4.1.2	Separation von heparinisiertem Knochenmarkblut.....	35
4.1.3	Isolation von CD4 und CD8 T-Zellen („MACS-Isolation“) .....	35
4.2	Einfrieren der Zellen .....	36
4.3	Auftauen der Zellen .....	36
4.4	Zellen zählen .....	37
4.5	Zellkultur.....	37
4.5.1	K562 A <sub>2</sub> / K562 B <sub>7</sub> -Zellen .....	37
4.5.2	TM-Zellen und K32-Zellen .....	38
4.5.3	Restimulationsprotokoll für die T-Zellkultur .....	38
4.5.4	Sort.....	39
4.5.5	Einzelzellkultur für T-Zellen.....	39
4.6	Drei-Tage-Protokoll für die Ausreifung Dendritischer Zellen.....	40
4.7	Durchflusszytometrie .....	40
4.7.1	Allgemein.....	40
4.7.2	FACS-Färbung .....	41
4.7.3	FLAER-Färbung .....	41
4.7.4	Tetramer-Färbung .....	41
4.7.5	FoxP3-Färbung.....	42
4.7.6	Apoptosefärbung .....	42
4.8	Proliferationsassay – CFSE Assay .....	43
4.9	Funktionelle Tests.....	43
4.9.1	IFN- $\gamma$ – Elispot-Assay .....	43
4.9.2	IFN- $\gamma$ Zytokin – Sekretionsassay .....	45
4.9.3	Chrom ( <sup>51</sup> Cr)-release-Assay .....	46
5	Ergebnisse.....	48
5.1	Charakterisierung der Patienten-Lymphozyten mittels FACS.....	48
5.2	Verlust der GPI-Anker unter Alemtuzumabtherapie .....	52
5.3	Knochenmark .....	55
5.4	Kostimulatorische Moleküle .....	58
5.5	CMV-spezifische CD8 T-Zellen.....	60
5.6	CD52 <sup>-</sup> Gedächtnis-T-Zellen nach Alemtuzumabgabe .....	62
5.6.1	Verteilung T <sub>CM</sub> und T <sub>EM</sub> .....	65
5.6.2	Rekonstitution naiver T-Zellen nach HSZT .....	67

5.6.3	Terminale Effektor Zellen.....	70
5.7	CD52-Expression auf regulatorischen T- Zellen.....	71
5.8	Funktionelle Tests.....	72
5.8.1	IFN- $\gamma$ Zytokin-Sekretionsassay .....	72
5.8.2	IFN- $\gamma$ Elispot.....	75
5.8.3	Untersuchung der Zelllyse der T-Zellen im Chrom-release-Assay .....	76
5.9	Proliferation .....	77
5.9.1	Anwendung bestehenden CFSE-Protokolls an den T-Zellen der Transplantationspatienten.....	77
5.9.2	Untersuchung des T-Zellrezeptor V-Beta-Repertoire auf CD8 T-Zellen .....	80
6	Diskussion .....	81
6.1	Die in vivo Alemtuzumabgabe führt zur Expansion GPI-Anker negativer T-Zellen .	81
6.2	Immunrekonstitution unter Alemtuzumab.....	82
6.3	CD52-negative Treg nach Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie .....	83
6.4	Knochenmark .....	84
6.5	Untersuchung Expression kostimulatorischer Signale auf CD52-positiven und -negativen T-Zellen.....	85
6.6	Eingeschränktes T-Zellrezeptor V $\beta$ -Repertoire nach Alemtuzumab-Therapie .....	86
6.7	Einflussfaktoren auf die Gedächtnis-T-Zellen nach allogener HSZT .....	88
6.7.1	Warum treten Gedächtnis-T-Zellen vorwiegend nach HSZT auf? – Die Lymphopenie-induzierte Proliferation.....	89
6.7.2	Rekonstitution naiver T-Zellen nach vorangegangener T-Zelldepletion.....	90
6.7.3	Die Rolle von Gedächtnis-T-Zellen in GvHD .....	92
6.8	CMV-spezifische CD8 T-Zellen als prognostischer Faktor .....	93
6.9	Funktionsverlust GPI-Anker negativer T-Zellen nach Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie .....	95
7	Zusammenfassung .....	96
8	Literaturverzeichnis.....	98
9	Anhang .....	111
9.1	Abbildungsverzeichnis .....	111
9.2	Tabellenverzeichnis .....	112
9.3	Zusammensetzung von verwendeten Medien- und Pufferlösungen .....	113
9.4	Protokolle .....	114
9.4.1	Separation mononukleärer Zellen aus Leukozytenfilm und dem peripheren Blut („Ficoll“) .....	114
9.4.2	Separation heparinisiertes Knochenmarkblut.....	115
9.4.3	Isolation von CD4 und CD8 T-Zellen („MACS Isolation“) .....	115
9.4.4	Einfrieren der Zellen .....	116

9.4.5	Auftauen der Zellen .....	116
9.4.6	Zellkultur für K562, TM, K32 .....	116
9.4.7	Restimulation der T Zellen .....	117
9.4.8	Einzelzellkultur für T-Zellen.....	118
9.4.9	3 Tage Protokoll für die Ausreifung Dendritischer Zellen .....	118
9.4.10	FACS-Färbung .....	119
9.4.11	Proliferationsassay- CFSE Assay .....	121
9.4.12	IFN- $\gamma$ Elispot Protokoll .....	122
9.4.13	IFN- $\gamma$ Zytokin-Sekretionsassay .....	123

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Aplastische Anämie
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino 9-Ethyl Carbazol
AG	Antigen
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
ATG	Antithymozytenglobulin
B-NHL	B-Zell Non Hodgkin Lymphom
BSA	Bovines Serumalbumin
CCRx	Chemokinrezeptor
CD	englisch: cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CSA	Cyclosporin A
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritische Zelle
dest.	destilliert
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elispot	Enzyme-linked Immuno Spot
FACS	Durchflusszytometrie, engl. fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLAER	fluoreszierendes Aerolysin, engl. fluorescent aerolysin
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	Vorwärtslichtstreuung, engl. forward scatter
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
Gr A/B	Granzym A/B
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt Reaktion, engl. graft-versus-host-disease
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie Reaktion, engl. graft-versus-leukemia reaction

HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HS	Humanes Serum
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
ICAM-1	Interzellulläres Adhäsionsmolekül, CD54
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IPEX	Autoimmunerkrankung, engl. immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
k.Z.	keine Zellen
LFA-1/3	Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen
LIP	Lymphopenie-induzierte Proliferation
MACS	Magnet-assoziierte Zellsortierung, engl. magnetic activated cell sorting
MACPF	Membran-Angriff-Komplex
M. Hodgkin	Morbus Hodgkin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. major histocompatibility complex
Mio.	Millionen
MM	Multiplres Myelom
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MZ-L.	Mantelzell-Lymphom
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NRS	Normal rat serum
OKT <sub>3</sub>	Handelsname für Muromab-CD3, monoklonaler Anti-CD3-Antikörper
OMF	Osteomyelofibrose
Patient Nr.	Patient Nummer
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, engl. peripheral blood mononuclear cell
PCP	Pneumocystis-Pneumonie
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PBS	Phosphatpuffer, engl. phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
PGE	Prostaglandin E
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
PTLD	Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
RIC	dosisreduzierte Konditionierung, engl. reduced intensity conditioning

rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SSC	Seitwärtslichtstreuung, engl. sideward scatter
Tbl.	Tabelle
TCD	T-Zell Depletion, engl. T cell depletion
T <sub>CM</sub>	Zentrale Gedächtnis-T-Zellen, engl. central memory T cell
T <sub>EM</sub>	Effektor Gedächtnis-T-Zellen, engl. effector memory T cell
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T-NHL	T-Zell-Non Hodgkin Lymphom
Treg	regulatorische T-Zelle
TSDR	Treg-specific demethylated region
TVZ	Tumorkonzentrationszentrum
TZR	T-Zell Rezeptor
VZV	Varizella-Zoster-Virus
7-AAD	7-Aminoactinomycin

# 1 Einleitung

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) stellt eine kurative Therapie für viele maligne hämatologische Krankheitsbilder, wie Lymphome und Leukämien, dar (1). Durch die eingesetzte Chemo- oder Bestrahlungstherapie zur Konditionierung, also Vorbereitung des Immunsystems des Empfängers auf das Transplantat vom Spender, kommt es dabei allerdings häufig zu Infektionen und einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD) (1). Daraus ergeben sich deutlich erhöhte Risiken für den Einsatz der HSZT bei älteren und vorerkrankten Patienten (2).

In den letzten Jahren wurden neuere Therapieregime für diese Patientengruppe entwickelt. Dazu gehören sogenannte dosisreduzierte Konditionierungsregime (RIC), die eine geringere Toxizität aufweisen und sich verstärkt den therapeutischen Effekt des Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (GvL) zu Nutze machen (3).

Eine dieser klinischen Studien wurde an der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt (4). Die Patienten wurden im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation dosisreduziert konditioniert (5). Zur in vivo T-Zelldepletion (TCD) wurde der monoklonale Antikörper Alemtuzumab (Campath 1-H) eingesetzt (5).

Alemtuzumab, ein monoklonaler Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD52, wird im Rahmen von RIC-Regimen zur T-Zelldepletion verwendet. Durch die TCD soll das Auftreten der GvHD, die mit einer hohen Mortalität einhergeht, reduziert werden (6). Nachteilig stellt sich allerdings die nach Alemtuzumabgabe häufig beobachtete verzögerte Immunrestitution mit einem erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen dar (5, 7).

Bei Patienten, die mit Alemtuzumab behandelt wurden, konnte man, im Gegensatz zu gesunden Probanden, das Auftreten von CD52-negativen T-Zellen nachweisen (8, 9). In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits durch Vorarbeiten der Verlust des Oberflächenmarkers CD52 auf T-Zellen nach Gabe von Alemtuzumab bestätigt werden. Zudem korreliert der Verlust von CD52 mit dem Fehlen von Glykosylphosphatidylinositol-Ankern (GPI-Anker) und weiterer GPI-verankerter Moleküle. Experimentell zeigte sich, dass CD52-negative T-Zellen eine eingeschränkte antigenspezifische T-Zellantwort, sowohl für Zytomegalievirus (CMV) als auch Epstein-Barr-Virus (EBV), aufweisen (10, 11).

Ziel meiner Arbeit ist, phänotypische und funktionelle Aspekte der CD52-negativen T-Zellen nach einer Alemtuzumab-basierten Konditionierungstherapie, im Unterschied zu den CD52-positiven T-Zellen, weiter zu untersuchen. Dabei standen die für die immunologische Antwort bedeutenden Gedächtnis-T-Zellen im Vordergrund. In den letzten Jahren hat man herausgefunden, dass zur Abwehr von Infektionen die Gedächtnis-T-Zellen existenziell sind (12). Bei einer Reinfektion können sich diese Gedächtnis-T-Zellen rasch teilen und den pathogenen Erreger bekämpfen (13). Durch die Konditionierung im Rahmen der HSZT kommt es zur Suppression des angeborenen und erworbenen Immunsystems (14). Während das angeborene Immunsystem nach der HSZT vergleichsweise schnell regeneriert, kommt es auf Seiten des erworbenen Immunsystems zu einem langanhaltenden Defizit mit einem einhergehenden erhöhten Risiko für Infektionen (14).

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Regeneration von naiven T-Zellen nach HSZT, die ein Zeichen für eine antigenspezifische Immunantwort darstellen (15). In meiner Arbeit werden somit weitere Grundlagen für das Verständnis der Immunrekonstitution nach der Gabe von Alemtuzumab und mögliche Ursachen für das erhöhte Infektionsrisiko nach Gabe des Antikörpers geschaffen.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Das Immunsystem

Bereits von Geburt an muss sich der Körper des Menschen jeden Tag mit pathogenen Erregern auseinandersetzen. Zur Abwehr von Bakterien, Viren und Pilzen besitzt der menschliche Organismus chemische, mikrobiologische und physikalische Schutzbarrieren (16). Da diese genannten Abwehrmechanismen nicht ausreichen, verfügt der Mensch über ein Immunsystem. Zytokine, Abwehrzellen, lymphatische Organe und humorale Faktoren bilden dieses komplexe Netzwerk aus (16, 17).

Das Immunsystem lässt sich in die angeborene und die erworbene Immunität teilen (16). Diese beiden Teilbereiche des Immunsystems stehen in enger Interaktion zueinander (17-19).

#### 2.1.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht bereits ohne Erregerkontakt, ist unspezifisch und kann kein Gedächtnis ausbilden (16, 19, 20). Es umfasst eine zelluläre und eine humorale Komponente. Zur zellulären Ebene gehören neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten (17, 19). Das Komplementsystem, Akute Phase Proteine und Zytokine, wie Interferone und Interleukine, bilden die humorale Ebene (16). Die erworbene Immunität hingegen entsteht nach dem ersten Kontakt mit Erregern und wird durch die T-Lymphozyten und B-Lymphozyten gebildet (18, 19). Antigen-präsentierende Zellen (APZ), wie Langerhans-Zellen und Dendritische Zellen (DC), sind für die antigenspezifische T-Zellstimulation verantwortlich (18). Der auf der Oberfläche vorhandene antigenspezifische T-Zellrezeptor erkennt die von den APZ präsentierenden Peptide. Es kommt zur weiteren T-Zellaktivierung und Effektorfunktion der T-Zellen (17).

## 2.1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark aus lymphatischen Vorläuferzellen und wandern zur weiteren Differenzierung zum Thymus (16). Die T-Zellen verlassen den Thymus nach einigen Selektionsschritten als naive T-Zellen (21). Die im Blut- und Lymphsystem zirkulierenden naiven T-Zellen erkennen nur Antigene, die durch APZ prozessiert und auf der Oberfläche über Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexe (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC) präsentiert werden (22). Diese antigenspezifischen T-Zellen proliferieren zu Effektor-T-Zellen und können somit Krankheitserreger abwehren (23). Ein Teil dieser T-Zellen differenziert sich zu Gedächtnis-T-Zellen (23).

T-Zellen weisen auf ihrer Oberfläche Leukozyten-Differenzierungsantigene auf, die mit Hilfe des CD-Systems (engl. Cluster of differentiation) eingeteilt werden (16, 18, 24, 25). Diese Differenzierungsantigene sind charakteristische Oberflächenmoleküle und können Aufgaben wie Signaltransduktion, Zell-Zell-Kontakt, Zytokinrezeptoren, Rezeptor- oder Enzym-Funktion beinhalten (24). In der nachfolgenden Tabelle ist eine Auswahl an CD-Antigenen dargestellt, die im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung sind (siehe Tabelle 1).

CD-Antigen	Zellart	Funktion
<b>CD3</b>	T-Zelle	Signaltransduktion, T-Zellrezeptor
<b>CD4</b>	T-Helferzelle	Corezeptor für MHC-II Moleküle
<b>CD8</b>	Zytotoxische T-Zelle	Corezeptor für MHC-I Moleküle
<b>CD28</b>	T-Zelle	zur Bindung CD 80/86, mit CD 3 costimulatorische Wirkung auf T-Zellen
<b>CD52</b>	Lymphozyten, Epithelzellen, Monozyten	Unbekannt
<b>CD54</b>	T-Zelle, B-Zelle	Adhäsionsmolekül
<b>CD55</b>	alle Zellen	bindet C3b
<b>CD58</b>	alle Zellen	zur Zell-Zell-Adhäsion befähigt
<b>CD59</b>	T-Zelle, NK-Zelle, Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten	bindet C8/C9, Verhinderung MAC-Zusammensetzung
<b>CD137</b>	B-Zelle, aktivierte T-Zelle	Kostimulatorisches Molekül

Tabelle 1: Auswahl einiger CD-Antigene, modifiziert nach (26)

Alle T-Zellen zeichnen sich durch ein CD3-Molekül auf der Zelloberfläche aus (25). Die reifen CD3-Lymphozyten werden in die zwei Subpopulationen, CD4 T-Lymphozyten (T-Helferzellen) und CD8 T-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen), unterteilt (16). Zu Beginn ihrer Entwicklung exprimieren die T-Zellen sowohl CD4 als auch CD8 auf ihrer Oberfläche (21). Während der Reifung wird schließlich nur noch ein Molekül auf der Zelloberfläche getragen (16).

Das CD3-Molekül bildet einen Komplex mit dem T-Zellrezeptor (TZR) und ist somit zur intrazellulären Signaltransduktion und T-Zellstimulation befähigt (27). Der T-Zellrezeptor setzt sich aus einem Heterodimer von  $\alpha/\beta$  Ketten oder in  $< 10\%$  der Fälle aus  $\gamma/\delta$  Ketten zusammen (25). Jede dieser Ketten enthält jeweils eine dominante und eine variable Region (16). Durch die verschiedenen Prozesse, wie Schneiden und Spleißen der V-, D-, J- und C-Segmente, werden die variablen Regionen modifiziert und es entsteht eine Vielzahl von T-Zellrezeptoren (16, 28, 29). Die große Bandbreite an T-Zellrezeptoren ermöglicht dem erworbenen Immunsystem, auf unterschiedliche pathogene Erreger reagieren zu können (30). Der auf der Oberfläche der T-Zelle exprimierte T-Zellrezeptor ist dabei Antigen-spezifisch. Diese Vorgänge finden im Thymus, vor allem in jungen Lebensjahren, statt. Mit zunehmendem Alter nimmt die Bildung der TZR ab (30, 31).

#### 2.1.2.1 Kostimulatorische Moleküle

Zur T-Zellaktivierung werden zwei wichtige Abläufe benötigt: Als erstes müssen APZ prozessierte Peptide mit Hilfe von MHC-Molekülen präsentiert werden (32). Als zweites werden kostimulatorische Signale zur Interaktion zwischen T-Zelle und APZ notwendig (32).

Zu den Bekanntesten gehört der CD80/86 (B7) / CD28-Komplex, der ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist (33). Dadurch kann neben der T-Zellaktivierung durch IL2-Produktion, auch die Immunantwort geregelt werden (32, 34). Die schwerwiegenden Folgen bei Störungen dieses Signalweges kann man an Mausmodellen, die eine CD28-Defizienz aufweisen, untersuchen. Hier ist eine regelrechte T-Zellantwort auf Infektionen mit Bakterien und Viren völlig unmöglich (35).

Das Glykoprotein CD28 ist auf der Oberfläche von naiven T-Zellen zu finden (36). Die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen wird ebenfalls durch CD28, aber auch durch CD58, ein weiteres kostimulatorisches Molekül, reguliert (34, 37).

CD58 oder auch Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 3 (LFA-3) wird auf APZ, Erythrozyten, Fibroblasten, endothelialen Zellen und Thymusepithel exprimiert (38). Dabei existiert eine transmembrane und eine GPI-verankerte Form des Moleküls (38). Das Oberflächenmolekül CD58 bindet an CD2 der T-Zellen und ist somit ebenfalls kostimulatorisch an der T-Zellaktivierung, vor allem auch von regulatorischen T-Zellen, beteiligt (37). In Experimenten hat man eine unterschiedliche Regulation des Moleküls in unterschiedlichen Zelltypen entdeckt. Bei Entzündungen ist CD58 hochreguliert, währenddessen z.B. bei bestimmten Karzinomen CD58 herunter reguliert ist. Dies kann ein Mechanismus dafür sein, dass Krebszellen so dem Immunsystem entgehen (38).

CD54 oder auch Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und ist auf der Oberfläche von Leukozyten und Endothelzellen zu finden (39). Zu den Funktionen des Oberflächenmoleküls zählt die Migration der Leukozyten zum entzündeten Gewebe (39). Eine weitere Aufgabe ist die Interaktion zwischen T-Zelle und APZ mit Hilfe des Liganden Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 1 (LFA-1) (40). Außerdem ist CD54 bei einigen Karzinomen, wie z.B. Kolorektales Karzinom, vermehrt zu finden (40).

Ein weiteres kostimulatorisches Molekül ist das zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie gehörige CD137, welches auf aktivierten CD4 und CD8 T-Zellen zu finden ist (41). Zusätzlich ist es auch auf DC, NK-Zellen und regulatorischen T-Zellen vorhanden (42). CD137 bewirkt eine verstärkte zytolytische Aktivität der T-Zellen und ist somit heutzutage ein Angriffspunkt in der Krebstherapie mit einer guten Erfolgsrate (42).

#### 2.1.2.2 T-Helferzellen

CD4 T-Zellen unterstützen die Immunantwort indem sie durch Zytokinausschüttung andere Zellen zur Abwehr aktivieren (25). Th1-, Th2-, Th17- und regulatorische T-Zellen (Treg) sind Untergruppen der T-Helferzellen (20). Interleukin 2 (IL 2), welches von TH1-Zellen gebildet wird, stimuliert unter anderem die T-Zellproliferation

(27). Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) wird zur Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen von Th1-Zellen gebildet (20, 27). Th2-Zellen sezernieren Interleukin 4, Interleukin 5, Interleukin 6 und 10. Vor allem IL-4 ist für die Ausreifung der B-Zelle zur antikörperproduzierenden Plasmazelle verantwortlich (27). Die Th2-Zellen schützen somit den Organismus vor allergischen Reaktionen und Parasiten (20). Bakterien und Pilze werden durch die Th17-Zellen eliminiert, indem sie die Aktivierung von Neutrophilen einleiten (20, 25)

Die regulatorischen T-Zellen, die im Thymus entstehen, sind zur Hemmung einer überschießenden Immunantwort sowie einer Ausbildung von Selbsttoleranz befähigt (43). Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle bei immunregulatorischen Prozessen, wie Autoimmunität, Tumoren, Transplantatabstoßung, Impfung, Infektionen und GvHD (25, 43, 44). Sie können CD4 und CD8 T-Zellen, sowie DC, NK-Zellen und B-Lymphozyten entweder durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch Ausschüttung inhibierender Zytokine in ihrer Fähigkeit zur Proliferation, Aktivierung und Effektorfunktion supprimieren (43). Sie sind charakterisiert durch die Koexpression von CD4 und CD25 auf der Oberfläche und dem Transkriptionsfaktor FoxP3 intrazellulär (43, 45). FoxP3 ist ein typischer Marker für die Treg und ist wichtig für die Funktion und Entwicklung der Zellen (44).

### 2.1.2.3 Die zytotoxischen T-Zellen

CD8 T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen (CTL) genannt, können Tumorzellen und virusinfizierte Zellen Antigen-abhängig z.B. durch das Einbringen von Perforinen in die Zellmembran töten und spielen somit ebenfalls eine wichtige Rolle in der Immunabwehr (46, 47). Es befinden sich neben den Perforinen im rauen Endoplasmatischen Retikulum auch Granzyme (Serinproteasen) in den zytotoxischen Granula (48).

Die Hauptthese ist, dass Perforine die Zellmembran der Zielzelle für die Granzyme durchlässig werden lassen (25). Der genaue Mechanismus muss durch weitere Experimente allerdings noch hinreichend geklärt werden. Die in die Zielzelle eingedrungenen Granzyme sorgen dann für die DNA-Fragmentierung und leiten die Zellapoptose ein (17, 25).

Neben dem Zelltod durch Granzyme, führt noch ein weiterer Weg zur Apoptose der Zielzelle durch zytotoxische T-Lymphozyten. Dafür verantwortlich sind die auf den CTL vorhandenen Rezeptoren (FAS-Liganden) (25).

#### 2.1.2.4 Reifungsstadien der T-Zelle: Naive T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen

Gedächtnis-T-Zellen (engl. memory cells) sind eine Reifungsstufe der T-Zelle und ein wichtiger Bestandteil des humanen spezifischen Immunsystems (45). Die naiven CD4 und CD8 T-Zellen werden durch Antigenkontakt zu Effektor-T-Zellen aktiviert (23). Ein Teil dieser Effektorzellen wird dann schließlich zur Gedächtnis-T-Zelle (23). Durch Proliferation und Differenzierung kommt es zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses und somit bei erneutem Antigenkontakt zur stärkeren und rascheren Immunantwort (49). Eine wichtige Aufgabe des immunologischen Gedächtnisses stellt somit der effektive Schutz vor Reinfektionen dar (12).

Der wichtigste Unterschied zwischen Gedächtnis-T-Zellen und naiven T-Zellen stellt die Fähigkeit zur raschen Teilung dar (50). Die Gedächtnis-T-Zellen weisen im Gegensatz zu den naiven T-Zellen zudem eine geringere Vielfalt ihrer TZR auf (51). Der Oberflächenmarker CD45RO ist auf den Gedächtnis-T-Zellen zu finden, während CD45RA auf naiven T-Zellen vorhanden ist (52).

Gedächtnis-T-Zellen können sowohl für CD4 und CD8 T-Zellen nachgewiesen werden (52). Man unterscheidet zwei Typen von Gedächtnis-T-Zellen, die sich aus naiven T-Zellen im Thymus durch Antigenpräsentation mit Hilfe von Dendritischen Zellen entwickeln und die, die viele Jahre persistieren: Effektor Memory T-Zellen und Central Memory T-Zellen. CCR7, ein Chemokin-Rezeptor und CD62L, die für die Migration zu sekundären lymphatischen Organen verantwortlich sind, sorgen für die Unterscheidung der Effektor Memory T-Zellen ( $T_{EM}$ ) von Central Memory T-Zellen ( $T_{CM}$ ) (23, 53). Die  $T_{EM}$  exprimieren kein CCR7 und kein CD62L auf ihrer Zelloberfläche. Sie migrieren in peripheres Gewebe und entzündliches Milieu und zeigen direkte inflammatorische oder zytotoxische Effektorfunktion (52). Diese Zellen haben die Möglichkeit  $IFN\gamma$ , IL4 und gespeichertes Perforin für die immunologische Abwehr freizusetzen (23). Im Gegensatz zu den naiven T-Zellen bewirken die  $T_{EM}$  eine raschere Immunabwehr durch eine schnellere Zytokinsekretion, Zellteilung und Proliferation bei geringeren Antigenkonzentrationen (54). Die CCR7-positiven und CD62L-

positiven  $T_{CM}$  migrieren in sekundäre lymphatische Organe und stimulieren DC- oder B-Zellen.  $T_{CM}$  besitzen keine direkte Effektor-Funktion, aber das Potenzial, sich in  $T_{EM}$ -Zellen zu differenzieren (52, 53, 55). Studien zeigten, dass  $T_{CM}$  vor allen bei akuten Infektionen auftreten, während  $T_{EM}$  vorrangig bei chronischen Infektionen oder nach mehrmaliger Impfung zu finden sind (52).

## **2.2 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation**

### 2.2.1 Grundlagen

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) stellt ein Verfahren zur Übertragung von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen dar (1). 1968 wurde die erste HSZT mit Stammzellen aus dem Knochenmark durchgeführt (56).

Von allogener HSZT spricht man, wenn Empfänger und Spender nicht genetisch identisch sind (1). In diesem Fall wird ein Familienspender oder ein Spender über ein Register mit passenden HLA-Merkmalen gesucht (57). Die weitgehende Übereinstimmung der HLA-Merkmale von Spender und Empfänger sind für eine erfolgreiche HSZT relevant (58). Die allogene HSZT dient als Therapie für viele maligne hämatologische Erkrankungen, wie Akute myeloische Leukämie (AML), Chronische myeloische Leukämie (CML), Chronische lymphatische Leukämie (CLL), Aplastische Anämie (AA) und Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie (PNH), aber auch für Blutbildungsstörungen, wozu z.B. die Thalassämie gehört. Probleme bei dieser Therapieform ergeben sich durch das Auftreten von opportunistischen Infektionen, Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD) und durch eine Medikamenten-bedingte Toxizität (1).

Als Stammzellquellen bei allogener HSZT dienen neben dem Knochenmark heute auch durch Granulozyten-Kolonie-stimulierte Faktoren (G-CSF) behandelte mononukleäre Zellen aus dem peripherem Blut (PBMC) und Nabelschnurblut (1, 56). Die Entdeckung, dass PBMC und Nabelschnurblut auch Stammzellen enthalten und für HSZT genutzt werden können, brachte einen großen Fortschritt (56). Dabei ist die PBMC-Stammzelltransplantation heute die am häufigsten angewandte Methode (59). Vorteile gegenüber Knochenmarkpunktat liegen bei der PBMC-Stammzelltransplantation in der deutlich niedrigeren Invasivität (periphere Entnahme aus der Vene) (57),

schnelleren Regeneration der hämatopoetischen Zelllinie und T-Zellen und einer geringeren Infektionsrate (1). Nachteilig ist ein höheres Risiko für das Auftreten einer chronischen GvHD (1).

### 2.2.2 Konditionierung und dosisreduzierte Therapieregime

Vor einer HSZT wird eine Bestrahlungs- oder Chemotherapie mit einer hohen Dosis beim Patienten durchgeführt. Diese sogenannte Konditionierung dient der Verringerung der Tumorzellen und soll zusätzlich eine Immunsuppression beim Patienten bewirken, damit eine Transplantatabstoßung möglichst verhindert wird (60). Um auch älteren und multimorbiden Patienten die kurative Behandlungsmöglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation anzubieten, wurden Konditionierungsregime entwickelt, die weniger auf die hochdosierte Chemo- oder Bestrahlungstherapie und somit die Chemotherapiewirkung setzen, sondern auch den therapeutischen Effekt des neuen Immunsystems (GvL) mit einbeziehen (61).

Bei der dosisreduzierten Konditionierung erhalten die Patienten zur Konditionierung geringere Strahlendosen oder weniger toxische Zytostatika, um die Intensität der Therapie und die damit verbundenen Nebenwirkungen zu minimieren (61, 62). RIC-Regime nehmen eine Zwischenstellung zwischen myeloablativen und nicht-myeloablativen Verfahren ein. Im Gegensatz zu nicht-myeloablativen Therapien tritt bei RIC eine Panzytopenie ein und eine Stammzellübertragung ist notwendig (61, 63, 64). Von nicht-myeloablativ spricht man, wenn die Hämatopoese des Patienten durch die Chemo- oder Bestrahlungstherapie nicht komplett zerstört wird und sich grundsätzlich auch selbständig erholen könnte (64). Als Medikamente werden Purinanaloga (Fludarabin) in Kombination mit alkylierende Agenzien (Busulfan, Melphalan, Idarubicin, Cytarabin, Cyclophosphamid) eingesetzt (62, 65).

### 2.2.3 Zwei Phänomene der Stammzelltransplantation – GvHD und GvL

Die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion, auch unter dem Namen Graft versus Host Disease (GvHD) bekannt, ist eine unerwünschte Reaktion, bei der Spenderzellen gesundes Patientengewebe angreifen und schädigen (66). Billingham entdeckte

1966, dass immunkompetente T-Lymphozyten vom Spender das Empfängergewebe erkennen und angreifen (67). Durch die therapieassoziierte Immunsuppression besteht eine verminderte Immunabwehr des Transplantatempfängers (68) und somit ist das Risiko einer GvHD erhöht. GvHD trägt entscheidend zur Mortalität und Morbidität nach allogener HSZT bei (67). Mit einer Inzidenz von 10-80% stellt sie eine häufige Komplikation der Stammzelltransplantation dar (67).

Man kann zwischen akuter und chronischer GvHD unterscheiden. Diese wurde früher anhand des Auftrittszeitpunkts nach Transplantation vorgenommen, wobei man bei unter 100 Tagen nach HSZT von akuter und darüber hinaus von chronischer GvHD sprach (69). Im klinischen Verlauf beobachtete man allerdings auch Zeichen von chronischer GvHD unter 100 Tagen (69). Heute wird die akute GvHD nach entsprechender Organbeteiligung von Haut, Leber und Darm in vier Stadien je nach Schweregrad eingeteilt (67, 70-72). Filipovich et al (73) revolutionierten die Einteilung der chronischen GvHD und entwickelten ein neues Scoring-System zur Verbesserung der Therapie. Chronische GvHD liegt vor, wenn sich ein typisches klinisches Symptom, wie z.B. Poikilodermie, zeigt (73). Zusätzlich müssen andere zutreffende Diagnosen ausgeschlossen werden und ein deutlicher Unterschied zur akuten GvHD bestehen (73). Die chronische GvHD wird weiter in eine limited (lokalisierte) und extended (generalisierte) Form unterschieden (73). In der Klinik sieht man auch Formen, die sowohl Kriterien der akuten als auch der chronischen GvHD aufweisen (67). Hier spricht man von einem Overlap-Syndrom (73).

Eine wichtige Rolle beim Auftreten der GvHD spielen neben dem Alter des Patienten und vorherigen Therapien vor allem die HLA-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Bei nicht-verwandten Spendern tritt die unerwünschte Reaktion gehäuft auf (66). Trotz der Prophylaxe durch immunsuppressive Medikamente wie Cyclosporin-A (CSA) sowie Alemtuzumab zur T-Zelldepletion kann eine GvHD auftreten. Als Therapie der GvHD werden Steroide eingesetzt (70).

Ein weiterer Effekt, der eng mit dem Auftreten von GvHD vergesellschaftet ist, ist der erwünschte Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt bei allogener HSZT. Dabei ist eine deutliche Abgrenzung zwischen GvHD und GvL sehr schwierig (74). Unter GvL versteht man, dass das Immunsystem des Spenders die entarteten Zellen des Empfängers angreift und bekämpft (75, 76). Dieser Prozess benötigt Zeit und kann bis zu einem Jahr z.B. nach Gabe einer Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) auftreten (77).

Eine wichtige Voraussetzung von GvL ist der genetische Unterschied zwischen dem Empfänger und Spender (74). Entdeckt wurde der wichtige GvL-Effekt durch den Einsatz von nicht-myeloablativen Behandlungen mit dem Ergebnis der kompletten Remission bei hämatologischen Erkrankungen. Ebenfalls wurden komplette Remissionen bei der Gabe von DLI oder auch trotz Reduzierung der Immunsuppression bei noch vorhandener Tumorrestkrankung beobachtet (74). Als die hauptverantwortlichen Zellen werden CD4 und CD8 T-Zellen sowie NK-Zellen vom Spender-Immunsystem gesehen (74). In Studien wird immer wieder untersucht, wie man den positiven GvL-Effekt erhöhen kann und gleichzeitig das einhergehende GvHD-Risiko minimieren kann (74).

#### 2.2.4 Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation

Die vollständige Regeneration des Immunsystems kann bis zu zwei Jahre nach HSZT andauern und ist vor allem bei älteren Menschen verzögert. Zuerst erholen sich die neutrophilen Granulozyten, daraufhin rekonstituieren auch Monozyten, NK-Zellen, Thrombozyten und Erythrozyten (1). Das lang andauernde Defizit des Immunsystems ist bedingt durch die langsame Regeneration der T- und B-Zellen, die mindestens 2-8 Monate beträgt. Auch bei milderer Konditionierung werden die gleichen Verläufe beobachtet, da zur Vorbeugung der Graft-versus-Host-Disease eine ausreichende Immunsuppression erforderlich ist (1). Die neu entstandene Abwehr gleicht dem naiven Immunsystem eines Kindes, sodass z.B. erneut Impfungen durchgeführt werden müssen. Die NK-Zellen und B-Zellen entwickeln sich innerhalb von 1-2 Monaten aus lymphatischen Vorläuferzellen. Bei den B-Zellen beobachtet man nach Transplantation eine Reifungsstörung mit einem einhergehenden Antikörper-Mangel (1). Daneben ist auch die T-Zellrekonstitution beeinträchtigt. Hieraus resultiert eine länger anhaltende Abwehrschwäche gegenüber Krankheitserregern (vor allem opportunistischen Infektionen mit CMV und EBV) nach Transplantation (1).

Es gibt zwei Wege der T-Zellrekonstitution: die T-Zellen können Thymus-abhängig als naive T-Zellen regenerieren und dann peripher expandieren oder als Gedächtnis-T-Zellen aus dem Transplantat proliferieren. Zeitig nach Transplantation findet man vorwiegend die Thymus-unabhängige Rekonstitution und erst im späteren Verlauf die de novo Entwicklung von T-Zellen durch den Thymus (78). Die Vielfalt der TZR ist

abhängig von der Neusynthese von naiven T-Zellen. Durch den Alterungsprozess, die Bestrahlung, Entstehung von GvHD und den Einsatz von Zytostatika wird die Fähigkeit der Rekonstitution naiver T-Zellen durch den Thymus zunehmend verringert (14). Bei älteren Patienten findet man im Gegensatz zu jüngeren deutlich seltener eine T-Zellregeneration über den Thymus-abhängigen Weg (1, 79) und somit ein geringeres T-Zellrezeptor-Repertoire, welches mit einer defizitären T-Zellabwehr einhergeht (80).

Als Marker für die vollständige Immunkompetenz wird häufig die Regeneration der CD4 T-Zellen genutzt, da diese deutlich länger als bei den CD8 T-Zellen dauert (1). Damit geht eine Verringerung von Infektionen einher. In der Regenerationszeit kann man laborchemisch eine verminderte CD4/CD8-Ratio, wie auch bei HIV-Patienten, nachweisen. Als wichtige Grenze mit deutlich erhöhtem Risiko für opportunistische Infektionen wird eine CD4 T-Zellzahl von < 200 Zellen/ $\mu$ l angesehen (1, 81).

#### 2.2.5 Gabe von Donor-Lymphozyten-Infusionen

Kolb et al beschrieben bereits 1990 den erfolgreichen Einsatz von Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) bei dem Auftreten von Rezidiven bei CML-erkrankten Patienten (82). Zunehmend werden heutzutage Donor-Lymphozyten-Infusionen im Verlauf allogener Stammzelltransplantationen zur Remissionserhaltung z.B. bei CML eingesetzt (4, 7). Bei nicht-myeolablativen Verfahren werden sie vor allem für die Möglichkeit, einen gemischten Chimärismus in einen kompletten Chimärismus zu verwandeln, genutzt (77). Ein großes Problem, wie schon oben erwähnt, stellt das erhöhte GvHD-Risiko nach DLI-Gabe dar. So zeigten Kolb et al, dass eine spätere Gabe von DLI ein geringeres GvHD-Risiko mit sich bringt, im Gegensatz zur frühzeitigen Gabe unter zwei Monaten nach Transplantation (77). In Studien erkannte man, dass CD8-depletierte DLI, die Gefahr der GvHD senken können (7).

Das Hauptziel von DLI-Gaben ist, den GvL-Effekt auszunutzen und somit ein Rezidiv der hämatologischen Erkrankung zu verhindern (77). Es findet eine beschleunigte Immunrekonstitution statt und kann somit das Risiko von opportunistischen Infektionen senken (7). Meyer et al sahen als Merkmal der verbesserten Immunrekonstitution eine signifikante Erhöhung der CD4 T-Zellen in den Blutproben nach DLI-Gabe (7).

## 2.2.6 Was versteht man unter T-Zelldepletion (TCD)?

Die T-Zelldepletion bei allogener HSZT soll das Auftreten von GvHD verringern und damit eine entscheidende Senkung der Mortalität nach HSZT bewirken (83, 84). Weitere Vorteile zeigen sich in der geringeren Organtoxizität. Allerdings weist die TCD auch Nachteile auf. Dazu zählen eine höhere Inzidenz der Transplantatabstoßung vor allem bei CML-Patienten, ein höheres Risiko von CMV-Reaktivierungen und Epstein-Barr-Virus-assoziierten lymphoproliferativen Funktionsstörungen (83). Durch die T-Zelldepletion treten gehäuft opportunistische Infektionen auf, da eine verzögerte Immunrekonstitution mit einer deutlich verminderten Anzahl und eingeschränkter Funktionalität der CD4 und CD8 T-Zellen auftritt. Außerdem zeigt sich ein nur beschränktes TZR-Repertoire, welches ebenfalls zur schlechten Abwehr gegenüber Infektionen beiträgt (83, 84).

Neben den immunologischen TCD-Methoden mit dem Einsatz monoklonaler Antikörper, wie CAMPATH-1H *in vitro* und *in vivo* und Antithymozytenglobulin (ATG), existieren auch physikalische Möglichkeiten durch Agglutination mit Phyttagglutinin und anschließende Behandlung durch Schafs-Erythrozyten sowie die Zellseparation durch Zentrifuge oder Dichtegradientenzentrifugation (83). Kombinierte Verfahren stellen die CD34<sup>+</sup> Selektion durch immunomagnetische Beads und die Agglutination durch Saubohnen und monoklonalen Antikörpern dar (83).

## 2.3 Alemtuzumab

### 2.3.1 Charakterisierung

Alemtuzumab, auch Campath-1H genannt, ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler IgG1 Antikörper, der gegen CD52 gerichtet ist und zur TCD eingesetzt wird (6). Bisher ist nur wenig über CD52, ein GPI-verankertes Molekül, das zwölf Aminosäuren umfasst, bekannt (6, 85, 86). Es wird vermutet, dass CD52 eine Rolle in der T-Zellmigration und Kostimulation einnimmt (6, 87). CD52 wird auf Lymphozyten, Eosinophilen, Makrophagen, Monozyten und DC exprimiert. Dagegen weisen Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten dieses Merkmal nicht auf. Desweite-

ren wurde der Oberflächenmarker im Ductus deferens und Epididymidis gefunden (6, 88).

Die Lyse der Zielzellen durch Alemtuzumab findet Komplement-vermittelt und Antikörper-abhängig statt (6, 88). Ursprünglich stammte der Antikörper von Ratten und wurde durch eine Pathologieabteilung von Cambridge weiterentwickelt, um ihn für hämatologische Therapien beim Menschen zugänglich zu machen (88).

Haupteinsatzgebiet von Alemtuzumab war früher vor allem bei einem Rezidiv oder refraktärem Stadium der Chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) anzusehen (85). Auch bei RIC-Regimen zur Konditionierung wird Alemtuzumab eingesetzt (85). Weitere Anwendungen findet Alemtuzumab auch bei nicht-malignen Erkrankungen wie Multiple Sklerose und Rheumatoider Arthritis durch seine Eigenschaft, T-Zellen zu depletieren (85, 86).

Mit dem Einsatz von Campath-1H kann das Risiko von akuter GvHD auf 2-20% und von chronischer GvHD auf 0-13% und damit auch die einhergehende Mortalität gesenkt werden (89). Es wird angenommen, dass durch geringere Gewebeerstörung durch Alemtuzumab weniger inflammatorische Zytokine frei werden und so das GvHD-Risiko gesenkt wird (90).

Nachteile ergeben sich durch die verzögerte Immunrekonstitution und das erhöhte Risiko opportunistischer Infektionen, wie CMV und EBV (87, 91). Patienten, die mit Alemtuzumab behandelt worden sind, weisen vor allem sechs Monate nach Alemtuzumabgabe ein deutlich erhöhtes Infektionsrisiko durch Neutropenie, depletierte T-Lymphozyten und ein eingeschränktes TZR-Repertoire auf (92).

### 2.3.2 Virale Infektionen nach Alemtuzumab-Therapie

In klinischen Studien beobachtete man eine verzögerte Immunrekonstitution und damit einhergehend ein erhöhtes Risiko für CMV- und EBV-Reaktivierung bei einer T-Zelldepletion durch Alemtuzumab (83).

Eine Infektion mit dem Zytomegalievirus, der zu der Familie der Herpesviren gehört, ist in der Bevölkerung weit verbreitet und zeigt bei einer Erstinfektion nach der Geburt meistens einen asymptomatischen Verlauf. Die Viren verbleiben latent im Körper

und können im Falle einer Abwehrschwäche reaktiviert werden (93). Durch die spezifische und die humorale Immunantwort eines immunkompetenten Organismus kann die Infektion in der Regel kontrolliert werden. Eine entscheidende Rolle bei der CMV-Abwehr spielen NK-Zellen und T-Zellen (94). Gefährlich wird CMV für immunsupprimierte Patienten (nach Transplantation, HIV) durch die verminderte Abwehr von Erregern infolge der verringerten CD4 T-Zellen. Es können z.B. eine schwerwiegende CMV-Pneumonie, CMV-Kolitis oder ein Befall der Retina mit Erblindung die Folge sein (93).

Bei 30-90% der Patienten kann man nach allogener Stammzelltransplantation eine Reaktivierung mit CMV beobachten (95). Vor allem in den ersten drei Monaten nach Transplantation ist das Risiko einer Reaktivierung am höchsten und somit das Screening von CMV am wichtigsten (95). Mit Hilfe des Nachweises des pp65-Proteins oder des CMV-Genoms durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann man frühzeitig eine Reaktivierung von CMV durch eine Blutuntersuchung detektieren (95). Ein rasches Erkennen der Virusreplikation und die schnelle Therapie z.B. mit Ganciclovir tragen entscheidend zur Morbiditäts- und Mortalitätssenkung bei (95).

## **2.4 Eine klinische Studie der Universitätsmedizin Mainz**

In der III. Medizinischen Klinik der Universität Mainz werden in einer klinischen Phase I/II-Studie Patienten nach dem dosisreduzierten Fludarabin/Melphalan Konditionierungsregime in Kombination mit einer Alemtuzumab-basierten TCD allogene Stammzelltransplantiert. Es wurden Patienten eingeschlossen, die eine Indikation für eine allogene Stammzelltransplantation hatten, aber zeitgleich eine Kontraindikation für eine konventionelle hochdosierte Konditionierungstherapie aufwiesen (7).

Zur *in vivo* T-Zelldepletion wird zusätzlich der monoklonale humanisierte anti-CD52 Antikörper Campath 1H / Alemtuzumab eingesetzt – hierdurch soll das Engraftment verbessert und die GvHD-Inzidenz gesenkt werden (7). Diese Kombination aus RIC und TCD ermöglicht somit auch eine Behandlungsoption für ältere und multimorbide Patienten, sowie für Patienten ohne HLA-identen Spender (96).

Meyer et al zeigten, dass durch Alemtuzumab das Risiko der GvHD reduziert wird und dennoch ein erfolgreiches Anwachsen (Engraftment) des Transplantates stattfindet (4). Diese Aussagen konnten auch Kottaridis et al mit ähnlichem Studienproto-

koll bestätigen (5). Obwohl der Antikörper bis zu 56 Tage nach Transplantation im Blut nachweisbar ist, ist die Immunrekonstitution, vor allem in der CD4 T-Zellpopulation, über diesen Zeitpunkt hinaus eingeschränkt (97). Die mit Alemtuzumab behandelten Patienten zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für opportunistische Infektionen (96).

Um die Immunrekonstitution als Schutz vor Infektionen und zur Verhinderung eines Rezidivs zu beschleunigen, wurden in der Studie der III. Medizinischen Klinik der Universität Mainz an Tag +60 und +120 nach Transplantation in 90-Tages-Intervallen CD8-depletierte Donor-Lymphozyten-Infusionen prophylaktisch verabreicht (7). Durch die zeitige Gabe der DLI erhofft man sich zusätzlich einen verbesserten GvL-Effekt (7). Ziel ist die mehrmalige DLI-Gabe mit steigender Dosis. Allerdings erhöht sich dadurch auch das GvHD-Risiko (40-60%) und alle Patienten müssen vor der nächsten DLI-Gabe auf erste Anzeichen bereits bestehender GvHD untersucht werden (4). Bei vorhandenen Merkmalen der GvHD kann die DLI-Gabe nicht erfolgen. Um das erhöhte GvHD-Risiko zu verringern, wurden die CD8 T-Zellen aus der DLI entfernt (4).

Durch Phänotypisierung der Lymphozyten der Patienten nach Alemtuzumabgabe mit Hilfe von FACS-Analysen konnte ebenfalls ein längerfristiges Auftreten von CD52-negativen T-Zellen nach HSZT von Meyer et al beschrieben werden (4). Auch in der Literatur wird das vorwiegende Vorkommen von CD52-negativen T-Zellen mit bis zu 80% aller T-Zellen nach Alemtuzumabtherapie bestätigt (8). In der Arbeitsgruppe von Meyer et al wurde der CD52-negative Anteil der CD4 und CD8 T-Zellen ohne und mit DLI-Gabe verglichen (4). Dabei zeigte sich ein deutlich niedriger Anteil an CD52-negativen T-Zellen in der CD4 T-Zellpopulation, vereinzelt bei einigen Patienten auch bei den CD8 T-Zellen, nach DLI-Gabe (4). Man geht davon aus, dass das Auftreten von CD52-positiven T-Zellen für eine Rekonstitution des T-Zellrepertoires und damit einhergehend für eine bessere Immunsystemabwehr mit vermindertem Infektionsrisiko spricht (4).

Meine Arbeit untersucht das Auftreten von CD52-negativen Gedächtnis-T-Zellen und die Rekonstitution CD52-positiver naiver T-Zellen im Verlauf nach Alemtuzumab-basierter allogener HSZT.

### 3 Material

#### 3.1 Medien

Bezeichnung	Hersteller
Aqua dest.	B. Braun (Melsungen)
AIM-V Medium	Gibco™, Invitrogen (Karlsruhe)
Heparin (Liquemin)	Roche (Grenzach-Wyhlen)
OKT <sub>3</sub> (Muromab CD3)	Janssen Cilag (Neuss)
PBS Gibco 14190 Dulbecco's	Gibco™, Invitrogen (Karlsruhe)
Phytohämagglutinin (PHA)	Oxoig, Merck Biosciences (Darmstadt)
RPMI 1640	Gibco™, Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI	Gibco™, Invitrogen (Karlsruhe)
X-VIVO15 T-Zellkulturmedium	Biowhittaker (Viersen, B)

#### 3.2 Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories (Pasching, A)
Geneticin (G418)	Biochrom (Berlin)
Humanalbumin 20% Behring	CSL Behring (King of Prussia, USA)
Humanes Serum	Blutbank Universitätsmedizin Mainz, gepooltes Serum von gesunden Spendern

#### 3.3 Zytokine

Bezeichnung	Hersteller
GM-CSF	Leukine liquid (Cambridge, USA)
IL-1 $\beta$	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
IL-2	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
IL-4	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
IL-6	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
PGE 2	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
TNF- $\alpha$	Promokine, PromoCell GmbH (Heidelberg)

### 3.4 Geräte und Software

Gerät	Firma
Autoklav, Systec V-150	KSG Sterilisatoren, Olching Systec GmbH (Wettenberg)
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus (Hanau)
Durchflusszytometer, BD FACS Canto™ II, FACS Aria 1 mit FACS Diva Software	BD Biosciences (Heidelberg)
Eismaschine UBE50/53	Ziegra (Isernhagen)
ELISpot Kamera	Zeiss (Jena)
ELISpot Mikroskop	Zeiss (Jena)
Expo32	Beckmann Coulter (Krefeld)
Feinwaage, 0,05-210 g	Sartorius (Göttingen)
Gefrierschrank (-80°C)	Hera freeze, Heraeus/Kendro (Langenselbold)
Kühlschrank mit Gefrierfach (4°C, -20°C)	Privileg (Fürth)
KS ELISpot, Version 4.9	Zeiss (Jena)
Mehrkanalpipetten 5-200µl	Brand (Wertheim)
Phasenkontrastmikroskop, Axiovert 25 (für Zellen)	Zeiss (Jena)
Pipettiergerät (PipetBoy)	IBS Integra Biosciences VWR (Darmstadt)
Pipette (1-10 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipette (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Brand (Wertheim)
Schüttelgerät („Lab Dancer“)	VWR (Darmstadt)
Sterile Werkbank („Flow“, HERAsafe Typ HS 18)	Kendro (Hanau)
Stickstoff-Kryo-Bank XLC 1370	
Vortexer MS2	Minishaker IKA®, IKA (Staufen)
Waage Sartorius (BA 2100 S) (0,5 g-2100 g)	GFL (Burgwedel)
WIZARD2 (automatic Gamma-Counter)	PerkinElmer (Waltham, USA)
Zentrifuge	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge	Kendro-Heraeus (Langenselbold)

### 3.5 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Cellstainer	BD Biosciences GmbH (Heidelberg)
Cryobox	Nalge Nunc (Wiesbaden)
Einmalpipetten (1,2,5,10,25,50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhäuser)
ELISpot Klebefolie Mathahcloc	Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)
ELISpot 96-well Platte	Millipore (Billerica, USA)
Eppendorf-Röhrchen (500, 1500, 2000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
FACS-Tubes	Fisher Scientific (Schwerte)
Falcon 15 ml	Greiner Bio-One (Frickenhäuser)
Handschuhe Gr. S	Semperit AG Holding (Wien, Österreich)

Kulturplatten 6-, 24-, 96-Loch	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Leukosep™ Tubes (50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Nunc (Cryo-Röhrchen)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Petrischalen (35, 60, 94 mm)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Pipettenspitzen (0,5-10 µl; 10-200 µl, 100-1000 µl)	Starlab (Ahrensburg)
Sterilfilter FP30/0,2 CA-S, FP30/0, 45 CA-S, FP30/1,2 CA-S	Schleicher & Schuell (Dassel)
Steritop™	Millipore, Eschborn
Zellkulturflasche Filter Top 50ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellkulturflasche Filter Top 250ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen)

### 3.6 Glaswaren

Bezeichnung	Hersteller
Becherglas (200,500,1000 ml)	Schott AG (Mainz)
Duran-Glasflaschen (500,1000,2000, 5000 ml)	Schott AG (Mainz)
Deckgläser 24x32 mm	Menzel (Braunschweig)
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal, Schreck (Hofheim)

### 3.7 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)	Sigma (Deisenhofen)
<sup>51</sup> Chrom	PerkinElmer (Waltham, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt)
Dimethylformamid (DMF)	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt)
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma (Deisenhofen)
EDTA Disodiumsalz	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt)
Ethanol 70%	Brüggemann Alkohol (Heilbronn)
Ethanol vergällt 96%	Martin und Werner Mundo (Mz-Kostheim)
Ethanol reinst	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Isopropanol	Fluka (Deisenhofen)
Ficoll Lymphozyten Trennmedium (LSM 1077)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt)
Phosphate-buffered Saline (PBS)	Gibco BRL (Karlsruhe)
TAE-Puffer	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypanblau	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt)
Tween 20 Detergens	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn)
Wasserstoffperoxid 30%	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt)

### 3.8 Kits

Bezeichnung	Hersteller
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)
IFN-γ Secretion Assay Detection Kit (PE)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
FoxP3 Staining Kit	ebioscience
Vectastain ABC Kit Elite (Avidin Peroxidase Komplex)	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

### 3.9 Peptide

Bezeichnung	Hersteller
H-NLVPMVATV-OH	JPT Peptide Technologies (Berlin)
PepMix™ HCMVA (pp65)	JPT Peptide Technologies (Berlin)
H-TPRVTGGGAM-OH	JPT Peptide Technologies (Berlin)

H-NLVPMVATV-OH ist ein Peptid, welches HLA-A2 restringiert für CMV ist und für die Immunstimulation von T-Zellen in funktionellen Tests eingesetzt wird (98).

PepMix™ HCMVA ist ein überlappender Peptidpool (ÜLP) aus mehreren Peptiden, welches der Sequenz des pp65 des CMV entspricht und so für Analysen der Immunantwort von T-Zellen z.B. im Elispot oder Zytokin-Sekretionsassays genutzt werden kann (99).

H-TPRVTGGGAM-OH ist ein Peptid, welches HLA-B7 restringiert für CMV ist und ebenfalls in funktionellen Tests zur Immunstimulation eingesetzt wird (98).

### 3.10 FACS-Antikörper

Antikörper	Fluorchrom	Hersteller
IgG/IgG	FITC / PE	Beckmann Coulter
IgG 1	APC	Beckmann Coulter
IgG 1	PC 5	Beckmann Coulter
IgG 1 k	V 450	BD
IgG 1 k	PerCP-Cy 5,5	BD
IgG 1 k	PE-Cy 7	BD
IgG 1 k	APC-Cy 7	BD

IgG	APC-H 7	BD
CD3	FITC	Beckmann Coulter
CD3	PE	Beckmann Coulter
CD3	APC	Beckmann Coulter
CD3	PC 5	Beckmann Coulter
CD3	V 450	BD
CD3	PE-Cy 7	BD
CD3/4	FITC / PE	Beckmann Coulter
CD4	FITC	Beckmann Coulter
CD4	PE	Beckmann Coulter
CD4	APC	Beckmann Coulter
CD4	APC-H 7	BD
CD8	FITC	Beckmann Coulter
CD8	PE	Beckmann Coulter
CD8	APC	Beckmann Coulter
CD8	APC-H 7	BD
CD16	PE	Beckmann Coulter
CD19	PE	Beckmann Coulter
CD19	PC 5	Beckmann Coulter
CD25	PeCy7	BD Pharmingen
CD25	PE	Beckmann Coulter
CD28	PE	BD Pharmingen
CD45RA	APC	Miltenyi
CD45RA	V 450	BD
CD45RA	PE	Beckmann Coulter
CD45RO	PE	Beckmann Coulter
CD45RO	APC	BD
CD52	FITC	Serotec
CD52	PE	Serotec
CD52	APC	Serotec
CD52	Alexa Fluor 488	BD Biosciences, HD
CD54	PE	BD Pharmingen
CD55	PE	BD
CD56	APC	BD
CD56	PC 5	Beckmann Coulter
CD58	PE	Beckmann Coulter
CD59	PE	BD
CD62L	PE	Beckmann Coulter
CD62L	PE	Beckmann Coulter
CD62L	PC5	Beckmann Coulter
CD127	PE	Beckmann Coulter
CD137	APC	BD Pharmingen
CD137	PE	BD Pharmingen
7-Aminoactinomycin	FITC	BD Biosciences, HD
CCR7	PE	Miltenyi
FLAER/FL2S	Alexa Fluor 488	Biozol, FL1S/FL2S

FOXP3	Alexa Fluor 488	ebioscience
TCR PAN $\alpha/\beta$	PE	BD Pharmingen
TCR PAN $\gamma/\delta$	APC	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 1	FITC/PE	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 2	PE	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 3	PE	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 5.1	PE	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 5.2	FITC	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 5.3	PE	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 7.1	FITC	Beckman Coulter
TCR V 7.1	FITC	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 8	PE	Biolegend
TCR V $\beta$ 11	FITC	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 12	PE	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 13.1	PE	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 13.2	PE	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 13.6	FITC	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 14	FITC, PE	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 16	FITC	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 17	PE	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 20	FITC	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 21.3	FITC	Beckman Coulter
TCR V $\beta$ 22	PE	Beckman Coulter
Tetramer HLA-A *0201 CMV pp65	APC	Beckmann Coulter
Tetramer HLA-B *0702 CMV pp65	APC	Beckmann Coulter

Tabelle 2: Verwendete FACS-Antikörper

### 3.11 Übersicht Studienpatienten

Für meine experimentelle Arbeit wurden die Lymphozyten von insgesamt 42 Studienpatienten untersucht. Die Patienten wurden vorher in der klinischen Studie der Universitätsmedizin Mainz (allogene HSZT mit dosisreduziertem Konditionierungsregime und Alemtuzumab basierter TCD) eingeschlossen (7). In Frage kamen dafür Patienten mit einer malignen hämatologischen Grunderkrankung, die ein hohes Rezidivrisiko oder bereits vorausgegangene erfolglose Therapien und Kontraindikationen für eine myeloablative Therapie aufwiesen (7). Das schriftliche Einverständnis aller Patienten zur Teilnahme an der Studie sowie Blutabnahmen im Rahmen der Studie lagen vor (7) (Ethikkommission mit Bearbeitungsnr. 837.175.03). Standardmäßig wurden an Tag +60 und +360 nach Transplantation 50 ml venöses Blut entnommen (7). Bei Vorstellung in der hämatologischen Ambulanz wurde zusätzlich zu

weiteren Zeitpunkten venöses Blut bei den Patienten entnommen und von mir untersucht. Neben peripherem Blut gelang es uns auch bei sieben Patienten (Patienten Nr. 6, 7, 8, 11, 22, 26, 30) Knochenmarkpunkate zur Bestimmung der CD52-Expression zu entnehmen. Anhand des Vorliegens von ausreichend CD52-positiven und CD52-negativen T-Zellen, wurden die funktionellen Tests mit dem jeweiligen peripheren Blut der Studienpatienten durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle wird das Patientenkollektiv anonymisiert mit einer von mir zugewiesenen Nummer, sowie Geschlecht, Alter, Grunderkrankung und Übersicht über die erfolgten experimentellen Untersuchungen dargestellt.

Patientenkollektiv				Experimentelle Untersuchungen		
Patient Nr.	Geschlecht	Alter	Diagnose	KM-Punktat	Gedächtnis-T-Zellen	Funkt. Tests
1	m	58	NHL		x	
2	m	48	NHL		x	x
3	m	70	AML			
4	w	64	AML			
5	w	56	MM			
6	m	69	AML	x	x	
7	m	71	AML	x	x	
8	w	58	AML	x		x
9	w	60	MPS		x	x
10	m	71	ALL			
11	m	24	AML	x	x	
12	m	59	MZ L.			
13	w	56	AML		x	
14	m	61	AML		x	
15	w	69	AML			
16	w	54	AML			
17	m	65	AML			
18	m	52	MM			
19	m	53	MZ L.		x	
20	w	63	NHL			
21	m	65	MM		x	
22	m	54	PNH	x	x	
23	w	52	ALL			
24	w	62	AML			
25	m	63	MDS		x	
26	m	50	AML	x		x
27	w	52	CML			x
28	m	38	M. Hodgkin		x	x
29	m	47	MM			
30	w	63	AML	x		
31	m	49	MPS			

32	m	65	AML		x	
33	w	51	AML			
34	m	60	T-NHL			
35	m	72	AML		x	
36	m	68	CML			
37	w	71	AML			
38	m	57	OMF			
39	m	63	AML		x	
40	m	58	B-NHL			x
41	w	25	T-NHL		x	
42	m	49	M. Hodgkin		x	

Tabelle 3: Übersicht Transplantationspatienten mit Geschlecht (m = männlich, w = weiblich), Alter, Erkrankung

## 4 Methoden

Im Anhang unter 9.4 lassen sich die dazugehörigen Laborprotokolle finden.

### 4.1 Dichtegrad-Zentrifugation

#### 4.1.1 Separation mononukleärer Zellen aus Leukozytenfilmen und peripherem Blut („Ficoll“) (100)

Zur Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes wird das Vollblut der Patienten und die von der Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz gestellten Leukozytenfilme (engl. Buffy-Coats) von gesunden Spendern nach der standardisierten Dichtegrad-Zentrifugation, die ursprünglich von Graze et al 1979 entwickelt worden ist (101), aufgereinigt. Die Lymphozyten sammeln sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte zwischen Plasma und Ficoll-Trennmedium an (26, 101). Das Zellsediment besteht aus Granulozyten und Erythrozyten.

Die Isolation der mononukleären Zellen wird in unserer Arbeitsgruppe nach dem Protokoll von der Firma Greiner Bio-One mit Leukosep<sup>TM</sup>-Röhrchen durchgeführt (100). Es werden Leukosep<sup>TM</sup>-Röhrchen mit Fritte mit je 15 ml Ficoll-Trennmedium (Ficoll-Hypaque) befüllt. Durch kurzes Anzentrifugieren kann das Medium unter die Fritte gebracht werden. Das heparinisierte, venöse Patientenblut (20-50 ml) oder der Buffy-Coat (500 ml) wird nun auf die Leukosep<sup>TM</sup>-Röhrchen, mindestens je 15 ml, verteilt und das Gesamtvolumen von 50 ml mit PBS ausgeglichen. Die Tubes werden bei

2300 rpm, für 20 Minuten, bei Raumtemperatur, ohne Bremse und ohne Beschleunigung, zentrifugiert. Die entstandene PBMC Bande, zwischen Plasma und Ficoll, wird vorsichtig mit einer 2 ml-Pipette abgenommen, in ein 50 ml-Falcon überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und anschließend für 8 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert. Die Zellen werden in 10 ml PBS aufgenommen und bei 1500 rpm, für 5 Minuten, bei Raumtemperatur zentrifugiert (= Waschen). Nach der Zählung können die Zellen für funktionelle Tests oder für FACS-Analysen verwendet werden.

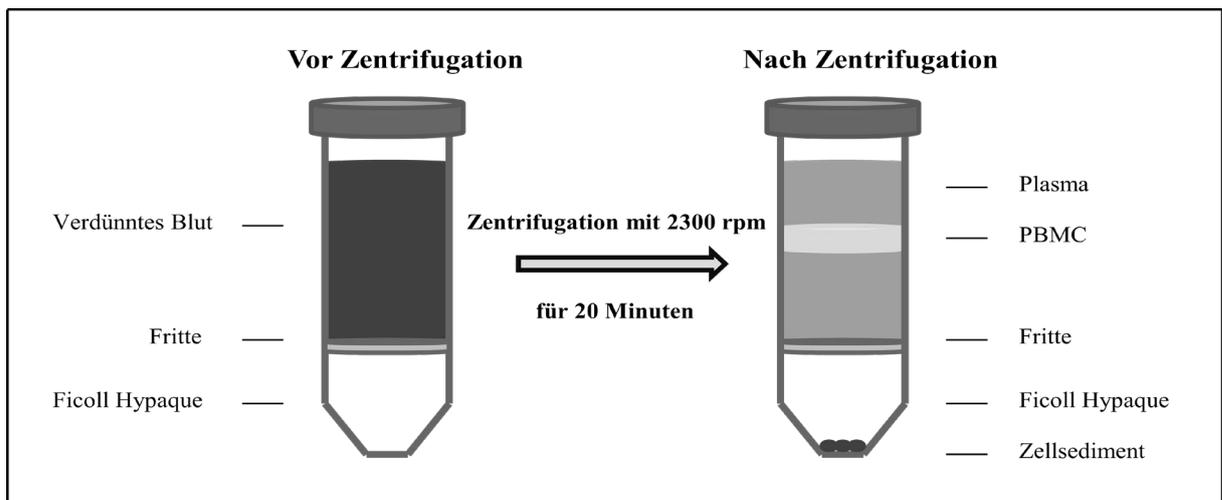


Abb. 1: Vor und nach der Dichtegradient-Zentrifugation (modifiziert nach (100))

#### 4.1.2 Separation von heparinisierem Knochenmarkblut

Das heparinisierte Knochenmarkblut wird 1:4 mit PBS verdünnt. In 50 ml-Falcons, ohne Fritte, werden 15 ml Ficoll-Trennmedium gegeben und anschließend langsam mit dem verdünnten Knochenmarkblut überschichtet. Die Zentrifugation erfolgt bei 2300 rpm, ohne Bremse und Beschleunigung für 20 Minuten. Anschließendes Verfahren siehe 4.1.1.

#### 4.1.3 Isolation von CD4 und CD8 T-Zellen („MACS-Isolation“)

Mit Hilfe von paramagnetisch beladenen Antikörpern (MACS-Micro-Beads) können CD4 und CD8 T-Zellen aus PBMC nach dem Protokoll der MACS-Isolation (engl. magnetically activated cell sorting) von Miltenyi Biotec isoliert werden (102). Der Magnet wird mit den Säulen und Filtern bestückt, über die die Zellen separiert wer-

den. Die MACS-Isolation erfolgt nach dem Prinzip der positiven Selektion, das bedeutet, dass die magnetbeladenen Zellen (= gelabelten Zellen) an der Säule haften bleiben und zum Schluss durch Entmagnetisierung eluiert werden (102). Es werden jeweils CD4 oder CD8-Beads benutzt.

Das Auftauen und Waschen der Zellen (siehe 4.3) erfolgt im Kulturmedium. Das Zellpellet wird anschließend mit 10 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen. 10 Mio. Zellen werden in 80 µl MACS-Puffer und 20 µl Micro-Beads aufgenommen, gevortext und bei 4 °C für 15 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit MACS-Puffer, werden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer über die Säule gegeben und die Negativfraktion in einem Tube aufgefangen. Nach dem Spülen des Tubes, des Filters und der Säule mit jeweils 500 µl MACS-Puffer wird die Säule aus dem Magneten entfernt und auf das Positivfraktions-Röhrchen gesetzt. Mit 1000 µl MACS-Puffer und dem Stempel können die Zellen eluiert werden. Es wird stets steril und auf Eis gearbeitet.

## **4.2 Einfrieren der Zellen**

Zellen, die vorerst nicht mehr benötigt werden, können mit nachfolgendem Protokoll kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut werden (siehe 4.3). Dafür versetzt man das Einfriermedium mit dem Gefrierschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Zellen werden abzentrifugiert, dekantiert und in 1 ml Einfriermedium mit 10% DMSO pro Einfrier Röhrchen (Nunc) aufgenommen. Es können bis zu  $5 \times 10^6$  PBMC bzw. T-Zellen oder  $0,5 \times 10^6$  DC pro Röhrchen kryokonserviert werden. Die Nuncs werden nun in vorgekühlte Isopropanol-ummantelte Becher gestellt. Diese sorgen dafür, dass die Temperatur konstant um 1 °C pro Minute sinkt und damit die Kristallbildung und Zellzerstörung vermindert wird. Vorerst werden die Isopropanol-Behälter im -80 °C Kühlschrank aufbewahrt und nach einem Tag im Stickstofftank bei -196 °C gelagert.

## **4.3 Auftauen der Zellen**

In Vorbereitung wird ein 50 ml-Falcon mit 10 ml Kulturmedium befüllt und bei 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Die eingefrorenen Nuncs aus dem Stickstofftank werden ebenfalls im Wasserbad kurz erwärmt. Die aufgetaute Probe wird in Medium mit ei-

ner 5 ml-Pipette aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und in ein Falcon überführt. Danach erfolgt die Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wird dekantiert und anschließend das bei Raumtemperatur toxische DMSO durch erneutes zweimaliges Waschen mit RPMI oder Kulturmedium entfernt. Zur Vermeidung von Zellverlusten ist schnelles Arbeiten erforderlich.

#### **4.4 Zellen zählen**

Die Zellen werden dafür 1:2 mit Trypanblau gemischt. Der Azofarbstoff Trypanblau dringt nur über die durchlässige Membran toter Zellen ein (26). Somit kann man gut zwischen lebenden und nicht vitalen Zellen bei der Auszählung differenzieren (26). Die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wird durch Anhauchen befeuchtet und das Deckglas darauf gesetzt. Die gefärbte Zellsuspension wird in die Zählkammer pipettiert. Nach dem Absetzen der Zellen zählt man mit dem Mikroskop 16 Quadrate u-förmig aus und die berechnet die Zellzahl nach folgender Formel:  $100 = x \cdot 10^6 \text{ Zellen} / \text{ml}$  (26).

#### **4.5 Zellkultur**

Zur Kultivierung der Zellen nutzen wir die für das Labor geltenden Standards. Dies bedeutet, dass alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Umgebung einer Werkbank durchgeführt werden. Die Zellen werden anschließend in unserem Inkubator bei 5 % CO<sub>2</sub>, einer Temperatur von 37 °C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert.

##### **4.5.1 K562 A<sub>2</sub> / K562 B<sub>7</sub>-Zellen**

Die K 562-Zellen entstammen einer CML-Zelllinie, die z.B. im Elispot als Antigen präsentierende Zellen eingesetzt werden können (103). Sie exprimieren auf der Zelloberfläche keine HLA I- und II-Moleküle und können mit unterschiedlichen HLA-Genen transfiziert werden. Somit ist es möglich, z.B. die T-Zellantwort von CD8 T-Zellen verschiedener Menschen mit unterschiedlichen HLA-Typen gegen virale

Peptide, wie CMV, EBV oder Influenza zu testen, indem man jeweils die passende HLA-Transfektante der K652-Zellen wählt (103). Die K562-A<sub>2</sub>- und K562-B<sub>7</sub>-Transfektanten wurden freundlicherweise von der Arbeitsgemeinschaft Wölfel, Universitätsmedizin Mainz, zur Verfügung gestellt. Alle vier Tage erfolgt der Mediumwechsel der Zellkultur. Dafür werden die Zellen aus der Zellkulturflasche in ein Falcon überführt und anschließend drei Mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 1500 rpm, 5 Minuten, RT). Die Zellen werden gezählt (siehe 4.4) und gesplittet. Es werden maximal 1 Mio. Zellen pro ml Kulturmedium eingesetzt und im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Außerdem erfolgt die Zugabe des Aminoglykosids Geneticin (G-418) in einer Konzentration von 1 mg/ml. Die Transfektanten enthalten ein Resistenzgen gegenüber dem G-418 und werden somit nicht getötet.

#### 4.5.2 TM-Zellen und K32-Zellen

Die TM-Zellen und K32-Zellen sind eine immortalisierte B-Zelllinie und wurden ebenfalls nach dem Zellkulturprotokoll (s. 4.5.1) behandelt. Diese Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M. Theobald (Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt.

#### 4.5.3 Restimulationsprotokoll für die T-Zellkultur

Die PBMC der Patienten werden entsprechend ihrer Expression in CD52<sup>+</sup> und CD52<sup>-</sup> T-Zellpopulationen sortiert und in Kultur genommen. An Tag 1 werden pro Zellkulturflasche  $5 \times 10^6$  B-Lymphozyten (wie z.B. TM-Zellen) mit 8000 rad und  $25 \times 10^6$  PBMC von gesunden Spendern mit 3500 rad bestrahlt, damit ein Überwachsen der T-Zellkultur durch die Feeder-Zellen verhindert wird. Diese Feeder Zellen werden zusammen mit den Zellkulturzellen in 12 ml T-Zellmedium, 50 U/ml Medium humanes IL-2, 30 ng/ml OKT<sub>3</sub> aufgenommen und in T25-Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Der monoklonale Anti-CD3 Antikörper OKT<sub>3</sub> muss an Tag 4 in mehreren Waschschritten mit AIMV ausgewaschen werden und die Zellen werden mit 12 ml T-Zellmedium und 50 U/ml humanes IL-2 erneut versetzt.

Um Zellverluste zu vermeiden, wird an Tag 7 und 10 jeweils nur ein halber Wechsel des Mediums durchgeführt. Dieses Protokoll nach Kuball et al wird alle 14 Tage wiederholt. Funktionelle Tests können an Tag 10-12 durchgeführt werden.

#### 4.5.4 Sort

Mit Hilfe des FACS-Sorters (FACS-Aria) und der FACS-Diva Software können die Patientenproben in CD52<sup>+</sup> und CD52<sup>-</sup> Fraktionen separiert werden. Dabei werden die Zellen nach 4.7.2 gefärbt und mit freundlicher Unterstützung des Tumorstudien- und Tumorvaxinationszentrums (TVZ) Mainz in die jeweiligen Tubes sortiert. Die T-Zellkulturen werden über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> belassen und am nächsten Tag mit AIMV gewaschen und anschließend wie unter 4.5.3 beschrieben restimuliert. Das OKT<sub>3</sub> (30 ng/ml) wird an Tag 2 dazu pipettiert. Nach dem ersten Zyklus wird das Restimulationsprotokoll, wie ursprünglich beschrieben, beibehalten.

#### 4.5.5 Einzelzellkultur für T-Zellen

Ebenfalls werden CD4 und CD8 T-Zellen nach ihrer CD52 Expression einzeln mit Hilfe des FACS-Sorters in Kultur genommen. Als Vorlage dient das Restimulationsprotokoll für T-Zellen der AG Theobald. Nach dem Sort werden die T-Zellen in 100 µl T-Zellmedium und 100 U/ml IL2 für 2-3 Tage im Inkubator gelagert. Als Feederzellen dienen mit 3500 rad bestrahlte PBMC ( $25 \times 10^5$ ) und mit 8000 rad bestrahlte TM-Zellen ( $5 \times 10^5$ ). An Tag 1 erfolgt die Zugabe von 30 ng/ml OKT<sub>3</sub>. Der halbe Mediumwechsel wird an Tag 3, 7 und 10 durchgeführt. Die Restimulation wird alle 14 Tage wiederholt und die T-Zellen bei einer Zellzahl von  $> 0,2 \times 10^6$  in T25-Zellkulturflaschen versetzt.

## 4.6 Drei-Tage-Protokoll für die Ausreifung Dendritischer Zellen

Für funktionelle Tests wie z.B. Elispot oder IFN- $\gamma$ -Zytokinsekretionsassay benötigt man Dendritische Zellen des zu untersuchenden Probanden, die mit Hilfe des Protokolls nach Dauer et al (104) aus PBMC generiert werden können.

Dafür werden  $10-15 \times 10^6$  PBMC in 3 ml DC-Medium pro well einer 6-well-Platte ausgesät. Zur Adhärenz wird die Platte bei 37 °C für 45-60 Minuten inkubiert und anschließend werden die überschüssigen Zellen mit kaltem PBS abgewaschen. Nach Zugabe von 3 ml DC-Medium mit 1000 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 werden die Zellen für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Am 2. Tag erfolgt zur weiteren Ausreifung die Zugabe von 10 ng/ml IL1- $\beta$ , 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1000 U/ml IL-6 und 1  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub>. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C werden die maturen Dendritischen Zellen geerntet. Der Überstand wird in ein 50 ml Falcon überführt und die Platte zur besseren Ablösung der Zellen kurz auf Eis gestellt. Nach mehrmaligem Waschen können die Dendritischen Zellen eingefroren (siehe 4.2.) oder in funktionellen Tests eingesetzt werden.

## 4.7 Durchflusszytometrie

### 4.7.1 Allgemein

Die Durchflusszytometrie dient der Charakterisierung und Analyse von Zellen. Die Probe wird mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und kann mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) sortiert werden (26). Beim Passieren der Laserstrahlen erzeugt die Zelle ein Streulicht, welches mit Hilfe eines Detektorsystems erfasst werden kann. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forwardscatter) stellt das Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und somit die Zellgröße dar (26). Währenddessen steht das Seitwärtsstreulicht (SSC = SidewardScatter) für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, also die Beschaffenheit der Zelle (26).

Wir verwenden monoklonale, anti-humane Antikörper, die mit Fluorchromen wie Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Blue horizon, PC5, Alexa fluor 488 gekoppelt sind. Durch diese Vielzahl der gegen bestimmte Antigene gerichteten Antikörper ist eine bis zu 6-fache Färbung in einem Ansatz

möglich. Mit Hilfe des FACS erhält man auch die Möglichkeit, funktionelle Tests wie Secretion Assay und Proliferationsassays zu charakterisieren.

#### 4.7.2 FACS-Färbung

Für die FACS-Färbung werden etwa  $0,1-0,5 \times 10^6$  PBMC oder T-Zellen pro Röhrchen eingesetzt. Nach dem Waschen (Zentrifugieren bei 1500 rpm, 5 Minuten, Raumtemperatur) mit FACS-Puffer werden die Antikörper dazu pipettiert und entsprechend inkubiert (meist 15 Minuten bei 4 °C). Erneut werden die Proben gewaschen und anschließend mit 500 µl FACS-Fixanz fixiert. Die Messung erfolgt mittels BD FACS-Canto.

#### 4.7.3 FLAER-Färbung

FLAER ist ein fluoreszierendes Aerylsin, welches spezifisch GPI-Anker bindet (105). Die Zellen werden wie unter 4.3 beschrieben aufgetaut und nach dem Standard-FACS-Protokoll gefärbt. Danach erfolgt die Zugabe von PBS und die Zentrifugation (1100 rpm, 4 °C für 10 Minuten) der Probe. Nach dem Dekantieren werden die Zellen in 125 µl kaltem PBS resuspendiert und 6,25 µl FLAER-Reagenz dazu pipettiert. Die Inkubation des Antikörpers beträgt 20 Minuten bei 4 °C. Nach einem anschließenden Waschschrift wird die Probe mit PBS + 2 % Paraformaldehyd fixiert und sofort mittels dem FACS-Gerät analysiert.

#### 4.7.4 Tetramer-Färbung

Mit Hilfe HLA-Peptid spezifischer Tetramere können wir CMV-spezifische CD8 T-Zellen bei unseren Patienten detektieren und somit geeignete Probanden für funktionelle Testungen finden. Die HLA-Peptid-Tetramer-Komplexe können antigenspezifische CTL unabhängig von Zytokinsekretion oder Proliferation detektieren. Das Tetramer wird aus vier biotylinierten HLA-Peptiden und einem zentralen Streptavidin-Molekül gebildet (106). Durch ein Fluorchrom wird die Detektion der antigenspezifischen CTL im FACS ermöglicht.

Die Tetramer-Färbung erfolgt nach dem Protokoll der Firma Beckmann Coulter (107). Es wird eine Suspension von  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml PBS hergestellt und davon 200  $\mu$ l auf jedes Tube verteilt. Im Folgenden werden die Antikörper und 5  $\mu$ l des MHC Tetramer dazu pipettiert und nach dem Vortexen für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS (Zentrifugation 400 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur) wird die Probe mittels PBS + 0,5 % Paraformaldehyd fixiert und kann bis zu 24 Stunden nach der Färbung gemessen werden.

#### 4.7.5 FoxP3-Färbung

Das Protein FoxP3 ist ein spezifischer Marker für regulatorische T-Zellen. Die Färbung erfolgt nach dem Protokoll der Firma Thermo Fisher Scientific (108). Nach der standardisierten FACS-Färbung werden die Proben in 1 ml Perm / Fix (Fixation Permeabilization Concentrate 1:3 verdünnt mit Fixation/Permeabilization Diluent) resuspendiert und für eine Stunde im Dunkeln bei 4 °C inkubiert.

Nach dem Waschen mit PBS/BSA und zwei Mal mit Perm (1x, Permeabilization Buffer (10x) 1:10 verdünnt mit Aqua dest.) erfolgt der Blockierungsschritt mittels 100  $\mu$ l 2 %igem NRS für 15 Minuten bei 4 °C. Danach werden 20  $\mu$ l FoxP3-Antikörper dazu pipettiert und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit 2 ml Perm (1x) werden die Zellen in 0,5 ml PBS/BSA resuspendiert und anschließend mit dem FACS-Gerät analysiert.

#### 4.7.6 Apoptosefärbung

Mit Hilfe von 7-Aminoactinomycin (7AAD) kann man zwischen vitalen, apoptotischen und toten Zellen, z.B. in einer Zellkultur, unterscheiden (26). 7AAD diffundiert durch die durchlässige Membran nicht vitaler Zellen. Mit einem Absorptionsmaximum von 488 nm kann der fluoreszierende Farbstoff im FITC-Kanal gemessen werden. Im Anschluss an die FACS-Färbung nach Protokoll werden in jedes Röhrchen 300  $\mu$ l PBS und 20  $\mu$ l 7AAD dazu pipettiert und für 15 Minuten im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschschrift erfolgt die FACS-Messung.

## **4.8 Proliferationsassay – CFSE Assay**

Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester, kurz CFSE, ist ein Farbstoff, mit dem man mittels FACS-Analysen die Proliferation von Zellen untersuchen kann. CFSE diffundiert passiv in die Zelle und bindet sich an intrazelluläre Proteine (109). Durch Esterasen wird die Acetatgruppe abgespalten und somit zu einem fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt. Das verbleibende Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester reagiert mit den intrazellulären Aminen und dient dem Nachweis in der FACS-Analyse (109). Kommt es zur Teilung, wird die Hälfte der Erbinformation auf die nächste Tochterzelle übertragen. Dieser Zellzyklus wiederholt sich mehrmals. Allerdings ist dieser Ablauf eher theoretisch. Denn in der Praxis läuft die Teilung nicht immer gleichmäßig ab (109).

Der CFSE-Assay wird nach dem Protokoll der Firma invitrogen durchgeführt (110) und wurde auf unsere T-Zellen angepasst. PBMC werden in T25-Zellkulturflaschen mit jeweils 12 ml T-Zellmedium, 30 ng/ml OKT<sub>3</sub> und 50 U/ml IL2 gegeben und bei 37 °C in Kultur genommen. Die Proliferation kann jeden Tag gemessen werden. Dafür werden jeweils 1 x 10<sup>6</sup> Zellen abgezweigt und in je 1ml vorgewärmten PBS + 0,1 % BSA aufgenommen. Für eine Konzentration von 2,5 µM verwenden wir 0,5 µl CFSE-Lösung (18 µl DMSO + 1 CFSE Röhrchen) pro ml PBS. Die Inkubation beträgt 10 Minuten bei 37 °C. Zum Abstoppen werden 5 ml AIMV + 10 % Humanserum pro ml pipettiert und 5 Minuten auf Eis gelagert. Das zelltoxische CFSE muss in mehreren Waschschritten gut ausgewaschen werden (Zentrifugieren 1500 rpm, 5 Minuten, RT). Zur Charakterisierung der Zellen können diese nach dem FACS-Protokoll gefärbt werden und anschließend am FACS-Gerät gemessen werden. CFSE wird dabei im FITC-Kanal gemessen.

## **4.9 Funktionelle Tests**

### **4.9.1 IFN-γ – Elispot-Assay**

Der Enzyme-linked Immunospot Assay (Elispot-Assay) stellt eine Methode zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen dar (103). Dabei werden die APZ mit einem spezifischen Antigenpeptid beladen, das von den spezifischen T-Zellrezeptoren erkannt wird (26). Die Anzahl der stimulierten T-Zellen kann anhand der entstandenen Zyto-

kinspots ermittelt werden. CD4 und CD8 T-Zellen produzieren nach erfolgreicher Stimulation IFN- $\gamma$ .

Eine 96-well Mikrotiterplatte, die mit einer Nitrocelluloseschicht versehen ist, wird im ersten Schritt mit einem Fängerantikörper gegen humanes IFN- $\gamma$  beschichtet (Coaten) (26). Dabei bindet der monoklonale Antikörper mit seinem konstanten Bereich an die Nitrocellulosefolie und ist somit in der Lage, mit der variablen Region das sezernierte IFN- $\gamma$  zu binden. Es folgt die Inkubation mit den Zellen, die nach 20-24 Stunden durch Waschen entfernt werden. Der biotinylierte IFN- $\gamma$ -Detektionsantikörper bindet Streptavidin und bedingt durch die Zugabe der Meerrettich-Peroxidase und des Peroxidasesubstrats die Rotfärbung, die als sogenannte Spots sichtbar werden (26).

Die Vorbereitung der 96-well Mikrotiterplatte erfolgt mit 20  $\mu$ l/well 75 % Ethanol und dreimaligem Waschen mit 150  $\mu$ l PBS. Mit 60  $\mu$ l/well PBS und 10  $\mu$ l/ml primären Antikörper wird die Elispot-Platte gecoated und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zum Blockieren wird die Elispot-Platte drei Mal mit 150  $\mu$ l/well gewaschen und für eine Stunde bei 37 °C mit 100  $\mu$ l/well AIMV+10 % Humanserum (HS) inkubiert.

Danach erfolgt die Belegung der Platte. Die bei der Magnetassoziierten Zellsortierung oder FACS-Sortierung isolierten CD4 und CD8 T-Zellen der Patienten kommen als zytokinsezernierende Effektorzellen zum Einsatz. Pro well werden in 500  $\mu$ l T-Zellmedium jeweils  $0,1 \times 10^6$  T-Zellen eingesetzt.  $0,75 \times 10^5$  K562 Zellen pro well, transfiziert mit dem jeweiligen HLA-Gen je nach Patient, dienen als APZ. Um die CMV-Reaktivität zu testen, benutzen wir Peptid Pools, die CD4 und CD8 Epitope von CMV pp65 beinhalten, aber auch kurze CMV Peptide wie NLV oder TPR. Die von den Patienten-PBMC generierten „Fast DC“ ( $0,2 \times 10^5$ /well) präsentieren diese Peptide. Der sensitive Elispot-Assay wird durch eine Positivkontrolle (Phenylhämagglutinin (PHA) mit T-Zellen und eine Negativkontrolle (T-Zellen allein oder mit nicht peptidbeladenen „Fast DC“) komplettiert.

Nach der 24-stündigen Inkubation bei 37 °C werden die Zellen mit sechsmaligem Waschen mit PBS und 0,05 % Tween entfernt. Danach wird der Sekundär-Antikörper mit 2  $\mu$ g/ml in 60  $\mu$ l/well PBS und 0,5 % BSA dazu pipettiert und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach dem erneuten Waschen mit PBS und 0,05 % Tween werden 100 µl/well ABC-Komplex (Ansatz: 10ml PBS, 100µl PBS/10 % Tween, Vectastain Kit: jeweils 1 Trp. von Lösung A und B in großer Petrischale mischen und im Dunkeln 30 Minuten inkubieren) dazu gegeben und für eine Stunde bei 37 °C belassen. Um die rote Farbreaktion sichtbar zu machen, erfolgt die Zugabe der Meerrettich-Peroxidase (100 µl/well AEC-Komplex) mit 0,5 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro ml als Reaktionskatalysator für 10-15 Minuten.

Die Platte wird danach mit Leitungswasser gespült, über Nacht getrocknet und die abgelöste Nitrocellulose-Membran mit dem KS ElispotReader ausgewertet.

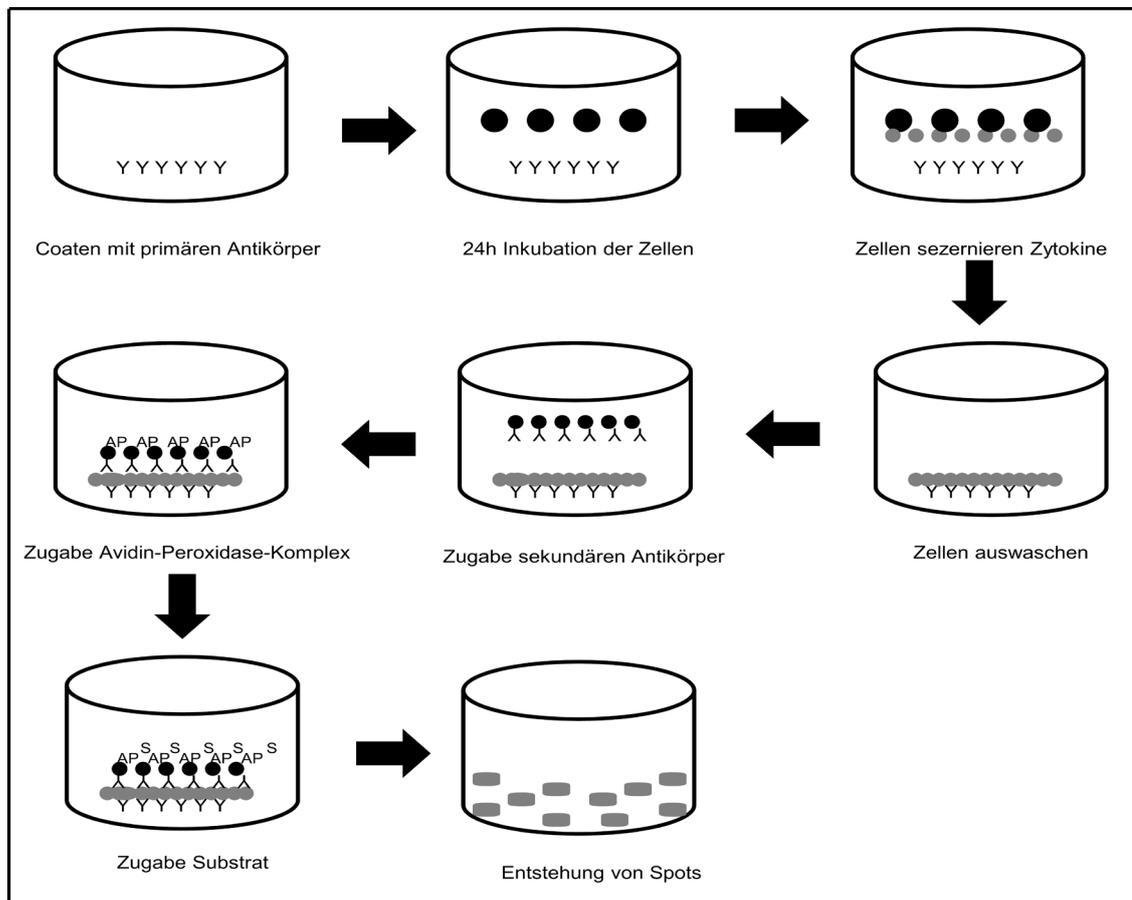


Abb.2: Darstellung Ablauf Elispot modifiziert nach (26)

#### 4.9.2 IFN- $\gamma$ Zytokin – Sekretionsassay

Im Zytokin-Sekretionsassay kann man die IFN- $\gamma$ -Sekretion von T-Zellen der Patienten nach Stimulation mit autologen „Fast DC“, die mit überlappenden pp65 CMV Peptid beladen werden, durchflusszytometrisch nachweisen. Die zu untersuchenden

Zellen werden einen Tag vorher aufgetaut (siehe Protokoll / 4.3) und über Nacht im Inkubator bei 37 °C gelagert.

Die Durchführung des Zytokin-Sekretionsassays richtet sich nach dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec (111). Zuerst werden pro Ansatz  $1 \times 10^6$  PBMC in 1 ml T-Zell-medium in einem 15 ml-Falcon aufgenommen. Es gibt insgesamt vier Versuchsansätze. Der erste Ansatz enthält  $1 \times 10^6$  PBMC, im zweiten werden zu den PBMC allogene DC hinzugefügt, im dritten überlappendes CMV Peptid und im vierten sind PBMC, DC und überlappendes CMV Peptid enthalten. Diese vier Tubes werden für vier Stunden bei 37 °C inkubiert und nach zwei Waschschritten mit FACS-Puffer in 80 µl kaltes AIMV + 10 % HS und 20 µl Catch Reagent aufgenommen und auf Eis für 10 Minuten gelagert. In dieser Zeit bindet sich der Antikörper-Komplex (Catch Reagent) unspezifisch an die T-Zelloberfläche (111).

Danach werden 10 ml warmes Medium pro Ansatz dazugegeben und 45 Minuten bei 37 °C inkubiert und dabei alle 5 Minuten resuspendiert. Die T-Zellen beginnen mit der Sekretion von IFN- $\gamma$ , welches sich an die andere freie Region des Catch Reagent binden kann (111).

Nach erneutem Waschen werden die Zellen in 90 µl kaltem Medium und 10 µl DetectionAntibody, der für die Markierung des IFN- $\gamma$  im Durchflusszytometer verantwortlich ist, aufgenommen. Anschließend werden die FACS-Antikörper (CD3, CD4, CD8, CD52) zur weiteren Charakterisierung dazu pipettiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen werden die Zellen mit FACS-Fixans fixiert und die IFN- $\gamma$  Sekretion durchflusszytometrisch gemessen.

#### 4.9.3 Chrom ( $^{51}\text{Cr}$ )-release-Assay

Eine weitere wichtige Funktion der T-Zellen besteht in der zellvermittelten Zytotoxizität, um Tumorzellen, Viren und Bakterien zu eliminieren. Der  $^{51}\text{Cr}$ -release-Assay ermöglicht es, diese Eigenschaft der T-Zellen im Labor zu quantifizieren. Die Grundlage dieser Methode stellt die Freisetzung von radioaktivem Chrom durch die getöteten Zellen dar (26). In freundlicher Kooperation mit Herrn Dr. Sebastian Klobuch (AG Thomas, Universitätsmedizin Mainz) konnten wir dieses Experiment mit T-Zellen unserer Patienten durchführen. Aus der FACS-sortierten und restimulierten T-Zell-

kultur entnehmen wir CD52<sup>+</sup> und CD52<sup>-</sup> CD8 T-Zellen, die die Effektorzellen in diesem Versuch darstellen. Als Zielzellen dienen CMV-infizierte Fibroblasten.

Zuerst erfolgt die Inkubation der Targetzellen in einem Kulturmedium (RPMI und 10% FCS) mit radioaktivem <sup>51</sup>Chrom. Dabei wird <sup>51</sup>Chrom in die Zelle aufgenommen und reichert sich im Zellinneren an (26). Das überschüssige <sup>51</sup>Chrom wird mittels Waschen entfernt. Die so markierten Zielzellen werden für vier Stunden mit den Effektorzellen in Kultur genommen (112). Danach werden die Zellen abzentrifugiert und das freigesetzte radioaktive <sup>51</sup>Cr im Kulturüberstand im  $\gamma$ -Zähler bestimmt. Nach folgender Formel kann die <sup>51</sup>Chrom-Freisetzung berechnet werden: (Experimentelle Freisetzung – Spontane Freisetzung) x 100 / (Maximale Freisetzung – Spontane Freisetzung) (112).

Die Negativkontrolle wird mittels K562 Zellen durchgeführt. Da diese Zellen keine HLA-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, werden diese von T-Zellen nicht als Zielzellen erkannt und können sich der Lyse entziehen.

Somit ist es möglich, die zellvermittelte Zytotoxizität zwischen CD8/52<sup>+</sup> und CD8/52<sup>-</sup> T-Zellen zu untersuchen.

## **5 Ergebnisse**

Im Rahmen der den Gegenstand dieser Arbeit bildenden Studie an der Universitätsmedizin Mainz wurden die Lymphozyten von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mit dosisreduzierter Konditionierung und Alemtuzumab-vermittelter TCD immunologisch untersucht. Zuerst wurden die Oberflächenantigene der PBMC durchflusszytometrisch charakterisiert. Der Fokus lag auf der Detektion von CD52-negativen T-Zellen. Anhand dessen konnten geeignete Probanden für die funktionellen Tests, wie Elispot, Zytokin-Sekretionsassay und Proliferationsassay ausgewählt werden. Die Ergebnisse der Experimente werden im nachfolgenden Abschnitt dargestellt.

### **5.1 Charakterisierung der Patienten-Lymphozyten mittels FACS**

Die Lymphozyten der Patienten wurden durchflusszytometrisch untersucht. Interessant war für uns die Verteilung der Expression von CD52 auf den CD4 und CD8 T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der HSZT. Die untersuchten Patienten hatten zum Abnahmezeitpunkt noch keine Spenderlymphozyten erhalten. Bereits im Rahmen einer Vorarbeit in unserer Arbeitsgruppe wurde ein Protokoll dazu erstellt (10). Zum Einsatz kamen folgende FACS-Antikörper: CD3 Blue Horizon, CD4/CD8 APC und CD52 FITC.

Zur Auswertung nutzten wir die Expo-Software (Version 32). Ein Beispiel für eine Gating-Variante wird nachfolgend exemplarisch dargestellt. Zuerst wurde im FSC/ SSC das Lymphozytengate gezogen und dann die CD3 und jeweils CD8 oder CD4 T-Zellen daraus dargestellt. Zur Unterscheidung der CD52-positiven und CD52-negativen Populationen fand das Gating über CD52 statt. Insgesamt untersuchten wir 40 Patienten auf die Expression CD52-negativer Zellpopulationen.

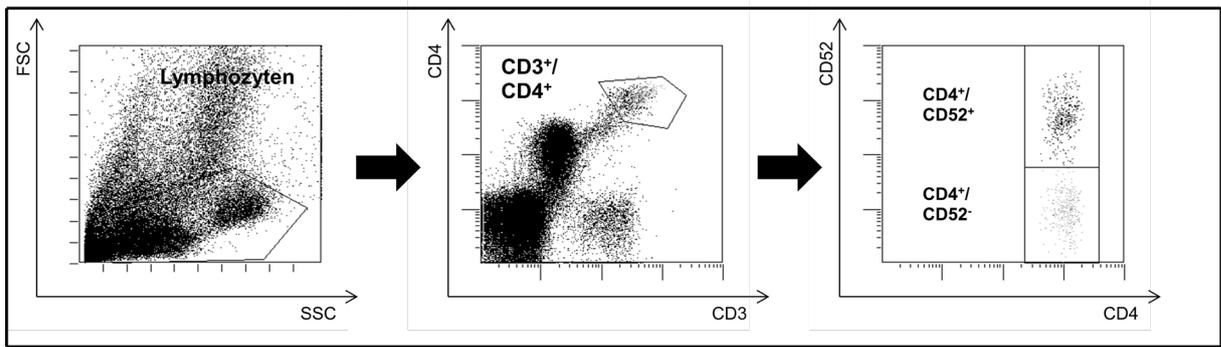


Abbildung 3: Gating Strategie CD52- Expression der T-Zellen der Studienpatienten, gezeigt an Patient Nr. 11

38 von 40 untersuchten Patienten (Ausnahmen: Patienten Nr. 34 und 37) weisen CD52-negative CD4 T-Zellen auf. Bei den CD8 T-Zellen konnten mit Hilfe der FACS-Analyse bei 36 Patienten CD52-negative Populationen nachgewiesen werden. Die folgende Tabelle stellt eine Übersicht über die prozentuale Verteilung der CD52-positiven und -negativen Populationen der CD4 und CD8 T-Zellen der Patienten gegenüber.

Patient	Tx	CD4 (Anteil in %)		CD8 (Anteil in %)	
		CD52 <sup>+</sup>	CD52 <sup>-</sup>	CD52 <sup>+</sup>	CD52 <sup>-</sup>
1	143	65,3	34,7	87,9	12,1
2	1602	78,5	21,5	67,2	32,8
3	55	23	77	41,6	58,4
4	84	52,2	47,8	20,9	79,1
5	61	9,6	90,4	19,6	81,4
6	83	30	70	24,4	75,6
7	55	12,5	87,5	89	11
8	41	13	87	19	81
9	87	54	46	71,1	28,9
10	95	24,1	75,9	37,2	62,8
11	62	2,5	97,5	1,6	98,4
12	144	19,4	80,6	11,6	88,4
13	148	14,7	85,3	80,3	19,7
14	69	11,2	88,8	45,4	54,6
15	78	15	85	96,6	3,4
16	26	47,6	52,4	100	0
17	47	98,2	1,8	97	3
18	35	55,4	44,6	65,3	32,7
19	40	47,8	52,2	96,4	3,6
20	26	98,8	1,2	92,4	7,6
21	53	78	22	57	43
22	85	29,5	70,5	69,4	30,6
23	87	3	97	6,3	93,7

24	95	12,6	87,4	30,8	69,2
25	70	37	63	100	0
26	30	8,2	89,8	k. Z.	k. Z.
27	49	4	96	0	100
28	234	51	49	27,6	72,4
29	77	64,6	35,4	76	24
30	146	84,4	15,6	81,8	18,2
31	84	0	100	0	100
32	877	75,9	24,1	60,7	39,3
33	671	88	12	96,6	3,4
34	991	99,9	0,1	99,9	0,1
35	105	46,1	53,9	62,1	37,9
36	n.b.	6,3	93,7	6,5	93,5
37	343	100	0	100	0
38	336	98,5	1,5	89,9	10,1
39	n.b.	86,4	13,6	49,8	50,2
40	n.b.	94,9	5,1	82,6	17,4

Tabelle 4: Prozentuale Darstellung der CD52-positiven und -negativen Populationen der Patienten für die CD4 und CD8 T-Zellen mit Transplantationszeitpunkt (Tx) nach HSZT (k.Z.\* = keine Zellen zum FACS-Zeitpunkt vorhanden, n.b. = Zeitpunkt Probenentnahme nicht bekannt)

Nach Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie beobachteten wir vorrangig CD52-negative Zellpopulationen sowohl für CD4 als auch CD8 T-Zellen, die auch noch Jahre nach der HSZT nachweisbar sind. Anhand Patient Nr. 2 (Abb. 4) konnte gezeigt werden, dass CD52-negative Populationen sowohl für CD4 als auch für CD8 T-Zellen noch über vier Jahre nach HSZT nachgewiesen werden können.

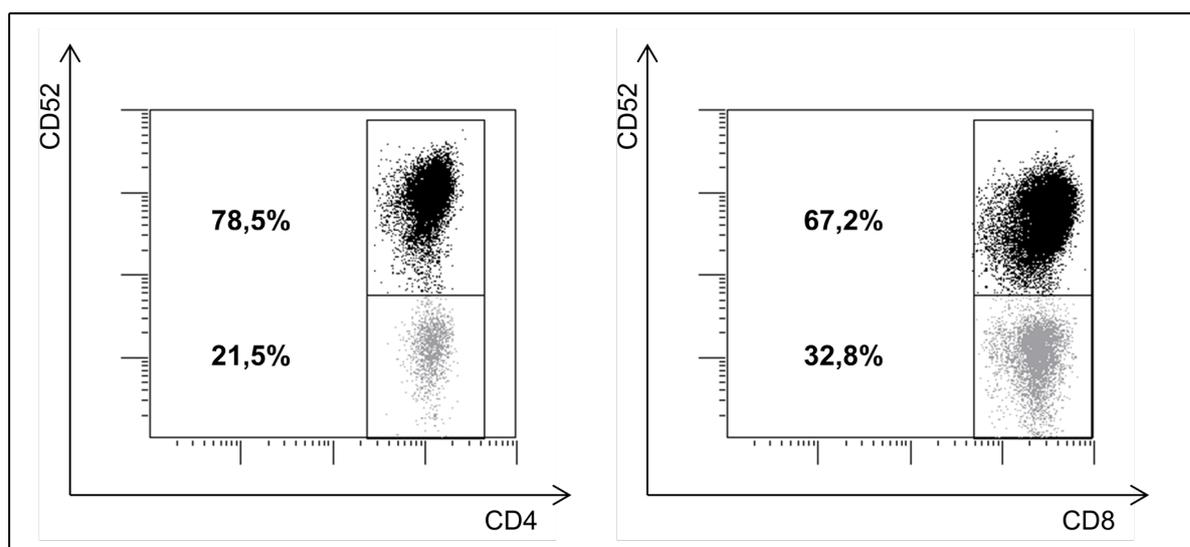


Abbildung 4: Patient Nr. 2 (Tx 1602 nach HSZT) Darstellung der CD52-positiven und -negativen Population für CD4 und CD8 T-Zellen

Die Blutentnahme und Phänotypisierung der T-Zellen der Patienten fand zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach HSZT statt. Dabei wurden die Studienteilnehmer in die drei folgenden Gruppen eingeteilt: Tag < +50 nach Transplantation, Tag +50 – +100 und > +100 nach Transplantation. In der unten aufgeführten Abbildung 5 sieht man eine Zunahme der CD52-negativen Population für CD4 T-Zellen und CD8 T-Zellen im Zeitraum Tag +50 bis Tag +100. Bei den CD8 T-Zellen erkennt man gegenüber den CD4 T-Zellen einen höheren Anteil an CD52-negativen T-Zellen. Es sind ca. 75 % der CD8 T-Zellen CD52 negativ, währenddessen 60% der CD4 T-Zellen CD52 negativ sind. Ab Tag +100 nach Transplantation nehmen die CD52-negativen T-Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation ab. Insgesamt verdeutlicht sich eine hohe Varianz hinsichtlich der CD52-Expression auf den T-Zellen bei den Studienpatienten. Im Gegensatz zu Gesunden findet man aber einen deutlich höheren Anteil an CD52-negativen T-Zellen bei fast allen Studienpatienten.

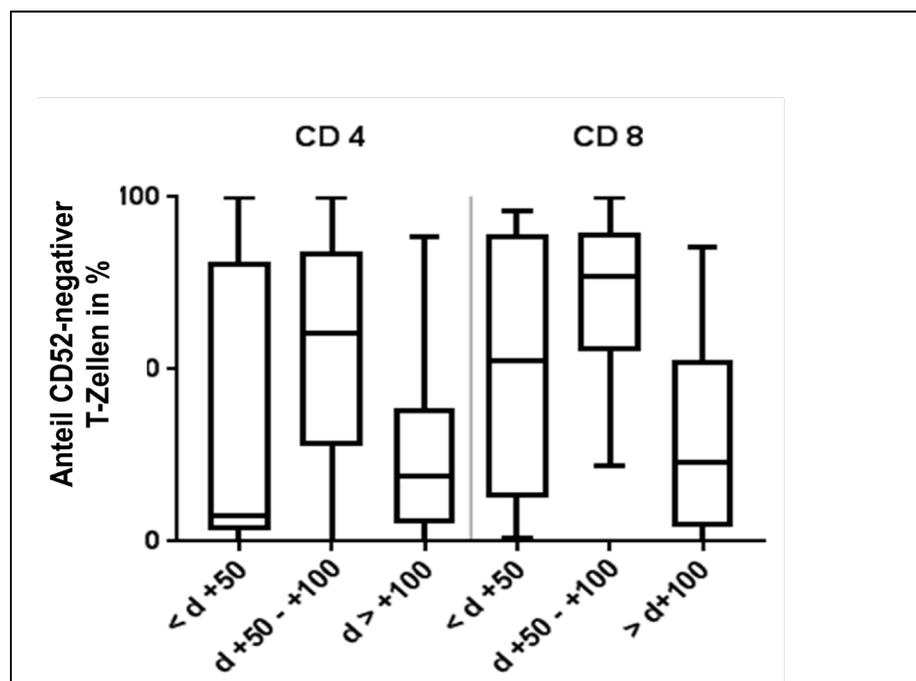


Abbildung 5: Median CD52-negativer CD4 und CD8 T-Zellen nach allogener HSZT

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die höchste Anzahl an CD52-negativen T-Zellen im Zeitraum von Tag +50 bis +100 nach Transplantation beobachten lässt, wobei der Effekt bei den CD8 T-Zellen deutlich ausgeprägter ist. Ab Tag +100 nimmt der Anteil der CD52-negativen T-Zellen an der Gesamtzellzahl wieder ab.

## 5.2 Verlust der GPI-Anker unter Alemtuzumabtherapie

Mit Hilfe der FLAER-Färbung konnten wir die GPI-Anker der CD52-negativen T-Zellpopulation untersuchen. Hier setzten wir die Antikörper FLAER (FITC-Kanal), CD52 PE, CD4 / CD8 APC und CD3 Blue Horizon ein. Für die Auswertung wurde auf die Lymphozyten gegatet, dann auf CD3 und CD4/CD8. Im nächsten Dotplot wurden diese gegateten Zellen gegen CD52 und schließlich dann gegen FLAER angezeigt (siehe Abb. 6).

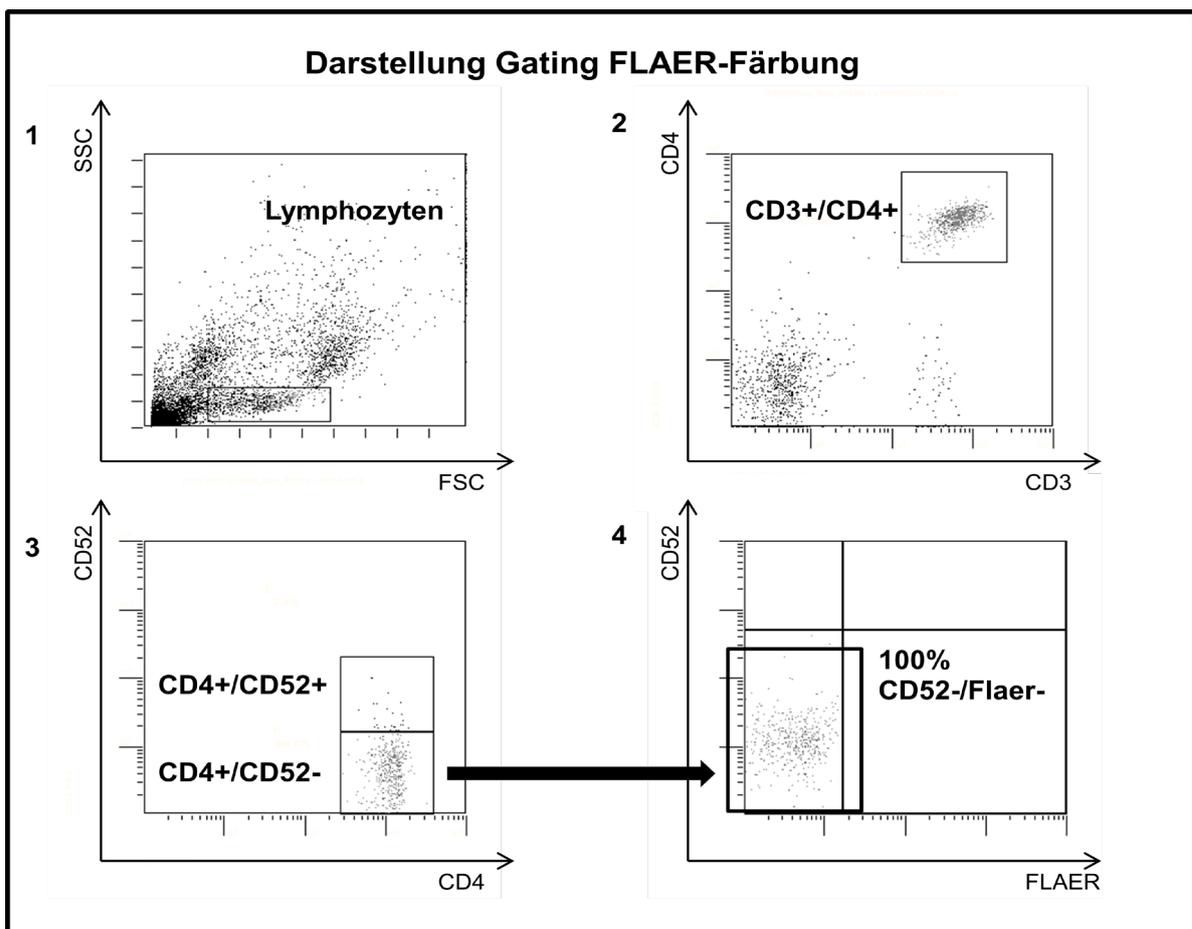


Abbildung 6: Gating-Strategie FLAER-Färbung gezeigt an Patient Nr. 5 beispielhaft für CD4 T-Zellen, Nr.1 Gating auf Lymphozyten, Nr. 2 Festlegung Bereich CD3<sup>+</sup>/CD4 T-Zellen, Nr. 3 Unterteilung CD4 T-Zellen in CD52-positiv und CD52-negativ, Nr. 4 Darstellung CD52-negative T-Zellen weisen keinen GPI-Anker auf (FLAER negativ)

Wir untersuchten insgesamt 29 Patienten. Bei 25 der untersuchten Probanden kann man erkennen, dass CD52-negative CD4 und CD8 T-Zellen keinen GPI-Anker aufweisen, da sich FLAER in dieser Population nicht anfärben lässt. Hier zeigen über 80 % der CD52-negativen T-Zellen keinen GPI-Anker auf ihrer Oberfläche, dargestellt in der unten aufgeführten Tabelle 5.

Patient	Tx	FLAER neg	
		CD4 <sup>+</sup> /52 <sup>-</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> /52 <sup>-</sup> (%)
1	143	100	100
2	1602	86,9	87
3	55	93,3	98,2
4	84	k.Z.	100
5	61	100	100
7	55	98,5	61,5
8	41	99,8	100
9	87	99,3	91,6
10	95	98,6	98,3
11	62	100	100
12	144	100	100
13	148	99,9	97,7
14	69	99,9	87,2
15	78	98,6	83,3
16	26	100	k.Z.
17	47	97,9	100
18	35	100	99,2
19	40	99,8	97,6
20	26	100	k.Z.
21	53	100	100
22	85	100	100
24	95	99,4	90
26	30	100	k.Z.
27	49	100	100
29	77	82,1	k.Z.
32	877	92,3	78,3
33	671	97,4	50
35	105	97,8	95,7
38	336	78,9	97,1

Tabelle 5: Übersicht über die prozentuale Verteilung der GPI-Anker für CD52-negative T-Zellen für CD4 und CD8 T-Zellen, CD52<sup>-</sup> T-Zellpopulation als Ausgangswert

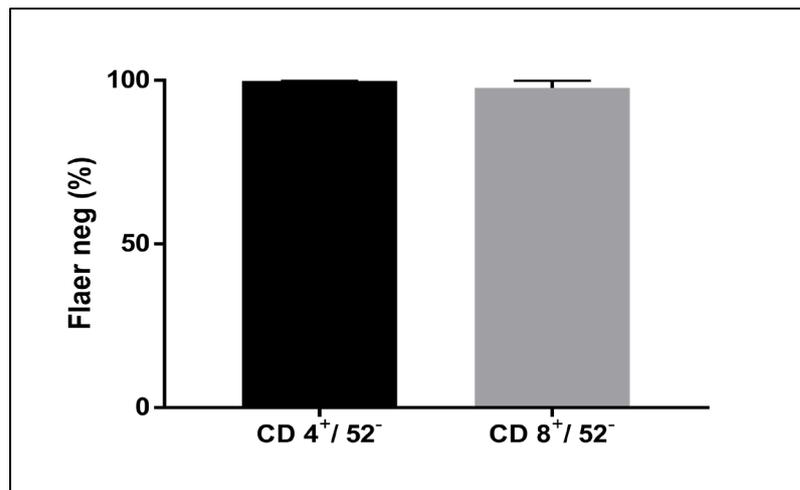


Abbildung 7: Darstellung GPI-Anker-Verlust auf CD4 und CD8 T-Zellen

CD52-negative T-Zellen weisen in der CD4 und CD8 T-Zellpopulation einen Verlust des GPI-Ankers auf, nachgewiesen durch eine FACS-Analyse mittels FLAER-Färbung (Abb. 7). Hingegen weisen alle CD52-positiven T-Zellen GPI-Anker auf (nicht dargestellt).

Im Patientenscreening untersuchten wir neben CD52 auch die GPI-verankerten Moleküle CD55 und CD59. Die folgenden Antikörper wurden verwendet: CD52 FITC, CD55/CD59 PE, CD4/CD8 APC und CD3 Blue Horizon. Dabei wurde wie unter 5.1 beschrieben gegatet und schließlich jeweils CD55 und CD59 gegen CD52 angezeigt. Bei allen 25 untersuchten Patienten konnte ein fast vollständiges Fehlen von CD55 und CD59, für CD4 und CD8 T-Zellen, bei den GPI-Anker-negativen Zellen gezeigt werden. Vor allem für die CD4 T-Zellen trifft dies durchgängig zu. Bei den CD8 T-Zellen erkennt man bei vier Patienten (Patienten Nr. 3, 7, 15 für CD4, Patienten Nr. 15 und 16 für CD8) eine Rate von unter 80 %. Es kommt unter Alemtuzumabtherapie bei GPI-Anker negativen T-Zellen zum Verlust weiterer GPI-verankerter Moleküle wie CD55 und CD59.

Patient Nr.	Tx	CD55 <sup>-</sup> (%)		CD59 <sup>-</sup> (%)	
		CD4 <sup>+</sup> /CD52 <sup>-</sup>	CD8 <sup>+</sup> /CD52 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD52 <sup>-</sup>	CD8 <sup>+</sup> /CD52 <sup>-</sup>
2	143	99,8	99,8	100	100
3	1602	92	68,4	99,7	100
4	55	100	100	100	100
5	84	98,4	96	100	100
6	61	78,4	84,3	98	99,7
7	55	99,2	66	99,7	80,2
8	41	92	98,3	99,9	99,9
9	87	99,1	93,8	100	99,4
10	95	98,6	98,8	99,6	99,4
11	62	99,4	98,8	100	99,4
12	144	100	99,8	100	100
13	148	99,3	98	100	100
14	69	98,7	98,1	99,8	99,8
15	78	99,1	46,9	99,2	68,8
16	26	61,4	k.Z.	87,5	66,7
17	47	100	100	100	100
18	35	79,3	81,9	96,2	98
19	40	94,7	86,4	100	99,2
20	26	100	100	100	100
27	49	82,1	97,1	100	100
29	77	100	100	100	100
32	877	99,7	100	100	100
34	991	100	100	100	100
35	105	99,7	98,7	99,6	99,8
36	n.b.	91,2	90,5	99,4	100

Tabelle 6: Darstellung des Verlustes von CD55 und CD59 bei GPI-Anker-negativen Zellen für CD4 und CD8 T-Zellen (ausgehend von 100% CD52-negativen T-Zellen)

### 5.3 Knochenmark

Durchflusszytometrisch wurden Knochenmarkpunktate von sieben Patienten (Patienten Nr. 6, 7, 8, 11, 22, 26, 30) zwischen Tag +24 bis +286 nach HSZT analysiert und mit dem jeweiligen peripheren Blut zum gleichen Zeitpunkt verglichen. Wir verwendeten CD3 APC, CD4 / CD8 APC, CD52 PE und FLAER (FITC-Kanal) zur Charakterisierung. Phänotypisch stellten sich auch im Knochenmark CD52-positive und CD52-negative Populationen dar. Die prozentuale Verteilung im Knochenmark glich dem Verhältnis des gemessenen Anteils der CD52-positiven und CD52-negativen T-Zellen im peripheren Blut der Patienten (siehe Tab. 7).

Auch im Knochenmark beobachteten wir, dass die CD52-negativen T-Zellen bei allen Patienten GPI-Anker negativ waren (nicht dargestellt). In der nachfolgenden Abb. 8 wird die Verteilung der Lymphozyten bei Patient Nr. 11 im Knochenmark und peripherem Blut gegenübergestellt.

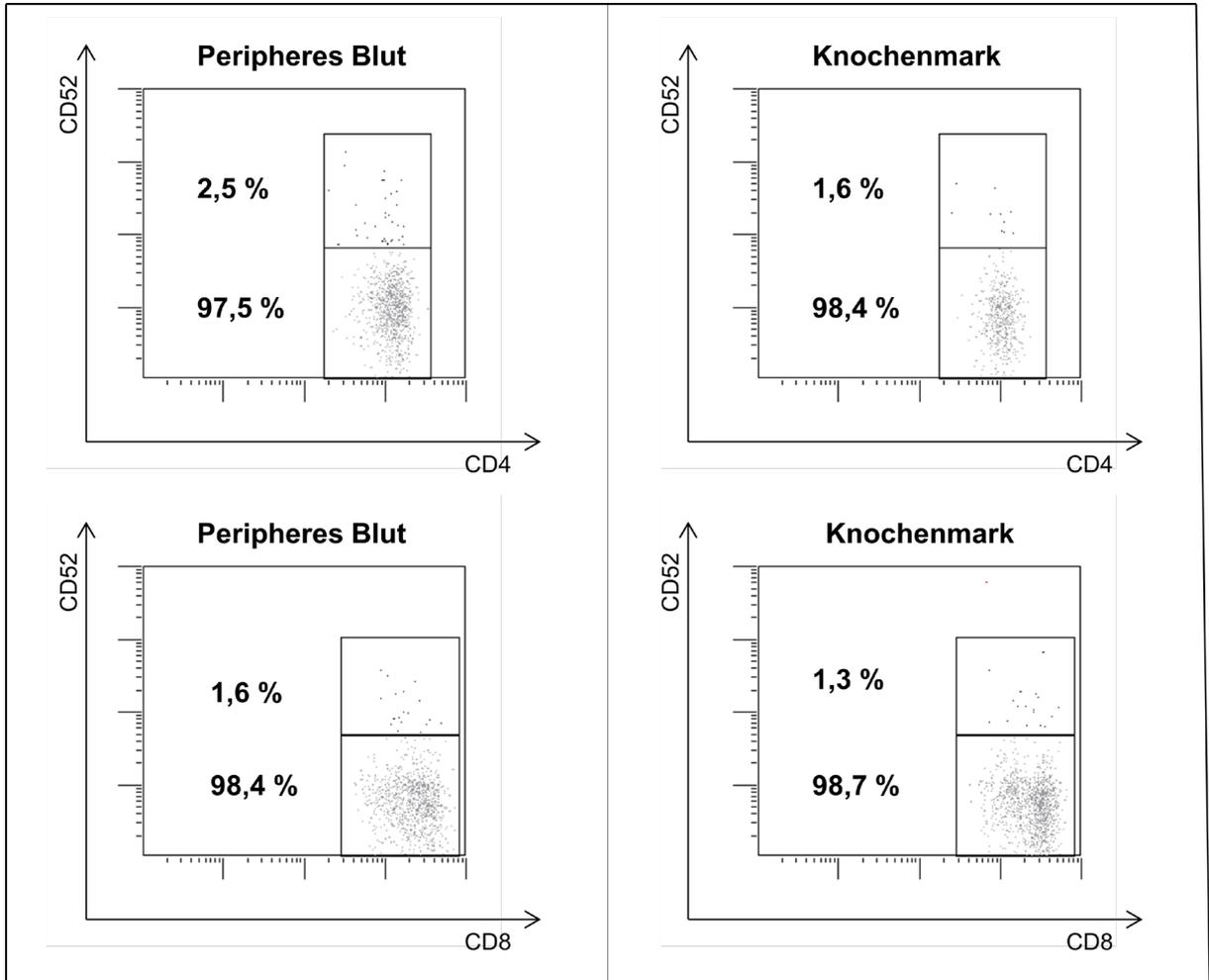


Abbildung 8: Gegenüberstellung der Verteilung der CD52-Populationen im Knochenmark und peripherem Blut exemplarisch bei Patient Nr. 11

Die nachfolgende Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die Verteilung der CD52-positiven und CD52-negativen T-Zellzahlen bei den sieben untersuchten Patienten.

Patient Nr.	T-Zelle		Knochenmark (%)	Peripheres Blut (%)
	CD4	CD52 <sup>+</sup>		
6	CD4	CD52 <sup>+</sup>	1,8	30
		CD52 <sup>-</sup>	98,2	70
	CD8	CD52 <sup>+</sup>	8,9	24,4
		CD52 <sup>-</sup>	91,1	75,6
7	CD4	CD52 <sup>+</sup>	6,4	12,5
		CD52 <sup>-</sup>	93,6	87,5
	CD8	CD52 <sup>+</sup>	81	89

		<b>CD52<sup>-</sup></b>	19	11
<b>8</b>	<b>CD4</b>	<b>CD52<sup>+</sup></b>	9,8	13
		<b>CD52<sup>-</sup></b>	90,2	87
	<b>CD8</b>	<b>CD52<sup>+</sup></b>	57	19
		<b>CD52<sup>-</sup></b>	43	81
<b>11</b>	<b>CD4</b>	<b>CD52<sup>+</sup></b>	2,5	1,6
		<b>CD52<sup>-</sup></b>	97,5	98,4
	<b>CD8</b>	<b>CD52<sup>+</sup></b>	1,6	1,3
		<b>CD52<sup>-</sup></b>	98,4	98,7
<b>22</b>	<b>CD4</b>	<b>CD52<sup>+</sup></b>	35,6	29,5
		<b>CD52<sup>-</sup></b>	64,4	70,5
	<b>CD8</b>	<b>CD52<sup>+</sup></b>	67,8	69,4
		<b>CD52<sup>-</sup></b>	32,2	30,6
<b>26</b>	<b>CD4</b>	<b>CD52<sup>+</sup></b>	3,8	8,2
		<b>CD52<sup>-</sup></b>	96,2	89,8
	<b>CD8</b>	<b>CD52<sup>+</sup></b>	20,3	k.Z.
		<b>CD52<sup>-</sup></b>	79,7	k.Z.
<b>30</b>	<b>CD4</b>	<b>CD52<sup>+</sup></b>	88,9	84,4
		<b>CD52<sup>-</sup></b>	11,1	15,6
	<b>CD8</b>	<b>CD52<sup>+</sup></b>	75	81,8
		<b>CD52<sup>-</sup></b>	25	18,2

Tabelle 7: Vergleich Anteil der CD52 T-Zellpopulationen zwischen Knochenmarkpunktat und peripherem Blut

Anhand der Analyse von peripherem Blut und Knochenmark bei sieben Patienten zum gleichen Zeitpunkt zeigte sich eine prozentuale Gleichverteilung der CD52-negativen T-Zellpopulationen im peripheren Blut und im Knochenmark. Ein Kompartement-Effekt kann somit ausgeschlossen werden.

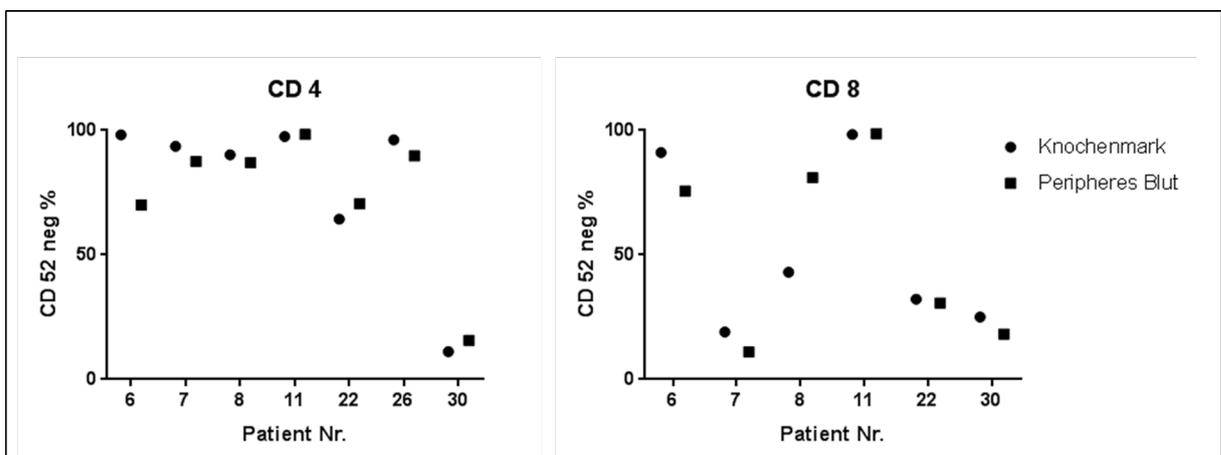


Abbildung 9: Grafische Gegenüberstellung CD52-negativer T-Zellen der CD4 und CD8 T-Zellen im peripheren Blut und Knochenmark

## 5.4 Kostimulatorische Moleküle

Es wurden sieben Patienten (Patienten Nr. 1, 2, 6, 7, 8, 11, 22) auf die prozentuale Verteilung der kostimulatorischen Moleküle zwischen CD52-positiven und CD52-negativen T-Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Bei den Studienpatienten analysierten wir exemplarisch die Oberflächenmarker CD28 (PE), CD54 (PE), CD58 (PE) und CD137 (PE). CD28 wird bei Patienten Nr. 6, 7, 8, 11, 22 in der CD4 T-Zellpopulation und bei Patienten Nr. 6, 11, 22 in der CD8 T-Zellpopulation vorrangig von CD52-negativen T-Zellen exprimiert. Zum Vergleich färbten wir noch die T-Zellen von zwei gesunden Probanden (gekennzeichnet als Proband 1 und 2). Hier lässt sich erkennen, dass CD28 auf den CD52<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Zellen in gleicher Prozentzahl exprimiert wird. Bei den CD52<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen weisen Proband 1 und 2 mit > 40 % deutlich mehr CD28 auf.

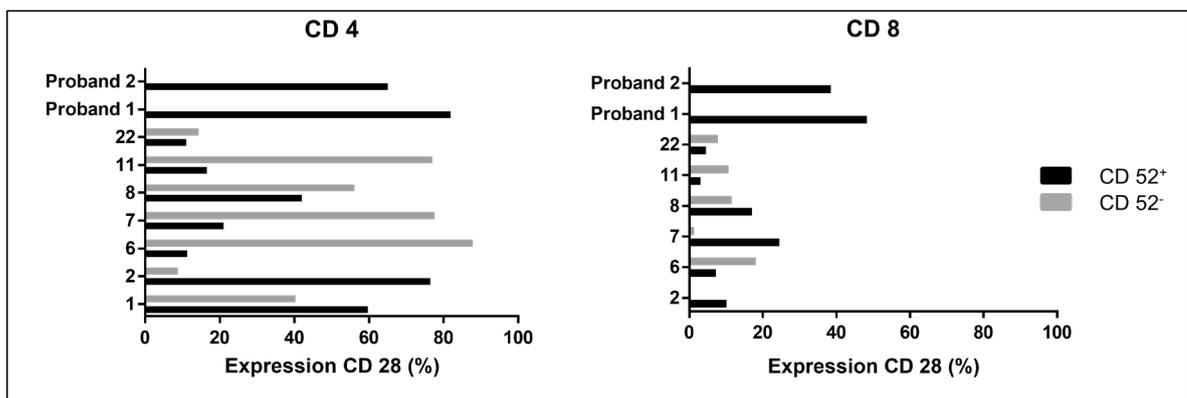


Abbildung 10: CD28 Expression auf CD4 und CD8 T-Zellen

CD54 zählt ebenfalls zu den kostimulatorischen Molekülen. Mit > 80 % wird CD54 auf den CD4 und CD8 T-Zellen bei gesunden Probanden exprimiert. Bei den Studienpatienten ist CD54 deutlich geringer sowohl auf CD52-positiven als auch auf CD52-negativen T-Zellen zu finden. Siehe nachfolgend Abbildung 11.

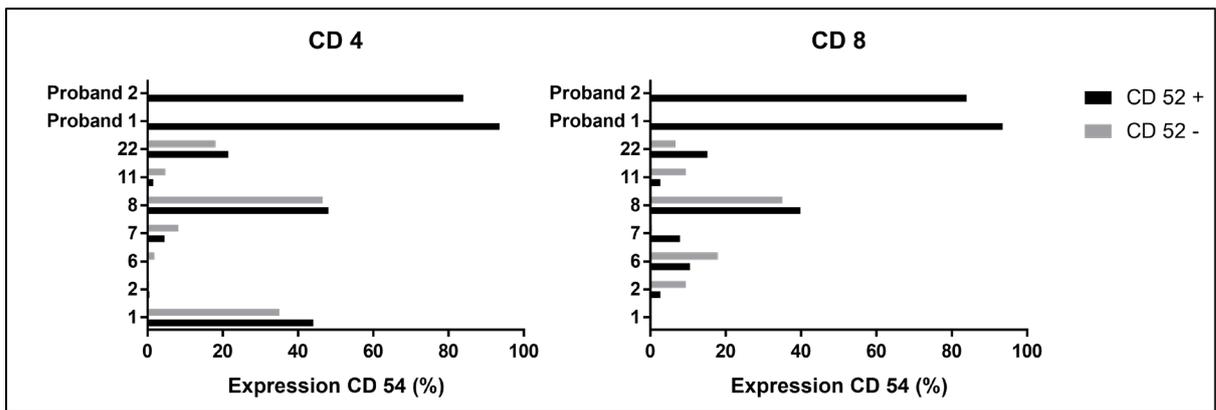


Abbildung 11: CD54 Expression auf CD4 und CD8 T-Zellen

Die Analyse von CD58 brachte folgende Ergebnisse: Die Patienten Nr. 2, 6, 11 für die CD8 T-Zellen und die Patienten Nr. 6, 7, 11 und 22 für die CD4 T-Zellen zeigten den größten Anteil an CD58 in der CD52-negativen T-Zellpopulation verglichen mit den CD52-positiven T-Zellen. Die Probanden 1 und 2 wiesen ebenfalls eine hohe CD58-Expression auf.

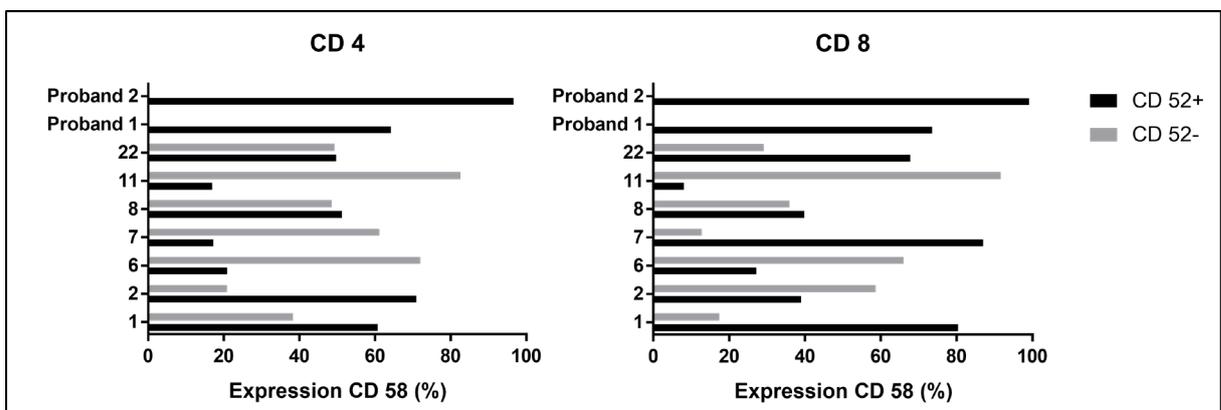


Abbildung 12: CD58 Expression auf CD4 und CD8 T-Zellen

In der Abbildung 13 ist die Expression von CD137 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Patienten Nr. 1, 8 und 22 für CD4 T-Zellen und Patienten Nr. 1, 8, 11 für CD8 T-Zellen bis zu 40 % CD137 aufweisen. Hingegen exprimieren die Probanden 1 und 2 nur geringfügig CD137.

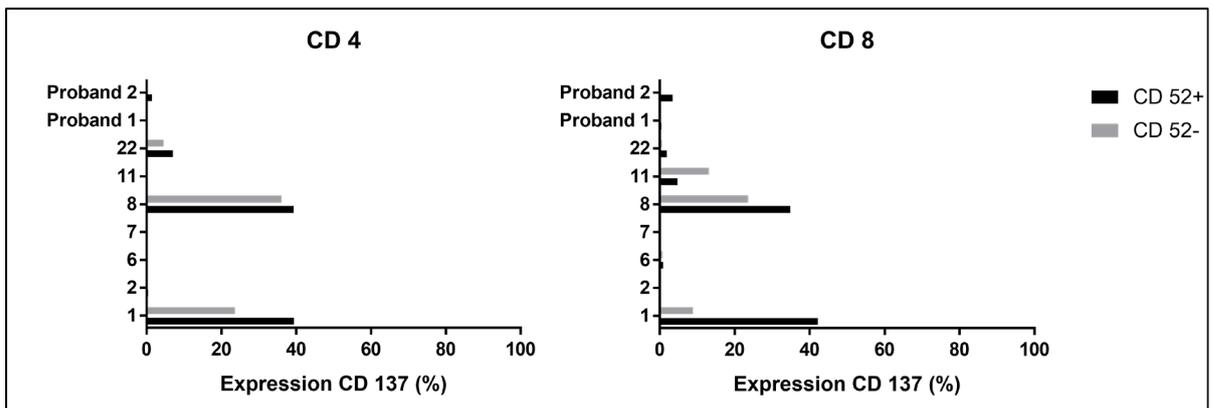


Abbildung 13: CD137 Expression auf CD4 und CD8 T-Zellen

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich sagen, dass bei den Studienpatienten ein individuelles Verteilungsmuster von CD28, CD54, CD58 und CD137 vorliegt. Vor allem bei CD28 und CD58 fällt aber auf, dass CD52-negative T-Zellen kostimulatorische Moleküle, die zur Interaktion zwischen T-Zelle und APZ und damit für die Immunantwort verantwortlich sind (32), aufweisen. Teilweise konnten wir beobachten, dass sogar die CD52-negativen T-Zellen mehr kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren im Gegensatz zu den CD52-positiven T-Zellen.

### 5.5 CMV-spezifische CD8 T-Zellen

Mit Hilfe HLA-Peptid-spezifischer Tetramere konnten wir CMV-spezifische CD8 T-Zellen bei insgesamt sechs Patienten (Patienten Nr. 2, 9, 26, 27, 28, 39) identifizieren. In der Gegenüberstellung CD52-positiver und CD52-negativer T-Zellen erkennt man eine deutlich höhere Frequenz CMV-spezifischer CD8 T-Zellen in der CD52-positiven T-Zellpopulation.

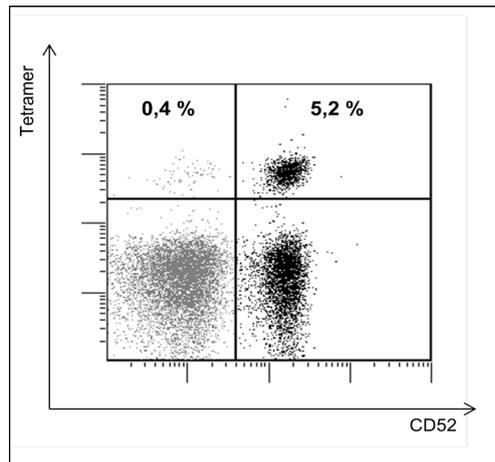
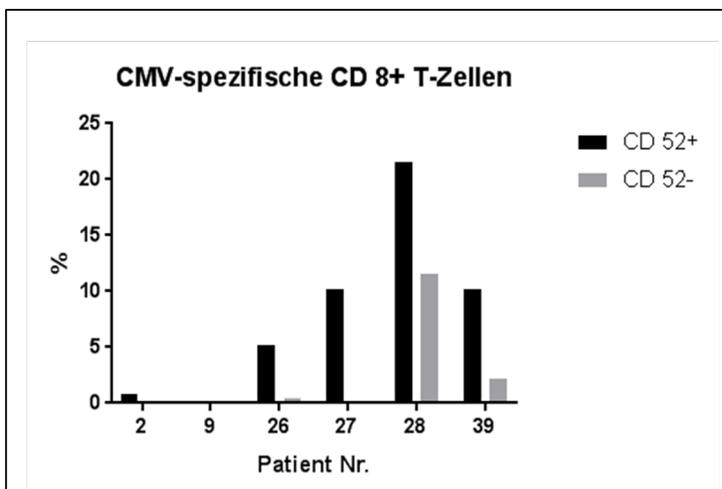


Abbildung 14: Tetramer-positiver Zellen in der CD52-positiven und CD52-negativen T-Zellpopulation bei Patnr. 26

Bei allen sechs untersuchten Studienpatienten beobachteten wir in der CD52-positiven T-Zellpopulation eine höhere Frequenz CMV-spezifischer CD8 T-Zellen. Die CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>-</sup> wiesen hingegen eine Frequenz von < 1 % (Ausnahme: Patienten Nr. 28 und 39) auf. In der Auswertung verdeutlicht sich die individuelle Verteilung des Anteils CMV-spezifischer CD8 T-Zellen bei den Studienpatienten.



Patient Nr.	Tetramer pos. (%)	
	CD52 <sup>+</sup>	CD52 <sup>-</sup>
2	0,8	0,1
9	0,1	0
26	5,2	0,4
27	10,2	0,1
28	21,6	11,5
39	10,2	2,2

Abbildung 15: Diagramm und Tabelle Anteil Tetramer positiver CD8 T-Zellen in CD52-positiver und CD52-negativer T-Zellpopulation

Diese Beobachtung konnte auch anhand der FACS-sortierten T-Zellkultur von Patient Nr. 28 nachgewiesen werden. 89,1 % der CD52-positiven T-Zellen in der T-Zellkultur von Patient Nr. 28 sind Tetramer positiv, währenddessen in der CD52-nega-

tiven T-Zellkultur nur 0,1 % Tetramer-positive T-Zellen detektiert werden konnte (siehe Abb. 16). Auch hier verdeutlicht sich, dass der Hauptanteil der CMV-spezifischen CD8 T-Zellen CD52-positiv ist.

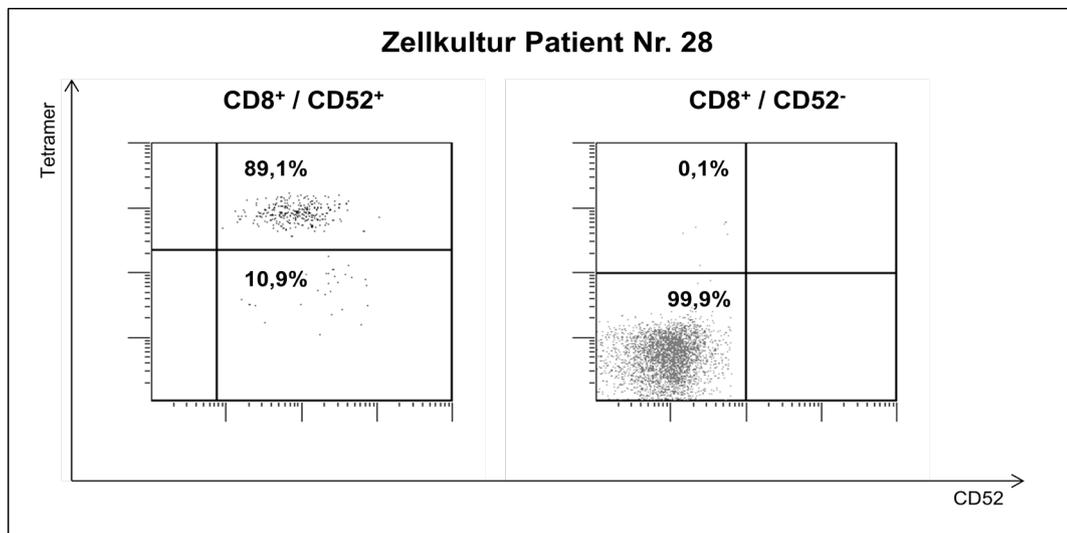


Abbildung 16: Darstellung Verteilung Tetramer-positiver T-Zellen bei CD8 / CD52<sup>+</sup> T-Zellkultur und CD8 / CD52<sup>-</sup> T-Zellkultur

## 5.6 CD52-negative Gedächtnis-T-Zellen nach Alemtuzumabgabe

Wir untersuchten den Phänotyp der T-Zellen von insgesamt 18 Patienten im chronologischen Verlauf nach Alemtuzumab-basierter allogener HSZT (34-1617 Tage nach HSZT) durchflusszytometrisch. Das untersuchte Patientenkollektiv war 23 bis 72 Jahre alt. Gedächtnis-T-Zellen weisen auf ihrer Oberfläche CD45RO auf. Im Fokus der Untersuchung stand die prozentuale Verteilung der Gedächtnis-T-Zellen im Hinblick auf die CD52-Expression. Nachfolgend ist die Gatingstrategie in Abb. 17 (Lymphozyten -> CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> oder CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen -> CD45RO<sup>+</sup> -> CD52<sup>+</sup>/CD52<sup>-</sup>) aufgezeigt.

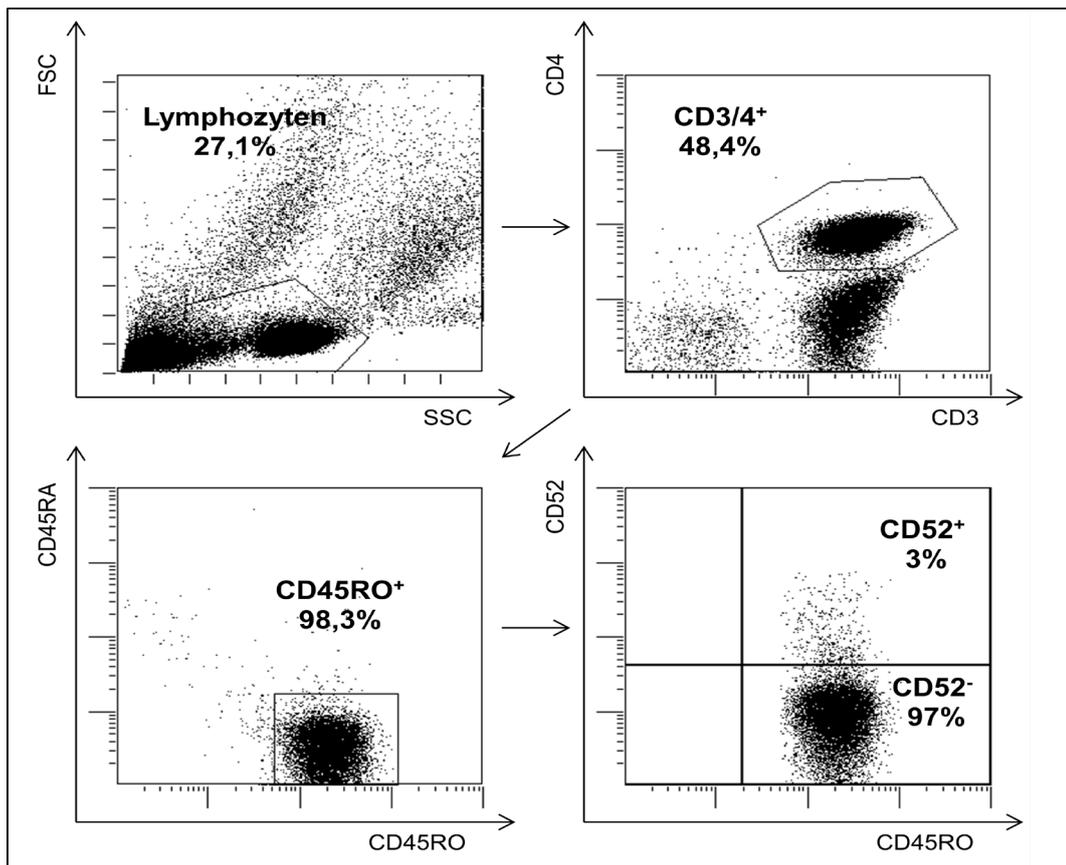


Abbildung 17: Gatingstrategie Gedächtnis-T-Zellen exemplarisch für CD4 T-Zellen an Patient Nr. 11 (Tx +209)

Bei allen 18 Patienten konnten wir für CD4 und CD8 T-Zellen einen Memory-Phänotyp nachweisen. Die prozentuale Verteilung der Gedächtnis-T-Zellen ist dabei individuell vom Patienten und vom Zeitpunkt der Probenentnahme nach Transplantation abhängig. Die unten aufgeführte Tabelle gibt einen Überblick über die Verteilung der CD4 und CD8 Gedächtnis-T-Zellen getrennt nach CD52-Expression.

		Gedächtnis-T-Zellen			
		CD4		CD8	
Patient Nr.	Tx	CD52 <sup>+</sup>	CD52 <sup>-</sup>	CD52 <sup>+</sup>	CD52 <sup>-</sup>
1	365	27,4	72,6	47,8	52,2
	967	66,3	33,7	80,8	19,2
	1618	64,3	25,7	89,9	10,1
2	140	10,8	89,2	21,7	78,3
	350	52,8	47,2	49,1	50,9
	937	73,9	26,1	90,3	9,7
6	140	4,6	95,4	30,8	69,2
	179	14,5	85,5	16,1	83,9
7	100	45,3	54,7	92	8
	175	38,1	61,9	31,6	68,4

<b>9</b>	140	99,7	0,3	99,9	0,1
<b>11</b>	100	8,1	91,9	16,3	83,7
	153	37,2	62,8	61,6	38,4
	204	2,1	97,9	26,1	73,9
<b>13</b>	50	4,2	95,8	69,5	30,5
	148	43,9	56,1	76,7	23,3
<b>14</b>	103	8,9	91,1	60,3	39,7
	132	14,9	85,1	36,1	63,9
	146	19,3	80,7	66,5	33,5
<b>19</b>	41	21,6	78,4	96,6	3,4
	90	13,8	86,2	63,8	36,2
<b>21</b>	117	64,1	35,9	42	58
	350	87,1	12,9	86,8	13,2
<b>22</b>	646	34,5	65,5	64,1	35,9
<b>25</b>	34	93,9	6,1	100	0
	111	27,6	72,4	98,7	1,3
	176	34,5	65,5	94,3	5,7
	303	94,1	5,9	22,6	77,4
<b>28</b>	194	20	80	81,9	18,1
	230	18,9	81,1	84,6	15,4
<b>32</b>	365	31,7	68,3	26,1	73,9
	969	65,6	34,4	37,8	62,2
<b>35</b>	155	99,4	0,6	99	1
<b>39</b>	140	54,1	45,9	83,8	16,2
	365	77,6	2,4	49,6	50,4
	658	93,1	6,9	72,3	27,7
	1000	72,1	27,9	98,2	1,8
<b>41</b>	34	14,6	85,4	76,9	23,1
	48	12,4	87,6	53,5	46,5
<b>42</b>	50	17,4	82,6	33,1	66,9
	100	6,9	93,1	34,1	65,9

Tabelle 8: Darstellung der prozentualen Verteilung der Gedächtnis-T-Zellen in der CD4 und CD8 Population getrennt nach CD52 von 18 Patienten (ausgehend von 100% CD45RO<sup>+</sup> in der jeweiligen Population von CD4 und CD8)

Man erkennt, dass die Gedächtnis-T-Zellen hauptsächlich CD52-negativ sind. Zur weiteren Differenzierung erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen nach dem Zeitpunkt der Blutentnahmen nach Transplantation der jeweiligen Patienten: Tag < +100, Tag +100 – +365 und Tag > +365. Aufgrund der teils eingeschränkten Verfügbarkeit der Proben handelt es sich um unterschiedlich große Stichprobengrößen zu den jeweiligen Zeitpunkten. In der grafischen Darstellung (Abb. 18) des zeitlichen Verlaufs erkennt man eine hohe Streubreite des Anteils der CD52-negativen Gedächtnis-T-Zellen der Studienpatienten.

Es ist also von einem individuellen Muster bei jedem Patienten auszugehen. Dennoch lässt sich sagen, dass der Anteil der CD52-negativen Gedächtnis-T-Zellen in der CD8 Population zwischen Tag +100 und +365 ansteigt. Die CD4<sup>+</sup>/CD52<sup>-</sup> Gedächtnis-T-Zellen weisen ein anderes Verteilungsmuster auf, so nimmt der Anteil der Gedächtnis-T-Zellen mit zunehmender Zeit nach Transplantation ab. Den höchsten Anteil an CD4<sup>+</sup>/CD52<sup>-</sup> Gedächtnis-T-Zellen kann man < Tag +100 beobachten. Der geringste Anteil an CD52-negativen Gedächtnis-T-Zellen lässt sich bei CD4 und CD8 T-Zellen bei den Studienpatienten in der dritten Gruppe, also Zeitpunkt nach Transplantation > +365, dokumentieren. Nachfolgend sind die Daten im Zeitverlauf grafisch dargestellt.

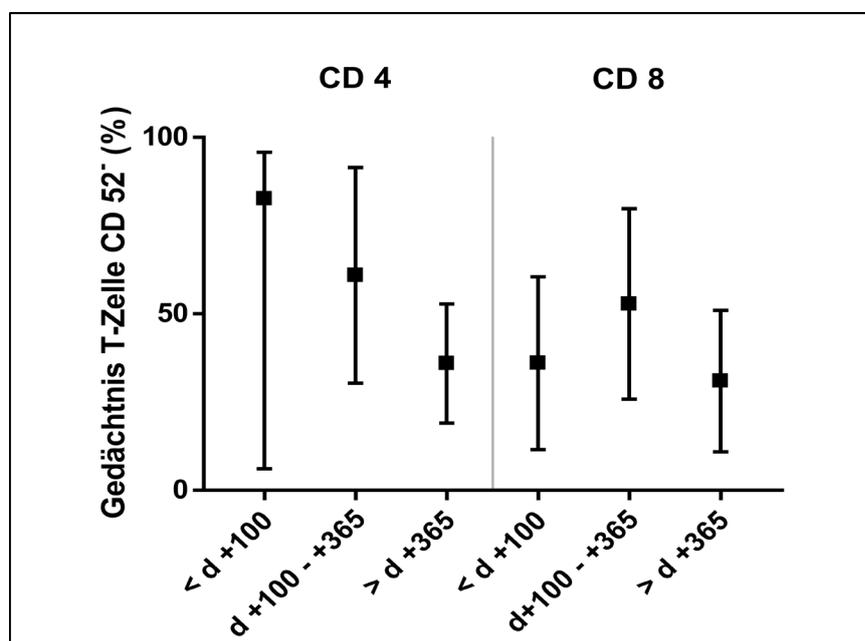


Abbildung 18: Grafik zeitlicher Verlauf des Medians CD52-negativer Memory T-Zellen für CD4 und CD8 der Studienpatienten, < Tag 100 n = 5, Tag 100 – 365 n = 15, Tag > 365 n = 5

### 5.6.1 Verteilung T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub>

Die Gedächtnis-T-Zellen lassen sich in die beiden folgenden Subpopulationen einteilen: Central Memory Zellen (T<sub>CM</sub>) und Effektor Memory Zellen (T<sub>EM</sub>). CD45RO ist, wie bereits oben erwähnt, der Marker für Gedächtnis-T-Zellen und somit auf T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> vorhanden. Zur Unterscheidung der zwei Subtypen dienen die Oberflächenmarker CD62L und CCR7 (52). Im Gegensatz zu T<sub>EM</sub> weisen T<sub>CM</sub> CD62L und CCR7 auf. In unserer Analyse haben wir nach CD62L gegatet und konnten somit eine Unterscheidung erzielen (siehe Abb. 19).

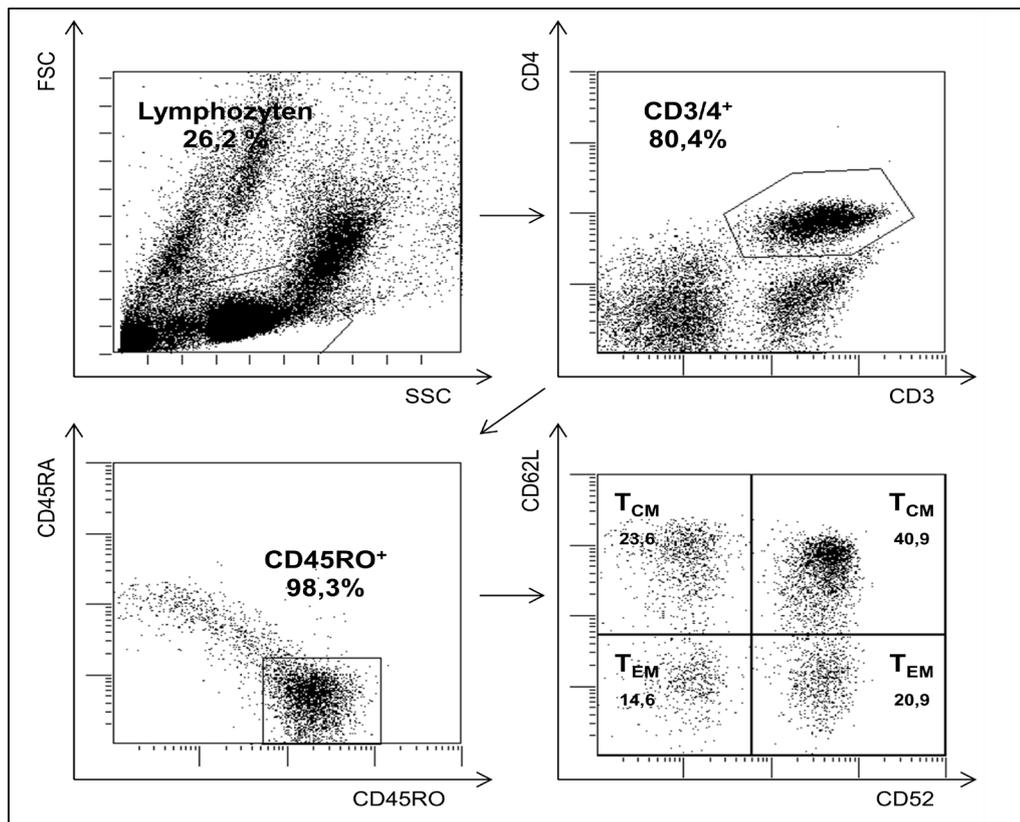


Abbildung 19: Gating-Strategie zur Unterscheidung T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> anhand des Oberflächenmarkers CD62L exemplarisch an Patient Nr. 1 (Tx +1618)

Die Ergebnisse von 17 Patienten wurden nach dem Gesichtspunkt T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> analysiert. Es zeigte sich, dass sowohl T<sub>CM</sub> als auch T<sub>EM</sub> bei den Patienten zu finden sind. Anhand der unten aufgeführten Abbildung 20 lässt sich eine unterschiedliche Verteilung zwischen CD52-positiven und CD52-negativen T-Zellen erkennen.

Die Rate der T<sub>CM</sub> CD52<sup>+</sup> T-Zellen liegt für CD4 und CD8 T-Zellen zu allen drei Zeitpunkten unter 40%. CD52<sup>-</sup> T<sub>CM</sub> sind in der CD4 T-Zellpopulation bis Tx +365 vorwiegend vertreten, währenddessen bei den CD8 T-Zellen der Anteil abnehmend ist. Hingegen die CD52<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> den Hauptanteil der Gedächtnis-T-Zellen in der CD8 Population bis Tx > +365 bilden und die T<sub>EM</sub> CD52<sup>-</sup> T-Zellen deutlich verringert sind. In der CD4 Population erkennt man einen Anstieg der T<sub>EM</sub> CD52<sup>+</sup>, vor allem ab Tx > +365.

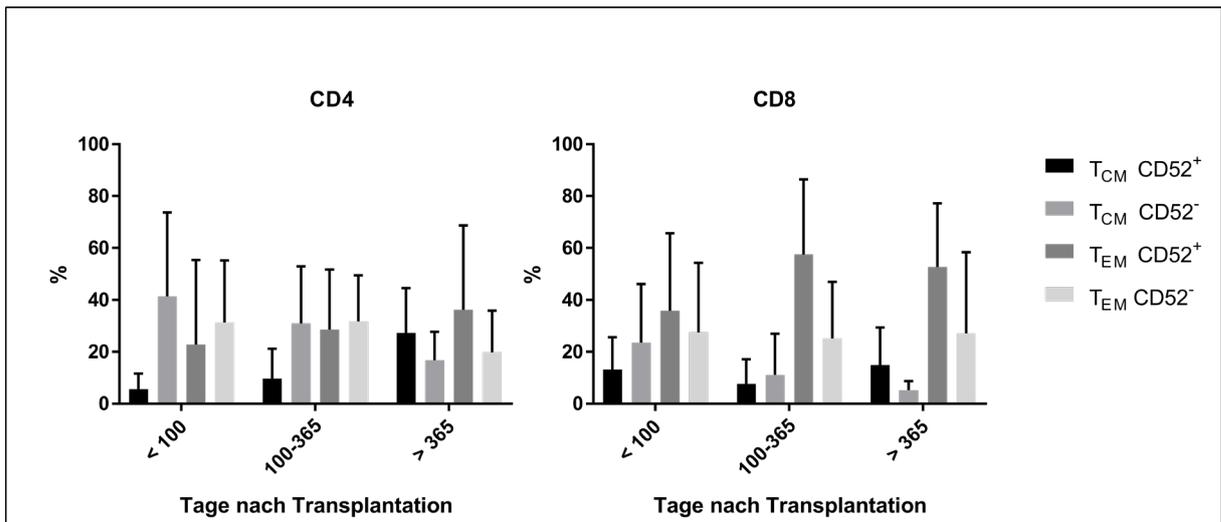


Abbildung 20: Gegenüberstellung Anteil T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> für CD4 und CD8 T-Zellen anhand der CD52-Expression

### 5.6.2 Rekonstitution naiver T-Zellen nach HSZT

Einen weiteren wichtigen Gesichtspunkt der Analysen bildet die Rekonstitution naiver T-Zellen nach Transplantation. Bei 10 von 17 untersuchten Studienpatienten fanden wir nach Transplantation naive CD4 und CD8 T-Zellen. Die naiven T-Zellen, die sich phänotypisch als CD45RA<sup>+</sup> / CD62L<sup>+</sup> / CCR7<sup>+</sup> T-Zellen markieren sind dabei alle CD52-positiv.

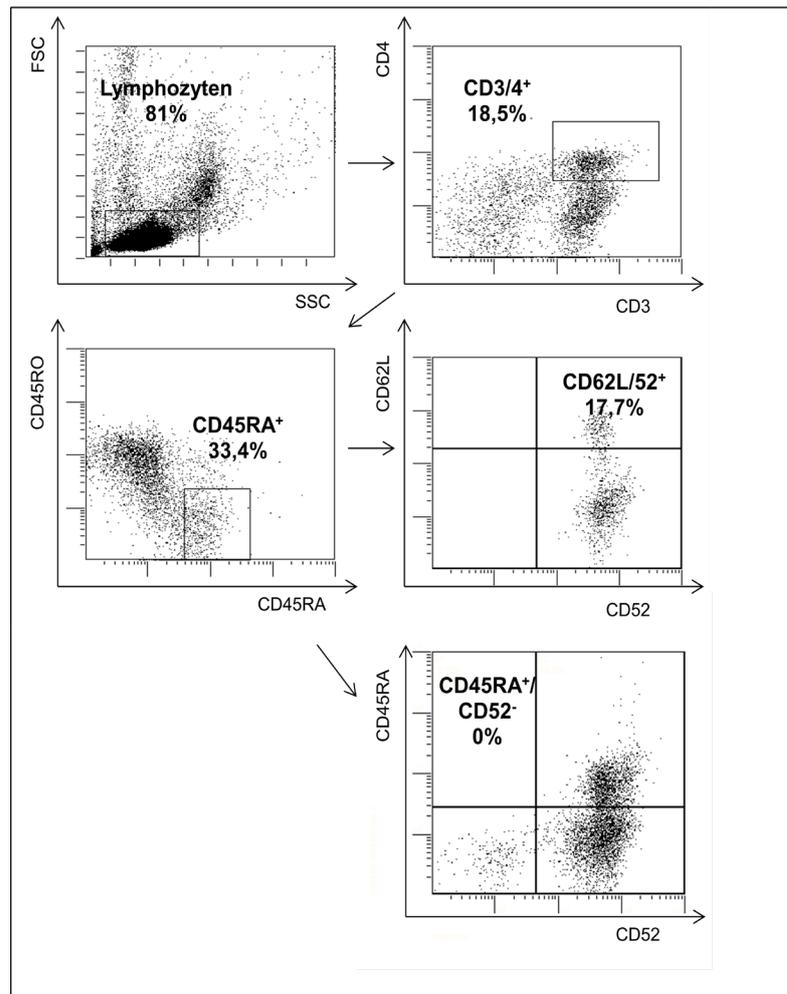


Abbildung 21: Gating naive T-Zellen exemplarisch für CD4 T-Zellen an Patient Nr. 39 (Tx +658)

Im Vergleich zu Gesunden mit 48 % naiven T-Zellen (Abb. nicht gezeigt) ist der Anteil an naiven T-Zellen bei Transplantationspatienten deutlich vermindert. Bei Tx < 100 beträgt der Anteil an naiven T-Zellen in der CD4 und CD8 T-Zellpopulation < 1 %. Zwischen Tag 100-365 nach Transplantation zeigt sich eine Rate von < 10 % naiver T-Zellen. Ab Tag 365 nach Transplantation kann man in den Analysen eine weitere Zunahme an CD52-positiven naiven T-Zellen beobachten. Wir haben bis zu 11 % naive T-Zellen in der CD4 T-Zellpopulation und bis zu 26 % in der CD8 T-Zellpopulation gefunden. Insgesamt zeigt sich zu allen drei Zeitpunkten ein geringerer Anteil an CD52-positiven naiven T-Zellen bei den CD4 T-Zellen verglichen mit den CD8 T-Zellen. Auch individuelle Unterschiede zwischen den Studienpatienten in der Rekonstitution naiver T-Zellen verdeutlichen sich zu allen drei Zeitpunkten nach Transplantation. Die unten aufgeführte Abbildung gibt eine Übersicht über den Verlauf der Rekonstitution naiver T-Zellen nach Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie anhand von 17 Studienpatienten.

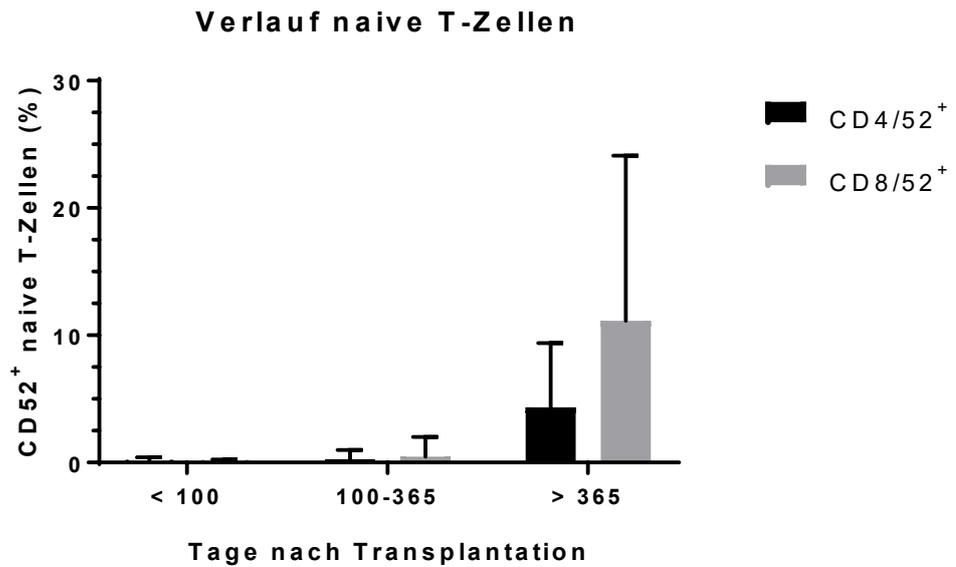


Abbildung 22: Darstellung zeitlicher Verlauf des Auftretens naiver T-Zellen bei den Transplantationspatienten (% = Anteil CD52<sup>+</sup> T-Zellen an CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen)

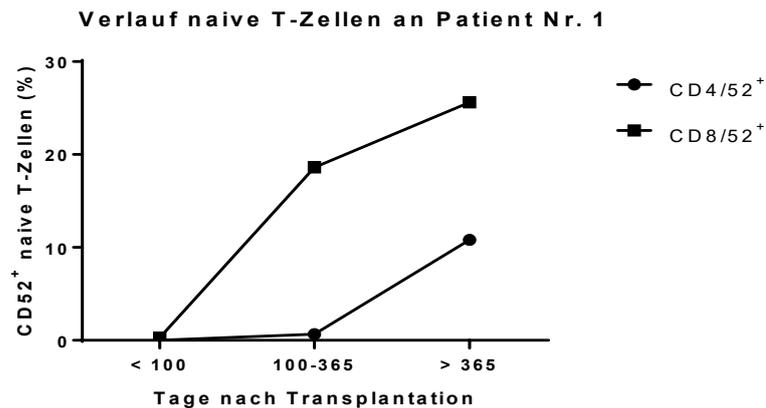


Abbildung 23: Verlauf naive T-Zellen nach Transplantation an Patient Nr. 1 (% = Anteil CD52<sup>+</sup> T-Zellen an CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen)

In Zusammenschau zeigt sich, dass sich nach der allogenen HSZT im Verlauf naive T-Zellen bei den Studienpatienten regenerieren. Diese weisen alle CD52 auf ihrer Oberfläche auf. Jedoch ist der prozentuale Anteil der naiven T-Zellen bei Transplantationspatienten im Vergleich zu Gesunden deutlich vermindert. Die Regeneration naiver T-Zellen ist in der CD8 T-Zellpopulation schneller als in der CD4 T-Zellpopulation (siehe Abb. 23). In der CD52-negativen T-Zellpopulation haben wir zu keinem Zeitpunkt und bei keinem Patienten naive T-Zellen gefunden.

### 5.6.3 Terminale Effektor Zellen

In der FACS-Analyse zeigten sich auch GPI-Anker-negative CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen, die kein CD62L oder CCR7 auf der Oberfläche besaßen. Phänotypisch kann man hier von terminalen Effektor-Zellen ausgehen. Das Gating wurde wie unter Abbildung 21 durchgeführt.

Bei allen 17 Patienten konnten wir von Tag +34 bis Tag +1618 CD 45RA<sup>+</sup> / CD62L<sup>-</sup> T-Zellen detektieren. Zu allen 3 Zeitpunkten nach Transplantation sind die erschöpften T-Zellen sowohl für CD4 als auch für CD8 am ehesten CD52-positiv. CD52-negativ erschöpfte T-Zellen haben einen deutlich geringeren Anteil. Im Verlauf ist die Anzahl der erschöpften T-Zellen insgesamt abnehmend.

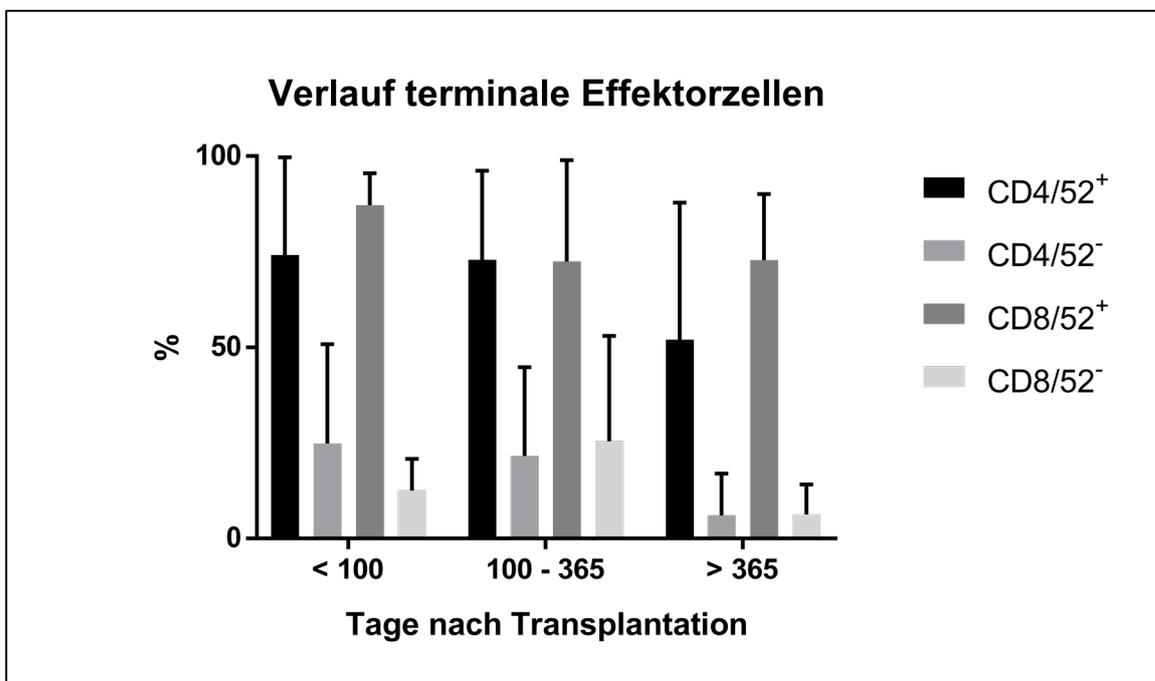


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der terminalen CD52 neg. Effektorzellen für CD4 und CD8 T-Zellen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der höchste Anteil an erschöpften T-Zellen in der CD8 T-Zellfraktion zu finden ist. Zu allen drei Zeitpunkten und bei allen Patienten zeigte sich vorrangig ein CD52-positiver Phänotyp bei den erschöpften T-Zellen.

## 5.7 CD52-Expression auf regulatorischen T- Zellen

Bei 12 Studienpatienten analysierten wir die CD52-Expression auf regulatorischen T-Zellen. Wir verwendeten folgende Antikörper zur Färbung: CD3 BlueHorizon, CD4 APC Cy-7, CD52 APC, CD25 PE und FoxP3 FITC. In der Auswertung wurde zuerst im SSC und FSC auf die Lymphozyten gegatet. Daraus wurden dann die CD3<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> T-Zellen angezeigt. Schließlich wurde dann auf Treg mit CD25<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> gegatet und daraus dann nach CD52<sup>+</sup> und CD52<sup>-</sup> T-Zellpopulation getrennt (Gatingstrategie siehe Abb. 25).

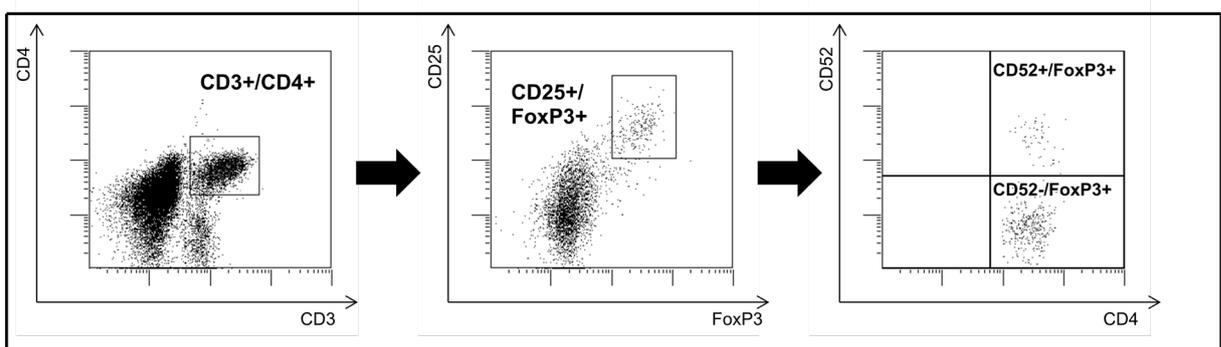


Abbildung 25: Gatingstrategie der T-regulatorischen Zellen gezeigt an Patient Nr. 19

Bei 11 von 12 Patienten konnten nach allogener HSZT mit Alemtuzmab-basierter Konditionierungstherapie CD52-negative regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden. Eine Übersicht gibt die nachfolgende Tabelle.

Patient	Population	%
1	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>7,4</b>
	CD52 <sup>+</sup>	97,4
	CD52 <sup>-</sup>	2,6
2	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>3,4</b>
	CD52 <sup>+</sup>	99,7
	CD52 <sup>-</sup>	0,3
3	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>1,5</b>
	CD52 <sup>+</sup>	75
	CD52 <sup>-</sup>	25
5	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>2,2</b>
	CD52 <sup>+</sup>	11
	CD52 <sup>-</sup>	89

6	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>2,9</b>
	CD52 <sup>+</sup>	16,8
	CD52 <sup>-</sup>	83,2
7	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>8,6</b>
	CD52 <sup>+</sup>	93,3
	CD52 <sup>-</sup>	6,7
9	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>5,7</b>
	CD52 <sup>+</sup>	72,9
	CD52 <sup>-</sup>	27,1
11	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>5,3</b>
	CD52 <sup>+</sup>	1,4
	CD52 <sup>-</sup>	98,6
14	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>4,8</b>
	CD52 <sup>+</sup>	15,3
	CD52 <sup>-</sup>	84,7
19	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>6,2</b>
	CD52 <sup>+</sup>	37,4
	CD52 <sup>-</sup>	62,6
22	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>1,7</b>
	CD52 <sup>+</sup>	10,3
	CD52 <sup>-</sup>	89,7
39	<b>CD4/25<sup>+</sup>/FoxP3</b>	<b>1,4</b>
	CD52 <sup>+</sup>	100
	CD52 <sup>-</sup>	0

Tabelle 9: Übersicht über die Treg-Verteilung in der CD52-positiven und -negativen Population der Patienten

## 5.8 Funktionelle Tests

### 5.8.1 IFN- $\gamma$ Zytokin-Sekretionsassay

Im Zytokin-Sekretionsassay kann man die CMV-spezifische IFN- $\gamma$  Produktion der T-Zellen ex vivo nachweisen. Für unsere Experimente wurden dafür Patienten ausgewählt, die CMV seropositiv waren und im Vortest CMV-Tetramer-positiv T-Zellen aufwiesen.

In einem ersten methodischen Ansatz etablierten wir diesen Test für transplantierte Patienten. Wir untersuchten bei Patient Nr. 9 den Einfluss der Inkubationszeit auf die IFN- $\gamma$  Freisetzung der PBMC (siehe Abb. 26). Bei unserem Zytokin-Sekretionsassay nach Standardbedingungen (siehe 4.9.2) wurden die Zellen nach Peptid- und DC-Zugabe für vier Stunden im Inkubator gelagert. Wir verlängerten diese Zeit auf sechs

Stunden. In der Gegenüberstellung der Ergebnisse fiel auf, dass die CD4<sup>+</sup>/CD52<sup>+</sup> T-Zellen nach sechs Stunden Inkubation mehr IFN- $\gamma$  freisetzten (1 %), als nach vier Stunden mit nur 0,3 %. Somit ist eine Verlängerung der Inkubationszeit als sinnvoll zu werten. Bei den CD8 T-Zellen ließ sich kein Effekt erkennen. Die IFN- $\gamma$ -Produktion war zu beiden Zeitpunkten mit 0,3 % identisch. Die GPI-Anker-negativen Zellen zeigten sowohl bei den CD4 als auch bei den CD8 T-Zellen nach vier und sechs Stunden keine IFN- $\gamma$  Freisetzung.

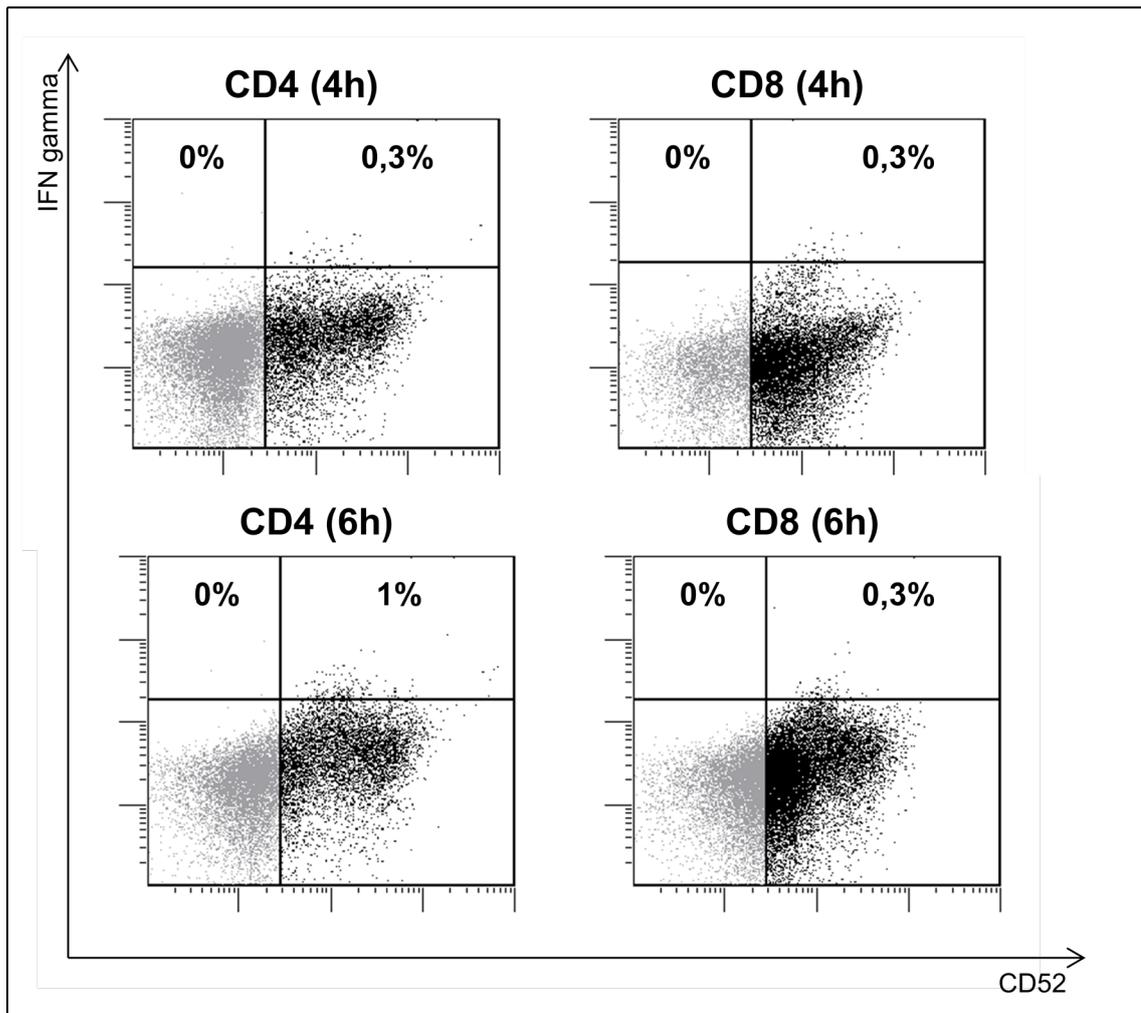


Abbildung 26: Vergleich der CMV-spezifischen IFN-Freisetzung der PBMC von Patient Nr. 9 nach 4 und 6 Stunden

Nach Etablierung des Assays untersuchten wir fünf Patienten (Patienten Nr. 8, 9, 26, 27, 40) der Studie und verglichen dabei die T-Zellantwort zwischen der CD52-positiven und -negativen Fraktion für die CD4 und CD8 T-Zellen. Es wurden jeweils PBMC, PBMC mit DC, PBMC mit Peptid und PBMC mit Peptid und DC getestet. Als Peptide wurden PepMix™ HCMVA (ÜLP, siehe 3.9) und H-NLVPMVATV-OH (HLA-A2 restringiert, NLV, siehe 3.9) verwendet. Die vier Versuchsansätze wurden mit den FACS-Antikörpern CD52 FITC, IFN- $\gamma$  PE, CD4/8 APC und CD3 Blue Horizon gefärbt. Um die IFN- $\gamma$  Freisetzung vergleichen zu können, wurde zuerst auf die Lymphozyten gegatet, dann CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> oder CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> und daraus dann für die CD52-positiven und -negativen Zellen die IFN- $\gamma$  Produktion angezeigt.

In der nachfolgenden Tabelle kann man bei allen Versuchsansätzen eine höhere IFN- $\gamma$  Freisetzung unter Peptidstimulation bei den CD52 positiven T-Zellen verglichen mit den CD52-negativen T-Zellen beobachten (Tab. 10).

Patient	CD4			CD8		
	Peptidstimulation	CD52 <sup>+</sup>	CD52 <sup>-</sup>	Peptidstimulation	CD52 <sup>+</sup>	CD52 <sup>-</sup>
8	ohne	0,1	0	ohne	0,2	0
	mit ÜLP	<b>0,9</b>	<b>0,3</b>	mit NLV	<b>0,2</b>	<b>0</b>
9	ohne	0	0	ohne	0,7	0
	mit ÜLP	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	mit NLV	<b>0,4</b>	<b>0</b>
26	ohne	0,6	0	ohne	0,1	0
	mit ÜLP	<b>1,1</b>	<b>0</b>	mit NLV	<b>0,8</b>	<b>0</b>
27	ohne	0,7	0,1	ohne	0,3	0
	mit ÜLP	<b>0,7</b>	<b>0,2</b>	mit NLV	<b>1,7</b>	<b>0,1</b>
40	ohne	0,1	0	ohne	0,1	0
	mit ÜLP	<b>0,9</b>	<b>0</b>	mit ÜLP	<b>0,2</b>	<b>0</b>

Tabelle 10: Zusammenfassung der IFN- $\gamma$  Freisetzung der PBMC der Patienten im Zytokin-Sekretionsassay

### 5.8.2 IFN- $\gamma$ Elispot

Der Elispot ist ein weiterer Funktionstest zur Überprüfung der T-Zellfunktion ex vivo anhand der IFN- $\gamma$ -Sekretion. Dafür wurden die T-Zellen von Patient Nr. 28 nach CD52-Expression FACS-sortiert und in Kultur genommen. Die CD8 T-Zellen getrennt nach CD52-Expression wurden mit K562B7-Zellen und HLA-B7 restringierten Peptid H-TPRVTGGGAM-OH (TPR-Peptid, siehe 3.9) nach Protokoll inkubiert. Die Positivkontrolle wurde mit PHA und die Negativkontrolle mit CD8 ohne Peptid und K562B7-Zellen durchgeführt.

In der Auswertung des Elispots erkennt man eine deutlich höhere Spotproduktion und damit eine höhere IFN- $\gamma$ -Sekretion der CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber den CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>-</sup> T-Zellen. Erst durch die Titration der T-Zellen und K562B7-Zellen war eine Auszählung der Spots/well durch den Elispot-Reader möglich. So wurden die CD8T-Zellen und K562B7-Zellen im Verhältnis 1:4 eingesetzt. So kann man bei den CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>+</sup> T-Zellen 1184 Spots / 10.000 T-Zellen auszählen. Die CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>-</sup> T-Zellen weisen hingegen nur 75 Spots / 10.000 T-Zellen auf. Somit konnte in einem weiteren Funktionstest anhand der IFN- $\gamma$ -Sekretion eine eingeschränkte Funktion der CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>-</sup> T-Zellen nachgewiesen werden.

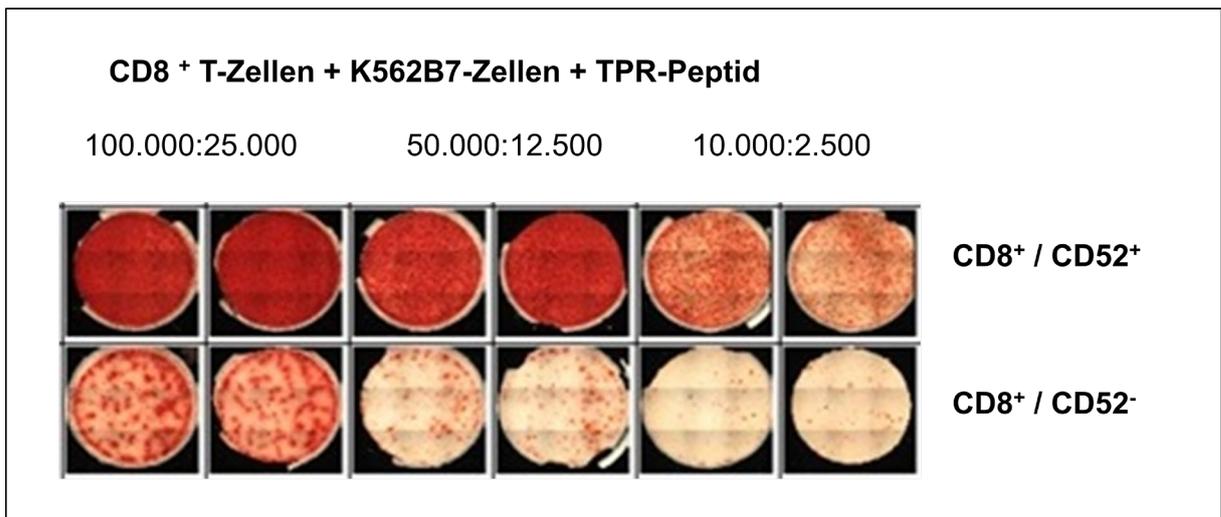


Abbildung 27: Ergebnis IFN- $\gamma$  Elispot von Patient Nr. 28, im Vergleich CD8/52<sup>+</sup> und CD8/52<sup>-</sup> T-Zellen

### 5.8.3 Untersuchung der Zelllyse der T-Zellen im Chrom-release-Assay

Im Chrom-release-Assay konnten wir die lytische Funktion der CD8 T-Zellen, vergleichend zwischen CD52-positiven und -negativen T-Zellen, untersuchen. Es wurden die im FACS-sortierten und in vitro stimulierten CD8 T-Zellen von Patient Nr. 28 analysiert. Die Zellen wurden mit CMV-infizierten Fibroblasten und zur Kontrolle mit K562-B7 und TPR getestet.

Bei einer E:T von 30:1 zeigten die CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>+</sup> T-Zellen eine spezifische Lyse der CMV-infizierten Fibroblasten von 75 %, die auch bei einer E:T von 3:1 noch 70 % betrug. Die Fibroblasten ohne CMV wurden zu 20-25 % lysiert. Im Vergleich dazu zeigten die CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>-</sup> T-Zellen eine deutlich geringere Lyse CMV-infizierter Fibroblasten, die sowohl bei einer E:T von 30:1, als auch bei einer E:T von 3:1 25 % betrug.

Anhand der nachfolgenden Abbildung kann man einen deutlichen Unterschied im Lyseverhalten zwischen CD52-positiven und CD52-negativen T-Zellen erkennen. Die CMV-spezifische Zelllyse ist bei CD52-negativen T-Zellen deutlich vermindert.

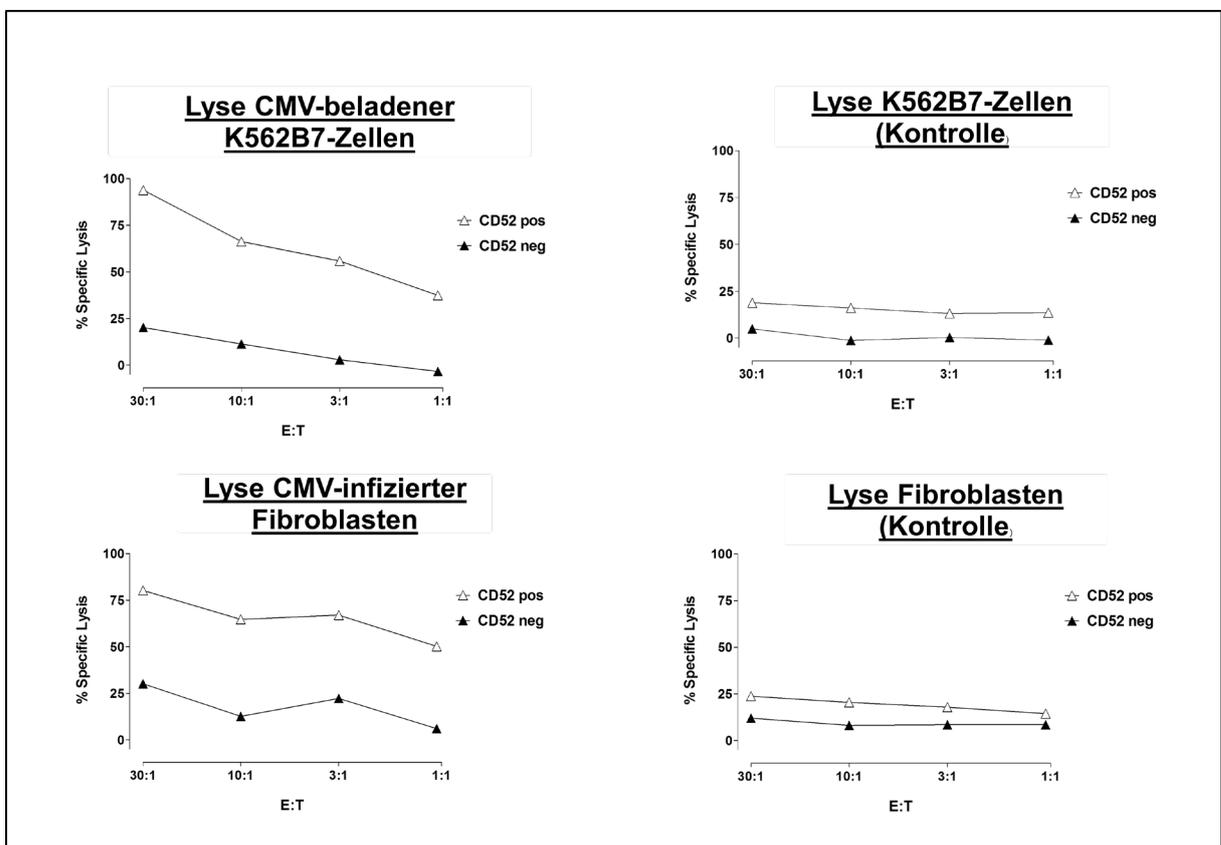


Abbildung 28: Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays, gezeigt an Patient Nr. 28

## 5.9 Proliferation

### 5.9.1 Anwendung bestehenden CFSE-Protokolls an den T-Zellen der Transplantationspatienten

Die T-Zellen wurden mit dem CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit der Firma invitrogen in vitro untersucht. Das mitgelieferte Protokoll diente als Grundlage. In drei Versuchsansätzen wurde die optimale Konzentration anhand von PBMC aus Buffys ausgetestet. Nach ursprünglichem Protokoll ging man von einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  aus. Wir testeten 0,5; 2,5 und 5  $\mu\text{M}$ . In der Gegenüberstellung der Daten zeigte sich bei einer CFSE Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  eine gute Abgrenzung der Peaks und Auswertung der Proliferation. Somit stellt 2,5  $\mu\text{M}$  eine optimale Konzentration im Hinblick auf Zelltoxizität und ausreichender Beurteilung der Zellteilung dar.

Nach vielen Vorversuchen wurde die Proliferation an Patient Nr. 2 mit der CFSE-Methode getestet. Im nachfolgenden FACS-Bild (Abb. 29) zeigt sich eine deutlich eingeschränkte Proliferation von  $\text{CD4}^+/\text{CD52}^-$  T-Zellen im Vergleich zu  $\text{CD4}^+/\text{CD52}^+$  bei Patient Nr. 2. Innerhalb der  $\text{CD52}$ -positiven Population proliferieren 37,5 % der Zellen, in der  $\text{CD52}$ -negativen T-Zellfraktion insgesamt nur 15,6 % der Zellen.

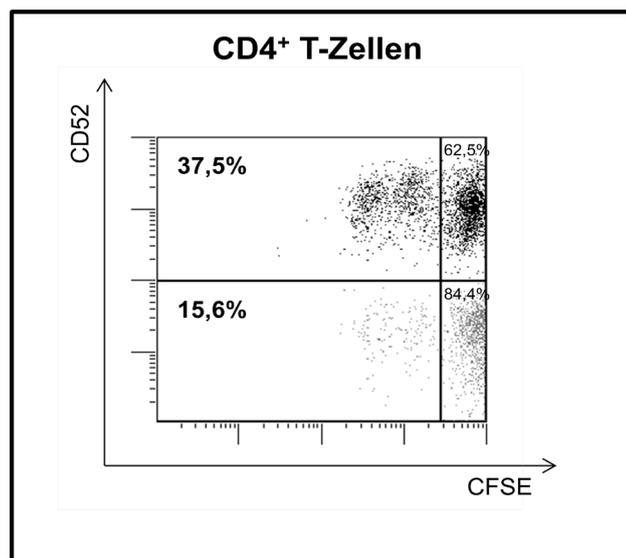


Abbildung 29: FACS-Darstellung Proliferation  $\text{CD4}^+$  T-Zellen getrennt nach  $\text{CD52}$ -Expression, Patient Nr. 2, 1h nach CFSE-Färbung, in einem dotplot dargestellt

Desweiteren wurden ex vivo T-Zellen von Patient Nr. 2 unspezifisch mit OKT<sub>3</sub> stimuliert, anschließend mit CFSE gefärbt und mit Hilfe der FACS-Analyse die T-Zellproliferation nach einer, zwei, vier, sechs, zehn und zwölf Stunden gemessen.

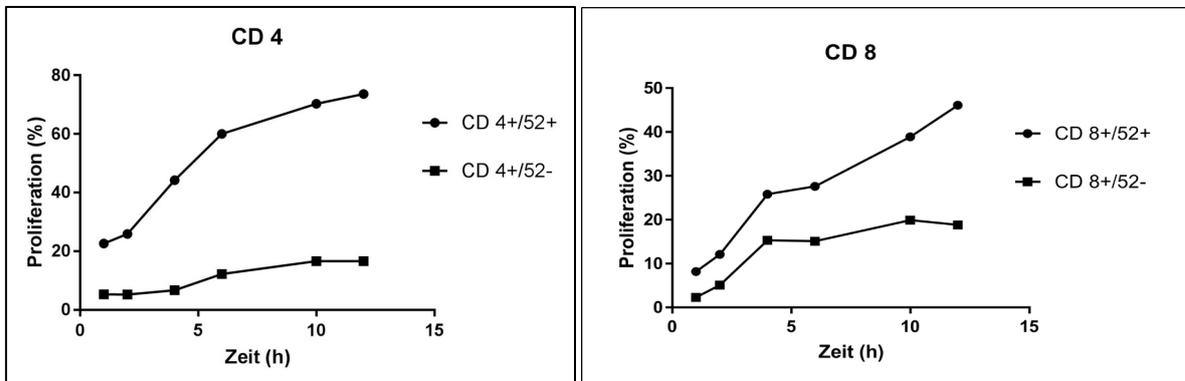


Abbildung 30: Proliferation über 12h ex vivo CD4 und CD8 T-Zellen von Patient Nr. 2

Aus den Daten geht hervor, dass sowohl bei den CD4 als auch bei den CD8 T-Zellen die CD52-negativen Zellen in den ersten zwölf Stunden eine geringere Proliferation zeigten. Jeweils nur 20 % der Zellen sowohl bei den CD4 und CD8 T-Zellen teilten sich. Im Gegensatz dazu wiesen die CD52-positiven Zellen mit bis zu 70 % proliferierenden T-Zellen bei den CD4 und 45 % bei den CD8 auf.

Desweiteren haben wir die Proliferation von Patient Nr. 2 und 27 (Patient Nr. 27 nicht gezeigt) über fünf Tage untersucht. Am ersten Tag zeigte sich eine deutlich höhere Proliferationsrate der CD4<sup>+</sup>/CD52<sup>+</sup> T-Zellen beider Patienten und der CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>+</sup> T-Zellen bei Patient Nr. 2. Danach konnte kein Unterschied zwischen den CD52-positiven und -negativen T-Zellen im Verlauf dokumentiert werden. Im unten aufgeführten Histogramm (Abb. 31) ist die Antigen-unspezifische Proliferation der CD4 T-Zellen getrennt nach CD52-Expression von Patient Nr. 2 in den ersten sechs Stunden dargestellt.

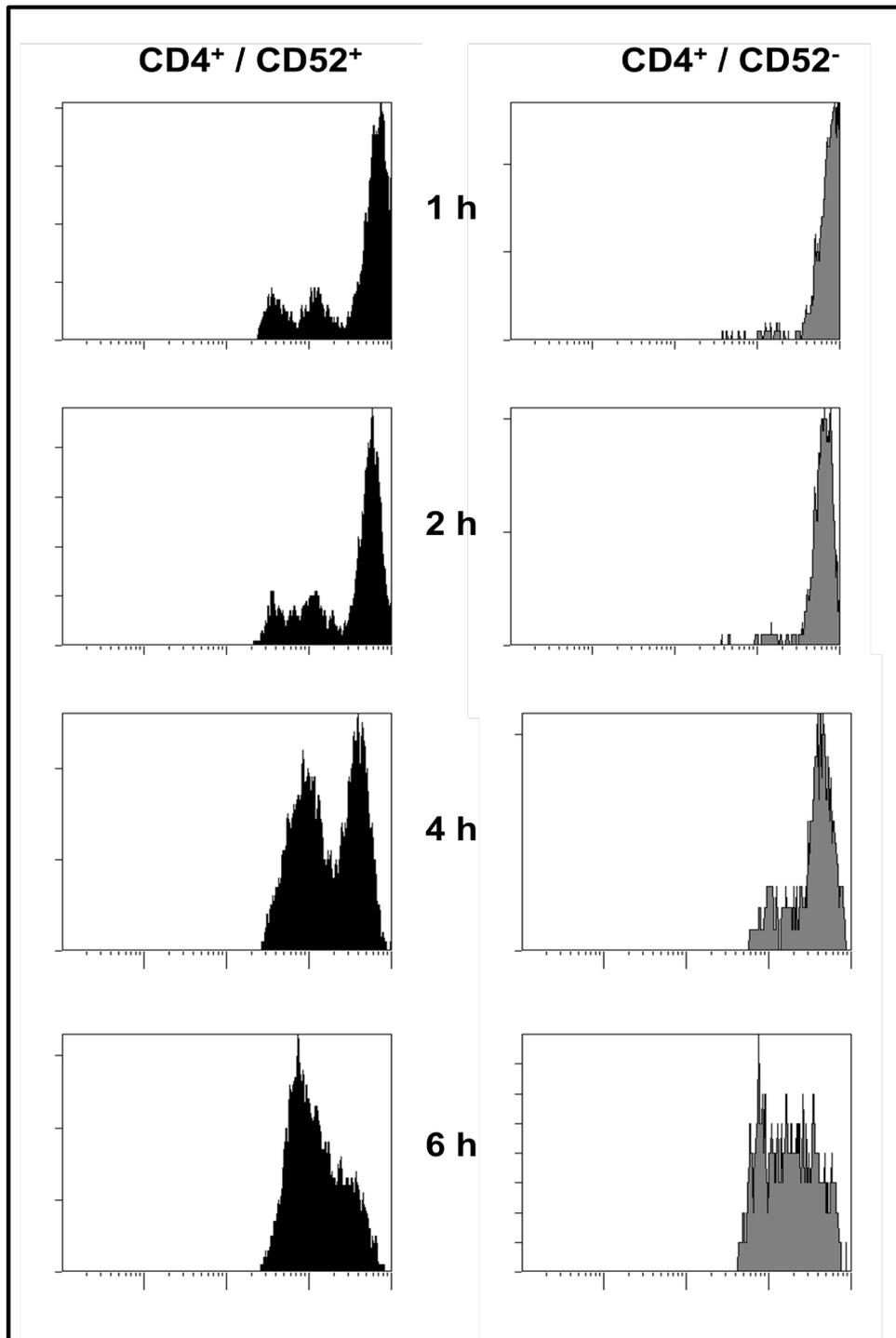


Abbildung 31: Histogrammdarstellung Proliferationsverhalten im Vergleich von CD4/CD52<sup>+</sup> und CD4/CD52<sup>-</sup> T-Zellen, an Patient Nr. 2

Es zeigt sich, dass die CD52-negativen T-Zellen für CD4 und CD8 T-Zellen, vor allem in den ersten 24 Stunden, eine verzögerte und geringere Proliferationsrate aufweisen. An den folgenden Tagen konnten wir keinen Unterschied detektieren.

### 5.9.2 Untersuchung des T-Zellrezeptor V-Beta-Repertoires auf CD8 T-Zellen

Wir untersuchten bei fünf Studienpatienten (Patienten Nr. 2, 3, 9, 27, 40) im Alter von 48-70 Jahren das TZR-V-Beta ( $V\beta$ )-Repertoire der CD52-positiven und CD52-negativen CD8 T-Zellpopulation. Grundsätzlich zeigten die CD8 T-Zellen der Patienten kein breites TZR-Spektrum. Das in der Literatur beschriebene am häufigsten vorkommende  $\alpha/\beta$ -Heterodimer (25) ist auch bei unseren Patienten sowohl für CD52-positive und CD52-negative T-Zellen wiederzufinden. Das  $\gamma/\delta$ -Heterodimer ist hauptsächlich bei CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>+</sup> T-Zellen vertreten. Insgesamt fällt auf, dass mehr  $V\beta$ -positive Peaks bei den CD8<sup>+</sup>/CD52<sup>+</sup> T-Zellen im Gegensatz zu den CD8/CD52<sup>-</sup> T-Zellen zu beobachten sind. Von einer individuellen Varianz bedingt durch einen unterschiedlichen Immunstatus und z.B. akuten Infektionen ist auszugehen.

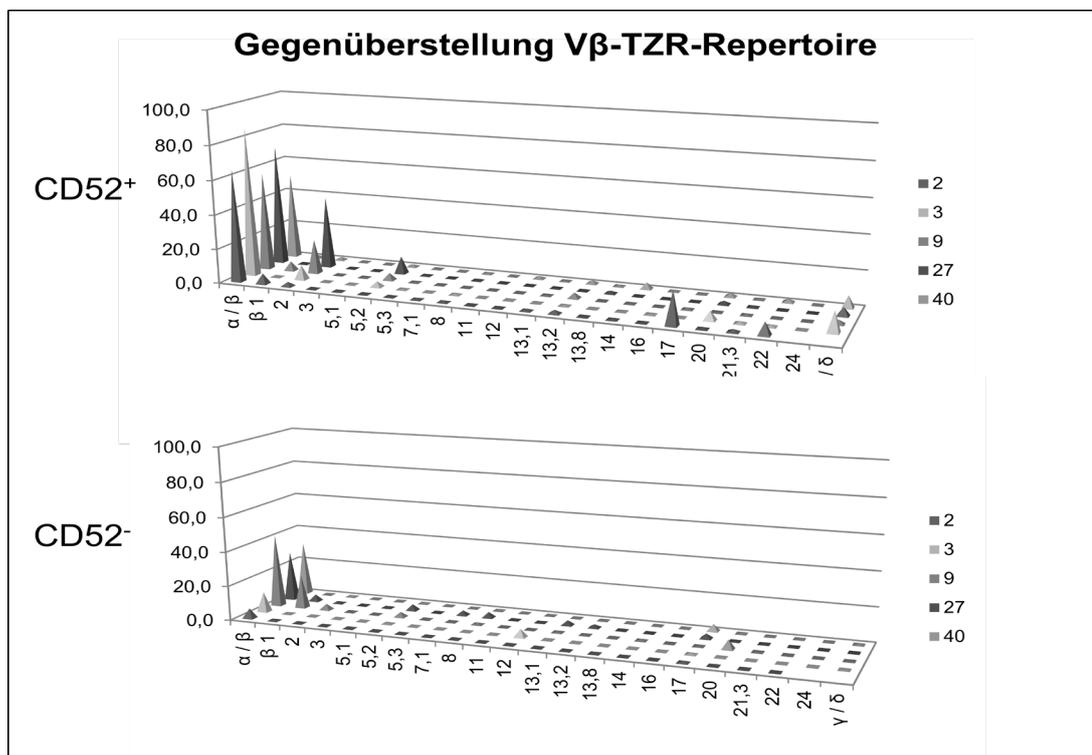


Abbildung 32: Gegenüberstellung  $V\beta$ -TZR-Repertoire von CD52<sup>+</sup> und CD52<sup>-</sup> T-Zellen bei fünf Studienpatienten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das TZR- $V\beta$ -Repertoire nach Alemtuzumab-Therapie im Rahmen einer HSZT deutlich eingeschränkt ist. Neben der T-Zell-depletion hat Alemtuzumab auch einen Einfluss auf das T-Zellrezeptor-Spektrum.

## 6 Diskussion

### 6.1 Die in vivo Alemtuzumabgabe führt zur Expansion GPI-Anker negativer T-Zellen

In mehreren klinischen Studien zeigte sich, dass durch die Gabe von Alemtuzumab bei den Patienten vorrangig CD52-negative (GPI-Anker negative) T-Zellen, die beim gesunden Menschen nur in sehr niedriger Frequenz zu finden sind, ausgebildet werden (8). Mittels FLAER-Färbung konnte in unserer Arbeitsgruppe der Verlust des GPI-Ankers sowie weiterer GPI-verankerter Moleküle (CD55, CD59) bei CD52-negativen T-Zellen nachgewiesen werden (9, 10, 113, 114). CD52-positive Zellen hingegen wiesen immer einen GPI-Anker auf.

Durch die in vivo Gabe von Alemtuzumab bildet sich bei T-Zellen ein – wie von der Paroxysmalen Nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) bekannter – Phänotyp aus (8). Die PNH ist eine seltene Multisystemerkrankung mit dem Hauptsymptom der Komplement-vermittelten intravaskulären Hämolyse (115). Durch eine somatische Mutation im PIG-A Gen in der GPI-Anker-Biosynthese fehlen die GPI-verankerten Moleküle CD55 und CD59 und die Hämolyse wird dadurch begünstigt (115). Bei unseren Transplantationspatienten beobachteten wir keine Hämolyse. Die Wirkung von Alemtuzumab beschränkt sich hauptsächlich auf B- und T-Zellen (6), währenddessen die PNH auch Erythrozyten betrifft (115), so dass sich hier eine Erklärung für die fehlende Hämolyse bei Alemtuzumab-therapierten Patienten ergibt. Die zuerst angenommene PIG-A-Mutation, wie sie bei der PNH anzutreffen ist, ist bei Alemtuzumab-behandelten Patienten laut Taylor et al nicht zu finden (8). Andere Arbeitsgruppen nehmen allerdings eine noch nicht entdeckte Mutation in der GPI-Anker-Biosynthese als mögliche Ursache für die Ausbildung von CD52-negativen T-Zellen nach Alemtuzumabgabe an (114).

Rawstron et al hingegen gehen davon aus, dass auch Nicht-transplantierte und Gesunde geringe Frequenzen von PNH-Klonen aufweisen (116). Zur Expansion GPI-Anker negativer T-Zellen kommt es dann durch einen immunologischen Selektionsdruck bedingt durch Alemtuzumab (8, 114, 116). Auch Fracchiola et al unterstützen die Hypothese, dass PNH-artige Zellen bereits bei Gesunden vorhanden sind und z.B. durch das Zytokin TGF- $\beta$  die Umgebung für PNH-artige Zellen positiv verändert wird (117).

## 6.2 Immunrekonstitution unter Alemtuzumab

Mehrere Publikationen adressieren den Einfluss von Alemtuzumab auf die Immunrekonstitution. Dabei zeigte sich, dass die unterschiedlichen Zellpopulationen, u.a. T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen ein unterschiedliches Verhalten in der Rekonstitution aufweisen (1). Die Gabe des monoklonalen Antikörpers Alemtuzumab bedingt eine komplette T- und B-Zelldepletion. Dabei regenerieren die B-Zellen innerhalb von 3-6 Monaten nach Transplantation, währenddessen die Rekonstitution der T-Zellen deutlich verlangsamt stattfindet und Jahre bis zur Normalisierung dauern kann (6).

Wir konnten anhand unserer Transplantationspatienten ebenfalls eine verlangsamte Rekonstitution der T-Zellen nachweisen. Dabei zeigten 9 von 16 Patienten > 110 Tage nach Transplantation eine verzögerte Immunrekonstitution der T-Zellen mit <  $200 \times 10^6$  Zellen/l (7). Die Analyse der Daten ergab aber auch eine zweite Gruppe von Patienten mit deutlich schnellerer Regenerierung der T-Zellen. So konnten wir bei 7 von 16 Patienten T-Zellzahlen von >  $200 \times 10^6$  Zellen/l 110 Tage nach Transplantation ausfindig machen (7).

Dass die Immunrekonstitution der T-Zellen nach in vivo Alemtuzumabgabe deutlich verzögert stattfindet und auch noch Jahre nach Transplantation andauern kann, haben auch andere Arbeitsgruppen feststellen können. Vor allem in den ersten zwei Monaten wurden unter Alemtuzumab deutlich niedrigere Lymphozytenzahlen beschrieben (118). Vergleicht man die Rekonstitution der CD4 T-Zellen und der CD8 T-Zellen fällt ein unterschiedliches Verhalten auf: Die CD8 T-Zellen weisen eine schnellere Rekonstitution nach der Transplantation, im Gegensatz zu den CD4 T-Zellen, auf (119). Bei unseren Daten zeigte sich allerdings ein höherer Anteil an CD4 T-Zellen nach Transplantation (7). Dennoch entsteht ein Defizit der CD4 T-Zellen und liegt auch nach Transplantation weiterhin unter dem Normbereich der CD4 T-Zellen eines gesunden Menschen. Dieses Defizit ist auch noch über 18 Monaten nach Transplantation nachweisbar. Eine mögliche Erklärung könnte das fortgeschrittene Alter der Patienten und die damit verbundene eingeschränkte Thymusfunktion oder Regenerationsfähigkeit der Zellen sein (6, 120). Am häufigsten sah man opportunistische Erkrankungen in den ersten acht Wochen nach der Transplantation (120). Im Gegensatz zu einigen Publikationen konnten wir auch deutlich länger nach Transplantation opportunistische Infektionen mit CMV-Reaktivierungen klinisch beobachten.

Bei unseren Transplantationspatienten konnten wir nach Alemtuzumabgabe, wie bereits in der Literatur beschrieben, vorrangig CD52-negative T-Zellpopulationen nachweisen (8, 9). Auch andere Arbeitsgruppen konnten 1-2 Monate nach entsprechender Konditionierung 40-80 % der B-Zellen und ein Großteil der T-Zellen als CD52-negativ Zellpopulation detektieren. Im Verlauf sah man, dass dieser Effekt bei B-Zellen nur transient zu beobachten war. Währenddessen bei T-Zellen der CD52-negative Phänotyp über 20 Monate detektiert werden konnte (8). Wir konnten bei einigen Patienten noch vier Jahre nach Transplantation CD52-negative T-Zellen beobachten, obwohl Alemtuzumab im Serum nicht mehr nachweisbar war. Analysen haben ergeben, dass Alemtuzumab bis zu 56 Tage nach Transplantation mit einer Konzentration von  $> 0,1 \mu\text{g/ml}$  im Serum vorhanden ist. Die Halbwertszeit von Alemtuzumab beträgt acht Tage (87, 97).

### **6.3 CD52-negative Treg nach Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie**

Regulatorische T-Zellen spielen eine große Rolle für das Auftreten von GvHD und in der Immunrestitution (121). In meiner Arbeit konnte ich bei 11 von 12 Patienten CD52-negative Treg nach allogener HSZT mit Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie nachweisen. Die CD52-negativen Treg zeigten ebenfalls einen Verlust des GPI-Ankers (122).

Welche Bedeutung nehmen nun die CD52-negativen Treg nach HSZT bei den Transplantationspatienten ein? Bereits mehrere Publikationen beschäftigten sich mit der Funktion von Treg im Rahmen der HSZT. Dabei zeigte sich, dass Treg eine entscheidende Rolle im Auftreten von GvHD nach HSZT spielen (45, 123). So können Treg das Risiko einer GvHD minimieren (123). Zu dieser Erkenntnis gelangte man, da bei akuter und chronischer GvHD ein Defizit von Treg im peripheren Blut von Transplantationspatienten nachweisbar ist (78). Das zeitige Auftreten von Treg nach Transplantation hat somit einen positiven Effekt auf die Immunrestitution und GvHD-Insidenz (121).

Weiterführende funktionelle Tests in unserer Arbeitsgruppe weisen eine eingeschränkte Funktion von CD52-negativen Treg gegenüber CD52-positiven Treg auf (122). Dies lässt den Schluss zu, dass das Risiko einer Entstehung einer akuten GvHD durch die vorwiegend CD52-negativen Treg mitverursacht wird (122). Die Re-

konstitution von CD52-positiven Treg im Verlauf nach allogener HSZT spielen eine wichtige Rolle für das geringere Auftreten akuter GvHD (122).

#### **6.4 Knochenmark**

In den meisten Arbeiten, so vorrangig auch in unserer Arbeitsgruppe, werden die Erkenntnisse zu CD52-negativen T-Zellen anhand von Untersuchungen des peripheren Blutes gewonnen. Diese Methode stellt eine wenig invasive und gut verfügbare Quelle bei Patienten dar.

Bei sieben Transplantationspatienten war es möglich, neben PBMC auch das Knochenmark nach allogener HSZT nach entsprechendem Studienprotokoll zum gleichen Zeitpunkt zu untersuchen. In der Gegenüberstellung von PBMC und Knochenmark sahen wir eine Gleichverteilung der CD52-positiven und -negativen T-Zellen. Ein möglicher Kompartementeffekt konnte aus unserer Sicht damit ausgeschlossen werden. Dass Alemtuzumab in der klinischen Anwendung keinen Einfluss auf hämatopoetische Vorläuferzellen hat, konnten auch Gilleece et al bestätigen (124).

Anhand eines Mausmodells war es der Arbeitsgruppe Hu et al (6) auch möglich, Aussagen zur T-Zelldepletion in anderen lymphatischen Organen, wie Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Thymus, zu treffen (6). Die Gabe von 0,5-1mg/kg Alemtuzumab bewirkt eine vollständige Depletion von peripheren T- und B-Zellen, allerdings nicht in den lymphatischen Organen (6). Bei der oben genannten Dosis von 0,5-1 mg/kg sind T-Zellen weiterhin in den lymphatischen Organen vorhanden. Erst eine höhere Dosis von 5 mg/kg Alemtuzumab bewirkt eine komplette Depletion der T-Zellen in der Milz und nur eine 50 % Depletion im Thymus (6). Als mögliche Ursachen werden eine geringere Effektivität und Erreichbarkeit von Alemtuzumab gegenüber lymphatischen Organen gewertet (6, 125). Diese Ansicht deckt sich auch mit den Experimenten von Marco et al (125). Hier wurde bei herztransplantierten Affen die T-Zelldepletion zwischen peripherem Blut und Lymphknoten verglichen (125). Dabei fiel auf, dass bei in vivo Gabe von Alemtuzumab 99 % der Lymphozyten im peripheren Blut und 70 % der Lymphozyten im Lymphknoten in den ersten 24 Stunden depletiert werden konnten. Bei der in vitro Alemtuzumabgabe zeigte sich sogar eine noch höhere Resistenz von T-Zellen im Lymphknoten gegenüber dem peripheren Blut gegen den T-Zelldepletierenden Effekt (125). Marco et al gehen sogar davon aus, dass sich durch die geringere Zytotoxizität von Alemtuzumab gegenüber lym-

phatischer Organe noch ein T-Zellpool in den Lymphknoten befindet (125). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass, im Gegensatz zu unserer Arbeit, doch Unterschiede zwischen der T-Zelldepletion im peripheren Blut und den einzelnen lymphatischen Organen bestehen können. Erschwert wird allerdings der Vergleich dadurch, dass es sich bei Hu et al (6) und Marco et al (125) um Tiermodelle (Maus, Affe) handelt und genetische Unterschiede zwischen Mensch und Tier vorhanden sind. Ein weiteres Problem für die genaue Untersuchung stellt die ethisch nicht vertretbare Untersuchung von Lymphknoten, Thymus und Milz beim Menschen dar. Auch die Behandlung mit beliebig hohen Dosen von Alemtuzumab und einer damit einhergehenden größeren Toxizität sind beim Menschen nicht möglich.

Hauptsächlich, so auch in der klinischen Studie der Universitätsmedizin Mainz, wird Campath in vivo verabreicht. Novitzky et al untersuchten die in vitro Alemtuzumabgabe („Alemtuzumab in the bag“) (126). Hierbei wird Alemtuzumab in vitro zum Transplantat hinzugefügt, bevor es dem Spender verabreicht wird (126). Die Bedingungen wie Zellkonzentration im Transplantat und Dosierung von Alemtuzumab ex vivo sind noch nicht standardisiert (126). In der Studie von Novitzky et al zeigte sich, dass wenn die Dosis von Alemtuzumab zu hoch gewählt wird, man auch in vivo-Effekte durch den freien Antikörper im Serum erhält (126). Höhere Zellkonzentrationen im Transplantat weisen höhere CD52-Konzentrationen auf und der T-Zelldepletierende Effekt durch Alemtuzumab ist somit höher (126). Es wird beschrieben, dass die Depletion der Lymphozyten in vivo geringer ist als in vitro, was sich aber in der klinischen Anwendung nicht bestätigen lässt (126).

## **6.5 Untersuchung Expression kostimulatorischer Signale auf CD52-positiven und -negativen T-Zellen**

In Anbetracht der wichtigen Funktion kostimulatorischer Moleküle untersuchten wir sieben unserer Studienpatienten. Es wurde die Verteilung von CD28, CD54, CD58 und CD137 auf CD52-positiven und -negativen T-Zellen betrachtet. CD28 und CD58 waren auf der Oberfläche der CD4/CD52<sup>-</sup> T-Zellen prozentual zu den CD52<sup>+</sup> Zellen gesehen deutlich stärker exprimiert.

In der Literatur wird ein Wechsel der Oberflächenmoleküle in Abhängigkeit der vorliegenden Immunsituation beschrieben. So wird z.B. CD58 (LFA-3) bei Entzündungen hochreguliert, währenddessen es bei Tumorzellen herunterreguliert wird (32).

Dass eine reduzierte Anzahl an kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von CD52-negativen T-Zellen vorliegt und mit einer verminderten Abwehr einhergeht, lässt sich anhand unserer Daten nicht beweisen. Die kostimulatorischen Moleküle sind auch auf den CD52-negativen T-Zellen vorhanden.

Anhand unserer Ergebnisse kann man also sagen, dass auch auf CD52-negativen T-Zellen die Moleküle für die kostimulatorischen Signale zur T-Zellaktivierung vorhanden sind. Allerdings erkennt man, dass sich bei jedem Patienten ein unterschiedliches Expressionsmuster der kostimulatorischen Moleküle ergibt.

Nach Cavanagh et al ist die Expression von CD28 auf der Zelloberfläche unter anderem abhängig vom Alter. Bei älteren Probanden zeigte sich deutlich weniger CD28 im Vergleich zu jüngeren. Der Verlust von CD28 auf der Oberfläche geht mit der Unfähigkeit zur Effektorfunktion der Zelle einher (127). Unser Patientenkollektiv war 24-71 Jahre alt. Einen Unterschied in der Verteilung der Oberflächenmarker nach Alter konnten wir allerdings nicht nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich keine Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von CD52-negativen T-Zellen als möglicher Grund für eine Abwehrschwäche gegenüber opportunistischen Infektionen bei den ausgewählten Transplantationspatienten nachweisen. Man muss allerdings beachten, dass je nach Reifungszustand der T-Zellen (naive T-Zelle, Effektor-T-Zelle, Gedächtnis-T-Zelle) unterschiedliche kostimulatorische Moleküle exprimiert werden (127). Desweiteren haben wir mit CD28, CD54, CD58 und CD137 nur eine Auswahl an kostimulatorischen Molekülen untersucht. Zu der CD28-Familie gehören z.B. auch noch CTLA-4 und PD-1, die beide eine inhibitorische Wirkung auf die T-Zellaktivierung haben (127). Ein weiterer zu untersuchender Aspekt ist die Frage, ob die untersuchten kostimulatorischen Moleküle z.B. GPI-verankert sind, da alle zur B7-Familie gehörenden Moleküle einen GPI-Anker vorweisen (35). Möglich wären hier Veränderungen durch Alemtuzumab und eine damit einhergehende Verringerung der T-Zellaktivierung und Abwehr von pathogenen Erregern bei allogener HSZT.

## **6.6 Eingeschränktes T-Zellrezeptor V $\beta$ -Repertoire nach Alemtuzumab-Therapie**

Nach allogener Stammzelltransplantation ist eine verminderte Diversität des T-Zell-

Rezeptor-Repertoires beschrieben (80). Das Auftreten von Infektionen geht nach Meinung der Literatur nicht nur mit der verzögerten Immunrestitution, sondern auch mit dem eingeschränkten TZR-Repertoire nach Alemtuzumabtherapie einher (81). Daher interessierte uns auch neben der T-Zelldepletion die Verteilung des T-Zellrezeptor  $V\beta$ -Repertoires von CD8 T-Zellen nach Alemtuzumab-Therapie im Vergleich von CD52-positiven und -negativen T-Zellen. Die häufigste angewandte Methode zur Untersuchung ist die PCR-Analyse der T-Zellrezeptoren (128). Eine weitere schnellere und effektive Möglichkeit stellt die Durchflusszytometrie mit dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen  $V\beta$  dar (128, 129).

Bei fünf untersuchten Studienpatienten zeigte sich ein insgesamt schmäleres Repertoire wie bereits in der Literatur beschrieben. Das vorrangig vorhandene  $\alpha/\beta$ -Heterodimer (25) war bei CD8/CD52<sup>+</sup> und CD8 /CD52<sup>-</sup> zu finden, währenddessen  $\gamma/\delta$ -Ketten nur für CD8/CD52<sup>+</sup> T-Zellen positiv waren. So wiesen die CD8/CD52<sup>+</sup> T-Zellen zwar mehr T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche auf als die CD8 /CD52<sup>-</sup> T-Zellen, aber im Vergleich zum gesunden Menschen doch eine eingeschränkte Bandbreite an T-Zell-Rezeptoren. Unsere Daten ergeben daher, dass die Vielfältigkeit des TZR  $V\beta$ -Repertoires nach Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie vermindert ist und deuten auf eine oligoklonale Expansion nach Transplantation hin.

In der Literatur ist ein beschränktes Auftreten der T-Zellrezeptoren nach Alemtuzumab beschrieben (130). Dies könnte neben der vorhandenen TCD eine Ursache für das Auftreten von schwerwiegenden Infektionen, vor allem CMV-Reaktivierungen (130) und opportunistische Erkrankungen, darstellen. Im Verlauf normalisiert sich das TZR-Repertoire und bildete die Grundlage für eine bessere Immunabwehr und Verringerung der Infektionen (81). Die Expansion des TZR-Repertoires ist abhängig von der wieder einsetzenden Thymusfunktion mit der de novo Regeneration der naiven T-Zellen (80). Da erst im späteren Verlauf nach Transplantation bei unseren untersuchten Transplantationspatienten eine Reconstitution der naiven T-Zellen stattfindet, ergibt sich hier eine weitere Erklärung für das beschränkte TZR-Repertoire der CD52<sup>-</sup> T-Zellen. Die naiven T-Zellen weisen alle GPI-Anker auf und auch eine höhere TZR-Diversität.

Ein weiterer Einflussfaktor stellt das Alter des Empfängers dar. So hat sich in Studien gezeigt, dass die TZR-Vielfalt der naiven T-Zellen mit zunehmendem Alter sinkt. Vor allem ab einem Alter von 70 Jahren ist hier ein starker Rückgang zu verzeichnen

(31). Die verminderte Abwehr gegen das Influenzavirus im Alter veranschaulicht die Hypothese klinisch (131). Qi et al sehen gegensätzlich auch bei älteren Probanden eine gewisse Vielfalt des TZR-Repertoires (30). Diese Erkenntnisse stellen auch bei den vorrangig älteren Patienten in unserer Studie einen Aspekt dar. So kann bereits durch den natürlichen Alterungsprozess eine zusätzliche Einschränkung in der Abwehr von pathogenen Keimen einhergehen.

Weiterhin können schwerwiegende Infektionen, Autoimmunerkrankungen, GvHD und Transplantatabstoßungsreaktionen die TZR beeinflussen (132). Auch das Zusammenspiel zwischen hämatologischen Spender- und Empfängerzellen kann eine Einflussgröße darstellen (132). Nach Wu et al (132) tragen persistierende Empfängerzellen zur TZR-Rekonstitution bei. In ihrer Arbeit konnten abnormale oligoklonale TZR für drei Jahre nach HSZT nachgewiesen werden (132).

## **6.7 Einflussfaktoren auf die Gedächtnis-T-Zellen nach allogener HSZT**

Zwischen Tag +100 bis +365 nach Transplantation konnten wir für CD4 und CD8 T-Zellen vorwiegend CD52-negative Gedächtnis-T-Zellen, die vermutlich vom Stammzelltransplantat stammen, nachweisen (133).

Macedo et al (134) analysierten die T-Zellen von nieren- und pankreastransplantierten Patienten nach Alemtuzumab-Therapie. Neben dem bereits bekannten und vor allem die CD4-Subpopulation betreffenden Lymphozytenverlust konnten weitere differenzierte Aussagen getroffen werden. Es zeigte sich eine langanhaltende Verschiebung der CD4 T-Zellen zu einem Memory-Phänotyp auch noch Jahre nach der Transplantation (134). Diese Aussage konnten wir durch unsere Daten ebenfalls stützen. Ge et al sprechen ebenfalls von einem hauptsächlich nach Transplantation vorliegenden Memory-Phänotyp (135). Es zeigt sich, dass die TCD durch Alemtuzumab im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation eine Veränderung in das Gleichgewicht von Gedächtnis-T-Zellen und naiven T-Zellen mit sich bringt (136). Hier ergibt sich ein Hinweis für eine eingeschränkte Immunabwehr nach Alemtuzumab-basierter HSZT, denn die Gedächtnis-T-Zellen nehmen wichtige Effektorfunktionen wie die Zytokinsekretion in der Immunantwort ein (137). Sind diese Gedächtnis-T-Zellen nun vorrangig CD52-negativ und besitzen damit eine defiziente Effektorfunktion, ergibt sich hier eine deutlich schlechtere Immunantwort nach HSZT.

Eine weitere Studie von Roux et al (130) ergab, dass auch das Transplantationsregime mit entsprechender Konditionierung einen Einfluss auf die Rekonstitution der T-Zellen hat (130). Durch die Konditionierung wird das erworbene Immunsystem mit seiner Gedächtnisfunktion zerstört. Somit ist die Regeneration der Gedächtnis-T-Zellen von den T-Zellen des Spenders abhängig (130).

#### 6.7.1 Warum treten Gedächtnis-T-Zellen vorwiegend nach HSZT auf? – Die Lymphopenie-induzierte Proliferation

Dass die T-Zellen hauptsächlich einen Memory-Phänotyp nach allogener Stammzelltransplantation mit TCD durch Alemtuzumab aufweisen, wurde von vielen Arbeitsgruppen in der Literatur (125, 134, 135) beschrieben und konnte auch durch unsere Analysen bestätigt werden.

Es stellt sich nun die Frage nach den Gründen für diese Erscheinung. Als Ursache dafür wird die sogenannte Lymphopenie-induzierte Proliferation (LIP) angesehen. Der Begriff Lymphopenie-induzierte Proliferation beschreibt die Teilung der Zellen ohne Antigenpräsentation in einer lymphopenen Situation (135). Naive T-Zellen werden somit phänotypisch und funktionell zu Gedächtnis-T-Zellen (138, 139). Dies geschieht ohne die bekannten Zwischenstufen: Effektor Gedächtnis-T-Zellen, das kostimulatorische Molekül CD28, ohne IL-2-Ausschüttung und ohne Antigenpräsentation (138). Verantwortlich sind aber Interaktionen zwischen TZR und körpereigenen MHC-Peptiden (136, 140, 141), was eine Erklärung für die Entstehung von GvHD bei stammzelltransplantierten Patienten sein könnte (138).

Weiterhin wirkt sich die Hochregulierung von IL-7 und IL-15 in einer lymphopenen Umgebung positiv für den Ablauf der LIP aus (134, 136). Dieser Prozess sorgt für die gleichbleibende Anzahl der T-Zellen im Körper, die durch Bestrahlungs- oder Chemotherapie deutlich gestört wird (135). Die Gedächtnis-T-Zellen bleiben relativ konstant über einen längeren Zeitraum bestehen (> 1 Monat) (139). Eine Umwandlung nach LIP von Gedächtnis-T-Zellen in naive T-Zellen ist allerdings nicht möglich (135). Somit dient die LIP allein der Erhaltung der Gedächtnis-T-Zellen ohne Rekonstitution von naiven T-Zellen (135, 139). Es handelt sich um einen thymusunabhängigen Weg und kann somit auch zeitig nach Transplantation stattfinden (142). Interessant dabei ist, dass die LIP eine deutlich verzögerte Proliferation der T-Zellen im Gegensatz

zum Antigen-stimulierten Prozess aufweist (141) und eine weitere Erklärung für die Risiken einer opportunistischen Infektion nach Transplantation beinhaltet.

Die Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen nach HSZT wird aber auch durch das Auftreten von virusreaktiven Antigenen, wie CMV, begünstigt (143). CMV-spezifische T-Zellen, die vom Spender stammen, wachsen durch das Auftreten CMV-reaktiver Antigene hoch. Wenn CMV-positive Patienten Stammzellen von CMV-negativen Spendern erhalten, entsteht ein erhöhtes Risiko für eine CMV-Reaktivierung nach HSZT (143).

Eine weitere Theorie stützt sich auf die Aussage, dass diese Gedächtnis-T-Zellen der TCD-Wirkung von Alemtuzumab entgehen (125). Sie sind sozusagen widerstandsfähiger als naive T-Zellen (136). Erklärungen hierfür können vorliegende Mechanismen der Gedächtnis-T-Zellen, wie antiapoptotische Gene oder eine gezielte Blockade der Komplement-aktivierten Lyse durch Alemtuzumab, sein (136). Möglich ist eine Kombination aus erhöhter Widerstandsfähigkeit der Gedächtnis-T-Zellen gegenüber Alemtuzumab und eine aktivierte LIP im Rahmen der Transplantation, die für das Vorliegen eines vorwiegenden Memory-Phänotyps sorgt (136).

#### 6.7.2 Rekonstitution naiver T-Zellen nach vorangegangener T-Zelldepletion

Anhand von FACS-Färbungen war es möglich, bei unseren Patienten naive T-Zellen ausfindig zu machen. 10 von 17 Patienten zeigten für CD4 und CD8 T-Zellen naive T-Zellen, allerdings mit einem Anteil von < 10 % zwischen Tag 100-365 nach Transplantation. Die neu gebildeten naiven T-Zellen waren dabei stets CD52-positiv. Wir können davon ausgehen, dass generell eine Rekonstitution von naiven CD52-positiven T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation und Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie möglich ist. Die Rekonstitution erfolgt allerdings deutlich verzögert.

Entscheidend ist die Frage, welche Voraussetzungen für die Entstehung von naiven T-Zellen nach Transplantation notwendig sind. Eine Rekonstitution von naiven T-Zellen aus Gedächtnis-T-Zellen wird als unwahrscheinlich angenommen (135). Im Mausmodell konnten Ge et al (135) nach einer T-Zelldepletion drei Bedingungen für die Rekonstitution von naiven T-Zellen ausmachen: Die Ausbildung von naiven T-Zellen beruht auf einer de novo Entwicklung (135). Dafür ist die Übertragung von

Stammzellen als Grundvoraussetzung anzusehen. Weitere Bedingungen stellen eine erfolgte Bestrahlung und eine intakte Thymusfunktion dar. Bei Patienten mit Thymektomie kann demzufolge keine Rekonstitution von naiven T-Zellen erfolgen (135, 139). Die Thymusfunktion kann außerdem durch steigendes Alter, direkte Toxizität der Bestrahlungs- oder Chemotherapie und GvHD beeinträchtigt werden (15, 144). Nach der Übertragung von Stammzellen können diese im Thymus des Empfängers proliferieren und zur Entstehung von naiven T-Zellen führen. Die Stammzellen gehen ursprünglich vom Spender aus (135, 139, 144). Als Grundlage wird auch hier die positive Selektion der T-Zellentstehung im Thymus angesehen (144). Dabei reagieren die T-Zellen mit spezifischen TZR und körpereigenen MHC Molekülen (145, 146).

Schlussfolgernd kann man sagen, dass ein länger anhaltendes Immundefizit mit dem Risiko, an opportunistischen Infektionen zu erkranken, durch eine inadäquate T-Zellbildung im Thymus hervorgerufen wird (15). Die Funktion der Immunabwehr ist also abhängig von der Ausbildung von naiven T-Zellen (15). Das Studienprotokoll der Studie 177 der Universitätsmedizin Mainz schließt hauptsächlich ältere und vorerkrankte Patienten ein (7). Da man aus verschiedenen Studien weiß, dass mit zunehmendem Alter die Thymusfunktion abnimmt (144), ergibt sich hier ein weiteres Problem für die erhöhte Gefahr, an opportunistischen Infektionen nach allogener Alemtuzumab-basierter HSZT zu erkranken. Die thymusabhängige Rekonstitution von naiven T-Zellen ist dabei ein langsam ablaufender Prozess im Rahmen der HSZT (144) und begünstigt dadurch weiterhin frühe und fulminant verlaufende Infektionen nach HSZT.

In der FACS-Auswertung der PBMC der Transplantationspatienten zeigten sich, neben naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen, eine weitere T-Zellpopulation, die CD45RA auf der Oberfläche aufweisen, aber kein CD62L (55). Man spricht von sogenannten erschöpften T-Zellen oder terminalen Effektor T-Zellen (engl. exhausted T-cells) (55). Bei allen Patienten konnten erschöpfte T-Zellen in der CD4 und CD8-Population nachgewiesen werden. Die erschöpften T-Zellen waren hauptsächlich CD52 positiv. Die terminalen T-Zellen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen. Wichtige Effektorfunktionen und die Fähigkeit der Zytotoxizität gehen verloren (147). Diese erschöpften T-Zellen könnten ebenfalls Gründe für eine ineffektive Viruskontrolle (148) bei dem Auftreten von CMV- und EBV-Reaktivierungen im Kontext der HSZT schlussfolgern lassen.

### 6.7.3 Die Rolle von Gedächtnis-T-Zellen in GvHD

In unseren Analysen betrachteten wir die zwei Subpopulationen der Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{EM}$  und  $T_{CM}$ ). In der Gegenüberstellung zeigte sich, dass die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen den Hauptanteil bei den CD4 und CD8 T-Zellen ausmachen. Die  $T_{EM}$  waren dabei vorrangig CD52-positiv. Anhand der Untersuchungen konnten wir also nachweisen, dass neben einem vorwiegenden Memory-Phänotyp, die  $T_{EM}$ -Population überwiegt und somit die Aussage von der Arbeitsgruppe Pearl et al (149) bestätigen. Diese hatten bei der Untersuchung von Patienten nach TCD durch Alemtuzumab herausgefunden, dass die  $T_{EM}$ -Population weniger depletiert wird (149). Die  $T_{EM}$ -Subpopulation ist weniger sensitiv gegenüber der Antikörper-vermittelten Zytolyse von Alemtuzumab. Die genauen Gründe sind bisher unbekannt. Man weiß allerdings, dass antigenspezifische T-Zellen z.B. durch bestimmte Oberflächenmarker oder Mechanismen resistenter als naive T-Zellen sind (149).

Welche Auswirkungen hat der vorrangige  $T_{EM}$ -Phänotyp der T-Zellen klinisch gesehen für die Patienten? In verschiedenen Publikationen wurde dieser Aspekt eingehend untersucht und wird nachfolgend dargestellt. Eine schwerwiegende und häufige Komplikation nach Stammzelltransplantation und somit auch oft bei unseren Transplantationspatienten zu beobachten, ist die GvHD. Matthews et al (119) fanden heraus, dass bei einer akuten und chronischen GvHD CD4  $T_{EM}$  vorwiegend zu finden sind. Im Gegensatz dazu ist die CD4  $T_{CM}$ -Population vermindert. Somit stellen die CD4  $T_{EM}$ , am ehesten vom Spender stammend, eine entscheidende Schlüsselfunktion in der Pathogenese der chronischen GvHD dar (119). Die CD8  $T_{EM}$  werden in den Studien vernachlässigt (150). Dieses Ungleichgewicht zwischen  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$  könnte eine mögliche Erklärung für die Entstehung von GvHD sein (150, 151). Bei gesunden Probanden war im Vergleich zu transplantierten Patienten die  $T_{CM}$ -Population deutlich höher. Man geht davon aus, dass die  $T_{CM}$ -Population nach Transplantation vorrangig depletiert wird. Dazu gibt es verschiedene Theorien. Ein Weg wäre, dass die Produktion der naiven T-Zellen durch die Zerstörung von Thymusgewebe bei GvHD gestört wird und sich somit die normalerweise daraus entstehenden  $T_{CM}$ -Zellen verringern (150). Wenn man allerdings von einer Konversion von naiven T-Zellen zu  $T_{CM}$  über die Stufe der  $T_{EM}$  ausgeht, liegt möglicherweise in dieser Phase eine Blockie-

rung vor (150). Auch die Arbeitsgruppe von Zhang et al spricht von alloreaktiven Gedächtnis-T-Zellen, die durchaus in der Lage sind, GvHD zu verursachen (152).

Gegensätzlich dazu gibt es Arbeiten, die die Fähigkeit der T<sub>EM</sub> zur Ausbildung einer GvHD verneinen (153, 154). Gründe dafür sind das Fehlen von CD62L und CCR7 und ein damit einhergehendes Unvermögen zum Lymphknoten zu wandern. Außerdem besitzen sie weniger spezifische TZR und eine geringere klonale Expansionsmöglichkeit (155, 156). Auch Zheng et al (157) sprechen den T<sub>EM</sub> die Fähigkeit zur Ausbildung einer GvHD ab und sehen darüber hinaus ihre Rolle am ehesten im positiven GvL-Effekt (157). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten nach Dutt et al (158) auf die Analyse verschiedener Gedächtnis-T-Zellen in den einzelnen Studien zurückzuführen zu sein. Möglicherweise gibt es Gedächtnis-T-Zellen, die mit Antigenen geprimed sind und die nicht mit den körpereigenen Antigenen des Empfängers reagieren. Bei der Analyse solcher Zellen stellten Dutt et al (158) ebenfalls keine Fähigkeit zur GvHD-Entstehung fest. Im Vergleich dazu sah man bei naiven T-Zellen eine letal verlaufende akute GvHD-Form mit massivem Durchfall und einer damit verbundenen hohen Gewichtsabnahme (158). Eine chronische GvHD-Form, Leber und Darm betreffend, konnte allerdings bei Antigen-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen beobachtet werden. Vergleicht man naive T-Zellen und Antigen-spezifische Gedächtnis-T-Zellen miteinander, zeigt sich eine schwerwiegenderere und raschere GvHD bei den naiven T-Zellen (158). Das Potenzial der naiven T-Zellen, durch den Oberflächenmarker CD62L zum Lymphknoten zu wandern, scheint eine Erklärung für die schnellere GvHD-Reaktion zu sein (158).

Anhand der regen Diskussion kann man erkennen, dass die Rolle der Gedächtnis-T-Zellen in der GvHD noch nicht hinreichend geklärt ist. Weitere Studien müssen durchgeführt werden, um neue Erkenntnisse und damit einhergehende Therapieansätze zu gewinnen. Abschließend lässt sich sagen, dass sowohl in der Literatur als auch anhand unserer Daten ein Überwiegen des T<sub>EM</sub>-Phänotyps verzeichnet werden kann und in den Kontext der klinischen Bedeutung eingebracht werden muss.

## **6.8 CMV-spezifische CD8 T-Zellen als prognostischer Faktor**

Neben Blutuntersuchungen mit der PCR-Methode auf CMV (159) gibt es noch die Möglichkeit, mit HLA-Peptid spezifischen Tetrameren CMV-spezifische CD8 T-Zellen als Ausdruck der effektiven Immunantwort zu detektieren (160). In unserer Arbeits-

gruppe wurden anhand von sechs Transplantationspatienten CMV-spezifische CD8 T-Zellen für CD52-positive und -negative T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen. Die Tetramerfärbung diente als Vorversuch, um geeignete Probanden für weitere funktionelle Tests, wie Zytokin-Sekretionsassay, IFN- $\gamma$  Elispot, Zellyse und Proliferation herauszufinden.

In der Gegenüberstellung lässt sich eine deutlich höhere Frequenz von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen in der CD52-positiven T-Zellpopulation beobachten. Noch eindeutiger lässt sich unsere Beobachtung an der Zellkultur von Patient Nr. 28 darstellen. So sind 89,1 % der CD52-positiven T-Zellen Tetramer-positiv und damit auch CMV-spezifisch positiv, währenddessen nur 0,1 % der CD52-negativen T-Zellen Tetramer-positiv sind. Mehrere Publikationen stellten einen Zusammenhang zwischen dem Schutz vor CMV-Reaktivierungen nach HSZT und dem Nachweis von hohen CMV-spezifischen CD8 T-Zellzahlen her (106, 159-161). Dabei entscheidend ist auch der Zeitpunkt des Auftretens von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen nach Transplantation. Eine verspätete Rekonstitution von CMV-spezifischen CD8 T-Zellen geht auch mit einer höheren Komplikationsrate einher (161). Cwynarski et al (160) stellten eine verspätete Rekonstitution nach allogener HSZT mit Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie fest. Es konnten keine Tetramer-positiven T-Zellen vor Tag 100 nach Transplantation beobachtet werden (160).

Zusammenfassend gehen wir davon aus, dass CD 52-negative T-Zellen nach Alemtuzumab-basierter Konditionierung eine deutlich verzögerte Immunantwort gegenüber CMV darstellen und es somit zu erhöhten CMV-Reaktivierungen nach der Transplantation kommt. Beweise für eine verminderte CMV-Antwort nach Alemtuzumab-basierter Konditionierung konnten wir bereits in unserer Arbeitsgruppe im IFN- $\gamma$  Sekretionsassay, IFN- $\gamma$  Elispot und im Chrom-release-assay finden (10). In diesen drei Assays kann die Funktion der CD52-negativen T-Zellen mit den CD52-positiven T-Zellen verglichen werden. Bei fünf untersuchten Patienten konnten wir eine verringerte IFN- $\gamma$  Ausschüttung der CD52-negativen T-Zellen im Sekretionsassay beobachten. Ebenfalls zeigten die CD52-negativen T-Zellen bei Patient Nr. 28 eine verringerte IFN- $\gamma$  Produktion im Elispot und eine geringere lytische Aktivität im Chrom-release-assay. Eine Rolle dabei könnte der Verlust des GPI-Ankers, der eine wichtige Rolle in der T-Zellaktivierung einnimmt, bei den CD52-negativen T-Zellen spielen (10, 162).

## **6.9 Funktionsverlust GPI-Anker negativer T-Zellen nach Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie**

Neben der phänotypischen Analyse der T-Zellen nach allogener HSZT mit Alemtuzumab-basierter Konditionierungstherapie war für uns der funktionelle Unterschied von CD52-positiven und CD52-negativen T-Zellen von Bedeutung.

Bereits in einer Vorarbeit in unserer Arbeitsgruppe konnte den CD52-negativen T-Zellen eine eingeschränkte Funktion im IFN- $\gamma$  Zytokin-Sekretionsassay ex vivo, Cytochrom-release-Assay und IFN- $\gamma$  Elispot nachgewiesen werden (10, 11). Auch in meinen Untersuchungen konnte ich eine deutlich geringere IFN- $\gamma$ -Sekretion nach Antigen-spezifischer Stimulation in der CD52-negativen Population zeigen.

Für weitere Aussagen wurde die Antigen-unabhängige Proliferation von PBMC von Transplantationspatienten nach Alemtuzumabgabe mit Hilfe der CFSE-Färbung getestet. Bei Patient Nr. 2 konnte in den ersten 12 Stunden eine eingeschränkte Proliferation der CD52-negativen T-Zellen gegenüber den CD52-positiven T-Zellen veranschaulicht werden. Die Zellen wurden dabei ex vivo unspezifisch mit OKT3 stimuliert. Bei selbigem Patienten führten wir ebenfalls eine Proliferationsmessung über fünf Tage durch. Am ersten Tag zeigte sich eine deutlich geringere Proliferationsrate der CD52-negativen T-Zellen gegenüber den CD52-positiven T-Zellen, die in den Folgetagen nicht mehr nachweisbar war. Wir konnten somit auch bei Antigen-unspezifischer Stimulation eine verminderte Proliferationsrate von CD52-negativen T-Zellen detektieren.

In der Literatur wird allerdings meist die Antigen-spezifische Stimulation untersucht (79). Die Arbeitsgruppe von Roux et al (130) beschreibt trotz des annähernden Erreichens der T-Zellzahlen eine lange Funktionseinschränkung der T-Zellen nach Transplantation (130). Auch nach Alemtuzumabgabe im Rahmen von Nierentransplantationen konnte eine eingeschränkte Funktion von CD4 T-Zellen und CD8 T-Zellen hinsichtlich IFN- $\gamma$ -Produktion beobachtet werden (79). Die Ursache für die eingeschränkte Funktion der T-Lymphozyten nach Alemtuzumabtherapie sehen Malek et al im Verlust GPI-verankerter Proteine (162). So ging ein GPI-Anker-Defizit auch mit einer geringeren Zytokinproduktion sowie T-Zellaktivierung einher (10, 162). Daran lässt sich erkennen, dass zur T-Zellaktivierung neben einer Interaktion zwischen TZR und MHC-Molekülen mit Antigenpräsentation auch GPI-verankerte Proteine (u.a. CD55, CD59, Ly-6 und Thy-1) eine wichtige Rolle im Prozess der T-Zellaktivierung

und -proliferation spielen (162). Aus diesem Grund hat auch der Verlust von CD52 auf der Oberfläche der T-Zellen eine große Auswirkung auf den Signalweg der T-Zellproliferation, was wir anhand unserer Daten nachweisen konnten.

## 7 Zusammenfassung

Die Entwicklung dosisreduzierter Therapieregime in der HSZT ermöglichte eine Erweiterung der kurativen Therapieoptionen, vor allem für ältere Patienten (60). Alemtuzumab, ein Antikörper gegen CD52, wird in diesem Rahmen zur T-Zelldepletion eingesetzt (6). Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass es nach Alemtuzumab-Applikation zu einer Expansion von CD52-negativen T-Zellen kommt (114). Wenn der Antikörper im Rahmen der allogenen HSZT eingesetzt wird, kann man diese Zellen in hohen Frequenzen oft noch jahrelang nachweisen. Diese hohen Frequenzen lassen sich bei nicht-transplantierten Patienten oder Gesunden nicht zeigen (8). Wir konnten noch vier Jahre nach allogener HSZT bei einigen Patienten nachweisen, dass ein großer Anteil der T-Zellen CD52-negativ blieb. Wir korrelierten das Fehlen von CD52 auf den T-Zellen mit dem Fehlen von GPI-Ankern und weiteren GPI-verankerten Molekülen auf der Zelloberfläche (8, 10).

In meiner Arbeit habe ich untersucht, welche phänotypischen und funktionellen Unterschiede sich zwischen CD52-positiven und CD52-negativen T-Zellen des gleichen Patienten ergeben. Ich konnte deutliche Hinweise darauf finden, dass CD52-negative (bzw. GPI-Anker negative) T-Zellen funktionell eingeschränkt sind (118).

Anhand phänotypischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass es sich bei den persistierenden CD52-negativen T-Zellen um expandierende Gedächtniszellen handelt, die vermutlich dem Stammzelltransplantat entstammen (125, 135, 163). Im Gegensatz dazu sind neu gebildete naive T-Zellen im Rahmen der Blutstammzelltransplantation durchgehend CD52-positiv. Dies deutet darauf hin, dass nach Alemtuzumab basierter Konditionierungstherapie eine deutlich verzögerte Rekonstitution neuer naiver T-Zellen auftritt (144).

Durch den Vergleich der antigen-spezifischen T-Zellantwort in verschiedenen funktionellen Tests (IFN- $\gamma$  Sekretionsassay, IFN $\gamma$ -Elispot und Chrom-release-Assay) konnte eine deutlich eingeschränkte antigenspezifische Funktion der CD52-negativen

T-Zellen im Gegensatz zu den CD52-positiven T-Zellen nachgewiesen werden (10, 11). Auch das antigen-unspezifische Proliferationsverhalten der CD52-negativen T-Zellen war deutlich eingeschränkt.

Die Zusammenschau meiner Ergebnisse zeigt ein eingeschränktes T-Zellrezeptor-Repertoire und eine geringere Proliferationsfähigkeit der nach HSZT vorrangigen CD52-negativen T-Zellen, weitere mögliche Erklärungen für die eingeschränkte Immunabwehr nach Alemtuzumabtherapie. Meine Arbeit gibt Hinweise darauf, dass die T-Zelldepletion mit Alemtuzumab neben einem quantitativen T-zellvermindernden Effekt (7) auch Auswirkungen auf die Funktion der nachweisbaren T-Zellen hat (10, 11). Man muss davon ausgehen, dass eine funktionierende antigenspezifische T-Zellantwort von der Rekonstitution naiver GPI-Anker-positiver T-Zellen abhängt (144). In der vorliegenden Arbeit bezieht sich die beschränkte T-Zellfunktion in erster Linie auf die CMV-spezifische antivirale Immunität. Aber das Fehlen von GPI-Ankern auch auf anderen T-Zellpopulationen, wie z.B. den T-Helferzellen (122), lässt vermuten, dass dies nicht der einzig qualitative Unterschied im Rahmen der Immunrekonstitution ist, der durch Alemtuzumab vermittelt wird.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Mackall C, Fry T, Gress R, Peggs K, Storek J, Toubert A, et al. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. Bone marrow transplantation. 2009;44(8):457-62.
2. Goyal G, Gundabolu K, Vallabhajosyula S, Silberstein PT, Bhatt VR. Reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic-cell transplantation for older patients with acute myeloid leukemia. Therapeutic Advances in Hematology. 2016;7(3):131-41.
3. Sengsayadeth S, Savani BN, Blaise D, Malard F, Nagler A, Mohty M. Reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia in complete remission - a review from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. Haematologica. 2015;100(7):859-69.
4. Meyer RG, Wagner EM, Konur A, Bender K, Schmitt T, Hemmerling J, et al. Donor CD4 T cells convert mixed to full donor T-cell chimerism and replenish the CD52-positive T-cell pool after alemtuzumab-based T-cell-depleted allo-transplantation. Bone marrow transplantation. 2009;45(4):668-74.
5. Kottaridis PD, Chopra R, Chakraverty RK, Chakrabarti S, Robinson S, Peggs K, et al. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. Blood. 2000;96(7):2419-25.
6. Hu Y, Turner MJ, Shields J, Gale MS, Hutto E, Roberts BL, et al. Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. Immunology. 2009;128(2):260-70.
7. Meyer RG, Britten CM, Wehler D, Bender K, Hess G, Konur A, et al. Prophylactic transfer of CD8-depleted donor lymphocytes after T-cell-depleted reduced-intensity transplantation. Blood. 2007;109(1):374-82.
8. Taylor VC, Brett S, Field MC. Antibody selection against CD52 produces a paroxysmal nocturnal aemoglobinuria phenotype in human lymphocytes by a novel mechanism. Biochemical Journal. 1997:919-25.
9. Hertenstein B, Bunjes D, Duncker C, Raghavachar A, Arnold R, Heimpel H. Emergence of CD52-, Phosphatidylinositolglycan-Anchor-Deficient T Lymphocytes After In Vivo Application of Campath-1H for Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. Blood. 1995;86:1487-92.
10. Lay A. GPI-Anker-negative T-Zellen persistieren nach Alemtuzumab-basierter Konditionierung im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation. 2013.
11. Kouka A. Bedeutung der GPI-Anker für die EBV-spezifische T-Zellantwort nach allogener hämatopoetischer Stammzelltrasplantation. 2016.
12. Zinkernagel RM. On immunological memory. The Royal Society. 2000:369-71.

13. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2008;73(11):975-83.
14. Krenger W, Blazar BR, Hollander GA. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(25):6768-76.
15. Weinberg K, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, Koup RA, Collins RH, Douek DC. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97(5):1458-66.
16. Delves PJ, Roitt IM. The immune system- First of two parts. *NEJM*. 2000;343:37-49.
17. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet*. 2001;357(9270):1777-89.
18. Chaplin DD. Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
19. Holleran G, Lopetuso L, Petito V, Graziani C, Ianiro G, McNamara D, et al. The Innate and Adaptive Immune System as Targets for Biologic Therapies in Inflammatory Bowel Disease. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(10).
20. Silva FA, Rodrigues BL, Ayrizono ML, Leal RF. The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology research and practice*. 2016;2016:2097274.
21. Lee DK, Hakim FT, Gress RE. The thymus and the immune system: layered levels of control. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2010;5(10 Suppl 4):S273-6.
22. Abbas AK, Janeway CA, Jr. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. *Cell*. 2000;100(1):129-38.
23. Sallusto F, Lanzavecchia A. Exploring pathways for memory T cell generation. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(6):805-6.
24. Belov L, de la Vega O, dos Remedios CG, Mulligan SP, Christopherson RI. Immunophenotyping of Leukemias Using a Cluster of Differentiation Antibody Microarray. *Cancer Research* 2001;61:4483-9.
25. Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2008.
26. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator - Immunologie*. Elsevier GmbH. 2006;2.
27. Delves PJ, Roitt IM. The immune system - second of two parts. *NEJM*. 2000;343(2):108-17.

28. Warren RL, Freeman JD, Zeng T, Choe G, Munro S, Moore R, et al. Exhaustive T-cell repertoire sequencing of human peripheral blood samples reveals signatures of antigen selection and a directly measured repertoire size of at least 1 million clonotypes. *Genome research*. 2011;21(5):790-7.
29. Sethna Z, Elhanati Y, Dudgeon CS, Callan CG, Jr., Levine AJ, Mora T, et al. Insights into immune system development and function from mouse T-cell repertoires. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(9):2253-8.
30. Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee JY, et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(36):13139-44.
31. Ahmed M, Lanzer KG, Yager EJ, Adams PS, Johnson LL, Blackman MA. Clonal expansions and loss of receptor diversity in the naïve CD8 T cell repertoire of aged mice. *Journal of immunology*. 2009;182(2):784-92.
32. Silberman D, Bucknum A, Bartlett T, Composto G, Kozlowski M, Walker A, et al. CD28 ligation increases macrophage suppression of T-cell proliferation. *Cellular & molecular immunology*. 2012;9(4):341-9.
33. Leung J, Suh WK. The CD28-B7 Family in Anti-Tumor Immunity: Emerging Concepts in Cancer Immunotherapy. *Immune network*. 2014;14(6):265-76.
34. Wakamatsu E, Mathis D, Benoist C. Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(3):1023-8.
35. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome biology*. 2005;6(6):223.
36. Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in immunology*. 2013;34(11):556-63.
37. De Jager PL, Baecher-Allan C, Maier LM, Arthur AT, Ottoboni L, Barcellos L, et al. The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(13):5264-9.
38. Wallich R, Brenner C, Brand Y, Roux M, Meuer S. Basis for Alternative mRNA Splicing of the Gene Structure, Promoter Characterization, and Human CD58 Gene. *The Journal of Immunology*. 1998;160:2862-71.
39. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports*. 2009;61:22-32.
40. Reina M, Espel E. Role of LFA-1 and ICAM-1 in Cancer. *Cancers*. 2017;9(11).
41. Ye Q, Song DG, Poussin M, Yamamoto T, Best A, Li C, et al. CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(1):44-55.

42. Yonezawa A, Dutt S, Chester C, Kim J, Kohrt HE. Boosting Cancer Immunotherapy with Anti-CD137 Antibody Therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(14):3113-20.
43. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews*. 2006;212:8-27.
44. Michael M, Shimoni A, Nagler A. Regulatory T cells in allogeneic stem cell transplantation. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:608951.
45. Beres AJ, Drobyski WR. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Frontiers in immunology*. 2013;4:163.
46. Stewart SE, Kondos SC, Matthews AY, D'Angelo ME, Dunstone MA, Whisstock JC, et al. The perforin pore facilitates the delivery of cationic cargos. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(13):9172-81.
47. Sieni E, Cetica V, Hackmann Y, Coniglio ML, Da Ros M, Ciambotti B, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: when rare diseases shed light on immune system functioning. *Frontiers in immunology*. 2014;5:167.
48. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T Lymphocyte Granules Are Secretory Lysosomes, Containing Both Perforin and Granzymes. *The Journal of experimental medicine*. 1991;173:1099-109.
49. Kaur A, Rosenzweig M, Johnson RP. Immunological memory and acquired immunodeficiency syndrome pathogenesis. *The Royal Society*. 2000;355:381-90.
50. Tough DF, Sprent J. Turnover of Naive- and Memory-phenotype T Cells. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179:1127-35.
51. Geiger R, Duhon T, Lanzavecchia A, Sallusto F. Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(7):1525-34.
52. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401:708-12.
53. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven Proliferation and Differentiation of Human Naive, Central Memory and Effector Memory CD4+ T Cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(12):1711-9.
54. Rogers PR, Dubey C, Swain SL. Qualitative Changes Accompany Memory T Cell Generation: Faster, More Effective Responses at Lower Doses of Antigen. *The Journal of Immunology*. 2000;164(5):2338-46.

55. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunological Reviews*. 2006;21:214–24.
56. Cheuk DK. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World journal of transplantation*. 2013;3(4):99-112.
57. Riezzo I, Pascale N, La Russa R, Liso A, Salerno M, Turillazzi E. Donor Selection for Allogeneic Hemopoietic Stem Cell Transplantation: Clinical and Ethical Considerations. *Stem cells international*. 2017;2017:5250790.
58. Bochtler W, Gragert L, Patel ZI, Robinson J, Steiner D, Hofmann JA, et al. A comparative reference study for the validation of HLA-matching algorithms in the search for allogeneic hematopoietic stem cell donors and cord blood units. *Hla*. 2016;87(6):439-48.
59. Korbling M, Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(24):6411-6.
60. Storb R, Sandmaier BM. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Haematologica*. 2016;101(5):521-30.
61. Sengsayadeth S, Savani BN, Blaise D, Malard F, Nagler A, Mohty M. Reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia in complete remission - a review from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica*. 2015;100(7):859-69.
62. Storb RF, Champlin R, Riddell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH. Non-Myeloablative Transplants for Malignant Disease. *Hematology*. 2001:375-91.
63. Chaudhry M, Ali N. Reduced-intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation: looking forward to an international consensus. *Blood Research*. 2015;50(2):69-70.
64. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2009;15(12):1628-33.
65. Jimenez M, Ercilla G, Martinez C. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens. *Leukemia*. 2007;21(8):1628-37.
66. Villarreal CD, Alanis JC, Perez JC, Candiani JO. Cutaneous graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplant - a review. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2016;91(3):336-43.
67. Garnett C, Apperley JF, Pavlu J. Treatment and management of graft-versus-host disease: improving response and survival. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2013;3:366-78.
68. Dogan A, Dogdu O, Ozdogru I, Yarlioglu M, Kalay N, Inanc M, et al. Graft-versus-Host Disease after Stem Cell Transplantation. *Texas Heart Institute Journal*. 2013;40(4):428-34.

69. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet*. 2009;373(9674):1550-61.
70. Vasconcelos L, Vieira EC, Minicucci EM, Salvio AG, Souza MP, Marques ME, et al. Chronic graft-versus-host disease: clinical presentation of multiple lesions of lichenoid and atrophic pattern. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2013;88(5):799-802.
71. Hou CY, Xu LL, Chen H, Liu N, Jiang M, Wang GQ, Zhang L, Wang XH, Zeng YJ. Intestinal aGVHD and infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Medical Science Monitor*. 2013;19:802-6.
72. Ball LM, Egeler RM, Party EPW. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone marrow transplantation*. 2008;41 Suppl 2:S58-64.
73. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biology of blood and marrow transplantation. Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11(12):945-56.
74. Warren EH, Deeg HJ. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue antigens*. 2013;81(4):183-93.
75. Ishii K, Barrett AJ. Novel immunotherapeutic approaches for the treatment of acute leukemia (myeloid and lymphoblastic). *Therapeutic Advances in Hematology*. 2016;7(1):17-39.
76. Heidegger S, van den Brink MR, Haas T, Poeck H. The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Frontiers in immunology*. 2014;5:337.
77. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112(12):4371-83.
78. Takahashi H, Ikeda K, Ogawa K, Saito S, Ngoma AM, Mashimo Y, et al. CD4+ T cells in aged or thymectomized recipients of allogeneic stem cell transplantations. *Biological research*. 2015;48:41.
79. Bouvy AP, Klepper M, Betjes MG, Weimar W, Hesselink DA, Baan CC. Alemtuzumab as Antirejection Therapy: T Cell Repopulation and Cytokine Responsiveness. *Transplantation direct*. 2016;2(6):e83.
80. van Heijst JW, Ceberio I, Lipuma LB, Samilo DW, Wasilewski GD, Gonzales AM, et al. Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nature medicine*. 2013;19(3):372-7.
81. Rezvany MR, Tehrani MJ, Karlsson C, Lundin J, Rabbani H, Osterborg A, et al. Reconstitution of the T-cell repertoire following treatment with alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2006;135(4):475-85.

82. Kolb H, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990;76(12):2462-5.
83. Soiffer RJ, Ho VT. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001;98:3192-204.
84. Hobbs GS, Perales MA. Effects of T-Cell Depletion on Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcomes in AML Patients. *Journal of clinical medicine*. 2015;4(3):488-503.
85. Gribben JG, Hallek M. Rediscovering alemtuzumab: current and emerging therapeutic roles. *British journal of haematology*. 2009;144(6):818-31.
86. Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(7):16414-39.
87. Poire X, van Besien K. Alemtuzumab in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert opinion on biological therapy*. 2011;11(8):1099-111.
88. Willis MD, Robertson NP. Alemtuzumab for Multiple Sclerosis. *Current neurology and neuroscience reports*. 2016;16(9):84.
89. Chakraverty R, Orti G, Roughton M, Shen J, Fielding A, Kottaridis P, et al. Impact of in vivo alemtuzumab dose before reduced intensity conditioning and HLA-identical sibling stem cell transplantation: pharmacokinetics, GVHD, and immune reconstitution. *Blood*. 2010;116(16):3080-8.
90. Hale G, Slavin S, Goldman JM, Mackinnon S, Giralt S, Waldmann H. Alemtuzumab (Campath-1H) for treatment of lymphoid malignancies in the age of nonmyeloablative conditioning? *Bone marrow transplantation*. 2002;30(12):797-804.
91. Kharfan-Dabaja MA, Nishihori T, Otrrock ZK, Haidar N, Mohty M, Hamadani M. Monoclonal antibodies in conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation. Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2013;19(9):1288-300.
92. Warner JL, Arnason JE. Alemtuzumab use in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia: a history and discussion of future rational use. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2012;3(6):375-89.
93. Bhat V, Joshi A, Sarode R, Chavan P. Cytomegalovirus infection in the bone marrow transplant patient. *World journal of transplantation*. 2015;5(4):287-91.
94. Holmes-Liew CL, Holmes M, Beagley L, Hopkins P, Chambers D, Smith C, et al. Adoptive T-cell immunotherapy for ganciclovir-resistant CMV disease after lung transplantation. *Clinical & translational immunology*. 2015;4(3):e35.

95. Pinheiro SG, de Matos SB, Botura MB, Meyer R, Lima FW. Late cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation: case reports. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2013;35(6):435-7.
96. Johnston BL, Conly JM. Alemtuzumab and natalizumab: The monoclonal antibody story continues. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2006;17(6):327-9.
97. Morris EC, Rebello P, Thomson KJ, Peggs KS, Kyriakou C, Goldstone AH, et al. Pharmacokinetics of alemtuzumab used for in vivo and in vitro T-cell depletion in allogeneic transplantations: relevance for early adoptive immunotherapy and infectious complications. *Blood*. 2003;102(1):404-6.
98. JPT. Product Data Sheet.
99. Kern F. Cytomegalovirus Protein Spanning PepMix™ Peptide Pools to Discover Changes in T-Cell Immunity in the Aging Population Application Note JPT Technologies. 2012:1-2.
100. One GB. Separation mononukleärer Zellen. Available from: [http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/German%20Catalogue/08346\\_Kapitel\\_9\\_D.pdf](http://www.greinerbioone.com/UserFiles/File/German%20Catalogue/08346_Kapitel_9_D.pdf).
101. Shih C, Bernard GW. Peripheral Blood Mononuclear Cells Develop Into Multinucleated Osteoclasts in Tissue Culture. *The Anatomical Record*. 1996;245:41-5.
102. Biotec M. MACS Cell Separation. Available from: <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Cell%20Separation/MACSTechnology%20Brochure.ashx>.
103. Britten CM, Meyer RG, Kreer T, Drexler I, Wölfel T, W. H. The use of HLA-A\*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J Immunol Methods*. 2002;259:95-110.
104. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, et al. Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors. *The Journal of Immunology*. 2003:4069-76.
105. Corporation C. Flaer: Alexa Fluor 488 proaerolysin. Available from: [www.cedarlanelabs.com](http://www.cedarlanelabs.com).
106. Gratama JW, van Esser JWJ, Lamers CHJ, Tournay C, Löwenberg B, Bolhuis RLH, et al. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD81 T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood*. 2001;98(5):1358-64.
107. Coulter B. iTAg™ MHC Class I Murine Tetramer - SA-PE 2002. Available from: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=T10145.pdf>.

108. Scientific TF. eBioscience FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set 2017. Available from: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/00-5523-00>.
109. Bocharov G, Luzyanina T, Cupovic J, Ludewig B. Asymmetry of cell division in CFSE-based lymphocyte proliferation analysis. *Frontiers in immunology*. 2013;4:1-7.
110. Scientific TF. Cell Trace™ Cell Proliferation Kits. 2017:1-7.
111. Biotec M. IFN- $\gamma$  Secretion Assay – Cell Enrichment and Detection Kit (PE). 2016:1-31.
112. Dorrschuck A, Schmidt A, Schnurer E, Gluckmann M, Albrecht C, Wolfel C, et al. CD8+ cytotoxic T lymphocytes isolated from allogeneic healthy donors recognize HLA class Ia/Ib-associated renal carcinoma antigens with ubiquitous or restricted tissue expression. *Blood*. 2004;104(8):2591-9.
113. Mohan SR, Clemente MJ, Afable M, Cazzolli HN, Bejanyan N, Wlodarski MW, et al. Therapeutic implications of variable expression of CD52 on clonal cytotoxic T cells in CD8+ large granular lymphocyte leukemia. *Haematologica*. 2009;94(10):1407-14.
114. Rawstron AC, Rollinson SJ, Richards S, Short MA, English A, Morgan GJ, et al. The PNH phenotype cells that emerge in most patients after CAMPATH-1H therapy are present prior to treatment. *British Journal of Haematology*. 1999;107:148-53.
115. Sahin F, Meltem Akay O, Ayer M, Sinan Dal M, Ertop S, Ilhan O, et al. Pesh PNH diagnosis, follow-up and treatment guidelines. *Am J Blood Res*. 2016;6(2):19-27.
116. Hu R, Mukhina GL, Lee SH, Jones RJ, Englund PT, Brown P, et al. Silencing of genes required for glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in Burkitt lymphoma. *Experimental hematology*. 2009;37(4):423-34 e2.
117. Fracchiolla NS, Barcellini W, Bianchi P, Motta M, Permo E, Cortelezzi A. Biological and molecular characterization of PNH-like lymphocytes emerging after Campath-1H therapy. *British Journal of Haematology*. 2001;112:969-71.
118. Marek A, Stern M, Chalandon Y, Ansari M, Ozsahin H, Gungor T, et al. The impact of T-cell depletion techniques on the outcome after haploidentical hematopoietic SCT. *Bone marrow transplantation*. 2014;49(1):55-61.
119. Matthews K, Lim Z, Afzali B, Pearce L, Abdallah A, Kordasti S, et al. Imbalance of effector and regulatory CD4 T cells is associated with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation using a reduced intensity conditioning regimen and alemtuzumab. *Haematologica*. 2009;94(7):956-66.
120. Brett S, Baxter G, Cooper H, Johnston JM, Tite J, Rapson N. Repopulation of blood lymphocyte sub-populations in rheumatoid arthritis patients treated with the depleting humanized monoclonal antibody, CAMPATH-1H. *Immunology*. 1996;88:13-9.

121. Bolton HA, Zhu E, Terry AM, Guy TV, Koh WP, Tan SY, et al. Selective Treg reconstitution during lymphopenia normalizes DC costimulation and prevents graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(9):3627-41.
122. Epp K, Schäfer L, Theobald M, Bopp T, Meyer R, Wagner EM. Functionally impaired GPI-anchor negative regulatory T cells strongly correlate with acute Graft versus Host Disease after Alemtuzumab-based conditioning regimen. 13th CIMT Annual Meeting. 2015:221.
123. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921-8.
124. Gilleece MH, Dexter TM. Effect of Campath-1H antibody on human hematopoietic progenitors in vitro. *Blood*. 1993;82:807-12.
125. Marco MR, Dons EM, van der Windt DJ, Bhamra JK, Lu LT, Zahorchak AF, et al. Post-transplant repopulation of naive and memory T cells in blood and lymphoid tissue after alemtuzumab-mediated depletion in heart-transplanted cynomolgus monkeys. *Transplant immunology*. 2013;29(1-4):88-98.
126. Novitzky N, Davison G, Abdulla R, Mowla S. Definition of the variables affecting efficacy of immunodepletion ex vivo of peripheral blood progenitor cell grafts by alemtuzumab (Campath in the bag). *Biology of blood and marrow transplantation. Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2013;19(12):1753-9.
127. Cavanagh MM, Qi Q, et al. Finding Balance: T cell Regulatory Receptor Expression during Aging. *Aging and Disease*. 2011;2(5):398-413.
128. van den Beemd R, Boor PPC, van Lochem EG, Hop WCJ, Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Flow Cytometric Analysis of the Vb Repertoire in Healthy Controls. *Cytometry*. 2000;40:336-45.
129. McLean-Tooke A, Barge D, Spickett GP, Gennery AR. T cell receptor Vbeta repertoire of T lymphocytes and T regulatory cells by flow cytometric analysis in healthy children. *Clinical and experimental immunology*. 2008;151(1):190-8.
130. Roux E, Helg C, Dumont-Girard F, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. Analysis of T-cell Repopulation After Allogeneic Bone Marrow Transplantation: Significant Differences Between Recipients of T-cell Depleted and Unmanipulated Grafts. *Blood*. 1996;87(9):3984-399.
131. Yager EJ, Ahmed M, Lanzer K, Randall TD, Woodland DL, Blackman MA. Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(3):711-23.
132. Wu CJ, Chillemi A, Alyea EP, Orsini E, Neuberg D, Soiffer RJ, and Ritz J. Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood*. 2000;95(1):352-9.

133. Rao SP, Sancho J, Campos-Rivera J, Boutin PM, Severy PB, Weeden T, et al. Human peripheral blood mononuclear cells exhibit heterogeneous CD52 expression levels and show differential sensitivity to alemtuzumab mediated cytotoxicity. *PLoS one*. 2012;7(6):e39416.
134. Macedo C, Walters JT, Orkis EA, Isse K, Elinoff BD, Fedorek SP, et al. Long-term effects of alemtuzumab on regulatory and memory T-cell subsets in kidney transplantation. *Transplantation*. 2012;93(8):813-21.
135. Ge Q, Hu H, Eisen HN, Chen J. Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(5):2989-94.
136. Neujahr DC, Chen C, Huang X, Markmann JF, Cobbold S, Waldmann H, et al. Accelerated Memory Cell Homeostasis during T Cell Depletion and Approaches to Overcome It. *The Journal of Immunology*. 2006;176(8):4632-9.
137. Zimmermann Ch, Prévost-Blondel A, Blaser C, Pircher H. Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *Eur J Immunol* 1999;29:284-90.
138. Cho BK, Rao VP, Ge Q, Eisen HN, Chen J. Homeostasis-stimulated Proliferation Drives Naive T Cells to Differentiate Directly into Memory T Cells. *J Exp Med*. 2000;192:549–56.
139. Tanchot C, Le Campion A, Martin B, Leautaud S, Dautigny N, Lucas B. Conversion of Naive T Cells to a Memory-Like Phenotype in Lymphopenic Hosts Is Not Related to a Homeostatic Mechanism That Fills the Peripheral Naive T Cell Pool. *The Journal of Immunology*. 2002;168(10):5042-6.
140. Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ. Naive T Cells Transiently Acquire a Memory-like Phenotype during Homeostasis-driven Proliferation. *J Exp Med*. 2000;192 (4):557–64.
141. Murali-Krishna K, Ahmed R. Cutting Edge: Naive T Cells Masquerading as Memory Cells. *The Journal of Immunology*. 2000;165(4):1733-7.
142. Lin K, Chen S, Chen G. Role of memory T cells and perspectives for intervention in organ transplantation. *Frontiers in immunology*. 2015;6:1-6.
143. Fuji S, Kapp M, Einsele H. Monitoring of pathogen-specific T-cell immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Frontiers in immunology*. 2013;4:276.
144. Politikos I, Boussiotis VA. The role of the thymus in T-cell immune reconstitution after umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2014;124(22):3201-11.
145. Kieper WC, and Jameson SC. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:13306-11.

146. Min B, Foucras G, Meier-Schellersheim M, Paul WE. Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(11):3874-9.
147. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010;129(4):474-81.
148. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *Journal of Virology*. 2003;77(8):4911-27.
149. Pearl JP, Parris J, Hale DA, Hoffmann SC, Bernstein WB, McCoy KL, et al. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *American journal of transplantation*. 2005;5(3):465-74.
150. Yamashita K, Choi U, Woltz PC, Foster SF, Sneller MC, Hakim FT, Fowler DH, Bishop MR, Pavletic SZ, Tamari M, Castro K, Barrett AJ, Childs RW, Illei GG, Leitman SF, Malech HL, Horwitz ME. Severe chronic graft-versus-host disease is characterized by a preponderance of CD4+ effector memory cells relative to central memory cells. *Blood*. 2004;103(10):3986-8.
151. Ali N, Flutter B, Sanchez Rodriguez R, Sharif-Paghaleh E, Barber LD, Lombardi G, et al. Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R $\gamma$  null mice display a T-effector memory phenotype. *PloS one*. 2012;7(8):e44219.
152. Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG. Alloreactive Memory T Cells Are Responsible for the Persistence of Graft-versus-Host Disease. *The Journal of Immunology*. 2005;174(5):3051-8.
153. Chen BJ, Cui X, Sempowski GD, Liu C, Chao NJ. Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease. *Blood*. 2004;103(4):1534-41.
154. Chen BJ, Deoliveira D, Cui X, Le NT, Son J, Whitesides JF, et al. Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse. *Blood*. 2007;109(7):3115-23.
155. Juchem KW, Anderson BE, Zhang C, McNiff JM, Demetris AJ, Farber DL, et al. A repertoire-independent and cell-intrinsic defect in murine GVHD induction by effector memory T cells. *Blood*. 2011;118(23):6209-19.
156. Anderson BE, McNiff J, Yan J, Doyle H, Mamula M, Shlomchik MJ, et al. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(1):101-8.
157. Zheng H, Matte-Martone C, Li H, Anderson BE, Venketesan S, Sheng Tan H, et al. Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood*. 2008;111(4):2476-84.

158. Dutt S, Tseng D, Ermann J, George TI, Liu YP, Davis CR, et al. Naive and Memory T Cells Induce Different Types of Graft-versus-Host Disease. *The Journal of Immunology*. 2007;179(10):6547-54.
159. Pastore D, Delia M, Mestice A, Perrone T, Carluccio P, Gaudio F, et al. Recovery of CMV-specific CD8+ T cells and Tregs after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation*. 2011;17(4):550-7.
160. Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, Wagner S, Mahendra P, Apperley J, et al. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97(5):1232-40.
161. Gratama JW, Boeckh M, Nakamura R, Cornelissen JJ, Brooimans RA, Zaia JA, et al. Immune monitoring with iTAg MHC Tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective multicenter study. *Blood*. 2010;116(10):1655-62.
162. Malek TR, Fleming TJ, Codias EK. Regulation of T lymphocyte function by glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) - anchored proteins. *Immunology*. 1994;6:105-13.
163. Roberto A, Castagna L, Zanon V, Bramanti S, Crocchiolo R, McLaren JE, et al. Role of naive-derived T memory stem cells in T-cell reconstitution following allogeneic transplantation. *Blood*. 2015;125(18):2855-64.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vor und nach der Dichtegrad-Zentrifugation (modifiziert nach (110)) .....	35
Abbildung 2: Darstellung Ablauf Elispot modifiziert nach (26) .....	45
Abbildung 3: Gating Strategie CD52-T-Zellen der Studienpatienten, gezeigt an Patient Nr. 11 .....	49
Abbildung 4: Patient Nr. 2 (Tx 1602 nach HSZT) Darstellung der CD52-positiven und -negativen Population für CD4 und CD8 T-Zellen.....	50
Abbildung 5: Median CD52-negativer CD4 und CD8 T-Zellen nach allogener HSZT .....	51
Abbildung 6: Gating-Strategie FLAER-Färbung gezeigt an Patient Nr. 5 beispielhaft für CD4 <sup>+</sup> T-Zellen, Nr.1 Gating auf Lymphozyten, Nr. 2 Festlegung Bereich CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> T-Zellen, Nr. 3 Unterteilung CD4 T-Zellen in CD52 <sup>+</sup> und CD52 <sup>-</sup> , Nr. 4 Darstellung CD52 <sup>-</sup> T-Zellen weisen keinen GPI-Anker auf (FLAER negativ) .....	52
Abbildung 7: Darstellung GPI-Anker-Verlust auf CD4 und CD8 T-Zellen .....	54
Abbildung 8: Gegenüberstellung der Verteilung der CD52-Populationen im Knochenmark und peripherem Blut exemplarisch bei Patient Nr. 11 .....	56
Abbildung 9: Grafische Gegenüberstellung CD52-negativer T-Zellen der CD4 und CD8 T-Zellen im peripheren Blut und Knochenmark.....	57
Abbildung 10: CD28 Expression auf CD4 und CD8 T-Zellen .....	58
Abbildung 11: CD54 Expression auf CD4 und CD8 T-Zellen .....	59
Abbildung 12: CD58 Expression auf CD4 und CD8 T-Zellen .....	59
Abbildung 13: CD137 Expression auf CD4 und CD8 T-Zellen .....	60
Abbildung 14: FACS-Bild Gegenüberstellung Tetramer-positiver Zellen in der CD52 <sup>+</sup> und CD52 <sup>-</sup> T-Zellen bei Patient Nr. 26.....	61
Abbildung 15: Diagramm und Tabelle zur Darstellung CMV-spezifischer CD8 T-Zellen in der CD52-positiver und CD52-negativer Population.....	61
Abbildung 16: Darstellung Verteilung Tetramer-positiver T-Zellen bei CD8 / CD52 <sup>+</sup> T-Zellkultur und CD8 / CD52 <sup>-</sup> T-Zellkultur .....	62
Abbildung 17: Gatingstrategie Gedächtnis-T-Zellen exemplarisch für CD4 T-Zellen an Patient Nr. 11 (Tx +209).....	63
Abbildung 18: Grafik zeitlicher Verlauf des Medians CD52-negativer Memory T-Zellen für CD4 und CD8 der Studienpatienten, < Tag 100 n = 5, Tag 100 – 365 n = 15, Tag > 365 n = 5 .....	65
Abbildung 19: Gating-Strategie zur Unterscheidung T <sub>CM</sub> und T <sub>EM</sub> anhand des Oberflächenmarkers CD62L exemplarisch an Patient Nr. 1 (Tx +1618) .....	66

Abbildung 20: Gegenüberstellung Anteil TCM und TEM für CD4 und CD8 T-Zellen anhand der CD52 Expression .....	67
Abbildung 21: Gating naive T-Zellen exemplarisch für CD4 T-Zellen an Patient Nr. 39 (Tx +658) .....	68
Abbildung 22: Darstellung zeitlicher Verlauf naiver T-Zellen bei den Transplantationspatienten (% = Anteil CD52+ T-Zellen an CD45RA* T-Zellen) .....	69
Abbildung 23: Verlauf naive T-Zellen nach Transplantation an Patient Nr. 1 (% = Anteil CD52+ T-Zellen an CD45RA* T-Zellen) .....	69
Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der terminalen CD52 neg. Effektorzellen für CD 4 und CD 8 T-Zellen.....	70
Abbildung 25: Gatingstrategie der T-regulatorischen Zellen gezeigt an Patient Nr. 19.....	71
Abbildung 26: Vergleich der CMV-spezifischen IFN-Freisetzung der PBMC von Patient Nr. 9 nach 4 und 6 Stunden .....	73
Abbildung 27: Ergebnis IFN- $\gamma$ Elispot von Patient Nr. 28, im Vergleich CD 8 <sup>+</sup> /CD52 <sup>+</sup> und CD8/CD52 <sup>-</sup> T-Zellen.....	75
Abbildung 28: Ergebnis des Zytochrom-Assays, gezeigt an Patient Nr. 28 .....	76
Abbildung 29: FACS-Darstellung Proliferation CD4 T-Zellen getrennt nach CD52-Expression, Patient Nr. 2, 1h nach CFSE-Färbung, in einem dotplot dargestellt.....	77
Abbildung 30: Proliferation über 12h ex vivo CD4 und CD8 T-Zellen von Patient Nr. 2 .....	78
Abbildung 31: Histogrammdarstellung Proliferationsverhalten im Vergleich von CD4/CD52 <sup>+</sup> und CD4/CD52 <sup>-</sup> T-Zellen, an Patient Nr. 2.....	79
Abbildung 32: Gegenüberstellung V $\beta$ -TZR-Repertoire von CD52 <sup>+</sup> und CD52 <sup>-</sup> T-Zellen bei fünf Studienpatienten .....	80

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl einiger CD-Antigene, modifiziert nach (26).....	13
Tabelle 2: Verwendete FACS-Antikörper .....	30
Tabelle 3: Übersicht Transplantationspatienten mit Geschlecht, Alter, Erkrankung.....	33
Tabelle 4: Prozentuale Darstellung der CD52-positiven und -negativen Populationen der Patienten für die CD4 und CD8 T-Zellen mit Transplantationszeitpunkt (Tx) nach HSCT .....	49
Tabelle 5: Übersicht über die proz. Verteilung der GPI-Anker für CD52-negative T-Zellen für CD 4 <sup>+</sup> und CD 8 <sup>+</sup> T-Zellen, CD52 T-Zellpopulation als Ausgangswert.....	53

Tabelle 6:	Darstellung des Verlustes von CD55 und CD59 bei GPI-Anker-negativen Zellen für CD4 und CD8 T-Zellen (ausgehend von 100% CD52-negativen T-Zellen).....	55
Tabelle 7:	Vergleich Anteil der CD52 T-Zellpopulationen zwischen Knochenmarkpunktat und peripherem Blut.....	56
Tabelle 8:	Darstellung der prozentualen Verteilung der Gedächtnis-T-Zellen in der CD 4 und CD 8 Population getrennt nach CD52 von 18 Patienten (ausgehend von 100% CD45RO+ in der jeweiligen Population von CD4 und CD8) .....	63
Tabelle 9:	Übersicht über die Treg-Verteilung in der CD52-positiven und -negativen Population der Patienten .....	71
Tabelle 10:	Zusammenfassung der IFN- $\gamma$ Freisetzung der PBMC der Patienten im Zytokin-Sekretionsassay.....	74

### 9.3 Zusammensetzung von verwendeten Medien- und Pufferlösungen

Lagerung bei 4 °C, ansonsten Änderung angegeben.

<b>Acetatpuffer für Elispot</b>	46,9 ml H <sub>2</sub> O 4,6 ml Essigsäure 0,2N 11 ml Natriumacetat 0,2N
<b>AEC Substratlösung für Elispot</b>	3-Amino-2-Ethyl-Carbazol-Tablette 2,5 ml Dimethylformamid 47,5 ml Acetatpuffer
<b>EDTA-Puffer, pH 8,0</b>	0,375 g Disodiumsalz ad 1 L H <sub>2</sub> O
<b>FACS-Puffer</b>	PBS 0,1% BSA (Bovines Serumalbumin)
<b>FACS-Fixans</b>	PBS 1% Formaldehyd
<b>Formaldehydlösung 2% für FLAER-Färbung</b>	PBS 2% Formaldehyd
<b>MACS-Puffer</b>	1000 ml PB 5 g BSA 4 ml EDTA
<b>Medium zum Auftauen von PBMCs und</b>	PBS

<b>T-Zellen</b>	0,5% EDTA
<b>Medium zum Kryokonservieren von Zellen</b>	X-Vivo 20% Humanalbumin 10 U/ml Heparin 10% DMSO
<b>Kulturmedium für K562, Selektionsmedium</b>	RPMI 1640/21875 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1 mg/ml Geneticin
<b>Kulturmedium für K32 und TM</b>	RPMI 1640/21875 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin
<b>Kulturmedium für T-Zellen</b>	AIM V 10% humanes Serum 50 U/ml IL-2
<b>Kulturmedium für Dendritische Zellen (Fast DC)</b>	RPMI 1% humanes Serum
<b>Kulturmedium für Dendritische Zellen (reife DC)</b>	AIM V 2% humanes Serum
<b>Trypanblau (Stammlösung)</b> (Lagerung RT)	2,0g Trypanblau ad 1 L H <sub>2</sub> O
<b>Trypanblau (Gebrauchslösung)</b> (Lagerung RT)	75 ml Trypanblau Stammlösung 75 ml NaCl (150 mM)

## 9.4 Protokolle

### 9.4.1 Separation mononukleärer Zellen aus Leukozytenfilm und dem peripheren Blut („Ficoll“)

- Buffy coat oder Patientenblut in Zellkulturflasche füllen
- 1:1 mit PBS verdünnen
- 15 ml Ficoll Separationsmedium unter die Fritte des Leucosep™ Röhrchens zentrifugieren (1500 rpm, 1 min, RT)
- Verdünntes Patientenblut oder Buffy coat über die Fritte schichten

- Zentrifugieren (1000 rpm, 20 min, RT) mit ausgeschalteter Beschleunigungs- und Bremsfunktion der Zentrifuge
- PBMC Schicht mit zwei ml Pipette abnehmen und in 50 ml Tube überführen
- Tube mit abgenommenen PBMC zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT)
- 2-mal waschen mit PBS

#### 9.4.2 Separation heparinisertes Knochenmarkblut

- Heparinisertes Knochenmarkblut 1:4 mit PBS verdünnen
- 15 ml Ficoll-Trennmedium in ein 50 ml-Falcon ohne Fritte geben
- Auf Ficoll-Trennmedium das Knochenmarkblut/PBS-Gemisch langsam überschichten
- Zentrifugieren (2300 rpm, 20 min, RT), ohne Bremse oder Beschleunigung
- Weitere Schritte wie unter 9.4.1 nach Zentrifugation

#### 9.4.3 Isolation von CD4 und CD8 T-Zellen („MACS Isolation“)

- Zellen auftauen und zweimal in Medium waschen
- Auf Eis arbeiten
- $10 \times 10^6$  Zellen in 10 ml MACS-Puffer (4 °C) aufnehmen
- Zellen zählen zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, 4 °C)
- Dekantieren, Pellet kurz aufwirbeln
- Je  $10 \times 10^6$  Zellen in 80 µl MACS-Puffer aufnehmen, 20 µl MikroBeads dazugeben, vortexen
- Inkubieren (4 °C, 15 min)
- Zellen mit 2 ml MACS-Puffer waschen
- Zentrifugieren (5 min, 1500 rpm)
- 500 µl MACS-Puffer Säule und Filter spülen
- Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer aufnehmen
- Durchlaufen lassen, als Negativ-Fraktion
- Tube und Filter mit je 500 µl spülen
- Filter mit 500 µl spülen, verwerfen
- Säule mit 500 µl spülen
- Säule aus dem Magneten entfernen
- Positiv-Fraktion in Säule 2-mal mit 1000 µl MACS-Puffer eluieren, Säule verwerfen

- Positiv-Fraktion zählen

#### 9.4.4 Einfrieren der Zellen

- Zellen in Medium waschen
- Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT), dekantieren
- Zellpellet aufnehmen in 1,5 ml/nunc Einfriermedium mit 10 % DMSO
- In einer Kryokonservierungsbox mit Isopropanol-Ummantelung (4 °C) in einen Gefrierschrank mit -80 °C stellen
- Probe nach maximal 3 Tagen in einen flüssigen Stickstoff überführen

#### 9.4.5 Auftauen der Zellen

- Nunc mit Zellen dem Stickstofftank entnehmen und in einem Wasserbad bei 37 °C auftauen lassen
- Nunc ausspülen mit 10 ml PBS/EDTA
- Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT), Überstand dekantieren
- 2-mal in PBS/EDTA waschen

#### 9.4.6 Zellkultur für K562, TM, K32

- Zellen auftauen nach Protokoll
- In 12 ml Kulturmedium suspendieren und in einer Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>
- Bei K562: nach 3 Tagen Genitacin zur Selektion dem Medium hinzugeben

#### Jeden Montag und Freitag:

- Zellkultur und Kulturmedium unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilen
- semiadhärente Zellen vom Flaschenboden durch klopfen lösen
- Zellen aufnehmen, zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT)
- 2-mal waschen mit PBS
- Zellen zählen
- Etwa  $3 \times 10^6$  Zellen in 12 ml frischen Zellkulturmedium / Flasche kultivieren
- Restliche Zellen kryokonservieren oder verwerfen

#### 9.4.7 Restimulation der T Zellen

- Verwendete Feeder Zellen: bestrahlte allogene PBMC, K32, TM
- Kultivierung einer Zelllinie aufrecht In einer T25 Kulturflasche, 37 °C, 5 % CO<sup>2</sup>
- Maximal 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml Medium einsetzen

#### Tag 0

- Cellsort der T-Zellpopulationen
- 1 Tag lang Resuspension der T-Zelllinie in Kulturmedium, 37 °C, 5 % CO<sup>2</sup>

#### Tag 1 (Freitag)

- T-Zellen entnehmen, zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT), waschen in PBS
- Feeder Zellen werden bestrahlt: 5x10<sup>6</sup> K32 oder TM (8000 rad), 25x10<sup>6</sup> allogene PBMC (3500 rad)
- Bestrahlte Feederzellen werden zusammen mit dem T-Zellen in 12 ml Medium in Zellkulturflaschen kultivieren

#### Tag 2 (Samstag)

- Zugabe von 30 ng/ml Medium OKT<sub>3</sub> zu der Zellkultur

#### Tag 4 (Montag)

- T-Zellen entnehmen, zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT), zweimal mit PBS auswaschen zur OKT<sub>3</sub>-Entfernung
- Ohne T-Zellen zu zählen in neue Kulturflasche mit 12 ml frischen Medium setzen

#### Tag 7 (Freitag)

- Halber Mediumwechsel, 50 IU/ml IL2 auf Gesamtmenge des Mediums zufügen

#### Tag 10 (Montag)

- Halber Mediumwechsel, 50 IU/ml IL2 auf Gesamtmenge des Mediums zufügen
- Zellen zählen

#### Tag 14 (Freitag)

- T-Zellen entnehmen, zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT), zweimal waschen in PBS
- Feederzellen werden bestrahlt: 5x10<sup>6</sup> K32 oder TM (8000 rad), 25x10<sup>6</sup> allogene PBMC (3500 rad)

- Bestrahlte Feederzellen werden zusammen mit dem T-Zellen in 12 ml Medium in Zellkulturflaschen kultivieren
- Zugabe von 30 ng/ml Medium OKT<sub>3</sub> zu der Zellkultur

Nach Restimulation an Tag 14, Protokoll an Tag 4 weiterführen.

#### 9.4.8 Einzelzellkultur für T-Zellen

- Verwendete Feederzellen: bestrahlte allogene PBMC, K32, TM
- Kultivierung einer Zelllinie in e well einer 96-Loch Gewebekulturplatte, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>
- Verwendung von T-Zellkulturmedium mit 100 U/ml IL-2

#### Tag 0

- Cellsort der T-Zellpopulationen
- 1-3 Tage verbleiben in 100 µl T-Zellkulturmedium, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

#### Tag 1 (Freitag)

- Feederzellen bestrahlen : 5x10<sup>5</sup> K32 oder TM (8000 rad), 25x10<sup>5</sup> allogene PBMC (3500 rad)
- Bestrahlte Feederzellen zu T-Zellen hinzufügen
- Zugabe von 30 ng/ml Medium OKT<sub>3</sub> zu der Zellkultur

#### Tag 4 (Montag), Tag 7 (Freitag), Tag 10 (Montag)

- Halber Mediumwechsel, 90 µl Medium durch 100 µl ersetzen
- Zellen zählen, mikroskopieren

#### Tag 14 (Freitag)

- T-Zellen wie an Tag 1 restimulieren

Nach Restimulation Protokoll an Tag 4 weiterführen.

#### 9.4.9 3 Tage Protokoll für die Ausreifung Dendritischer Zellen

##### Tag 0:

- PBMCs auftauen
- 10-15 Zellen zu drei ml DC Medium in 6 well Platte aussäen
- Inkubation (45-60 min, 37 °C)

- Überstand aus den Wells abnehmen und Wells mit warmem PBS auswaschen (4-mal)
- Überstand (PBMC ohne DC) wegfrieren
- Zugabe von:
  - 1000 U/ml GM-CSF
  - 500 U/ml IL4
- Inkubation (24 Stunden, 37 °C)

#### Tag 1:

- Zugabe zu jedem well von:
  - 10 µg/ml IL-1β
  - 10 µg/ml TNF-α
  - 1000 U/ml IL-6
  - 1 µg/ml PGE<sub>2</sub>
- Inkubation (24 Stunden, 37 °C)

#### Tag 2 (DCs ernten):

- Jedes Well mindestens zweimal mit kaltem PBS (4 °C) auswaschen, auf Eis arbeiten
- Ausgewaschene Platten nach überbleibenden Zellen mikroskopieren, ggf. erneut auswaschen
- Zellen zählen und kryokonservieren oder in Assays weiterverwenden

### 9.4.10 FACS-Färbung

#### Färbung mit antihumanen Antikörpern

- 0,1-1x10<sup>6</sup> Zellen zweimal in FACS-Puffer waschen und auf FACS-Probenröhrchen verteilen
- Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT), Überstand dekantieren
- Ak (5 µl) zum Zellpellet zugeben, vortexen
- Inkubation (15 min, RT) im Dunkeln
- 2-mal mit FACS-Puffer waschen
- Zellen mit 500 µl FACS-Fixans fixieren
- Proben innerhalb einer Woche messen

### Färbung mit FLAER

- Zellen auftauen in PBS/EDTA
- Zellen aufnehmen in kaltes PBS (4 °C)
- Auf FACS-Tubes verteilen, 500.000 Zellen/Tube
- FACS-Färbung nach Protokoll (s. oben), ohne die Zellen zu fixieren
- Zentrifugieren (10 min, 1100 rpm, 4 °C)
- Resuspendieren in 125 µl kaltem PBS
- 6,25 µl FLAER-Reagenz/Tube hinzufügen, Tubes vortexen
- Inkubation (20 min, auf Eis), im Dunkeln
- Zentrifugieren (10 min, 1100 rpm, 4 °C)
- Resuspendieren in kaltem PBS (4 °C)
- Zentrifugieren (5 min, 1500 rpm, RT)
- Fixieren der Zellen mit 500 µl 2 % Paraformaldehyd-Lösung/Tube

### Färbung für den Zellsort

- Zellen auftauen in PBS/EDTA, 3-mal in PBS/EDTA waschen
- $0,1 \times 10^6$  Zellen als Kompensationsproben auf FACS-Tubes verteilen, FACS-Färbung nach Protokoll
- $50-70 \times 10^6$  Zellen verwenden für Sort-Probe, FACS-Färbung mit 10 µl pro  $10 \times 10^6$  Zellen, Inkubation 20 min, RT
- Nach FACS-Färbung alle Zellen 2-mal in PBS/EDTA waschen, Zellen in 0,5-1,5 ml PBS/EDTA aufnehmen in FACS-Röhrchen mit Deckel
- T-Zellkulturmedium in FACS-Röhrchen mit Deckel vorlegen, beschriften mit den zu sortierenden Zellpopulationen
- Zellen auf Eis sofort in das Tumolvakzinationszentrum zum sortieren bringen

### Tetramer Färbung

- PBMCs auftauen
- Suspension mit  $5 \times 10^6$  Zellen / ml herstellen
- 200 µl davon in jedes Tube
- AK nach Panel und 5 µl MHC Tetramer I dazu
- Gut vortexen
- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
- 1 ml PBS dazu

- Zentrifugieren bei 400 x g , 5 min
- Dekantieren, Zellpellet auflockern
- Resuspendieren in 500 µl PBS mit 0,5 % Formaldehyd
- Bis zur Facs Messung bei 4°C 1h bis max. 24 h aufheben

### FoxP3-Färbung

#### Benötigte Medien:

- Fixation Permeabilization Concentrate 1:3 verdünnen mit Fixation/Permeabilization Diluent → Perm/Fix
- Permeabilization Buffer (10x) 1:10 verdünnen mit Aqua dest. → Perm (1x)
- Normal rat serum (NRS) 2 % ansetzen in Permeabilization Buffer (1x)

#### Protokoll:

- FACS-Färbung nach Protokoll
- Nicht benötigte FACS-Röhrchen fixieren
- Waschen in kaltem PBS/BSA
- Zellen resuspendieren in 1 ml Perm/Fix
- Inkubieren 1h bei 4 °C im Dunkeln
- Waschen mit PBS/BSA
- 2-mal waschen mit 2ml Perm (1x)
- Blockieren:
  - o In etwa 100 µl 2 %-igen NRS
  - o Inkubieren 15 min bei 4 °C
- Ohne waschen 20 µl Foxp3 AK zugeben
- Inkubieren 30 min bei 4 °C im Dunkeln
- Zellen 2-mal waschen mit 2 ml Perm (1x)
- Resuspendieren in 0,5 ml PBS/BSA
- Zellen messen

#### 9.4.11 Proliferationsassay- CFSE Assay

- Zellen in vorgewärmten PBS/0,1 % BSA (FACS Puffer) aufnehmen (c= 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml)

- 2 µl / ml von 5mM CFSE Lösung (18 µL DMSO + 1 Röhrchen CFSE) für eine c = 10 µM dazugeben  
(0,5 µL / ml FACS Puffer)
- 10 min Inkubation bei 37 °C
- 5 ml /ml Facs Puffer eiskaltes AIMV+10%HS dazu
- 5 min Inkubation auf Eis
- Zentrifugieren 5 min, RT, 1500 rpm
- 2 x zentrifugieren und waschen in AIMV

#### 9.4.12 IFN-γ Elispot Protokoll

##### Tag 0:

- 20 µl/well 35 % Ethanol-H<sub>2</sub>O-Lösung pipettieren, danach aus der Platte ausschicken
- 3-mal mit 150 µl PBS/well waschen, vor dem letzten Waschschrift Primär AK zum coat ansetzen
- 60 µl/well PBS mit 10 µl/ml Primär AK pipettieren
- Inkubation über Nacht bei 4 °C in Alufolie.

##### Tag 1:

- 3-mal mit 150 µl PBS/well waschen, einmal zwei min inkubieren
- 100 µl Kulturmedium/well hinzugeben
- Inkubation (1 Stunde, 37 °C)
- 100 µl/well Kulturmedium mit zu testenden Zellen hinzugeben
- Inkubation (20 Stunden, 37 °C) in Alufolie.

##### Tag 2:

- 6-mal mit 150 µl/well PBS 0,05% Tween waschen
- 60 µl/well PBS 0,5% BSA mit 2 µg/ml Sekundär-AK zugeben
- Inkubation (2 Stunden, 37 °C)
- sechsmal die Platte mit PBS 0,05% Tween waschen
- 100 µl Vecstain ABC-Komplex/well zugeben
- Inkubation (1 Stunde, RT) im Dunkeln
- 3-mal die Platte mit PBS 0,05% Tween waschen, 3-mal mit PBS
- 100 µl AEC/well zugeben
- Inkubation (10-20 min, RT)

- 10-mal Platte mit Leitungswasser waschen, währenddessen Plastikboden abziehen
- Trocknen der Platte über Nacht.
- Auswertung der Spots im Elispot Auswertegerät und -Software

#### 9.4.13 IFN- $\gamma$ Zytokin-Sekretionsassay

- Zellen am Vortag auftauen, über Nacht in Medium (AIMV 10% HS) im Brutschrank kultivieren
- Pro Ansatz werden  $1 \times 10^6$  PBMC/15 ml Tube
- Stimulation mit CMV-Peptiden oder allogenen DC: Zellen in einem ml Medium (AIMV 10%HS) mit Peptiden (NLV: 10  $\mu$ g/ml; pp65 überlappendes Peptid: 1  $\mu$ g/ml) oder allogenen DC (20.000 Zellen) inkubieren (4 Stunden, 37 °C)
- Zentrifugieren (1500 rpm, 5 Minuten, 4°C), dekantieren, Überstand abpipettieren
- In 2 ml kaltem FACS-Puffer (4°C) waschen
- Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, 4°C), Überstand abpipettieren
- Aufnehmen in 80  $\mu$ l kaltes Medium (AIMV 10%HS, 4°C) und 20  $\mu$ l Catch Reagent zugeben
- Inkubation: 10 min auf Eis
- 10 ml warmes Medium (AIMV 10%HS, 37 °C) zugeben
- Inkubation (45 min, 37 °C), alle 5 min resuspendieren
- Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, 4°C), dekantieren
- In zwei ml kaltem FACS-Puffer (4°C) waschen
- Dekantieren, Überstand abpipettieren, in FACS-Puffer aufnehmen und auf FACS-Tubes verteilen
- IFN- $\gamma$  Detection Antibody (10  $\mu$ l/Tube) und AK für FACS-Färbung zugeben
- Inkubation (10 min, auf Eis)
- 2-mal mit kaltem FACS-Puffer (4°C) waschen
- Fixieren mit 500  $\mu$ l FACS-Fixans/FACS-Tube