

Untersuchungen zu Migration, *Homing* und Effektor-
Funktionen humaner T-Lymphozyten in NOD.Cg-
Prkdc^{scid} Il2r^{gtm1Wjl}/SzJ-Mäusen im Rahmen der
allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Ariane Brunk
geb. am 05.03.1983 in Göttingen

Mainz, 2011

Dekan:

1.Berichterstatter:

2.Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2011

Hiermit versichere ich, gemäß § 11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 30.04.1990, die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel in der Arbeit angegeben zu haben.

Ort, Datum

Ariane Brunk

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	DIE AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE.....	3
2.1.1	Klassifikation	3
2.1.2	Epidemiologie und Mortalität	5
2.1.3	Diagnose.....	6
2.1.4	Grundlagen der Entstehung einer Leukämie	7
2.1.4.1	Hierarchie der gesunden Hämatopoese	8
2.1.4.2	Hierarchie der malignen Hämatopoese	10
2.1.4.3	Genetische Ursachen der Leukämie	10
2.1.5	Prognose.....	12
2.1.6	Konventionelle Therapieansätze	14
2.1.6.1	Chemotherapie.....	14
2.2	T LYMPHOZYTEN.....	15
2.2.1	Frühe Entwicklung.....	15
2.2.2	Antigen-Präsentation im Rahmen des MHC	16
2.2.2.1	Genetischer Aufbau	16
2.2.2.2	Expression, Struktur und Funktion.....	17
2.2.3	Auslösen einer Immunantwort – Die immunologische Synapse.....	17
2.2.4	Differenzierung von T Lymphozyten in Effektor- und Gedächtniszellen	19
2.3	MIGRATION UND <i>HOMING</i> VON T LYMPHOZYTEN.....	20
2.3.1	Adhäsionsmoleküle	21
2.3.1.1	Selektine	21
2.3.1.2	Integrine	22
2.3.1.3	Immunoglobulin Superfamilie.....	22
2.3.1.4	Chemokine und Chemokin-Rezeptoren.....	23
2.3.2	Die Leukozyten-Adhäsionskaskade.....	24
2.4	ADOPTIVE IMMUNTHERAPIE ZUR BEHANDLUNG VON AML	27
2.4.1	Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation als Immuntherapie.....	27
2.4.1.1	Graft-versus-Host Erkrankung und Graft-versus-Leukämie Effekt	28
2.4.1	Adoptiver Transfer von AML-reaktiven CTL als Immuntherapie	30
2.5	DIE NOD.CG-PRKDC^{SCID} IL2RG^{TM1WJL}/SZJ MAUS	32
3	ZIELSETZUNG	34
4	MATERIAL UND METHODEN.....	36
4.1	MATERIAL	36
4.1.1	Geräte.....	36

4.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	37
4.1.3	Glaswaren.....	38
4.1.4	Chemikalien	38
4.1.5	Medien und Zusätze.....	39
4.1.6	Operationsbesteck	40
4.1.7	Zytokine und Wachstumsfaktoren	41
4.1.8	MACS [®] Microbeads und Zubehör.....	41
4.1.9	Antikörper, human	42
4.1.10	Antikörper, murin	43
4.1.11	Zellkulturmedien und Puffer.....	44
4.2	METHODEN.....	47
4.2.1	Arbeiten mit Zellkulturen.....	47
4.2.2	Gewinnung und Handhabung von primärem Patientenmaterial.....	47
4.2.3	Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität.....	47
4.2.4	Kryokonservierung von Zellen	48
4.2.5	Auftauen von kryokonservierten Zellen	48
4.2.6	Aufreinigung von Zellmaterial mittels Ficoll Dichtegradienten-Zentrifugation	48
4.2.7	Durchflusszytometrie.....	49
4.2.7.1	Prinzip	49
4.2.7.2	Färbung mit monoklonalen Antikörpern	49
4.2.7.2.1	Direkte Färbung	49
4.2.7.2.2	Indirekte Färbung.....	50
4.2.7.3	FACS-Messung	50
4.2.8	Kultivierung adhärent wachsender Endothelzellen	50
4.2.8.1	Kultur von bEND.3/bEND.5 Endothelzellen	51
4.2.8.2	Kultur von primären murinen Lungen-Endothelzellen.....	51
4.2.8.3	Kultur von HUVECs	51
4.2.9	Zellseparation mit MACS [®] Technologie	52
4.2.9.1	Prinzip	52
4.2.9.2	Isolation von humanen CD3 ⁺ / CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T Zellen aus PBMC.....	52
4.2.9.3	Isolation von murinen CD90.2 ⁺ T Zellen aus BALB/cJ Splenozyten.....	52
4.2.9.4	Isolation von naiven CD8 ⁺ T Zellen.....	53
4.2.10	Polyklonale Stimulation humaner und muriner T Zellen.....	54
4.2.11	Gemischte Lymphozyten Leukämie Kultur (MLLC).....	54
4.2.12	Herstellung EBV-transformierter B Zell-Linien	54
4.2.13	Generierung EBV-spezifischer T Lymphozyten.....	55
4.2.14	IFN γ ELISpot zur Analyse der Reaktivität AML-reaktiver CD8 ⁺ CTL	55
4.2.14.1	Prinzip	55

4.2.14.2	Durchführung	56
4.2.15	⁵¹ Chrom-Freisetzungstest zur Analyse der spezifischen Lyse-Fähigkeit	57
4.2.16	Studien zu Adhäsion und Transmigration	58
4.2.16.1	PKH Färbung	58
4.2.16.2	Flow Chamber (Flusskammer) Experimente	58
4.2.16.3	Transwell Experimente.....	61
4.2.16.3.1	Prinzip	61
4.2.16.3.2	Durchführung	61
4.2.17	Arbeiten mit Versuchstieren.....	63
4.2.17.1	Ganzkörperbestrahlung von Versuchstieren.....	63
4.2.17.2	Gewinnung von peripheren Blutproben	63
4.2.17.3	Intravenöser Transfer von Einzelzellsuspensionen	63
4.2.17.3.1	Transfer von AML Blasten.....	64
4.2.17.3.2	Transfer von AML-reaktiven CTL	64
4.2.17.4	Chirurgische Entnahme und Aufarbeitung von Organen	64
5	ERGEBNISSE.....	65
5.1	ETABLIERUNG EINES PRÄKLINISCHEN MURINEN AML-MODELLS	65
5.1.1	Charakterisierung der primären AML-Patientenproben.....	65
5.1.2	Untersuchung des <i>Engraftment</i> -Potentials primärer AML-Proben <i>in vivo</i>	67
5.1.3	Verlauf des <i>Engraftment</i> einer primären AML am Beispiel der AML MZ667	69
5.1.4	Molekulare und phänotypische Unterschiede zwischen gut und schlecht anwachsenden primären AML-Proben	70
5.2	ADOPTIVER TRANSFER VON AML-REAKTIVEN SPENDER-CTL	72
5.2.1	Das System AML MZ580 – <i>single-mismatch</i> reaktive CTL	73
5.2.1.1	Charakterisierung des Spender-Empfänger-Systems	73
5.2.1.2	Isolierung naiver CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T Zellen aus Spender 913183 PBMC	73
5.2.1.3	Generierung AML MZ580-reaktiver CTL in MLLC-Ansätzen	75
5.2.1.4	Etablierung geeigneter Bedingungen für den adoptiven Transfer	77
5.2.1.5	Adoptiver Transfer zur Untersuchung der Funktionalität unterschiedlicher CTL- Populationen	79
5.2.1.5.1	Phänotypische Charakterisierung der AML MZ580- <i>single mismatch</i> reaktiven CTL- Populationen	79
5.2.1.5.2	Experimenteller Ablauf	80
5.2.1.5.3	Ergebnisse	82
5.2.1.6	Untersuchung der Kinetik der Effektor-Funktionen AML MZ580-reaktiver CTL	85
5.2.1.7	Analyse der <i>ex vivo</i> -Reaktivität adoptiv transferierter Tag 28 CTL.....	90
5.2.2	Das System AML MZ308 – <i>dual-mismatch</i> reaktive CTL.....	92
5.2.2.1	Charakterisierung des Spender-Empfänger-Systems	92
5.2.2.3	Generierung AML MZ308-reaktiver CTL in MLLC-Ansätzen	94

5.2.2.4	Etablierung geeigneter Bedingungen für den adoptiven Transfer	95
5.2.2.5	Adoptiver Transfer zur Untersuchung der Funktionalität unterschiedlicher CTL- Populationen	96
5.2.2.5.1	Phänotypische Charakterisierung der AML MZ308- <i>dual mismatch</i> reaktiven CTL- Populationen	96
5.2.2.5.2	Experimenteller Ablauf	97
5.2.2.5.3	Ergebnisse	97
5.2.3	Spezifitätsversuch im AML MZ580- und MZ308-System.....	100
5.2.3.1	Charakterisierung des Spender-Empfänger-Systems	101
5.2.3.2	Generierung der CTL-Populationen.....	101
5.2.3.3	Adoptiver Transfer zur Spezifitätskontrolle im AML MZ580/308-System.....	103
5.2.3.3.1	Phänotypische Charakterisierung der einzelnen CTL-Populationen	103
5.2.3.3.2	Experimenteller Ablauf	104
5.2.3.3.3	Ergebnisse	106
5.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse des adoptiven T Zell Transfers.....	110
5.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM TRANSMIGRATIONSVERHALTEN HUMANER T ZELLEN ÜBER MURINES ENDOTHEL	111
5.3.1	Adhäsions- und Transmigrationsstudien in der Flusskammer.....	112
5.3.1.1	Kultivierung von Endothelzellen in der Flusskammer	112
5.3.1.2	Charakterisierung der Endothelzellen.....	113
5.3.1.3	MACS®-Isolation von murinen und humanen T Lymphozyten.....	114
5.3.1.4	Charakterisierung der isolierten T Lymphozyten	114
5.3.1.5	Fluoreszenz-Färbung der T Lymphozyten mit PKH-Farbstoffen	115
5.3.1.6	Untersuchung zur Adhäsion von humanen T Lymphozyten an murine Endothelzellen	116
5.3.1.7	Vergleichende Untersuchung des Adhäsionsverhaltens humaner und muriner T Zellen auf humanem und murinem Endothel.....	117
5.3.2	Funktionale Untersuchungen des Adhäsionsmechanismus unter Einsatz funktionsblockierender monoklonaler Antikörper	119
5.3.2.1	Adhäsionsstudien auf bEND.3 Endothelzellen	120
5.3.2.2	Adhäsionsstudien auf primären murinen Lungen Endothelzellen	123
5.3.3	Funktionale Untersuchungen des Transmigrations-Mechanismus unter Einsatz funktionsblockierender monoklonaler Antikörper	126
5.3.3.1	Transmigration humaner T Lymphozyten	127
5.3.3.2	Transmigration muriner T Lymphozyten	128
5.3.4	Zusammenfassung der Studien zu Adhäsion und Transmigration humaner T Zellen über murines Endothel.....	129
6	DISKUSSION.....	131
6.1	ETABLIERUNG EINES NOD.CG-PRKDC^{SCID} IL2RG^{TM1WJL}/SZJ-AML MODELLS.....	131

6.1.1	FAB-Klassifikation	133
6.1.2	Mutationen der Flt3-Rezeptor-Tyrosinkinase	133
6.1.3	Anteil CD34 ⁺ CD38 ⁻ LSC	134
6.1.4	Anteil CXCR4 ⁺ AML-Blasten.....	135
6.2	BIOLOGISCHE SIGNIFIKANZ DES ADOPTIVEN TRANSFERS AML-REAKTIVER CTL	136
6.2.1	Kultur und Charakterisierung der AML-reaktiven CTL-Populationen.....	137
6.2.2	Etablierung geeigneter Bedingungen für den adoptiven Transfer	138
6.2.3	Effizienz und Spezifität der adoptiv transferierten CTL-Populationen	140
6.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER EXTRAVASATION HUMANER T ZELLEN ÜBER MURINES ENDOTHEL	143
6.3.1	Funktionale Untersuchung des Adhäsionsverhaltens humaner T Lymphozyten an murines Endothel	144
6.3.2	Funktionale Untersuchung des Transmigrationsmechanismus humaner T Lymphozyten über murines Endothel	147
6.3.3	Zusammenfassung.....	148
7	LITERATURVERZEICHNIS	149
8	ANHANG	162
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	162

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die akute myeloische Leukämie (AML) zählt zu den aggressivsten neoplastischen Erkrankungen der Hämatopoese. Die Mehrheit der Patienten mit AML erreicht nach Induktions-Chemotherapie den Zustand der kompletten Remission, jedoch erleiden mehr als die Hälfte dieser Patienten anschließend einen Rückfall und versterben an den Folgen der Erkrankung [1]. Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (engl.: *hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) stellt die einzig putativ kurative Behandlungsform für rezidierende Patienten und solche mit schlechter Prognose dar. Jedoch birgt diese Form der Therapie auch eine Vielzahl an Risiken. Insbesondere das Auftreten einer akuten Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl.: *graft-versus-host disease*, GvHD) stellt die Hauptursache für transplantationsassoziierte Mortalität und Morbidität dar [2]. Die Depletion von alloreaktiven zytotoxischen T Lymphozyten (CTL) aus dem Transplantat ermöglicht zwar die Prävention der Entstehung einer GvH-Erkrankung, jedoch häufig unter gleichzeitigem Verlust des förderlichen, anti-leukämischen Transplantat-gegen-Leukämie-Effekts (engl.: *graft-versus-leukemia*, GvL) [3]. Um den GvL-Effekt unter Vermeidung einer GvH-Erkrankung zu erhalten, bietet sich der gezielte adoptive Transfer von Leukämie-spezifischen, nicht alloreaktiven CTL als attraktive Strategie der Immuntherapie für AML-Patienten nach allogener HSCT an. In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich ein prä-klinisches murines AML-Modell unter Einsatz des stark immundefizienten NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ- (NSG-) Mausstamms und primären AML-Blasten durch die Optimierung bereits publizierter Protokolle etabliert werden. Bei zehn von 17 transplantierten primären AML-Proben konnte ein erfolgreiches *Engraftment* der humanen Zellen und eine Rekonstitution der humanen Neoplasie in den NSG-Mäusen erzielt werden. Die *Engraftment*-Rate betrug somit 58,82% und lag etwas unter dem aus der Literatur bekannten Wert von 65-70% [4, 5]. Es ließen sich gut, intermediär und schlecht anwachsende AML-Proben anhand der *Engraftment*-Stärke und -Reproduzierbarkeit voneinander unterscheiden. Anhand der Analyse von für das *Engraftment* kritischer Parameter konnte ein Zusammenhang zwischen *Engraftment*-Rate in der Maus und Flt3-Mutationsstatus sowie FAB-Klassifikation des Patienten hergestellt und somit Angaben aus der Literatur bestätigt werden. Für zwei Patienten-spezifische AML-Modelle, MZ580 und MZ308, konnten *in vitro* erfolgreich AML-reaktive, über einzelne bzw. duale HLA-Diskrepanzen restringierte CTL-Populationen generiert und über einen Zeitraum von bis zu 70 Tagen expandiert werden. Deren adoptiver Transfer in zuvor mit humanen AML-Blasten inokulierte NSG-Mäuse führte zu einer nahezu vollständigen Eradikation der AML-Blasten und Remission der Versuchstiere. Anhand unterschiedlich langer *in vitro* Kultur-Zeiträume konnte ein für die *in vivo* ausgeübten Effektor-Funktionen optimaler Reifungszustand der CTL-Populationen von maximal 28 Tagen bestimmt werden. Die kinetische Analyse der lytischen Aktivität *in vivo* deutete auf

eine relativ schnelle Ausübung der Effektor-Funktionen durch die CTL-Populationen innerhalb von zwei bis 24 Stunden nach adoptivem Transfer hin. Durch die Verwendung von *in vitro* generierten EBV-reaktiven CTL aus einem irrelevanten Spender konnte zudem die Spezifität der *in vivo* ausgeübten Effektor-Funktionen nachgewiesen werden. Die *ex vivo* Resolution adoptiv transferierter CTL und deren *in vitro* Analyse in einem IFN γ ELISpot wies eine konstante Reaktivität der Zellen ohne Induktion einer Xeno-Reaktivität nach. Die zur Verbesserung der Persistenz humaner CTL-Populationen eingesetzten autologen CD4⁺ T Zellen zeigten nur im AML MZ308-System eine positive Wirkung. Generell konnte die Persistenz *in vivo* jedoch trotz initialer Substitution mit den Zytokinen IL-2 und IL-7 nicht über einen Zeitraum von sieben Tagen hinaus aufrechterhalten werden.

Zur Untersuchung des Extravasations-Mechanismus humaner T Zellen über murines Endothel wurden sowohl Flusskammer- als auch Transwell-Studien durchgeführt, um die molekularen Grundlagen des Adhäsions- und Transmigrationsprozesses aufzuklären. Durch den parallelen Einsatz humaner und muriner T Zellen auf murinen Endothelzellen unter Zusatz funktionsblockierender monoklonaler Antikörper konnte gezeigt werden, dass der Extravasations-Mechanismus beider Spezies auf Interaktionen homologer Adhäsionsmolekül-Paare, nämlich VLA-4–VCAM-1 und LFA-1–ICAM-1, beruht. Für einzelne Moleküle konnten in Abhängigkeit der eingesetzten Endothelzellen Unterschiede in der Funktionalität zwischen den Spezies identifiziert werden. Der Adhäsionsprozess war durch die Blockade der VLA-4–VCAM-1-Interaktion stärker inhibierbar als durch die Blockade von LFA-1–ICAM-1. Die Transmigration hingegen war durch die Blockade beider Adhäsionsmolekül-Paare vergleichbar stark inhibierbar.

2 EINLEITUNG

2.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akuten Leukämien zählen zu den malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems im Knochenmark. Ihre Entstehung beruht auf genetischen Veränderungen in den primitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen. Dadurch kommt es zu Störungen in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose, die ultimativ zu einer Akkumulation klonaler, teilungsfähiger, aber unzureichend differenzierter Vorläuferzellen in Blut, Knochenmark und ggf. auch in anderen Organen (Lymphknoten, Leber, Milz, ZNS) führen. Je nach Art der betroffenen Zelllinie entwickelt sich eine akute lymphatische Leukämie (ALL) bzw. eine akute myeloische Leukämie (AML). Bedingt durch die hohe Proliferationsrate der entarteten Zellen bilden sich akute Leukämien i.d.R. innerhalb kurzer Zeit, meist Wochen, aus. Im Verlauf wird die normale, gesunde Hämatopoese in zunehmendem Maße durch neoplastische, hyperproliferative Zellen verdrängt, was zu typischen Leitsymptomen wie Blässe, körperlicher Schwäche, Infekt-Anzeichen (Fieber), Gerinnungsstörungen und Blutungsneigungen (Petechien) führt [6].

2.1.1 Klassifikation

Die erste systematische Einteilung der akuten Leukämien erfolgte in den 1970er Jahren anhand morphologischer und zytochemischer Merkmale der Blasten. Es entstand die sogenannte Französisch-Amerikanisch-Britische (FAB) Klassifikation, die im Laufe der Jahre unter Einbeziehung neuer immunologischer und mikroskopischer Techniken erweitert und präzisiert wurde. Sie umfasst acht Subtypen, in denen eine akute Leukämie ausschließlich entsprechend Morphologie und Differenzierungszustand der Zellpopulationen eingeordnet wird [7-9]. Die Diagnose einer AML ist zu stellen, sofern der Anteil pathologischer Blasten an der Gesamtheit nukleärer Zellen in Knochenmark und/oder Blut $\geq 30\%$ beträgt [6]. Zusammengefasst ist die heute gängige Klassifikation in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Einteilung der verschiedenen Subtypen der AML nach FAB-Klassifikation, Definition nach WHO-Nomenklatur sowie jeweilige Inzidenz (verändert nach [6], www.klinikum.uni-heidelberg.de).

FAB Subtyp	WHO-Nomenklatur	Inzidenz (% AML)
M0	AML mit minimaler myeloischer Differenzierung	Selten
M1	AML ohne Ausreifung	20%
M2	AML mit Ausreifung bzw. mit t(8;21) (AML/ETO)	30%
M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL)	5%
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	30%
M4eo	Myelomonozytäre AML mit inv 16 oder t(16;16) (CBFβ/MYH11)	30%
M5	Akute monoblastische (M5a) oder monozytische (M5b) Leukämie	10%
M6	Akute Erythroleukämie	Selten
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie	Selten

Durch die zusätzliche Analyse von zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen bei Leukämien entstand parallel die WHO-Klassifikation, die zusätzlich zu den FAB-Kriterien eine Gruppierung anhand genetischer, biologischer, immunphänotypischer und klinischer Eigenschaften beinhaltet [10]. So werden bspw. AML-Erkrankungen mit typischen genetischen Aberrationen von therapieinduzierten Erkrankungen abgegrenzt (siehe Tabelle 2) [11]. Zwei signifikante Unterschiede zwischen der FAB- und WHO-Klassifikation liegen zudem darin, dass (a) ein niedrigerer Anteil an Blasten in Blut und/oder Knochenmark ($\geq 20\%$ statt $\geq 30\%$) für die Diagnose benötigt wird, und (b) die Kategorisierung von AML Fällen in spezifische biologische und klinische Untergruppen erfolgt. Als Hauptgruppen gelten (1) AML-Erkrankungen mit spezifischen wiederkehrenden genetischen Aberrationen, (2) AML-Erkrankungen mit multilineärer Dysplasie und (3) therapieinduzierte AML- oder MDS-Erkrankungen. Alle weiteren AML-Erkrankungen, die in keine der genannten Kategorien fallen, werden in die vierte Hauptgruppe, AML ohne andere Kategorisierung, eingeordnet [10]. Zudem werden Patienten bei Vorhandensein der in Kategorie 1 spezifizierten zytogenetischen Aberrationen nun unabhängig vom Blasten-Anteil als „an einer AML erkrankt“ eingestuft.

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der AML (verändert nach [10]).

Kategorie	Leukämieform
AML mit typischen zytogenetischen Aberrationen	AML mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO) AML mit abnormen Knochenmarkseosinophilen und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBF/MYH11) Akute Promyelozytenleukämie - AML M3 mit t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR α) und Varianten AML mit 11q23-(MLL-)Anomalien
AML mit multilineärer Dysplasie	nach vorhergehender Myelodysplasie / myeloproliferativem Syndrom De-novo AML ohne vorhergehendes Syndrom
Therapieinduzierte AML und MDS	durch Alkylanzien durch Therapie mit Topoisomerase-II-Inhibitoren nach sonstiger Chemo-/Strahlentherapie
AML ohne andere Kategorisierung	AML mit min. myeloischer Differenzierung (FAB M0) AML ohne Ausreifung (FAB M1) AML mit Ausreifung (FAB M2) Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4) Akute monoblastische (FAB M5a) oder monozytische (FAB M5b) Leukämie Akute Erythroleukämie (FAB M6) Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7) Akute Basophilenleukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose Myelosarkom/Chlorom

2.1.2 Epidemiologie und Mortalität

In Deutschland stellen ungefähr 3% aller Tumorerkrankungen Leukämien dar, womit sie im Gegensatz zu anderen Krebsarten relativ selten sind. Dennoch beeinflussen sie aufgrund hoher Mortalitätsraten überproportional stark die Statistiken zur Überlebenswahrscheinlichkeit bei Krebserkrankungen. Die AML kann in allen Altersstufen auftreten und stellt bis heute die Haupttodesursache bei Patienten mit Krebserkrankung über 39 Jahren dar [12-14]. Die Inzidenz nimmt mit ansteigendem Alter stark zu: bei Patienten <65 Jahren lag sie zwischen 2000 – 2003 in den USA bei 1,8 Erkrankten pro 100 000 Personen, bei Patienten \geq 65 Jahren bereits bei 17 Erkrankten pro 100 000 Personen [14]. Dieser Trend gilt im Allgemeinen für Leukämien. Die Wahrscheinlichkeit, eine Leukämie zu entwickeln liegt in der Altersgruppe der 0-39-Jährigen bei 0,15% (eine von 700 Personen ist betroffen), bei den über 70-Jährigen bereits bei knapp 1% (eine von 106 Personen ist betroffen) [15]. Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 67 Jahre. Somit muss die AML als eine Erkrankung der Älteren angesehen werden [6]. Jedoch zeigt die AML auch einen geringen Häufigkeitsgipfel bei Kindern un-

ter zwei Jahren, meist in Form der seltenen kongenitalen Leukämie [16]. Sie stellt mit einer Inzidenz von 0,7 Erkrankten pro 100 000 Kindern die zweithäufigste Leukämie-Erkrankung (nach der ALL) bei Kindern dar (www.awmf.org). In Deutschland existiert im Gegensatz zu den meisten angloamerikanischen Ländern derzeit kein flächendeckendes Register zur Erfassung von Leukämieerkrankungen bei Erwachsenen. Somit ist bei Erwachsenen derzeit keine zuverlässige Aussage über die Inzidenz von Leukämien in Deutschland möglich. Jedoch werden im Rahmen des „Deutschen Kompetenznetz akute und chronische Leukämien“ zurzeit Schätzzahlen für Deutschland anhand bestehender Daten aus dem größten amerikanischen Krebsregister (SEER) erhoben. Aus den so ermittelten Fallzahlen ergibt sich das in Abbildung 1 dargestellte Bild für die geschätzte Anzahl an AML-Erkrankungen in Abhängigkeit vom Alter pro Jahr in Deutschland:

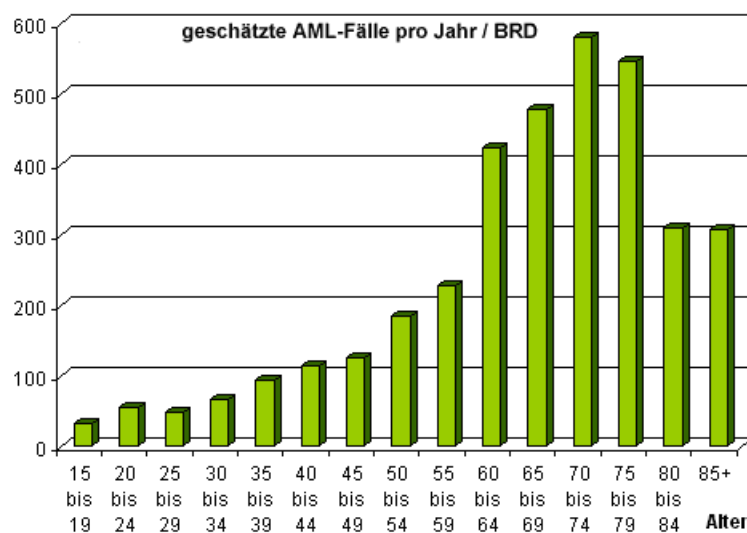


Abbildung 1: Geschätzte AML-Fälle pro Jahr in Deutschland (Stand:2000) [17].

Auch hier ist eine deutliche Korrelation zwischen Anstieg der Fälle pro Jahr und zunehmendem Alter zu erkennen. Die Anzahl der geschätzten Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland liegt für Erwachsene bei ca. 3600 und für Kinder bei 89 [6]. Die Remissionsrate bei Standard Induktionschemotherapie liegt für Patienten bis 60 Jahre mit AML Erkrankung bei 65-75% [18]. Bei älteren Patienten sinkt die Remissionsrate bereits auf 45-55% ab [19, 20]. Zudem erleidet die Mehrzahl der Patienten einen Rückfall und stirbt innerhalb von zwei Jahren nach Erreichen der Remission [21]. Die 5-Jahre-Überlebensrate liegt für AML-Patienten in den USA bei 21%. Mit zunehmendem Alter nehmen auch die Überlebensraten ab und betragen bei den über 75-Jährigen nur noch 2% [22].

2.1.3 Diagnose

Bei Vorliegen der in Abschnitt 2.1 beschriebenen typischen Symptome, und somit dem Verdacht einer AML, ist der erste Schritt die Ermittlung des Anteils an Blasten im peripheren Blut

des Patienten durch ein Blutbild mit mikroskopischem Differentialblutbild und Retikulozyten-Bestimmung. Bei unauffälligem Differentialblutbild erfolgt eine Knochenmarkdiagnostik mit anschließender morphologischer Untersuchung und zytochemischer Färbung der Ausstriche (z.B. unspezifische Esterase, Myeloperoxidase). In beiden Fällen muss der Blastenanteil 20% oder mehr betragen, um den Verdacht einer AML zu bestätigen. Liegen weniger als 20% Blasten vor, so muss mit Hilfe einer zytogenetischen Analyse geklärt werden, ob spezifische chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden können, die dennoch eine Diagnose erlauben [10] (siehe Abschnitt 2.1.1). Bei erfolgtem morphologischem Nachweis von Blasten sollte zusätzlich eine Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie stattfinden. Diese ermöglicht eine genaue Analyse der Antigen-Expression und der linearen Zugehörigkeit (lymphatisch, myeloisch) der Blasten-Population. Die zytogenetische Identifizierung des Karyotyps sowie die Analyse vorliegender Mutationen anhand des Knochenmarkaspirats sind heutzutage unerlässlich, denn sie ermöglichen eine genauere Einteilung der AML in spezifische Untergruppen und dienen als prognostische Faktoren (siehe Abschnitt 2.1.5). Weitere notwendige Laboruntersuchungen sind eine Gerinnungsdiagnostik, die Bestimmung von Lactatdehydrogenase (LDH) und C-reaktivem Protein (CRP) sowie Blutgruppenbestimmung und Virusserologien. Bei Patienten ≥ 65 Jahre sollte zudem eine HLA-Typisierung erfolgen, um für eine eventuelle spätere allogene Stammzelltransplantation (siehe Abschnitt 2.4.1) vorbereitet zu sein (www.cme-punkt.de).

2.1.4 Grundlagen der Entstehung einer Leukämie

Bei der AML handelt es sich um eine genetische Erkrankung. Die maligne Transformation einer gesunden hämatopoetischen Vorläuferzelle durch die Ansammlung genetischer Alterationen führt dabei zu den bereits beschriebenen Krankheitssymptomen (siehe Abschnitt 2.1). Zu den Risikofaktoren, welche die Wahrscheinlichkeit eine Erkrankung erhöhen, zählen sowohl genetische (z.B. Trisomie 21) als auch Umwelt-bedingte Faktoren (Chemische Agenzien, Chemotherapie oder ionisierende Strahlung) [23, 24]. Im Laufe eines Lebens sammeln sich in den Zellen des Organismus vermehrt Mutationen an, vornehmlich bedingt durch die wiederkehrende Exposition gegenüber kanzerogenen äußeren Einflüssen. Von Bedeutung für die Entscheidung, ob diese Anhäufung von Mutationen zu einer malignen Erkrankung wie beispielsweise der AML führt, ist zum einen die Art der betroffenen Zelle (somatische Zelle oder Keimbahnzelle), zum anderen der betroffene genetische Abschnitt sowie die Art und Auswirkung der Mutation (stumm, aktivierend, unterdrückend, deletierend, etc.). In jüngster Zeit gewinnt besonders in der Aufklärung der molekularen Grundlagen der AML das Konzept der Tumorstammzelle immer mehr an Bedeutung. Demzufolge sind die zur Erkrankung führenden Mutationen nur in undifferenzierten Stamm- oder Vorläuferzellen zu finden, die sich dann zu mehr oder weniger stark ausdifferenzierten Zellen weiterentwickeln, hyperproliferie-

ren und die gesunde Hämatopoese verdrängen. Demgegenüber steht die Hypothese, dass genetische Veränderungen, die zu einer Leukämie führen können, im jeweiligen Differenzierungszustand der normalen hämatopoetischen Reifung stattfinden und Zellen zusätzlich die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch weitere Mutationen wiedererlangen [25, 26].

2.1.4.1 Hierarchie der gesunden Hämatopoese

Aufgabe der gesunden adulten Hämatopoese ist es, den Organismus kontinuierlich und ein Leben lang mit der erforderlichen Menge an Zellen des Blutsystems durch Neubildung zu versorgen. Das Blut als flüssiges Organ setzt sich zusammen aus einem korpuskulären, zellulären Bestandteil (Hämatokrit) sowie dem flüssigen Blutplasma. Zu seinen Hauptfunktionen zählen der Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid im Gewebe, sowie der Transport von Elektrolyten, Boten- und Nährstoffen, Wärme und Wasser. Zudem ermöglicht es Zellen des Immunsystems die Migration im Organismus, um im Falle einer Infektion gezielt in die betroffenen Gewebe einzuwandern, oder Verletzungen durch den Gerinnungsprozess zu verschließen. Die einzelnen Funktionen werden von unterschiedlichen Zelltypen vermittelt: Erythrozyten dienen dem Gasaustausch, Thrombozyten (Blutplättchen) ermöglichen die Blutgerinnung, Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen sind Bestandteile des Immunsystems und vermitteln die Abwehr von Krankheitserregern [27]. Bereits in den 1950er Jahren konnte experimentell gezeigt werden, dass der Transfer von gesundem Knochenmark in letal bestrahlte Tiere zu deren Überleben führt. Durch weitere Experimente verdichteten sich die Hinweise auf das Vorhandensein von niederfrequenten, multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark, deren Transfer eine Neuentstehung der Blutbildung in letal bestrahlten Tieren und somit deren Überleben ermöglichten [28-30]. Diese multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC, engl.: *hematopoietic stem cell*) stehen an der Spitze der Hierarchie der Hämatopoese und sind sowohl zur Selbsterneuerung durch Zellteilung sowie zur Differenzierung in alle anderen Zelltypen fähig (siehe Abbildung 2) [31]. Der erste Differenzierungsschritt führt dabei entweder zur gemeinsamen Vorläuferzelle der myeloischen Linie (CMP, engl.: *common myeloid progenitor*) oder der lymphoiden Linie (CLP, engl.: *common lymphoid progenitor*). In nächster Instanz gehen aus diesen Vorläuferzellen durch weitere Differenzierungsschritte die terminal differenzierten Zellen der myeloerythroiden Reihe (Megakaryozyten und später Thrombozyten, Erythrozyten, Mastzellen, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) oder der lymphatischen Reihe (NK Zellen, T Lymphozyten, B Lymphozyten und daraus resultierend Plasmazellen) hervor. Dendritische Zellen (DC, engl.: *dendritic cells*) können aus beiden Vorläuferzell-Typen entstehen.

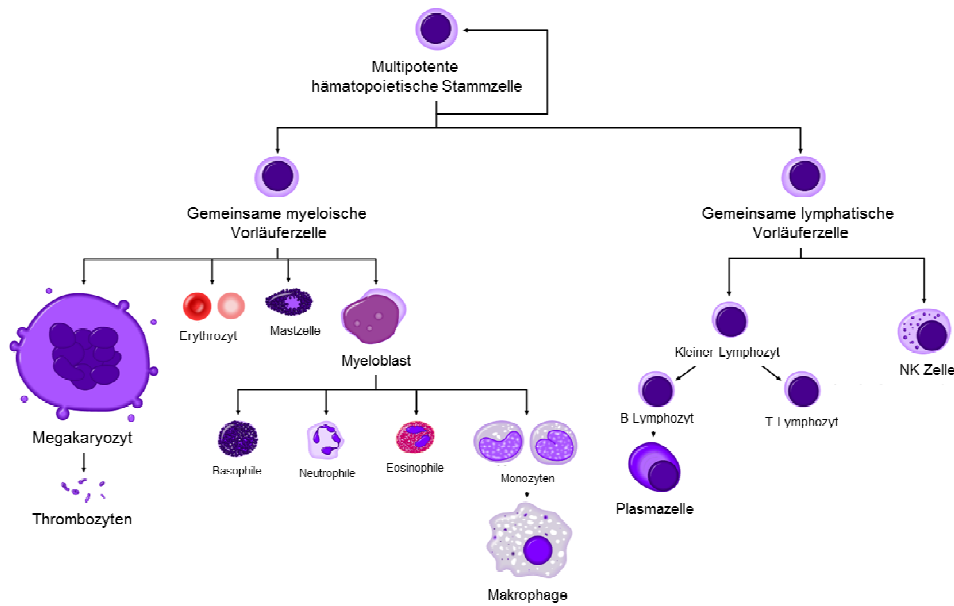


Abbildung 2: Entwicklung des hämatopoetischen Systems aus der multipotenten Stammzelle (verändert nach Mikael Häggström, 2009).

Die HSC können weiter unterteilt werden in sogenannte Langzeit-Stammzellen (LT-HSC, engl.: *long-term HSC*), die zu unbegrenzter Selbsterneuerung fähig sind, und die sogenannten Kurzzeit-Stammzellen (ST-HSC, engl.: *short-term HSC*), die nur für eine definierte Zeitspanne (ca. acht Wochen) zur Selbsterneuerung in der Lage sind [25]. Je weiter die Differenzierung voranschreitet, desto mehr sind die Zellen in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkt, bis zuletzt terminal differenzierte, funktionell reife Zellen entstehen. Durch den Erhalt der proliferativen Kapazität sind die HSC im Gegensatz zu terminal differenzierten Zellen in der Lage, ein Leben lang für die Neubildung von allen zellulären Komponenten des Bluts zu sorgen [32]. In adulten Säugern befinden sich die HSC vornehmlich in einem spezialisierten Bereich in der endostealen Knochenregion, der sogenannten Nische [33]. Diese setzt sich zusammen aus Osteoblasten oder Endothelzellen angrenzender sinusoidaler Blutgefäße, sowie den aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) hervorgehenden Stromazellen [34]. Die Mehrzahl der HSC befindet sich dort in ruhendem Zustand (G_0 -Phase des Zellzyklus) und tritt im Schnitt nur einmal im Monat in die G_1 -Phase ein. Die Wechselwirkungen der HSC mit den Zellen der Nische spielen eine bedeutende Rolle für die Entscheidung über Retention oder Auswanderung der Stammzellen im/aus dem Knochenmark, die Balance von symmetrischer (zur Expansion der HSC) und asymmetrischer (zum Erhalt der Anzahl an HSC) Zellteilung sowie Differenzierung und Apoptose. Durch eine strenge Regulierung dieser Prozesse wird permanent ein konstantes Reservoir an HSC erhalten und zudem ausreichend differenzierte Zellen erzeugt [35, 36].

2.1.4.2 Hierarchie der malignen Hämatopoese

Bereits seit den frühen 1970er Jahren existiert die Vorstellung, dass auch im Falle der Leukämie eine karzinogene Stammzelle an der Spitze der hämatopoetischen Hierarchie steht. Dies resultierte aus der Beobachtung, dass nur eine kleine Subpopulation muriner leukämischer Zellen in der Lage war, *in vitro* und *in vivo* extensiv und klonal zu proliferieren [37, 38]. Jedoch erst die 1997 durchgeführten Transfer-Studien von Blair *et al.* [39] und Bonnet und Dick [40] in immundefiziente *nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency* (NOD/SCID, deutsch: nicht-adipös diabetisch/schwere kombinierte Immunodefizienz)-Mäuse konnten klar die niederfrequente Subpopulation an Zellen definieren, die eine *de novo* Initiierung, Aufrechterhaltung und Propagation von Leukämie *in vivo* erlauben. Phänotypisch waren diese leukämischen Stammzellen (LSC, engl.: *leukemic stem cells*), die je nach Patient nur 0.2–1% der Gesamtzellzahl darstellen, beschränkt auf das Kompartiment der Thy1⁺CD34⁺CD38⁻-Zellen. Fraglich ist allerdings bis heute, ob die LSC aus einer gesunden HSC hervorgeht und durch die Akkumulation von Mutationen zusätzlich zu der bereits vorhandenen Fähigkeit zur Selbsterneuerung kanzerogen wird, oder ob auch aus stärker oder sogar terminal differenzierten hämatopoetischen Zellen LSC entstehen können [26]. Diese müssten zunächst ihre Stammzell-Eigenschaften wiedererlangen, um anschließend durch weitere Mutationen kanzerogen zu werden. Für beide Theorien gibt es molekulare Belege: Eine der häufigsten genetischen Aberration bei AML-Erkrankungen (ca. 15%) ist die t(8;21)-Translokation, bei der als Fusionsprodukt der AML1-ETO Transkriptionsfaktor entsteht [41, 42]. Dieser konnte bei Patienten in Remission jedoch nicht nur in den Blasten, sondern auch in gesunden, nicht leukämogenen HSC detektiert werden. Somit schien die Translokation bereits in den HSC stattgefunden zu haben und die Transformation zur Leukämie erfolgte erst später durch zusätzliche Mutationen [43]. Im Fall der akuten Promyelozytenleukämie (APML) hingegen konnte gezeigt werden, dass das assoziierte Fusionsprotein PML/RAR α nur in den [CD34⁻CD38⁺]- und nicht den [CD34⁺CD38⁻]-Zellpopulationen gefunden werden kann. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die genetische Translokation erst in stärker differenzierten Subpopulationen stattfindet [44].

2.1.4.3 Genetische Ursachen der Leukämie

LSC besitzen die gleiche Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch symmetrische und asymmetrische Zellteilung wie HSC [40, 45]. Jedoch haben sie im Gegensatz zu gesunden HSC die Kontrolle über die komplexen Mechanismen zur gezielten Steuerung von Proliferation, Differenzierung und Apoptose durch Mutationen verloren. Dies führt zu den für eine akute Leukämie typischen Eigenschaften der Hyperproliferation und einer Blockade der Differenzierung [6]. Etwa 45-55% aller akuten Leukämien besitzen einen abnormen Karyotyp mit einer spezifischen chromosomalen Alteration, und 10-12% weisen insgesamt drei oder mehr

zytogenetische Abnormalitäten auf (komplexer Karyotyp) [46-48]. Im Allgemeinen sind für die maligne Transformation einer gesunden Vorläuferzelle Veränderungen in verschiedenen Signalwegen vonnöten (siehe Abbildung 3).

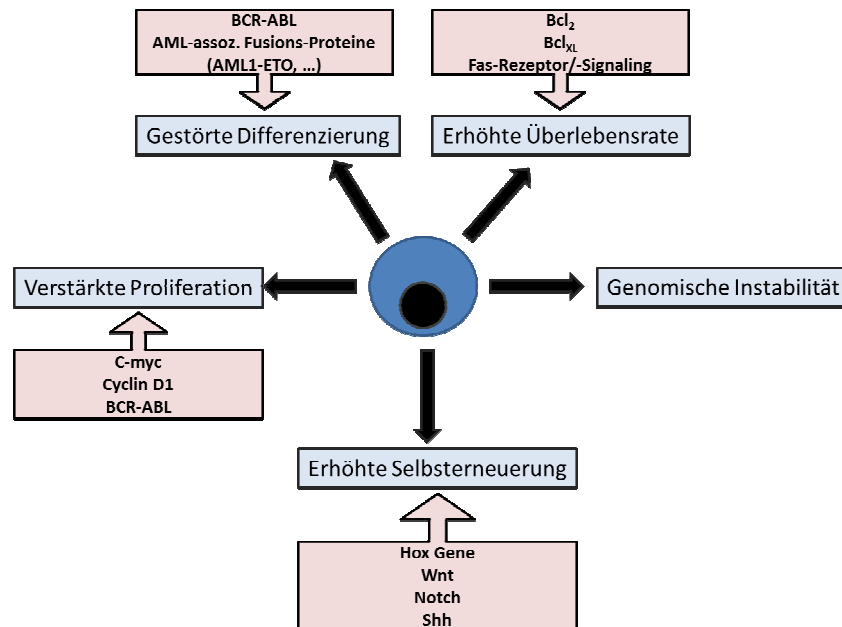


Abbildung 3: Mögliche genetische Veränderungen die zur Deregulierung von Signalwegen innerhalb der HSC und somit zur malignen Transformation zur LSC führen können (verändert nach [25]).

Häufig zählen dazu Mutationen von Transkriptionsfaktoren (TF), die zu einer gestörten Differenzierung führen. Bei der AML sind bis heute eine Reihe an durch chromosomale Translokation entstandene neuartige Fusionsproteine von TF bekannt, wie z.B. AML1-ETO, PML-RAR α oder CBF-MYH1. Diese sorgen für eine veränderte Aktivierung von Zell-signalling-Mechanismen oder transkriptionellen Regulatoren, die wiederum direkt in die hämatopoetische Differenzierung eingreifen [49, 50]. Die Mechanismen der veränderten transkriptionellen Regulation umfassen dabei die Rekrutierung von abnormalen Ko-Repressor-Komplexen, Eingriffe in den Chromatin-Umbau sowie die Zersetzung von subnuklearen Kompartimenten [51]. Häufig wirken diese chimere TF im Vergleich zu ihrem ursprünglichen Pendant zudem dominant negativ [52]. Weitere gängige Mutationen betreffen Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs) wie *FMS-related tyrosine kinase 3* (Flt3), c-Kit oder c-Fms sowie deren nachgeschaltete Signalmoleküle, wie Ras oder Raf. Durch Phosphorylierungskaskaden in den Zellkern stimulieren sie das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus und führen so zu verstärkter Proliferation. Besonders die RTK Flt3 ist bei vielen AML-Patienten (ca. 30%) konstitutiv durch interne Tandem-Duplikationen (ITD) der Juxtamembran-Domäne oder Punkt-Mutationen im Aktivierungsloop der Kinase-Domäne aktiviert [53-55]. Eine dritte Form von oft beobachteten Mutationen betrifft die Mechanismen der Apoptose-Steuerung und setzt diese außer Kraft. So sorgen aktivierende Mutationen anti-apoptotisch wirkender Proteine

wie Bcl₂ oder Bcl_{XL} sowie eine gestörte Signalweiterleitung durch den Fas-Rezeptor für eine erhöhte Überlebens- bzw. eine verminderte Apoptose-Rate [56-58]. Verschiedene Kombinationen der hier beschriebenen Mutationen können zudem dazu führen, dass die betroffene Zelle die Fähigkeit zur vermehrten Selbsterneuerung und somit Stamm-/Vorläuferzell-Charakteristika wiedererlangt [52]. Kollektiv betrachtet ermöglichen die aufgeführten Defekte eine kontinuierliche Evolution des leukämischen Klons durch Ansammlung von krankhaften Veränderungen.

2.1.5 Prognose

Für Patienten <65 Jahren liegen die Chancen, eine AML Erkrankung zu überleben bei ca. 40% [1]. Somit stellt die AML eine heilbare Krankheit dar, die dennoch mit sehr hohen Mortalitätsraten verbunden ist. Zurzeit sind die zwei wichtigsten Faktoren für die Prognose eines Patienten mit einer AML-Erkrankung dessen Alter sowie die zytogenetischen Befunde zum Zeitpunkt der Diagnose [59]. Das zunehmende Alter stellt im Allgemeinen einen adversen prognostischen Faktor dar, wohingegen chromosomale Aberrationen sich je nach Typ günstig oder ungünstig auswirken können [47]. Desweiteren spielen vorausgegangene hämatologische Erkrankungen, die Behandlung einer anderen Erkrankung mittels Chemo-/Strahlentherapie, die Tumorlast zum Zeitpunkt der Diagnose sowie die aktuelle körperliche Verfassung eine wichtige Rolle. Den wichtigsten Hinweis auf den Erfolg einer Induktionstherapie und die Überlebenswahrscheinlichkeit gibt jedoch der Karyotyp der Blasten [46]. Je nach Art der gefundenen Mutation(en) wird eine Einteilung in drei Risikogruppen vorgenommen, günstig, intermediär oder ungünstig. Zu den prognostisch günstigen zytogenetischen Veränderungen zählen die chromosomale Translokation t(15;17) im Fall der APML (FAB M3), sowie Patienten mit Translokation t(8;21) oder Inversion inv(16)/t(16;16). Diese machen ca. 20% aller AML-Fälle bei Patienten <60 Jahren aus und gehen mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit für eine komplette Remission (CR, engl.: *complete remission*) der Erkrankung einher. Ebenso ist die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv in dieser Gruppe eher gering (30-40%) [1]. Eine intermediäre Prognose liegt bei Translokation t(9;11), dem Verlust des Y-Chromosoms oder dem zusätzlichen Erwerbs eines ganzen Chromosoms vor. Zytogenetisch unauffällige AML-Patienten, die ca. 50% aller AML-Patienten ausmachen, fallen ebenfalls in die Gruppe mit intermediärem Risiko. Eine schlechte Prognose wird bei Translokation t(6;9), Inversion inv(3)/t(3;3), Monosomien der Chromosomen fünf oder sieben sowie einem komplexen Karyotyp gestellt. Dies betrifft ca. 15% aller Patienten <60 Jahren und hat eine Fünf-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit von nur 20% zur Folge [1]. Patienten mit einem komplex aberranten Karyotyp überleben zudem häufig nicht länger als ein Jahr nach Diagnosestellung [48, 60]. Im Zuge wesentlich verbesserter zytogenetischer Analysen für die Diagnostik und Prognose von AML-Erkrankungen wurden immer mehr Mutationen auf Einzel-Nukleotid-

Ebene bekannt. Diese stellten sich besonders für die Gruppe der zytogenetisch unauffälligen AML-Patienten als prognostisch wertvoll heraus. Auch hier wird unterschieden zwischen günstigen und ungünstigen Faktoren. Als günstig gelten Mutationen des Nucleophosmin-1- (NPM1-) sowie des *CCAAT/enhancer binding protein α* -(CEBPA-) Gens. Hierbei handelt es sich in beiden Fällen um Proteine, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind und terminal die myeloische Differenzierung beeinträchtigen [61, 62]. Die Frequenz der Mutationen beträgt für NPM1 ca. 30% bei adulten *de novo* AML Erkrankungen und ca. 50-60% bei zytogenetisch unauffälligen Patienten. Die CEBPA-Mutation wird bei ca. 5-9% aller neu diagnostizierten Fälle festgestellt [60]. Zu den prognostisch ungünstigen Faktoren zählen speziell Mutationen der Flt3-Kinase, die eine der am häufigsten auftretenden Mutationen bei hämatologischen Erkrankungen darstellen und bei ca. 25-45% aller AML-Patienten auftreten. Der membranständige Rezeptor, der zur Unterklasse III der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) gehört, besitzt fünf Immunglobulin (Ig)-ähnliche extrazelluläre Domänen, eine Transmembran-Domäne, eine juxtamembran-Domäne sowie einen zytosolischen Anteil mit zwei Tyrosin-Kinase-Domänen (TKD) und phosphorylierbaren Tyrosin-Resten. Alle Mitglieder der Unterklasse RTK III (z.B. FMS, KIT; PDGFRA/B) spielen wichtige Rollen bei der Regulierung von Differenzierung, Proliferation und Überleben hämatopoetischer Zellen [63, 64]. Sie führen durch konstitutive Aktivierung der Kinase zu Hyperproliferation und vermehrtem Überleben von hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die häufigste Art der Mutation ist hier die ITD, die bei ca. 30% aller zytogenetisch unauffälligen Patienten vorkommt und mit zunehmendem Alter der Patienten vermehrt auftritt [65-70]. Alternativ werden Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in der Kinase-Domäne gefunden, die bei 5-10% aller AML-Patienten vorkommen [71]. Die Expression von Flt3 findet fast ausschließlich in frühen myeloischen und lymphatischen Vorläufern statt und wird auch bei ca. 70-90% der leukämischen Blasten von AML-Patienten gefunden [72, 73]. Die Expression des Liganden (Flt3L) hingegen findet in fast allen Geweben statt, wobei die höchste Konzentration in mononukleären peripheren Blutzellen (PBMC) vorliegt [66]. Im gesunden adulten Menschen ist die Serumkonzentration von Flt3L zwar sehr gering, jedoch durch bestimmte Umstände wie z.B. durch eine Chemotherapie induzierbar [74]. Durch Liganden-Bindung erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors, die zu einer Aktivierung der Tyrosin-Kinase-Funktion und der (Auto-) Phosphorylierung des Rezeptors sowie zellulärer Substrate führt. Diese aktivieren vermutlich wichtige zelluläre Signalwege, wie z.B. den MAP-Kinase- sowie den PI3-Kinase-Weg, die durch Beeinflussung der Transkription verschiedener Gene zu einer erhöhten zellulären Proliferation führen [75-77]. Zusätzlich wird durch verminderte Expression von pro-apoptotischen Genen wie *BAX* die Apoptose-Rate gesenkt [78]. Mutationen der RTK Flt3 führen zu einer Liganden-unabhängigen, konstitutiven Aktivierung der Kinase-Domäne und somit zu einer unkontrollierten Proliferation der betroffenen Zellen. Sowohl bei pädiatrischen als auch adulten AML

Erkrankungen gelten Mutationen des *FLT3*-Gens als starke, unabhängige Hinweise auf eine schlechte Prognose hinsichtlich des weiteren klinischen Verlaufs [66].

2.1.6 Konventionelle Therapieansätze

Oberstes Ziel der Behandlung einer AML-Erkrankung ist die Induktion einer CR und im weiteren Verlauf die Prävention eines Rezidivs. Die Definition der Remission umfasst dabei einen Rückgang der Blasten-Population (ohne Auer-Stäbchen) im Knochenmark auf <5%, die normale Ausreifung aller hämatopoetischen Zelllinien sowie die Regeneration des peripheren Blutbilds (>1000 Neutrophile/ μ l, \geq 100 000 Thrombozyten/ μ l) über einen Zeitraum von mind. 4 Wochen. Eine partielle Remission liegt vor, falls der Anteil an Blasten im KM >5%, aber <25% beträgt. Als Rezidiv wird das Wiederauftreten von Blasten im peripheren Blut und/oder ein Blasten-Anteil >5% im KM definiert [79, 80].

2.1.6.1 Chemotherapie

Die Chemotherapie stellt bis heute die Basis der AML-Therapie dar. Dabei unterscheidet man zwei Phasen: die Induktionstherapie zur drastischen Reduktion der Tumorlast und somit zum Erreichen der CR, und die Postremissionstherapie zur Aufrechterhaltung der Remission und der Verhinderung eines Rezidivs. In der Induktionstherapie kommen verschiedene Kombinationen von Zytostatika zum Einsatz. Der heutige Standard besteht aus Zyklen einer dreitägigen Gabe von Anthrazyklinen (meist Daunorubicin) und einer sieben-tägigen Phase Cytosin-Arabinosid (Ara-C), was in etwa 50-60% der Fälle zu einer CR und einer langfristigen Überlebensrate von 10-20% führt [81, 82]. Als Analogon des Nukleotids Cytosin wird Ara-C als Triphosphat in die DNA der Zellen eingebaut und führt durch Hemmung von DNA-Polymerasen zum Zelltod. Die Wirkung ist jedoch beschränkt auf aktiv proliferierende Zellen [83]. Daunorubicin zählt zur Gruppe der Anthrazykline, wie auch Doxorubicin und Idarubicin. Diese zytostatisch wirksamen Antibiotika induzieren durch Hemmung der Topoisomerase II DNA-Strangbrüche [84]. Sie können jedoch bei Überexpression von Multidrug-Resistance-Proteinen in den Zielzellen wirkungslos sein und im schlimmsten Fall resistente Subklone selektionieren [6, 85, 86]. Trotz des Erreichens hoher Remissionsraten durch die Induktionstherapie sind die Langzeit-Überlebensraten für AML-Patienten weiterhin niedrig, wodurch der sich anschließenden Postremissionstherapie auch heute noch eine große Bedeutung zukommt. Als Therapieoptionen kommen hier die intensive Konsolidierungs-Chemotherapie, die niedrig-dosierte Erhaltungstherapie, sowie die allogene oder autologe Stammzelltransplantation (HSCT, engl.: *hematopoietic stem cell transplantation*) in Frage [87]. Als potentiell kurativ hat sich bisher nur die allogene Stammzelltransplantation herausgestellt (siehe Abschnitt 2.4.1).

2.2 T Lymphozyten

T Lymphozyten stellen gemeinsam mit B Lymphozyten die Effektor-Zellen der erworbenen (adaptiven) Immunantwort dar. Sie versetzen den Organismus in die Lage, Millionen verschiedener molekularer Strukturen präzise zu erkennen und eine entsprechende Immunantwort auszulösen. Zudem besitzen sie die Fähigkeit zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, was bei einer erneuten Infektion mit einem bereits bekannten Pathogen zu einer verbesserten Sekundär-Antwort führt. Diese Eigenschaften beruhen auf der Expression eines Antigen-spezifischen Rezeptors auf der Oberfläche der T Lymphozyten, dem sogenannten T Zell Rezeptor (TCR, engl.: *T cell receptor*). Dessen spezifische und hochaffine Bindung an fremde Peptide, die durch Moleküle des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC, engl.: *major histocompatibility complex*) präsentiert werden, führt zur Auslösung einer Immunantwort.

2.2.1 Frühe Entwicklung

T Lymphozyten entstehen im Knochenmark und gehen aus HSC hervor. Ihre Entwicklung erfolgt bis zum Stadium der Thymozyten im Knochenmark und wird anschließend im Thymus fortgesetzt. Unreife Thymozyten wandern in den Thymus ein und beginnen dort mit der Differenzierung. Dabei durchlaufen sie subsequeute Reifungsstadien, die sich in der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle (TCR, CD3 Komplex, Ko-Rezeptoren CD4/CD8, etc.) widerspiegeln. Unreife Thymozyten besitzen weder einen TCR noch Ko-Rezeptoren und werden als doppelt-negative ($CD4^-CD8^-$) Thymozyten bezeichnet. Im ersten Entwicklungsschritt erfolgt die somatische Rekombination der TCR-Gene durch das sogenannten *V-(D)-J Joining*. Durch die individuelle Kombination verschiedener genetischer Elemente, die für die Antigen-bindende Region kodieren, entsteht dabei eine enorm hohe Rezeptor-Vielfalt [88]. Weitere genetische Ereignisse, wie ungenaues *splicing* oder die Insertion zusätzlicher Nukleotide, erhöhen die Vielfalt. Der Großteil der T Lymphozyten exprimiert anschließend Rezeptoren bestehend aus einem $\alpha\beta$ -Heterodimer, bei dem sich jede Kette aus einer konstanten und einer variablen Domäne zusammensetzt. Die variablen Domänen sind hierbei zuständig für die Antigen-Spezifität und besitzen drei sogenannte Komplementarität-bestimmende Regionen (CDR, engl.: *complementarity determining regions*, CDR1-3). Zusätzlich exprimieren $\alpha\beta$ -T Lymphozyten den CD3-Komplex, einen multimeren Proteinkomplex, der erst durch nicht-kovalente Assoziation mit dem TCR die Signalfunktion der T Zelle ermöglicht. Eine kleine Population an T Zellen exprimiert anstelle des $\alpha\beta$ - einen heterodimeren $\gamma\delta$ -TCR. Sie erkennen ihr Antigen ohne MHC-Restriktion und kommen vermehrt in den Schleimhäuten des Darms vor [89]. Nach Fertigstellung des TCR exprimieren $\alpha\beta$ -T Zellen gleichzeitig beide Ko-Rezeptoren, sowohl CD4 als auch CD8, und werden als doppelt-positive ($CD4^+CD8^+$) Thymozyten bezeichnet. Zur Vermeidung von Autoreaktivität der Rezeptoren gegenüber Selbst-

Antigenen durchlaufen die T Lymphozyten anschließend positive und negative Selektionsprozesse. Dabei werden sie auf ihre Komplementarität und Affinität gegenüber Selbst-MHC-Molekülen und -Peptiden getestet. Erfolgt die Erkennung eines körpereigenen MHC-Peptid-Komplexes spezifisch, aber mit niedriger Affinität, so erhalten die Zellen ein Überlebenssignal und verlieren je nach Art des erkannten MHC-Moleküls den nicht mehr benötigten Ko-Rezeptor („MHC-Restriktion“). Ist die Affinität zum präsentierten Selbst-Antigen zu hoch, so erhält die Zelle Signale, die zur Einleitung von Apoptose führen („Klonale Deletion“). Analog geschieht dies, falls die Zelle gar kein MHC-Molekül über den TCR erkennt. Ultimativ wird somit nur ein Bruchteil der theoretisch möglichen Rezeptoren erhalten [90-92]. Die nun reifen, einfach-positiven ($CD4^+$ oder $CD8^+$) T Lymphozyten verlassen den Thymus und zirkulieren im Organismus. Sobald ein spezifischer Antigen-Rezeptor exprimiert wird, stellt er die einzige Antigen-Erkennungsstruktur dar und wird auch von allen Tochterzellen ausschließlich exprimiert.

2.2.2 Antigen-Präsentation im Rahmen des MHC

T Lymphozyten benötigen für die Erkennung ihres spezifischen Antigens über den TCR einen Komplex aus fremdem Peptid-Antigen und Selbst-MHC-Molekül (siehe 2.2.1). Beim Menschen wird der MHC auch als HLA-(humanes Leukozyten Antigen, engl.: *human leukocyte antigen*) System bezeichnet, da die ersten Genprodukte des MHC auf Leukozyten identifiziert wurden [93]. Die Hauptfunktion der HLA-Moleküle ist es, das Immunsystem über die Präsenz von Pathogenen im Organismus in Kenntnis zu setzen [94]. Zudem sind sie verantwortlich für die Erkennung und Abstoßung von fremden Zellen oder Geweben im Rahmen von Transplantationen und wurden im Zuge der Untersuchung von Gewebeverträglichkeit entdeckt [95, 96].

2.2.2.1 Genetischer Aufbau

Der humane MHC-Locus besteht aus einer Vielzahl von Genen (Polygenie) und befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom sechs. Die klassischen MHC-Gene umfassen drei Loci der HLA-Moleküle der Klasse I (HLA-A/-B/-C) sowie drei Loci der Klasse II (HLA-DR/-DQ/-DP). Es existieren zudem für Klasse I sowie für Klasse II nicht-klassische Gene (HLA-E, -F, -G, HFE bzw. HLA-DM und -DO), sowie die Klasse I-ähnlichen Gene (*MICA*, *MICB*) [93]. Für die meisten Loci existieren zwei Allele (mütterlich und väterlich), zudem sind die Allele der HLA-Moleküle stark polymorph, d.h. es existieren für jeden Locus hunderte Allele, die sich zum Teil nur durch einzelne Nukleotid-Substitutionen (SNP, engl.: *single nucleotide polymorphism*) unterscheiden. Bisher sind über 500 Varianten des HLA-B Gens, mehr als 200 Varianten des HLA-A Gens, und über 100 Varianten des HLA-C Gens bekannt [97]. *HLA-B* wurde jüngst als das am stärksten polymorphe humane Gen bezeichnet [98].

2.2.2.2 Expression, Struktur und Funktion

Auf allen kernhaltigen, somatischen Zellen des Körpers sind HLA-Moleküle der Klasse I zu finden. Diese bestehen aus zwei Polypeptidketten, einer schweren α -Kette und einer leichten β_2 -Mikroglobulin (β_2M)-Kette, die sich in vier Domänen gliedern. Die β_2M -Kette wird dabei von einem separaten Gen auf Chromosom 15 codiert [94, 99]. Nur die α -Kette ist in Form eines klassischen integralen Typ I Membranproteins in der Zellmembran verankert. Die β_2M -Kette kommt als lösliches, assoziiertes Protein vor [100]. Die HLA-Moleküle der Klasse II sind nur auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC, engl.: *antigen presenting cell*) des Immunsystems, wie DCs, Makrophagen und B Lymphozyten, zu finden. Sie bestehen aus zwei nicht-kovalent assoziierten heterogenen Polypeptidketten, α und β , die beide integrale Membranproteine des Typ I darstellen [101]. Die zentrale Funktion der HLA-Moleküle liegt in der Präsentation von durch Prozessierung entstandener Antigene. Jedes HLA-Molekül ist in der Lage, eine bestimmte kurze Sequenz von Aminosäuren (AS) in Form eines Peptids in einer spezifischen Grube zu binden und zu präsentieren. Die HLA-Klasse I Moleküle präsentieren dabei vornehmlich endogene und zytoplasmatische Antigene. Dabei kann es sich um Bruchstücke defekter körpereigener Proteine oder virale und/oder Tumor-assoziierte Peptide handeln. Diese besitzen eine Länge von ca. acht bis zehn AS und werden in einer Grube, die von den Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ gebildet wird, auf der Moleküloberfläche präsentiert [100, 102, 103]. Die HLA-Klasse II Moleküle hingegen binden exogene und extrazelluläre Antigene. Dabei kann es sich z.B. um lösliche Proteinfragmente oder Bestandteile von Bakterien handeln. Sie werden in Form von 13-25 AS langen Peptiden in einer Bindungsfurche präsentiert, die von den Domänen $\alpha 1$ und $\beta 1$ gebildet wird. Diese ist prinzipiell strukturell homolog zur HLA-Klasse I Grube, weist jedoch an beiden Seiten der Bindungsfurche offene Enden auf, was die Bindung von längeren Peptiden ermöglicht [104].

HLA-Klasse I Moleküle präsentieren ihre prozessierten, gebundenen Antigene gegenüber $CD8^+$ T Lymphozyten, während $CD4^+$ T Lymphozyten den HLA-Klasse II-Peptid-Komplex erkennen.

2.2.3 Auslösen einer Immunantwort – Die immunologische Synapse

Die Mehrheit der naiven (= noch nicht mit Antigen in Kontakt gekommenen) T Zellen zirkulieren zwischen peripherem Blut und den sekundären lymphatischen Organen (SLO, engl.: *secondary lymphatic organs*) wie Lymphknoten, Milz, Tonsillen und Schleimhäuten. Dort ist die Wahrscheinlichkeit, auf Antigen-beladene APCs zu treffen und dadurch aktiviert zu werden, sehr hoch. Um fälschliche Immunantworten zu vermeiden, ist der Aktivierungsprozess von naiven T Lymphozyten stark reguliert und erfordert die konzertierte Aktion von zwei individuellen Signalen. Dazu gehören die Aktivierung des TCR durch die Erkennung des Komplexes aus körpereigenem MHC-Molekül und fremdem Peptid (1. Signal) sowie die gleichzei-

tige Bindung ko-stimulatorischer Moleküle (2. Signal). Erfolgt nur die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes ohne Ko-Stimulus, so wird die T Zelle entweder anerg (unreaktiv) oder geht in Apoptose. Werden jedoch kombiniert beide Signale übermittelt, erfolgt die Aktivierung der T Lymphozyten und somit die klonale Expansion und Differenzierung in Effektor- und Gedächtniszellen [90, 105]. Die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes erfolgt dabei über den Komplex aus TCR-CD3-Komplex und dem jeweiligen Ko-Rezeptor (CD8 bzw. CD4) auf den T Lymphozyten. Die Antigen-Bindung löst durch Aggregation des CD3-Komplexes intrazelluläre Signale aus, die durch Transduktion in den Nukleus zur Aktivierung proliferativer Gene führen [106]. Zu den wichtigsten ko-stimulatorischen Molekülen zählen z.B. die Mitglieder der B7-Familie, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), das Glykoprotein CD40 sowie die Adhäsionsmoleküle LFA-3 (CD58) und ICAM-1 (CD54). Diese Moleküle werden besonders auf aktivierten APC wie DCs exprimiert und als Antwort auf pro-inflammatorische Signale (Zytokine, Chemokine, etc.) vermehrt produziert. Die korrespondierenden Liganden (CD28, CD40L, CD2 und LFA-1) wiederum werden auf T Lymphozyten exprimiert (siehe Abbildung 4) [107-110].

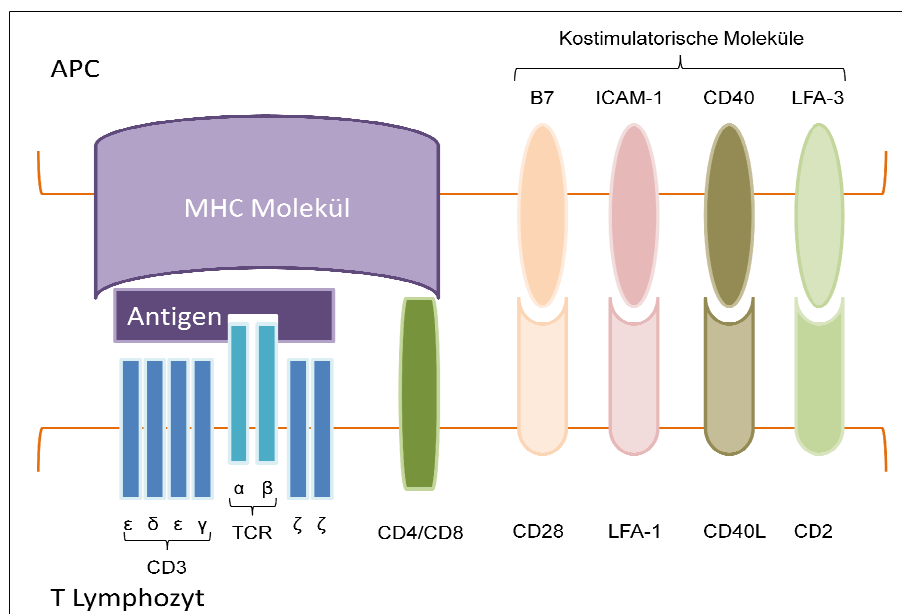


Abbildung 4: Die immunologische Synapse. Interaktionen zwischen APC und T Lymphozyt zur Aktivierung der T Zelle (verändert nach [105]).

Analog zu ko-stimulatorischen existieren zudem ko-inhibitorische Moleküle, wie CTLA-4 (CD152) oder PD-1. Deren Bindung an den jeweiligen Rezeptor B7-2 (CD86) bzw. PD-L1/PD-L2 (CD274/CD273) kann die Aktivierung der T Zelle unter gewissen Umständen verhindern und spielt eine wichtige Rolle für die Homöostase der T Lymphozyten [111, 112].

2.2.4 Differenzierung von T Lymphozyten in Effektor- und Gedächtniszellen

Im Verlauf einer typischen Immunantwort auf ein akutes Pathogen werden Antigen-spezifische T Lymphozyten aktiviert, proliferieren stark und expandieren. Als Resultat steht eine große Population an Effektor-T Zellen zur Verfügung, die nach der erfolgreichen Bekämpfung des Pathogens zu einem großen Teil wieder abstirbt. Allerdings entstehen dabei auch Zellen, die das immunologische Gedächtnis darstellen und noch lange nach der Infektion persistieren. Sie verbessern die sekundäre Immunantwort auf dasselbe Pathogen, indem sie eine schnellere, effektivere, und sensiblere (bezogen auf die Menge an benötigtem Antigen zum Auslösen der Antwort) Reaktion ermöglichen. Die Effektor-Zellen stellen somit eine unmittelbare Immunreaktion zur Verfügung, wohingegen die Gedächtniszellen eine langfristige Immunität des Organismus bewirken.

Effektor-T Zellen lassen sich anhand ihrer Oberflächenmoleküle in zwei Klassen einteilen: Die $CD4^+$ T Helferzellen (T_H) und die $CD8^+$ zytotoxischen T Zellen (CTL). Die Hauptfunktion der $CD4^+$ T_H Zellen liegt in der Produktion und Sezernierung von Zytokinen, und dadurch in der Regulierung weiterer Komponenten der zellulären Immunität. Nach Antigen-Aktivierung entwickeln sie sich von der T_{H0} Zelle entweder zur T_{H1} Zelle oder zur T_{H2} Zelle weiter. Morphologisch sind diese Subpopulationen nicht unterscheidbar, jedoch induzieren sie völlig unterschiedliche Folgereaktionen durch die jeweils sezernierten Zytokine. T_{H1} Zellen produzieren vornehmlich IL-2, das die Proliferation und Zytotoxizität von $CD8^+$ CTL stimuliert, und Interferon- γ (IFN γ), das Makrophagen aktiviert und die Zytotoxizität von NK Zellen einleitet. Somit induziert eine T_{H1} Antwort durch Aktivierung verschiedener zellulärer Komponenten des Immunsystems eine Zell-vermittelte Immunantwort. T_{H2} Zellen hingegen lösen eine Antikörper-vermittelte Immunantwort aus, indem sie durch die Freisetzung der Zytokine IL-4/-5/-9/-13 und GM-CSF die Antikörper-Produktion durch B Zellen stimulieren [92]. $CD8^+$ CTL üben direkte Toxizität auf APC aus. Nach Erkennung des spezifischen Antigen-MHC-Komplexes auf der Zielzelle erfolgt die Bindung der CTL an die Zelle und durch Degranulation die Insertion von Perforin-Molekülen in die Plasmamembran. Diese bilden Poren in der Zellmembran aus und lösen dadurch einen erhöhten Wasser- und Ioneninflux in die Zelle aus. In Folge kommt es durch das osmotische Anschwellen der Zelle zum Zelltod. Zusätzlich werden von der T Zelle Granzyme freigesetzt und durch die Perforine in die Zelle geleitet. Diese aktivieren intrazelluläre Caspasen und induzieren die Apoptose der Zielzelle. Desweiteren können CTL mit Hilfe des membranständigen Fas-Liganden an Fas-Rezeptoren („Todesrezeptoren“) der Zielzellen binden und so ebenfalls die Apoptose einleiten [92, 105]. CTL sezernieren analog zu T_H Zellen Zytokine, darunter Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), Lymphotoxin und IFN γ [106].

Gedächtnis T Zellen können sowohl aus CD4⁺ als auch aus CD8⁺ Effektor-Zellen durch lineare Differenzierung hervorgehen. Ihre Persistenz im Organismus wird durch ein verlängertes Überleben sowie eine basale homöostatische Proliferation gesichert. Absterbende Zellen werden somit kontinuierlich durch neue Zellen mit derselben Antigen-Spezifität ersetzt. Die Aufrechterhaltung dieser Vorgänge ist stark Zytokin-abhängig: CD4⁺ Gedächtniszellen benötigen IL-7 und CD8⁺ Gedächtniszellen IL-7 sowie IL-15 [113, 114]. Es werden zwei unterschiedliche Zell-Populationen unterschieden, zum einen die Effektor-Gedächtnis (engl.: *effector memory*, T_{EM}) T Zellen und zum anderen die zentralen Gedächtnis (*central memory*, T_{CM}) T Zellen. T_{EM} Zellen migrieren zum Ort der Infektion und üben dort unmittelbare Effektor-Funktionen aus, wohingegen T_{CM} Zellen in SLO wandern und selbst wenig oder keine zytolytische Aktivität ausüben. Als Antwort auf bekannte Antigene proliferieren sie jedoch stark und differenzieren zu Effektor-T Zellen aus [115]. Humane T_{CM} Zellen exprimieren im Ruhezustand konstitutiv den Gedächtnis-Marker CD45RO. Zusätzlich exprimieren sie das Selektin CD62L (siehe Abschnitt 2.3.1.1) und den Chemokin-Rezeptor CCR7 (siehe Abschnitt 2.3.1.4), womit sie phänotypisch naiven T Zellen ähneln und ebenso wie diese in SLO einwandern können. Jedoch reagieren sie weitaus sensitiver auf Antigen-Stimulation, sind weniger abhängig von Ko-Stimulation und durch die Hochregulierung von CD40L empfänglicher für die Signale von APC. Nach der Ligation des TCR produzieren T_{CM} Zellen zunächst hauptsächlich IL-2, durch Proliferation und Differenzierung in Effektor-T Zellen werden im Anschluss jedoch große Mengen an IFN γ oder IL-4 sezerniert. Humane T_{EM} Zellen exprimieren im Ruhezustand ebenfalls CD45RO, aber kein CCR7, und sind heterogen in ihrer CD62L-Expression. Um die Einwanderung in entzündete Gewebe zu ermöglichen, exprimieren sie zudem ein charakteristisches Repertoire an Chemokin-Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen (siehe Abschnitt 2.3). Im Vergleich zu naiven T Zellen besitzen sie hohe Mengen an Perforin und sind bereits innerhalb von wenigen Stunden nach Antigen-Stimulation in der Lage, Effektor-Zytokine (IFN γ , IL-4, IL-5) zu sezernieren [116].

2.3 Migration und *Homing* von T Lymphozyten

T Lymphozyten migrieren permanent, sowohl in einer konstitutiven als auch in einer induzierten Form, in und aus dem Blutstrom. Die konstitutive Migration umfasst das Auswandern neu gebildeter, differenzierter Zellen aus dem Knochenmark ins Blut sowie die Migration von Zellen aus dem Blut ins Gewebe und durch das lymphatische System. Die durch Stimuli induzierte transendotheliale Migration (TEM) wiederum findet hauptsächlich als Antwort auf inflammatorische Signale oder Chemokine in postkapillaren Venolen und Arterien statt. Die Rekrutierung an den Ort der Entzündung erfordert Zell-Zell-Interaktionen, vermittelt durch membranständige Adhäsionsmoleküle auf den Immunzellen sowie den Endothelzellen der Blutgefäße im infizierten Gewebe. Die reversible Interaktion der Moleküle führt zu intrazellu-

lären Signalkaskaden, die durch Reorganisation des Zytoskeletts eine gerichtete Bewegung der Zelle erlauben, die Expression weiterer Adhäsionsmoleküle und -Rezeptoren induzieren oder zur Zytokin-Produktion führen. Das Spektrum an exprimierten Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche einer Zelle entscheidet über das Interaktionsvermögen der Zelle mit der Umgebung. Die Liganden-Spezifität der einzelnen Moleküle variiert stark, ebenso wie die regionale Verteilung der Liganden im Organismus. Somit bestimmen die Gewebe-spezifischen Expressionsmuster auf Endothelzellen ebenso wie die spezifische Verteilung von Adhäsionsmolekülen auf Lymphozyten über deren Eintritt in verschiedene Gewebe [117, 118].

2.3.1 Adhäsionsmoleküle

Die Extravasation von T Lymphozyten aus dem peripheren Blut ins Gewebe erfordert die sequentielle, koordinierte Interaktion einer Vielzahl von Adhäsionsmolekülen mit ihren entsprechenden Liganden. Diese kommen entweder auf der Oberfläche anderer Zellen oder als Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) vor. Die Adhäsionsmoleküle können dabei in drei Hauptfamilien eingeteilt werden: (1) Selektine (2) Integrine (3) Mitglieder der Ig Superfamilie.

2.3.1.1 Selektine

Die Familie der Selektine ist hochkonserviert und umfasst drei Mitglieder; E-/P- und L-Selektin, die auf unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden. Selektine gehören zur Gruppe der C-Typ Lektine und binden an Glykoproteine und -lipide, die Sialyl Lewis^x (sLeX)-Tetrasaccharide besitzen. Die Bindung erfolgt dabei Kalzium-abhängig. Sie gehören zu den Typ I Transmembran-Proteinen und können über ihre C-terminale zytoplasmatische Domäne Signale in den Zellkern leiten.

P-Selektin wird in Endothelzellen und Plättchen in sekretorischen Granula (Weibel-Palade-Körperchen/ α -Granula) gespeichert. Nach Aktivierung der Zellen, z.B. durch Histamin oder Thrombin, erfolgt eine rasche Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran und das enthaltene P-Selektin wird auf die Zelloberfläche relokalisiert. E-Selektin wird konstitutiv nur von Endothelzellen der Haut und im Knochenmark exprimiert. In anderen Geweben, dort meist in postkapillaren Venolen, erfolgt die transiente Expression erst nach Stimulation der Endothelzellen mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder IL1- β . L-Selektin hingegen wird konstitutiv auf allen Leukozyten exprimiert. Die Oberflächenkonzentration wird dabei durch die modulierende Wirkung von Metalloproteinasen bestimmt, die zur enzymatischen Abtrennung der extrazellulären Domäne (engl.: *shedding*) führen. Der Hauptligand für P- und L-Selektin ist das Sialomucin P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), das auf vielen Leukozyten sowie Venolen mit hohem Endothel (HEV, engl.: *high endothelial venules*) in Peyer's Patches und Lymphknoten exprimiert wird. L-Selektin bindet zudem an andere endotheliale Mucine wie CD34, Podocalyxin oder *glycosylated cell adhesion molecule-1*

(GlyCAM-1) [119]. E-Selektin bindet ebenfalls an PSGL-1, aber auch an weitere sLeX-Glykoproteine. Auf Leukozyten-Seite zählen dazu vor allem CD44 und E-Selektin Ligand-1 (ESL-1) [120, 121].

2.3.1.2 Integrine

Die Familie der Integrine umfasst eine Gruppe von Typ I Transmembran-Glykoproteinen mit großer, extrazellulärer Domäne, einer einzelnen Transmembran-Domäne sowie einem kurzen, zytoplasmatischen Teil. Die nicht-kovalent assoziierten heterodimeren Adhäsionsmoleküle bestehen aus je einer α - und einer β -Untereinheit. In Vertebraten sind heute 18 α - und acht β -Untereinheiten bekannt, die zu einer Kombination von 24 $\alpha\beta$ -Integrinen führen. Zellen des Immunsystems exprimieren mindestens zehn Mitglieder der β_2 -, β_7 - und β_1 -Integrine, wobei β_2 - und β_7 -Integrine exklusiv auf Leukozyten vorkommen [122]. Integrine ermöglichen die Integration von extrazellulären und intrazellulären Signalen durch Bindung von Liganden außerhalb der Zelle und gleichzeitiger Bindung an Komponenten des Zytoskeletts und verschiedene Signalmoleküle innerhalb der Zelle. Dadurch sind sie an vielen Funktionen des Immunsystems direkt beteiligt. Dazu zählen die Adhäsion und Migration von Leukozyten, die Ausbildung der immunologischen Synapse, der Prozess der Phagozytose sowie Signalweiterleitung während der Ko-Stimulation, und auch die Zellpolarisation [123, 124]. Durch die extrazelluläre Bindung von Chemokinen und Zytokinen an Oberflächenrezeptoren kann die Adhäsionsstärke der Integrine dynamisch reguliert werden, indem intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden, die die Konformation der Dimere transient ändern („*inside-out signaling*“). Physiologisch können dabei drei Konformationen unterschieden werden, eine geschlossene, niedrig-affine, eine geöffnete, niedrig-affine und eine geöffnete, hoch-affine Form [121, 125]. Zusätzlich führt auch die Bindung der Integrine selbst an entsprechende Liganden (Kollagen, Fibronectin, Zellmembran-Proteine, etc.) zu intrazellulären Signalweiterleitungen („*outside-in signaling*“) [126]. Die Liganden-Bindung erfordert die Präsenz divalenter Kationen, die in Abhängigkeit von Art und Konzentration die Adhäsion verstärken oder abschwächen können [127].

Für die Adhäsion und Transmigration von T Lymphozyten spielen die Integrine VLA-4 (*very late antigen-4*, $\alpha_4\beta_1$ -Integrin, CD49d/CD29) und LPAM-1 (*lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule-1*, $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, CD49d/ β_7) der Integrin- α_4 -Unterfamilie sowie LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*, $\alpha_L\beta_2$ -Integrin, CD11a/CD18) der Integrin- β_2 -Unterfamilie eine tragende Rolle [125]. Ihre Liganden, die Mitglieder der Ig Superfamilie, werden im folgenden Abschnitt besprochen.

2.3.1.3 Immunglobulin Superfamilie

Die Ig Superfamilie (Sf) umfasst mehrere Unterfamilien von Proteinen, die alle Typ I Transmembran-Glykoproteine darstellen und extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen besitzen. Sie

stellen nicht nur Liganden für die Familie der Integrine dar, sondern lösen durch Interaktion mit ihrem jeweiligen Rezeptor ebenfalls intrazelluläre Signale aus, die z.B. die Permeabilität der Zelle beeinflussen und somit die TEM verstärken können [128]. Im Folgenden werden nur die für das Verständnis dieser Arbeit wichtigen Moleküle näher erläutert.

Die *inter-cellular adhesion molecule-* (ICAM-)Unterfamilie besitzt fünf Mitglieder (ICAM-1 bis ICAM-5), deren Sequenzhomologie untereinander zwischen 30 und 50 % beträgt. Strukturell bestehen sie aus zwei bis neun extrazellulären Ig-Sf-Domänen, einer hydrophoben Transmembran-Domäne sowie einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. ICAM-1 (CD54) wird konstitutiv nur auf venolären Endothelzellen und einigen Leukozyten exprimiert. Durch den Einfluss von inflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α) kann es jedoch von fast allen Zelltypen exprimiert werden. ICAM-1 stellt einen der Haupt-Liganden für das α_4 -Integrin LFA-1 dar. ICAM-2 besitzt im Gegensatz zu ICAM-1 nur zwei extrazelluläre Ig-Domänen und wird konstitutiv auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert. Inflammatorische Zytokine führen hier keine verstärkte Expression herbei. Es kann ebenfalls an das α_4 -Integrin LFA-1 binden, spielt jedoch im Rahmen der Leukozyten TEM nur eine untergeordnete Rolle [129, 130]. Die übrigen Mitglieder, ICAM-3/-4 und -5, werden im Folgenden nicht näher erläutert.

Das *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1, CD106) besitzt eine ähnliche Struktur und Funktion wie ICAM-1. Es besteht aus sechs bis sieben extrazellulären Ig-Domänen und stellt den Haupt-Liganden für das β_1 -Integrin VLA-4 dar. Im Gegensatz zu ICAM-1 wird es nicht auf ruhenden Endothelzellen exprimiert, sondern muss durch inflammatorische Zytokine induziert werden [130].

Das *mucosal adressin cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1) ist ein relativ neues Mitglied der Ig-Sf und besitzt eine Multi-Domänen-Struktur. Es wird vornehmlich von mukösen Endothelzellen exprimiert, speziell in Peyer's Patches und mesenterialen Lymphknoten, und dient als Rezeptor sowohl für L-Selektin als auch das α_4 -Integrin LPAM-1. Es stellt einen wichtigen Rezeptor für die Migration von Lymphozyten in die Schleimhäute dar [131].

2.3.1.4 Chemokine und Chemokin-Rezeptoren

Die Migration von Leukozyten über Endothelzellen wird häufig durch die Präsenz von chemotaktischen Zytokinen (= Chemokine) ausgelöst. Bei den Chemokinen handelt es sich um eine große Gruppe kleiner (8-14 kDa), strukturell verwandter löslicher Moleküle, die an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR, engl.: *G protein coupled receptor*) binden. Sie werden traditionell auf der Grundlage der Verteilung ihrer N-terminalen Cystein-Reste in vier Familien (C, CC, CXC, und CX3C) eingeteilt. Bis heute sind etwa 50 Chemokine und ca. 20 Rezeptoren bekannt. Das bekannteste, an der Migration von Leukozyten beteiligte Chemokin ist *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1 oder CXCL12), das in fast allen humanen Geweben exprimiert wird und an den Rezeptor CXCR4 bindet. Leukozyten können sowohl endothelial

auf Proteoglykanen immobilisierte als auch lösliche Chemokine binden. Die Bindung an GPCRs führt über zytoplasmatisch lokalisierte G Proteine zur Aktivierung von Integrinen, und damit zu intrazellulären Signalkaskaden sowie zur Reorganisation des Zytoskeletts, die zusammen die Adhäsion und Motilität der Zelle steuern. Die gleichzeitige Polarisation der Zelle ermöglicht zudem eine gerichtete Bewegung [128, 132].

Die Migration naiver T Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe erfolgt u.a. durch die Bindung der homöostatischen Chemokine CCL19 oder CCL21 an ihren Rezeptor, CCR7. Neben diesem besitzen naive T Zellen nur zwei weitere Chemokin-Rezeptoren, CCR9 und CXCR4, von denen jedoch nur letzterer eine Rolle für die TEM spielt [133, 134]. Effektor- und Effektor-Gedächtnis T Lymphozyten migrieren hingegen bevorzugt über postkapillare Venolen in nicht-lymphoide Gewebe und exprimieren kein CCR7, dafür jedoch je nach Gewebe-Tropismus verschiedene Kombinationen weiterer Chemokin-Rezeptoren (Haut: CCR4 und/oder CCR10; Darm: CCR9/CCR6; ZNS: CXCR3) [118].

2.3.2 Die Leukozyten-Adhäsionskaskade

Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut ins Gewebe läuft in sequentiellen Schritten ab (siehe Abbildung 5). Der erste Schritt umfasst dabei das Einfangen (engl.: *tethering*) von frei im Blutfluss schwimmenden Zellen durch die Interaktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen der Blutgefäße sowie Leukozyten. Anschließend gehen die Leukozyten in eine rollende Bewegung entlang der Gefäßwand über (engl.: *rolling*). Dabei werden Signale von Adhäsionsmolekülen und Chemokin-Rezeptoren in den Zellkern übertragen, die langsameres Rollen und schließlich das Abstoppen der Zelle auslösen. Sowohl *tethering* als auch *rolling* werden vornehmlich durch die Familie der Selektine vermittelt (siehe Abschnitt 2.3.1.1), obwohl auch Integrine *rolling* erlauben [135].

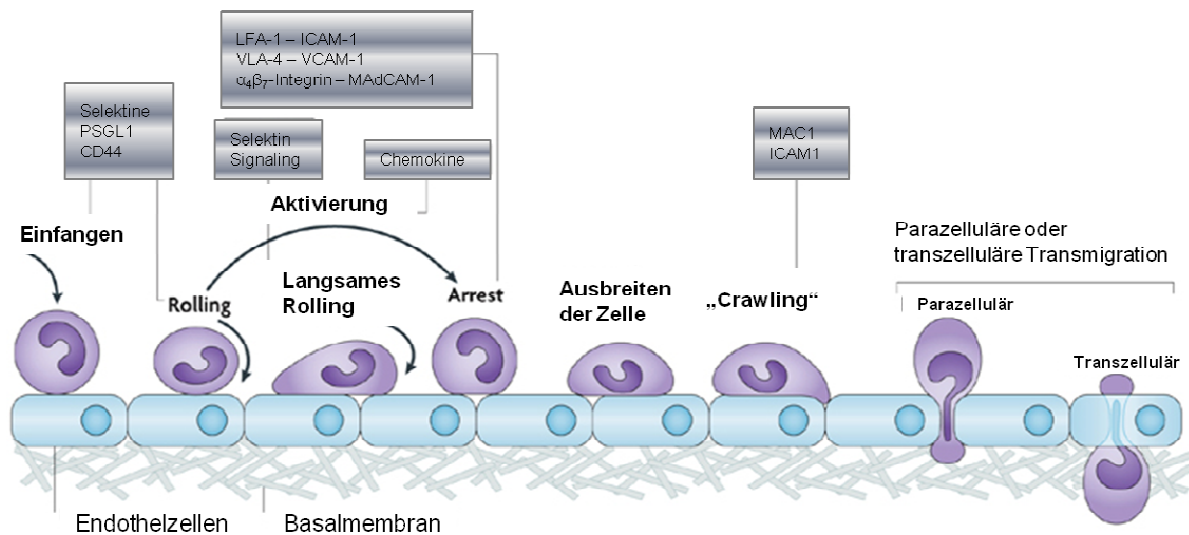


Abbildung 5: Die Leukozyten-Adhäsionskaskade (verändert nach [135])

Der Bindungsvorgang erfolgt dabei unter dynamischen Bedingungen: der umgebende Blutfluss übt einen konstanten Scherdruck auf die Leukozyten aus, die nun mit ca. 100-1000-fach niedrigerer Geschwindigkeit als das restliche Blut an der Gefäßwand entlang rollen. Die Selektin-vermittelten Interaktionen müssen daher bestimmte Voraussetzungen erfüllen: (1) die Bindungsbildung an der Vorderkante der rollenden Zelle muss sehr schnell erfolgen, (2) sie muss eine hohe Zugfestigkeit gewährleisten und (3) die Dissoziation muss, um *rolling* zu ermöglichen, ebenfalls schnell erfolgen [121]. Dies spiegelt sich in den außergewöhnlich hohen Assoziations- und Dissoziationskonstanten (k_{on} und k_{off}) wider [135]. Studien ergaben, dass mit zunehmendem Scherdruck die Lebensdauer der Bindung zunächst zu- und ab einem kritischen Wert wieder abnimmt [136]. In Abwesenheit von Scherdruck findet zudem keine L- oder P-Selektin vermittelte Adhäsion statt [137]. Während des Rollens kommen die Leukozyten in engen physischen Kontakt mit den Endothelzellen der Gefäßwand, wodurch Chemokine an ihre korrespondierenden GPCRs auf den Leukozyten binden können. Sie vermitteln nach Liganden-Bindung intrazellulär die rapide Aktivierung und Konformationsänderung der sonst nicht-adhäsiven, niedrig-affinen Integrine [138]. Zusätzlich kann die Aktivierung der Integrine auf Leukozyten-Seite auch durch die Interaktion von L-Selektin oder PSGL-1 erfolgen. Die erhöhte Affinität und Avidität erlaubt nun die feste Bindung der Integrine an ihre korrespondierenden Ig Sf-Liganden (ICAMs, VCAM-1, MAdCAM) und somit an die Gefäßwand. Dies ist die Voraussetzung für die Einleitung des Transmigrationsprozesses. Dabei müssen Lymphozyten drei distinkte Barrieren überwinden: Die Endothelzellen, die Basalmembran der Endothelzellen sowie die Perizyten. Die Einleitung der TEM erfolgt durch laterale Migration der Lymphozyten, sog. Krabbeln (engl. *crawling*), auf der luminalen Oberfläche der Endothelzellen, ohne Ablösung durch den herrschenden

Scherdruck. Dieser Vorgang erlaubt es den Lymphozyten, permissive Stellen für die Diapedese zu finden [139]. Sobald dies der Fall ist, hält die Zelle an und beginnt die Extravasation. Dies kann auf zwei Wegen erfolgen, trans- oder parazellulär. Im Fall der parazellulären Route erfolgt die Migration durch gelöste endotheliale Zell-Zell-Kontakte (*Tight junctions*, *adherence junctions*, *gap junctions*). Die dafür benötigten Veränderungen des Zytoskeletts können durch die Ligations von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. ICAM-1, ausgelöst werden. Der zytoplasmatische Teil von ICAM-1 induziert dabei die Aktivierung der kleinen GTPase Rho und weiterer an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligter Proteine [140]. Die transzelluläre Migration, bei der die Endothelzelle durchwandert wird, wurde bisher hauptsächlich bei der TEM in das Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke sowie bei vielen *in vitro* Modellen beobachtet. Sie wird nur von einer Minderheit emigrierender Zellen genutzt und soll hier nicht weiter erläutert werden [135].

2.4 Adoptive Immuntherapie zur Behandlung von AML

2.4.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation als Immuntherapie

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation stellt in der Behandlung hämatologischer Neoplasien sowie bei einer Reihe nicht-maligner Erkrankungen des Knochenmarks und Immunsystems den Therapieansatz mit höchstem kurativen Potenzial dar. Ursprünglich wurde sie als Behandlungsmaßnahme bei Strahlenschäden und daraus resultierender Knochenmarks-Toxizität eingesetzt. Seit den späten 1950er Jahren jedoch nimmt ihr Stellenwert in der Behandlung maligner, nicht-maligner oder genetisch bedingter hämatopoetischer Erkrankungen immer mehr zu [141, 142]. Dazu zählt auch die Behandlung akuter Leukämien. Eine AML-Erkrankung ist derzeit sogar die häufigste Indikation für eine allogene HSCT. Je nach Prognose des Patienten, dem Ansprechverhalten auf die Induktionstherapie und Remissionsstatus wird eine Entscheidung für oder gegen eine allogene HSCT als Therapie getroffen. Für Patienten in der prognostisch günstigen Risikogruppe (siehe Abschnitt 2.1.5) ist in der ersten Vollremission meist keine Indikation gegeben. Doch bereits bei Standardrisiko-Patienten und spezielle bei Hochrisiko-Patienten liegt diese vor. Bei Auftreten eines Rezidivs sowie folgender Vollremissionen besteht für alle Patienten die Indikation zur allogenen HSCT [143].

Der Fokus der HSCT als Behandlung hämatologischer Erkrankungen lag initial auf der anti-leukämischen Wirksamkeit der Konditionierungstherapie. Diese bestand aus der Verabreichung myeloablativer Dosen von Chemo- und Strahlentherapie, die für hämatopoetische Zellen letal waren, von nicht-hämatopoetischem Gewebe jedoch toleriert werden konnten. Durch die harsche Konditionierung wurden nicht nur die malignen hämatopoetischen Zellen des Empfängers stark geschädigt, sondern gleichzeitig dessen Immunität zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen minimiert und Raum für das Transplantat im Knochenmark geschaffen. Die anschließende Transplantation gesunder Spender-HSC (auch genannt *graft*, deutsch: Transplantat) diente dabei in erster Linie der Bekämpfung hoher Mortalitätsraten bedingt durch die induzierte Knochenmarks-Toxizität. Als geeignete Stammzell-Quelle stellten augenscheinlich autologe HSC oder HSC eines syngenen Spenders die optimale Wahl dar, da diese nicht zu adversen immunologischen Effekten zwischen Spender und Empfänger führten. Jedoch wiesen Patienten nach autologer HSCT ein stark erhöhtes Rezidiv-Risiko der hämatologischen Grunderkrankung auf, das gleichzeitig die häufigste Todesursache nach erfolgter Transplantation darstellte [144, 145]. Erfolgte die Transplantation hingegen unter Einsatz von HLA-identen allogenen Spender-Stammzellen, war eine verminderte Rezidiv-Rate zu beobachten. Diese beruhte vorwiegend auf den im Transplantat enthaltenen Spender-T Lymphozyten und den durch sie induzierten immunologischen Effekten. In jüngster Zeit verschiebt sich der Fokus der HSCT mehr und mehr auf den Nutzen dieser potenten

immunologischen Effekte und deren Optimierung im Rahmen der Transplantation. Gleichzeitig sorgt die Einführung schonenderer Konditionierungsverfahren wie der nicht-myeloablativen, Dosis-reduzierten Konditionierung (RIC, engl.: *reduced intensity conditioning*), für eine niedrigere Behandlungs-assoziierte Toxizität bei gleichbleibendem Transplantations-Erfolg der Spender-HSC [141]. Dies macht die HSCT auch für ältere Patienten und Patienten mit Vor-/Begleiterkrankungen zugänglich [146, 147]. Die Vorteile der HSCT bleiben bei besserer Verträglichkeit der Behandlung erhalten, und die Gesamt-Überlebensrate scheint vergleichbar oder sogar erhöht gegenüber der konventionellen myeloablativen Therapie zu sein [148-150]. Die zentralen immunologischen Effekte auf Basis der im Transplantat enthaltenen Spender-Lymphozyten stehen im Vordergrund der Behandlung und werden im Folgenden näher erläutert [147, 151-153].

2.4.1.1 Graft-versus-Host Erkrankung und Graft-versus-Leukämie Effekt

Bei der HSCT werden zusätzlich zu den hämatopoetischen Stammzellen auch Spender-Lymphozyten (B Zellen, T Zellen, NK Zellen) in den Empfänger übertragen. Da Spender und Empfänger im Fall der allogenen Transplantation nicht genetisch identisch sind, finden Immunreaktionen, vornehmlich in Richtung von Spender zu Empfänger, statt. Diese beruhen auf Unterschieden in den für die Auslösung einer adaptiven Immunantwort zentralen Molekülen, den HLA-Molekülen und den durch sie präsentierten Peptiden (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Moleküle des HLA-Komplexes sind polygen und zudem hochgradig polymorph (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Für die Auswahl eines geeigneten allogenen Spenders spielen die Identitäten der HLA-Klasse I Moleküle, HLA-A/-B/-C sowie der HLA-Klasse II Moleküle, HLA-DQB1 und -DRB1 eine tragende Rolle. Unter Geschwister-Spendern liegt die Wahrscheinlichkeit der HLA-Identität bei 25%, bei Fremd-Spendern ist sie weitaus geringer. Findet eine Transplantation über die HLA-Barriere statt, so erkennen Spender-T Lymphozyten die polymorphen Bereiche der HLA-Moleküle (auch genannt *major* Histokompatibilitäts-Antigene) und lösen eine Immunantwort aus. Je mehr HLA-Loci nicht übereinstimmen, umso häufiger treten nach der Transplantation schwere, adverse Immunreaktionen auf. Doch auch bei Vorliegen von HLA-Identität zwischen Spender und Empfänger kommt es in ca. 40-80% der Fälle noch zu ungünstigen Immunreaktionen, da viele endogene Proteine, die durch HLA-Moleküle präsentiert werden, ebenfalls Polymorphismen aufweisen [154]. Diese *minor* Histokompatibilitäts-Antigene (mHA_g) führen analog, wenn auch in abgeschwächter Form, zu T Zell-Reaktionen [155]. Je nach Spezifität der T Lymphozyten und Verbreitung der jeweiligen Antigene sind zwei verschiedene immunologische Effekte zu beobachten (siehe Abbildung 6).

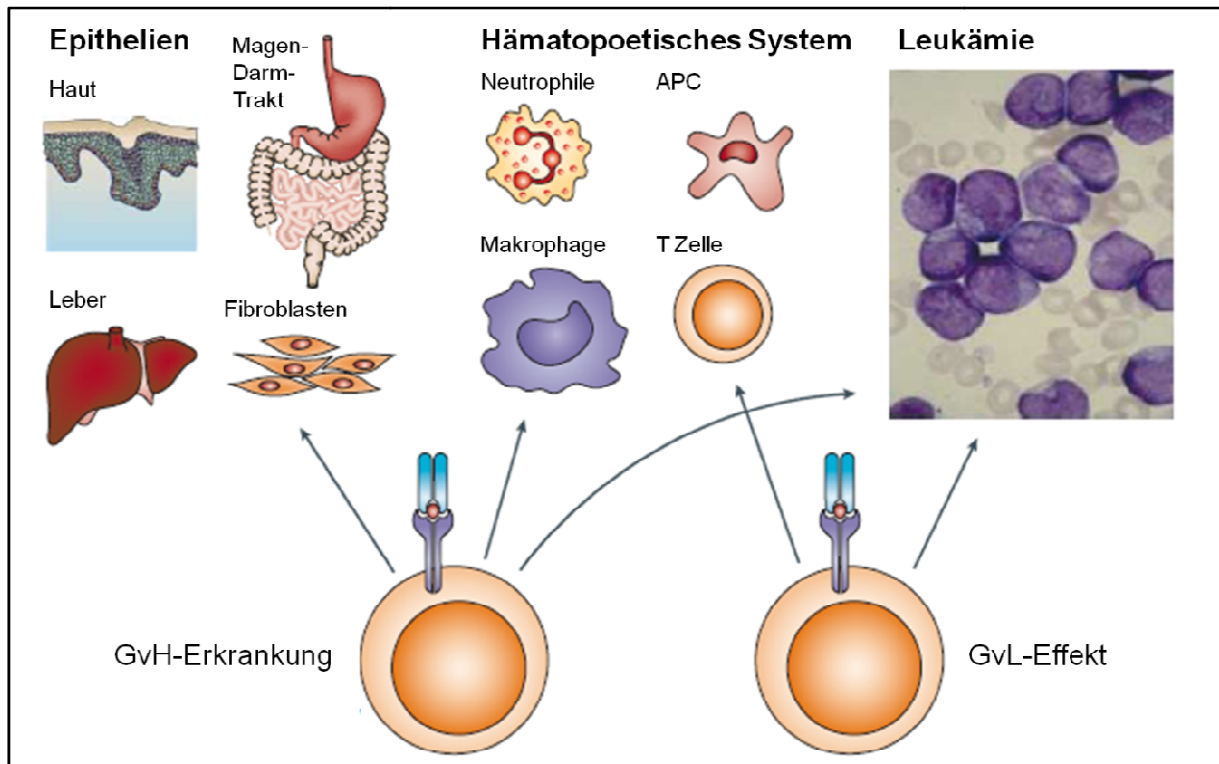


Abbildung 6: Immunologische Effekte im Rahmen der allogenen HSCT: GvH-Erkrankung und GvL-Effekt. Spender T Zellen, die spezifisch sowohl auf hämatopoetischen als auch epithelialen Zellen exprimierte mHAGs erkennen sind vermutlich der Auslöser der GvH-Erkrankung. Gleichzeitig könnten diese T Zellen jedoch auch einen GvL-Effekt ermitteln, sofern die erkannten mHAGs auch auf leukämischen Zellen exprimiert werden. Spender T Zellen, die spezifisch nur auf hämatopoetischen Zellen exprimierte mHAGs erkennen, können einen GvL-Effekt ohne gleichzeitige Entstehung einer GvHD auslösen (verändert nach [156]).

Zum einen kann die unerwünschte Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (GvHD, engl.: *graft-versus-host disease*) auftreten, bei der Spender-T Zellen die Haut, die Schleimhäute des Magen-Darm-Trakts sowie Leber und Lunge des Empfängers angreifen [157]. Die verantwortlichen allo-reaktiven T Lymphozyten besitzen dabei vorwiegend Spezifitäten für ubiquitär vorkommende mHAGs, die nicht exklusiv von hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Die akute GvHD, deren Entwicklung innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation einsetzt, stellt die Hauptursache für transplantationsassoziierte Mortalität und Morbidität dar [2]. Zum anderen können Spender-T Zellen aber auch den erwünschten Transplantat-gegen-Leukämie (GvL, engl.: *graft-versus-leukemia*)-Effekt vermitteln, der zur Eradikation von Tumorzellen im Empfänger beiträgt [156]. Der GvL-Effekt wird dabei analog zur GvH-Erkrankung durch Polymorphismen in mHAGs ausgelöst, diese werden jedoch spezifisch von hämatopoetischen Zellen exprimiert. GvHD-induzierende Spender-T Zellen können zum GvL-Effekt beitragen, wenn sie mHAGs erkennen, die sowohl auf hämatopoetischen Zellen als auch ubiquitär vorkommen. Um die gleichzeitige Induktion einer GvH-Erkrankung zu verhindern, müssen T Zellen exklusiv auf hämatopoetischen Zellen exprimierte mHAGs erkennen. In seltenen Fällen können auch residuelle Empfänger-Lymphozyten die im Transplantat enthaltenen Zellen angreifen und das Transplantat abstoßen.

Bereits in den späten 1950er Jahren konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass der Transfer von allogenen HSC im Vergleich zum syngenem Transfer zur Eradikation residueller Leukämie-Zellen führt [158]. Diese Effekte konnten auch im Menschen nachgewiesen werden: Sowohl die syngene Knochenmarks-Transplantation als auch die Depletion von Spender T Lymphozyten aus einem allogenen Transplantat führen zu erhöhten Rezidivraten [151, 159-162]. Die Infusion von Spender-Lymphozyten (DLI, engl.: *Spender lymphocyte infusion*) in CML-Patienten mit Rezidiv nach allogener HSCT hingegen führte zur stark verbesserten Remissionsraten, bei Patienten mit akuten Leukämien war der Erfolg jedoch stark limitiert [163]. Der GvL-Effekt und das Auftreten von GvHD sind somit eng miteinander verwoben. Die komplette Entfernung von T Zellen aus einem allogenen Transplantat verringert zwar das GvHD-Risiko, gleichzeitig sind aber auch die Abstoßung des Transplantats, das vermehrte Auftreten von Infektionen bedingt durch das Fehlen immunkompetenter Lymphozyten und das Auftreten eines Rezidivs durch den fehlenden GvL-Effekt wahrscheinlicher [164-166]. Eine Möglichkeit zur Separation der beiden Prozesse besteht in der initialen Depletion der CD8⁺ Spender-T Lymphozyten (z.B. durch Antikörper) vor der allogenen HSCT, und der adoptiven Re-Infusion nach dem Anwachsen des Transplantats. Die temporäre Separation von Stammzell-Transplantation und DLI verringert das Risiko einer GvHD deutlich und erlaubt dennoch die Ausübung des GvL-Effekts [167-170]. Diese Tatsache beruht vorwiegend auf der durch das Anwachsen des Transplantats ausgelösten Rekonstitution der Hämatopoese durch Spenderzellen. Mit dem Wechsel von Empfänger- zu Spender-Hämatopoese geht die Induktion von Transplantations-bedingter Toleranz einher, die u.a. durch den kompletten Austausch von Empfänger-DCs durch Spender-DCs oder die Sezernierung von Typ 2-Zytokinen (IL-4, IL-10) erfolgt [171, 172]. Eine weitere Möglichkeit stellt der adoptive Transfer *in vitro* selektionierter und expandierter AML-reaktiver Spender-CTL dar.

2.4.1 Adoptiver Transfer von AML-reaktiven CTL als Immuntherapie

Die Fähigkeiten des Immunsystems, anhand von Tumor-Antigenen Tumorzellen zu erkennen und zu attackieren, sind lange bekannt [173]. Somit stellt die gerichtete Manipulation einzelner Komponenten des Immunsystems eine zusätzliche attraktive Strategie zur Bekämpfung maligner Erkrankungen dar. Der Einsatz monoklonaler Antikörper für verschiedenste Erkrankungen und Therapieformen zählt heute zu den klinischen Standardverfahren [174]. Die Implementierung zellulärer Immuntherapien hingegen, die eine Isolation und Expansion von Antigen-spezifischen Lymphozyten *in vitro* voraussetzen, verläuft aufgrund der hohen Komplexität und des benötigten Zusammenspiels vieler Faktoren weitaus langsamer. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass *ex vivo* expandierte spezifische Spender-CTL in der Lage sind, virale Infektionen und Epstein-Barr Virus (EBV)-assoziierte Lymphome zu bekämpfen [175-177]. Auch der Einsatz von unmanipulierten Spender-Lymphozyten Infusionen

bei AML-Rezidiven nach allogener HSCT zeugt vom immuntherapeutischen Potential der transferierten Zellen [178]. Der klinische Nutzen durch den Spender-Lymphozyten vermittelten GvL-Effekt ist hier jedoch schwächer als bei CML-Patienten und bedarf weiterer Optimierung [179]. Ziel einer adoptiven Immuntherapie für AML-Patienten nach allogener HSCT ist es, GvL- und GvHD-Effekt zu separieren. Dazu müssen T Zellen generiert bzw. selektioniert werden, deren Spezifität gegen exklusiv auf leukämischen/hämatopoetischen und nicht auf gesunden/nicht-hämatopoetischen Empfänger-Zellen vorkommende Antigene gerichtet ist. Andernfalls besteht aufgrund des dualen Effektor-Mechanismus allogener Spender T Lymphozyten weiterhin das Risiko der unerwünschten Entstehung einer GvHD. Als potentielle Antigene kommen nicht-polymorphe Leukämie-assoziierte Antigen (LAAs, z.B. Wilm's Tumor 1 Protein (WT1), Proteinase 3, Survivin oder CD45) sowie exklusiv auf hämatopoetischen Zellen des Empfängers exprimierte mHAg in Frage [180]. Werden diese durch Spender-Lymphozyten als fremd erkannt, so erfolgt im Optimal-Fall eine Eradikation der hämatopoetischen Zellen des Empfängers ohne Induktion einer GvHD unter Beibehaltung der Spender-Hämatopoese. Bis heute ist eine Vielzahl an mHAg identifiziert, von denen jedoch nur wenige exklusiv auf die Hämatopoese beschränkt sind [181]. Dazu zählen unter anderem HA-1, HA-2, HB-1 und BCL2A1 [182]. Weiterhin konnten Antigene gefunden werden, die sowohl auf leukämischen Blasten als auch auf deren Vorläuferzellen exprimiert werden und somit als Ziel-Antigene für die Generierung spezifischer CTL in Frage kommen. In einigen Fällen konnte zudem bereits gezeigt werden, dass mHAg-spezifische T Zell-Klone in der Lage sind, das Wachstum von leukämischen Kolonien *in vitro* sowie das Anwachsen leukämischer Vorläuferzellen in NOD/scid-Mäusen *in vivo* zu inhibieren [183, 184]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in NOD/scid-IL2Ry^{Null}-Mäusen durch die Ko-Inkubation von AML-Blasten und AML-spezifischen CD8⁺ CTL erzielt werden [185].

In vielen Patienten werden nach der allogenen HSCT vermehrt LAA-spezifische Spender-T Lymphozyten im Empfänger gefunden. Die Isolation und *in vitro* Expansion dieser Zellen post-Transplantation stellt eine Möglichkeit zur Gewinnung Leukämie-reaktiver Spender-Lymphozyten für den adoptiven Transfer dar [156]. Die meisten Patienten weisen nach der HSCT jedoch sehr niedrige T Zell-Frequenzen auf, die durch den häufigen Einsatz immun-supprimierender Medikamente zusätzlich beeinträchtigt werden. Die Expansion zur Generierung adäquater Zellzahlen für den adoptiven Transfer muss meist über Monate erfolgen und ist somit sehr zeitintensiv. Der adoptive Transfer, speziell bei Patienten die eine Dosis-reduzierte Konditionierung durchlaufen haben, sollte jedoch relativ rasch nach der HSCT erfolgen; dies wirkt sich aufgrund der herrschenden Lymphopenie zusätzlich positiv auf die Persistenz der T Zellen aus [186]. Die *in vitro*-Kultivierung über lange Zeiträume führt zudem häufig zu terminaler Differenzierung und eingeschränkter Funktionalität der T Zellen, bedingt durch das Eintreten replikativer Seneszenz [187]. Alternativ kann die Generierung Leukämie-

reaktiver CTL auch aus Spender-PBMC *in vitro* erfolgen, indem LAA-beladene APC wie DCs oder modifizierte leukämische Zellen als Stimulatoren eingesetzt werden [188-190]. In jüngster Zeit gewinnt zudem der retrovirale Transfer von TCR-Genen, die aus hoch-affinen und – aviden CTL Klonen isoliert und/oder modifiziert wurden, in Spender-T Zellen immer mehr an Bedeutung [191]. Alle Strategien stehen gemeinsam vor der Herausforderung, innerhalb kurzer Zeit substantielle Mengen an hoch-aviden, LAA-spezifischen, klonalen T Lymphozyten zu generieren, die *in vivo* expandieren, migrieren und persistieren, ihre Reaktivität beibehalten und als Gedächtnis-T Zellen lebenslang Immunität vermitteln [192]. Als vielversprechender Ansatz wurde jüngst die Generierung Leukämie-reaktiver CTL im sogenannten *mini-mixed lymphocyte-leukemia culture* (MLLC, deutsch: gemischte Lymphozyten-Leukämie Kultur) Verfahren aus CD45RA⁺ CD8⁺ naiven Spender-T Zellen etabliert. Dabei werden durch repetitive Stimulation von aufgereinigten CD45RA⁺ CD8⁺ T Zellen mit HLA-Klasse I-identen primären AML-Blasten durch Einsatz geringer Ausgangszellzahlen (10⁴ CD8⁺/well in 96-well Mikrotiter-Platten) über einen relativ kurzen Zeitraum hohe Zellzahlen mono- und oligoklonale LAA- oder mHAg-reaktive CTL generiert [187]. In adoptiven Transfer-Studien in der Maus konnte gezeigt werden, dass CD62L⁺ naive und CD8⁺ T_{CM} Zellen gegenüber CD62L⁻ CD8⁺ T_{EM} Zellen eine überlegene anti-Tumor Reaktivität vermitteln [193]. Die mittels mini-MLLC generierten CTL behalten auch nach mehrwöchiger Kultur die Expression spezifischer früher Differenzierungsmarker wie CD62L und CD127 bei [187].

2.5 Die NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ Maus

Die Untersuchung und Aufklärung von komplexen Krankheitsprozessen im Menschen erfordert häufig die Projektion der biologischen Abläufe auf einen Modellorganismus, in dem die Erkrankung möglichst exakt in allen Details reproduziert werden kann. Da *in vivo* Studien im Menschen aufgrund ethischer Bedenken und technischer Vorbehalte häufig nicht möglich sind, wächst der Bedarf an geeigneten Tiermodellen. Die Hausmaus (*mus musculus*) und daraus resultierende Zuchtlinien dienen bereits in vielen Fällen als Modellsystem zur Aufklärung komplexer biologischer Fragestellungen. Jedoch erst die Entwicklung sogenannter „humanisierter“ Mäuse, die durch den Transfer humanen Gewebes, hämatopoetischer Stammzellen oder PBMC entstehen, ermöglichte es, viele humanspezifische biologische Prozesse auch *in vivo* untersuchen zu können. Durch die Kombination verschiedener genetischer Mutationen entstanden Zuchtstämme, die so stark immundefizient sind, dass Transplantationen humaner Gewebe und Zellen über die xeno-Barriere Mensch-Maus hinweg ohne bzw. mit stark verminderten Abstoßungsreaktionen möglich sind. Zu den wichtigsten Eckpunkten zählt hierbei zunächst die Entdeckung der spontanen *Prkdc*^{scid} (engl.: *protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide; severe combined immunodeficiency*, abgekürzt: *scid*) Mutation in CB17-Mäusen [194]. Tiere dieses Stammes besitzen keine funktionalen,

reifen T und B Zellen und nur rudimentär vorhandene, stark verkleinerte lymphoide Organe. Die Transplantation humaner PBMC führt zu einem geringen Anwachsen der transferierten Zellen, erzeugt jedoch keine funktionelle humane Hämatopoese. Zudem sind die Tiere aufgrund des beeinträchtigten DNA Reparatur-Mechanismus sensitiver gegenüber radioaktiver Strahlung [195]. Im nächsten Schritt wurde durch die Einkreuzung der *scid*-Mutation in verschiedene Stämme beobachtet, dass im Besonderen der entstandene NOD-LtSz/*scid*-Stamm ein stark verbessertes Anwachsen humaner PBMC gegenüber allen anderen gekreuzten Stämmen ermöglichte. NOD-Mäuse (engl.: *non-obese diabetic*, nicht-fettleibig-diabetisch) weisen Defekte in den immunregulatorischen Funktionen antigenpräsentierender Zellen, der Regulierung des T Zell Repertoires sowie beeinträchtigte NK Zell-Funktionen auf. Sie entwickeln spontan T Zell-vermittelte autoimmune Insulitis und Diabetes mellitus (Typ 1) [196-198], jedoch nicht in Kombination mit der *scid*-Mutation. NOD-LtSz/*scid*-Mäuse besitzen zudem Defekte in der angeborenen Immunität, z.B. unreife Makrophagen und eine gestörte Komplement-Aktivität. Trotz der verbesserten Engraftment-Kapazität besitzt dieser Stamm jedoch auch Nachteile: die Tiere sind stark anfällig gegenüber der spontanen Entstehung von Thymomen und weisen eine relativ geringe Lebenserwartung von ca. 8,5 Monaten auf [199]. Vor allem die residuelle NK Zell-Aktivität und die unbeeinträchtigte Funktionalität weiterer Komponenten der angeborenen Immunität verhinderten auch im NOD-LtSz/*scid*-Stamm die vollständige Etablierung eines humanen Immunsystems. Dieser Schritt konnte erst durch die zusätzliche, gezielte Mutation einer von vielen Zytokin-Rezeptoren gemeinsam genutzten Untereinheit, der Interleukin-2-Rezeptor gamma Kette (IL2rg), erfolgen. Dabei handelt es sich um ein Transmembran-Protein, das von den entsprechenden Zytokin-Rezeptoren zur Bindung von IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 für die Integrität und Funktionalität des jeweiligen Rezeptor-Komplexes benötigt wird. Das Vorhandensein ist essentiell für die hoch-affine Bindung der entsprechenden Liganden und die dadurch ausgelöste Signalweiterleitung innerhalb der Zelle [200-202]. Im Menschen führen Mutationen des *IL2rg* Gens, von denen inzwischen über 200 bekannt sind, zur sogenannten *X-linked severe combined immunodeficiency*. Die Krankheit äußert sich, ähnlich wie in den mutierten Mäusen, durch die Abwesenheit funktionaler T und NK Zellen, da die Reifung der Zellen durch fehlende IL-7 und IL-15 Signale nicht stattfinden kann [203]. Durch Kombination des Knockouts der IL2-Rezeptor gamma Kette mit Mäusen des NOD-LtSz/*scid*-Hintergrunds entstanden hochgradig immundefiziente Tiere des NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (abgekürzt NSG)-Stammes, die weder funktionale T-, B- noch NK Zellen besitzen, eine beeinträchtigte angeborene Immunität aufweisen und im Vergleich zu Stämmen ohne *IL2rg*-Mutation erneut eine verbesserte Kapazität zum *engraftment* humaner hämatopoetischer Zellen bieten. Tiere des NSG-Stammes sind ebenfalls Strahlungs-sensitiv, besitzen jedoch eine weitaus höhere Lebenserwartung als NOD-LtSz/*scid*-Mäuse und weisen keine spontane Entstehung von Thymomen auf [201].

3 ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte ein murines, Patienten-spezifisches Leukämie-Modell für anschließende adoptive Transferstudien *in vitro* generierter und expandierter AML-reaktiver CTL etabliert werden. Dazu sollten primäre, aus Patientenmaterial gewonnene AML-Blasten durch den Transfer in NSG-Mäuse auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, eine stabile und dauerhafte Rekapitulation der humanen Neoplasie *in vivo* zu erzeugen. In weniger immundefizienten Mausstämmen konnte dies bisher nur für maximal 70% der transplantierten AML-Proben gezeigt werden, wobei das Auswachsen humaner Zellen relativ schwach blieb [4]. Der Einsatz des stärker immundefizienten NSG-Mausstammes sollte in der vorliegenden Arbeit zeigen, ob dieses Mausmodell tatsächlich eine höhere Permissivität für das Anwachsen humaner primärer AML-Blasten besitzt, wie es in der Literatur beschrieben ist [200, 201, 204, 205]. Zudem sollte eine Analyse hinsichtlich verschiedener, aus der Literatur bekannter Parameter, die potentiell für den *Engraftment*-Erfolg einzelner primärer AML-Proben verantwortlich sind, anhand des beobachteten *Engraftment*-Verhaltens erfolgen. In den etablierten AML-Mausmodellen sollte im Anschluss die Effizienz, Persistenz und Kinetik des anti-neoplastischen Effekts *in vitro* generierter AML-reaktiver Spender-CTL *in vivo* analysiert werden. Durch mehrere Gruppen konnte inzwischen gezeigt werden, dass AML-reaktive Spender-CTL in HLA-identischen Spender-Empfänger-Kombinationen durch repetitive Stimulation der Spender-PBMC mit leukämischen Blasten gewonnenen werden können [185, 187, 206, 207]. Die Spezifität der CTL konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in einigen Fällen bereits nachgewiesen werden. So führte die Ko-Kultur AML-spezifischer CTL mit den als Stimulatoren eingesetzten AML-Blasten vor dem adoptivem Transfer des Zellgemisches zur kompletten Inhibition des Anwachsens in sowohl NOD/scid- als auch NSG-Mäusen [183, 185]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Einsatz *in vitro* generierter und expandierter CTL in Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie in einigen Fällen zum Erreichen erneuter Remission führen kann [208]. Jedoch ist bisher nur wenig über die Kinetik der adoptiven CTL Therapie im Menschen bekannt. Dies liegt zum einen an der relativ geringen Anzahl bisher therapierter Patienten, und zum anderen an der technischen Schwierigkeit, die transferierten Zellen vor dem Hintergrund der endogenen Leukozyten des Patienten zu identifizieren und zu verfolgen. Dieses Problem kann durch den Einsatz muriner Modellsysteme umgangen werden. Somit besteht hoher Bedarf an der Entwicklung prä-klinischer Modelle, in denen sowohl die Effizienz, Persistenz als auch die Kinetik des anti-leukämischen Effekts humaner CTL analysiert werden kann.

Parallel dazu sollten Untersuchungen erfolgen, um den Extravasations- und Transmigrationsmechanismus humaner T Lymphozyten über die Xeno-Barriere im Mausmodell im Vergleich mit murinen T Lymphozyten aufzuklären. Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle bei

einer Vielzahl von immunologischen Reaktionen im Organismus. Die pharmakologische Modulation von Prozessen der Zellmigration ist eine beliebte Strategie bei der Entwicklung neuer oder Optimierung bestehender Wirkstoffe und wird häufig in prä-klinischen Mausmodellen untersucht. Die Auswirkungen des Vorhandenseins einer Xeno-Barriere wurden bisher nur in anderen Xeno-Systemen wie dem porcine-humanen, nicht jedoch dem murin-humanen, untersucht [209]. Somit stellt die Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Transmigration humaner T Lymphozyten über murines Endothel eine essentielle Basis für das Verständnis und die Interpretation erzielter Ergebnisse im hier gewählten humanisierten Mausmodell dar. Zur Untersuchung der einzelnen Prozesse sollten Adhäsionsstudien in der Flusskammer auf murinem Endothel sowie Transmigrationsstudien im Transwell System etabliert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav 40-60	H+P Labortechnik, Ober-schleißheim
Bestrahlungsanlage		
CO ₂ -Inkubator	Heracell 150i/150	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Digitalkamera	Ixus 50	Canon, Norderstedt
Dispenser Multipette	Dial control 1-5	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer	FACS Canto™	BD Biosciences, Heidel-berg
Eismaschine	UBE50/35	Ziegra, Isernhagen
Feinwaage (0.05-210 g)		Sartorius, Göttingen
Flaschendispenser		Eppendorf, Hamburg
Gamma Zähler	Packard Cobra	Perkin Elmer, Rodgau
Gefrierschrank (-80°C)	Hera freeze, HFU 686 Basic	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Kühl- und Gefrier- kombinationen (4°C, -20°C)		Bosch, München Liebherr, Ochsenhausen
Labormikroskop (invers) mit Laserquelle und Kamera	IX71 + Cell F Imaging Soft- ware	Olympus, Hamburg
MACS-Separationseinheit	MACS Multistand	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Magnetrührer mit Heizplatte	Variomag	Monotherm Electronicrührer, München
Phasenkontrastmikroskop für Zellkultur	Wilovert S	Helmut Hund, Wetzlar
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Mikroliterpipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100- 1000 µl)	Transferpette® S	Brand, Wertheim
Mehrkanalpipette	Nunc	Thermo Fisher Scientific,

(25-200 µl)		Dreieich
Rotlichtlampe	Infraphil	Philipps, Hamburg
Schlauchdosier-pumpe	PHD2000 programmable	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Sterile Werkbank	Technoflow 2F180-II GS	Integra Bioscience, Fernwald
Stickstoff-Kryo-Bank	Espace 151 GAZ	Air Liquide, Düsseldorf
Stickstoff-Tank	Taylor-Wharton XL-180	Tec Lab, Königstein
Vortexer	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad, schüttelbar	SW22	Julabo Labortechnik, Seelbach
Wasser- Deionisierungsanlage	Purelab Ultra	Elga-Berkefeld, Celle
Zentrifugen	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
	Megafuge 3.0R	Heraeus Sepatech, Oste- rode
	Biofuge Fresco	Heraeus Centrifuges, Buckinghamshire, UK

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Cellstrainer, 40, 70, 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg
Einfrierboxen	Nunc, Wiesbaden
Einfrier-Röhrchen Cryotube 1.8 ml	Nunc, Wiesbaden
Einfrier-Röhrchenständer	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten, steril, 1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml	Greiner, Nürtingen
Eisbad	NeoLab (Heidelberg)
FACS-Röhrchen zur Durchflusszytometrie	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Röhrchenständer	Carl Roth, Karlsruhe
Falcon-Röhrchen, 15 und 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon-Röhrchenständer	Carl Roth, Karlsruhe
Flussskammern, IBIDI® µ-Slide VI0.4 ibiTreat	IBIDI, München
Gewebekulturplatten, 6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch	Greiner, Nürtingen
Handschuhe	Sempercare

MATERIAL UND METHODEN

Kanülen, Sterican [®] , verschiedene Größen	Braun, Melsungen
Kasten für Objektträger, mit Verschluss	neoLAB, Heidelberg
Messzylinder Plastik, 25 ml, 100 ml, 1000 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatten, Flach-, Rund- und V-Bodenplatten im 96- Lochformat	Greiner, Nürtingen
Petrischalen, Ø 94 mm, 60 mm, 35 mm	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen, 0,5-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße (Eppis), 500/1500/2000 µl	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle, steril, Einmal	FEATHER Safety Razor Co, Japan
Spritzen, 10, 20 und 50 ml Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Sterilfilter FP30/0,2 µm CA-S, FP30/0,45 µm CA-S	Millipore, Eschborn
Transwell Platten, steril, 6,5 mm mit 5,0 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert	Corning Costar, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturflaschen, 25, 80 und 175 cm ² Kulturfläche	Greiner, Nürtingen

4.1.3 Glaswaren

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Glaswaren

Bezeichnung	Hersteller
Bechergläser, 200, 500 und 1000 ml	Schott, Mainz
Deckgläser, 24x32 mm	Menzel, Braunschweig
Duran-Glasflaschen, 500, 1000, 2000 und 5000 ml	Schott, Mainz
Objektträger SUPERFROST PLUS, 25x75 mm	Menzel, Braunschweig
Zählkammern, Thoma	LO-Labor Optik, Bad Homburg

4.1.4 Chemikalien

Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
7-AAD Viability Dye	Beckman Coulter, Krefeld
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol, geeignet für HPLC (98%)	Merck, Darmstadt
Ethanol zur Flächendesinfektion (70%)	Nedalco Alcohol, Heilbronn
Ficoll Lymphozyten Separationsmedium LSM 1077	PAA Laboratories, Pasching, A
FITC-Dextran3000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Freka-DERM, Hautdesinfektion	Dr. Schumacher, Malsfeld
Isopropyl-Alkohol	Hedinger, Stuttgart
Na ₂ ⁵¹ CrO ₄	Perkin Elmer, Rodgau
Paraformaldehyd (PFA), 4%	Applichem, Heidelberg
PKH-26 fluorescent cell linker kit MINI	Sigma-Aldrich, Steinheim
PKH-67 fluorescent cell linker kit MIDI	Sigma-Aldrich, Steinheim
Terralin liquid, Schnelldesinfektionsmittel	Schülke, Hamburg
Trypanblau	Applichem, Heidelberg
Trypsin-EDTA (0.05%)	PAA Laboratories, Pasching, A
Tween-20	Applichem, Heidelberg
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt

4.1.5 Medien und Zusätze

Tabelle 7: Übersicht der eingesetzten Medien und Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller
AIM-V Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Aqua dest. B. Braun	Braun, Melsungen
Borgal 24%-Injektionslösung	Virbac, Bad Oldesloe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase I	Roche, Grenzach-Wyhlen
Dulbecco`s modified eagle medium (DMEM)	Lonza, Verviers, Belgien
Endothelzell Wachstums-Medium-2 (EGM-2) Bullet Kit	Lonza, Verviers, Belgien
Fibronectin, human	BD Biosciences, NJ, USA
Fötales Kälberserum (FCS, <i>engl.: fetal calf serum</i>)	PAA Laboratories, Pasching, A
Hanks balanced salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Heparin-Natrium-25000 ratiopharm®	Ratiopharm, Ulm
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Humanes AB-Serum (aus dem Blut gesunder Spender, hitzeinaktiviert)	Blutspendezentrale Universitätsklinik, Mainz
Gelatine Typ A (Porcine skin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Lonza, Verviers, Belgien
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Saline (PBS; -CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Phytohemagglutinin (PHA)	Murex Biotech Ltd., Kent, UK
RPMI 1640 Medium (1x, + L-Glutamin)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
X-VIVO 20 T-Lymphozyten Medium	Lonza, Verviers, Belgien

4.1.6 Operationsbesteck

Alle eingesetzten Bestandteile des aufgeführten Operationsbestecks wurden von der Firma Fine Science Tools (FST), Heidelberg bezogen.

Tabelle 8: Übersicht des eingesetzten Operationsbestecks

Scheren

Kat. Nr. 14054 - 13 gerade, scharfe, vorne abgestumpfte Klinge 13 cm

Kat. Nr. 14068 - 12 gerade Klinge 12 cm

Kat. Nr. 14088 - 10 gerade Klinge 10.5 cm

Kat. Nr. 14080 - 11 Arterienschere mit Kugelkopf (1.5mm) 11.5 cm

Kat. Nr. 14001 - 12 gerade, scharfe, vorne abgestumpfte Klinge 12 cm

Pinzetten

Kat. Nr. 11050 - 10 gerade Pinzette 10 cm

Kat. Nr. 11052 - 10 Pinzette mit gebogener, gezahnter 0.8 mm Spitze 10 cm

Kat. Nr. 11002 - 12 gerade Pinzette 12 cm

4.1.7 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Tabelle 9: Übersicht der eingesetzten Zytokine

Zytokin	Hersteller
CCL-21	R&D Systems, Wiesbaden
hECGS	PromoCell, Heidelberg
IL-2	Chiron, Emeryville, CA, USA
IL-7	R&D Systems, Wiesbaden
IL-7 (Fc-Chimera)	Merck, Darmstadt
IL-12	R&D Systems, Wiesbaden
IL-15	R&D Systems, Wiesbaden
IL-21	Biomol, Hamburg
TNF- α (Tumor necrosis factor-1 α)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

4.1.8 MACS[®] Microbeads und Zubehör

Tabelle 10: Zubehör für die magnetische Zellseparation mittels MACS[®]

Bezeichnung	Herstellerkennzeichnung
CD3 Microbeads, human	Miltenyi Biotec # 130-050-101
CD4-Microbeads, human	Miltenyi Biotec # 130-045-101
CD8-Microbeads, human	Miltenyi Biotec # 130-045-201
Naive CD8 ⁺ T cell-Isolation Kit	Miltenyi Biotec # 130-093-244
CD90.2 Microbeads, murin	Miltenyi Biotec # 130-049-101
MS Säulen	Miltenyi Biotec # 120-000-472
LS Säulen	Miltenyi Biotec # 120-000-475
LD-Säulen	Miltenyi Biotec # 130-042-901
MiniMACS [®] Separator	Miltenyi Biotec # 130-042-102
MidiMACS [®] Separator	Miltenyi Biotec # 130-042-302
MACS [®] Multistand	Miltenyi Biotec # 130-042-303

4.1.9 Antikörper, human

Tabelle 11: FACS Antikörper für die Detektion von humanen Oberflächen-Antigenen

Antigen	Klon	Konjugation	Hersteller
CD3	UCHT1/SK7	FITC/PE-Cy7	Beckton Dickinson
CD4	13B8.2	PE	Beckman Coulter
CD8	B9.11	FITC	Beckman Coulter
CD11a	HI111	Unkonjugiert	BioLegend
CD11a	HI111	PE	BioLegend
CD14	RMO52	PE	Beckman Coulter
CD15	80H5	PE	Beckman Coulter
CD16	3G8	FITC	Beckman Coulter
CD18	TS1/18	Unkonjugiert	BioLegend
CD19	J3-119	PE	Beckman Coulter
CD25	2A3	PE	Beckton Dickinson
CD33	WM53	PE	Beckton Dickinson
CD34	581	PE	Beckman Coulter
CD38	T16	FITC	Beckman Coulter
CD44	J.173	FITC	Beckman Coulter
CD45	J.33	APC	Beckman Coulter
CD45RA	HI100	PE-Cy5	Beckton Dickinson
CD45RO	UCHL1	FITC	Beckman Coulter
CD49d	9F10	Unkonjugiert	BioLegend
CD49d	BU49	FITC	Southern Biotech
CD54	HCD54	Unkonjugiert	BioLegend
CD56	N901 (NHK-1)	PE	Beckman Coulter
CD62E	UZ6	Unkonjugiert	Gene Tex. Inc.
CD62L	DREG-56	Unkonjugiert	BioLegend
CD62P	Psel.KO2.12	Unkonjugiert	eBioscience
CD64	22	FITC	Beckman Coulter
CD65	88H7	FITC	Beckman Coulter
CD69	HP-4B3	FITC	Ancell
CD80	MAB104	FITC	Beckman Coulter
CD86	IT2.2	PE	Beckton Dickinson

CD102	CBR-IC2/2	Unkonjugiert	BioLegend
CD105	43A3	Unkonjugiert	BioLegend
CD106	STA	Unkonjugiert	eBioscience
CD184	12G5	PE	BioLegend
β7	FIB504	Unkonjugiert	eBioscience
CCR7	150503	FITC	R&D Systems
HLA-ABC	B9.12.1	FITC	Beckman Coulter
HLA-DR	G46-6	PE	Beckton Dickinson
IgG1	H2	FITC, PE, APC, PE-Cy5/-Cy7	Beckton Dickinson

Tabelle 12: HLA-spezifische blockierende Antikörper

Antikörper	Isotyp	Spezifität	Referenz
W6/32	Maus IgG2a	HLA-Klasse I	Cell 1979 14:9
HB55	Maus IgG2a	HLA-DR	Jl 1980 125:293
B1.23.2	Maus IgG2b	HLA-B & C	Tissues Antigens 1983, 22:107
SFR8B6	IgG2b Maus/Ratte	HLA-Bw6, einige C-Allele	Jl 1982 128:2804

4.1.10 Antikörper, murin

Tabelle 13: FACS Antikörper für die Detektion von murinen Oberflächen-Antigenen

Antigen	Klon	Konjugation	Hersteller
CD3ε	145-2C11	FITC	Beckton Dickinson
CD4	GK1.5	FITC	Beckton Dickinson
CD8a	53-6.7	PE	Beckton Dickinson
CD11a	M17/4	Unkonjugiert	eBioscience
CD18	M18/2	Unkonjugiert	eBioscience
CD31	MEC 13.3	Unkonjugiert	Beckton Dickinson
CD49d	R1-2	Unkonjugiert	eBioscience
CD54	YN1/1.7.4	Unkonjugiert	BioLegend
CD62E	UZ6	Unkonjugiert	Gene Tex. Inc.
CD62L	MEL-14	Unkonjugiert	BioLegend
CD62P	Psel.KO2.12	Unkonjugiert	eBioscience

CD90.2	53-2.1	PE	Beckton Dickinson
CD102	3C4 (MIC2/4)	Unkonjugiert	BioLegend
CD105	MJ7/18	Unkonjugiert	BioLegend
CD106	429 (MVCAM.A)	Unkonjugiert	BioLegend
β 7-Integrin	FIB504	Unkonjugiert	eBioscience
MAdCAM	MECA-367	Unkonjugiert	BioLegend
IgG2a	RTK2758	Unkonjugiert	BioLegend
IgG2b	RTK4530	Unkonjugiert	BioLegend

4.1.11 Zellkulturmedien und Puffer

Alle Zellkultur-Medien wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Einfrier-Medium AG Hartwig

90% FCS

10% DMSO

Einfrier-Medium AG Herr

90% AIM-V + 8% HSA + 10 IU/ml Heparin

10% DMSO

Auftau-Medium

DMEM

10 μ g/ml DNase I

Medium für HUVECs

EGM-2 Medium

Medium für bEND.3

DMEM

10% FCS

2% L-Glutamin

1% Pen/Strep

Medium für bEND.5

DMEM

10% FCS

2% L-Glutamin

1% Pen/Strep

1 mM Natrium-Pyruvat

1x *non-essential aminoacids*

50 µM β-Mercaptoethanol

Medium für primäre murine Lungen-Endothelzellen

DMEM/F12

20% FCS

2 mM hECGS

Medium zur polyklonalen Stimulation von T Zellen über Nacht

AIM-V

1 µg/ml αCD3

1 µg/ml αCD28

Präparations-Medium

RPMI 1640

1% FCS

1% Pen/Strep

Medium für den adoptiven Zelltransfer

PBS

0,5% FCS / 1% Humanserum

Medium für Flusskammer-Experimente

HBSS

0,5% BSA

Medium für Transmigrationsstudien in Transwell Assays

DMEM

5% FCS

2% L-Glutamin

25 mM HEPES

+/- 200 ng/ml CCL21

FACS Puffer

PBS

3,32% 30%iges BSA

Spatelspitze Natrium-Azid

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen unter sterilen Bedingungen an einem sterilen Arbeitsplatz und unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte für alle Zelllinien bei 37°C, 5% CO₂ unter 95% Luftfeuchtigkeit.

4.2.2 Gewinnung und Handhabung von primärem Patientenmaterial

Primäre AML Blasten wurden aus peripherem Blut oder Leukapheresaten von neu diagnostizierten AML Patienten mit Hilfe von Ficoll Separation (siehe Abschnitt 4.2.6) isoliert. PBMC wurden aus Routine-Blutspenden der Transfusionszentrale des Universitätsklinikums Mainz gewonnen. Diese konnten entsprechend der gewünschten HLA-Merkmale angefordert werden. Aus einer 450 ml Vollblutspende wurden sogenannte Leukozytenfilme oder „Buffy Coats“ maschinell abgetrennt und zur Verfügung gestellt. Diese enthalten Leukozyten, aus denen durch Ficoll-Separation die Lymphozyten isoliert werden können. Die PBMC wurden entweder direkt für weitere Versuche eingesetzt oder in kleinen Portionen (5x10⁷ Zellen) in flüssigem Stickstoff gelagert (siehe Abschnitt 4.2.4).

4.2.3 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die zu untersuchende Zellsuspension im Verhältnis 1:2 – 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Dieser Vitalfarbstoff dringt nur durch die Zellmembran toter Zellen und führt zu einer deutlichen Blaufärbung dieser Zellen. Die verdünnte Zellsuspension wurde in eine Thoma/Neubauer Zählkammer überführt und die Anzahl nicht-blaugefärbter Zellen in einer bestimmten Anzahl Groß- oder Gruppenquadrate ermittelt. Die anschließende Berechnung der Zellzahl pro ml erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{N}{n} \times V \times 10^4$$

N = Anzahl gezählter lebender Zellen

n = Anzahl ausgezählter Grossquadrate

V = Verdünnungsfaktor

10⁴ = Kammerfaktor

4.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Konservierung von humanen und murinen Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Die einzufrierenden Zellen wurden mittels Trypanblau-Färbung gezählt (siehe Abschnitt 4.2.3) und in Portionen von 1 bis 50 Mio. Zellen in $900\ \mu\text{l}$ Einfrier-Medium + $100\ \mu\text{l}$ DMSO in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in einem vorgekühlten Einfrierbehälter zunächst für mindestens 48 Stunden bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen in die Kryobank (-196°C) überführt und gelagert.

4.2.5 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurde pro aufzutauendes Nunc à 1-1,5 ml Inhalt Auftau-Medium in 10-fachem Überschuss im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die gefrorenen Kryoröhrchen wurden ebenfalls im Wasserbad an-, jedoch nicht vollständig aufgetaut. Die angetauten Kryoröhrchen wurden mit 70%igem Ethanol desinfiziert und unter der Sterilbank geöffnet. Das zuvor erwärmte Medium wurde nun genutzt, um repetitiv die angetauten Zellen zu spülen und portionsweise in das frische Medium zu überführen. Somit wurde das toxische DMSO im Einfriermedium ausreichend stark verdünnt, um die Zellen nicht zu schädigen. Nach Ausspülen aller Zellen wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1500 Umdrehungen pro Minute (UPM) in einer Eppendorf Zentrifuge 5810R, 4°C , 5 min) und das Zellpellet in adäquater Menge frischem Medium resuspendiert.

4.2.6 Aufreinigung von Zellmaterial mittels Ficoll Dichtegradienten-Zentrifugation

Sowohl PBMC von gesunden Spendern als auch AML Blasten aus peripherem Blut oder Leukapheresaten von Patienten wurden mittels Ficoll Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Dazu wurde zur Isolierung von PBMC aus Buffy Coats der gesamte Inhalt des Buffy Coats (ca. 70-80 ml) mit Hilfe einer 50 ml-Spritze entnommen und im Verhältnis 1:1 mit PBS in einem sterilen Gefäß verdünnt. Je 25 ml Ficoll Lösung wurden in sterile 50 ml-Falcons vorgelegt und anschließend langsam mit 25 ml des Blut-PBS Gemisches überschichtet. Die Röhrchen wurden anschließend für 20 min bei 2100 UPM in einer Eppendorf Zentrifuge 5810R bei 4°C zentrifugiert. Die Leukozyten waren anschließend als weißer Ring über der Ficoll-Schicht sichtbar, wurden vorsichtig abgesaugt und in neue 50 ml Falcons überführt. Die Zellen wurden zwei Mal durch Zugabe von PBS gewaschen und durch Zentrifugation bei 1800 UPM in einer Eppendorf Zentrifuge 5810R für 10 min pelletiert. Die Überstände wurden dekantiert, die isolierten Zellen erneut in PBS resuspendiert, vereinigt und bei 2100 UPM für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in PBS aufge-

nommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Thoma Zählkammer (siehe Abschnitt 4.2.3) bestimmt. Die Isolation von AML Blasten erfolgte analog.

4.2.7 Durchflusszytometrie

4.2.7.1 Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie (FACS, engl.: *fluorescence activated cell sorting*) handelt es sich um ein optisches Messverfahren, mit dem multiple Eigenschaften wie Größe, Komplexität des Zytoplasmas, Expression membranständiger und intrazellulärer Proteine sowie DNA- und RNA-Gehalt einzelner Zellen bestimmt werden können. Einzelzellsuspensionen werden mit hoher Geschwindigkeit in laminarem Fluss durch eine Kapillare gesaugt und passieren dabei einen Laserstrahl. Entsprechend ihrer Form, Größe und Granularität bewirken die Zellen eine unterschiedlich starke Streuung des Lichts. Diese Signale werden als Vorwärtsstreu-licht (FSC = *Forward Scatter*) und Seitwärtsstreu-licht (SSC = *Sideward Scatter*) auf einem Photomultiplier detektiert. Die Stärke der jeweiligen Streuung korreliert im FSC-Kanal mit der Größe (je mehr Vorwärtsstreu-licht, desto größer die Zellen) und im SSC-Kanal mit der Granularität der Zellen (je mehr Seitwärtsstreu-licht; desto granulärer, komplexer und strukturierter die Zelle). Zusätzlich zu diesen intrinsischen Eigenschaften kann die Expression von Proteinen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern analysiert werden. Durch die Wahl von Fluorochromen mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissions-Wellenlängen kann simultan in einer Messung eine Vielzahl von Parametern ermittelt werden (zusammengefasst in [210]). Die Analyse der Emission lässt sowohl qualitative als auch quantitative Rückschlüsse zu.

4.2.7.2 Färbung mit monoklonalen Antikörpern

Alle untersuchten Zellpopulationen wurden als Einzelzellsuspensionen eingesetzt. Es wurden sowohl kommerzielle, direkt an Fluorochrome konjugierte monoklonale Antikörper (mAb) als auch unkonjugierte mAb eingesetzt. Diese wurden in einem zweiten Färbeschritt mit den entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Sekundär-Antikörpern markiert. Alle Färbungen wurden auf Eis durchgeführt. Alle Antikörper wurden bei 4°C gelagert.

4.2.7.2.1 Direkte Färbung

Für die Durchführung von Immunfluoreszenz-Färbungen mit direkt konjugierten mAb wurden 10 000 bis 500 000 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und durch Zugabe von 1 ml FACS-Puffer und anschließende Zentrifugation für 5 min bei 1500 UPM in einer Eppendorf Zentrifuge 5810R bei 4°C gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und der jeweilige mAb zu 2,5 – 10 µl in das Restvolumen (ca. 80 µl) im FACS-Röhrchen pipettiert. Durch

Vortexen wurde eine Resuspension des Pellets erreicht und die Röhrchen für 15 – 30 min bei 4 C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen. Je nach weiterer Verwendung wurden die Zellen durch Zugabe von 200 Öl PFA (4%) fixiert oder für direkte Messung im Durchflusszytometer in 200 Öl FACS-Puffer resuspendiert.

4.2.7.2.2 Indirekte Färbung

Für die Durchführung von Immunfluoreszenz-Färbungen mit unkonjugierten mAb wurden 10 000 bis 500 000 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und durch Zugabe von 1 ml FACS-Puffer und anschließende Zentrifugation für 5 min bei 1500 UPM in einer Eppendorf Zentrifuge 5810R bei 4 C gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und der jeweilige unkonjugierte mAb zu 1 – 2,5 Öl in das Restvolumen (ca. 80 Öl) im FACS-Röhrchen pipettiert. Durch Vortexen wurde eine Resuspension des Pellets erreicht und die Röhrchen für 15 – 30 min bei 4 C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen. Anschließend wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundär-Antikörper aus der entsprechenden Spezies zu 1 – 5 Öl in das Restvolumen im FACS-Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden durch Vortexen resuspendiert und erneut für 15 – 30 min bei 4 C inkubiert.  berschussiger ungebundener Antikörper wurde durch einen weiteren Waschschrift entfernt. Je nach weiterer Verwendung wurden die Zellen durch Zugabe von 200 Öl PFA (4%) fixiert oder für direkte Messung im Durchflusszytometer in 200 Öl FACS-Puffer resuspendiert.

4.2.7.3 FACS-Messung

Die Analyse der gefärbten Zellsuspensionen erfolgte an einem BD FACS Canto Durchflusszytometer. Dazu wurde ein *gate* (Rahmen) um die zu analysierende Zellpopulation gesetzt und 10 000 bis 100 000 Ereignisse pro Probe gemessen. Für die Durchführung von Lebendf rbungen bzw. der Analyse des Anteils toter und lebender Zellen in einer Probe wurden kurz vor der Messung 2,5 Öl des Zellfarbstoffs 7-Aminoactinomycin (7-AAD) zu der Probe pipettiert. Dieser interkaliert spezifisch in die DNA ausschließlich toter Zellen und verändert dabei seine Fluoreszenzeigenschaften. Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der BD FACSDiva™ 6.1.3 Software sowie der EXPO™32 Software (Beckman Coulter).

4.2.8 Kultivierung adhärent wachsender Endothelzellen

Die Kultivierung aller adhärent wachsenden Endothelzellen erfolgte in verschlossenen Zellkulturflaschen. Für die Kultur der Zelllinien (bEND.3/bEND.5/HUVECs) wurden die Zellkulturflaschen zunächst mit 0,1% porciner Gelatine-Lösung beschichtet. Dazu wurden, je nach Größe der Zellkulturflasche, 1-5 ml der Lösung hinzugefügt, die Flasche zur homogenen Verteilung geschwenkt und für 30 min bei 37 C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die

überschüssige Gelatine-Lösung entfernt und die Flasche ein Mal mit PBS ausgespült. Die Kultur der primären Endothelzellen erfolgte in analog mit Fibronectin (25 µg/ml) beschichteten Flaschen.

4.2.8.1 Kultur von bEND.3/bEND.5 Endothelzellen

Die murinen Endothelzelllinien bEND.3 und bEND.5 wurden bis zum Erreichen von 90%iger Konfluenz kultiviert und anschließend im Verhältnis 1:4 – 1:6 gesplittet. Dazu wurde das alte Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen ein Mal durch Zugabe von PBS gespült, um Reste des Mediums zu entfernen. Anschließend erfolgten die Zugabe von 1-5 ml Trypsin-EDTA, je nach Größe der Zellkulturflasche, und die Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ für 3-10 min. Durch visuelle Inspektion wurde die Ablösung der Zellen überprüft und die Reaktion durch Zugabe von Serum-haltigem Medium abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden resuspendiert, in RPMI-Medium gewaschen, pelletiert und in frischem Kulturmedium im gewünschten Verhältnis in Gelatine-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät. Beide Zelllinien wurden nicht über Passage 30 hinaus für Versuche eingesetzt.

4.2.8.2 Kultur von primären murinen Lungen-Endothelzellen

Die Kultur primärer muriner Lungen-Endothelzellen erfolgte bis zum Erreichen 70-80%iger Konfluenz. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet. Dazu wurde das alte Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen ein Mal durch Zugabe von PBS gespült, um Reste des Mediums zu entfernen. Anschließend erfolgten die Zugabe von 1-5 ml Trypsin-EDTA, je nach Größe der Zellkulturflasche, und die Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ für 3-10 min. Durch visuelle Inspektion wurde die Ablösung der Zellen überprüft und die Reaktion durch Zugabe von Serum-haltigem Medium abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden resuspendiert, in RPMI-Medium gewaschen, pelletiert und in frischem Kulturmedium im gewünschten Verhältnis in Fibronectin-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät.

4.2.8.3 Kultur von HUVECs

HUVECs wurden bis zum Erreichen von 80%iger Konfluenz kultiviert und anschließend im Verhältnis 1:4 gesplittet. Dazu wurde das alte Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen ein Mal durch Zugabe von PBS gespült, um Reste des Mediums zu entfernen. Anschließend erfolgten die Zugabe von 1-5 ml Trypsin-EDTA, je nach Größe der Zellkulturflasche, und die Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ für 3-10 min. Durch visuelle Inspektion wurde die Ablösung der Zellen überprüft und die Reaktion durch Zugabe von Serum-haltigem Medium abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden resuspendiert, in RPMI-Medium gewaschen, pelletiert und in frischem Kulturmedium im gewünschten Verhältnis in Gelatine-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät. HUVECs wurden maximal bis zum Erreichen der fünften Passage für Versuche eingesetzt.

4.2.9 Zellseparation mit MACS[®] Technologie

4.2.9.1 Prinzip

Die MACS[®] Technologie ermöglicht es, gezielt Zellpopulationen aus heterogenen Zellgemischen zu isolieren oder bestimmte Zellfraktionen aus einem Gemisch zu entfernen. Dazu werden die Zielzellen mit 50 nm kleinen superparamagnetischen Partikeln (MACS[®] Microbeads, Miltenyi Biotec) inkubiert, die kovalent an monoklonale Antikörper gegen die gewünschte Zielstruktur gekoppelt sind. Durch Auftragen des Zellgemischs auf eine magnetisierte Separationssäule werden die an die Microbeads gekoppelten Zellen in der Säule zurückgehalten, während die nicht-markierten Zellen ungehindert durchfließen können. Durch mehrmaliges Spülen der Säule mit Puffer wird eine erhöhte Reinheit erzielt. Nach Entmagnetisierung der Säule erfolgt die Elution der Zielfraktion.

4.2.9.2 Isolation von humanen CD3⁺ / CD4⁺ /CD8⁺ T Zellen aus PBMC

Die Isolation von humanen CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten aus PBMC gesunder Spender erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die PBMC wurden aufgetaut, gewaschen, gezählt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und je 1×10^7 PBMC in 80 μ l Puffer resuspendiert. Je 1×10^7 Zellen wurden 20 μ l anti-CD3/anti-CD4/anti-CD8 Microbeads zugefügt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit 1-2 ml Puffer pro 10^7 Zellen gewaschen, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und je 10^8 Zellen in 500 μ l Puffer resuspendiert. Die Separation erfolgte, je nach Zellzahl, in einer MS- oder LS-Säule, die durch Zugabe von 0,5 bzw. 3 ml Puffer equilibriert wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension aufgetragen und drei Mal durch Zugabe von 0,5 bzw. 3 ml Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde in einem sterilen 15 ml Falcon aufgefangen. Die Positiv-Fraktion wurde nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld durch Zugabe von 1 bzw. 5 ml Puffer und Durchdrücken des Stempels in ein steriles 15 ml Falcon eluiert. Zur Überprüfung der Reinheit wurden FACS-Färbungen beider Fraktionen auf die Expression von CD3/CD4/CD8 durchgeführt.

4.2.9.3 Isolation von murinen CD90.2⁺ T Zellen aus BALB/cJ Splenozyten

Die Isolation von murinen CD90.2⁺ T Lymphozyten aus BALB/cJ Splenozyten erfolgte analog zur Isolation von humanen CD3⁺ T Lymphozyten. Als Ausgangsmaterial dienten hier jedoch frisch präparierte Splenozyten aus BALB/cJ-Mäusen. Diese wurden zunächst mit Erythrozyten-Lyse-Puffer behandelt, gewaschen, gezählt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und je 1×10^7 PBMC in 90 μ l Puffer resuspendiert. Je 1×10^7 Zellen wurden 10 μ l anti-CD90.2 Microbeads zugefügt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Zur Überprüfung der

Reinheit wurden FACS-Färbungen beider Fraktionen auf die Expression von CD90.2 durchgeführt.

4.2.9.4 Isolation von naiven CD8⁺ T Zellen

Die Isolation von naiven CD8⁺ T Zellen aus PBMC erfolgte mit Hilfe des „Naive CD8⁺ T-Cell Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec) entsprechend der Herstellerangaben. Prinzipiell werden dabei zunächst die nicht-naiven T Zellen und NK Zellen mit einer Mischung biotinylierter Antikörper gegen CD45RO, CD56, CD57, und CD244 markiert und durch die Zugabe von anti-Biotin Microbeads über eine LD-Säule depletiert. Anschließend wird die naive T Zell-Fraktion durch eine Positiv-Selektion unter Einsatz von anti-CD8 Microbeads isoliert.

Für die Isolation wurden PBMC aufgetaut, gewaschen, gezählt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet je 1×10^7 PBMC in 40 μ l Puffer resuspendiert. Pro 1×10^7 Zellen wurden je 10 μ l des biotinylierten Antikörper-Cocktails zugefügt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden pro 1×10^7 Zellen je 30 μ l Puffer sowie 20 μ l anti-Biotin Microbeads hinzugefügt und gemischt. Die Zellen wurden erneut bei 4°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1-2 ml Puffer pro 10^7 gewaschen, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet pro 10^8 Zellen in 500 μ l Puffer resuspendiert. Zunächst erfolgte nun die Depletion der nicht-naiven T Zellen über eine LD-Säule. Diese wurde durch Zugabe von 2 ml Puffer equilibriert. Anschließend wurde die Zellsuspension aufgetragen und zwei Mal durch Zugabe von 1 ml Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde in einem sterilen 15 ml Falcon aufgefangen. Diese unmarkierte Fraktion diente im Anschluss der Positiv-Isolation. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet je 1×10^7 PBMC in 80 μ l Puffer resuspendiert. Je 1×10^7 Zellen wurden 20 μ l anti-CD8 Microbeads zugefügt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit 1-2 ml Puffer pro 10^7 Zellen gewaschen, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet pro 10^8 Zellen in 500 μ l Puffer resuspendiert. Die Separation erfolgte, je nach Zellzahl, in einer MS- oder LS-Säule, die durch Zugabe von 0,5 bzw. 3 ml Puffer equilibriert wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension aufgetragen und drei Mal durch Zugabe von 0,5 bzw. 3 ml Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde in einem sterilen 15 ml Falcon aufgefangen. Die Positiv-Fraktion wurde nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld durch Zugabe von 1 bzw. 5 ml Puffer und Durchdrücken des Stempels in ein steriles 15 ml Falcon eluiert. Zur Überprüfung der Reinheit wurden FACS-Färbungen beider Fraktionen auf die Expression von CD8 sowie verschiedener naiver T Zell-Marker (CD45RA, CCR7, CD62L, CD28, CD127, CD57) durchgeführt.

4.2.10 Polyklonale Stimulation humaner und muriner T Zellen

Zur polyklonalen Aktivierung humaner und muriner T Lymphozyten wurden diese nach MACS-Isolation aus PBMC bzw. murinen Splenozyten (siehe Abschnitte 4.2.9.2 und 4.2.9.3) über Nacht in Anwesenheit der mAb α CD3 ϵ und α CD28 inkubiert. Durch die gleichzeitige Bindung der ϵ -Kette des TCR-Komplexes und des kostimulatorischen Moleküls CD28 erfolgt eine polyklonale Stimulation der T Zellen. Dazu wurden 6-*well* Platten mit je 3 ml/*well* des auf 3 μ g/ml in PBS verdünnten mAb Okt3 (human) bzw. anti-CD3 ϵ (murin) beschichtet und für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde überschüssige Lösung entfernt und die *wells* mit 3 ml PBS gespült. Die isolierten T Zellen wurden auf 1x10⁷ Zellen/ml in AIM-V eingestellt und 1 μ g/ml anti-CD28 der jeweiligen Spezies hinzugefügt. In jeden beschichteten *well* wurden maximal 3 ml Zellsuspension ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.2.11 Gemischte Lymphozyten Leukämie Kultur (MLLC)

Die Herstellung AML-reaktiver CTL durch die gemischte Lymphozyten Leukämie Kultur (MLLC, engl.: *mixed lymphocyte leukemia culture*) erfolgte ausschließlich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr, Universitätsmedizin Mainz. Sie beruht auf dem Prinzip der repetitiven Stimulation HLA-inkompatibler, naiver CD8⁺ Spender-T Lymphozyten mit primären Patienten AML-Blasten zur Generierung HLA-*mismatch*-reaktiver Spender CTLs. Alle MLLC wurden in 48-*well* Platten in AIM-V Medium unter Zusatz von 10% Humanserum durchgeführt. Die Isolierung der in der Kultur eingesetzten naiven CD8⁺ T Lymphozyten (*responder* Zellen, 5x10⁵ Zellen/*well*) erfolgte wie in Abschnitt 4.2.9.4 beschrieben. Als Stimulatoren wurden mit 35-60 Gy bestrahlte allogene primäre AML-Blasten (5x10⁵ Zellen/*well*) eingesetzt, die über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ in AIM-V + 10% Humanserum vorkultiviert wurden. Als *feeder* Zellen wurden die nicht-naiven oder CD8⁻ T Zellen (5x10⁵ Zellen/*well*) nach Bestrahlung mit 35 Gy eingesetzt. Das Medium wurde während der ersten 14 Tage der Kultur mit 5 ng/mL IL-7, 1 ng/mL IL-12, 5 ng/mL IL-15 und 10 ng/ml IL-21 substituiert. Ab Tag 14 wurde IL-12 durch 100 U/ml IL-2 ersetzt. Die Restimulation der Kultur erfolgte wöchentlich mit bestrahlten AML-Blasten. Zur Expansion der Kulturen wurden die Zellen nach einer Woche in 24-*well* Platten überführt und unter Einsatz von je 10⁶ *responder* Zellen und bestrahlten AML-Blasten als Stimulatoren weiterkultiviert.

4.2.12 Herstellung EBV-transformierter B Zell-Linien

Für die Generierung EBV-transformierter B lymphoblastoider Zell-Linien (B-LCL, engl.: *B-lymphoblastoid cell line*) aus Spender- oder Patienten-Zellmaterial wurden 1x10⁷ PBMC in einem 15 ml-Falcon unter Zugabe von 0,5 ml Überstand der B95.8 Zellen für 4 Stunden bei

37°C inkubiert. Sowohl Zellen als auch Überstand wurden anschließend in einem Gesamtvolumen von 5 ml RPMI + 20% FCS + 1% Pen/Strep in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Zur Inhibition von T Zell-Wachstum wurde Cyclosporin A (CsA) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zelle zur Entfernung von Viruspartikeln und CsA gewaschen und in 5 ml frischem Medium ausgesät. Das Zellwachstum wurde täglich überprüft und je nach Bedarf frisches Medium hinzugefügt. EBV-transformierte B-LCL, die ein stabiles Wachstum aufwiesen, wurden in mittlere Zellkulturflaschen überführt und bei einer Zelldichte von $0,2-0,4 \times 10^6$ /ml in normalem Zellkulturmedium weiterkultiviert.

4.2.13 Generierung EBV-spezifischer T Lymphozyten

Alle Ansätze wurden in 48-*well* Platten in AIM-V Medium unter Zusatz von 10% Humanserum durchgeführt. Für die Generierung EBV-spezifischer CD8⁺ T Lymphozyten wurde zunächst aus den Spender 1013104 PBMC die Gesamtheit der CD8⁺ T Lymphozyten mittels MACS-Isolation (siehe Abschnitt 4.2.9.2) isoliert. Diese Fraktion wurde analog zum MLLC-Protokoll (siehe Abschnitt 4.2.11) in 24-*well* Platten mit letal bestrahlten (100 Gy) autologen EBV-B-LCL Zellen und letal bestrahlten (35 Gy) CD8⁻ *feeder* Zellen kokultiviert. Das Verhältnis der einzelnen Zellpopulationen betrug $1 \times 10^6:0,5 \times 10^6:1 \times 10^6$. Initial wurden der Kultur keine Zytokine zugesetzt, erst am Tag drei erfolgte die Substitution mit 100 U/ml IL-2 und 5 µg/ml IL-7. Die Restimulation der Kultur erfolgte wöchentlich mit bestrahlten autologen EBV-B-LCL Zellen. Zur Expansion der Kulturen wurden die Zellen nach einer Woche in 24-*well* Platten überführt und unter Einsatz von 10^6 *responder* Zellen und $0,5 \times 10^6$ bestrahlten autologen EBV-B-LCL Zellen als Stimulatoren weiterkultiviert.

4.2.14 IFN γ ELISpot zur Analyse der Reaktivität AML-reaktiver CD8⁺ CTL

4.2.14.1 Prinzip

Mit Hilfe des Interferon- γ -ELISpot (engl.: *enzyme-linked immunosorbent spot*)-Assay können IFN γ -sezernierende T Zellen auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Dazu wird ein monoklonaler Antikörper gegen humanes IFN γ auf der Nitrozellulose- oder Nylonmembran einer 96-*well* ELISpot-Platte immobilisiert, dessen variabler Bereich an ein distinktes Epitop von IFN γ bindet. Durch Ko-Inkubation von T Lymphozyten und ihren Zielzellen in den *wells* werden die T Zellen angeregt, nach Antigenerkennung IFN γ freizusetzen. Dieses wird von den auf der Membran immobilisierten Antikörpern gebunden. Nach Auswaschen der Zellen wird ein biotinylierter Sekundärantikörper zugegeben, der an ein alternatives Epitop von IFN γ bindet. Dieser wiederum wird in einem weiteren Schritt von an Streptavidin gekoppelte Peroxidase gebunden und löst durch anschließende Zugabe eines Peroxidase-Substrates eine enzymatische Farbreaktion aus. Die entstehenden farbigen „Spots“ auf der Membran

kennzeichnen den Ort der IFN γ Freisetzung durch einzelne T Zellen und entsprechen in der Summe der Frequenz und Reaktivität Antigen-spezifischer T Zellen.

4.2.14.2 Durchführung

Zur Vorbereitung des Assays wird die ELISpot-Platte (96-well Mikrotiterplatte mit Boden aus Nitrozellulosemembran) mit 10 $\mu\text{g/ml}$ des mAb 1-D1K (anti-IFN γ , Stock 1 mg/ml, Mabtech) beschichtet. Dazu wird die Stamm-Lösung entsprechend mit PBS verdünnt. Pro well werden 60 μl eingesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die wells drei Mal mit 150 $\mu\text{l/well}$ PBS gewaschen, um überschüssigen ungebundenen Antikörper zu entfernen. Durch Zugabe von 150 $\mu\text{l/well}$ FCS-haltigem Medium für 1 h bei 37°C werden freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Anschließend wird das Medium entfernt und die Platte durch mehrmaliges Ausklopfen getrocknet. Die Zugabe der Effektorzellen (10^3 – 2×10^4 /well) erfolgt in 100 μl AIM-V Medium. Anschließend wird die Platte für 15 min stehen gelassen, um ein Absinken der Effektorzellen auf die Membran sicherzustellen. Die Zugabe der Zielzellen (AML-Blasten: 5×10^4 - 1×10^5 /well, EBV-B Zellen: 5×10^4 /well, DCs: 1×10^4 /well) erfolgt ebenfalls in 100 μl AIM-V Medium und wird sehr langsam durchgeführt, um die abgesunkenen Effektorzellen nicht zu beeinträchtigen. Anschließend erfolgt die Inkubation der Platte über Nacht bei 37°C und 5% CO $_2$.

Am folgenden Tag findet die Entwicklung statt. Dazu wird die Platte zunächst sechs Mal mit Waschpuffer (PBS+0,05% Tween20) gewaschen, um Effektor- und Zielzellen zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrift wird die Platte gut ausgeklopft. Die Zugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers (7-B6-1-Biotin, Stock 1 mg/ml, Mabtech) erfolgt in 80 $\mu\text{l/well}$. Dazu wird der Sekundärantikörper auf 2 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/BSA 0,5% verdünnt. Anschließend wird die Platte für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf von 1,5 h wird der Avidin-Peroxidase-Komplex (APC, Vectastain Elite Kit, Vector) vorbereitet. Dazu werden einen Tropfen Reagenz A und ein Tropfen Reagenz B mit der 10 ml PBS/Tween20 0,1% gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte erneut sechs Mal gewaschen (siehe oben) und 80 $\mu\text{l/well}$ der APC-Lösung zugegeben. Die Platte wird 1 Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend drei Mal mit PBS+0,05% Tween20 und drei Mal mit PBS gewaschen. Nachfolgend wird das 3-Amino-9-Ethylcarbazol-(AEC-) Substrat angesetzt. Dazu wird eine Tablette in 2,5 ml Dimethylformamid unter dem Abzug gelöst und mit Acetatpuffer auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wird die Lösung über einen 0,45 μm -Filter sterilfiltriert. Für die weitere Verwendung wird die Lösung unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert. Erst kurz vor Gebrauch werden 25 $\mu\text{l}/50$ ml 30%iges H $_2$ O $_2$ hinzugegeben. Pro well werden 100 μl der fertigen AEC-Lösung zugefügt und für 4 – 10 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Die Färbereaktion wird durch Spülen mit fließendem Leitungswasser abgestoppt. Nach dem

Entfernen der Rückseite der Platte wird diese über Nacht im Dunkeln bei RT getrocknet und bis zur Auswertung dunkel gelagert. Die Auszählung der einzelnen entstandenen IFN γ -Spots erfolgt halbautomatisiert und standardisiert mit Hilfe der KSELISpot 4.9 Software (Zeiss, Jena, Germany).

Zur Identifizierung der individuellen HLA-Restriktion von T Zell-Populationen wurden Blockade-ELISpot Assays durchgeführt. Dabei werden HLA-spezifische mAb mit den jeweiligen Zielzellen inkubiert. Durch die Abschirmung des HLA-Moleküls inklusive gebundenem Peptid kann keine Erkennung des Zielantigens durch die T Zellen mehr stattfinden. Löst die Zugabe eines spezifischen Blockade-Antikörpers eine teilweise oder komplette Abnahme der Anzahl an IFN- γ -Spots aus, ist die Erkennung durch die jeweilige Effektorzelle teilweise bzw. komplett über das blockierte HLA-Molekül restringiert.

Folgende HLA-spezifischen Blockade-Antikörper wurden verwendet:

- W6/32: Dieser Maus IgG2a-Antikörper blockiert alle klassischen HLA-Klasse I Moleküle (HLA-A, -B, -C) und einige der nicht klassischen HLA-Klasse I Moleküle (HLA-E, -J und vermutlich auch HLA-G und -F). Die Konzentration von W6/32 im Blockadetest betrug zwischen 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$.
- HB55: Maus IgG2a. Dieser Antikörper blockiert alle HLA-Klasse II DR-Allele. Die Konzentration von HB55 im Blockadetest betrug zwischen 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$.
- B123-2: Dieser Maus IgG2a-Antikörper blockiert alle HLA-Klasse I B- und C-Allele. Die Konzentration von B123-2 im Blockadetest betrug zwischen 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$.
- SFR8B6: Dieser Maus IgG2b-Antikörper blockiert alle Allele der HLA-Klasse I Bw6-Gruppe sowie HLA-Klasse I C-Allele. Die Konzentration von SFR8B6 im Blockadetest betrug zwischen 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.15 $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest zur Analyse der spezifischen Lyse-Fähigkeit

Die Analyse der spezifischen Lyse-Fähigkeit der in MLLC generierten (siehe 4.2.11) AML-reaktiven CTLs mittels $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest erfolgte ausschließlich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr, Universitätsmedizin Mainz. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die jeweiligen Zielzellen (1×10^6) wurden für 2 Stunden mit 100 μCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) unter Zusatz von 50 μL FCS inkubiert. Die markierten Zielzellen wurden gewaschen und je $1,5 \times 10^3$ Zellen in 80 μl pro *well* in konischen 96-*well* Platten ausgesät. Die CTLs wurden ebenfalls à 80 μl in verschiedenen Effektor zu Zielzelle-Verhältnissen (E:T, engl.: *effector to target*) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 37°C wurden 80 μl des Überstands in einem Packard Cobra Gamma

Zähler gemessen (Perkin Elmer). Die prozentuale spezifische Lyse-Fähigkeit wurde anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = 100 \times \frac{(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})}{(\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})}$$

Als Kontrollen dienten die Inkubation der Zielzellen ausschließlich mit Medium/PBS (= minimale Freisetzung) sowie die Inkubation der Zielzellen mit PBS+1% TritonX100 (= maximale Freisetzung).

4.2.16 Studien zu Adhäsion und Transmigration

4.2.16.1 PKH Färbung

Zur Unterscheidung der untersuchten T Zell-Populationen in der Flusskammer mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die mit Hilfe von MACS[®] Technologie aufgereinigten T Zellen mit PKH-Farbstoffen in grün bzw. rot angefärbt. PKH-Farbstoffe bestehen aus einer langen aliphatischen Kohlenwasserstoffkette, an die ein Fluorophor gekoppelt ist. Die Kohlenwasserstoffkette inseriert in die Lipidmembran von Zellen und führt so zu einer Markierung der Zelloberfläche. Der Farbstoff eignet sich für *in vitro* und *ex vivo* Markierungen von Zellen, *in vitro* Proliferationsstudien sowie dem *in vitro* und *in vivo tracking* von Zellen [211]. Beide Farbstoffe, PKH-67 (grün) und PKH-26 (rot), wurden von Sigma Aldrich bezogen und entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt. Zunächst wurden die T Zellen in serumfreiem Medium gewaschen und pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet pro 2×10^7 T Zellen in 1 ml Diluent C resuspendiert. Im Anschluss wurden pro 2×10^7 T Zellen je 4 μ l des Farbstoffs in 1 ml Diluent C verdünnt. Das Farbstoff-Gemisch wurde direkt zu den resuspendierten Zellen gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach 3 - 5 min Inkubation wurde die Zellsuspension mit einem äquivalenten Volumen FCS gemischt, für 1 min inkubiert und für 10 min bei 1500 UPM in einer Eppendorf Zentrifuge 5810R zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde anschließend drei Mal mit serumhaltigem Medium gewaschen und abzentrifugiert. Nach Resuspension in entsprechendem Medium wurden die Zellen mittels FACS auf Intensität und Homogenität der Färbung kontrolliert. Je nach Verlauf wurden die Zellen anschließend direkt für weitere Versuche verwendet oder in Kultur genommen.

4.2.16.2 Flow Chamber (Flusskammer) Experimente

Zur Untersuchung des Transmigrationsmechanismus humaner T Zellen über murine Blutgefäße wurden Versuche in der sogenannten *flow chamber* (deutsch: Flusskammer) durchgeführt. Dieser experimentelle Aufbau simuliert den physiologischen Fliessvorgang in einem

Blutgefäß und ermöglicht dynamische Studien zur Adhäsion und Transmigration von humanen Leukozyten an murinen Endothelzellen (EC, engl.: *endothelial cells*) unter definierten hydrodynamischen Bedingungen. Der allgemeine Aufbau einer Flusskammer ist in Abbildung 7 schematisch gezeigt.

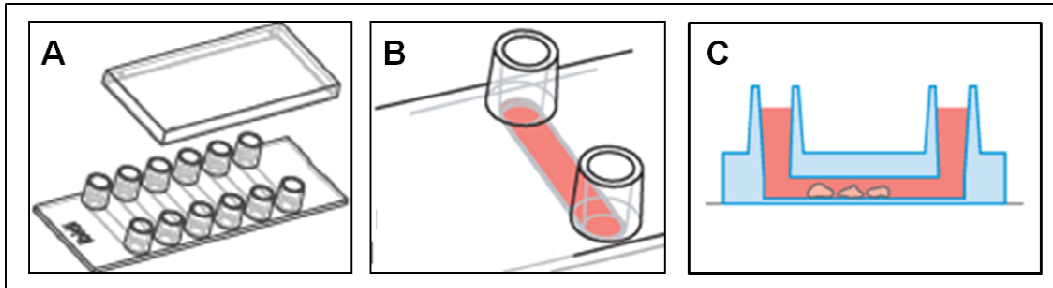


Abbildung 7: Aufbau der Flusskammer. **A** Aufsicht auf die Flusskammer; jede Kammer besitzt 6 einzelne Kanäle, die über je einen Zu- und Ablaufstutzen verfügen. **B** Ansicht eines einzelnen Kanals mit einem Volumen von 30 µl **C** Seitenansicht eines einzelnen Kanals. Adhärente Zellen können auf dem Boden des Kanals kultiviert werden (verändert nach www.IBIDI.de).

Alle Versuche wurden in IBIDI® µ-Slide VI^{0.4} Flusskammern unter nicht-sterilen Bedingungen durchgeführt. Jede Kammer besitzt sechs individuelle Kanäle mit einem Volumen von je 30 µl, die über endständige Stutzen mit zu- und abführenden Schläuchen verbunden werden können (siehe Abbildung 7). Eine Zellkultur-geeignete Beschichtung ermöglicht die Kultur von adhären Zellen auf dem Boden der einzelnen Kanäle. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden die Flusskammern zur Kultivierung von humanen und murinen Endothelzellen genutzt. Diese wurden in entsprechender Zellzahl ausgesät, so dass sie in den Kanälen nach zwei bis drei Tagen Kultur bei 37°C, 5% CO₂ Konfluenz erreichten. Kammern mit konfluenten EC-Schichten wurden auf dem Objektisch eines inversen Fluoreszenz-Mikroskops mit gekoppelter CCD-Kamera und Laserquelle fest montiert. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Durch Anschluss des zuführenden Schlauchs an eine Spritzenpumpe mit integriertem Drei-Wege-Hahn konnten Flüssigkeiten mit exakt definierter Fließgeschwindigkeit durch die Kanäle geleitet werden. Der resultierende Scherdruck berechnet sich wie folgt:

$$\tau \left[\frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2} \right] = 1.761 \phi \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right]$$

Mit Hilfe des Drei-Wege-Hahns wurden zudem humane und/oder murine T Zellen durch die Kanäle geleitet, um deren Interaktionen mit der EC-Schicht zu analysieren. Die Isolierung und Stimulation der T Zellen erfolgte wie in den Abschnitten 4.2.9.2, 4.2.9.3 und 4.2.9.4 beschrieben. Die Fluoreszenz-Markierung fand wie in Abschnitt 4.2.16.1 beschrieben statt. Die zu untersuchenden T Lymphozyten wurden auf 1x10⁶/ml in HBSS⁺ eingestellt und je 500 µl Zellsuspension in einer 1 ml Spritze pro Kanal durch den Drei-Wege-Hahn injiziert. Jeder Kanal wurde nur ein Mal benutzt.

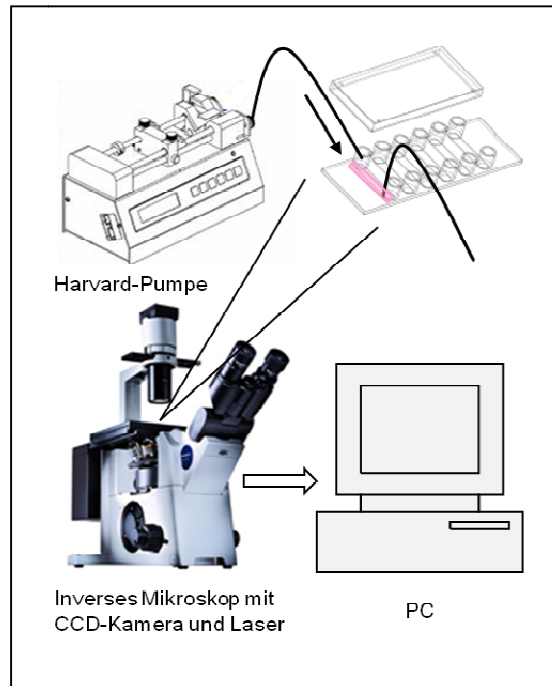


Abbildung 8: Experimenteller Aufbau der Flusskammer-Versuche. Die mit Endothelzellen beschichtete Flusskammer wird auf dem Objektträger-Tisch des inversen Mikroskops befestigt. Die Kanäle der Kammer werden mit Hilfe eines Schlauchs mit der Spritzenpumpe verbunden. Über den Drei-Wege-Hahn werden die T Zellen infundiert. Die Analyse der Versuche erfolgt mittels Cell F Imaging Software (Olympus, Hamburg) am PC. Bildquellen: <http://www.biophysics.com/images/ibidi/6Flow.gif>; <http://www.optik-foto-mueller.com/Olympusmikro/olympusmicroindex.html>; <http://www.jyi.org/articleimages/1510/originals/img2.jpg>

Die Perfusion der T Zellen erfolgte unter definiertem Scherdruck: Das initiale Aufspülen der Zellen erfolgte bei einem niedrigen Scherdruck von $0.2 - 0.35 \text{ dyn/cm}^2$. Zur Analyse von fester Adhäsion und Transmigration wurde der Scherdruck nach dem Aufspülen aller Zellen schrittweise alle 30 sec auf 1 dyn/cm^2 , 2 dyn/cm^2 , 5 dyn/cm^2 , 8 dyn/cm^2 und den Maximalwert von 15 dyn/cm^2 erhöht. Das Adhäsionsverhalten der einzelnen T Zellen wurde in Echtzeit auf einem angeschlossenen PC mit Hilfe einer CCD-Kamera und der Cell F Imaging Software (Olympus, Hamburg) überwacht. Es wurden folgende serielle Aufnahmen von je einem Bildausschnitt pro Kanal gemacht:

- Aufnahme vor Aufspülen der T Zellen (Ausgangszustand)
- Aufnahme nach Aufspülen der T Zellen mit niedrigem Scherdruck („Initial adhären-
de Zellen“)
- Aufnahmen im Abstand von 30 sec nach jeder Erhöhung des Scherdrucks
- Aufnahme nach der letzten Scherdruckerhöhung („Fest adhären-
de Zellen“)

Je nach Versuchsansatz wurde die oben genannte Bildfolge erweitert oder reduziert. Sofern fluoreszenzmarkierte Zellen eingesetzt wurden, fanden die Aufnahmen in den gewählten Fluoreszenzkanälen statt. Die Auswertung der Versuche erfolgte am PC mit Hilfe der Cell F Imaging Software (Olympus, Hamburg).

4.2.16.3 Transwell Experimente

4.2.16.3.1 Prinzip

Zur Untersuchung des Transmigrations-Mechanismus von T Lymphozyten über EC-Schichten wurden Transwell Experimente durchgeführt. Der schematische Aufbau des Transwell Systems ist in Abbildung 9 gezeigt. Die Transwell Einsätze besitzen an der Unterseite eine Zell-permeable Membran mit definierter Porengröße. Je nach geplanter Anwendung sind unterschiedliche Membranen und Porengrößen erhältlich.

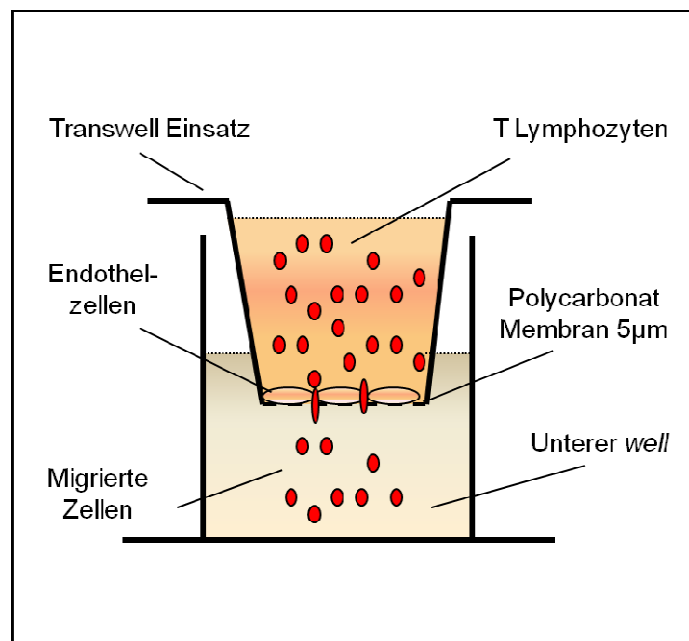


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Transwell Platte und des Transwell Einsatzes. Oberer sowie unterer *well* werden durch eine Zell-permeable Polycarbonat-Membran getrennt. Auf dieser Membran erfolgt die Kultur von Endothelzellen bis zur Konfluenz. Die zu untersuchenden Zellen (\pm Zugabe von blockierenden Antikörpern) werden in den oberen *well* gefüllt, der untere *well* enthält Medium \pm Zusatz eines Chemokins zur Induktion der Transmigration. Nach Ablauf des Inkubationszeit erfolgte die Quantifizierung der Zellen im oberen bzw. unteren *well*.

Die Polycarbonat-Membran erlaubt die Kultur von Endothelzellen auf ihrer Oberfläche, wodurch der Transmigrationsprozess von T Lymphozyten über Endothelzellen untersucht werden kann. Für den Versuch wurden Endothelzellen auf der Oberseite der Polycarbonat-Membran zur Konfluenz kultiviert und anschließend Populationen von T Lymphozyten in den oberen Einsatz gegeben. Durch Zugabe eines Chemokins in den unteren *well* wird die Transmigration der T Lymphozyten induziert. Unter Einsatz verschiedener funktionsblockierender mAb kann die Rolle einzelner Adhäsions-Moleküle für den Transmigrationsprozess untersucht werden.

4.2.16.3.2 Durchführung

In den hier durchgeführten Experimenten wurden Polycarbonat-Membranen mit einer Porengröße von fünf μm und einem Durchmesser von 6,5 mm in 24-*well* Platten eingesetzt. Diese

Kombination ist für die Analyse der Transmigration von T Lymphozyten besonders geeignet (siehe http://catalog2.corning.com/Lifesciences/media/pdf/transwell_guide.pdf). Die Einsätze wurden zunächst mit 100 µl 0,1% porciner Gelatine-Lösung beschichtet und für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Überschüssige Gelatine wurde entfernt und die Einsätze zwei Mal vorsichtig mit PBS gewaschen. Jeder Einsatz und jeder untere *well* wurden mit 100 µl bzw. 600 µl des jeweiligen Endothelzell-Mediums (für bEND.3 oder bEND.5) versehen und für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die entsprechenden Endothelzellen trypsinisiert, gewaschen und auf 5 – 7,5x10⁵ Zellen/ml in Endothelzell-Medium eingestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium aus den Einsätzen entfernt und je 100 µl der eingestellten Endothelzell -Suspension hinzugefügt. Nicht-adhärenente Zellen wurden nach 18 Stunden entfernt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ bis zum Erreichen der Konfluenz (~vier bis sechs Tage) kultiviert. Die Konfluenz der Endothelzell-Monolayer wurde durch Messung der Permeabilität für Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran 3000 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Germany) getestet. Zur Durchführung der Transwell Versuche wurden die Endothelzell-Monolayer 16 Stunden vor Versuchsbeginn mit 20 ng/ml TNF-α stimuliert. Um die Quantifizierung der einzelnen T Zell-Populationen nach Ablauf des Assays zu erleichtern wurden humane und murine T Lymphozyten mit unterschiedlichen PKH-Farbstoffen fluoreszent in grün (human) bzw. rot (murin) markiert (siehe Abschnitt 4.2.16.1). In einigen Versuchen wurden die T Lymphozyten und/oder Endothelzellen mit funktions-blockierenden mAbs (20 µg/ml in PBS) für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Als Kontroll-Antikörper wurde ein mAb gegen CD105 (Endoglin) eingesetzt, das auf Endothelzellen stark exprimiert wird, jedoch funktional nicht an der Transmigration von T Lymphozyten beteiligt ist. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit PBS entfernt. Vor der Zugabe der T Lymphozyten in das obere Kompartiment des Transwell Einsatzes wurden die Endothelzell-Monolayer drei Mal mit Transmigrations-Medium gewaschen. Die unteren *wells* wurden mit 600 µl Transmigrations-Medium mit oder ohne Zugabe von 200 ng/ml rekombinantem humanem CCL-21 befüllt. Anschließend wurden die T Lymphozyten (0,25 – 1x10⁶ Zellen in 100 µl Transmigrations-Medium/*well*) hinzugegeben. Die Transwell Platten wurden für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle zur Quantifizierung der Anzahl migrierter Zellen wurde eine 100 µl-Probe der initial eingesetzten T Lymphozyten zurückgestellt. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die transmigrierten Zellen aus den unteren *wells* in FACS-Röhrchen überführt, gewaschen und durch Zugabe von 200 µl PFA (4%) fixiert. Die Analyse der Proben erfolgte an einem FACS Canto Durchflusszytometer. Dazu wurde jede Probe 30 sec gemessen und mit der Anzahl gemessener Zellen in der zurückgestellten Kontrolle verglichen.

4.2.17 Arbeiten mit Versuchstieren

Für alle *in vivo* Experimente wurden die bereits in Abschnitt 2.5 beschriebenen NSG- Mäuse verwendet. Die Gewinnung von murinen CD90.2⁺ T Lymphozyten erfolgte ausschließlich aus adulten BALB/cJ Mäusen. Die Tiere wurden über das Jackson Laboratory (Bar Harbor, MA, USA) bezogen (Stock Nummer 005557). Die Zucht, Haltung und Manipulation der Tiere erfolgte in der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter sterilen (SPF, engl.: *specific pathogen free*) Bedingungen. Die Tiere erhielten Wasser und Trockenfutter *ad libitum*. Dem autoklavierten Trinkwasser wurde zusätzlich 0,08 mg/ml Borgal (Sulfadoxinum, Trimethoprimum) zugesetzt. Die Versuche wurden gemäß der Richtlinien der europäischen Union durchgeführt und von der deutschen Tierschutzbehörde genehmigt.

4.2.17.1 Ganzkörperbestrahlung von Versuchstieren

Zur Konditionierung der Versuchstiere werden diese 16 – 24 Stunden vor der Transplantation humaner AML Blasten sublethal mit einer Dosis von 150 cGy durch eine ¹³⁷Cs-Quelle bestrahlt. Diese Konditionierung ist nötig, um ein verbessertes Anwachsen der AML Blasten zu ermöglichen [201, 212].

4.2.17.2 Gewinnung von peripheren Blutproben

Zur Gewinnung peripherer Blutproben aus Versuchstieren wurden die Tiere mit Hilfe einer Rotlichtlampe erwärmt und anschließend die lateralen Schwanzvenen mit einem Skalpell punktiert. Das austretende Blut wurde in sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäßen, in denen 20 µl Heparin vorgelegt wurde, aufgefangen und durch Invertieren mit dem Heparin vermischt. Somit konnte die Agglutination des Bluts verhindert werden.

4.2.17.3 Intravenöser Transfer von Einzelzellsuspensionen

Die Inokulation von Versuchstieren mit AML Blasten bzw. der Transfer von AML reaktiven T Lymphozyten erfolgte mittels intravenöser (i.v.) Transplantation von Einzelzellsuspensionen. Dazu wurden die zu transplantierenden Zellen auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Es wurden jedoch nie mehr als 1×10^7 Zellen pro Versuch pro Tier transplantiert. Die Tiere wurden vor dem Transfer mit Hilfe einer Rotlichtlampe erwärmt, um die laterale Schwanzvene durch den erhöhten Blutfluss besser hervortreten zu lassen. Die Einzelzellsuspensionen der zu transplantierenden Zellen wurden in einer sterilen 1-ml Spritze mit 0,45 x 13 mm Kanüle aufgezogen und i.v. appliziert.

4.2.17.3.1 Transfer von AML Blasten

Der Transfer von AML Blasten erfolgte in 100 µl des Mediums für adoptiven Transfer. Die Blasten wurden, je nach Versuchsansatz, auf Zellzahlen von 1×10^4 – 1×10^7 Zellen/100 µl eingestellt.

4.2.17.3.2 Transfer von AML-reaktiven CTL

Der Transfer AML-reaktiver CTL erfolgte in jedem Experiment an Tag 5 nach der letzten Restimulation mit lethal bestrahlten AML-Blasten. Dazu wurden die $CD8^+$ CTL geerntet, gewaschen und in 100 µl des Mediums für adoptiven Transfer auf 5×10^6 Zellen/100 µl eingestellt. In einigen Fällen wurden zusätzlich 10% (5×10^5) frisch aus PBMC isolierte oder aufgetaute $CD4^+$ T Zellen hinzugefügt, so dass insgesamt $5,5 \times 10^6$ Zellen/100 µl transferiert wurden. Zusätzlich wurden die Zellsuspensionen vor dem Transfer mit 1000 U/100 µl IL-2 und 20 µg/100 µl Fc-IL-7 substituiert.

4.2.17.4 Chirurgische Entnahme und Aufarbeitung von Organen

Die Versuchstiere wurden durch Genickbruch (zervikale Dislokation) der Analyse zugeführt. Mittels sterilem chirurgischen Besteck und nach Desinfektion der Kadaver mit 70%igem Ethanol wurden die gewünschten Organe (Milz, Leber, Lungenlappen, Tibia, Femur) unter der Sterilbank entnommen. Dazu wurde für die Entnahme von Leber und Lunge ein senkrechter Schnitt entlang der ventralen Seite des Tieres durchgeführt und ggf. der Brustraum geöffnet. Die Entnahme der Milz erfolgte durch einen Schnitt in die linke Flanke des Tieres. Für die Gewinnung von Knochenmark wurden Tibia und Femur der hinteren Extremitäten entnommen und von Gewebe frei präpariert. Zur Herstellung von Einzelzellsuspension wurden die gesäuberten Knochen beidseitig im endostealen Bereich mit einer Schere geöffnet. Durch Ausspülen der beiden geöffneten Knochen mit Hilfe einer mit Präparationsmedium gefüllten 2 ml-Spritze und 0,45 x 13 mm Kanüle wurde das Knochenmark in ein 50 ml-Falcon mit aufgesetztem sterilen 100 µm-Zellsieb gespült. Andere Organe wie Milz, Lunge und Leber wurden nach der sterilen Entnahme ebenfalls über einem 100 µm-Zellsieb zerrieben und durch Spülen mit Präparationsmedium in eine Einzelzellsuspension überführt. Alle Einzelzellsuspensionen wurden durch Zentrifugation (1500 UPM, 4°C, 5 min) pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Pellets in Erythrozytenlyse-Medium resuspendiert und für wenige Minuten inkubiert. Durch Zugabe von Präparationsmedium im Überschuss wurde die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen erneut zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Pellets in adäquater Menge Medium resuspendiert.

5 ERGEBNISSE

5.1 Etablierung eines präklinischen murinen AML-Modells

5.1.1 Charakterisierung der primären AML-Patientenproben

Im Verlauf der Arbeit konnte durch enge Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr primäres Zellmaterial von insgesamt 17 verschiedenen AML-Patienten auf die Fähigkeit zum *Engraftment* und zur Reproduktion einer humanen Leukämie in NSG-Mäusen hin untersucht werden. Diese Etablierung eines murinen AML-Modells stellte die Basis für anschließende Untersuchungen adoptiver Transfer-Studien mit *in vitro* generierten und expandierten AML-reaktiven CTL dar.

Bei den Proben handelte es sich zumeist um Leukapheresate, zum Teil aber auch um periphere Blutproben oder Knochenmarks-Aspirate. Die Blasten wurden jeweils mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und direkt eingesetzt oder für den späteren Gebrauch kryokonserviert. Alle Proben wurden zunächst eingehend immunphänotypisch mittels Durchflusszytometrie und zytogenetisch untersucht. In Tabelle 14 sind die allgemeinen Charakteristika der einzelnen Patientenproben zusammenfassend dargestellt. Dazu zählen Alter und Geschlecht des Patienten, die FAB-Klassifikation und Immuntypisierung der einzelnen Proben sowie die dazugehörigen zytogenetischen Befunde. Hinsichtlich aller aufgeführten Parameter deckten die untersuchten AML Patienten-Proben eine breite Spanne ab.

Tabelle 14: Charakteristika der untersuchten AML Patientenproben

Patienten Nr.	Alter/Sex	FAB-Klassifikation	AML-Blasten Herkunft	Immunologische Subpopulationen				Zytogenetik	
				% CD3 ⁺	% CD19 ⁺	% CD16/56 ⁺	% CD34 ⁺ (38 ⁻)	Karyotyp	Mutationen
<i>MZ529</i>	39/W	M0/1	LP	2,1	1,5	0,7	4 (2,4)	46XX	Flt3-ITD
<i>MZ804</i>	33/M	M0/1	LP	2	0,5	0,7	61 (27,1)	Komplex, 5q ^{del}	-
<i>MZ625</i>	80/M	M0/1	PB	1,5	0,4	0,1	82,3 (51,2)	Aberrationen	-
<i>MZ667</i>	54/W	M1	LP	0,6	0,4	0,2	14,6 (13,1)	46XX	Flt3-ITD; NPM1
<i>MZ308</i>	78/W	M1	LP	2,2	1,5	0,3	0 (0)	46XX	Flt3-ITD
<i>MZ683</i>	54/W	M2	LP	2	0,8	0,4	28 (11,5)	46XX	Flt3-ITD
<i>MZ131</i>	72/M	M2	PB?	2,2	0,5	0,7	1,6 (0,6)	k.A.	Flt3-ITD
<i>MZ580</i>	54/M	M4	LP	1,2	1,1	0,1	19,5 (16,4)	46XY	Flt3-ITD; NPM1
<i>MZ872</i>	58/M	M4	LP	0,7	0,2	2,3	1 (0,1)	k.A.	-
<i>MZ987</i>	55/M	M4 (sek. aus MDS)	LP	3	19,1	0,5	21,5 (1,6)	k.A.	Flt3-ITD
<i>MZ237</i>	46/W	M4eo	LP	3	0,7	0,5	79,1	k.A.	Flt3-ITD
<i>MZ251</i>	57/W	M4eo	LP	1,9	1,5	1	37,9 (25)	46XY Inv(16)	-
<i>MZ574</i>	43/M	M4eo	LP	1,3	1	0,5	37,5 (21,3)	46XY Inv(16)	Flt3-D835
<i>MZ561</i>	76/W	M5	LP	5	2,2	0,2	55,1 (40,6)	k.A.	-
<i>MZ653</i>	75/W	M5	LP	3,6	0,9	8,1	6,4 (2,5)	46XX	-
<i>MZ484</i>	76/M	M5a	LP	1,9	0,3	1,2	74,5 (53,3)	k.A.	Flt3-ITD
<i>MZ418</i>	48/M	M5b	LP (Rezidiv)	0,9	0,4	0,3	1,2 (0,7)	46X delY	-

W=weiblich, M=männlich, LP= Leukapheresat, PB=peripheres Blut, k.A. = keine Angabe

5.1.2 Untersuchung des *Engraftment*-Potentials primärer AML-Proben *in vivo*

Zur initialen Untersuchung des *Engraftment*-Potentials humaner AML-Blasten von verschiedenen Spendern wurden Zellen aus primärem Patientenmaterial zu 5×10^6 - 1×10^7 Blasten i.v. in die Schwanzvene kleiner Kohorten von subletal bestrahlten NSG-Mäusen transplantiert. Die Tiere wurden über maximal 12 Wochen beobachtet und durch wöchentliche Blutentnahme auf das Anwachsen der AML Blasten hin überwacht und regelmäßig auf Anzeichen einer *GvH*-Erkrankung inspiziert. Das periphere Blut wurde mittels Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein humaner $CD33^+/CD45^+$ und $CD3^+/CD45^+$ Zellen hin untersucht. Sofern keine Abbruchkriterien zu einem frühzeitigen Versuchsende führten, wurden die Versuchstiere nach 8-12 Wochen durch zervikale Dislokation getötet und peripheres Blut, Milz und Knochenmark mittels immunphänotypischer Analyse im Durchflusszytometer eingehend untersucht. Als Abbruchkriterien galten offensichtliche klinische Anzeichen einer *GvHD* (Gewichtsverlust >15%, schlechter Allgemeinzustand, struppiges Fell, erhöhte Lethargie) sowie die Detektion einer hohen T Zell-Last im peripheren Blut (> 20% humane $CD3^+/CD45^+$ Zellen). Von einem erfolgreichen *Engraftment* der Versuchstiere wurde gesprochen, wenn im Knochenmark > 0,1% humane $CD33^+/CD45^+$ Zellen detektiert werden konnten.

Bei insgesamt zehn der untersuchten 17 AML-Proben konnte ein Anwachsen der humanen AML-Blasten im Knochenmark der Versuchstiere beobachtet werden (58,82%). Dabei spiegelte die Zusammensetzung der detektierten humanen Zellen bzgl. der immunologischen Subpopulationen die Ausgangssituation der transplantierten Blasten-Populationen wider, womit eindeutig die Rekapitulation der humanen Erkrankung in den Versuchstieren nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Allerdings gab es sowohl hinsichtlich der Stärke des *Engraftments* (% Anteil humaner $CD33^+/CD45^+$ Zellen im Knochenmark) als auch hinsichtlich der Zuverlässigkeit des *Engraftments* (Anzahl erfolgreich induzierter Leukämien pro Kohorte) signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 15). Die Stärke des *Engraftments* war abhängig von der Anzahl initial transplantierte Blasten sowie der Dauer der Wachstumsphase in den Versuchstieren. Aufgrund der Vielzahl der in der vorliegenden Arbeit transplantierten Versuchstiere (> 500) und der jeweils variierenden Versuchsparameter ist es nicht möglich, für die Gesamtheit der analysierten Versuchstiere absolute Prozent-Werte in Bezug auf die *Engraftment*-Stärke anzugeben. Generell konnten jedoch drei Gruppen von AML-Proben unterschieden werden:

1. Zuverlässig und reproduzierbar anwachsende Proben, die *Engraftment* in > 90% der transplantierten Versuchstiere pro Leukämie und pro Kohorte zeigten, und reproduzierbar hohe *Engraftment*-Stärken im Knochenmark zeigten.

2. Intermediär anwachsende Proben, die *Engraftment* in < 90% aber > 10% der transplantieren Versuchstiere pro Leukämie und pro Kohorte zeigten. Dabei war das *Engraftment* im Knochenmark variabel ausgeprägt.
3. Nicht anwachsende Proben, die in < 10% der transplantieren Versuchstiere pro Leukämie zum *Engraftment* führten und mit einer niedrigen *Engraftment*-Stärke einhergingen.

Tabelle 15: Ergebnis der Untersuchung des *Engraftment*-Potentials verschiedener primärer AML-Proben.
 Grün = zuverlässig in NSG-Mäusen anwachsende AML-Populationen, Orange = intermediär in NSG-Mäusen anwachsende AML-Populationen, Rot = wenig oder gar nicht in NSG-Mäusen anwachsende AML-Populationen.

Patienten Nr	Anzahl transplantierter Versuchstiere	Erfolgreiches <i>Engraftment</i>
<i>MZ131</i>	5	5/5
<i>MZ308</i>	5	4/4
<i>MZ529</i>	10	9/10
<i>MZ580</i>	5	5/5
<i>MZ667</i>	6	6/6
<i>MZ484</i>	5	2/5
<i>MZ561</i>	6	1/6
<i>MZ625</i>	6	1/6
<i>MZ683</i>	7	3/7
<i>MZ987</i>	5	1/5
<i>MZ237</i>	5	0/5
<i>MZ251</i>	5	0/5
<i>MZ418</i>	18	0/18
<i>MZ574</i>	5	0/5
<i>MZ653</i>	6	0/6
<i>MZ804</i>	9	0/9
<i>MZ872</i>	5	0/5

Die Gesamt-Effizienz des *Engraftments* lag in der Gruppe der zuverlässig anwachsenden AML-Proben bei durchschnittlich 96,67%, bei den intermediär anwachsenden AML-Proben bei durchschnittlich 27,59% und bei 0% für die nicht anwachsenden AML-Proben.

5.1.3 Verlauf des *Engraftment* einer primären AML am Beispiel der AML MZ667

Anhand der AML MZ667 soll beispielhaft der Verlauf des *Engraftment* einer zuverlässig anwachsenden humanen AML in NSG-Mäusen illustriert werden. Bei Patient MZ667 handelte es sich um eine weibliche Person, bei der im Mai 2007 im Alter von 54 Jahren eine AML FAB M1 diagnostiziert wurde. Die Patientin besaß einen normalen Karyotyp, die HLA-Klasse I Allele A 23/33 B 14/49 Cw 07/08, eine ITD-Mutation der Flt3-Kinase sowie eine Mutation des NPM1-Gens. Sie gehörte zur Gruppe der Hochrisiko-Patienten und verstarb vier Monate nach Diagnosestellung. Mit den aus Leukapheresaten gewonnenen AML-Blasten der Patientin wurde in NSG-Mäusen eine Kombination von Dosis-Eskalation und Kinetik durchgeführt. Initial wurden 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 und 5×10^6 AML MZ667-Blasten i.v. in mit 150 cGy bestrahlte Versuchstiere transferiert und bis zu drei Tiere pro Kohorte nach vier, acht oder 12 Wochen aufgearbeitet. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 10 in Form von *Dot Plots* für je ein Versuchstier exemplarisch dargestellt. Gemessen wurde der prozentuale Anteil humaner $CD33^+/CD45^+$ Zellen im Knochenmark pro Maus pro Zeitpunkt und pro anfänglich transferierte Zellzahl.

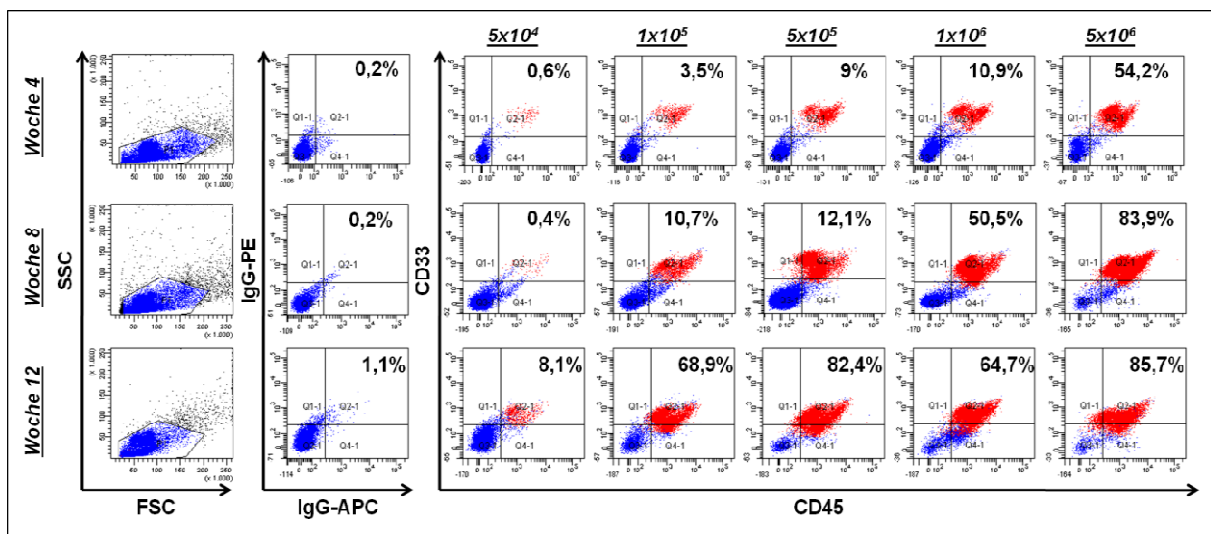


Abbildung 10: Dosis- und Kinetik des *Engraftment*-Verhaltens der AML MZ667 im Knochenmark von NSG-Mäusen. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte durch Inkubation der aus dem Knochenmark gewonnenen Einzelzellsuspension mit mAb gegen die humanen Antigene CD33 und CD45. Kontrollfärbungen wurden mit IgG-Antikörpern in Konjugation mit den entsprechenden Fluorophoren durchgeführt.

Anhand von Abbildung 10 ist ersichtlich, dass die Stärke des *Engraftments* sowohl Dosis- als auch zeitabhängig ist. Der Transfer der niedrigsten Zelldosis von 5×10^4 AML MZ667-Blasten führt bereits nach vier Wochen zu einer distinkt detektierbaren Population humaner $CD33^+/CD45^+$ Zellen im Knochenmark. Gleiches gilt für alle weiteren Zelldosen. Durch die Transplantation der höchsten Zelldosis von 5×10^6 AML MZ667-Blasten war nach vier Wochen bereits eine Verdrängung der murinen Hämatopoese zu über 50% durch humane $CD33^+/CD45^+$ Zellen erkennbar. Eine länger als acht Wochen andauernde Wachstumsphase führte nach Transfer der höchsten Zelldosis zu keiner signifikanten Steigerung des *Engraft-*

ments über $\pm 80\%$ hinaus. Ähnliche hohe *Engraftment*-Raten konnten zudem auch durch die Inokulation mit niedrigeren Zelldosen nach einer *in vivo* Wachstumsphase von 12 Wochen erzielt werden.

5.1.4 Molekulare und phänotypische Unterschiede zwischen gut und schlecht anwachsenden primären AML-Proben

Bis heute existieren keine klar definierten Parameter, die eine Prognose zur Qualität des *Engraftments* einer AML-Probe nach Transplantation in immundefiziente Mäuse erlauben. Somit kann das *Engraftment*-Verhalten von Patienten-Proben nur experimentell durch adoptiven Transfer ermittelt werden. Um potentielle Parameter, die mit einer reproduzierbar hohen *Engraftment*-Stärke korrelieren zu identifizieren, wurden die in der vorliegenden Arbeit transplantierten AML-Proben entsprechend der erfolgten Gruppierung (siehe Abschnitt 5.1.2) und hinsichtlich ausgewählter molekularer und immunphänotypischer Eigenschaften klassifiziert. Korrelationen mit dem *Engraftment* in Mäusen würde unter Umständen eine Prognose über das *in vivo* Verhalten unbekannter AML-Proben erlauben. Folgende Parameter wurden dabei verglichen:

- FAB-Klassifikation
- Flt3-Mutations-Status
- Anteil CD34⁺/CD38⁻ Blasten
- Anteil CD184⁺ (CXCR4⁺)/CD45⁺ Blasten

In Tabelle 16 sind vergleichend sowohl die FAB-Klassifikation als auch der Flt3-Status der untersuchten Patienten-Proben in Abhängigkeit vom *Engraftment* in NSG-Mäusen nach Transfer dargestellt.

Tabelle 16: Korrelation zwischen dem *Engraftment*-Potential einzelner primärer AML-Proben, dem Vorhandensein von FLT3-Mutationen sowie der FAB-Klassifikation. Grün = zuverlässig in NSG-Mäusen anwachsende AML-Populationen, Orange = intermediär in NSG-Mäusen anwachsende AML-Populationen, Rot = wenig oder gar nicht in NSG-Mäusen anwachsende AML-Populationen. ITD = *internal tandem duplication*.

Patienten Nr	FAB-Klassifikation	Flt3-Mutation
MZ529	M0/1	ITD ⁺
MZ667	M1	ITD ⁺
MZ308	M1	ITD ⁺
MZ131	M2	ITD ⁺
MZ580	M4	ITD ⁺
MZ625	M0/1	-
MZ683	M2	ITD ⁺
MZ987	M4 (sek. aus MDS)	ITD ⁺
MZ561	M5	n.d.
MZ484	M5a	ITD ⁺
MZ804	M0/1	-
MZ872	M4	-
MZ237	M4eo	ITD ⁺
MZ251	M4eo	-
MZ574	M4eo	D835 ⁺
MZ653	M5	-
MZ418	M5b	-

Anhand von Tabelle 16 ist ersichtlich, dass alle AML-Proben der zuverlässig anwachsenden Gruppe Flt3-Mutationen aufweisen die primär aus ITD-Mutationen bestehen. Eine Korrelation mit der FAB-Klassifikation schien ebenfalls vorzuliegen. Die Mehrheit der Proben gehörte zur Gruppe mit minimalen Differenzierungsgraden (M0-M2). Die AML-Proben der intermediär anwachsenden Gruppe wiesen hingegen keine einheitliche Zugehörigkeit zu einer bestimmten FAB-Klassifikation auf, besaßen jedoch analog zu den zuverlässig anwachsenden AML-Proben in der Mehrzahl der Fälle eine Flt3-Mutation. Die Patienten, deren AML-Blasten nicht zum *Engraftment* in NSG-Mäusen führten, wiesen zu >70% keine Flt3-Mutationen auf und gehörten vornehmlich den FAB-Klassifikationen M4-M5 an.

Die vergleichende Analyse des *Engraftment*-Potentials mit der Oberflächen-Expression von CD34 und CD184 ist in Abbildung 11 dargestellt.

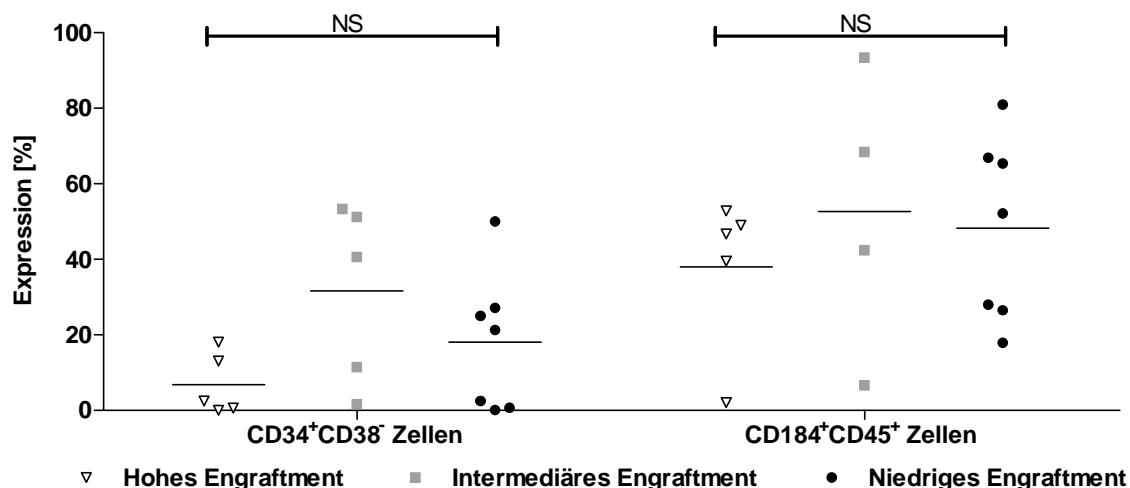


Abbildung 11: Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Stärke des *Engraftment*-Potentials und der Oberflächen-Expression von CD34 und CXCR4 (CD184) auf primären AML-Blasten. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD34⁺CD38⁻ sowie CD184⁺CD45⁺ Zellen für AML-Proben mit hohem (Δ), intermediärem (◻) und niedrigem (●) *Engraftment*-Potential. Angegeben sind sowohl die Expressions-Stärken jeder einzelnen Probe als auch der Mittelwert (-). Statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem *student's t test*. NS = nicht signifikant.

Patienten-Proben der zuverlässig anwachsenden AML-Spender wiesen im Mittel einen deutlich, jedoch nicht signifikant niedrigeren Anteil CD34⁺CD38⁻-Zellen (Mittelwert 6,82%±3,67%) auf als Spender mit intermediär (Mittelwert 31,64%±10,58%) anwachsende AML Blasten. Der Unterschied zwischen zuverlässig und schlecht (Mittelwert 18,1%±6,95%) anwachsenden sowie intermediär und schlecht anwachsenden Proben war ebenfalls nicht signifikant. Auch hinsichtlich der Expression von CD184 auf CD45⁺ Zellen war kein signifikanter Unterschied im Expressionsniveau zwischen den drei Gruppen erkennbar. Die Mittelwerte betragen 38%±2,96%, 52,7%±18,56% und 48,26%±9,17% für AML-Proben mit hohem, intermediärem und niedrigem *Engraftment*-Potential.

5.2 Adoptiver Transfer von AML-reaktiven Spender-CTL

Im Anschluss an die Etablierung des murinen Leukämie-Modells erfolgte dessen Einsatz zur Untersuchung der Effektor-Funktionen von *in vitro* generierten und expandierten AML-reaktiven humanen CTL *in vivo*. Ultimativ sollten geeignete Spender-Empfänger-Systeme gefunden werden, in denen ein zuverlässiges, reproduzierbares *Engraftment* der Empfänger AML-Blasten in NSG-Mäusen erzielt wurde und für das parallel aus HLA-identen Spender PBMC AML-spezifische CTL Klone generiert werden konnten. In der vorliegenden Arbeit konnten zwar fünf entsprechende Empfänger identifiziert werden (siehe Tabelle 15), jedoch standen für keinen der Empfänger passende HLA-idente Spender-PBMC zur Verfügung. Daher wurden alternativ CTL-Populationen aus Spender-PBMC generiert, die gegenüber dem Empfänger einen einzelnen bzw. einen dualen allelischen HLA-*mismatch* aufwiesen. Bei den so generierten Spender-Empfänger-Modellen handelt es sich um das Spender BC913183 – Empfänger MZ580-System bzw. um das Spender BC1019683 – Empfänger

MZ308-System. Der adoptive Transfer wird im Folgenden anhand dieser beiden Systeme eingehend beschrieben.

Insgesamt wurde im Verlauf dieser Arbeit in 134 von 179 Versuchstieren erfolgreich das *Engraftment* von AML MZ580-Blasten und in 42 von 84 Versuchstieren das *Engraftment* von AML MZ308-Blasten nachgewiesen. Die zu einer 100%igen *Engraftment*-Rate fehlenden Tiere sind entweder frühzeitig nach Inokulation mit den jeweiligen AML-Blasten verstorben (MZ580: 9/179, MZ308: 20/84) oder es wurde durch den adoptiven Transfer der CTL eine Remission der Leukämie erreicht (MZ580: 36 von 179 NSG-Mäuse, MZ308: 22 von 84 NSG-Mäuse).

5.2.1 Das System AML MZ580 – *single-mismatch* reaktive CTL

5.2.1.1 Charakterisierung des Spender-Empfänger-Systems

Bei Empfänger AML MZ580 handelte es sich um einen männlichen Patienten, bei dem im Februar 2007 im Alter von 54 Jahren eine AML FAB M4 diagnostiziert wurde. Der Patient besaß einen normalen Karyotyp, die HLA-Klasse I Allele A 01/01 B 57/57 Cw 06/06, eine ITD-Mutation der Flt3-Kinase sowie eine Mutation des NPM1-Gens. Er gehörte zur Gruppe der Hochrisiko-Patienten und verstarb sieben Monate nach Diagnosestellung. Zwischen PBMC-Spender BC913183 und Empfänger MZ580 lag auf HLA-Klasse I-Ebene in Spender-Empfänger-Richtung eine Inkompatibilität bezüglich des Allels HLA-B*57:01 vor. Die generierten CTL wiesen somit eine *single-mismatch*-(deutsch: einzelne Diskrepanz-) Reaktivität auf. Da der Empfänger MZ580 homozygot bezüglich aller HLA-Klasse I-Allele war, spielten die inkompatiblen zweiten Allele des heterozygoten Spenders BC913183 für die Generierung *single-mismatch* reaktiver CTL keine Rolle. In Tabelle 17 sind die hochaufgelösten HLA-Identitäten des Spender-Empfänger Systems BC913183/MZ580 gegenübergestellt.

Tabelle 17: Übersicht der HLA-Identität zwischen PBMC-Spender BC913183 und Empfänger AML-Patient MZ580. Die singuläre allelische Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger ist fett markiert.

	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
MZ580 AML	<i>01:01</i>		57:01		<i>06:02</i>	
BC913183	<i>01:01</i>	30:01	13:02	18:01	<i>06:02</i>	07:01

5.2.1.2 Isolierung naiver CD8⁺ und CD4⁺ T Zellen aus Spender 913183 PBMC

Die immunmagnetische Isolierung der für die Generierung AML MZ580-*single-mismatch*-reaktiver CTL benötigten naiven CD8⁺ T Lymphozyten erfolgte wie in Abschnitt 4.2.9.1 beschrieben. Die Reinheit der Isolation sowie der Phänotyp der isolierten Zellen wurden im Durchflusszytometer überprüft (siehe Abbildung 12).

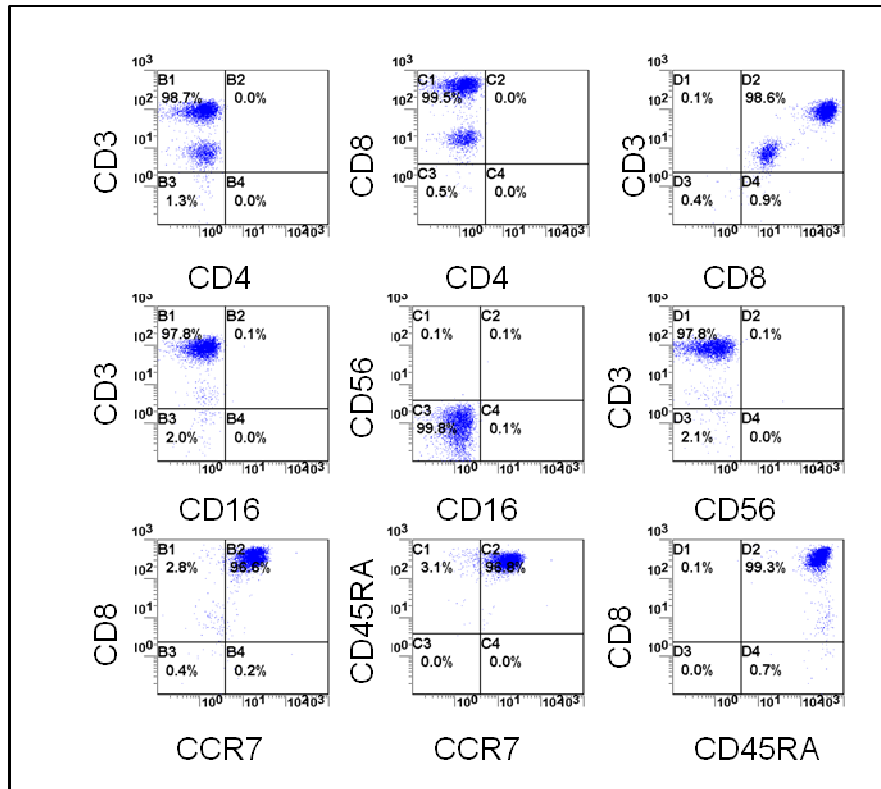


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse zur Reinheit und zum Phänotyp der immunmagnetisch isolierten naiven CD8⁺ T Lymphozyten aus Spender 913183 PBMC. Oberflächen-Expression der T Zell-spezifischen Marker CD3, CD4 und CD8, der NK Zell-spezifischen Marker CD16 und CD56 sowie der für naive CD8⁺ T Zellen charakteristischen Marker CCR7 und CD45RA. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Die Reinheit betrug für CD8⁺ Zellen >99%. Der Anteil CD4⁺ T Lymphozyten lag bei 0%, der Anteil CD16⁺CD56⁺ NK Zellen bei 0,1%. Die isolierten CD8⁺ T Lymphozyten wiesen zudem phänotypisch charakteristische Merkmale naiver T Lymphozyten wie die Oberflächen-Expression von CCR7 und CD45RA auf.

Die während des Isolationsprozesses ebenfalls aufgereinigten CD4⁺ T Lymphozyten wurden analog zu den CD8⁺ T Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert, jedoch erfolgte keine Analyse des Phänotyps (siehe Abbildung 13).

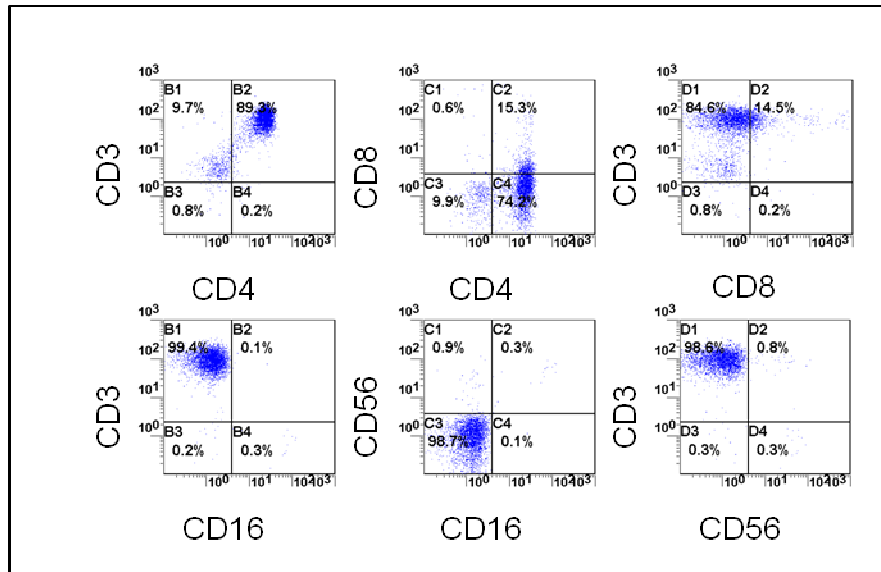


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse zur Reinheit der immunmagnetisch isolierten CD4⁺ T Lymphozyten aus Spender 913183 PBMC. Oberflächen-Expression von CD3, CD4 und CD8 sowie der NK Zell-spezifischen Marker CD16 und CD56 auf CD4⁺ T Lymphozyten. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Für die Isolation der CD4⁺ T Lymphozyten ergab sich eine Reinheit von >89%. Der Anteil CD16⁺CD56⁺ NK Zellen lag bei 0,3%. Zudem ließ sich eine geringe Kontamination durch CD8⁺ T Zellen feststellen. Die isolierten CD4⁺ T Lymphozyten wurden in kleinen Portionen à 5x10⁷ Zellen kryokonserviert und am Tag des adoptiven Transfers aufgetaut.

5.2.1.3 Generierung AML MZ580-reaktiver CTL in MLLC-Ansätzen

Die Generierung AML MZ580 *single-mismatch*-reaktiver CTL erfolgte anhand des bereits beschriebenen Protokolls (siehe Abbildung 14). Initial wurden dafür frisch isolierte naive CD8⁺ T Lymphozyten eingesetzt und mit einem Zytokin-Cocktail bestehend aus IL-7, IL-12, IL-15 und IL-21 substituiert. Nach 14 Tagen in Kultur wurde IL-12 durch IL-2 ersetzt. Durch wöchentliche Restimulation mit den korrespondierenden AML-Blasten des Patienten MZ580 wurden CTL-Populationen bis zum Erreichen von Tag 70 kultiviert. Im Folgenden werden nur Populationen bis zu einer Kulturdauer von 56 Tagen behandelt, da nur diese in den nachfolgend beschriebenen adoptiven Transfer-Studien zum Einsatz kamen.

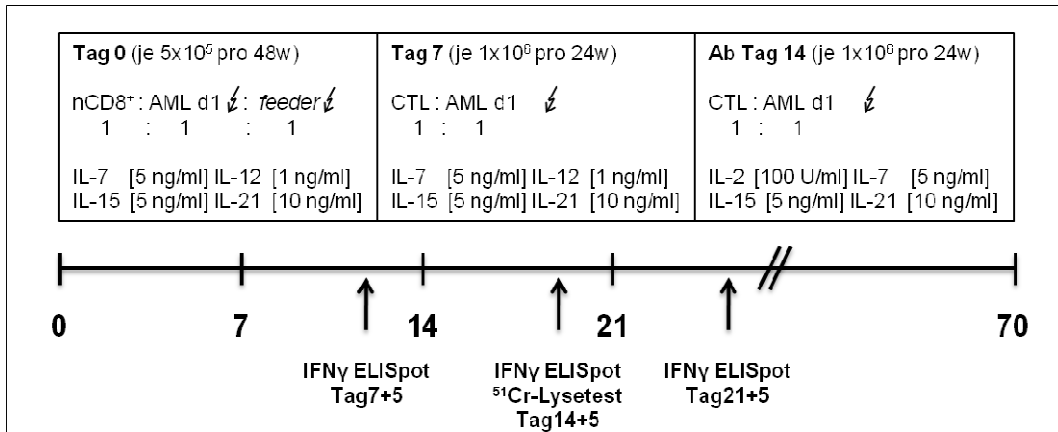


Abbildung 14: Protokoll zur Generierung und Expansion AML MZ580 single-mismatch-reaktiver CTL *in vitro*. Naive CD8⁺ T Lymphozyten wurden im Verhältnis 1:1:1 mit letal bestrahlten, vorkultivierten AML MZ580-Blasten und letal bestrahlten CD8⁻ *feeder* Zellen unter Zugabe eines Zytokin-Cocktails in 48-*well* Platten kultiviert. Nach sieben Tagen wurde die Kultur in 24-*well* Platten ohne Einsatz von *feeder*-Zellen fortgesetzt. Ab Tag 14 erfolgte die Kultur unter Substitution von IL-12 durch IL-2.

Während der gesamten Kulturdauer wurde an Tag drei bis fünf nach der jeweils letzten Restimulation die Reaktivität der CTL-Populationen mit Hilfe des IFN γ ELISpot-Verfahrens bestimmt (siehe Abbildung 15). Als Stimulatoren dienten Blasten der zur Stimulation in Kultur eingesetzten AML MZ580, EBV-transformierte B-LCL des AML Patienten MZ580, B-LCL des PBMC-Spender BC913183 sowie K562 Zellen als Kontrolle. Zusätzlich wurde die IFN γ -Spontanfreisetzung der CTL gemessen.

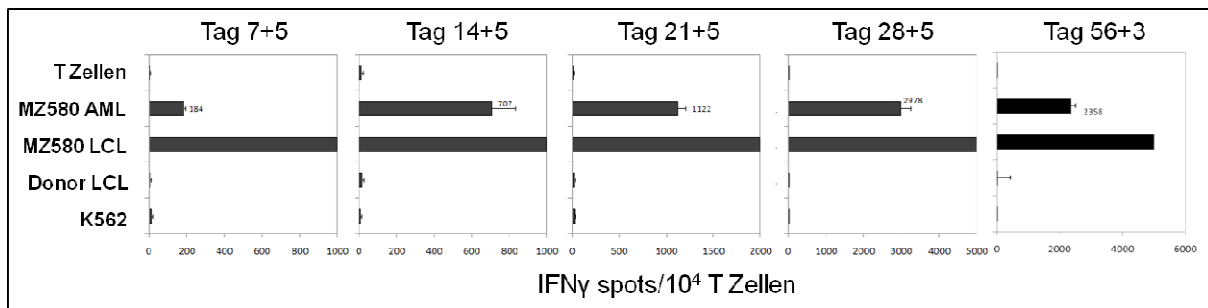


Abbildung 15: IFN γ ELISpot zur Untersuchung der Reaktivität der über unterschiedlich lange Zeiträume kultivierten AML MZ580-reaktiven CTL-Populationen. Zur Bestimmung der IFN γ -Freisetzung wurden die CTL-Populationen an Tag fünf bzw. Tag drei nach Restimulation eingesetzt. Als Zielzellen dienten AML-Blasten (10^5 Zellen /*well*) und B-LCL des Patienten MZ580, B-LCL des PBMC-Spender sowie K562 Zellen (je 5×10^4 Zellen /*well*). Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Wie in Abbildung 15 ersichtlich, nahm die Reaktivität der einzelnen CTL Populationen gegenüber den AML-Blasten bis zu einer Kulturdauer von 28 Tagen zu und begann ab Tag 56 wieder abzufallen. Gleichzeitig ist zu erkennen, dass in den jüngeren Kulturen eine deutlich stärkere Reaktivität gegen die EBV-Zelllinie des Patienten als gegen die zur Stimulation eingesetzten AML-Blasten vorhanden war. Weder die EBV-transformierte B-LCL des PBMC-Spenders, noch die als Kontrolle eingesetzten K562-Zellen wurden erkannt. Auch die Spontanfreisetzung der CTL Populationen war vernachlässigbar. Durch den Einsatz HLA-spezifischer, blockierender Antikörper konnte die Restriktion der CTL-Populationen über

HLA-Klasse I und spezifisch über ein HLA-A- oder HLA-B-Allel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der spezifischen Lyse-Aktivität der CTL-Populationen wurde an Tag14+5 der Kultur zusätzlich ein ^{51}Cr -Freisetzungstest durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2.15 und Abbildung 16).

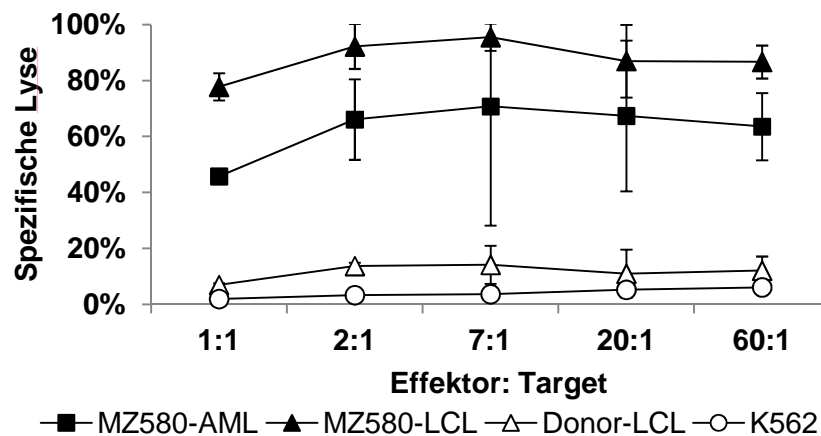


Abbildung 16: Zytolytische Aktivität der CTL Population an Tag 14+5. In den verwendeten ^{51}Cr -Freisetzungstests dienten AML-Blasten (■) und B-LCL (▲) des Patienten MZ580 sowie B-LCL des PBMC-Spenders (Δ) als Zielzellen (Target). K562 Zellen (○) wurden als Kontrolle zur Analyse möglicher NK Zell-Reaktivität eingesetzt. Effektor- und Target-Zellen wurden in den angegebenen Verhältnissen ko-kultiviert. Die Messwerte stellen Mittelwerte \pm SEM von Duplikaten dar. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Eine Erkennung und spezifische Lyse der zur Stimulation eingesetzten AML MZ580-Blasten durch die Tag 14+5 CTL-Population erfolgte hier in allen verwendeten Effektor:Target-Verhältnissen. Die spezifische Lyse-Fähigkeit der CTL-Population lag bei maximal 70%. Die Erkennung und Lyse der MZ580 Patienten-B-LCL erfolgte mit noch höherer Intensität (bis zu > 95% im Verhältnis 7:1). Der Einsatz von Spender-B-LCL und K562 Zellen führte in allen untersuchten Effektor:Target-Verhältnissen nur zu einer geringen Erkennung durch die Tag 14+5 CTL-Population mit einer Lyse-Aktivität von maximal 15%. Diese Daten bestätigten die im IFN γ -ELISpot erzielten Ergebnisse.

5.2.1.4 Etablierung geeigneter Bedingungen für den adoptiven Transfer

Nach der erfolgreichen Generierung ausreichender Zellzahlen AML MZ580-*single-mismatch* reaktiver CTL *in vitro* wurden im nächsten Schritt geeignete Bedingungen für den adoptiven Transfer etabliert. Auf Basis der *in vitro* ermittelten Daten zur spezifischen Lysefähigkeit der CTL-Populationen wurde entschieden, ein relativ hohes Effektor:Target-Verhältnis (10:1) von CTL-Populationen zu zuvor in NSG-Mäuse transplantierte AML-Blasten einzusetzen. Aufgrund bereits im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter *Engraftment*-Studien mit AML MZ580-Blasten und deren zuverlässiger Wachstums-Kinetik (siehe Abschnitt 5.1.2) wurde entschieden, eine Dosis von 5×10^5 AML MZ580-Blasten in eine Gruppe von sublethal bestrahlten Ver-

suchstieren zu transplantieren und den Verlauf des *Engraftments* engmaschig über einen Zeitraum von 14 bis 32 Tagen zu überwachen (siehe Abbildung 17).

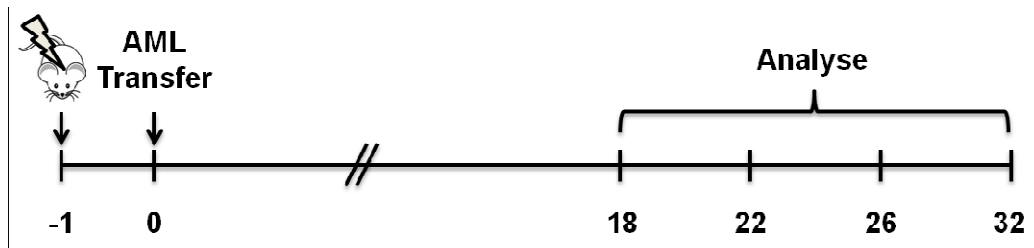


Abbildung 17: Experimenteller Ablauf der *Engraftment*-Kinetik der AML MZ580 zur Bestimmung des optimalen Zeitpunkts für den adoptiven T Zell-Transfer.

Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 14, 18, 22, 26 und 32) drei bis fünf Versuchstiere getötet und der prozentuale Anteil humaner CD33⁺CD45⁺ Zellen in peripherem Blut, Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch ermittelt. Die Ergebnisse sind für das Knochenmark-Kompartiment in Abbildung 18 gezeigt. Ziel war es, einen Zeitpunkt und einen damit verbundenen Anteil humaner CD33⁺CD45⁺ Zellen im Knochenmark der Versuchstiere zu finden, die dem Zustand der minimalen Resterkrankung (MRD, engl.: *minimal residual disease*) im Patienten möglichst nahe kommen. Des Weiteren kommen in dieser klinischen Situation sehr häufig Spender-Lymphozyten-Infusionen (DLIs, engl.: *donor lymphocyte infusion*) zum Einsatz. Der Anteil humaner Leukämie-Zellen im Knochenmark der Versuchstiere sollte somit idealerweise zwischen 1–2% liegen.

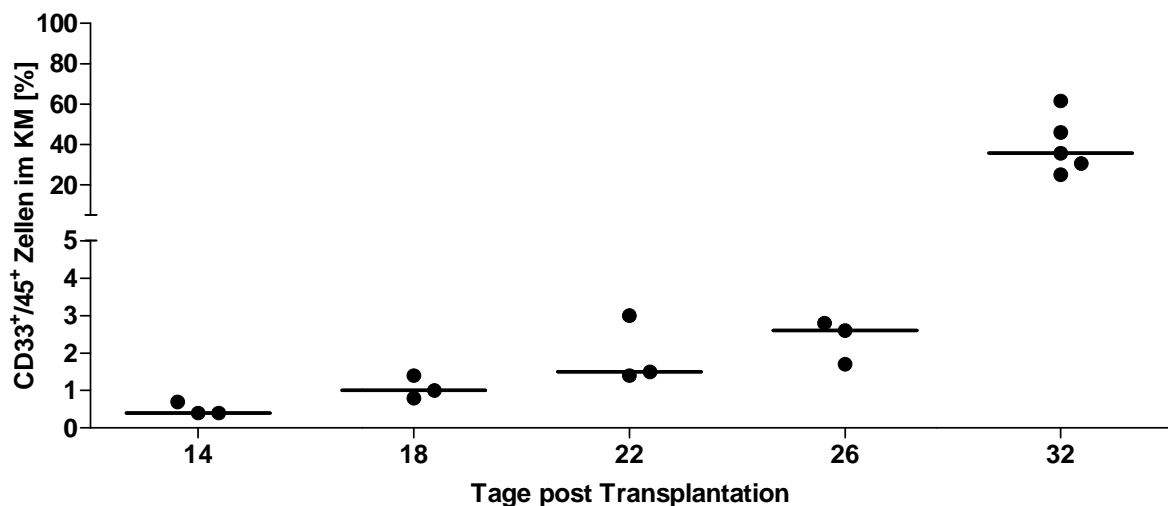


Abbildung 18: *Engraftment*-Kinetik der AML MZ580 zwischen Tag 14 und Tag 32 bei initialer Transplantation von 5×10^5 Blasten. N = 3 für Tag 14, 18, 22 und 26. N = 5 für Tag 32. Angegeben sind die einzelnen Messwerte sowie der Median (-).

Bei einer Transplantation von 5×10^5 Blasten pro Versuchstier konnte nach 14 Tagen ein mittleres *Engraftment* von $0,5 \pm 0,17\%$ im Knochenmark erzielt werden. Entsprechend der oben definierten Grenzen war dies zu niedrig. Die Anteile humaner Leukämie-Zellen an Tag 18 und

Tag 22 hingegen betragen $1,07 \pm 0,31\%$ bzw. $1,97 \pm 0,9\%$ und lagen somit im angestrebten Bereich. In keinem der untersuchten Versuchstiere konnten nach dem Transfer humaner AML-Blasten humane T Lymphozyten nachgewiesen werden. Um die Dauer der Experimente möglichst kurz zu halten, wurde entschieden, in folgenden Experimenten den adoptiven CTL-Transfer an Tag 18 durchzuführen.

5.2.1.5 Adoptiver Transfer zur Untersuchung der Funktionalität unterschiedlicher CTL-Populationen

Zur Untersuchung der Funktionalität und Stärke der Effektor-Funktionen der AML MZ580-*single mismatch* reaktiven CTL-Populationen in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro* wurden unterschiedlich alte CTL-Populationen adoptiv in AML MZ580-erkrankte NSG-Mäuse transferiert.

5.2.1.5.1 Phänotypische Charakterisierung der AML MZ580-*single mismatch* reaktiven CTL-Populationen

Es wurden zunächst CTL-Populationen untersucht, die *in vitro* über einen Zeitraum von 14, 21, 28 und 56 Tagen kultiviert und expandiert wurden. Diese Populationen wurden gewählt, um zum einen ein mögliches Differenzierungs- und Reifungs-Stadium zu identifizieren, das für eine effektive lytische Aktivität *in vivo* erforderlich ist, und zum anderen um eine mögliche maximale *in vitro* Kulturdauer zu identifizieren, ab der die Effizienz der Effektor-Funktionen *in vivo* abnimmt. Die Populationen wurden während der gesamten Kulturdauer regelmäßig anhand von durchflusszytometrischen Analysen auf Reinheit und Differenzierungsgrad der Zellen untersucht (siehe Abbildung 19). Die Reinheit der Zellen, gemessen anhand der Oberflächen-Expression von CD8, betrug für alle Populationen 99,9%.

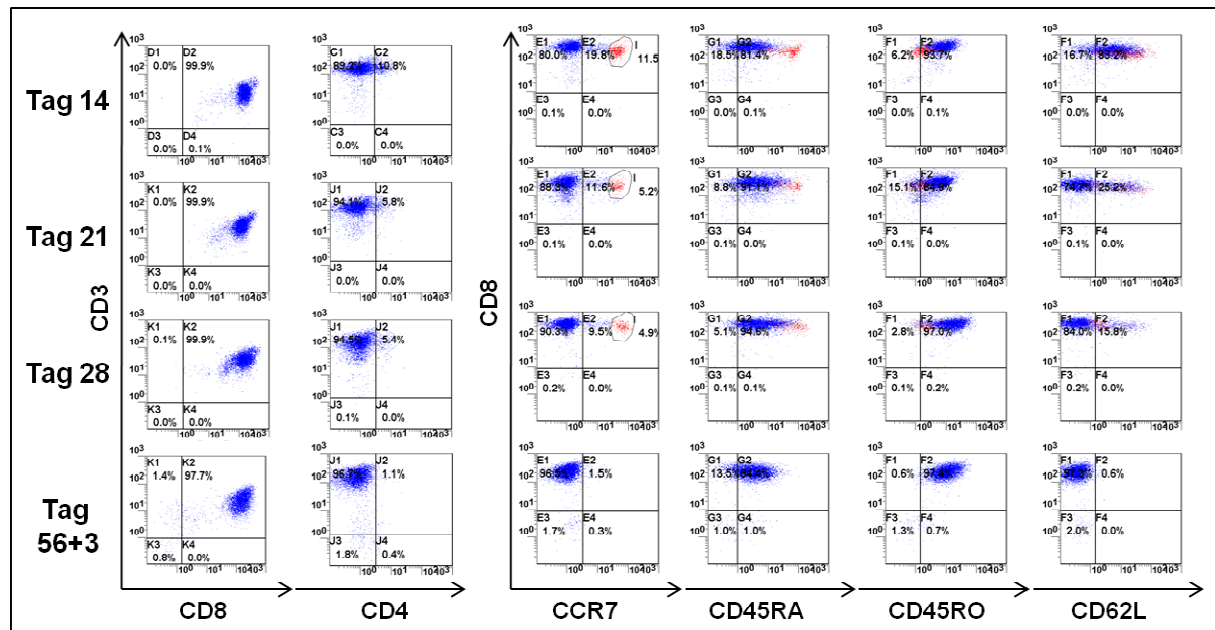


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse im Verlauf der Kultur zur Überprüfung von Reinheit und Differenzierung der einzelnen CTL-Populationen. Die für den adoptiven Transfer eingesetzten CTL-Populationen wurden hinsichtlich ihrer Reinheit auf die Expression von CD3, CD4 und CD8 zu unterschiedlichen Kulturzeitpunkten untersucht. Zusätzlich wurde die Expression der Differenzierungsmarker CCR7, CD45RA, CD45RO und CD62L analysiert. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Im Verlauf der Kultur war eine Zunahme der Expression des Oberflächen-Antigens CD45RO zu erkennen. Dies korrelierte mit der zunehmenden Aktivierung der T Lymphozyten sowie der verstärkten Präsenz von Antigen-spezifischen *Memory-T* Zellen. Gleichzeitig war eine Abnahme der Expression von Differenzierungsmarkern zu erkennen, die dem Phänotyp der naiven CD8⁺ T Zellen entsprachen. Dazu zählten vor allem CCR7, CD62L und CD45RA. Die generierten CTL-Populationen wiesen somit einen zunehmend differenzierten *effector memory* T Zell-Phänotyp auf.

5.2.1.5.2 Experimenteller Ablauf

In Tabelle 18 sind die einzelnen Versuchstier-Kohorten und die damit verbundenen transferrierten Zellen aufgeführt. Um den Einfluss der Präsenz autologer CD4⁺ T Lymphozyten auf die Persistenz der adoptiv transferrierten CTL-Populationen zu untersuchen, wurden zu den CTL-Populationen von Tag 14/21/28 zusätzlich 10% autologe CD4⁺ T Lymphozyten ko-transferiert. Als Vergleich diente der Transfer der Tag 21-Population ohne Zusatz von autologen CD4⁺ T Zellen. Um eine mögliche Xenoreaktivität der CD4⁺ T Zellen gegen murine Gewebeanigene auszuschließen, erhielt eine Kohorte ausschließlich CD4⁺ T Zellen ohne die vorherige Infusion von AML-Blasten. Um darüber hinaus eine mögliche CD4-vermittelte Alloreaktivität durch Spender-CD4⁺ T Zellen gegen die angewachsenen AML MZ580-Blasten zu untersuchen, wurde eine Kohorte der mit AML MZ580-Blasten transplantierten Versuchstiere ausschließlich mit CD4⁺ T Zellen behandelt. Der Transfer der CTL-Population Tag 56

erfolgte ebenfalls ohne Zusatz von autologen CD4⁺ T Zellen. Dies war durch die limitierte Verfügbarkeit von CD4⁺ T Zellen des Spenders begründet.

Tabelle 18: Analyse der Effektor-Funktionen unterschiedlich lange *in vitro* kultivierter MZ580-spezifischer CTL-Populationen. Übersicht und Behandlung der einzelnen Versuchstier-Kohorten. N = 5, außer für * N = 3.

Kohorte	Transferierte Zellzahl		
	MZ580-Blasten	CD8 ⁺ CTL	Autologe CD4 ⁺
CTL Tag 14	5x10 ⁵	5x10 ⁶	5x10 ⁵
CTL Tag 21	5x10 ⁵	5x10 ⁶	5x10 ⁵
CTL Tag 28	5x10 ⁵	5x10 ⁶	5x10 ⁵
CTL Tag 21-CD4 ⁺ *	5x10 ⁵	5x10 ⁶	-
CTL Tag 56-CD4 ⁺ *	5x10 ⁵	5x10 ⁶	-
AML MZ580 Ko	5x10 ⁵	-	-
AML MZ580 CD4 ⁺ Ko	5x10 ⁵	-	5x10 ⁵
CD4 ⁺ Ko	-	-	5x10 ⁵

Der allgemeine Ablauf des Transfer-Experiments ist in Abbildung 20 dargestellt. Anhand der in Abschnitt 5.2.1.4 ermittelten Transfer-Bedingungen erfolgte eine Inokulation der Versuchstiere mit 5x10⁵ AML MZ580-Blasten an Tag 0 nach subletaler Bestrahlung an Tag -1.

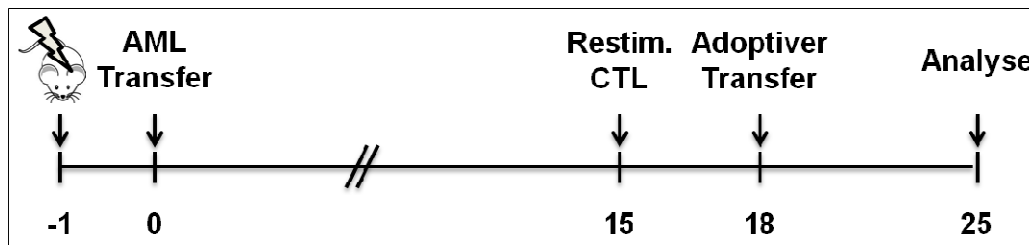


Abbildung 20: Versuchsablauf des adoptiven T Zell-Transfers zur Analyse der *in vivo* Effektor-Funktionen unterschiedlich lange *in vitro* kultivierter AML MZ580-single mismatch reaktiver CTL-Populationen.

An Tag 15 erfolgte die letztmalige Restimulation der zu untersuchenden CTL-Populationen mit den korrespondierenden AML MZ580-Blasten *in vitro*. An Tag 18, dem Tag des adoptiven CTL-Transfers, wurde die Stärke des *Engraftments* der AML-Blasten anhand von Verlaufskontrollen überprüft. Dazu wurden drei inokulierte Versuchstiere mittels Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein humaner CD33⁺/CD45⁺ AML MZ580-Blasten im Knochenmark untersucht. Das Ergebnis der Analyse diente als Ausgangswert der Leukämie-Last in den Versuchstieren vor dem adoptiven Transfer. Sofern die Stärke des *Engraftments* den definierten Bedingungen entsprach, erfolgte anschließend der adoptive Transfer der Zellen. Die Untersuchung der Populationen Tag 14-28 und Tag 56 fand zwar in separaten, homologen Experimenten statt, wird der Einfachheit halber aber im Folgenden als ein Experiment beschrieben. Die finale Analyse von peripherem Blut, Milz und Knochenmark aller Versuchstiere erfolgte an Tag 25. Zu diesem Zeitpunkt sollte entsprechend der in Abbildung 18 dargestell-

ten *Engraftment*-Kinetik der AML MZ580 bereits ein gegenüber dem Ausgangswert deutlich erhöhtes *Engraftment* im Knochenmark zu finden sein. Gleichfalls sollte ein Zeitraum von sieben Tagen ein ausreichendes Zeitfenster für die Ausübung der Effektor-Funktionen der CTL *in vivo* darstellen.

5.2.1.5.3 Ergebnisse

An Tag 18 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Verlaufskontrollen. Die *Engraftment*-Stärke der AML MZ580-Blasten lag im Knochenmark bei $0,5 \pm 0,17\%$ (Daten nicht gezeigt). Dieser Wert war zwar gegenüber den definierten Bedingungen leicht erniedrigt, jedoch war eindeutig eine distinkte Population an AML-Blasten erkennbar. Zur Verdeutlichung der klaren Detektierbarkeit auch geringer Mengen an humanen Zellen vor dem Hintergrund der NSG-Maus mittel FACS-Analyse sind in Abbildung 21 sowohl für humane $CD33^+/CD45^+$ AML-Blasten (obere Reihe, grün) als auch humane $CD8^+/CD45^+$ T Lymphozyten (untere Reihe, blau) minimale Infiltrationen in murinem Knochenmark von jeweils 0,1% dargestellt.

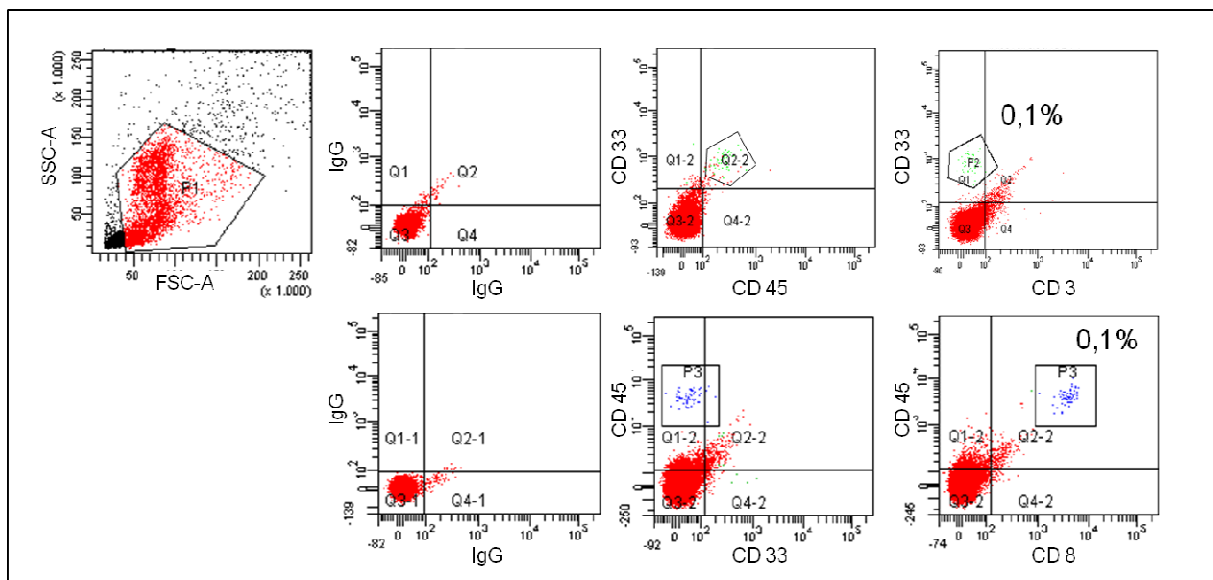


Abbildung 21: FACS-Analyse minimaler Infiltrationen humaner Zellen in murinem Knochenmark. Obere Reihe: murines Knochenmark mit geringer Infiltration (0,1%) humaner $CD33^+/CD45^+$ AML-Blasten (grün). Untere Reihe: murines Knochenmark mit geringer Infiltration (0,1%) humaner $CD8^+/CD45^+$ T Lymphozyten (blau).

Zudem sind gewisse Schwankungen in einem komplexen biologischen System wie der Maus nicht gänzlich zu vermeiden. Somit erfolgte der Transfer der CTL-Populationen wie beschrieben an Tag 18. An Tag 25 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der aus peripherem Blut, Milz und Knochenmark gewonnenen Einzelzellsuspensionen aller Versuchstiere hinsichtlich der Präsenz der initial transplantierten humanen $CD33^+CD45^+$ AML MZ580-Blasten sowie der adoptiv transferierten $CD8^+CD45^+$ CTL-Populationen und der in einigen Fällen zusätzlich transferierten $CD4^+CD45^+$ T Lymphozyten. Makroskopisch waren in allen adoptiv mit CTL transferierten Versuchstieren keine Anzeichen einer durch die humanen CTL vermittelten GvH-Erkrankung oder Xenoreaktivität detektierbar. Die Ergebnisse zur Untersuchung

der Funktionalität verschieden lange *in vitro* kultivierter CTL-Populationen im AML MZ580-System sind in Abbildung 22 für das Knochenmark-Kompartiment zusammenfassend dargestellt.

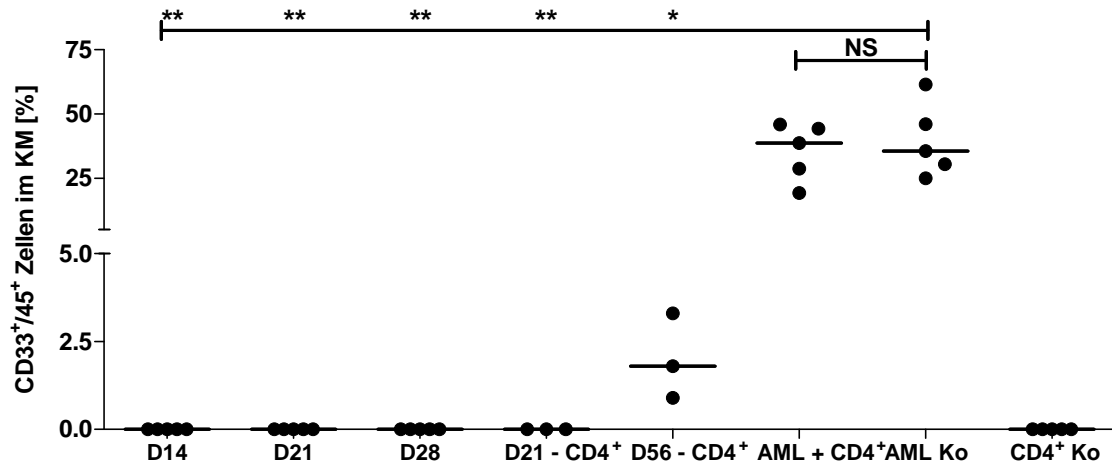


Abbildung 22: Analyse der *in vivo* Effektor-Funktionen unterschiedlich lange *in vitro* kultivierter AML MZ580-reaktiver CTL-Populationen im Knochenmark. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD33⁺CD45⁺ humaner AML MZ580-Blasten nach Behandlung der Versuchstiere mit den CTL-Populationen Tag 14/21/28/56 für eine Woche. Angegeben sind sowohl die Prozentwerte pro Versuchstier pro Kohorte als auch der Median (-) jeder Kohorte. N = 5 bzw. N = 3. Statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem *student's t test* (** = p < 0,005, * = p < 0,05).

Der adoptive Transfer der CTL-Populationen Tag 14/21/28 führte zu einer kompletten Eradikation der transplantierten AML MZ580-Blasten (0% CD33⁺CD45⁺ humane Zellen in allen Versuchstieren aller Kohorten detektierbar) in peripherem Blut, Milz und Knochenmark (siehe Abbildung 22 - Abbildung 24). Der Transfer der CTL-Population Tag 56 führte zu einer deutlichen Reduktion der leukämischen Last (0,9-3,3% (Median 1,8%) CD33⁺CD45⁺ humane Zellen detektierbar) im Knochenmark, jedoch nicht zu einer kompletten Entfernung der Blasten. Die Effektor-Funktionen der Tag 21-Populationen waren mit und ohne zusätzlichen Transfer autologer CD4⁺ T Zellen vergleichbar (0% vs. 0% CD33⁺CD45⁺ humane Zellen detektierbar). Der reine Transfer von autologen CD4⁺ T Zellen führte weder zu einer detektierbaren Xenoreaktivität noch zu einer Alloreaktivität gegenüber den transplantierten AML MZ580-Blasten. Dies ist an den vergleichbar hohen *Engraftment*-Raten der Versuchstiere aus der AML MZ580 Kontroll-Kohorte (25-61,5% (Median 35,6%) CD33⁺CD45⁺ humane Zellen im Knochenmark) und der Kohorte, die nach Transplantation der AML MZ580-Blasten ausschließlich autologe CD4⁺T Zellen erhielt (19,2-45,9% (Median 38,8%) CD33⁺CD45⁺ humane Zellen im Knochenmark), erkennbar.

Im peripheren Blut und der Milz konnten nur in den Kontroll-Kohorten (AML MZ580 ± autologe CD4⁺ T Zellen) sowie in den Versuchstieren, die Tag 56 CTL-Populationen erhielten, humane AML MZ580-Blasten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24).

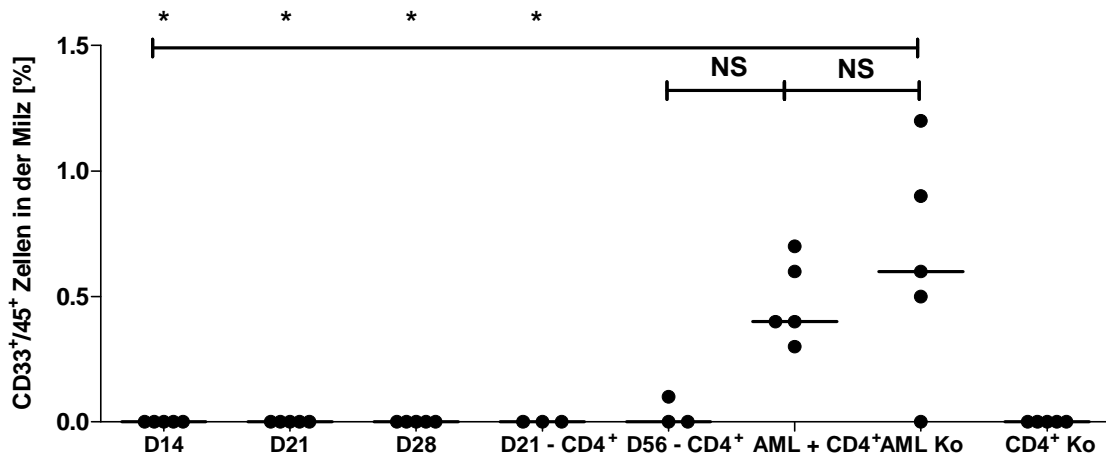


Abbildung 23: Analyse der *in vivo* Effektor-Funktionen unterschiedlich lange *in vitro* kultivierter Populationen AML MZ580-reaktiver CTL in der Milz. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD33⁺CD45⁺ humaner AML MZ580-Blasten nach Behandlung der Versuchstiere mit den CTL-Populationen Tag 14/21/28/56 für eine Woche. Angegeben sind sowohl die Prozentwerte pro Versuchstier pro Kohorte als auch der Median (-) jeder Kohorte. N = 5 bzw. N = 3. Statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem *student's t test* (* = p < 0,05).

In der Milz lag der Anteil humaner CD33⁺CD45⁺ Zellen in der Versuchstiergruppe, die Tag 56 CTL als Immuntherapie erhielten, nach sieben Tagen bei 0-0,1%. In den Kontrolltieren, die nur autologe CD4⁺ T Zellen als Immuntherapie erhielten, konnten 0-1,2% (Median 0,6%) und in der Gruppe der Kontrolltiere, die keine Immuntherapie erhielten, 0,3-0,7% (Median 0,4%) humane CD33⁺CD45⁺ Zellen detektiert werden. Somit ist der Unterschied im AML-*Engraftment* zwischen den Kontrollgruppen, die ausschließlich primäre AML-Blasten erhielten und denen, die zusätzlich autologe CD4⁺ T Zellen erhielten nicht signifikant. Eine durch autologe CD4⁺ T Zellen vermittelte AML-Reaktivität kann somit ausgeschlossen werden.

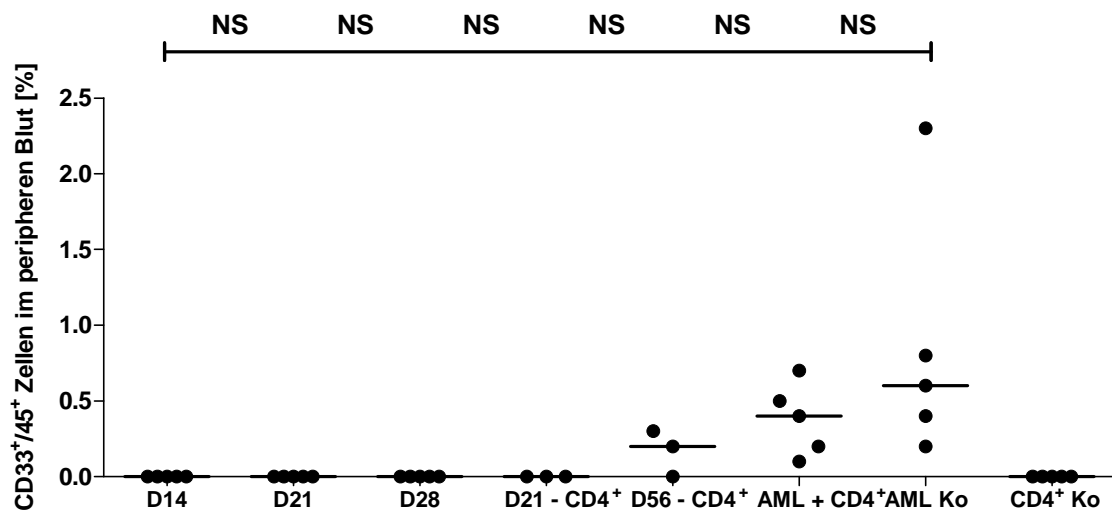


Abbildung 24: Analyse der *in vivo* Effektor-Funktionen unterschiedlich lange *in vitro* kultivierter Populationen MZ580-reaktiver CTL im peripheren Blut. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD33⁺CD45⁺ humaner AML MZ580-Blasten nach Behandlung der Versuchstiere mit den CTL-Populationen Tag 14/21/28/56 für eine Woche. Angegeben sind sowohl die Prozentwerte pro Versuchstier pro Kohorte als auch der Median (-) jeder Kohorte. N = 5 bzw. N = 3. Statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem *student's t test*.

Im peripheren Blut der mit Tag 56 CTL behandelten Versuchstiere konnten 0,0-0,3% (Median 0,2%) humane CD33⁺CD45⁺ Zellen detektiert werden. Bei den Kontrolltieren, die ausschließlich autologe CD4⁺ T Zellen erhielten, waren 0,1-0,7% (Median 0,4%) und bei den Kontrolltieren, die keine Immuntherapie erhielten, 0,2-2,3% (Median 0,6%) humane CD33⁺CD45⁺ Zellen sieben Tage nach T Zell-Transfer detektierbar. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Die adoptiv transferierten CTL-Populationen Tag 14/21/28 waren in allen untersuchten Kompartimenten detektierbar, jedoch in sehr geringen Zellzahlen (< 0,1%). In der Kohorte, die Tag 21 CTL ohne den Zusatz autologer CD4⁺ T Zellen erhielt, waren nach Ablauf der Effektor-Periode keine Zellen der initial transferierten CTL-Populationen mehr detektierbar. Ebenso waren die Tag 56 CTL in den untersuchten Kompartimenten der Versuchstiere nicht mehr aufzufinden. Weder der alleinige Transfer von autologen CD4⁺ T Zellen noch deren Transfer nach Transplantation der Versuchstiere mit AML MZ580-Blasten führten zu einer Persistenz der T Zellen in den Versuchstieren.

5.2.1.6 Untersuchung der Kinetik der Effektor-Funktionen AML MZ580-reaktiver CTL

Zur Analyse des zeitlichen Verlaufs der Effektor-Funktionen der transferierten AML MZ580-*single mismatch* reaktiven CTL *in vivo* wurde der in Abbildung 25 dargestellte Versuch durchgeführt. Hierbei erfolgte ein direkter Vergleich von mit Tag 28 AML MZ580-*single mismatch* reaktiven CTL therapierten und nicht-therapierten AML MZ580-tragenden Versuchstieren zu verschiedenen Zeitpunkten. Analog zu dem in Abschnitt 5.2.1.5 durchgeführten Experiment wurden alle Versuchstiere an Tag -1 subletal bestrahlt und an Tag 0 mit je 5x10⁵ AML MZ580-Blasten inokuliert.

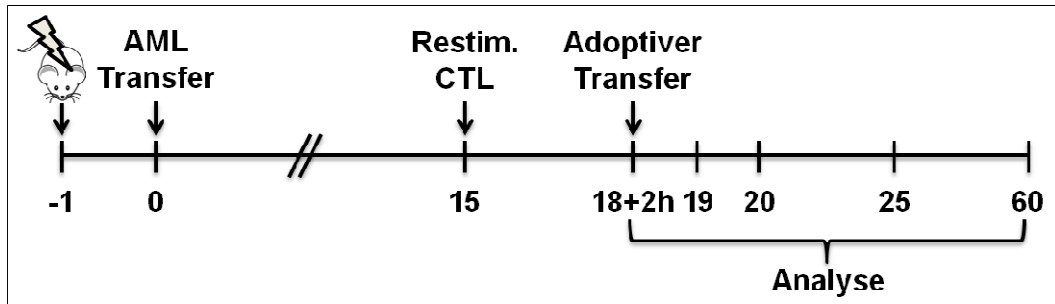


Abbildung 25: Versuchsablauf des adoptiven T Zell Transfer Experiments zur Analyse der Kinetik der Effektor-Funktionen der MZ580-spezifischen Tag 28 CTL-Population.

An Tag 15 erfolgte die Restimulation der Tag 28 CTL-Population mit AML MZ580-Blasten. Diese Population wurde gewählt, da aufgrund des vorangegangenen Experiments keine Unterschiede in der *in vivo* Funktionalität der Tag 14, Tag 21 und Tag 28 CTL-Populationen festgestellt werden konnte (siehe Abschnitt 5.2.1.5). Zudem standen aufgrund der längeren Expansionsphase der Tag 28 CTL höhere Zellzahlen für den geplanten Versuchsablauf zur Verfügung. An Tag 18 nach AML-Inokulation erfolgte der adoptive Transfer der CTL. Die Versuchstiere wurden in zwei Kohorten unterteilt (siehe Tabelle 19): Eine Kontroll-Kohorte mit ausschließlich AML MZ580-transplantierten Versuchstieren und eine Therapie-Kohorte, in der die Versuchstiere zusätzlich am Tag des T Zell-Transfers Tag 28 CTL erhielten. Der Transfer erfolgte ohne den Zusatz von autologen CD4⁺ T Zellen, da sich diese im vorangegangenen Experiment für Tag 21 CTL (siehe Abschnitt 5.2.1.5) als nicht notwendig für die Ausübung der Effektor-Funktionen der CTL-Populationen erwiesen hatten. Zudem war die Verfügbarkeit der Zellen limitiert.

Tabelle 19: Analyse der Kinetik der Effektor-Funktionen der MZ580-spezifischen Tag 28 CTL-Population. Übersicht und Behandlung der einzelnen Versuchstier-Kohorten. N = 3, außer für * N = 5.

Kohorte	Transferierte Zellzahl		Analyse nach
	MZ580-Blasten	CD8 ⁺ CTL	
CTL Tag 28	5x10 ⁵	5x10 ⁶	2 Stunden
			24 Stunden
			48 Stunden
			7 Tagen
			6 Wochen*
AML MZ580 Kontrolle	5x10 ⁵	-	2 Stunden
			24 Stunden
			48 Stunden
			7 Tagen
			6 Wochen

Die erste Aufarbeitung und vergleichende Analyse von jeweils drei Versuchstieren aus beiden Kohorten erfolgte zwei Stunden nach dem adoptiven Transfer. Die weiteren Versuchstiere wurden in Gruppen zu drei Tieren 24 Stunden, 48 Stunden, sieben Tage und sechs Wochen (hier N = fünf) nach dem adoptiven Transfer aufgearbeitet. Nach der durchflusszytometrischen Analyse verbleibende Zellfraktionen wurden für spätere Analysen (siehe Abschnitt 5.2.1.7) kryokonserviert (siehe Abschnitt 4.2.4). In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Knochenmark-Einzelzellsuspensionen der Versuchstiere beider Kohorten vergleichend dargestellt. Anhand der dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass bereits 24 Stunden nach dem adoptiven Transfer der CTL eine Tendenz zur Reduktion der leukämischen Last in den therapierten Versuchstieren gegenüber den nicht-therapierten Kontrolltieren sichtbar wird (1-2,1% (Median 1,4%) vs. 3-8,9% (Median 3,1%) CD33⁺CD45⁺ humane Zellen im Knochenmark).

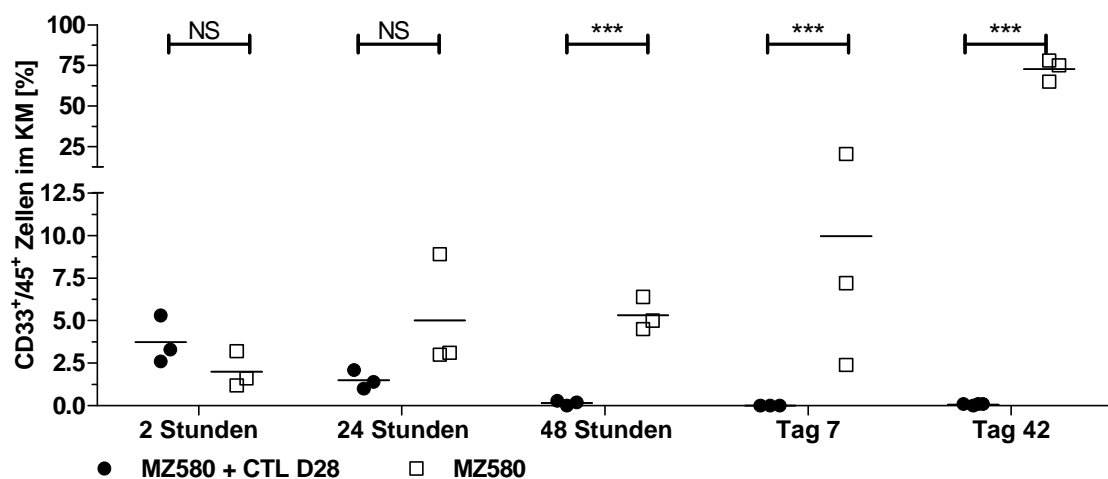


Abbildung 26: Untersuchung der Kinetik der *in vivo* Effektor-Funktionen AML MZ580-reaktiver Tag 28 CTL im Knochenmark. Vergleichend dargestellt sind der prozentuale Anteil humaner CD33⁺CD45⁺ AML MZ580-Blasten im KM der durch adoptiven Transfer der Tag 28 CTL therapierten Versuchstiere (●) sowie der nicht-therapierten Kontrolltiere (□). Angegeben sind sowohl die Prozentwerte pro Versuchstier pro Kohorte als auch der Median (-) jeder Kohorte. N = 3 bzw. N = 5 für Tag 42. Die Statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem *student's t test* (**p < 0,001).

Nach weiteren 24 Stunden (insg. 48 Stunden) war eine Eradikation von >99% der AML MZ580-Blasten in den untersuchten Versuchstieren stattgefunden (0-0,3% (Median 0,2%) CD33⁺CD45⁺ humane Zellen im Knochenmark). In den Kontrolltieren hingegen nahm die leukämische Last stetig zu (4,5-6,4% (Median 5%) CD33⁺CD45⁺ humane Zellen im Knochenmark). Die Analyse nach Ablauf von sieben Tagen zeigte eine vollständige Regression der AML Blasten aus dem KM der Versuchstiere (Ø 0% CD33⁺CD45⁺ humane Zellen im Knochenmark). Dies ist kongruent mit den bereits in 5.2.1.5 beschriebenen Ergebnissen. In den Kontrolltieren war eine weiter zunehmende leukämische Last (2,4-20,3% (Median 7,2%) CD33⁺CD45⁺ humane Zellen im Knochenmark) zu beobachten. Die Analyse sechs Wochen

nach Beginn der adoptiven Immuntherapie (Tag 60 nach Inokulierung der Versuchstiere mit AML MZ580-Blasten) diente zur Untersuchung der Persistenz des therapeutischen Ansatzes. Anhand der in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass in den therapierten Versuchstieren auch sechs Wochen nach dem adoptiven Transfer phänotypisch kein Rezidiv zu erkennen war (0-0,1% (Median 0,1%) CD33⁺CD45⁺ humane Zellen im Knochenmark). In den Kontrolltieren war zu diesem Zeitpunkt eine mit früheren Versuchen vergleichbare *Engraftment*-Rate von 65-78% (Median 75%) CD33⁺CD45⁺ humaner Zellen im Knochenmark zu beobachten.

Die durchflusszytometrische Analyse von Milz und peripherem Blut ist in Abbildung 27 analog zu den Ergebnissen der Knochenmark-Analyse dargestellt.

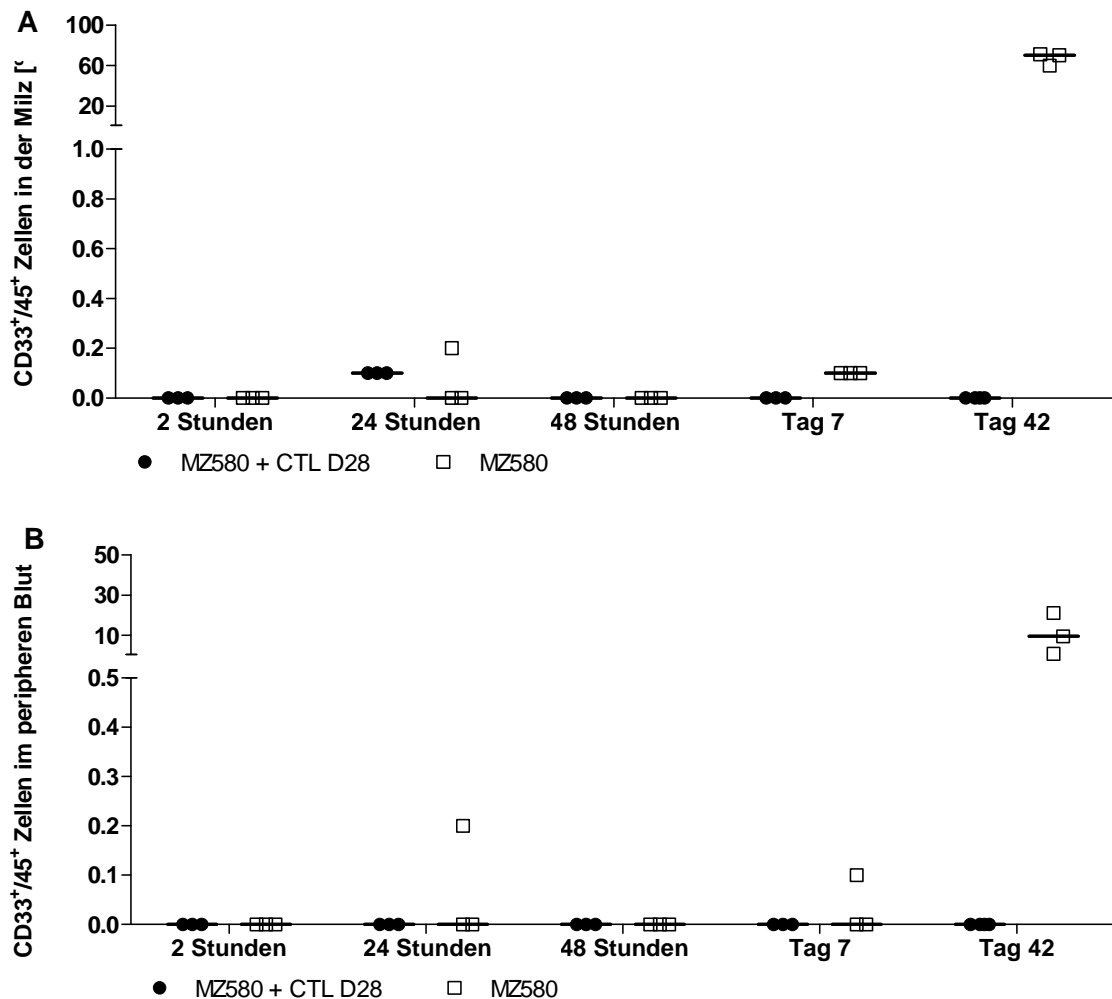


Abbildung 27: Analyse der Kinetik der *in vivo* Effektor-Funktionen der AML MZ580-reaktiven Tag 28 CTL in der Milz und im peripheren Blut. Vergleichend dargestellt sind der prozentuale Anteil CD33⁺CD45⁺ humaner AML MZ580-Blasten **A** in der Milz und **B** im peripheren Blut der therapierten Versuchstiere (●) sowie der nicht-therapierten Kontrolltieren (□). Dargestellt sind sowohl die Prozentwerte pro Versuchstier pro Kohorte als auch der Median (-) jeder Kohorte. N = 3 bzw. N = 5 für Tag 42.

In der Milz der therapierten Versuchstiere war zu keinem Zeitpunkt außer 24 Stunden nach dem adoptiven Transfer der Tag 28-CTL Population ein Auftreten der AML MZ580-Blasten erkennbar. Auch in den nicht-therapierten Kontrolltieren konnte innerhalb der ersten sieben

Tage nur minimales *Engraftment* <1% detektiert werden. Erst sechs Wochen nach dem adoptiven Transfer war in den Kontrolltieren ein substantielles *Engraftment* von 60-71% (Median 70%) CD33⁺CD45⁺ humaner Zellen zu verzeichnen. In den therapierten Versuchstieren hingegen waren auch zu diesem Zeitpunkt keine humanen CD33⁺CD45⁺ Zellen detektierbar.

Die Analyse der Verteilung humaner CD33⁺CD45⁺ Zellen im peripheren Blut zeigte ein ähnliches Ergebnis wie die Verteilung der Blasten in der Milz. Über den Zeitraum von sieben Tagen nach adoptivem Transfer waren in beiden Kohorten keine oder nur wenige humane CD33⁺CD45⁺ Zellen im Blut vorhanden. Erst nach Ablauf von sechs Wochen konnten im peripheren Blut der Kontrolltiere, nicht jedoch der therapierten Versuchstiere, substantielle Mengen humaner AML MZ580-Blasten (0,8-21% (Median 9,5%) humane CD33⁺CD45⁺ Zellen) detektiert werden.

In Abbildung 28 ist die Verteilung der durchflusszytometrisch nachgewiesenen humanen T Lymphozyten, klassifiziert anhand der Oberflächen-Antigene CD3 und CD8, im Knochenmark der einzelnen Versuchstiere in Abhängigkeit von der Versuchsdauer dargestellt.

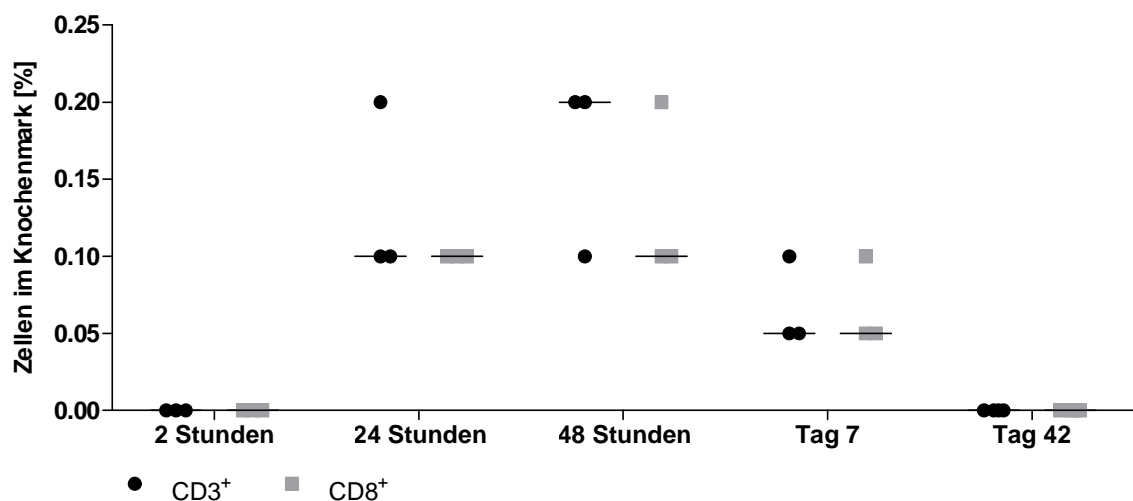


Abbildung 28: Verteilung humaner T Lymphozyten im Knochenmark der Versuchstiere der Therapie-Kohorte. Für jede Gruppe der Therapie-Kohorte sind der prozentuale Anteil CD3⁺ und CD8⁺ humaner T Lymphozyten in Abhängigkeit der Versuchsdauer sowie der Median (-) angegeben. N = 3 bzw. N = 5 für Tag 42.

Die Anzahl der transferierten Spender-T Lymphozyten nahm bis 48 Stunden nach adoptivem Transfer zu und danach wieder ab. Sechs Wochen nach Transfer waren im Knochenmark keine humanen T Zellen mehr detektierbar. Die zu frühen Zeitpunkten nachweisbaren humanen CD3⁺ T Lymphozyten bestanden fast ausschließlich aus CD8⁺ T Lymphozyten.

In Abbildung 29 ist die Verteilung humaner T Lymphozyten nach adoptivem Transfer von AML MZ580-*single mismatch* reaktiven CTL in den Milzen und im peripheren Blut der einzelnen Versuchstiere in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

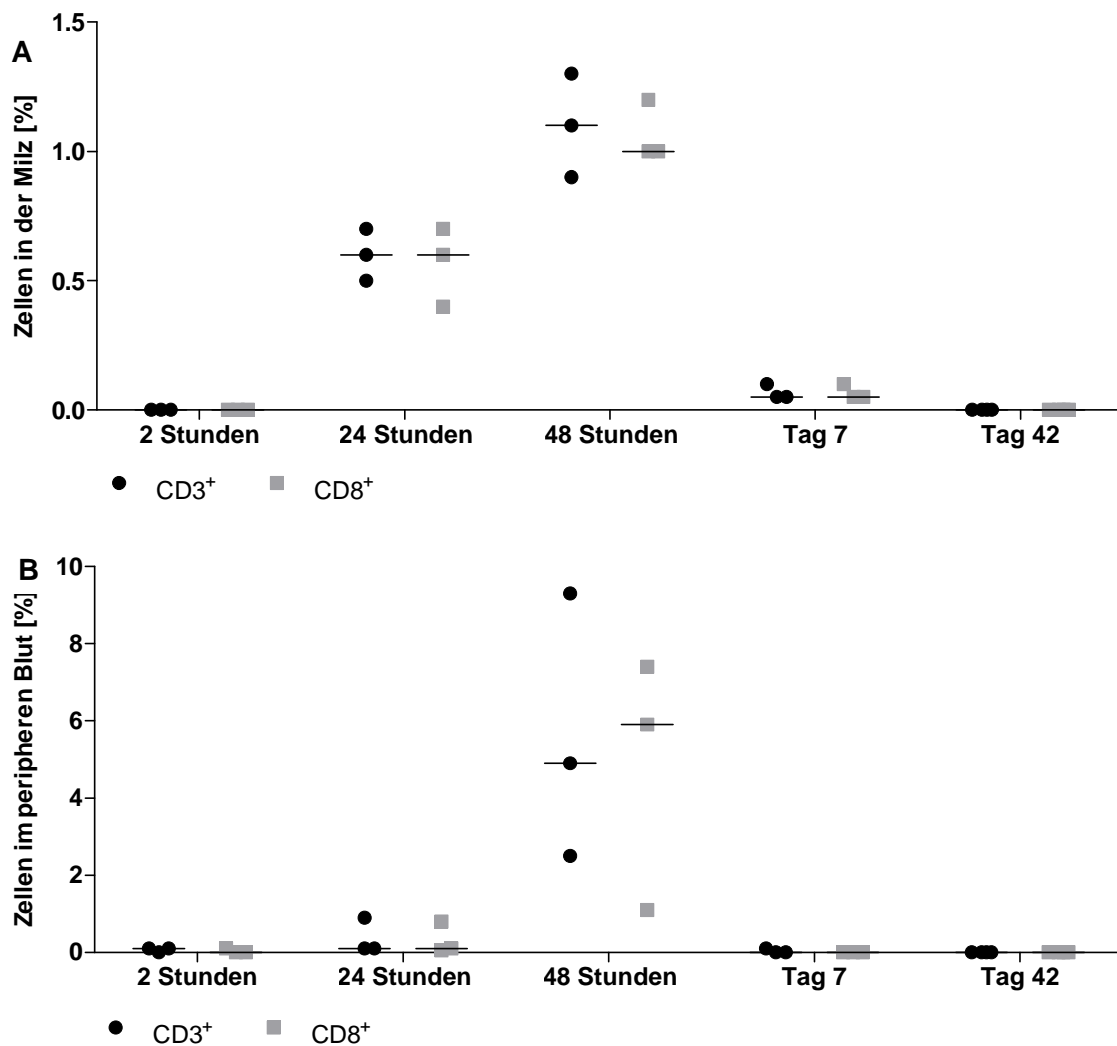


Abbildung 29: Verteilung humaner T Lymphozyten in den Milzen (A) und im peripheren Blut (B) der therapierten Versuchstiere in Abhängigkeit von der Zeit. Für jede Gruppe der Therapie-Kohorte sind der prozentuale Anteil CD3⁺ und CD8⁺ humaner T Lymphozyten sowie der Median (schwarze Linie) angegeben. N = 3 bzw. N = 5 für Tag 42.

Analog zum Knochenmark ist zu erkennen, dass die meisten humanen T Lymphozyten 48 Stunden nach Transfer in der Milz der Versuchstiere nachzuweisen waren. Die detektierten CD3⁺ T Lymphozyten bestanden >99% aus CD8⁺ T Lymphozyten. Die absolute Menge an T Lymphozyten im peripheren Blut war im Vergleich zu Knochenmark und Milz deutlich erhöht (Median 4,9% CD3⁺ T Lymphozyten im peripheren Blut vs. Median 0,2% CD3⁺ T Lymphozyten im Knochenmark vs. Median 1,3% CD3⁺ T Lymphozyten in der Milz).

5.2.1.7 Analyse der *ex vivo*-Reaktivität adoptiv transferierter Tag 28 CTL

Zur Analyse der *ex vivo*-Reaktivität adoptiv transferierter CTL-Populationen wurden Milzzellen aus T Zell-behandelten Versuchstieren in IFN γ -ELISpot Analysen auf ihre verbleibende Reaktivität getestet. Dazu wurden die in Abschnitt 5.2.1.6 beschriebenen, nach 24 Stunden kryokonservierten Milzzell-Suspensionen therapierteter Versuchstiere aufgetaut und der prozentuale Anteil CD3⁺ humaner T Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert (siehe Ab-

bildung 30 A). Der Anteil an T Lymphozyten (0,2%) war dabei geringfügig niedriger als der Mittelwert der Messwerte der einzelnen Versuchstiere (ca. 0,6%, siehe Abbildung 29). Dies kann durch einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen in Folge des Auftau-Prozesses begründet sein. Die gesamte Milzzell-Suspension wurde anschließend in einem IFN γ -ELISpot auf die Reaktivität der enthaltenen Tag 28 CTL gegenüber den zur Stimulation eingesetzten AML MZ580-Blasten sowie NSG-DCs als Zielzellen für potentielle Xenoreaktivität getestet. Als Vergleichskontrolle wurden Splenozyten von nicht-therapierten Versuchstieren eingesetzt.

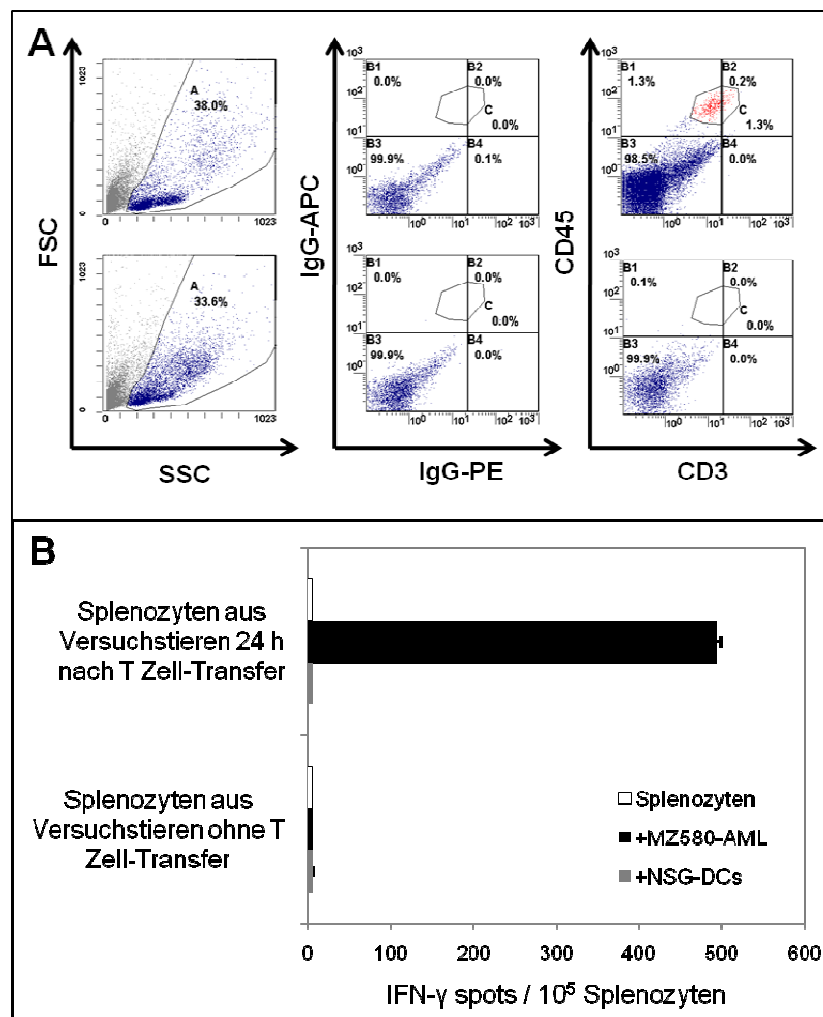


Abbildung 30: Analyse der *ex vivo*-Reaktivität adoptiv transferierter Tag 28 CTL im IFN γ -ELISpot. A Durchflusszytometrische Analyse der aufgetauten, vereinigten Splenozyten der Therapie-Kohorte zum Zeitpunkt 24 h (oben) sowie nicht-therapierter Kontrolltiere (unten) auf den Anteil CD3⁺humaner T Zellen. **B** IFN γ -ELISpot zur Überprüfung der Reaktivität der eingesetzten Splenozyten gegenüber humaner AML MZ580-Blasten und muriner NSG-DCs. Das E:T-Verhältnis betrug 1:1 für Splenozyten:AML MZ580-Blasten und 5:1 für Splenozyten:NSG-DCs. Angegeben ist der Mittelwert aus Duplikaten. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

In Abbildung 30 B ist illustriert, dass die in den Splenozyten-Suspensionen enthaltenen Tag 28 CTL stark gegen die zur Stimulation eingesetzten AML MZ580-Blasten mit der Freisetzung von IFN γ reagieren. Die Reaktivität war Zelldosis-abhängig, da die Verdünnung der eingesetzten Milzzellzahl zu einer reduzierten Anzahl von IFN γ -Spots führte (Daten nicht

gezeigt). Weiterhin war zu beobachten, dass NSG-DCs nicht zu einer IFN γ -Freisetzung und somit auch zu keiner Aktivierung der CTL führten. Damit kann eine Xenoreaktivität der CTL ausgeschlossen werden. Darüber hinaus führte weder die Ko-Inkubation der Splenozyten aus Kontrolltieren mit den AML MZ580-Blasten noch mit NSG-DCs zu einer IFN γ -Freisetzung.

5.2.2 Das System AML MZ308 –*dual-mismatch* reaktive CTL

Um die Reproduzierbarkeit der mit dem Spender BC913183–Empfänger MZ580-System gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen, wurde zusätzlich das Spender BC1019683–Empfänger AML MZ308-System etabliert. Die AML MZ308 gehörte ebenfalls zur Gruppe der AML-Proben, die zu einem reproduzierbaren *Engraftment* in NSG-Mäusen führten (siehe Tabelle 15).

5.2.2.1 Charakterisierung des Spender-Empfänger-Systems

Bei Empfänger MZ308 handelte es sich um eine weibliche Patientin, bei der im Dezember 2009 im Alter von 78 Jahren eine AML FAB M1 diagnostiziert wurde. Die Patientin besaß einen normalen Karyotyp, die HLA-Klasse I Allele A 01/26 B 38/51 Cw 04/12 sowie eine ITD-Mutation der Flt3-Kinase. Sie verstarb einige Zeit nach der Diagnosestellung. Zwischen PBMC-Spender BC1019683 und Empfänger MZ308 lagen auf HLA-Klasse I-Ebene Inkompatibilitäten bezüglich eines B-Allels, HLA-B*38:01, und eines C-Allels, HLA-C*12:03, vor. Somit konnten die CTL des Spenders BC1019683 gegen zwei HLA *mismatches* (B*38:01, C*12:03) reagieren, die in der Regel dominante Zielstrukturen darstellen. Zusätzlich konnte Reaktivität gegen AML-Peptidantigene entstehen, die von gemeinsamen HLA-Molekülen (A*01:01, A*26:01, B*51:01, C*04:01) präsentiert werden. In Tabelle 20 sind die hochaufgelösten HLA-Identitäten des Spender-Empfänger Systems BC1019683/MZ308 einander gegenübergestellt.

Tabelle 20: Übersicht der HLA-Identität zwischen PBMC-Spender BC1019683 und Empfänger AML-Patient MZ308.

	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
MZ308 AML	01:01	26:01	38:01	51:01	04:01	12:03
BC1019683	01:01	26:01	35:03	51:01	04:01	14:02

5.2.2.2 Isolierung naiver CD8⁺ und CD4⁺ T Zellen aus Spender 1019683 PBMC

Die Isolation naiver CD8⁺ und CD4⁺ T Lymphozyten erfolgte wie in Abschnitt 5.2.1.2 für das BC913183/MZ580-System beschrieben. In Abbildung 31 ist die durchflusszytometrische Analyse der isolierten Populationen auf Reinheit und Phänotyp dargestellt.

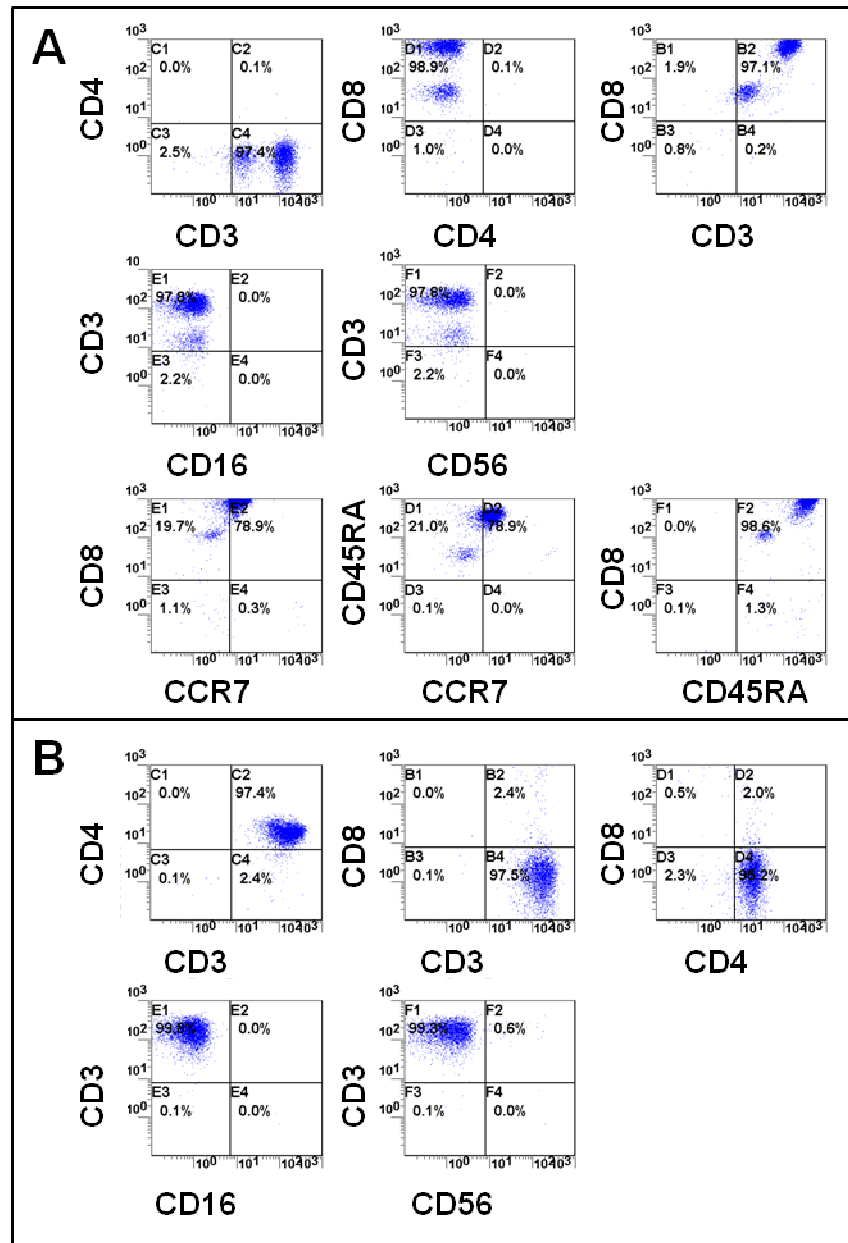


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Analyse zur Reinheit und zum Phänotyp der immunmagnetisch isolierten naiven CD8⁺ T Lymphozyten und CD4⁺ T Lymphozyten aus Spender BC1019683 PBMC. A Oberflächen-Expression der T Zell-spezifischen Marker CD3, CD4 und CD8, der NK Zell-spezifischen Marker CD16 und CD56 sowie der mit naiven CD8⁺T Zellen assoziierten Marker CCR7 und CD45RA **B** Oberflächen-Expression von CD3, CD4 und CD8 sowie der NK Zell-spezifischen Marker CD16 und CD56 auf CD4⁺ T Lymphozyten. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Die Reinheit der naiven CD8⁺ T Lymphozyten betrug 99,9%. Der Anteil an NK Zellen lag bei 0%. Die T Zellen wiesen aufgrund der Ko-Expression von CCR7 und CD45RA den charakteristischen Phänotyp naiver CD8⁺ T Lymphozyten auf.

Die Reinheit der isolierten CD4⁺ T Lymphozyten betrug 97,4%, der Anteil der Kontamination durch CD8⁺ T Lymphozyten lag bei ca. 2,5%. Es waren keine NK Zellen detektierbar. Die isolierten CD4⁺ T Lymphozyten wurden in kleinen Portionen à 5x10⁷ Zellen kryokonserviert und am Tag des adoptiven Transfers aufgetaut.

5.2.2.3 Generierung AML MZ308-reaktiver CTL in MLLC-Ansätzen

Die Generierung AML MZ308-*dual mismatch* reaktiver CTL-Populationen erfolgte analog zum BC913183/MZ580-System wie in Abschnitt 5.2.1.3 beschrieben. Durch wöchentliche Restimulation mit den korrespondierenden AML-Blasten des Patienten MZ308 wurden CTL-Populationen bis zum Erreichen von Tag 35 kultiviert und, je nach Proliferationsrate, Anteile der Populationen kryokonserviert oder zur weiteren Expansion genutzt. Im Folgenden werden nur Populationen bis zu einer Kulturdauer von 28 Tagen behandelt, da nur diese in der nachfolgend beschriebenen adoptiven Transfer-Studie zum Einsatz kamen.

Am Tag des adoptiven Transfers, d.h. drei Tage nach der jeweils letzten Restimulation, wurde die Reaktivität der CTL-Populationen mit Hilfe des IFN γ ELISpot-Verfahrens bestimmt (siehe Abbildung 32).

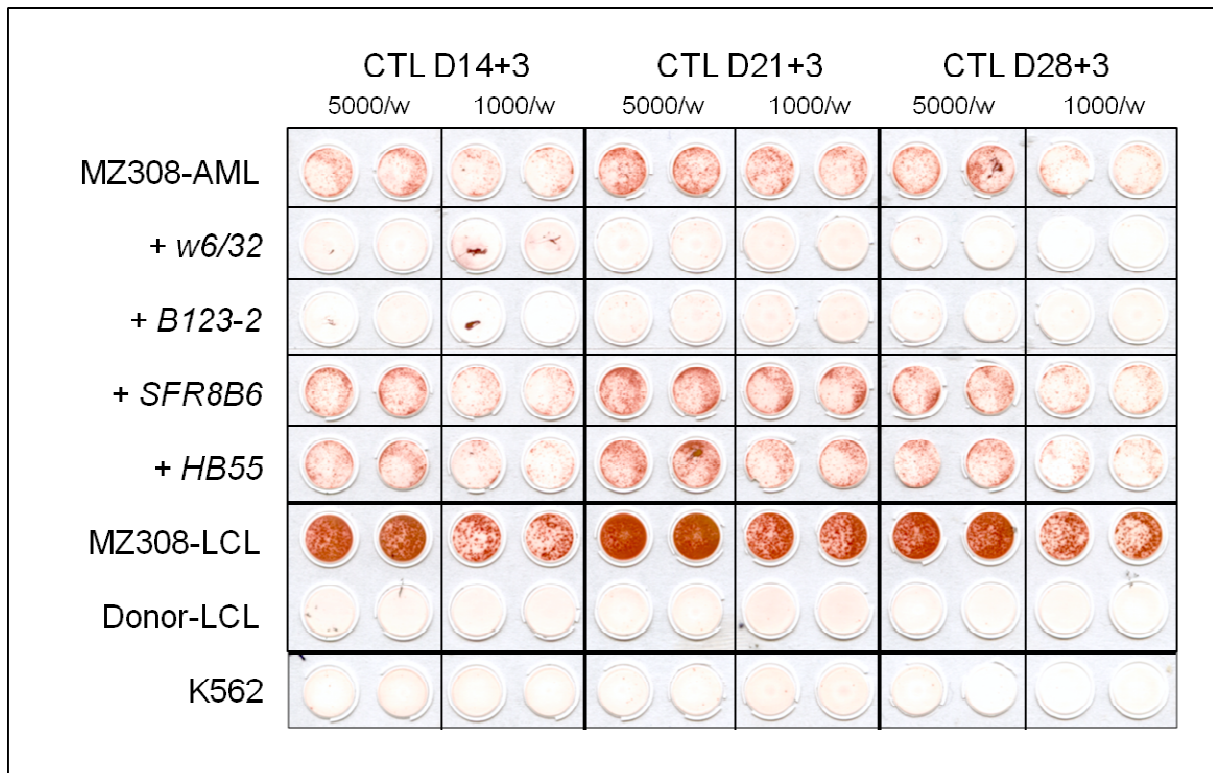


Abbildung 32: IFN γ ELISpot-Analyse der Reaktivität adoptiv transferierter MZ308-reaktiver CTL-Populationen am Tag des Transfers. Die Populationen wurden an Tag drei nach Restimulation eingesetzt. Als Zielzellen dienten AML-Blasten und B-LCL des Patienten MZ308, B-LCL des PBMC-Spenders sowie K562 Zellen. Zusätzlich wurden die HLA-spezifischen blockierenden mAb w6/32 (anti-Klasse I), B123-3 (anti-HLA-B/C), SFR8B6 (anti-HLA-Bw6) und HB55 (anti-HLA-DR) in sättigenden Konzentrationen eingesetzt um die HLA-Restriktion der CTL-Populationen zu identifizieren. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Als Zielzellen dienten Blasten der zur Stimulation in Kultur eingesetzten AML MZ308, EBV-transformierte B-LCL des AML Patienten MZ308, B-LCL des PBMC-Spender BC1019683 sowie K562 Zellen als Kontrolle für NK Aktivität. Gleichzeitig wurde durch Zugabe HLA-spezifischer, blockierender Antikörper die HLA-Restriktion der CTL überprüft. In Abbildung 32 ist ersichtlich, dass die Reaktivität der einzelnen CTL Populationen in Abhängigkeit von der

eingesetzten Zellzahl gegenüber den AML-Blasten relativ ähnlich war. Nur die Tag 21 CTL-Population zeigten eine etwas erhöhte Reaktivität. Gleichzeitig war zu erkennen, dass eine deutlich stärkere Reaktivität gegen die EBV-Zelllinie des Patienten als gegen die zur Stimulation eingesetzten AML-Blasten vorhanden war. Weder die EBV-transformierte B-LCL des PBMC-Spenders, noch die als Kontrolle eingesetzten K562-Zellen wurden erkannt. Die HLA-Restriktion der CTL-Populationen erfolgte damit über ein HLA-B- oder HLA-C-Allel der HLA-Klasse I Antigene.

Am Tag des adoptiven Transfers wurden zudem ⁵¹Chrom-Freisetzungstests zur Untersuchung der spezifischen Lyse-Aktivität der einzelnen CTL-Populationen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 zusammenfassend dargestellt.

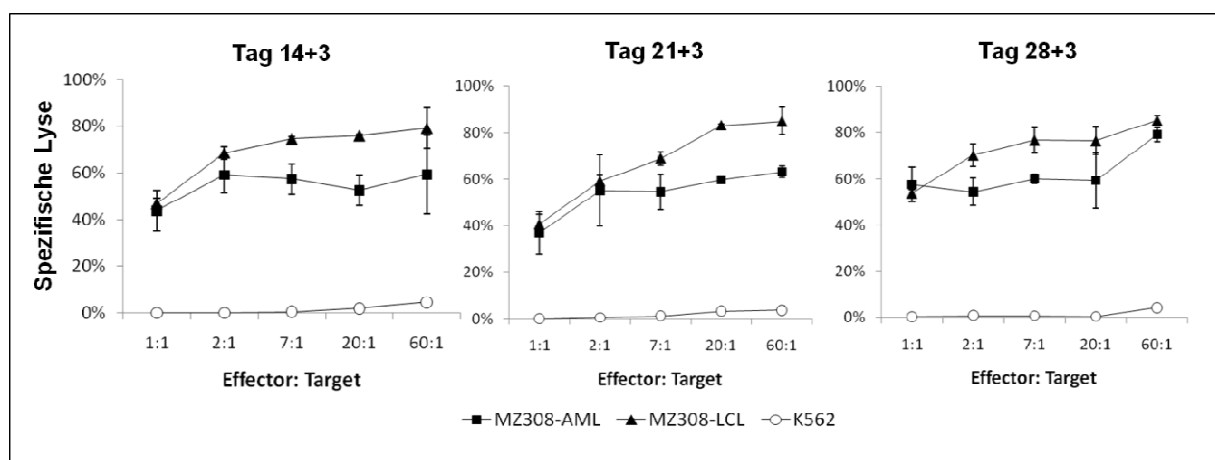


Abbildung 33: Zytolytische Aktivität der AML MZ308-reaktiven CTL Population an Tag 14+3, 21+3 und 28+3 ermittelt im ⁵¹Cr-Freisetzungstest. Als Zielzellen (Target) dienten AML-Blasten (■) und B-LCL (▲) des Patienten MZ308 sowie K562 Zellen (○) als Kontrolle für NK Zell-Reaktivität. Effektor- und Target-Zellen wurden in den angegebenen Verhältnissen kokultiviert. Die Messwerte stellen Mittelwerte ± SEM von Duplikaten dar. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Eine Erkennung und spezifische Lyse der zur Stimulation eingesetzten AML MZ308-Blasten durch die getesteten CTL-Populationen erfolgte hier in allen eingesetzten Effektor:Target-Verhältnissen. Die spezifische Lyse-Fähigkeit der CTL-Populationen lag bei ca. 60%. Die Erkennung und Lyse der MZ308 Patienten-B-LCL erfolgte mit etwas höherer Spezifität (bis zu > 80%). Der Einsatz von K562 Zellen führte in allen untersuchten Effektor:Target-Verhältnissen nur zu einer minimalen Erkennung durch die CTL-Populationen. Spender-B-LCL wurden nicht getestet. Diese Daten bestätigen die im IFN γ -ELISpot erzielten Ergebnisse.

5.2.2.4 Etablierung geeigneter Bedingungen für den adoptiven Transfer

In Anlehnung an die für das BC913183/MZ580-System etablierten Rahmenbedingungen für den adoptiven Transfer wurden für das BC1019683/MZ308-System analoge Bedingungen gewählt. Die Versuchstiere wurden mit 5×10^5 MZ308-Blasten inokuliert und der adoptive

Transfer erfolgte an Tag 18 nach Transplantation. Ebenso wurde entschieden, ein identisches Effektor:Target-Verhältnis von 10:1 einzusetzen.

5.2.2.5 Adoptiver Transfer zur Untersuchung der Funktionalität unterschiedlicher CTL-Populationen

Um analog zum BC913183/MZ580-System die Funktionalität und Stärke der Effektor-Funktionen unterschiedlich lange *in vitro* kultivierter AML MZ308-*dual mismatch* reaktiver CTL-Populationen zu untersuchen, wurden diese adoptiv in AML MZ308-erkrankte NSG-Mäuse transferiert.

5.2.2.5.1 Phänotypische Charakterisierung der AML MZ308- *dual mismatch* reaktiven CTL-Populationen

Es wurden analog zu den in Abschnitt 5.2.1.5 beschriebenen Experimenten AML MZ308-reaktive CTL-Populationen nach einer Kulturdauer von 14, 21, und 28 Tagen untersucht. Diese Populationen wurden gewählt, um mögliche Unterschiede in der Effizienz der lytischen Aktivität *in vivo* zu untersuchen. Die Zellen wurden während der gesamten Kulturdauer regelmäßig anhand von durchflusszytometrischen Analysen auf Reinheit und Differenzierungsgrad untersucht (siehe Abbildung 34). Die Reinheit der Zellen, gemessen anhand der Oberflächen-Expression von CD8, betrug am Tag des Transfers für alle Populationen im Mittel 99,9%.

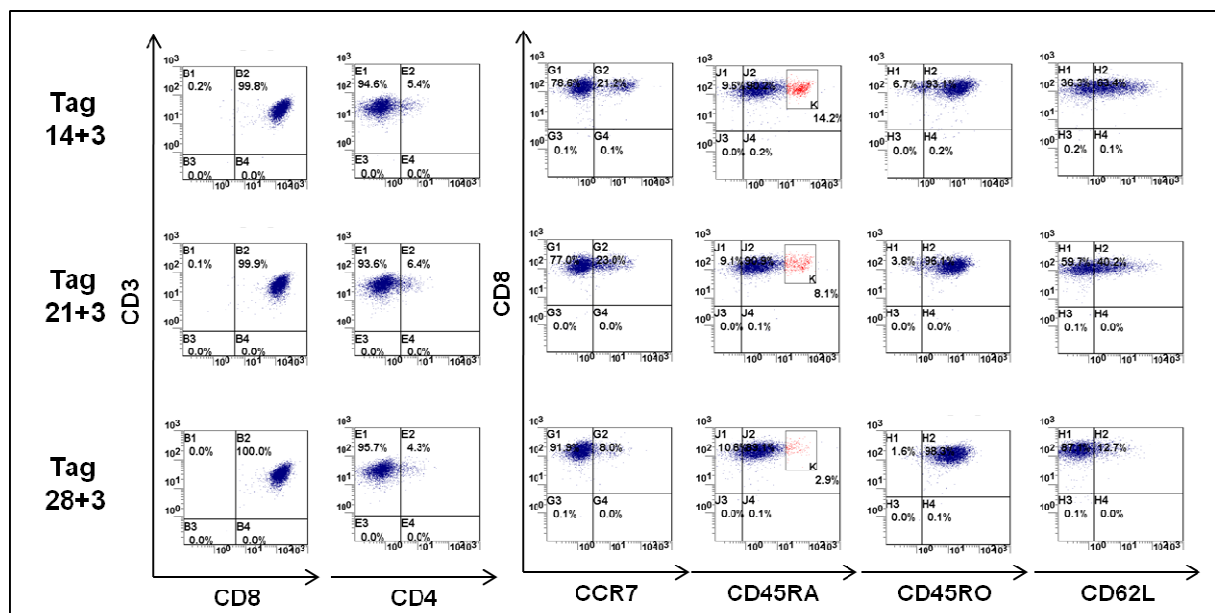


Abbildung 34: Durchflusszytometrische Analyse der AML MZ308-reaktiven CTL-Populationen im Verlauf der Kultur. Die für den adoptiven Transfer eingesetzten CTL-Populationen wurden hinsichtlich ihrer Reinheit auf die Expression von CD3, CD4 und CD8 untersucht. Zusätzlich wurde die Expression der Differenzierungsmarker CCR7, CD45RA, CD45RO und CD62L analysiert. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Im Verlauf der Kultur war eine Zunahme der Expression des Oberflächen-Antigens CD45RO zu erkennen. Dies korrelierte mit der zunehmenden Aktivierung der T Lymphozyten und der

verstärkten Präsenz von Antigen-spezifischen *memory*-T Zellen. Gleichzeitig war eine Abnahme der Expression von Differenzierungsmarkern zu erkennen, die dem Phänotyp der naiven CD8⁺ T Zellen entsprachen. Dazu zählten vor allem CCR7, CD62L und CD45RA (siehe Abschnitt 2.2.4). Die generierten CTL-Populationen wiesen somit einen zunehmend differenzierten *effector memory* T Zell-Phänotyp auf.

5.2.2.5.2 Experimenteller Ablauf

In Tabelle 21 sind die unterschiedlichen Kohorten und die jeweils transplantierten Zellen zusammenfassend dargestellt. Analog zu dem in Abschnitt 5.2.1.5 beschriebenen Versuch im BC913183/MZ580-System wurde neben den *in vivo*-Effektor-Funktionen der eingesetzten CTL-Populationen auch der potentielle Nutzen des Ko-Transfers autologer CD4⁺ T Zellen untersucht. Gleichzeitig wurde auch hier eine potentielle Leukämie- und Xenoreaktivität der autologen CD4⁺ T Zellen analysiert.

Tabelle 21: Analyse der Effektor-Funktionen unterschiedlich lange kultivierter AML MZ308-dual mismatch reaktiver CTL-Populationen. Übersicht und Behandlung der einzelnen Versuchstier-Kohorten. N = 5, außer für * N = 3.

Kohorte	Transferierte Zellzahl		
	MZ308-Blasten	CD8 ⁺ CTL	Autologe CD4 ⁺
CTL Tag 14	5x10 ⁵	5x10 ⁶	5x10 ⁵
CTL Tag 21	5x10 ⁵	5x10 ⁶	5x10 ⁵
CTL Tag 28	5x10 ⁵	5x10 ⁶	5x10 ⁵
CTL Tag 21-CD4 ⁺ *	5x10 ⁵	5x10 ⁶	-
AML MZ308 Ko	5x10 ⁵	-	-
AML MZ308 CD4 ⁺ Ko*	5x10 ⁵	-	5x10 ⁵
CD4 ⁺ Ko*	-	-	5x10 ⁵

Der allgemeine Versuchsablauf des Transfer-Experiments erfolgte wie in Abbildung 20 für das BC913183/MZ580-System dargestellt.

5.2.2.5.3 Ergebnisse

An Tag 18 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Verlaufskontrollen. Die *Engraftment*-Stärke der AML MZ308-Blasten lag im Knochenmark bei 0,2%. Dieser Wert war zwar gegenüber den definierten Bedingungen erniedrigt, es war jedoch eine distinkte Population an AML-Blasten klar erkennbar (Daten nicht gezeigt). Der Transfer der CTL-Populationen erfolgte wie beschrieben an Tag 18. An Tag 25 wurden aus peripherem Blut, Milz und Knochenmark Einzelzellsuspensionen aller Versuchstiere zur durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der Präsenz der anfänglich transplantierten humanen CD33⁺CD45⁺ AML MZ308-Blasten sowie der adoptiv transferierten CD8⁺CD45⁺ CTL-Populationen und der in einigen

Fällen zusätzlich transferierten CD4⁺CD45⁺ T Lymphozyten gewonnen. Auch hier waren makroskopisch in allen adoptiv mit CTL transferierten Versuchstieren keine Anzeichen einer durch die humanen CTL vermittelten GvH-Erkrankung oder Xenoreaktivität detektierbar. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Funktionalität verschieden lange *in vitro* kultivierter CTL-Populationen im AML MZ308-System sind in Abbildung 35 für das Knochenmark-Kompartiment zusammenfassend dargestellt.

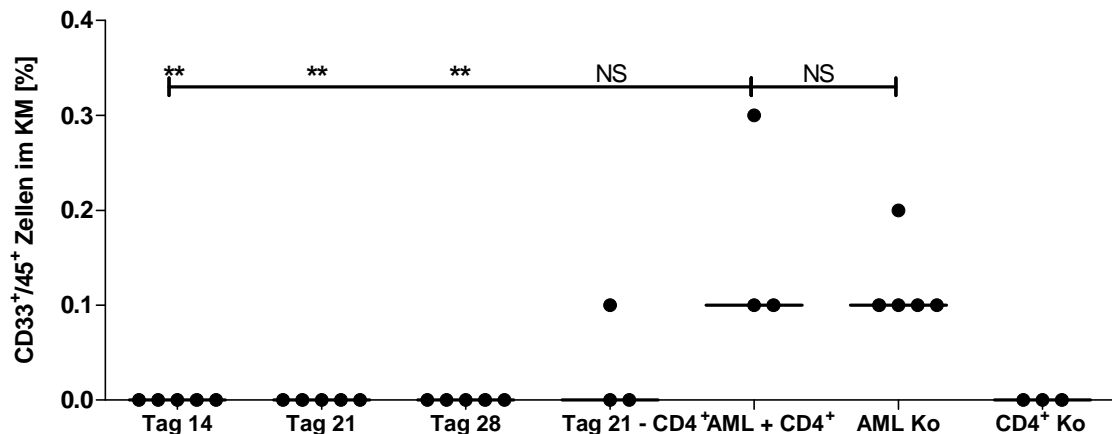


Abbildung 35: Analyse der *in vivo* Effektor-Funktionen unterschiedlich lange *in vitro* kultivierter AML MZ308-reaktiver CTL-Populationen im Knochenmark. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD33⁺CD45⁺ humaner AML MZ580-Blasten der einzelnen Versuchstier-Kohorten sieben Tage nach Applikation der adoptiven Immuntherapien. Angegeben sind sowohl die Prozentwerte pro Versuchstier pro Kohorte als auch der Median (-) jeder Kohorte. N = 5 bzw. N = 3. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem *student's t test* (**p < 0,005).

Analog zu den im BC913183/MZ580-System erzielten Ergebnissen ist ersichtlich, dass der adoptive Transfer aller CTL-Populationen, unabhängig von der vorangegangenen Kulturzeit, nach einer Woche zu einer kompletten Eradikation der AML MZ308-Blasten im Knochenmark therapiert Versuchstiere führte. Der alleinige Transfer von autologen CD4⁺ T Zellen in AML-tragende Versuchstiere hingegen hatte keinen Einfluss auf die Persistenz der AML MZ308-Blasten. Der Transfer autologer CD4⁺ T Zellen in nicht mit AML Blasten inokulierte Versuchstiere führte weder zur Induktion von Xenoreaktivität noch zur Persistenz der T Zellen in den Versuchstieren (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37). Der Transfer der Tag 21 CTL-Population ohne Ko-Transfer autologer CD4⁺ T Zellen führte zu einer kompletten Eradikation der leukämischen Last in zwei von drei Tieren. Im dritten Tier wurden residuelle Mengen an AML MZ308-Blasten detektiert. In der Milz und im peripheren Blut waren keine substantiellen Mengen an AML MZ308-Blasten zu detektieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

In Abbildung 36 und Abbildung 37 sind die Analysen hinsichtlich der Verteilung humaner T Lymphozyten im Knochenmark, in den Milzen und dem peripheren Blut der untersuchten Versuchstier-Kohorten dargestellt. Im Gegensatz zu den AML MZ580-*single mismatch* reaktiven CTL-Populationen waren eine Woche nach dem adoptiven Transfer der AML MZ308-

dual mismatch reaktiven CTL noch substantielle Mengen der transferierten T Lymphozyten wiederauffindbar, jedoch nur unter gleichzeitigem Ko-Transfer der autologen CD4⁺ T Lymphozyten.

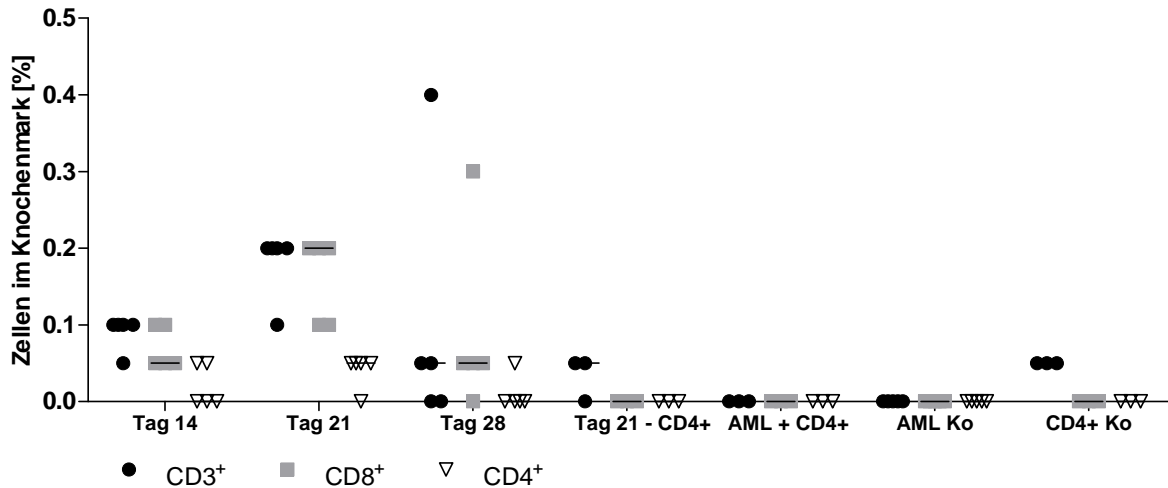


Abbildung 36: Verteilung humaner T Lymphozyten im Knochenmark der einzelnen Versuchstier-Kohorten. Für jede Gruppe der einzelnen Kohorten ist der prozentuale Anteil CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ humaner T Lymphozyten in Abhängigkeit der Versuchsdauer sowie der Median (-) angegeben. N = 5 bzw. 3.

In den Versuchstieren, die nicht mit CD4⁺ T Lymphozyten ko-transplantiert wurden konnten entweder keine (Knochenmark) oder nur minimale (Milz) Mengen an T Lymphozyten nachgewiesen werden. Zudem waren in einem von drei Tieren noch residuelle Mengen leukämische Blasten nachzuweisen (siehe Abbildung 35).

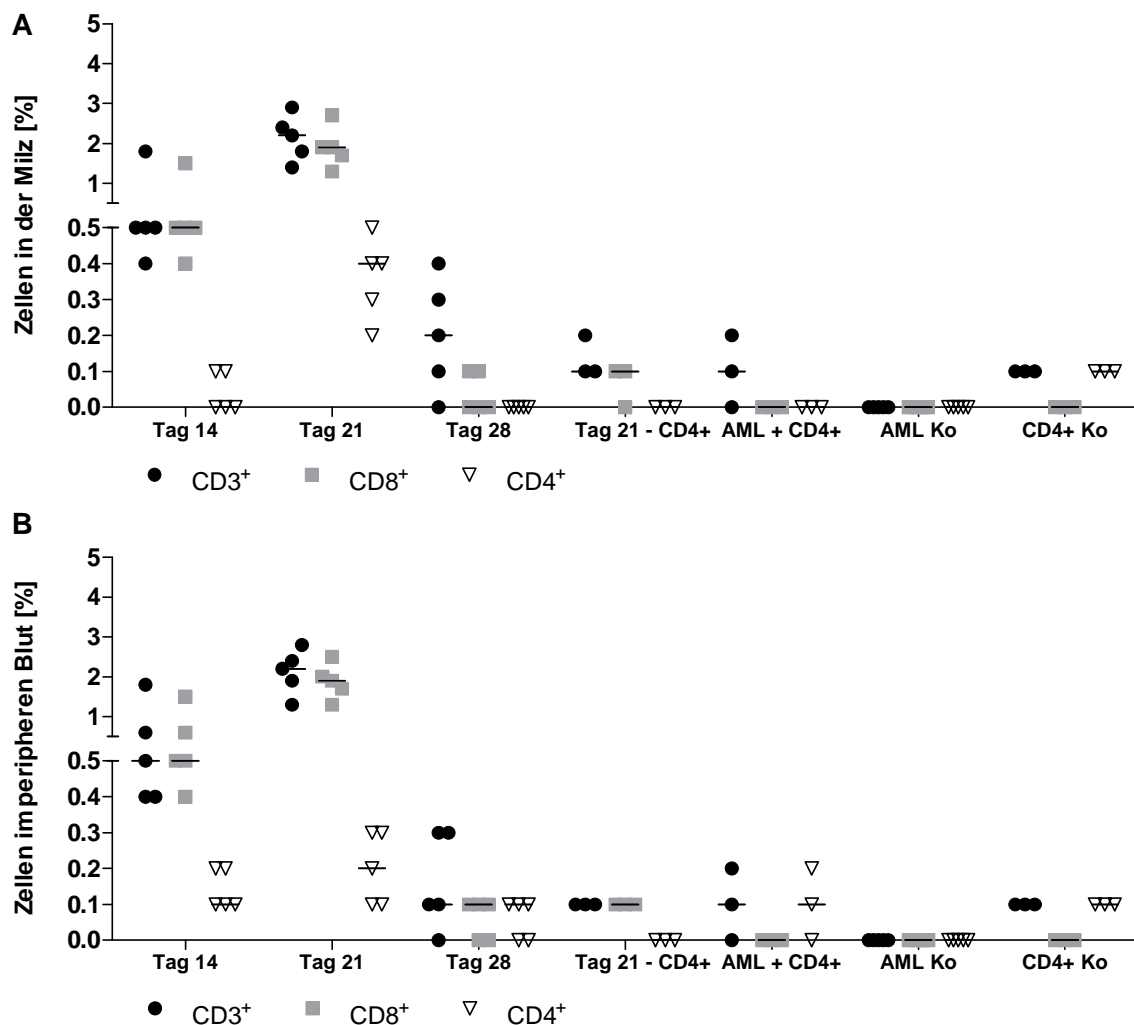


Abbildung 37: Verteilung humaner T Lymphozyten in der Milz (A) und im peripheren Blut (B) der einzelnen Versuchstier-Kohorten. Für jede Gruppe der einzelnen Kohorte sind der prozentuale Anteil CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ humaner T Lymphozyten in Abhängigkeit der Versuchsdauer sowie der Median (-) angegeben. N = 5 bzw. 3.

Die drei transferierten CTL-Populationen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Verteilung nur in der Milz signifikant. Dort konnte die größte Menge an humanen T Lymphozyten in der mit CTL Tag 21-therapierten Kohorte detektiert werden. Im Knochenmark war die Persistenz der drei CTL-Populationen ähnlich. Analog zu den in Abschnitt 5.2.1.5 beschriebenen Ergebnissen bestand die Mehrheit der CD3⁺ T Lymphozyten aus CD8⁺ CTL. Es konnten jedoch auch geringe Mengen CD4⁺ T Lymphozyten nachgewiesen werden.

5.2.3 Spezifitätsversuch im AML MZ580- und MZ308-System

Um auszuschließen, dass die *in vivo* beobachteten Effektor-Funktionen der *in vitro* generierten und expandierten CTL-Populationen im MZ580- und MZ308-System lediglich auf unspezifischen, T Zell-vermittelten Effekten wie der Freisetzung von hohen Mengen an Zytokinen beruhen, wurde das nachfolgende Experiment durchgeführt: Spender-PBMC von einem irrelevanten Dritten (engl.: *third party Spender*) wurden zur Generierung autologer, EBV-reaktiver CTL eingesetzt. Durch den gleichzeitigen Transfer EBV-spezifischer und AML-

reaktiver CTL in AML-transplantierte Versuchstiere sollte der Einfluss einer unspezifischen T Zell-vermittelten Lyse der AML-Blasten überprüft werden.

5.2.3.1 Charakterisierung des Spender-Empfänger-Systems

Die als Spezifitätskontrolle dienenden EBV-reaktiven Spender-CTL wurden in einem autologen System generiert. Als Empfänger dienten NSG-Mäuse, die wahlweise mit AML-Blasten des Patienten MZ580 oder der Patientin MZ308 transplantiert wurden. In Tabelle 22 sind vergleichend die HLA-Identitäten der AML-Patienten MZ580, MZ308, der zur Generierung AML-reaktiver CTL genutzten PBMC-Spender sowie des *third party* Spenders BC1013104 zusammengestellt. Bis auf die Übereinstimmung in einem HLA-C-Allel zwischen AML MZ308 und Spender BC1013104 ist der *third party* Spender zu allen anderen Systemen HLA-disparat.

Tabelle 22: HLA-Typ des irrelevanten PBMC-Spenders BC1013104, der zur Generierung EBV-spezifischer CTL verwendet wurde.

	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*	
MZ580 AML	01:01		57:01		06:02	
BC913183	01:01	30:01	13:02	18:01	06:02	07:01
MZ308 AML	01:01	26:01	38:01	51:01	04:01	12:03
BC1019683	01:01	26:01	35:03	51:01	04:01	14:02
BC1013104	02:01	03:01	07:02	35:02	04:01	07:02

5.2.3.2 Generierung der CTL-Populationen

Die Generierung EBV-spezifischer CTL erfolgte im autologen Spender BC1013104-System wie in Abschnitt 4.2.13 beschrieben. Da die EBV-Reaktivität eines gesunden Spenders vorwiegend im Kompartiment der *memory* und nicht der naiven T Zellen liegt, wurde hier die Gesamtheit der CD8⁺ T Zellen immunmagnetisch isoliert. Die CD8⁺ Zellen dienten als *feeder* Zellen. Die EBV-transformierten B-LCL dienten als Stimulatoren und wurden zusammen mit den letal bestrahlten CD8⁻ *feeder* Zellen zur Generierung EBV-spezifischer CTL in *in vitro*-Kulturen eingesetzt. Analog zu den AML-reaktiven CTL wurden die Zellen durch wöchentliche Restimulation mit letal bestrahlten Spender-B-LCL stimuliert und expandiert. Die Kultur erfolgte bis zum Tag 21 und die gewonnenen CTL wurden anschließend für den adoptiven Transfer eingesetzt. Parallel dazu wurden sowohl im MZ308- als auch MZ580-System erneut CTL-Populationen bis zum Erreichen von Tag 21 kultiviert und expandiert (siehe Abschnitte 5.2.2.3 und 5.2.1.3). In Abbildung 38 ist die durchflusszytometrische Analyse der einzelnen CTL-Populationen am Tag des Transfers (21+3) hinsichtlich der Reinheit gezeigt. Gleichzeitig

ist die Analyse der Reinheit der aus Spender BC1013104 PBMC isolierten CD4⁺ T Zellen gezeigt.

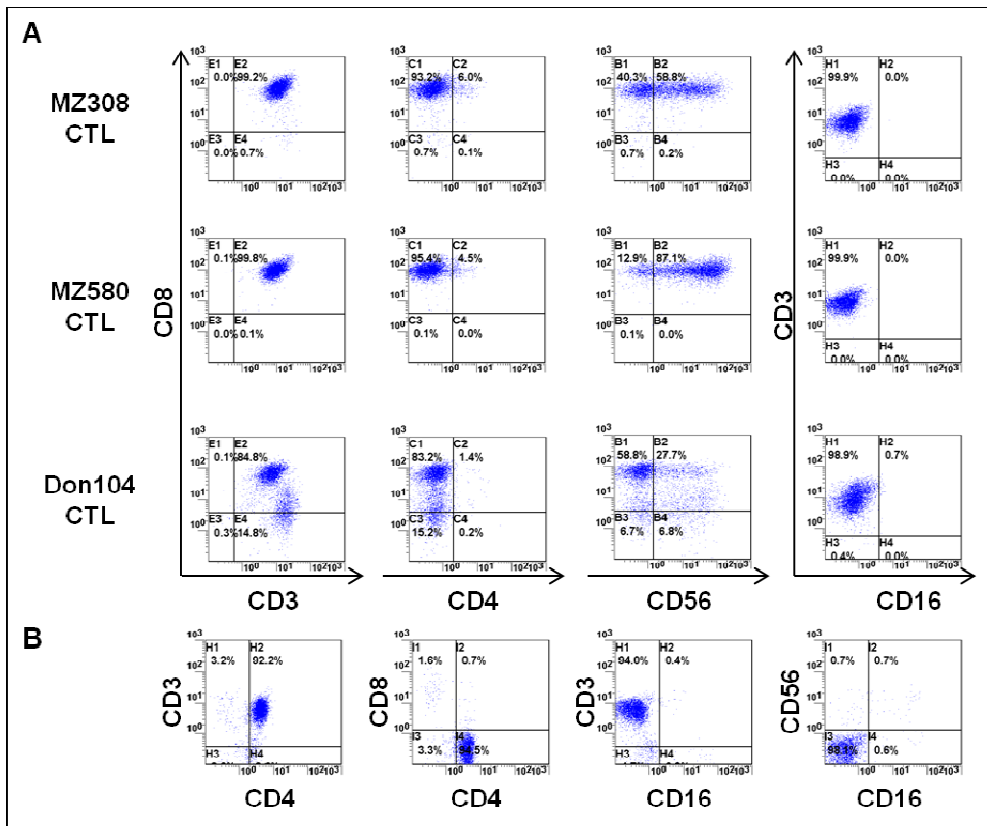


Abbildung 38: Durchflusszytometrische Analyse der für den adoptiven Transfer verwendeten CTL-Populationen am Tag des Transfers. A Überprüfung der Reinheit der expandierten CTL-Populationen anhand der Expression von CD3, CD4, CD8, CD16 und CD56 **B** Untersuchung der Reinheit der isolierten CD4⁺ T Zell-Fraktion aus Spender BC1013104 PBMC anhand der Expression von CD3, CD4, CD8, CD16 und CD56. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Die Reinheit, gemessen anhand der Oberflächen-Expression von CD8, betrug am Tag des Transfers für die AML-reaktiven CTL-Populationen >99%. Die Reinheit der Spender 104-EBV-reaktiven CTL lag bei ca. 85%.

Am Tag des Transfers wurden zusätzlich ⁵¹Chrom-Freisetzungstests mit den einzelnen CTL-Populationen durchgeführt, um die spezifische lytische Aktivität der Zellen zu ermitteln. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 39 zusammenfassend dargestellt.

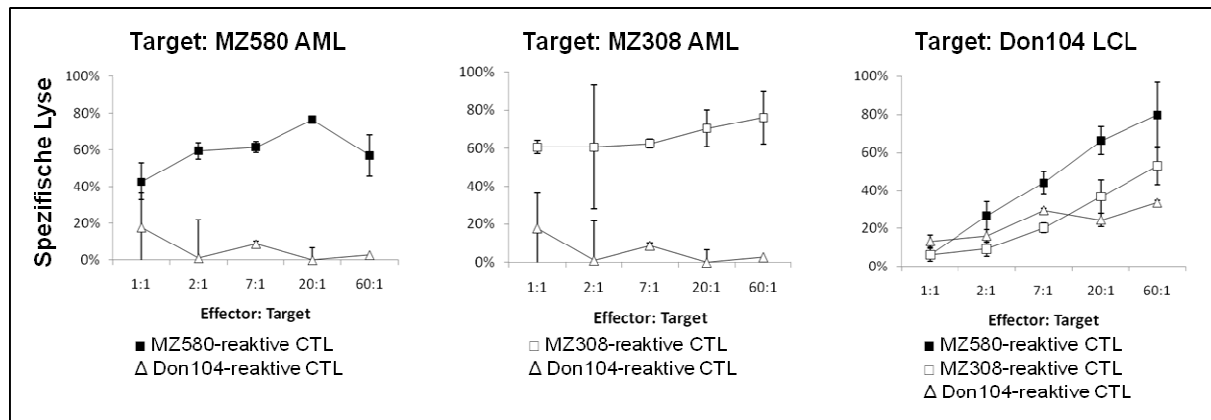


Abbildung 39: Zytolytische Aktivität der AML MZ580-, AML MZ308- und Spender-104-EBV-reaktiven CTL Population an Tag 21+3. Als Zielzellen (Target) im ⁵¹Cr-Freisetzungstest dienten AML MZ580 und MZ308-Blasten sowie Spender 104 B-LCL. Ermittelt wurden die zytolytische Aktivität MZ580-reaktiver CTL (■), Don104-reaktiver CTL (△) sowie MZ308-reaktiver CTL (□). Effektor- und Target-Zellen wurden in den angegebenen Verhältnissen eingesetzt. Die Messwerte stellen Mittelwerte ± SEM von Duplikaten dar. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Die Spender 104-EBV-reaktiven CTL zeigten in allen untersuchten E:T-Verhältnissen im Gegensatz zu den AML MZ580- bzw. MZ308-reaktiven CTL nur eine basale lytische Aktivität gegenüber den eingesetzten AML-Blasten. Die Erkennung durch die AML-reaktiven CTL-Populationen hingegen erfolgte mit hoher Spezifität. EBV-transformierte Spender-104-B-LCL wurden von allen drei CTL-Populationen mit zunehmendem E:T-Verhältnis verstärkt erkannt. Die spezifische Lyse-Aktivität der einzelnen CTL-Populationen unterschied sich nur unwesentlich, die stärkste Erkennung und spezifische Lyse erfolgte jedoch durch die AML MZ580-reaktiven CTL.

5.2.3.3 Adoptiver Transfer zur Spezifitätskontrolle im AML MZ580/308-System

5.2.3.3.1 Phänotypische Charakterisierung der einzelnen CTL-Populationen

Alle CTL-Populationen wurden nach einer Kulturdauer von 21+3 Tagen eingesetzt. Die Populationen wurden regelmäßig während der *in vitro*-Expansionsphase sowie am Tag des Transfers anhand von durchflusszytometrischen Analysen auf den Differenzierungsgrad der Zellen untersucht (siehe Abbildung 40).

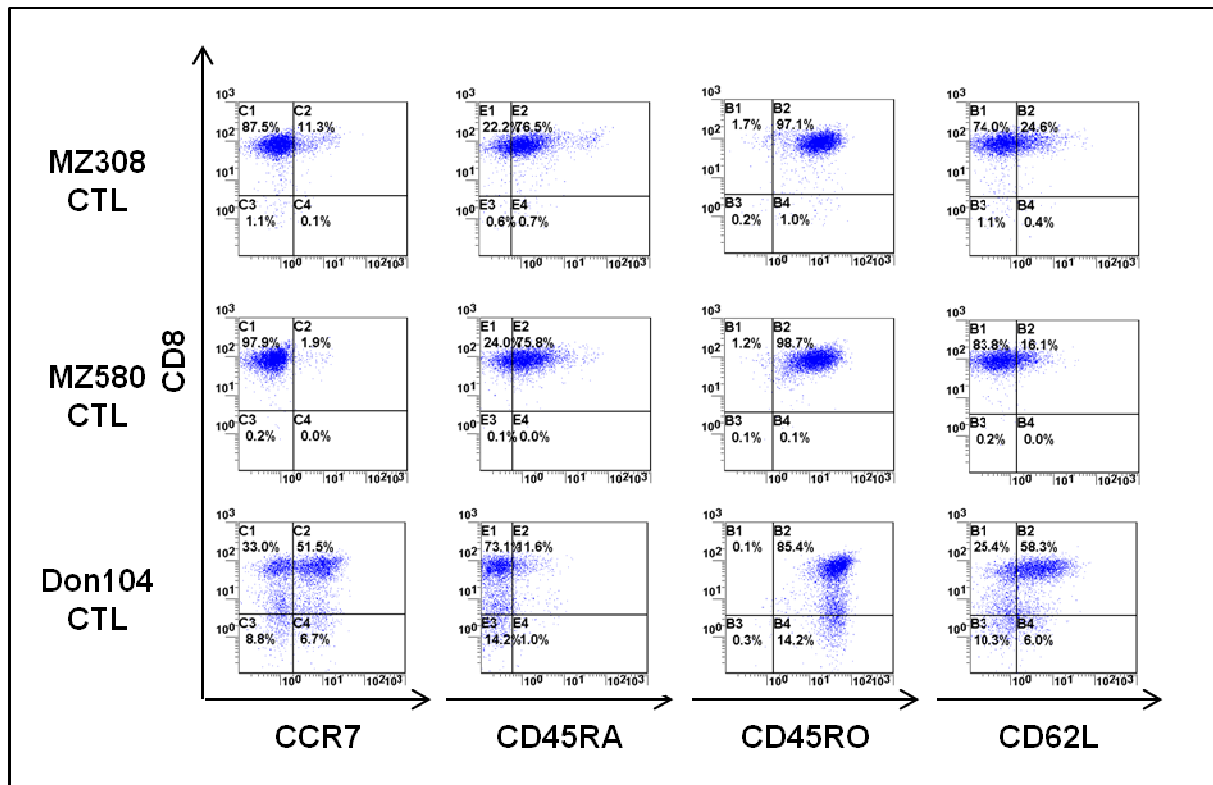


Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analyse der AML MZ308-, AML MZ580- und Spender-104 EBV-reaktiven Tag 21 CTL-Populationen am Tag des Transfers (D21+3). Die für den adoptiven Transfer eingesetzten CTL-Populationen wurden hinsichtlich der Expression der Differenzierungsmarker CCR7, CD45RA, CD45RO und CD62L analysiert. Originaldaten entstammen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr.

Die beiden AML MZ308- bzw. MZ580-reaktiven Tag 21+3 CTL Populationen wiesen nach drei-wöchiger *in vitro*-Kultur zunehmend den Phänotyp aktivierter reifer *effector memory* T Zellen auf, der durch die gleichzeitige Reduktion der Oberflächen-Expression der naiven T Zell-Marker CCR7, CD45RA und CD62L sowie der zunehmenden Expression des *memory*-Antigens CD45RO gekennzeichnet wurde. Auch die autolog generierten Spender-104-EBV reaktiven CTL wiesen an Tag 21+3 einen durch die Expression von CD45RO gekennzeichneten CD8⁺ *memory* Phänotyp auf. Aufgrund der Ko-Expression von CCR7 und CD62L lagen hier jedoch vornehmlich *central memory* T Zellen vor. Die EBV-Reaktivität eines gesunden EBV⁺-Spenders liegt vorwiegend im Kompartiment der *memory* T Zellen, was die unterschiedlichen T Zell-Populationen in den Systemen erklären könnte.

5.2.3.3.2 Experimenteller Ablauf

In Tabelle 23 sind die unterschiedlichen Kohorten und die jeweils transplantierten AML-Blasten und CTL-Populationen zusammenfassend dargestellt. Jeweils drei Versuchstier-Kohorten wurden mit AML MZ580- bzw. AML MZ308-Blasten inokuliert und anschließend a) AML-reaktive CTL b) Spender-104-EBV-spezifische CTL oder c) keine T Zellen adoptiv transferiert. Dies erlaubte eine vergleichende Analyse zur Spezifität von AML-reaktiven und Spender-104-EBV-reaktiven CTL.

Tabelle 23: Untersuchung zur Spezifität der ausgeübten Effektor-Funktionen AML MZ308-, AML MZ580- und Spender-104 EBV-reaktiver CTL-Populationen. Übersicht zur Behandlung der einzelnen Versuchstier-Kohorten. N = 5, außer für * N = 6.

Kohorte	Transferierte Zellzahl			
	MZ308-Blasten	MZ580-Blasten	CD8 ⁺ CTL	CD4 ⁺ CTL
MZ580 CTL Tag 21*		5x10 ⁵	5x10 ⁶	-
Spender-104 CTL Tag 21*		5x10 ⁵	5x10 ⁶	5x10 ⁵
MZ580 Kontrolle		5x10 ⁵	-	-
MZ308 CTL Tag 21	5x10 ⁵		5x10 ⁶	5x10 ⁵
Spender-104 CTL Tag 21	5x10 ⁵		5x10 ⁶	5x10 ⁵
MZ308 Kontrolle	5x10 ⁵		-	-

Bei Einsatz der AML MZ308-reaktiven CTL erfolgte zusätzlich eine Substitution mit 10% autologer CD4⁺ T Zellen, da dies bereits in dem in Abschnitt 5.2.2.5 beschriebenen Experiment vorteilhaft für die Effizienz und Persistenz der CTL war. Analog wurden auch die Spender-104-EBV-reaktiven CTL mit autologen CD4⁺ T Zellen kotransferiert. AML MZ580-reaktive CTL hingegen wurden nicht substituiert, da durch den Ko-Transfer CD4⁺ T Zellen in den in Abschnitt 5.2.1.5 beschriebenen Experimenten kein Einfluss auf die *in vivo* Effizienz der ausgeübten Effektor-Funktionen zu beobachten war.

Der allgemeine Versuchsablauf des Transfer-Experiments erfolgte wie in Abbildung 41 dargestellt. Anhand der in den Abschnitten 5.2.1.4 und in 5.2.2.3 ermittelten Transfer-Bedingungen erfolgte eine Inokulation der Versuchstiere mit 5x10⁵ AML MZ580- und AML MZ308-Blasten an Tag 0 nach subletaler Bestrahlung an Tag -1.

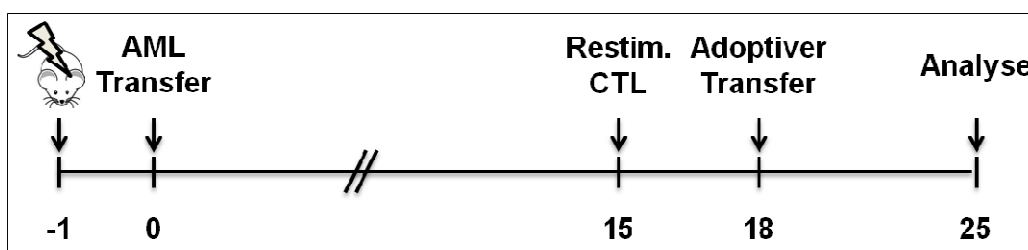


Abbildung 41: Versuchsablauf des adoptiven T Zell-Transfers zur Analyse der Spezifität der *in vivo* ausgeübten Effektor-Funktionen AML MZ308-, AML MZ580- und EBV-reaktiver CTL-Populationen.

An Tag 15 erfolgte die letztmalige Restimulation der zu untersuchenden CTL-Populationen mit den korrespondierenden AML-Blasten bzw. Spender-104 EBV-B-LCL *in vitro*. An Tag 18 wurde die Stärke des *Engraftments* der AML-Blasten anhand von Verlaufskontrollen wie bereits beschrieben überprüft. Anschließend erfolgte der adoptive Transfer der CTL-Populationen. Die finale durchflusszytometrische Analyse von peripherem Blut, Milz und Knochenmark aller Versuchstiere erfolgte an Tag 25.

5.2.3.3.3 Ergebnisse

An Tag 18 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Verlaufskontrollen. Die *Engraftment*-Stärke der AML MZ580-Blasten im Knochenmark lag bei $6,35 \pm 0,64\%$ und die der AML MZ308-Blasten bei $0,1\%$. Diese Werte waren zwar gegenüber den bereits beschriebenen *Engraftment*-Raten leicht verändert, dennoch war in den mit AML MZ308-Blasten inokulierten Versuchstieren klar eine distinkte Population von AML-Blasten erkennbar (Daten nicht gezeigt). Nach Transfer der CTL-Populationen erfolgte an Tag 25 die durchflusszytometrische Analyse auf Präsenz der humanen $CD33^+CD45^+$ AML MZ580- bzw. MZ308-Blasten sowie der adoptiv transferierten $CD8^+CD45^+$ CTL-Populationen und $CD4^+CD45^+$ T Lymphozyten in den aus peripherem Blut, Milz und Knochenmark gewonnenen Einzelzellsuspensionen aller Versuchstiere. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 für das Knochenmark-Kompartiment zusammenfassend illustriert.

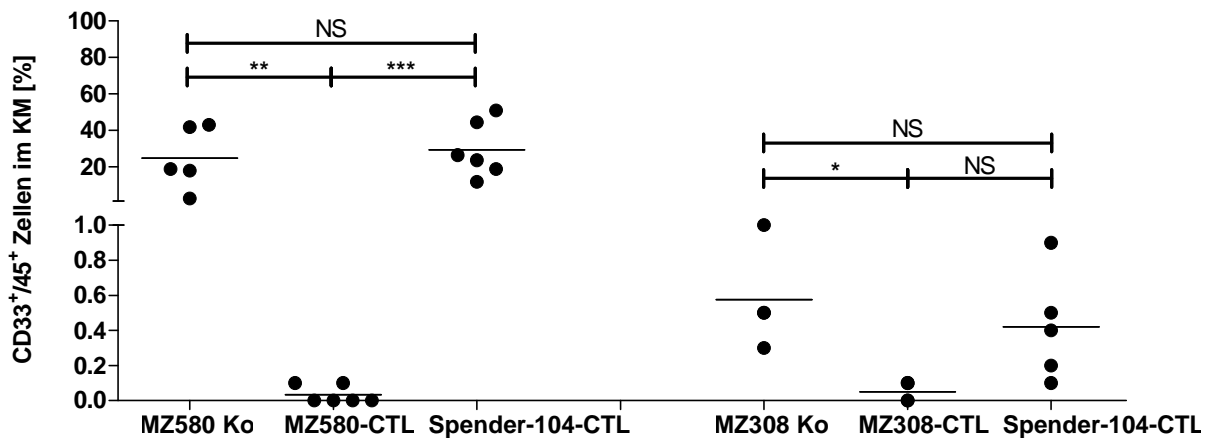


Abbildung 42: Analyse der Spezifität der *in vivo* ausgeübten Effektor-Funktionen AML MZ580-, MZ308- und Spender-104-EBV-reaktiver CTL-Populationen im Knochenmark. Dargestellt ist der prozentuale Anteil $CD33^+CD45^+$ humaner AML MZ580- (links) bzw. MZ308-Blasten (rechts) der einzelnen Versuchstier-Kohorten sieben Tage nach Applikation der adoptiven Immuntherapien. Angegeben sind sowohl die Prozentwerte pro Versuchstier pro Kohorte als auch der Median (-) jeder Kohorte. N = 4-6. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem *student's t test* (**p < 0,005).

Der Transfer der AML MZ580-reaktiven Tag 21 CTL-Population führte wie bereits beschrieben zu einer nahezu vollständigen Eradikation ($0-0,1\%$ humane $CD33^+CD45^+$ Zellen, Median $0,03\%$) der AML MZ580-Blasten im Knochenmark der Versuchstiere. Infundierte Spender-104-EBV-reaktive Tag 21 CTL hingegen resultierten in einer Expansion der AML MZ580-Blasten im Knochenmark, die vergleichbar war mit der Expansionsrate in den unbehandelten Kontrolltieren. In beiden Kohorten wurde am Tag der Analyse eine *Engraftment*-Rate von im Median $24,64\%$ bzw. $29,17\%$ humane $CD33^+CD45^+$ Zellen erzielt. Im MZ308-System konnte ein ähnliches, wenngleich weniger deutliches Ergebnis erzielt werden. Wie bereits in dem in Abschnitt 5.2.2.5 beschriebenen Experiment führte die Inokulation der Kontrolltiere mit AML MZ308-Blasten zu einem deutlich niedrigeren *Engraftment* der Versuchstiere im Knochen-

mark (0,3-1% humane CD33⁺CD45⁺ Zellen, Median 0,58%) als bei den mit AML MZ580-inokulierten Tieren. Die vergleichende Analyse der AML MZ308- und der Spender-104-EBV-reaktiven Tag 21 CTL zeigte dennoch eine nur durch AML MZ308-reaktive CTL ausgelöste Reduktion der leukämischen Last im Knochenmark (0-0,1% humane CD33⁺CD45⁺ Zellen, Median 0,05%) der therapierten Versuchstiere. Der Transfer der Spender-104-EBV-reaktiven Tag 21 CTL-Population hingegen führte zu einer mit der Kontrolltier-Kohorte vergleichbaren *Engraftment*-Rate von 0,1-0,9% (Median 0,42%) humaner CD33⁺CD45⁺ AML MZ308-Blasten.

Die durchflusszytometrische Analyse von Milz und peripherem Blut der Versuchstiere ist in Abbildung 43 gezeigt.

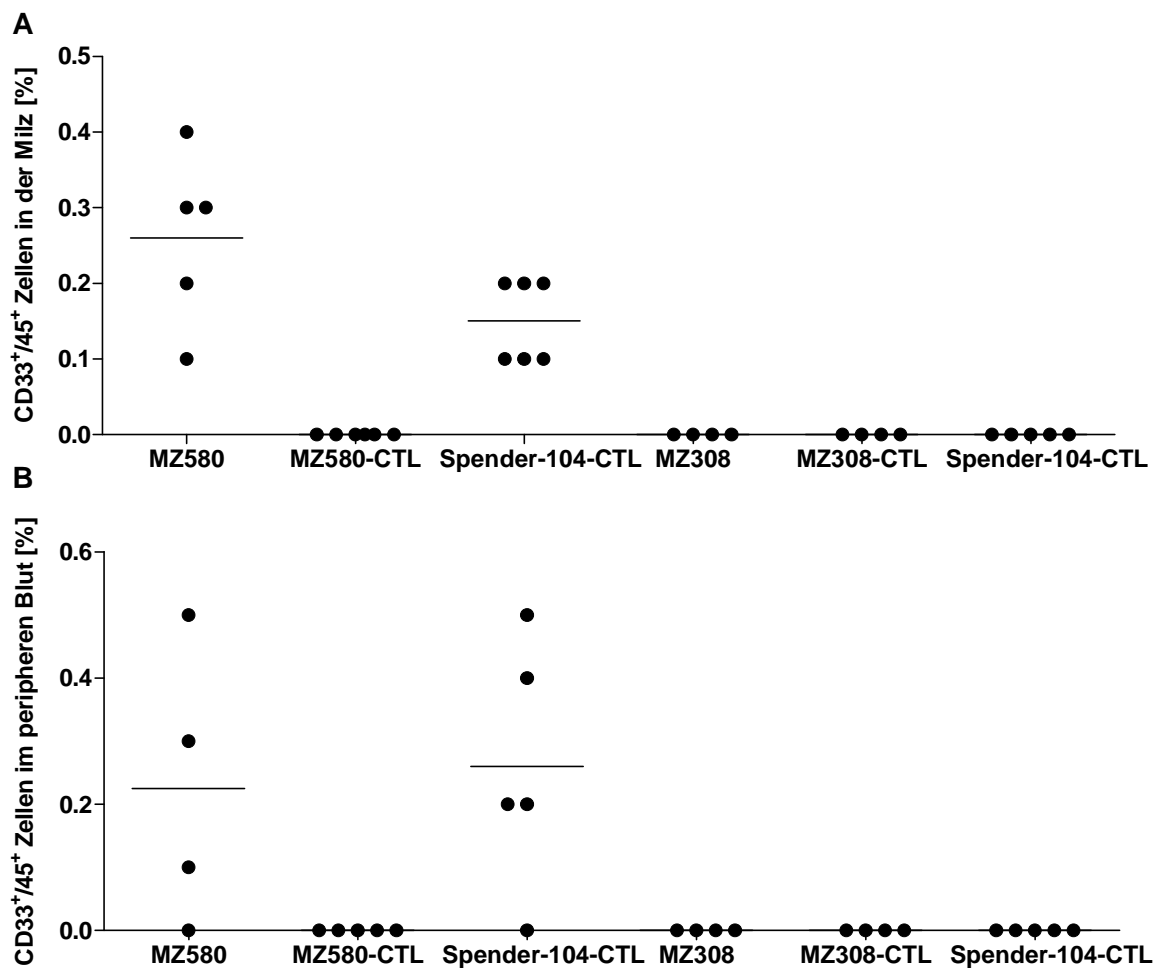


Abbildung 43: Analyse zur Spezifität der *in vivo* ausgeübten Effektor-Funktionen AML MZ580-, MZ308- und Spender-104-EBV-reaktiver CTL-Populationen in der Milz (A) und im peripheren Blut (B). Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD33⁺CD45⁺ humaner AML MZ580- (links) bzw. MZ308-Blasten (rechts) der einzelnen Versuchstier-Kohorten sieben Tage nach CTL-Transfer. Angegeben sind sowohl die Prozentwerte pro Versuchstier pro Kohorte als auch der Median (-) jeder Kohorte. N = 4-6.

Im AML MZ580-System sind ähnliche Verteilungen humaner CD33⁺CD45⁺ Zellen in der Milz und im peripheren Blut wie im Knochenmark zu erkennen. Sowohl die nur mit AML MZ580-Blasten inokulierten Versuchstiere als auch die mit Spender-104-EBV-spezifischen CTL behandelten Versuchstiere weisen vergleichbare Populationen humaner AML-Blasten auf (0,1-

0,4% (Median 0,26%) vs. 0,1-0,2% (Median 0,13%) humane CD33⁺CD45⁺ Zellen in der Milz bzw. 0-0,5% (Median 0,24%) und 0-0,5% (Median 0,27%) humane CD33⁺CD45⁺ Zellen im peripheren Blut).

In Abbildung 44 ist die Verteilung der mittels Durchflusszytometrie identifizierten T Zell-Populationen im Knochenmark der einzelnen Versuchstiere dargestellt.

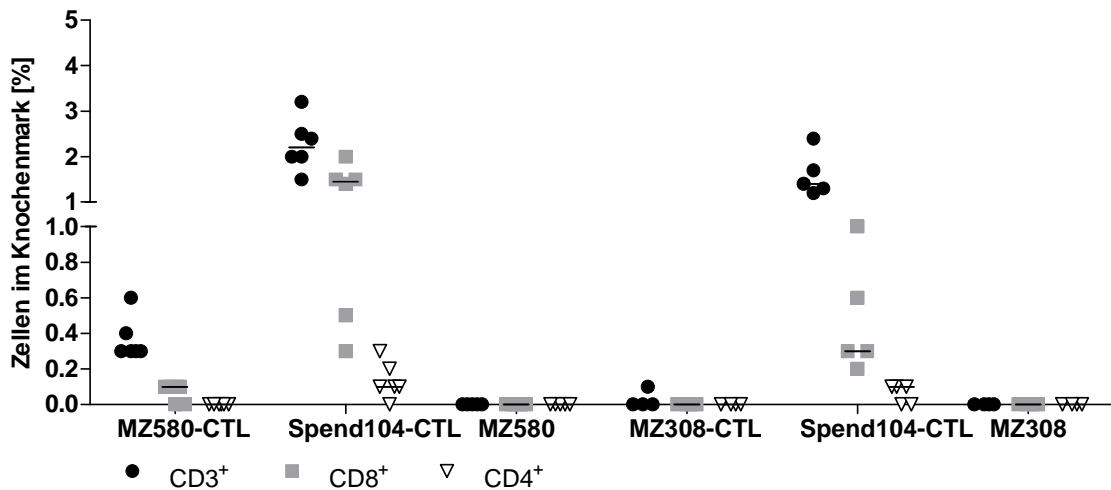


Abbildung 44: Verteilung humaner T Lymphozyten im Knochenmark der einzelnen Versuchstier-Kohorten. In jeder Kohorte sind der prozentuale Anteil CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ humaner T Lymphozyten für das einzelne Versuchstier sowie der Median (-) der Kohorte angegeben. N = 3-6.

Es wird deutlich, dass in beiden AML-Systemen nur nach Transfer der Spender-104-EBV-reaktiven CTL humane T Lymphozyten in substantiellen Mengen (Median 2,2% bzw. 1,4% für das AML-MZ580- bzw. AML MZ308-System) detektiert werden konnten. Nach adoptivem Transfer der AML-reaktiven CTL-Populationen wurden hingegen nur geringe Mengen humaner CD3⁺CD45⁺ Zellen (0,3-0,6% bzw. 0-0,1% im AML-MZ580- bzw. AML MZ308-System) detektiert. In allen Fällen handelte es sich hierbei vornehmlich um CD3⁺CD8⁺ T Lymphozyten. Nach adoptivem Transfer der Spender-104-EBV-reaktiven CTL konnten zudem geringe Mengen der zur Substitution eingesetzten CD3⁺CD4⁺ T Lymphozyten (0-0,3% bzw. 0-0,1% im AML-MZ580- bzw. AML MZ308-System) gefunden werden. In den Kontrolltier-Kohorten fand keine Detektion humaner T Lymphozyten statt.

In Abbildung 45 ist analog die Verteilung der mittels Durchflusszytometrie detektierten humanen T Lymphozyten in der Milz und im peripheren Blut der einzelnen Versuchstiere dargestellt.

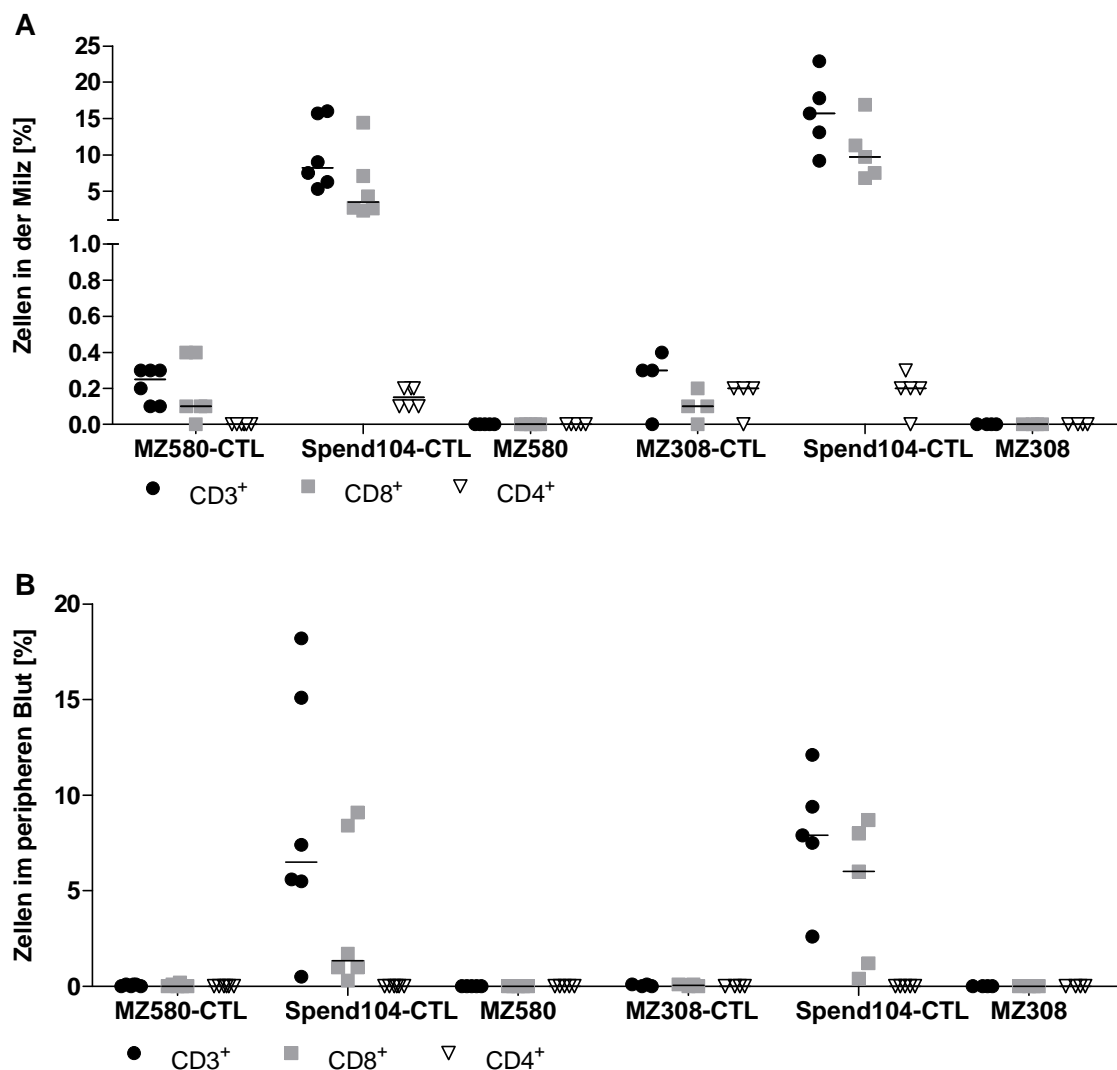


Abbildung 45: Verteilung humaner T Lymphozyten in der Milz (A) und im peripheren Blut (B) der untersuchten Versuchstier-Kohorten. In jeder Kohorte sind der prozentuale Anteil CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ humaner T Lymphozyten für das einzelne Versuchstier sowie der Median (-) der Kohorte angegeben. N = 3-6.

Es konnte eine ähnliche Verteilung der T Zellen in Milz und peripherem Blut wie bereits im Knochenmark der untersuchten NSG-Mäuse festgestellt werden. In den Milzen von mit AML MZ580- und AML MZ308-reaktiven CTL behandelten Versuchstieren konnten humane CD3⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten nachgewiesen werden, in vergleichbarer Menge zu den bereits im Knochenmark gefundenen Zellen (0,1-0,3% (Median 0,25%) bzw. 0-0,4% (Median 0,3%)). Der adoptive Transfer der Spender-104-EBV-reaktiven CTL-Populationen führte zu vergleichsweise hohen Mengen detektierbarer humaner CD3⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten in den Milzen (5,3-16% (Median 8,25%) bzw. 9,2-22,9 (Median 15,7%) im AML MZ580- bzw. AML MZ308-System) zum Analysezeitpunkt. Sowohl in den Milzen der mit Spender-104-EBV- als auch mit AML MZ308-reaktiven CTL behandelten NSG-Mäusen konnten zudem geringe Mengen der zur Substitution eingesetzten CD3⁺CD4⁺ T Lymphozyten nachgewiesen werden. Im peripheren Blut der analysierten Versuchstiere wurden ausschließlich humane T Lympho-

zyten in den mit Spender-104-EBV-reaktiven CTL behandelten NSG-Mäusen gefunden (0,5-18,2% (Median 6,5%) bzw. 2,6-12,1% (Median 7,9%) nach Inokulation mit AML MZ580- bzw. MZ308-Blasten). Die nachgewiesenen T Zellen setzten sich analog zu den im Knochenmark und der Milz erzielten Ergebnissen primär aus CD8⁺ T Lymphozyten zusammen. Die Menge detektierter CD4⁺ T Lymphozyten lag bei <0,1%. Nach adoptivem Transfer der AML-reaktiven CTL konnten keine humane T Lymphozyten detektiert werden. In den Kontrolltier-Kohorten konnten ebenfalls keine humanen T Lymphozyten nachgewiesen werden.

5.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des adoptiven T Zell Transfers

In Abschnitt 5.1 konnte erfolgreich die Etablierung eines prä-klinischen NSG-AML Modells durch die i.v.-Transplantation primärer, aus Patientenmaterial gewonnener AML-Blasten gezeigt werden. Das generierte Modell wurde parallel in zwei Spender-Empfänger-Systemen, AML MZ580 und MZ308, für Untersuchungen zum adoptiven Transfer AML-reaktiver, *in vitro* generierter und expandierter CTL eingesetzt. In beiden Systemen wurden unterschiedlich lange *in vitro* kultivierte CTL-Populationen auf ihre Effektor-Funktionen und Effizienz *in vivo* untersucht. Die im MZ580-System erzielten Ergebnisse konnten im MZ308-System bestätigt werden. In beiden Fällen führte der Einsatz vergleichsweise kurz *in vitro* kultivierter (maximal über 28 Tage) CTL-Populationen zu einer nahezu kompletten Eradikation der zuvor transplantierten AML-Blasten in den Versuchstieren. Diese CTL-Populationen wiesen einen frühen *effector memory* T Zell-Phänotyp auf. Der Einsatz von länger *in vitro* kultivierten Populationen führte im MZ580-System zu einer verminderten Effektorfunktion *in vivo*. Es konnte gezeigt werden, dass die Elimination der AML-Blasten im murinen Knochenmark zwischen zwei und 24 Stunden nach erfolgtem Transfer einsetzt und nach 48 Stunden fast vollständig abgeschlossen ist. Zur Analyse der Spezifität der durch AML-reaktive CTL ausgeübten Effektor-Funktionen *in vivo* wurden EBV-reaktive CTL eines *third party*-Spenders generiert und parallel zu AML-reaktiven CTL adoptiv transferiert. Die EBV-reaktiven CTL lösten im Gegensatz zu den AML-reaktiven CTL keine Eradikation der zuvor transplantierten AML-Blasten aus, sondern führten in den Versuchstieren zu einem mit nicht behandelten Kontrolltieren vergleichbaren *Engraftment*. Im Gegensatz zu den AML-reaktiven CTL wiesen die EBV-reaktiven CTL verstärkt einen *central memory* T Zell-Phänotyp auf.

5.3 Untersuchungen zum Transmigrationsverhalten humaner T Zellen über murines Endothel

In Abschnitt 5.2 konnte indirekt gezeigt werden, dass humane AML-reaktive T Lymphozyten nach systemischer Applikation durch i.v.-Transfer in NSG-Mäuse in der Lage sind, in mit AML-Blasten besiedelte Organe wie das Knochenmark und die Milz zu migrieren und dort Effektor-Funktionen auszulösen. Zum Nachweis, dass die transplantierten AML-Blasten nicht ausschließlich in den Blutgefäßen der NSG-Mäuse akkumulierten, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser im Institut für Pathologie in Leipzig immunhistochemische Schnitte und Färbungen von mit AML MZ580-Blasten transplantierten NSG-Mäuse angefertigt (siehe Abbildung 46).

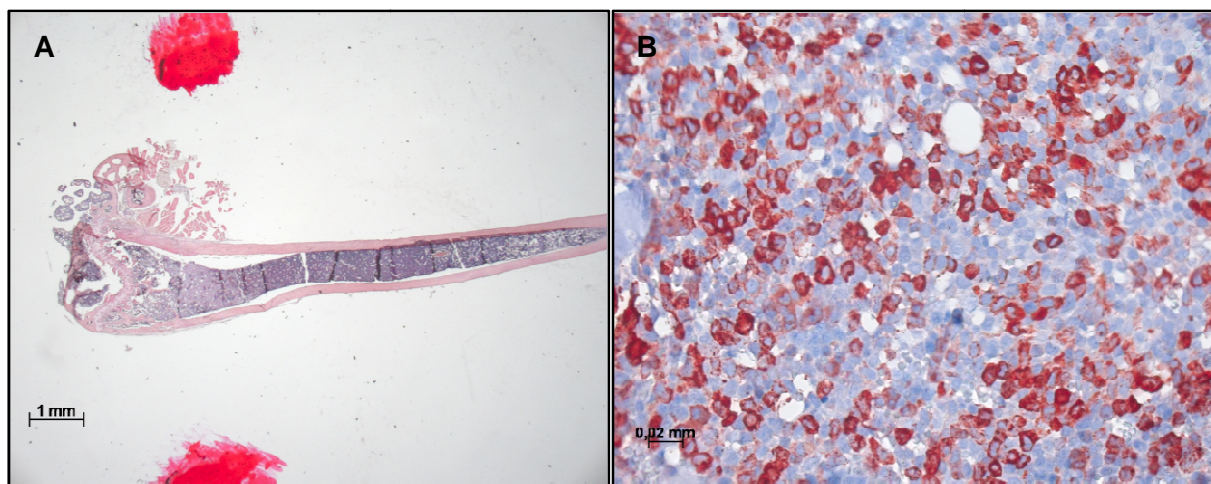


Abbildung 46: Immunhistochemische Untersuchung des Knochenmarks einer mit AML MZ580 inokulierten NSG-Maus. Die Aufarbeitung der NSG-Maus erfolgte an Tag 25 nach Transplantation von 5×10^5 AML MZ580-Blasten. Die durchflusszytometrische Analyse des zweiten Femurs ergab eine *Engraftment*-Stärke von ca. 20%. **A** Übersichtsdarstellung des Femur-Schnitts, gefärbt mittels NASD Enzymreaktion. 12-fache Vergrößerung **B** Immunhistochemische Färbung des murinen Knochenmarks mit einem humanen anti-Myeloperoxidase mAb. Vergrößerung 630-fach.

Anhand der Myeloperoxidase-Färbung einer seit 25 Tagen mit 5×10^5 AML MZ580-Blasten inokulierten NSG-Maus wird deutlich, dass die transplantierten Blasten homogen verteilt in der subendostealen Region des Knochenmarks vorliegen und nicht ausschließlich in der Vaskularisierung. Somit stellt die Extravasation humaner T Zellen über murine Blutgefäße eine essentielle Bedingung für die Migration in befallene Organe dar. Da dieser Transmigrationsprozess über die Speziesbarriere Maus-Mensch erfolgen muss, ist es möglich, dass andere Mechanismen als bei der Extravasation innerhalb ein und derselben Spezies zugrunde liegen. Bislang wurde die Fragestellung, auf welche Art und Weise humane T Zellen in humanisierten murinen Modellsystemen extravasieren, nicht adressiert. In der vorliegenden Arbeit sollte der genaue Transmigrations-Mechanismus humaner T Zellen über murine Blutgefäße und somit murine Endothelzellen auf molekularer Ebene analysiert werden. Dazu wurde ein Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Reinhard Henschler

am Blutspendendienst des Deutschen Roten Kreuzes (DRK), Frankfurt am Main, initiiert. Dort war es möglich, mit Hilfe eines speziellen experimentellen Aufbaus (siehe Abschnitt 5.3.1) die in einem Blutgefäß stattfindenden Interaktionen zwischen T Lymphozyten und vaskulären Endothelzellen zu simulieren und zu analysieren.

5.3.1 Adhäsions- und Transmigrationsstudien in der Flusskammer

Die Analyse der interzellulären Interaktionen von humanen T Lymphozyten und murinen vaskulären Endothelzellen erfolgte zunächst mit Hilfe der sogenannten Flusskammer wie in Abschnitt 4.2.16.2 beschrieben. Dazu wurden sowohl humane als auch murine T Lymphozyten sowie murine und humane Endothelzellen verwendet. Der Einsatz von Zellen der jeweils anderen Spezies diente dabei als Kontrolle. Jeder der sechs einzelnen Kanäle konnte individuell sowohl mit Zellen als auch mit Medien beschickt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden adhärent wachsende Endothelzellen in den einzelnen Kanälen bis zur Konfluenz kultiviert. Über die endständigen Stutzen erfolgte der Anschluss an ein Pumpen-System, das den Zu- und Abfluss von Flüssigkeiten und Zellsuspensionen unter definierten Fließgeschwindigkeiten erlaubte.

Das zugrunde liegende Schema der hier durchgeführten Experimente war fortwährend gleich. Nach Erreichen eines konfluenten EC-Monolayers in der Flusskammer wurden humane oder murine T Lymphozyten in einem Trägermedium mit einem niedrigen Scherdruck von 0,2-0,35 dyn/cm² über die Endothelzellen perfundiert und die Anzahl adhärenter Zellen nach Ablauf der Aufspül-Phase („initiale Adhäsion“) bestimmt. Anschließend wurde der Scherdruck schrittweise alle 30 sec auf 1 dyn/cm², 2 dyn/cm², 5 dyn/cm², 8 dyn/cm² und, je nach Experiment, auf den Maximalwert von 15 dyn/cm² erhöht. Dies simulierte den tatsächlich herrschenden Blutdruck in einem Blutgefäß und ist eine Voraussetzung für die Induktion von Transmigration. Durch die serielle Aufnahme von Echtzeit-Bildern konnte im Anschluss der Verlauf des Adhäsionsverhaltens sowie die Anzahl adhärenter Zellen nach Ablauf der schrittweisen Scherdruck-Erhöhung („feste Adhäsion“) bestimmt werden. In den folgenden Ergebnissen werden in einer Grafik jeweils die aus mehreren Einzel-Experimenten bestimmten Mittelwerte für initiale und feste Adhäsion der untersuchten T Zell-Populationen entsprechend der herrschenden Versuchsbedingungen gegenübergestellt.

5.3.1.1 Kultivierung von Endothelzellen in der Flusskammer

Als Vorbereitung für die im Folgenden erläuterten Versuche war eine erfolgreiche Kultur von vaskulären Endothelzellen in den Flusskammer-Kanälen notwendig. Um zu überprüfen, ob die ausgewählten murinen und humanen Endothelzellen einen konfluenten Monolayer in der Flusskammer ausbilden, wurden sie zunächst *in vitro* kultiviert und auf ihr Wachstumsverhalten in der Flusskammer hin analysiert (siehe Abbildung 47).

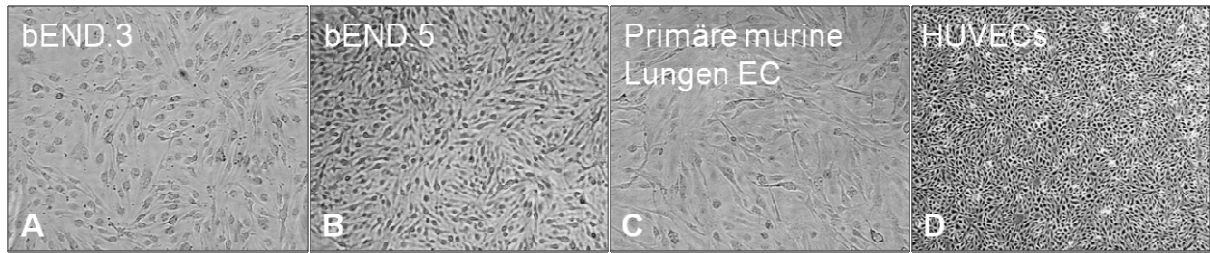


Abbildung 47: Übersicht der in den Flusskammern zur Konfluenz kultivierten Endothelzellen: A bEND.3 in 10x Vergrößerung, **B** bEND.5 in 4x Vergrößerung **C** Primäre murine Lungen-Endothelzellen in 4x Vergrößerung **D** HUVECs in 4x Vergrößerung

In Abbildung 47 sind beispielhafte Aufnahmen einzelner, in der Flusskammer kultivierter Monolayer der eingesetzten Endothelzellen dargestellt. Alle Endothelzellen erlaubten eine Kultivierung bis zur Konfluenz. Diese konnte in der Regel nach zwei bis drei Tagen erreicht werden.

5.3.1.2 Charakterisierung der Endothelzellen

Die in Abschnitt 5.3.1.1 dargestellten Endothelzellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expression typischer endothelialer Adhäsionsmoleküle untersucht. Da die Expression bestimmter Antigene nur nach vorheriger Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen induziert wird, wurden die Zellen vergleichend sowohl in ruhendem Zustand als auch nach Inkubation über Nacht mit niedrigen Konzentrationen von TNF- α analysiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 48 dargestellt.

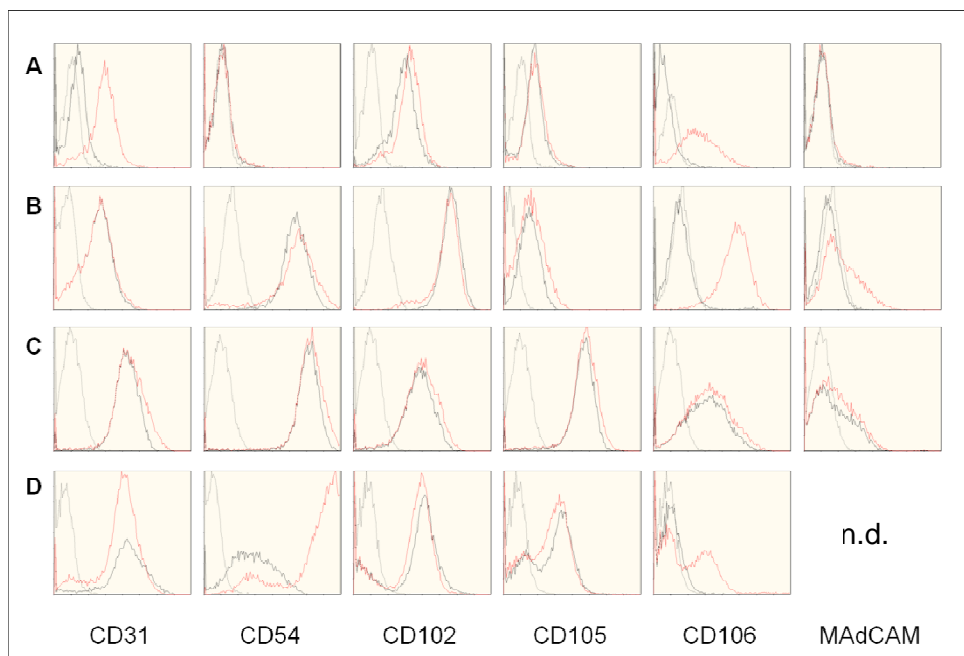


Abbildung 48: Durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle. A bEND.3 P17+3, **B** bEND.5 p20+6 **C** Primäre murine Lungen-Endothelzellen P10 **D** HUVECs P3. Dargestellt sind die Expressionstärken mit (rote Linie) und ohne (schwarze Linie) Stimulation über Nacht mit 20 ng/ml TNF- α . Die Isotyp-Kontrolle ist in grau dargestellt. n.d.= nicht durchgeführt.

Die Analyse ergab, dass mit Ausnahme von CD54 (ICAM-1, auf bEND.3 Endothelzellen) und MAdCAM (auf allen untersuchten Endothelzellen) alle für Endothelzellen charakteristischen Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der eingesetzten Endothelzellen entweder bereits in ruhendem Zustand exprimiert werden (z.B. CD102 (ICAM-2), CD105 (Endoglin)) oder durch die kurzzeitige Inkubation mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α zur Expression gebracht werden können (z.B. CD106 (VCAM-1), CD54 (ICAM-1) auf HUVECs). Somit eigneten sich alle ausgewählten Endothelzellen für die folgenden Untersuchungen in der Flusskammer.

5.3.1.3 MACS[®]-Isolation von murinen und humanen T Lymphozyten

Die MACS[®]-Isolation humaner T Lymphozyten erfolgte aus kryokonservierten PBMC unter Einsatz von anti-CD3 Microbeads. Die Isolation muriner T Lymphozyten erfolgte aus frisch präparierten Balb/cJ-Splenozyten unter Einsatz von anti-CD90.2 Microbeads (siehe Abschnitt 4.2.9). Die Reinheit der isolierten Fraktionen wurde nach jeder Aufreinigung durch Färbung mit anti-CD3 bzw. anti-CD90.2 mAb durchflusszytometrisch überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Isolation humaner CD3⁺ T Lymphozyten aus PBMC führte reproduzierbar zu Reinheiten von $\pm 95\%$. Die Isolation muriner CD90.2⁺ T Lymphozyten erzielte etwas niedrigere Reinheiten, trotz des Einsatzes von zwei Separations-Säulen. Die Reinheit lag dennoch reproduzierbar bei $>80\%$.

5.3.1.4 Charakterisierung der isolierten T Lymphozyten

Die durch MACS[®]-Isolation aufgereinigten humanen und murinen T Lymphozyten wurden hinsichtlich der Oberflächen-Expression charakteristischer Adhäsionsmoleküle mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurden vergleichende Messungen ruhender, „naiver“ T Lymphozyten sowie über Nacht polyklonal vorstimulierter, „aktivierter“ T Lymphozyten durchgeführt. Die Stimulation erfolgte durch Inkubation mit humanem anti-CD3 (Okt3) bzw. murinem anti-CD3 ϵ sowie humanem/murinem anti-CD28 mAb. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 zusammenfassend dargestellt.

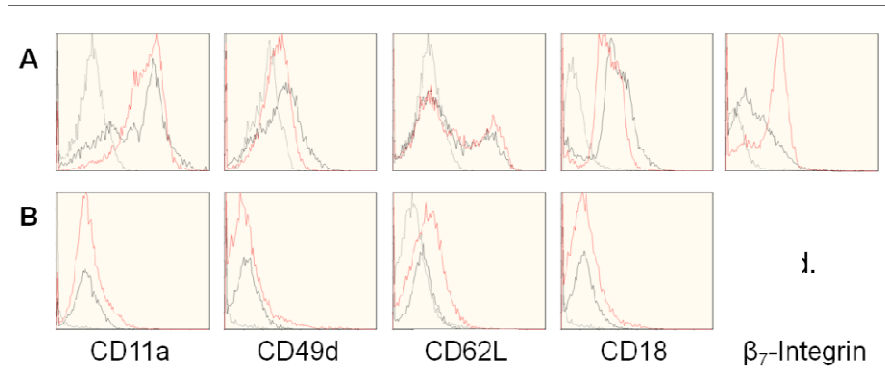


Abbildung 49: Durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle. **A** - Humane CD3⁺ T Lymphozyten **B** Murine CD90.2⁺ T Lymphozyten. Dargestellt sind die Expressionstärken ohne (schwarze Linie) und mit (rote Linie) polyklonaler Stimulation über Nacht mit 3 µg/ml humanem/murinem anti-CD3 und 1 µg/ml humanem/murinem anti-CD28 mAb. Die Isotyp-Kontrolle ist in grau dargestellt. n.d.= nicht durchgeführt.

Anhand von Abbildung 49 wird deutlich, dass alle untersuchten, charakteristischen Adhäsionsmoleküle auf den eingesetzten humanen und murinen T Lymphozyten bereits im ruhenden Zustand exprimiert wurden. Die polyklonale Stimulation führte vornehmlich bei murinen T Lymphozyten zu einer geringfügigen Steigerung der Expression. Bei humanen T Lymphozyten war nur im Fall des β_7 -Integrins eine deutlich erhöhte Expression registrierbar.

5.3.1.5 Fluoreszenz-Färbung der T Lymphozyten mit PKH-Farbstoffen

Um den parallelen Einsatz humaner und muriner T Lymphozyten in einem Flusskammer-Experiment und somit den direkten Vergleich des Adhäsions- und Transmigrationsverhaltens humaner und muriner T Zellen auf humanem oder murinem Endothel zu ermöglichen, wurden die eingesetzten T Zell-Populationen mit Hilfe von unterschiedlichen Fluorophorkoppelten Membran-Farbstoffen angefärbt. Humane T Lymphozyten wurde mittels des in einem grünen Wellenlängenbereich fluoreszierenden PKH67-Farbstoffs markiert, während murine T Lymphozyten durch den Einsatz des in einem roten Wellenlängenbereich fluoreszierenden PKH26-Farbstoffs angefärbt wurden (siehe Abschnitt 4.2.16.1). Die Markierung erfolgte jeweils direkt vor dem Einsatz der T Zell-Populationen in Flusskammer-Experimenten. Die Effizienz der Markierung wurde in einigen Fällen auch mittels Durchflusszytometrie überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Überprüfung von Homogenität und Effizienz des Markierungsverfahrens mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie ist in Abbildung 50 für beide T Zell-Populationen dargestellt.

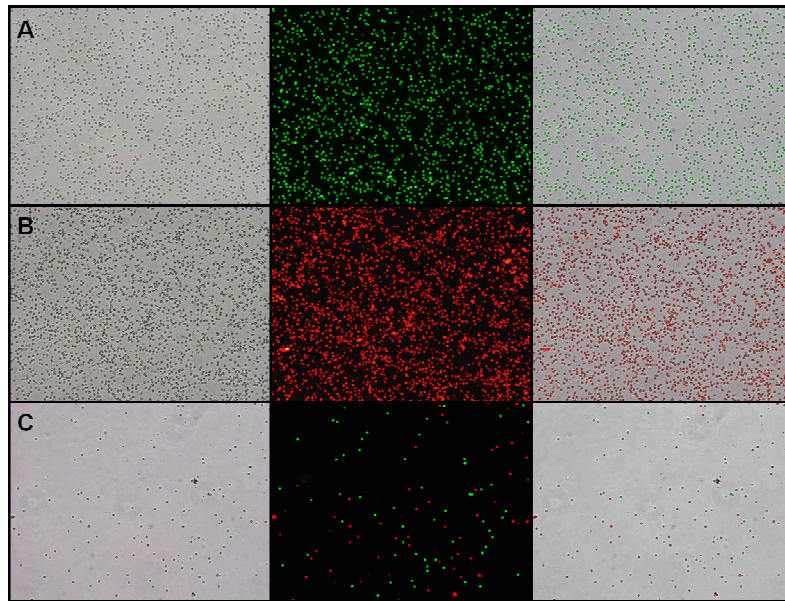


Abbildung 50: Analyse der Homogenität und Effizienz der Fluoreszenz-Färbung von humanen und murinen T Lymphozyten mit PKH-Farbstoffen mittels Fluoreszenzmikroskopie. A Humane CD3⁺ T Lymphozyten, gefärbt mit PKH67 (1×10^7 Zellen/ml) im Transmissionsmodus, Fluoreszenzmodus und als Überlagerung **B** Murine CD90-2⁺ T Lymphozyten, gefärbt mit PKH26 (1×10^7 Zellen/ml) im Transmissionsmodus, im Fluoreszenzmodus und als Überlagerung **C** Mischung humaner und muriner T Lymphozyten im Verhältnis 1:1 (1×10^6 /ml) im Transmissionsmodus, im Fluoreszenzmodus und als Überlagerung.

Anhand von Abbildung 50 wird ersichtlich, dass die Fluoreszenz-Markierung der T Lymphozyten unter Einsatz der PKH-Farbstoffe mit nahezu 100%iger Effizienz und Homogenität erfolgte. Diese Ergebnisse waren konstant reproduzierbar. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie erzielt (Daten nicht gezeigt). Die markierten Zellen wurden in einem 1:1-Verhältnis in einer finalen Konzentration von 1×10^6 /ml für nachfolgende Versuche in der Flusskammer eingesetzt.

5.3.1.6 Untersuchung zur Adhäsion von humanen T Lymphozyten an murine Endothelzellen

Zur Validierung des gewählten Versuchsaufbaus und der gewählten T Zell- und Endothelzell-Populationen wurden zunächst Adhäsionsstudien humaner T Lymphozyten an murine bEND.3 Endothelzellen durchgeführt. Die Versuche dienten der Überprüfung und Optimierung der gewählten Versuchsbedingungen, um eine maximale Adhäsion humaner T Lymphozyten an murine Endothelzellen unter möglichst physiologischen Bedingungen zu erzielen.

Dazu wurde zunächst das Adhäsionsverhalten ruhender, „naiver“ und polyklonal vorstimulierter humaner T Lymphozyten auf mit unterschiedlichen Konzentrationen des proinflammatorisch wirkenden Zytokins TNF- α stimulierten bEND.3 Endothelzellen verglichen. Die Isolation und Fluoreszenz-Markierung der T Zellen erfolgte wie in den Abschnitten 5.3.1.3 und 5.3.1.5 beschrieben. Pro Kanal wurden 5×10^5 T Zellen in einem Volumen von 500 μ l perfundiert. Nach Ablauf der Aufspül-Phase wurde die Anzahl initial adhärierender Zellen und nach Durchlaufen aller Scherdruck-Erhöhungen die Anzahl fest adhärierender Zellen

bestimmt. Die Ergebnisse der Adhäsions-Studie sind in Abbildung 51 zusammenfassend dargestellt.

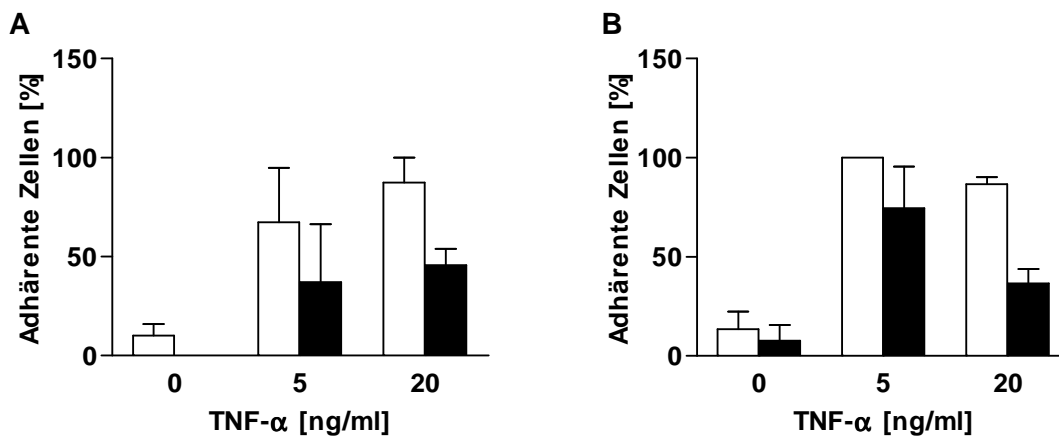


Abbildung 51: Validierung und Optimierung der Versuchsbedingungen für Flusskammer-Experimente. Bestimmung der optimalen TNF- α Konzentration und Vorbehandlung humaner T Zellen zur Erzielung maximaler Adhäsion auf murinen bEND.3. **A** Unstimulierte „naive“ humane CD3⁺ T Zellen **B** Über Nacht polyklonal vorstimulierte humane CD3⁺ T Zellen. Pro Versuch wurde in je einem Bildausschnitt die Anzahl initial adhärierender Zellen (■) sowie die Anzahl fest adhärierender Zellen (□) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Der Vergleich des Adhäsionsverhaltens ruhender und über Nacht vorstimulierter humaner T Lymphozyten auf murinen bEND.3 Endothelzellen zeigt, dass beide T Zell-Populationen eine Aktivierung des Endothels durch pro-inflammatorische Zytokine benötigen, um maximale Adhäsion zu erzielen. Für beide T Zell-Populationen reichten physiologisch relevante Konzentrationen von 5-20 ng/ml TNF- α aus, um eine deutliche Steigerung der initialen Adhäsion zu induzieren. Ruhende T Zellen wiesen gegenüber den vorstimulierten T Zellen eine deutlich niedrigere Anzahl fest adhärierender Zellen auf. Aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse erfolgte in nachfolgenden Versuchen ausschließlich der Einsatz vorstimulierter T Lymphozyten sowie die Aktivierung der eingesetzten Endothelzellen über Nacht durch Inkubation der Zellen mit 5-20 ng/ml TNF- α .

5.3.1.7 Vergleichende Untersuchung des Adhäsionsverhaltens humaner und muriner T Zellen auf humanem und murinem Endothel

Um das Adhäsionsverhalten humaner und muriner T Zellen auf humanem und murinem Endothel direkt vergleichen zu können, wurden Adhäsionsstudien in der Flusskammer nach initialer Kultivierung von bEND.3 Endothelzellen bzw. HUVECs durchgeführt. Die humanen und murinen T Zellen wurden wie bereits in Abschnitt 5.3.1.3 beschrieben isoliert, zum Teil über Nacht polyklonal vorstimuliert und am Versuchstag wie in Abschnitt 5.3.1.5 beschrieben Fluoreszenz-markiert. Die Endothelzellen wurden ebenfalls zum Teil über Nacht durch Inkubation mit 5-20 ng/ml TNF- α vorstimuliert. Die Ergebnisse der Adhäsionsstudien für humane und murine T Zellen auf bEND.3 Endothelzellen sind in Abbildung 52 dargestellt.

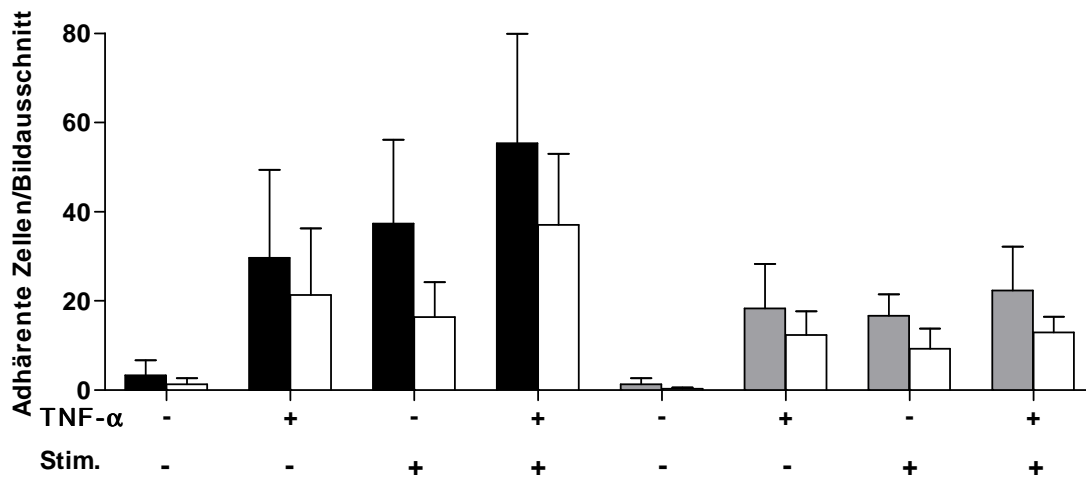


Abbildung 52: Adhäsionsverhalten humaner (■) und muriner (▒) T Lymphozyten auf bEND.3 EC. Sowohl die Endothelzellen als auch die T Zellen wurden vergleichend mit und ohne Vorstimulation (mit TNF- α bzw. anti-CD3/CD28 mAb) eingesetzt. Die gefüllten Balken (■ bzw. ▒) stellen die Anzahl initial adhätierender Zellen dar, die ungefüllten Balken (□) stellen die Anzahl fest adhätierender Zellen pro Bildausschnitt dar. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Bei fehlender Vorstimulation von sowohl Endothel als auch T Zellen war sowohl für humane als auch murine T Zellen eine relativ geringe Adhäsionsstärke zu beobachten. Die einseitige Stimulation von entweder Endothel oder T Zellen führte zu einer deutlich höheren und vergleichbaren Anzahl initial und fest adhätierender Zellen. Dies galt sowohl für humane als auch murine T Zellen. Im Fall der humanen T Zellen konnte durch Stimulation von sowohl Endothel als auch T Zellen eine weitere Steigerung der Anzahl initial und fest adhätierender Zellen induziert werden. Murine T Zellen hingegen zeigten keine deutliche Verbesserung der Adhäsion durch die kombinierte Vorstimulation.

In Abbildung 53 ist analog das Ergebnis der Adhäsionsstudie für humane und murine T Zellen auf HUVECs dargestellt.

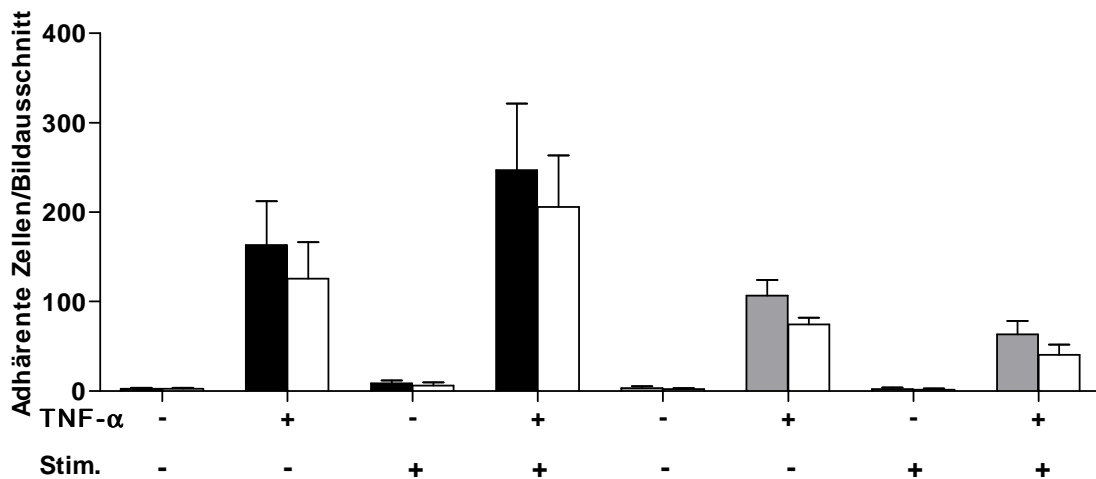


Abbildung 53: Adhäsionsverhalten humaner (■) und muriner (■) T Lymphozyten auf HUVECs. Die Endothelzellen wurden sowohl mit als auch ohne Vorstimulation mit TNF- α eingesetzt. Ebenso erfolgte die Perfusion der T Zellen mit und ohne vorherige polyklonale Stimulation. Pro Versuch wurde in je einem Bildausschnitt die Anzahl initial adhätierender Zellen (■ bzw. ■) sowie die Anzahl fest adhätierender Zellen (□) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Bei fehlender Vorstimulation von sowohl Endothel als auch T Zellen war auch auf HUVECs sowohl für humane als auch murine T Zellen eine minimale Adhäsionsstärke zu beobachten. Die einseitige Stimulation des Endothels hingegen führte sowohl für humane als auch murine T Zellen zu einer deutlich höheren Anzahl initial und fest adhätierender Zellen. Die einseitige Vorstimulation der T Zellen hingegen führte zu einer Adhäsionsstärke, die mit der Adhäsion bei komplett fehlender Vorstimulation vergleichbar war. Im Fall der humanen T Zellen konnte durch Stimulation von sowohl Endothel als auch T Zellen eine weitere Steigerung der Anzahl initial und fest adhätierender Zellen induziert werden. Murine T Zellen hingegen zeigten keine deutliche Verbesserung der Adhäsion durch die kombinierte Vorstimulation, tendenziell war sie sogar reduziert.

Im direkten Vergleich des Adhäsionsverhaltens humaner und muriner T Zellen auf murinem und humanem Endothel wurde deutlich, dass je nach eingesetzter Zell-Population unterschiedliche Versuchsbedingungen für eine optimale Adhäsionsstärke gewählt werden mussten. Für die nachfolgenden Versuche wurden sowohl die eingesetzten T Zell-Populationen als auch die Endothelzellen wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 4.2.10) vorstimuliert.

5.3.2 Funktionale Untersuchungen des Adhäsionsmechanismus unter Einsatz funktionsblockierender monoklonaler Antikörper

Zur Untersuchung der Bedeutung einzelner Adhäsionsmoleküle für die initiale und feste Adhäsion humaner T Zellen an murines Endothel wurden im Folgenden funktionsblockierende mAb in Adhäsionsstudien in der Flusskammer eingesetzt. Es wurden sowohl Moleküle einseitig auf der Endothel- als auch auf der T Zell-Seite blockiert sowie Kombinationen verschiedener mAb eingesetzt. Zudem wurden die Studien sowohl auf konfluenten Monolayern

der murinen Endothelzell-Linie bEND.3 als auch auf primären murinen Lungen- Endothelzellen durchgeführt. Um einen direkten Vergleich zwischen humanen und murinen T Zellen zu erzielen, wurden beide T Zell-Arten gleichzeitig eingesetzt und analysiert. Die Ergebnisse sind entsprechend der eingesetzten Endothelzellen sowie T Zell-Populationen individuell dargestellt.

5.3.2.1 Adhäsionsstudien auf bEND.3 Endothelzellen

In Abbildung 54 sind die Ergebnisse des Einsatzes funktionsblockierender mAb für die Adhäsion humaner CD3⁺ T Zellen an murine bEND.3 Endothelzellen gezeigt.

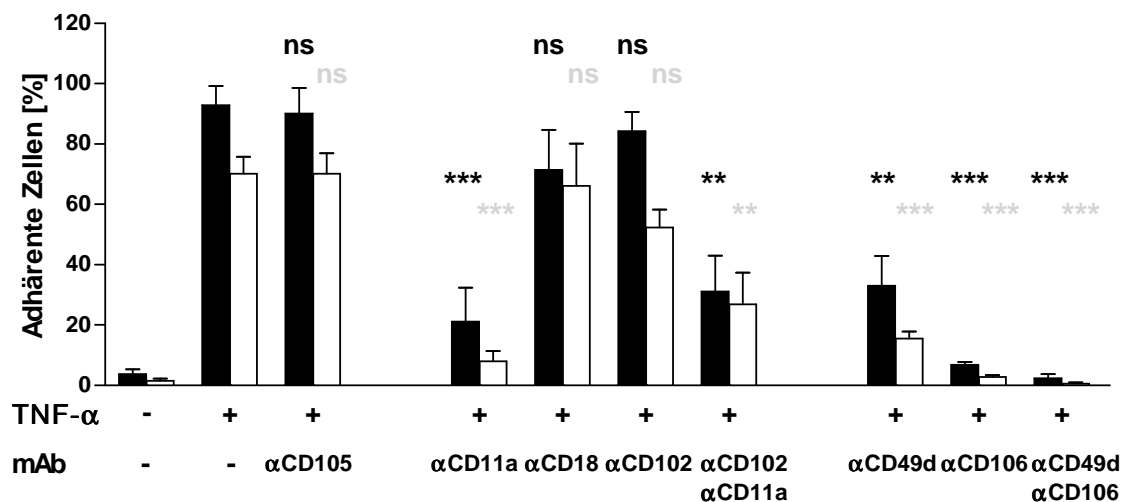


Abbildung 54: Einfluss funktionsblockierender mAb auf das Adhäsionsverhalten humaner CD3⁺ T Zellen auf bEND.3 EC. 10 µg/ml der angegebenen mAb wurden 30 min vor Versuchsbeginn direkt zu den bEND.3 Endothelzellen in die Flusskammer gegeben oder alternativ die T Zellen für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor Einsatz in der Flusskammer wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um überschüssigen mAb zu entfernen. Als Spezifitätskontrolle wurde αCD105 mAb eingesetzt. Pro Versuch wurde in je einem Bildausschnitt die Anzahl initial adhärrierender Zellen (■) sowie die Anzahl fest adhärrierender Zellen (□) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem *student's t test* (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,0001, schwarz = Initiale Adhäsion, grau = feste Adhäsion). Ns = nicht signifikant.

Analog zu den in Abschnitt 5.3.1.7 dargestellten Ergebnissen führt die fehlende Vorstimulation der bEND.3 Endothelzellen mit TNF-α nur zu einer sehr geringen Adhäsionsrate (Negativ-Kontrolle, im Mittel 3,7% bzw. 1,6% initial/fest adhärrierende Zellen). Nach Stimulation mit TNF-α hingegen war eine deutlich erhöhte Adhäsionsrate zu erkennen. Dieser Wert diente als Positiv-Kontrolle (im Mittel 92,85% bzw. 70,1% initial/fest adhärrierende Zellen) und als Referenz für eventuelle, durch den Einsatz funktionsblockierender mAb vermittelte Effekte. Als Spezifitätskontrolle diente der Einsatz des mAb CD105 (im Mittel 90,08% bzw. 70,17% initial/fest adhärrierende Zellen), der zu keiner signifikanten Reduktion der Adhäsion führte. Dieser blockiert Endoglin, ein Typ I Membranprotein, das einen Teil des TGF-β Rezeptor-Komplexes darstellt und konstitutiv auf Endothelzellen exprimiert wird. Gleichzeitig ist es, soweit bekannt, nicht an der Transmigration von T Lymphozyten beteiligt [213].

Zunächst wurden nun einzelne Komponenten der LFA-1–ICAM-Interaktion unter Einsatz funktionsblockierender mAb untersucht. Dazu zählten die α_L - und β_2 -Integrin Untereinheiten CD11a und CD18, sowie der potentielle Ligand ICAM-2 (CD102). Auf bEND.3 Endothelzellen konnte bereits in den durchgeführten Vorexperimenten mittels durchflusszytometrischer Analyse festgestellt werden, dass der alternative Ligand für das LFA-1 Integrin, ICAM-1 (CD54), weder konstitutiv noch induziert exprimiert wird (siehe Abschnitt 5.3.1.2). Somit konnte hier ausschließlich der Einfluss der Blockade von ICAM-2 untersucht werden. Die Adhäsion humaner T Zellen an bEND.3 Endothelzellen wurde durch den Einsatz der mAb gegen CD102 und CD18 tendenziell leicht vermindert (auf im Mittel 84,2% bzw. 52,33% und 71,49% bzw. 66,14% initial/fest adhärierende Zellen, nicht signifikant), eine signifikante Reduktion fand jedoch nur nach Einsatz des mAb gegen CD11a statt (im Mittel 21,16% bzw. 8,09% initial/fest adhärierende Zellen). Der kombinierte Einsatz von mAb gegen CD102 und CD11a zur gleichzeitigen Blockade von ICAM-2 und der α_L -Integrin Untereinheit führte ebenfalls zu einer signifikanten, wenn auch nicht zusätzlich gesteigerten Reduktion der Adhäsion (im Mittel 31,17% bzw. 26,8% initial/fest adhärierende Zellen). Der Unterschied in der Inhibition des mAb gegen CD11a alleine und die Kombination von mAb gegen CD11a und CD102 ist nicht signifikant.

Gleichzeitig wurden einzelne Komponenten der VLA-4–VCAM-1-Interaktion unter Einsatz funktionsblockierender mAb untersucht. Dazu zählten die Blockade der α_4 -Integrin Untereinheit CD49d, die des potentiellen Liganden VCAM-1 (CD106) sowie die Kombination beider mAb. Bereits die Blockade der α_4 -Integrin Untereinheit CD49d führte zu einer signifikanten Reduktion der initialen Adhäsion humaner T Zellen an bEND.3 Endothelzellen auf ca. 35% und der festen Adhäsion auf im Mittel 15,6% gegenüber der Positiv-Kontrolle. Der Einsatz des α CD106 mAb führte ebenfalls zu einer signifikanten, noch stärkeren Reduktion auf im Mittel 6,82% initiale und 2,9% feste Adhäsion. Die Kombination beider mAb reduzierte die Adhäsion auf ein mit der Negativ-Kontrolle vergleichbares Niveau (im Mittel 2,36% initiale und 0,55% feste Adhäsion).

In Abbildung 55 sind die Ergebnisse des Einsatzes funktionsblockierender mAb für die Adhäsion muriner CD90.2⁺ T Zellen an murine bEND.3 Endothelzellen gezeigt.

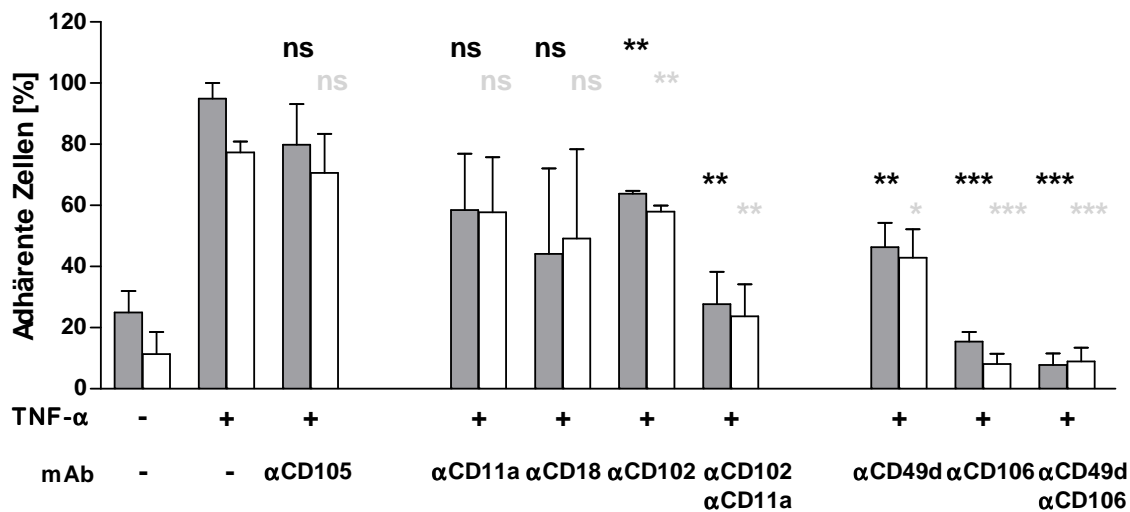


Abbildung 55: Einfluss funktionsblockierender mAb auf das Adhäsionsverhalten muriner CD90.2⁺ T Zellen auf bEND.3 EC. 10 µg/ml der angegebenen mAb wurden 30 min vor Versuchsbeginn direkt zu den bEND.3 Endothelzellen in die Flusskammer gegeben oder alternativ die T Zellen für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor Einsatz in der Flusskammer wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um überschüssigen mAb zu entfernen. Als Spezifitätskontrolle wurde αCD105 mAb eingesetzt. Pro Versuch wurde in je einem Bildausschnitt die Anzahl initial adhärerender Zellen (■) sowie die Anzahl fest adhärerender Zellen (▒) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem *student's t test* (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,0001, schwarz = Initiale Adhäsion, grau = feste Adhäsion). Ns = nicht signifikant.

Der Einsatz von ruhenden bEND.3 Endothelzellen führte hier zu einer höheren Anzahl initial adhärerender T Zellen (im Mittel 24,94% bzw. 11,37% initiale/feste Adhäsion) als bei Einsatz humaner T Zellen. Die maximale initiale Adhäsion wurde erst durch Vorstimulation der Endothelzellen mit TNF-α erzielt (im Mittel 94,83% bzw. 77,24% initiale/feste Adhäsion). Dies war vergleichbar mit der beobachteten maximalen initialen Adhäsion humaner T Zellen. Der Einsatz des als Spezifitätskontrolle dienenden αCD105 mAb führte zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Reduktion der Adhäsion (im Mittel 79,79% bzw. 70,56% initiale/feste Adhäsion).

Analog zu den humanen T Zellen wurden einzelne Komponenten der LFA-1-ICAM-Interaktion unter Einsatz funktionsblockierender mAb untersucht. Konträr zu den für humane T Zellen erzielten Ergebnissen führte der Einsatz des αCD11a mAb nur zu einer leichten, nicht signifikanten Reduktion der initialen Adhäsion (im Mittel 58,47% bzw. 57,72% initiale/feste Adhäsion). Auch der Einsatz von mAb gegen CD18 reduzierte den Anteil initial und fest adhärerender muriner T Zellen in nicht signifikantem Umfang (im Mittel auf 44% bzw. 49,14%). Die Blockade von CD102 führte zu einer signifikanten Reduktion von sowohl initialer als auch fester Adhäsion (auf im Mittel 63,77% bzw. 57,91%). Der kombinierte Einsatz von αCD102 und αCD11a zur gleichzeitigen Blockade von ICAM-2 und der α_L-Integrin Unter-einheit führte ebenfalls zu einer signifikanten, vergleichsweise stärkeren Reduktion der Ad-

häsion (27,63% bzw. 23,63% initial/fest adhärierende Zellen) als die alleinige Blockade von CD102.

Die Untersuchung der einzelnen Komponenten der VLA-4–VCAM-1-Interaktion ergab ein ähnliches Bild wie unter Einsatz humaner T Zellen. Die Blockade der α_4 -Integrin Untereinheit CD49d führte zu einer signifikanten Reduktion der initialen und festen Adhäsion muriner T Zellen an bEND.3 Endothelzellen (46,27% bzw. 42,84%) gegenüber der Positiv-Kontrolle. Der Einsatz des α CD106 mAb führte zu einer deutlich verstärkten, signifikanten Reduktion auf 15,44% bzw. 8,06% initiale/feste Adhäsion. Die Kombination beider mAb gegen CD49d und CD106 schließlich reduzierte die Adhäsion noch weiter auf 7,7% bzw. 8,94% initiale/feste Adhäsion.

5.3.2.2 Adhäsionsstudien auf primären murinen Lungen Endothelzellen

In Abbildung 56 sind die Ergebnisse des Einsatzes funktionsblockierender mAb für die Adhäsion humaner CD3⁺ T Zellen an murine primäre Lungen Endothelzellen gezeigt.

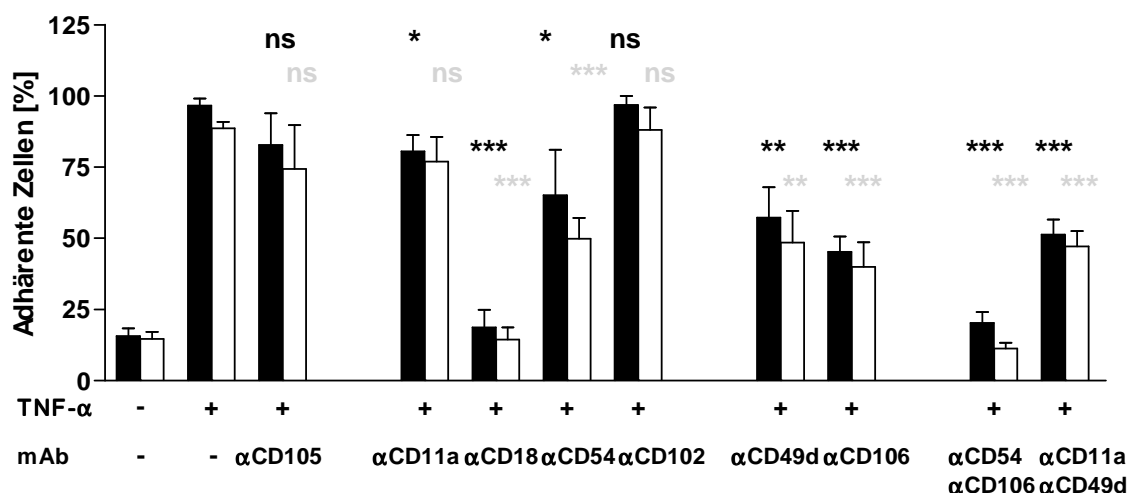


Abbildung 56: Einfluss funktionsblockierender mAb auf das Adhäsionsverhalten humaner CD3⁺ T Zellen auf primäre murine Lungen EC. 10 μ g/ml der angegebenen mAb wurden 30 min vor Versuchsbeginn direkt zu den bEND.3 Endothelzellen in die Flusskammer gegeben oder alternativ die T Zellen für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor Einsatz in der Flusskammer wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um überschüssigen mAb zu entfernen. Als Spezifitätskontrolle wurde α CD105 mAb eingesetzt. Pro Versuch wurde in je einem Bildausschnitt die Anzahl initial adhärrender Zellen (■) sowie die Anzahl fest adhärrender Zellen (□) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Std.fehler aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem student's t test (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,0001, schwarz = Initiale Adhäsion, grau = feste Adhäsion). Ns = nicht signifikant.

Analog zu den bereits beschriebenen Experimenten diente auch hier die Adhäsion an das ruhende Endothel als Negativ- und die Adhäsion an vorstimuliertes Endothel ohne den Einsatz funktionsblockierender mAb als Positiv-Kontrolle. Als Spezifitätskontrolle wurde analog der bereits in 5.3.2.1 eingesetzte CD105-mAb genutzt. Voraktivierte Humane CD3⁺ T Lymphozyten zeigten eine relativ geringe Adhäsion an ruhende primäre murine Lungen Endothelzellen (im Mittel 15,59% bzw. 14,62% initiale/feste Adhäsion). Eine maximale Adhäsion

konnte wiederum nur durch gleichzeitige Vorstimulation der Endothelzellen erreicht werden (im Mittel 96,7% bzw. 88,68% initiale/feste Adhäsion). Der Einsatz des α CD105-mAb führte im Vergleich zur Positiv-Kontrolle zu einer geringen, jedoch nicht signifikanten Reduktion der Adhäsion (im Mittel 82,8% bzw. 74,35% initiale/feste Adhäsion).

Auch hier wurden zunächst einzelne Komponenten der LFA-1–ICAM-Interaktion unter Einsatz funktionsblockierender mAb untersucht. In der in Abschnitt 5.3.1.2 beschriebenen Charakterisierung der eingesetzten Endothelzellen konnte auf primären murinen Lungen Endothelzellen im Vergleich zu bEND.3 Endothelzellen die Expression sowohl von ICAM-1 (CD54) als auch ICAM-2 (CD102) nachgewiesen werden. Somit konnten in den durchgeführten funktionalen Studien auf primären murinen Lungen Endothelzellen die Rollen beider Adhäsionsmoleküle durch gezielte Blockade untersucht werden.

Die funktionelle Blockade der α_L -Integrin Untereinheit CD11a führte zu einer geringfügigen, nur für die initiale Adhäsion signifikanten Reduktion der Adhäsion humaner T Zellen gegenüber der Positiv-Kontrolle (im Mittel 80,64% bzw. 77% initiale/feste Adhäsion). Dies ist konträr zu den auf bEND.3 Endothelzellen erzielten Ergebnissen. Dort führte eine Blockade von CD11a zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl adhärenter T Zellen. Die Blockade der β_2 -Integrin Untereinheit CD18 hingegen reduziert den Anteil adhärenter Zellen signifikant auf ein mit der Negativ-Kontrolle vergleichbares Niveau (im Mittel 18,64% bzw. 14,45% initiale/feste Adhäsion). Auch dies steht in Kontrast zu den auf bEND.3 Endothelzellen erzielten Ergebnissen (siehe Abschnitt 5.3.2.1). In Abbildung 56 ist ersichtlich, dass die Blockade von ICAM-1 ebenfalls zu einer signifikant verminderten Adhäsionsstärke humaner T Lymphozyten führt (im Mittel 65,11 bzw. 49,83% initiale/feste Adhäsion), wobei die feste Adhäsion stärker inhibiert wurde. Der Einsatz eines α CD102-mAb hingegen führte zu keiner signifikanten Reduktion der Adhäsion (im Mittel 96,94% bzw. 88,10% initiale/feste Adhäsion).

Die Untersuchung der VLA-4–VCAM-1-Interaktion erfolgte durch den Einsatz funktionsblockierender mAb gegen die α_4 -Integrin Untereinheit CD49d sowie deren Liganden VCAM-1 (CD106). Die Applikation beider mAb führte zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsionsstärke humaner T Zellen um ca. 40-50% (im Mittel 57,36% vs. 45,23% initiale Adhäsion und 48,48% vs. 39,99% feste Adhäsion) gegenüber der Positiv-Kontrolle. Die Inhibition von CD106 wies dabei eine höhere Signifikanz auf als die Inhibition von CD49d.

Durch den kombinierten Einsatz von mAbs, die zu einer funktionalen Blockade der beiden Haupt-Integrin-Liganden, ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106), führten, wurde die Adhäsionsstärke humaner T Lymphozyten auf primären murinen Lungen Endothelzellen signifikant vermindert (im Mittel auf 20,22% bzw. 11,24% initiale/feste Adhäsion). Sie entsprach somit dem Niveau der Negativ-Kontrolle. Der kombinierte Einsatz von mAb gegen die α -Untereinheiten der untersuchten Integrine, CD11a und CD49d, hingegen führte zwar eben-

falls zu einer signifikant niedrigeren Anzahl initial und fest adhärerender humaner T Zellen (51,33% bzw. 47,19% initiale/feste Adhäsion), die erzielte Inhibition war jedoch deutlich schwächer als bei einer Blockade der Integrin-Liganden.

Analoge Untersuchungen wurden auf primären murinen Lungen Endothelzellen auch unter Einsatz muriner CD90.2⁺ T Lymphozyten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 57 zusammenfassend dargestellt.

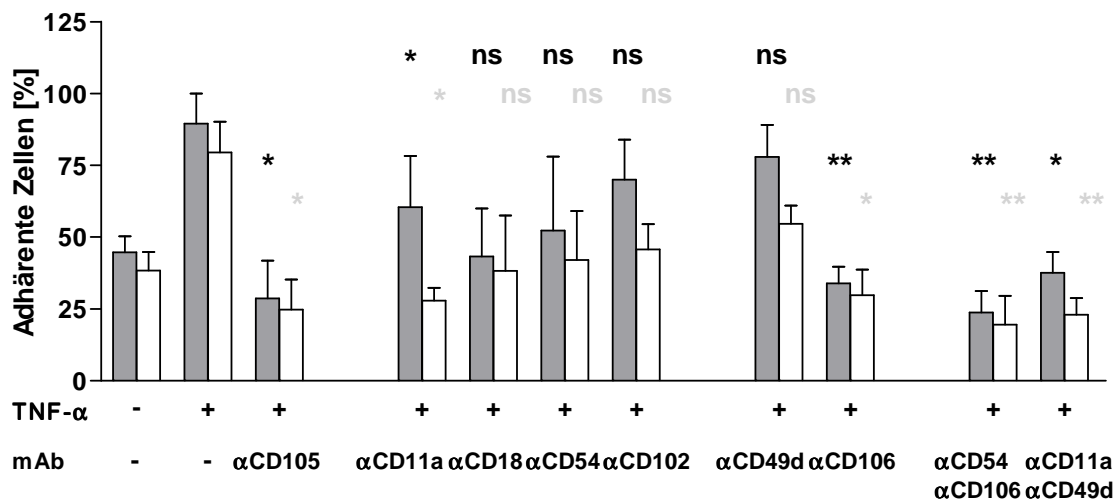


Abbildung 57: Einfluss funktionsblockierender mAb auf das Adhäsionsverhalten muriner CD90.2⁺ T Zellen auf primäre murine Lungen Endothelzellen. 10 µg/ml der angegebenen mAb wurden 30 min vor Versuchsbeginn direkt zu den bEND.3 Endothelzellen in die Flusskammer gegeben oder alternativ die T Zellen für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor Einsatz in der Flusskammer wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um überschüssigen mAb zu entfernen. Als Kontrolle diente der prozentuale Anteil initial und fest adhärerender Zellen ohne Zusatz von funktionsblockierendem mAb. Pro Versuch wurde in je einem Bildausschnitt die Anzahl initial adhärerender Zellen (■) sowie die Anzahl fest adhärerender Zellen (□) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem *student's t test* (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,0001, schwarz = Initiale Adhäsion, grau = feste Adhäsion). Ns = nicht signifikant.

Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten stellte der Anteil muriner T Zellen, die an ruhendes primäres murines Lungen-Endothel adhären, die Negativ-Kontrolle dar. Diese erreichte unter Einsatz muriner T Zellen bereits einen relativ hohen Wert: fast die Hälfte der perfundierten murinen T Zellen adhärte an das ruhende primäre murine Endothel (im Mittel 44,68% bzw. 38,37% initial/fest adhärerende Zellen). Die maximale Adhäsion wurde jedoch auch wie zuvor erst durch Vorstimulation der Endothelzellen mit TNF-α und den Einsatz nicht mit mAb behandelte, voraktivierte T Zellen erzielt (im Mittel 89,53% bzw. 79,43% initial/fest adhärerende Zellen). Dies stellte die Positiv-Kontrolle dar. Bei der Untersuchung der Adhäsion muriner T Zellen an primäre murine Lungen Endothelzellen führte der Einsatz des bisher als Spezifitätskontrolle dienenden αCD105-mAb zu einer signifikanten Inhibition der Adhäsion gegenüber der Positiv-Kontrolle (im Mittel 28,66% bzw. 24,71% initial/fest adhärerende Zellen), die vergleichbar mit dem Niveau der Negativ-Kontrolle war. Aufgrund des unerwarteten Verhaltens des αCD105-mAb wurde in diesem Experiment ein Vergleich zwischen dem

Adhäsionsverhalten nicht blockierter muriner T Zellen und dem mit einzelnen funktionsblockierenden mAb vor-inkubierten T Zellen gezogen.

Die gezielte Blockade von Adhäsionsmolekülen, die an der LFA-1–ICAM-Interaktion beteiligt sind, führte bei allen eingesetzten mAbs (CD11a, CD18, CD54 und CD102) tendenziell zu einer Inhibition der Adhäsion gegenüber der Positiv-Kontrolle. Eine signifikante Inhibition konnte nur durch Einsatz des mAb gegen CD11a erzielt werden (im Mittel 60,42% bzw. 27,93% initial/fest adhärierende Zellen). Dies steht in Kontrast zu den für humane T Zellen erzielten Ergebnissen, bei denen die stärkste Inhibition der Adhäsion durch die Blockade von CD18 erzielt werden konnte. Jedoch handelt es sich weiterhin um dasselbe Liganden-Rezeptor-Paar.

Die Untersuchung der VLA-4–VCAM-1-Interaktion zeigte bei Einsatz muriner T Zellen nur eine signifikante Inhibition der Adhäsion durch Einsatz des mAb gegen CD106 (im Mittel 33,93% bzw. 29,75% initial/fest adhärierende Zellen). Die Blockade von CD49d hingegen führte zu keiner signifikanten Inhibition (im Mittel 77,82% bzw. 54,63% initial/fest adhärierende Zellen).

Durch den kombinierten Einsatz von mAbs, die zu einer funktionalen Blockade der beiden Haupt-Integrin-Liganden, ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106), führten, wurde die Adhäsionsstärke muriner T Lymphozyten auf primären murinen Lungen Endothelzellen signifikant reduziert (im Mittel auf 23,72% bzw. 19,58% initiale/feste Adhäsion). Der kombinierte Einsatz von mAb gegen die α -Untereinheiten der untersuchten Integrine, CD11a und CD49d, führte ebenfalls zu einer signifikant niedrigeren Anzahl initial und fest adhärierender humaner T Zellen (im Mittel 37,63% bzw. 22,97% initial/fest adhärierende Zellen), die mit der durch Blockade der Integrin-Liganden erzielten Inhibition vergleichbar war.

5.3.3 Funktionale Untersuchungen des Transmigrations-Mechanismus unter Einsatz funktionsblockierender monoklonaler Antikörper

Zur Untersuchung der Bedeutung einzelner Adhäsionsmoleküle für die Transmigration humaner T Zellen über murines Endothel wurden im Folgenden funktionsblockierende mAb in Transmigrationsstudien im Transwell Transmigrations-Assay eingesetzt. Es wurden sowohl Moleküle einseitig auf der Endothel- als auch auf der T Zell-Seite blockiert sowie Kombinationen von mAb eingesetzt. Die Assays wurden sowohl unter Einsatz konfluenter Monolayer der murinen Endothelzell-Linie bEND.3 als auch bEND.5 durchgeführt. Die Konfluenz der Endothelzellen konnte in der Regel drei bis fünf Tage nach Aussäen der Zellen erreicht werden und wurde vor Durchführung des Versuchs mit Hilfe eines Permeabilitäts-Tests überprüft (siehe Abschnitt 4.2.16.3, Daten nicht gezeigt.). Der Einsatz von primären murinen Lungen Endothelzellen war nicht möglich, da diese nur limitiert verfügbar waren. Um einen direkten

Vergleich zwischen humanen und murinen T Zellen zu erzielen, wurden beide T Zell-Arten gleichzeitig eingesetzt. Die Ergebnisse sind entsprechend der eingesetzten Endothelzellen sowie T Zell-Populationen dargestellt.

5.3.3.1 Transmigration humaner T Lymphozyten

Die funktionale Analyse der an der Transmigration humaner T Zellen über murines Endothel beteiligten Adhäsionsmoleküle erfolgte sowohl auf bEND.3 als auch auf bEND.5 Endothelzellen (zur Analyse der Rolle von nur auf bEND.5 Endothelzellen exprimiertem ICAM-1 (CD54)) unter Einsatz humaner und muriner T Zellen. Initial wurden die humanen und murinen CD3⁺ bzw. CD90.2⁺ T Zellen unter Einsatz von PKH-Farbstoffen unterschiedlich fluoreszent markiert (siehe Abschnitt 5.3.1.5). Anschließend wurden pro *well* je 2,5x10⁵ humane und murine T Zellen im Transwell Transmigrations-Assay eingesetzt. Nach Ablauf der Inkubation für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Quantifizierung der transmigrierten T Zellen anhand der Fluoreszenz-Markierung im Durchflusszytometer wie in Abschnitt 4.2.16.3 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 58 zusammenfassend dargestellt.

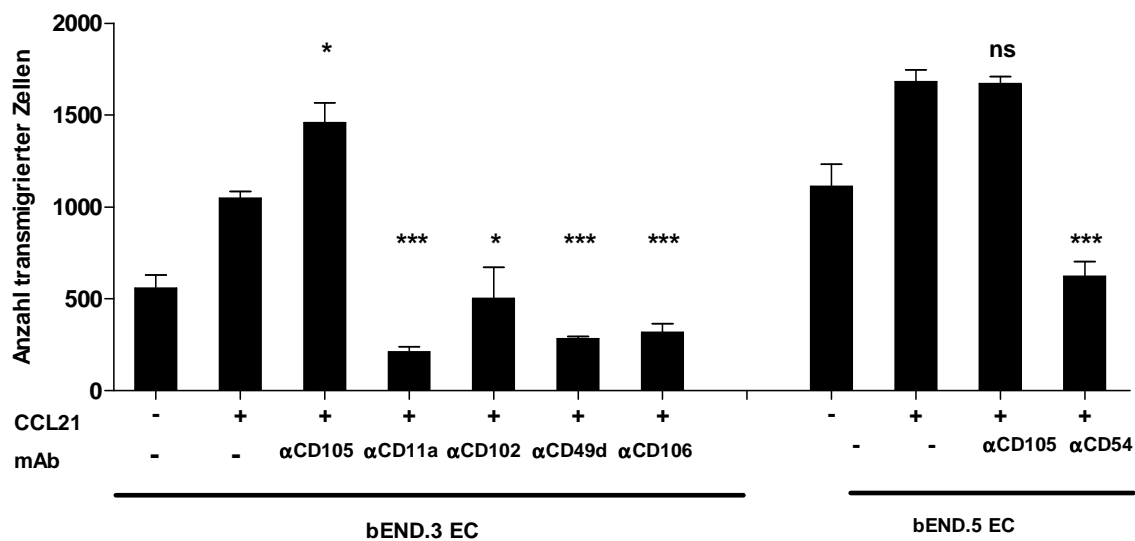


Abbildung 58: Transwell Transmigrations-Assay zur funktionalen Analyse der Beteiligung einzelner Adhäsions-Moleküle an der Transmigration humaner CD3⁺ T Zellen über murines Endothel. 20 µg/ml der angegebenen mAb wurden 30 min vor Versuchsbeginn direkt zu den bEND.3 oder bEND.5 Endothelzellen in die oberen *wells* gegeben oder alternativ mit den T Zellen für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor Einsatz im Transwell Assay wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um überschüssigen mAb zu entfernen. Als Spezifitätskontrolle diente ein mAb gegen CD105. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Quantifizierung der Anzahl transmigrierter Zellen erfolgte wie in Abschnitt 4.2.16.3.2 beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem *student's t test* (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,0001). Ns = nicht signifikant.

Als Kontrollen dienten sowohl die spontane, nicht-Chemokin induzierte Transmigration (Negativ-Kontrolle) sowie die Chemokin-induzierte Transmigration (Positiv-Kontrolle) der T Zellen, jeweils ohne Zusatz eines mAb. Die durch den Einsatz funktionsblockierender mAb ausgelösten inhibitorischen Effekte wurden hinsichtlich ihrer Signifikanz gegenüber der Positiv-Kontrolle analysiert. Allgemein ist zu bemerken, dass die Anzahl transmigrierter Zellen ge-

genüber der Anzahl eingesetzter Zellen relativ gering war (maximal 0,7% der eingesetzten Zellen transmigrierten). Da jedoch die induzierten Effekte reproduzierbar und statistisch signifikant waren, sind sie in Abbildung 58 dargestellt. Der Einsatz des bisher als Spezifitätskontrolle dienenden mAb gegen CD105 führte zu einer leichten Steigerung der Transmigrationsrate über bEND.3 Endothelzellen gegenüber der Positiv-Kontrolle. Auf bEND.5 Endothelzellen war dieser Effekt nicht zu beobachten. Die funktionale Blockade der α_L -Integrin Untereinheit CD11a führte zu einer drastischen, signifikanten Reduktion der Anzahl transmigrierender Zellen, ebenso wie die Blockade der α_4 -Integrin Untereinheit CD49d sowie dessen Liganden VCAM-1 (CD106). Die Blockade des potentiellen $\alpha_L\beta_2$ -Integrin Liganden ICAM-2 (CD102) führte zwar ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Transmigrationsrate, diese war jedoch deutlich schwächer. Durch die Blockade des alternativen $\alpha_L\beta_2$ -Integrin Liganden ICAM-1 (CD54) auf bEND.5 Endothelzellen hingegen konnte eine Inhibition der Transmigration induziert werden, die vergleichbar mit der Inhibition durch eine VCAM-1-Blockade war.

5.3.3.2 Transmigration muriner T Lymphozyten

In Abbildung 59 sind analog die Ergebnisse für die Analyse der Transmigration muriner T Zellen dargestellt.

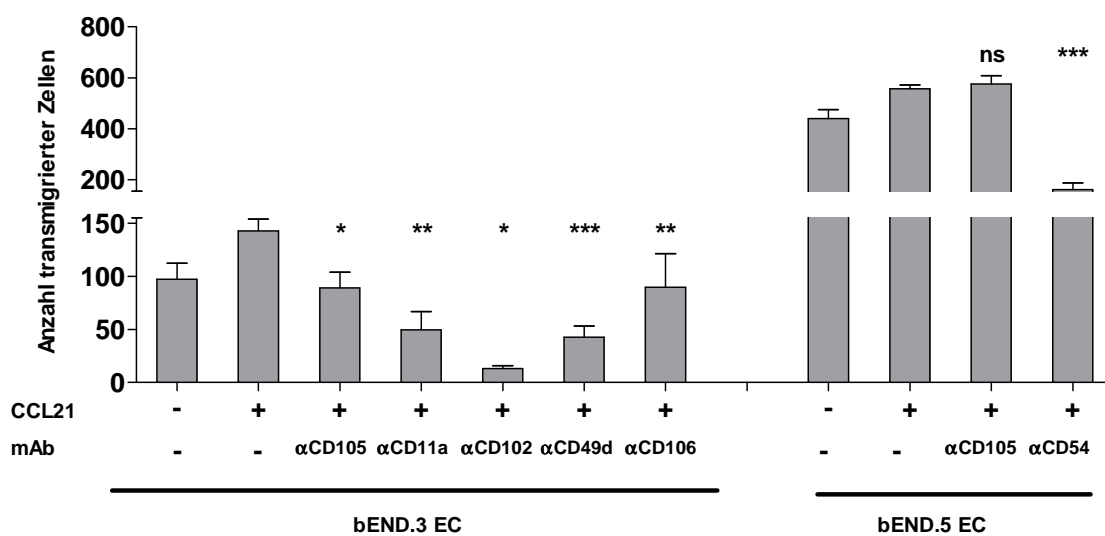


Abbildung 59: Transwell Transmigrations-Assay zur funktionalen Analyse der Beteiligung einzelner Adhäsions-Moleküle an der Transmigration muriner CD90.2⁺ T Zellen über murines Endothel. 20 µg/ml der angegebenen mAb wurden 30 min vor Versuchsbeginn direkt zu den bEND.3 oder bEND.5 EC in die oberen wells gegeben oder alternativ mit den T Zellen für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor Einsatz im Transwell Assay wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um überschüssigen mAb zu entfernen. Als Spezifitätskontrolle diente ein mAb gegen CD105. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Quantifizierung der Anzahl transmigrierter Zellen erfolgte wie in 4.2.16.3.2 beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem *student's t test* (* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,0001). Ns = nicht signifikant.

Als Kontrollen dienten ebenfalls sowohl die spontane, nicht-Chemokin induzierte Transmigration (Negativ-Kontrolle) sowie die Chemokin-induzierte Transmigration (Positiv-Kontrolle) der

T Zellen, jeweils ohne Zusatz eines mAb. Die durch den Einsatz funktionsblockierender mAb ausgelösten inhibitorischen Effekte wurden hinsichtlich ihrer Signifikanz gegenüber der Positiv-Kontrolle analysiert. Auch hier ist zu bemerken, dass die Anzahl transmigrierter Zellen gegenüber der Anzahl eingesetzter Zellen relativ gering ist (maximal 0,23% der eingesetzten Zellen transmigrierten). Analog zu Abbildung 58 war der Einsatz des als Spezifitäts-Kontrolle dienenden mAb gegen CD105 mit einer leichten Änderung der Transmigrationsrate über bEND.3 Endothelzellen gegenüber der Positiv-Kontrolle verbunden. Auf bEND.5 Endothelzellen war dieser Effekt wiederum nicht zu beobachten. Die funktionale Blockade der α_L -Integrin Untereinheit CD11a führte zu einer drastischen, signifikanten Reduktion der Anzahl transmigrierender Zellen, ebenso wie die Blockade der α_4 -Integrin Untereinheit CD49d sowie dessen Liganden VCAM-1 (CD106). Die Blockade des potentiellen $\alpha_L\beta_2$ -Integrin Liganden ICAM-2 (CD102) führte zwar ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Transmigrationsrate, diese war jedoch schwächer. Durch die Blockade des alternativen $\alpha_L\beta_2$ -Integrin Liganden ICAM-1 (CD54) auf bEND.5 Endothelzellen hingegen konnte eine Inhibition der Transmigration induziert werden, die vergleichbar mit der Inhibition durch eine VCAM-1-Blockade war.

5.3.4 Zusammenfassung der Studien zu Adhäsion und Transmigration humaner T Zellen über murines Endothel

In der vorliegenden Arbeit konnten erfolgreich verschiedene *in vitro* Systeme zur Analyse der Interaktionen zwischen humanen T Zellen und murinen Endothelzellen während des simulierten Extravasations-Prozesses etabliert werden. Durch den Einsatz verschiedener muriner Endothelzellen im Flusskammer-Aufbau konnte das Adhäsionsverhalten fluoreszent markierter humaner und muriner T Zellen vergleichend analysiert werden. Mit Hilfe des Transwell Transmigrations Assays konnte zudem deren Transmigrationsverhalten über murines Endothel untersucht werden. Die Rollen einzelner Adhäsionsmoleküle wurden dabei durch funktionsblockierende monoklonale Antikörper dezidiert überprüft. Der als Spezifitätskontrolle eingesetzte anti-CD105 mAb führte in einigen Experimenten zu einer unerwarteten Beeinflussung von Adhäsion bzw. Transmigration. Dieser beobachtete Effekt konnte im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden, möglicherweise führt jedoch die Bindung des mAb an seine Zielstruktur, den TGF-beta Rezeptor, zu einer Regulierung der Adhäsion und Transmigration. Generell waren sowohl das Adhäsions- als auch das Transmigrationsverhalten humaner und muriner T Zellen auf murinem Endothel mechanistisch vergleichbar. In Abhängigkeit der eingesetzten Endothelzellen konnten gewisse Unterschiede in der Funktionalität einzelner Moleküle bzw. Molekül-Untereinheiten festgestellt werden, prinzipiell waren jedoch bei beiden Spezies homologe Ligand-Rezeptor-Paare, primär VLA-4–VCAM-1 und sekundär LFA-1–ICAM, an Adhäsion und Transmigration beteiligt.

Die Blockade der VLA-4–VCAM-1–Interaktion führte sowohl für murine als auch humane T Zellen auf bEND.3 Endothelzellen zu einer nahezu kompletten Inhibition der Adhäsion. Im Vergleich dazu resultierte die Blockade der LFA-1–ICAM–Interaktion auf bEND.3 Endothelzellen zwar ebenfalls in einer signifikanten, jedoch nicht ganz so drastischen Inhibition der Adhäsion. Der Einsatz funktionsblockierender monoklonaler Antikörper auf primären murinen Lungen Endothelzellen zeugte ebenfalls von einer signifikanten Abhängigkeit der Adhäsion humaner und muriner T Zellen von der VLA-4–VCAM-1–Interaktion. Murine T Zellen wiesen im Gegensatz zu humanen T Zellen eine geringere Beeinflussbarkeit der Adhäsion durch eine Blockade der LFA-1–ICAM Interaktion auf. Die Adhäsion humaner T Zellen an primäre murine Lungen Endothelzellen war signifikant abhängig von der Funktionalität der Integrin β_2 -Untereinheit CD18 sowie, in geringerem Maße, von der Funktionalität des Integrin-Liganden ICAM-1. Die gleichzeitige Blockade der Integrin-Hauptliganden, ICAM-1 und VCAM-1 sowie die parallele Blockade der beiden Integrin α -Untereinheiten, CD11a und CD49d, führte für beide Spezies zu einer drastischen Reduktion der Adhäsion an primäre murine Lungen Endothelzellen. Die Untersuchung der Transmigration humaner und muriner T Zellen führte zu beinahe identischen Ergebnissen. Auch hier spielen die bereits beschriebenen Interaktionen zwischen VLA-4–VCAM-1 und LFA-1–ICAM eine wichtige Rolle. Die Blockade der einzelnen Moleküle führte in beiden Spezies zu einer signifikanten, vergleichbaren Reduktion der Transmigration.

6 DISKUSSION

6.1 Etablierung eines NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ-AML Modells

Die erfolgreiche Behandlung einer AML-Erkrankung stellt bis heute aufgrund des Mangels einer singulären, kurativen Therapieform für alle Patienten eine große Herausforderung dar. Die hohe genetische Diversität der Erkrankung erschwert die Entwicklung einer solchen Therapie zusätzlich und verdeutlicht die Notwendigkeit der Entwicklung eines robusten Tiermodells zur Untersuchung der komplexen biologischen Abläufe bei der *de novo* Entstehung einer AML *in vivo*. Im Verlauf der letzten 15 Jahre stellten immunsupprimierte Mausstämme wie die NOD/scid-Maus das Modell der Wahl für die Xeno-Transplantation humaner AML-Blasten dar [4, 214]. Sie ermöglichen eine rasche und zuverlässige Identifikation humaner Zellen vor dem murinen Hintergrund mit Hilfe von standardisierten Techniken wie der Durchflusszytometrie und erlauben gleichzeitig die Evaluation morphologischer und biologischer Charakteristika der transplantierten Zellen. Zudem existieren aufgrund des murinen und immundefizienten Phänotyps der Modelle keine Einschränkungen bzgl. der HLA-Identitäten der transplantierten Zellen [215]. Der Einsatz des NOD/scid-Modells führte sogar zur Entdeckung der (putativen) CD34⁺CD38⁻ leukämischen Stammzelle in den späten 1990er Jahren durch Bonnet und Dick *et al.* [40]. Die nach Transplantation humaner AML-Blasten erzeugten *Engraftment*-Raten waren jedoch häufig gering und lagen im Bereich von 0,1–10% humaner Zellen im murinen Knochenmark [4, 204]. Auch die Injektion von Zytokinen oder die Ko-Transplantation akzessorischer Zellen konnten das *Engraftment* nicht signifikant steigern [4, 216, 217]. Erst die Einführung neuer, stärker immundefizienter Mausstämme vor dem NOD/scid-Hintergrund führte zu verbesserten Modellen. Dazu zählen Tiere mit einer gezielten Deletion des β_2 -Mikroglobulin Gens, die zu einer defekten Expression von MHC Klasse I-Molekülen sowie verminderter NK Zell-Aktivität führt und Tiere mit einer Deletion der IL-2 Rezeptor *common gamma* Kette, deren Abwesenheit die Funktionalität einer Vielzahl von Zytokin-Rezeptoren beeinträchtigt [201, 218]. Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG-)-Stamm zeichnet sich durch die vollständige Abwesenheit von B, T und NK Zellen sowie eine hohe Lebenserwartung ohne spontane Thymombildung aus (siehe Abschnitt 2.5). Gleichzeitig soll das Modell eine verbesserte *Engraftment*-Stärke sowohl humaner HSC als auch humaner AML-Blasten ermöglichen [205, 219, 220]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die erfolgreiche Etablierung von zehn Patienten-spezifischen NSG-AML Modellen als Basis für den anschließenden experimentellen Transfer *in vitro* generierter und expandierter AML-reaktiver CTL als Immuntherapie. Insgesamt wurden 17 verschiedene AML-Proben in den NSG-Mäusen auf ihr *Engraftment*-Potential mit Hilfe eines initialen *Screening*-Verfahrens untersucht, das in Anlehnung an den von Bonnet *et al.* beschriebenen Ansatz durchgeführt wurde [5]. Die Versuchstiere wurden 16-24 Stunden vor

Transfer der AML-Blasten subletal mit einer Dosis von 150 cGy aus einer ^{137}Cs -Quelle bestrahlt. Diese Dosis war im Vergleich zu anderen publizierten Protokollen relativ niedrig [200, 220, 221], höhere Dosen führten in unseren Händen jedoch zu einer stark erhöhten Mortalitätsrate der Versuchstiere, die bereits vor Transfer der AML-Blasten auftrat (Daten nicht gezeigt). Anschließend erfolgte der i.v.-Transfer von $5\text{-}10 \times 10^6$ primären AML-Zellen mit einem Blasten-Gehalt von 80-90%, zumeist in Gruppen von fünf Versuchstieren. Alternative Transplantations-Strategien wie die intracraniale, intrahepatische, intraperitoneale oder intrafemorale Injektion wurden aufgrund mangelnder Expertise und fehlender Belege in der Literatur für ein überlegenes *Engraftment* nicht durchgeführt [222]. Anhand des initialen *Screenings* konnten zehn von 17 AML-Proben (58,82%) identifiziert werden, die zu einem detektierbaren *Engraftment* ($>0,1\%$ humane $\text{CD}33^+\text{CD}45^+$ Zellen im murinen Knochenmark) und einer Rekapitulation der humanen Erkrankung in den NSG-Mäusen führten. Bei den restlichen sieben AML-Proben konnte in keinem der transplantierten Versuchstiere ein An- oder Auswachsen der humanen Zellen detektiert werden. Die hier beobachtete *Engraftment*-Rate liegt mit 58,82% etwas unter dem aus der Literatur bekannten Wert von 65-70% [4, 5]. Jedoch ist die Aussagekraft der hier beobachteten *Engraftment*-Rate kritisch zu beurteilen, da die Anzahl evaluierter primärer AML-Proben ($N=17$) im Vergleich zu anderen Studien relativ gering ist [4, 205, 223].

Generell ließen sich die untersuchten primären AML-Proben in drei Gruppen einteilen: 1) AML-Proben, die zuverlässig und reproduzierbar zu einem starken *Engraftment* in $>90\%$ der transplantierten NSG-Mäuse führten; 2) AML-Proben, die in $< 90\%$ aber $> 10\%$ der transplantierten Versuchstiere pro Leukämie und pro Kohorte zu variabel hohem *Engraftment* führten sowie 3) AML-Proben, die in keinem der transplantierten Versuchstiere zu *Engraftment* führten. Da in der vorliegenden Arbeit insgesamt >500 Versuchstiere unter variablen Bedingungen transplantiert und analysiert wurden ist eine genaue Angabe der einzelnen erzielten *Engraftment*-Stärken je Versuchstier nicht möglich. Anhand des am Beispiel der AML MZ667 in Abschnitt 5.1.3 dargestellten *Engraftment*-Verlaufs einer zuverlässig anwachsenden AML wird jedoch verdeutlicht, dass in den Versuchstieren je nach initial transplantierte Zellzahl und Verweildauer in den Tieren ein nahezu vollständiger Ersatz des murinen Knochenmarks durch humane $\text{CD}33^+\text{CD}45^+$ Zellen erzielt werden konnte.

Zur Identifikation von potentiellen Parametern, die mit einer reproduzierbar hohen *Engraftment*-Stärke korrelieren, wurden die gruppierten primären AML-Proben vergleichend hinsichtlich einiger molekularer und phänotypischer Parameter analysiert. Die folgenden Parameter wurden in der Literatur als relevant für das *Engraftment* bezeichnet:

6.1.1 FAB-Klassifikation

Rombouts *et al.* konnten eine Korrelation zwischen der FAB-Klassifikation und dem *Engraftment*-Potential von primären AML Blasten in NOD/scid-Mäusen nachweisen. Der Transfer von AML Blasten aus Patienten mit FAB M0/1-Klassifikation führte zu einem deutlich höheren *Engraftment* als durch Blasten der FAB M2/4/5-Klassifikation [223]. Die Analyse der in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären AML-Proben hinsichtlich der FAB-Klassifikation ergab, dass in der Gruppe der zuverlässig anwachsenden AML-Proben, analog zu den Ergebnissen von Rombouts *et al.*, vorwiegend myeloide AML-Blasten mit relativ schwachem Differenzierungsgrad (4/5 AML-Proben gehörten zur FAB-Klassifikation M0-2) vorlagen. Diese gehören zwar, mit Ausnahme der FAB M0-Klasse, nicht zu den Hochrisiko-Gruppen, besitzen aber möglicherweise aufgrund des niedrigeren Differenzierungsgrads der Blasten ein höheres proliferatives Potential. Die Gruppe der intermediär anwachsenden AML-Proben war divers hinsichtlich der Zugehörigkeit zu einer bestimmten FAB-Klassifikation, die Gruppe der schlecht anwachsenden AML-Proben hingegen bestand fast ausschließlich aus (myelo)monozytären AML-Blasten (6/7 AML-Proben gehörten zur FAB-Klassifikation M4/5). Diese zählen zwar ebenfalls nicht zu den Hochrisiko-Gruppen, die Blasten sind jedoch bereits stärker ausdifferenziert und somit möglicherweise weniger stark proliferativ. Allerdings ist auch in der Gruppe der zuverlässig anwachsenden AMLs eine Patienten-Probe der FAB M4-Klasse enthalten. Somit ist eine genaue Abgrenzung zwischen gut und schlecht anwachsenden AML-Proben einzig aufgrund der Zugehörigkeit zu einer bestimmten FAB-Klassifikation hier nicht möglich. Jedoch scheinen tendenziell weniger differenzierte AML-Proben mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einem *Engraftment* zu führen. Zusammenfassend ließ sich in der vorliegenden Arbeit jedoch keine klare Korrelation zwischen FAB-Klassifikation und *Engraftment* in NSG-Rezipienten feststellen.

6.1.2 Mutationen der Flt3-Rezeptor-Tyrosinkinase

Mutationen der Rezeptor-Tyrosinkinase Flt3 stellen eine der häufigsten Arten von genetischen Aberrationen bei AML-Patienten dar und sind mit einer erhöhten Rezidiv-Rate und verminderter allgemeiner Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert (siehe Abschnitt 2.1.4.3). In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass speziell die Flt3-ITD-Mutation mit den putativen LSC assoziiert sowie am Prozess der Leukämogenese beteiligt ist und Flt3-ITD⁺ AML-Proben in NOD/scid-Mäusen zu einem verbesserten *Engraftment* führen [223-226]. Pearce *et al.* sowie Ailles *et al.* zeigten zudem, dass die karyotypisch definierte Zugehörigkeit zu prognostisch intermediären oder ungünstigen Risiko-Gruppen, in die auch Patienten mit Flt3-Mutationen fallen, zu einem verbesserten *Engraftment* in NOD/scid-Mäusen führt [4, 227]. Auch in den hier untersuchten AML-Proben konnte festgestellt werden, dass das Vorhandensein von Flt3-ITD-Mutationen positiv mit dem *Engraftment*-Potential der jeweiligen

AML-Probe in NSG-Mäusen korreliert. In der Gruppe der zuverlässig anwachsenden AML-Proben wiesen alle Patienten (5/5) eine Flt3-ITD-Mutation auf. Auch in der Gruppe der intermediär anwachsenden AML-Proben besaß die Mehrheit (3/5, eine Probe unbekannt) der untersuchten Proben eine Flt3-ITD-Mutation. In der Gruppe der schlecht anwachsenden AML-Proben hingegen wies die Mehrheit der Proben (5/7) keine Flt3-ITD-Mutation auf. Somit konnten die Ergebnisse der in NOD/scid-Mäusen durchgeführten Experimente auch unter Einsatz von NSG-Mäusen in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

6.1.3 Anteil CD34⁺CD38⁻ LSC

In den von Blair *et al.* [39] und Bonnet und Dick [40] durchgeführten Transfer-Studien von AML-Blasten in NOD/SCID-Mäuse konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der transplantierten leukämischen Zellen nicht in der Lage waren, *in vivo* extensiv zu proliferieren. Dies war nur für eine kleine Subpopulation an Zellen möglich, die zu einer *de novo* Initiierung, Aufrechterhaltung und Expansion der Leukämie *in vivo* führten. Diese putativen LSC, die je nach Patient nur in einer Frequenz von 0.2–1% der Gesamtzellzahl vorhanden sind, waren phänotypisch beschränkt auf das Kompartiment der CD34⁺CD38⁻ Zellen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten primären AML-Proben wurden auf den Anteil CD34⁺CD38⁻ Zellen an der Gesamt-Population mittels Durchflusszytometrie untersucht. Wie in Abbildung 11 dargestellt, war der prozentuale Anteil, je nach Patient, unterschiedlich hoch und lag zwischen 0 und ca. 50%. Auffällig war, dass in der Gruppe der zuverlässig anwachsenden AML-Proben im Mittel der geringste Anteil CD34⁺CD38⁻ Zellen gefunden wurde. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren jedoch statistisch nicht signifikant. Generell stellen diese Ergebnisse eine Diskrepanz zu einer jüngst publizierten Studie dar, in welcher der Anteil CD34⁺/CD38⁻/CD45^{-low} Zellen mit der Rezidiv-freien Überlebensrate von Patienten mit juveniler AML korreliert wurde. Es wurde festgestellt, dass die Prognose der Patienten umso schlechter war, je höher der Anteil CD34⁺/CD38⁻/CD45^{-low} Zellen war und daraus gefolgert, dass ein erhöhter Anteil LSC vorlag [228]. Jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die phänotypische Charakterisierung der LSC inzwischen nicht mehr auf das CD34⁺/CD38⁻-Kompartiment beschränkt ist, sondern durch eine Vielzahl weiterer Oberflächen-Antigene wie CD44, CD47, CD71, CD96, HLA-DR, CD123, Thy-1 sowie TIM-3 definiert wird [229-234]. Gleichzeitig sind auch Studien bekannt, in denen die zu einem *Engraftment* führende Zellpopulation nicht auf das ursprüngliche, undifferenzierte CD34⁺/CD38⁻-Zellkompartiment beschränkt ist, sondern auch alternative, bereits stärker differenzierte Phänotypen aufweisen kann [221, 235]. Allerdings wird auch in diesen Studien die Mehrheit der LSC im CD34⁺/CD38⁻-Zellkompartiment gefunden. Die Analyse der genannten zusätzlichen Oberflächenmarker wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt, womit eine eindeutige Identifizierung der putativen LSC in den CD34⁺/CD38⁻-Zellpopulationen nicht möglich ist.

Die Gruppe der schlecht anwachsenden AML-Proben besaß im Mittel ebenfalls einen höheren Anteil CD34⁺CD38⁻ Zellen als die Gruppe der zuverlässig anwachsenden AML-Proben, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

6.1.4 Anteil CXCR4⁺ AML-Blasten

Die Interaktion des Chemokins SDF-1 (stromal-derived factor 1, CXCL12) mit seinem Rezeptor CXCR4 (CD184) spielt bei der Migration, dem *Homing* und der Repopulation des Knochenmarks durch murine und humane HSC eine essentielle Rolle [236-238]. SDF-1 induziert eine gerichtete Motilität von CXCR4⁺-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine hohe Expressionsrate von CXCR4 als auch eine erhöhte Migrationsrate als Antwort auf einen SDF-1 Gradienten *in vitro* mit einer schnelleren Rekonvaleszenz nach sowohl allogener als auch autologer HSCT korrelieren [239]. Möhle *et al.* und Voermans *et al.* konnten nachweisen, dass auch humane AML-Blasten CXCR4 in variierenden Konzentrationen exprimieren. Zudem stellten sie eine Korrelation zwischen der FAB-Klassifikation und der Expressionsstärke von CXCR4 her und folgerten, dass die SDF-1-CXCR4-Interaktion vornehmlich in myelomonozytären Blasten mit FAB-Typ M3-5 von Bedeutung ist [240-242]. Rombouts *et al.* stellten zudem eine signifikant erhöhte CXCR4-Expression bei Patienten mit Flt3-ITD Mutation fest [243]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte ebenfalls eine Analyse der einzelnen AML-Proben hinsichtlich der Oberflächen-Expression von CXCR4. Diese wurde im Zusammenhang der jeweiligen Gruppierung in zuverlässig, intermediär oder schlecht anwachsende AML-Proben evaluiert. Wie in Abbildung 11 ersichtlich, wiesen alle drei Gruppen im Mittel eine ähnlich hohe Oberflächen-Expression von CXCR4 (38-52,7%) auf. Somit können die Beobachtungen von Möhle *et al.* und Voermans *et al.* bestätigt werden. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied in den Expressions-Niveaus der drei Gruppen festgestellt werden. Gleichzeitig konnte die Expression auch nicht mit der jeweiligen FAB-Klassifikation korreliert werden. Dies kann in der relativ geringen Anzahl untersuchter AML-Proben begründet sein, jedoch konnte auch von Pearce *et al.* und Monaco *et al.* in Studien mit größeren Fallzahlen keine Korrelation zwischen CXCR4-Expression und dem *Engraftment*-Potential gefunden werden [227, 244]. Somit stellt die Expressionsstärke von CXCR4 einen kontrovers diskutierten Parameter in der Beurteilung des putativen *Engraftment*-Potentials primärer AML-Blasten dar.

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Transplantations-Studien gezeigt werden, dass auch NSG-Mäuse, entsprechend bereits publizierter Ergebnisse für NOD/scid-Mäuse, ein erfolgreiches *Engraftment* von verschiedenen primären AML-Proben durch den i.v.-Transfer in subletal bestrahlte Versuchstiere erlauben. Die NSG-Mäuse scheinen jedoch, entgegen veröffentlichter Studien, gegenüber NOD/scid-Mäusen hinsichtlich des generellen *Engraftments* verschiedener primärer AML Proben in unseren Händen nicht überlegen zu

sein, da gegenüber den für NOD/scid-Mäuse publizierten *Engraftment*-Raten verschiedener AML Proben aus Patienten mit unterschiedlichen molekularen und phänotypischen Charakteristika keine Verbesserung erzielt werden konnte. Die Fähigkeit der einzelnen Patienten-Proben, zu *Engraftment* in NSG-Mäuse zu führen, scheint daher intrinsisch und nicht vorhersehbar zu sein. Als für das *Engraftment* relevante Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch zum einen das Vorhandensein von konstitutiv aktivierenden (ITD) Mutationen der Flt3-Kinase sowie in geringerem Maße die Zugehörigkeit der Patienten-Probe zu einer FAB-Klassifikation mit geringen Differenzierungszeichen identifiziert. Dies steht ebenfalls in Einklang mit den für NOD/scid-Mäuse publizierten Daten.

6.2 Biologische Signifikanz des adoptiven Transfers AML-reaktiver CTL

Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit stand neben der erfolgreichen Etablierung von Patienten-spezifischen NSG-AML Modellen deren Einsatz als prä-klinisches Modell zur Analyse der biologischen Signifikanz adoptiv transferierter, *in vitro* generierter und expandierter AML-reaktiver CTL als Immuntherapie im Rahmen der allogenen HSCT. Durch die Behandlung von mit AML-Blasten inokulierten NSG-Mäusen mit CTL-Populationen, die eine Spezifität für die zur Stimulation eingesetzten AML-Blasten besitzen, sollte der anti-leukämische Effekt im Rahmen der induzierten leukämischen Hämatopoese *in vivo* nachgewiesen werden. Die *in vitro* Generierung solcher CTL-Linien und -Klone aus Lymphozyten gesunder, HLA-identer Spender wurde bereits eingehend beschrieben [207, 245-250]. Desweiteren wurden solche CTLs zur Eradikation humaner maligner hämatopoetischer Zellen in immundefizienten Mausmodellen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation *in vitro* generierter, mHAg-spezifischer CTL mit AML-Blasten vor deren Inokulation in NOD/scid- und NSG-Mäuse das *Engraftment* verhindert [183, 185]. Der repetitive, adoptive Transfer hoher Dosen *in vitro* über HLA-Disparitäten generierter ALL-reaktiver CTL-Linien in mit ALL-Blasten inokulierte NOD/scid-Mäuse führte zu einer partiellen oder in einigen Versuchstieren kompletten Remission der Erkrankung [215]. Im Jahr 2007 wurde zudem eine klinische Studie der Phase I/II durchgeführt, um die Realisierbarkeit der *in vitro* Generierung Leukämie-reaktiver CTL-Linien zur Behandlung von Patienten mit rezidivierenden Leukämien nach allogener HSCT zu evaluieren. Zwar zeigten die generierten CTL-Linien *in vitro* moderate bis hohe anti-leukämische Wirksamkeit, *in vivo* führte der adoptive Transfer jedoch nur bei zwei von acht Patienten zum Erreichen einer kompletten Remission [251]. Dieser bereits in Teilen erfolgsversprechende Ansatz illustriert die generelle Machbarkeit eines solchen Therapieansatzes, betont gleichzeitig aber auch die Notwendigkeit der Verbesserung adoptiver Immuntherapien und deren Überprüfung in prä-klinischen Mausmodellen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Generierung AML-reaktiver CTL in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr nach bestehenden Protokollen aus naiven CD8⁺ T Lymphozyten [185,

187]. Durch den Einsatz naiver, stark teilungsfähiger CD8⁺ T Zellen und relativ kurzer *in vitro*-Kulturperioden sollte eine für phänotypisch stärker ausdifferenzierte T Zellen beschriebene, verminderte Persistenz *in vivo* umgangen werden [193, 252]. Es wurden erfolgreich für zwei Patienten-spezifische NSG-AML Modelle, MZ580 und MZ308, *in vitro* AML-reaktive CTL aus naiven CD8⁺ T Zellen von gesunden Spendern generiert und expandiert. Zusätzlich wurden als Spezifitätskontrolle dienende, autologe EBV-reaktive CTL aus PBMC eines irrelevanten Dritt-Spenders generiert. Die beiden AML-Systeme wurden gewählt, da zum einen die Inokulation von NSG-Mäusen mit den jeweiligen AML-Blasten reproduzierbar zu einem hohen *Engraftment* der Versuchstiere führte und zum anderen passende Spender-PBMC zur Generierung der CTL verfügbar waren. Die vorliegenden Spender-Empfänger-Kombinationen wiesen im Fall des MZ580-Systems einen singulären und im Fall des MZ308-Systems einen dualen HLA-Klasse I *mismatch* auf. Der Einsatz *mismatch*-reaktiver CTL-Linien ist auch aus anderen Studien bekannt [215]. Die klinische Situation erfordert optimalerweise ein für die HLA-Allele der Klasse I (A, B und C) und Klasse II (DRB1 und DQB1) identes Spender-Empfänger-System (möglichst 10/10 idente Allele), um das Risiko einer GvH-Erkrankung zu minimieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es jedoch nicht möglich, entsprechendes HLA-identisches Spender-Material zu erhalten. Bei Fehlen eines HLA-identischen Geschwister- oder Fremd-Spenders wird jedoch inzwischen auch in der Klinik auf HLA-inkompatible Transplantate zurückgegriffen, speziell wenn die Erkrankung bereits weit fortgeschritten ist. Diese Art der Transplantation verstärkt allerdings das Risiko für eine GvH-Erkrankung signifikant. Umso mehr HLA-Allele disparat sind, umso höher ist das Risiko einer akuten GvHD, der Abstoßung des Transplantats und einer erhöhten Mortalität [253]. Demgegenüber existieren jedoch auch bestimmte disparate HLA-Allel-Kombinationen, die zu einem verminderten Rezidiv-Risiko führen und augenscheinlich eine Separation von GvL- und GvH-Effekt erlauben [254]. Somit stellen die hier untersuchten Spender-Empfänger-Systeme durchaus klinisch relevante Situationen in einem prä-klinischen Maus-Modell nach. Zudem dient die Etablierung sowohl des Mausmodells als auch der geeigneten Bedingungen für den adoptiven Transfer als Basis für den späteren Einsatz HLA-identischer CTL Klone und die Entwicklung zukünftiger adoptiver Immuntherapie-Protokolle.

6.2.1 Kultur und Charakterisierung der AML-reaktiven CTL-Populationen

Die Generierung AML-reaktiver CTL-Populationen erfolgte in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr. Die Isolation naiver CD8⁺ T Lymphozyten erfolgte mit hoher Reinheit. Die anschließende *in vitro* MLL-Kultur unter repetitiver Stimulation mit letal bestrahlten Patienten-spezifischen AML-Blasten führte zu T Zell-Linien mit deutlicher lytischer Aktivität gegenüber den eingesetzten AML-Blasten, die über einen Zeitraum von bis zu 70 Tagen expandierbar waren. Gleichzeitig wiesen die T Zell-Kulturen auch eine starke

lytische Aktivität gegenüber EBV-transformierten B-LCL-Kulturen des AML-Patienten auf. Diese war in beiden Systemen sogar etwas höher als die jeweilige AML-Reaktivität und ist vermutlich auf eine erhöhte Expression und Erkennung der disparaten HLA-Moleküle auf den EBV-B-LCL zurückzuführen. Die ebenfalls generierten Spender-B-LCL wurden hingegen nicht erkannt, womit sowohl Autoreaktivität als auch eine Reaktivität gegenüber endogen präsentierten EBV-Antigenen ausgeschlossen sind. Phänotypisch erfolgte durch eine zunehmende *in vitro* Kulturdauer eine reduzierte Expression von naiven Oberflächen-Antigenen wie CD62L, CD45RA und CCR7 bei gleichzeitiger Zunahme der Expression des für *memory* T Zellen charakteristischen Markers CD45RO. Dies lässt auf eine zunehmende Aktivierung und Differenzierung der naiven T Zellen zu *effector memory* T Zellen schließen. Die Expression von „frühen“ phänotypischen Markern wie CD28, CD127 und CD62L war zwar rückläufig, blieb aber über die ersten vier Wochen der Kultur zu einem gewissen Grad erhalten. Die anhand von ELISpot-Tests ermittelte AML-Reaktivität der T Zell-Kulturen blieb über einen Zeitraum von 28 Tagen relativ konstant. Im MZ580-System konnte zu einem Kulturzeitpunkt von 56 Tagen hingegen bereits eine Reduktion der AML-Reaktivität nachgewiesen werden. Gleichzeitig war auch hier eine starke Erkennung der EBV-transformierten Patienten-B-LCL sichtbar. Die Analyse von CTL-Populationen über eine Kulturdauer von 56 Tagen hinaus erschien somit nicht zweckmäßig. Entsprechend der vorhandenen HLA-Disparitäten zwischen Spender und Empfänger im jeweiligen System konnte anhand des Einsatzes von Blockade-mAb im ELISpot-Test die jeweilige HLA-Restriktion der CTL-Populationen nachgewiesen werden. T Zellen im MZ580-System wurden eindeutig über HLA Klasse I restringiert, ebenso die CTL im MZ308-System. Dort konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Restriktion über HLA-B- oder C-Allele erfolgte.

Zur Generierung der als Spezifitätskontrolle dienenden autologen EBV-reaktiven Spender104-CTL wurde die Gesamtheit CD8⁺ T Zellen aus Spender-PBMC mit hoher Reinheit isoliert. Dieser Ansatz wurde gewählt, da die EBV-Reaktivität eines gesunden Spenders vorwiegend im Kompartiment der *memory* und nicht der naiven T Zellen liegt. Phänotypisch unterschieden sich die EBV-reaktiven T Zellen im Verlauf der Kultur von den AML-reaktiven CTL-Populationen. Erwartungsgemäß wiesen sie vornehmlich die Expression charakteristischer *central memory* T Zell-Antigene wie CD45RO, CCR7 und CD62L auf. Gegenüber den eingesetzten AML-Blasten wiesen sie im ⁵¹Cr-Freisetzungstest nur eine minimale lytische Aktivität auf und stellten somit eine ideale Spezifitätskontrolle dar.

6.2.2 Etablierung geeigneter Bedingungen für den adoptiven Transfer

Für den adoptiven Transfer der AML-reaktiven CTL-Populationen sollten Bedingungen in den mit AML-Blasten inokulierten NSG-Mäusen geschaffen werden, die der klinischen Situation im Patienten zum Zeitpunkt des adoptiven T Zell-Transfers möglichst nahe kommen. Die

Ermittlung der optimalen Zelldosis und Verweildauer der AML MZ580- und MZ308-Blasten in NSG-Mäusen zum Erreichen eines Zustands minimaler Erkrankung mit 1-5% humaner CD33⁺CD45⁺ Zellen im murinen Knochenmark ergab, dass eine Inokulation mit 5×10^5 AML-Blasten und eine Verweildauer von 18 Tagen in den Versuchstieren zu den angestrebten *Engraftment*-Raten führte. Im Gegensatz zu den von Nijmeijer *et al.* durchgeführten Studien mit ALL-Blasten sind die hier eingesetzten AML-Dosen vergleichsweise gering (1×10^7 vs. 5×10^5 Blasten). Jedoch erfolgte dort einzig die Analyse der leukämischen Last im peripheren Blut der Versuchstiere zum Zeitpunkt des adoptiven Transfers und nicht im Knochenmark [215]. Der adoptive T Zell-Transfer erfolgte dort bei Erreichen von 0,5-5% ALL-Blasten im peripheren Blut [255]. Diese Art der Überwachung des *Engraftment*-Verlaufs schien für die hier angestrebten adoptiven Transferstudien wenig sinnvoll, da nicht alle der im Rahmen dieser Arbeit transplantierten AML-Proben im Verlauf des *Engraftments* zuverlässig im peripheren Blut detektierbar waren. Zudem ließen sich daraus nur ungenaue Rückschlüsse auf die *Engraftment*-Stärke im Knochenmark ziehen, was zu einer unbekannt hohen Variabilität des Anteils humaner CD33⁺CD45⁺ Zellen im murinen Knochenmark zum Zeitpunkt des adoptiven Transfers führen würde.

Der Einsatz von AML MZ580-Blasten führte in allen durchgeführten Experimenten zu einem soliden *Engraftment* zum Zeitpunkt des adoptiven Transfers von 0,5-6,8% humaner CD33⁺CD45⁺ Zellen im murinen Knochenmark. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der durchgeführten kinetischen Analysen zum *Engraftment* der AML MZ308-Blasten vor den adoptiven Transferstudien führte deren Einsatz zu einem deutlich schwächeren *Engraftment* an Tag 18 von 0,1-0,3% humaner CD33⁺CD45⁺ Zellen im murinen Knochenmark. Da eine gewisse Variabilität im *Engraftment*-Verlauf in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Allgemeinzustand der Versuchstiere nicht gänzlich zu vermeiden war, die durchflusszytometrische Analyse eine distinkte Population humaner AML-Blasten zeigte und der Anteil dieser Blasten im Knochenmark im Verlauf der Experimente eindeutig zunahm, wurde der adoptive Transfer im MZ308-System trotz geringer initialer Erkrankung der Versuchstiere durchgeführt.

Aufgrund der *in vitro* ermittelten Daten bezüglich der lytischen Aktivität und Reaktivität der CTL-Populationen wurde entschieden, für den adoptiven Transfer ein E:T-Verhältnis von 10:1 zu wählen. Als Zellzahl der *Target*-Zellen wurde dabei die initial transferierte Menge an AML-Blasten definiert. Es erfolgte in jedem Experiment eine einzelne i.v.-Injektion der CTL-Populationen unter Zusatz von IL-7 und IL-2 zur Supplementierung der T Zellen *in vivo*. Aus der Literatur konnten E:T-Verhältnisse zwischen 1:1 und 50:1 ermittelt werden, die Art und Anzahl der verabreichten CTL-Injektionen variierte jedoch stark [215, 255-257].

6.2.3 Effizienz und Spezifität der adoptiv transferierten CTL-Populationen

Sowohl im MZ580- als auch im MZ308-System führte der adoptive Transfer AML-reaktiver CTL-Populationen bis zu einer *in vitro* Kulturdauer von 28 Tagen nach einer Woche Verweildauer in der Maus zu einer äquivalenten, nahezu kompletten Eradikation der zuvor transplantierten AML MZ580- bzw. AML MZ308-Blasten. Es konnten keine funktionalen Unterschiede hinsichtlich des Alters der Kultur sowie keine Korrelation bezüglich der unterschiedlichen HLA-Disparitäten der CTL-Populationen festgestellt werden. In insgesamt 25/27 der mit AML MZ580- und 19/22 der mit AML MZ308-Blasten inokulierten Versuchstiere führte der adoptive Transfer der jeweiligen AML-reaktiven CTL zu einer kompletten Eliminierung der humanen AML-Blasten. In den übrigen Tieren wurden minimale Resterkrankungen von $<0,2\%$ humaner $CD33^+CD45^+$ Zellen im murinen Knochenmark detektiert. In den nicht behandelten Kontrolltieren hingegen lagen *Engraftment*-Raten von durchschnittlich $28,37\pm 3,74\%$ humaner AML MZ580- und $0,32\pm 0,1\%$ humaner AML MZ308-Blasten vor. Die Analyse von Milz und peripherem Blut ergab ähnliche wenngleich auch weniger deutliche Ergebnisse. AML MZ580-reaktive CTL, die für eine Dauer von 56 Tagen *in vitro* kultiviert und expandiert wurden, zeigten *in vivo* hingegen bereits eine deutlich verminderte Effizienz. Zwar führte ihr adoptiver Transfer ebenfalls zu einer sichtbaren Reduktion der leukämischen Last der Versuchstiere gegenüber den Kontrolltieren, es erfolgte jedoch keine komplette Eliminierung der Blasten. Somit scheint die Reaktivität und Effizienz der lytischen Aktivität *in vivo* stark von der Kulturdauer abzuhängen. Dies ist möglicherweise auf eine terminale Differenzierung und eine durch die replikative Seneszenz bedingte funktionale Schwäche der T Zellen zurückzuführen [193, 252]. Alternativ ist es möglich, dass über einen längeren Kulturzeitraum AML-reaktive CTL von unspezifisch stimulierten Zell-Populationen überwachsen wurden [245]. Mit Hilfe einer kinetischen Analyse wurde festgestellt, dass unter Einsatz von Tag 21 MZ580-reaktiven CTL bereits 48 Stunden nach adoptivem Transfer der CTL eine fast vollständige Eradikation ($0,17\pm 0,9\%$ humane Blasten) der inokulierten AML-Blasten im murinen Knochenmark erfolgte. In den nicht-therapierten Kontrolltieren lag die *Engraftment*-Stärke zu diesem Zeitpunkt bereits bei $5,3\pm 0,57\%$. Zum frühesten Zeitpunkt der Analyse, zwei Stunden nach Transfer, waren zwar noch keine T Zellen im Knochenmark detektierbar, dies kann jedoch in der mangelnden Sensitivität der durchflusszytometrischen Analyse begründet sein. Einen Tag nach dem adoptiven Transfer hingegen waren bereits deutliche Populationen $CD3^+CD8^+$ T Zellen im Knochenmark detektierbar. Somit scheint die Effektorfunktion der CTL-Populationen unmittelbar, maximal 24 Stunden nach erfolgtem adoptivem Transfer einzusetzen und innerhalb eines Zeitraums von ca. 48 Stunden abgeschlossen zu sein. In einem murinen soliden Tumor-Modell konnte mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie gezeigt werden, dass die spezifische Lyse einzelner Tumorzellen durch singuläre,

adoptiv transferierte CTL jeweils ca. sechs Stunden dauert [258]. Somit liegt die hier beobachtete Geschwindigkeit der Leukämie-Eradikation durchaus in einem physiologischen Rahmen. Die Persistenz des anti-leukämischen Effekts konnte zudem durch eine Langzeitkontrolle im MZ580-System, in der die adoptiv therapierten Versuchstiere sechs Wochen nach Transfer analysiert wurden, bestätigt werden. Auch hier zeigten die Versuchstiere keine oder nur eine minimale Resterkrankung von 0,1% humaner CD33⁺CD45⁺ Zellen im murinen Knochenmark. Vergleichbare, nicht behandelte Kontrolltiere hingegen zeigten ein *Engraftment* von 65-78% humaner AML MZ580-Blasten im Knochenmark. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die eingesetzten AML-reaktiven CTL nicht nur zur Eliminierung der leukämischen Blasten, sondern auch der potentiellen LSC führen und ein Rezidiv in den Versuchstieren verhindern. Durch den Einsatz von autologen Don104-spezifischen, EBV-reaktiven CTL-Populationen in beiden Systemen konnte zudem die Spezifität der anti-leukämischen Aktivität der generierten AML-reaktiven CTL-Populationen nachgewiesen werden. Einzig der adoptive Transfer der jeweiligen, AML-reaktiven CTL-Populationen führte zu einer kompletten Eliminierung der inokulierten AML-Blasten in den Versuchstieren; der adoptive Transfer der Don104-spezifischen CTL-Populationen hingegen führte zu *Engraftment*-Raten, die mit denen der nicht-therapierten Kontrolltiere vergleichbar waren. Somit konnte eindeutig die Spezifität der eingesetzten AML-reaktiven CTL-Populationen nachgewiesen und ein unspezifischer anti-leukämischer Effekt, vermittelt z.B. durch eine unspezifische Freisetzung von Zytokinen durch die CTL-Populationen, ausgeschlossen werden.

Im Verlauf der Experimente zeigte keines der behandelten Versuchstiere Anzeichen für die Entstehung einer durch die humanen CD8⁺ CTL ausgelösten xenogenen GvH-Erkrankung. Die Reanalyse *ex vivo* isolierter AML MZ580-reaktiver CTL nach einer Verweildauer von 24 Stunden in den Mäusen in einem ELISpot-Test zeigte eine konstante, spezifische Reaktivität gegen AML MZ580-Blasten, jedoch nicht gegen murine, aus NSG-Mäusen isolierte DCs. Die Ergebnisse waren mit den *in vitro* ermittelten Daten vor Transfer vergleichbar. Somit scheint die Spezifität der transferierten CTL auf humane Antigene beschränkt zu sein. Im Rahmen der durchgeführten adoptiven Transfer-Studien wurde in beiden Systemen der Einfluss des zusätzlichen Transfers autologer CD4⁺ T Zellen auf Reaktivität und Persistenz der AML-reaktiven CTL *in vivo* evaluiert. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen nötig ist um eine langfristige *memory* Immunantwort *in vivo* zu induzieren [116, 259]. In den Transfer-Studien erfolgte dazu ein Ko-Transfer von 10% autologen CD4⁺ T Zellen. Hier konnten für die untersuchten Systeme keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden. Die eingesetzten CTL-Populationen im MZ580-System schienen unabhängig von der Substitution mit autologen CD4⁺ T Zellen *in vivo* reaktiv und konnten auch noch eine Woche nach Transfer in variablen, jedoch geringen Mengen in verschiedenen Organen der Versuchstiere nachgewiesen werden. Die CTL-Populationen

im MZ308-System hingegen wiesen unter Zusatz autologer CD4⁺ T Zellen eine deutlich erhöhte Persistenz auf. Für die als Spezifitätskontrolle dienenden Don104-EBV-reaktiven CTL erfolgte keine vergleichende Analyse, der Transfer erfolgte ausschließlich unter Substitution mit autologen CD4⁺ T Zellen. Erstaunlicherweise wurde für diese Zellpopulation generell die höchste Persistenz *in vivo* beobachtet, was möglicherweise in deren *central memory* Phänotyp begründet ist [260]. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen einer von Nijmeijer et al. durchgeführten Studie, die einen ähnlichen Effekt beobachteten [215]. Der reine Transfer autologer CD4⁺ T Zellen führte weder zu einem anti-leukämischen Effekt noch zu einem Auswuchs in den Versuchstieren. Ein Auswuchs der CD4⁺ T Zellen erfolgte auch bei gleichzeitigem Transfer von CD8⁺ T Zellen nicht. Generell war der Anteil wiedergefundener humaner T Zellen in Knochenmark, peripherem Blut und Milz der Versuchstiere im Vergleich zu den ursprünglich adoptiv transferierten Mengen relativ gering. Mit Hilfe immunhistochemischer Analysen konnte jedoch in mit AML-Blasten populierte murine Knochenmark-Schnitten eindeutig das Vorhandensein humaner T Lymphozyten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung für die geringe Persistenz könnte die fehlende Antigen-Stimulation nach Eradikation der AML-Blasten und eine darauf einsetzende Anergie der CTL-Populationen darstellen. Ebenso kann der drastische Unterschied zwischen den Kulturbedingungen *in vitro* und dem herrschende Zytokin-Milieu *in vivo* eine Rolle gespielt haben, da humanen T Lymphozyten in NSG-Mäusen kein adäquates Zytokin-Mikromilieu zur Verfügung steht. Die initiale Administration von IL-2 und IL-7 war möglicherweise zu niedrig, um einen Serumspiegel aufzubauen, der den Kulturbedingungen *in vitro* entsprach. Dies kann zu einem Aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD, engl.: *activation induced cell death*) in Folge von Zytokin-Entzug und mangelnder Antigen-Exposition geführt haben [261]. Eine längerfristige Persistenz der T Zellen *in vivo* könnte unter Umständen durch Adaption der Zytokin-Konzentrationen und Häufigkeit der Verabreichung erreicht werden. Gleichzeitig könnte die alternative exogene Supplementierung mit humanem IL-15, das besonders für die Homöostase humaner CD8⁺ *central memory* T Lymphozyten von Bedeutung ist, zu einer verbesserten Persistenz *in vivo* führen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich ein Protokoll für die Evaluation der *in vivo*-Effektor-Funktionen *in vitro* generierter und expandierter HLA-disparater, AML-reaktiver CTL-Populationen in einem Patienten-spezifischen murinen prä-klinischen AML-Modell etabliert und eingesetzt werden. Sowohl das Mausmodell als auch das etablierte Protokoll für den adoptiven Transfer stellen eine vielversprechende Basis für die Entwicklung und Evaluation zukünftiger adoptiver Immuntherapien unter Einsatz HLA-identer CTL-Linien und -Klone dar.

6.3 Untersuchungen zum Mechanismus der Extravasation humaner T Zellen über murines Endothel

Für die Aufklärung einer Vielzahl biologischer Fragestellungen hat sich der Einsatz von Tiermodellen als zentral erwiesen. Speziell die humane Immunologie-Forschung wäre ohne die Untersuchung und Rekonstruktion immunologischer Abläufe in immer stärker humanisierten Mausmodellen heute nahezu unvorstellbar [262]. Dennoch ist es essentiell und unumgänglich, Unterschiede in der Biologie von Maus und Mensch zu identifizieren und anzuerkennen. Diese werden z.B. im Vergleich seltener humaner Erkrankungen mit Mäusen sichtbar, bei denen der betroffene genetische Abschnitt mittels gezielter genetischer Deletion entfernt wurde [263]. Diese Unterschiede können zum einen durch strukturelle Divergenzen in den beteiligten Molekülen, alternative Signalwege oder variierende Funktionen, Affinitäten und/oder Aviditäten der beteiligten Moleküle hervorgerufen werden. Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte adoptive Transfer humaner AML-reaktiver T Lymphozyten führte in dem bereits beschriebenen NSG-AML-Modell (siehe Abschnitt 5.1) zu einer nahezu kompletten Eradikation der zuvor inokulierten AML-Blasten in Knochenmark, Milz und peripherem Blut der Versuchstiere. Anhand immunhistochemischer Analysen des Knochenmarks (siehe Abbildung 46) konnte gezeigt werden, dass die transplantierten AML-Blasten tatsächlich extravasal in den endostealen Bereichen des murinen Knochenmarks vorliegen, wie es auch anderweitig bereits beschrieben wurde [220]. Somit ist für die Ausübung des auf direktem Zell-Zell-Kontakt basierenden zytotoxischen Effekts der transferierten CTL deren Einwanderung in die endosteale Nische erforderlich. Aufgrund des i.v.-Transfers ist es zudem zwingend notwendig, dass die T Lymphozyten dabei murine Blutgefäße passieren und somit die Xeno-Barriere zwischen Maus und Mensch überschreiten. Untersuchungen bzgl. der Extravasations- und Transmigrationsvorgänge über eine Xeno-Barriere wurden bereits eingehend im human-porcinen, jedoch noch nicht im human-murinen System durchgeführt [209, 264, 265]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Transmigrationsmechanismus humaner T Lymphozyten über murines Endothel im Rahmen der Etablierung eines Mausmodells für den adoptiven Transfer AML-reaktiver CTL auf molekularer Ebene untersucht. Dazu wurden funktionelle *in vitro*-Analysen unter Einsatz funktions-blockierender mAb gegen aus der Literatur bekannter, an Adhäsion und Transmigration beteiligter Adhäsionsmoleküle auf sowohl Endothel- als auch T Lymphozyten-Seite durchgeführt. Durch den vergleichenden Einsatz humaner und muriner T Lymphozyten konnten Unterschiede im Extravasations-Prozess identifiziert und auf einzelne Adhäsionsmoleküle zurückgeführt werden. Diese Erkenntnisse können für zukünftige Untersuchungen von Adhäsions- und Transmigrationsprozessen humaner Lymphozyten im Mausmodell bzw. prä-klinische Studien mit Medikamenten, die gezielt auf die Zellmigration Einfluss nehmen, dienlich sein.

6.3.1 Funktionale Untersuchung des Adhäsionsverhaltens humaner T Lymphozyten an murines Endothel

Die Simulation und Untersuchung *in vivo* stattfindender Interaktionen zwischen humanen T Lymphozyten und murinen vaskulären Endothelzellen erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die molekularen Grundlagen des Adhäsionsprozesses mit Hilfe von Flusskammer-Studien unter Simulation des real herrschenden Scherdrucks im Gefäß und dem Einsatz von funktions-blockierenden mAb *in vitro* untersucht. Die Durchführung der Versuche erfolgte dabei in Anlehnung an bestehende, etablierte Protokolle in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Reinhard Henschler am Institut für Transfusionsmedizin des Deutschen Roten Kreuz (DRK) [266-268]. Es kamen sowohl primäre humane Nabelschnur-Endothelzellen, HUVECs, als auch primäre murine Lungen-Endothelzellen und zwei verschiedene murine Endothelzell-Linien, bEND.3 und bEND.5, zum Einsatz. Die ursprünglich geplante Isolation und Kultur von primären NSG-Endothelzellen aus dem Knochenmark konnte im Verlauf der Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden, weshalb auf andere, kommerziell verfügbare Endothelzellen ausgewichen wurde. Je nach Herkunft der Endothelzellen (bEND-Zellen: Blut-Hirn-Schranke, primäre murine Endothelzellen: Lunge, HUVEC: Nabelschnur) wiesen diese erwartungsgemäß Unterschiede sowohl in der Expressionsstärke als auch Verteilung von Adhäsionsmolekülen auf [269]. Diese potentiellen Variationen dürfen bei der Interpretation der erzielten Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden. Gleichzeitig war es in der vorliegenden Arbeit aufgrund der Vielzahl in Frage kommender Kandidaten und des beschränkten zeitlichen Rahmens nicht möglich, sämtliche am Adhäsionsprozess beteiligten Moleküle zu analysieren. Anhand der Expressionsmuster der vorhandenen Endothelzellen wurde eine Auswahl bekannter, am Adhäsionsprozess humaner T Lymphozyten an humanes Endothel beteiligter Moleküle getroffen und diese eingehender untersucht. Dabei handelte es sich um die auf T Lymphozyten vorkommenden Integrine LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$ -Integrin, CD11a/CD18) und VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -Integrin, CD49d/CD29) sowie deren potentielle Liganden, die CAMs ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) sowie VCAM-1 (CD106) [270-274]. Als Spezifitätskontrolle diente das Endoglin (CD105), ein Typ I Membran-Protein, das einen Teil des TGF- β Rezeptor-Komplexes darstellt und konstitutiv auf Endothelzellen exprimiert wird [213]. Der in einigen Experimenten auf bEND.3 sowie primären murinen Lungen-Endothelzellen beobachtbare variable Effekt auf Adhäsion und Transmigration durch den Einsatz des anti-CD105 mAb konnte im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden. Eine mögliche Erklärung stellt die Bindung des mAb an seine Zielstruktur, den TGF-beta Rezeptor, und eine daraus resultierende positive oder negative Regulierung der Adhäsion und Transmigration dar. Alternativ wäre eine ungünstige sterische Interaktion mit den T Zellen oder Endothelzellen denkbar. Alle eingesetzten Endothelzellen ließen sich dauerhaft in Kultur halten

und wiesen eine konstante Expression der relevanten Adhäsionsmoleküle auf. Zudem konnten sie in den eingesetzten Versuchsaufbauten (Flusskammer, Transwell-Einsatz) zur Konfluenz kultiviert werden und stellten somit eine adäquate Imitation der die Gefäßwand auskleidenden Endothelzellen dar. Um die Versuchsanforderungen weiter zu vereinfachen, wurde auf den Einsatz der über mehrere Wochen *in vitro* stimulierten CTL-Populationen verzichtet und stattdessen frisch isolierte und zum Teil polyklonal voraktivierte humane CD3⁺ T Zellen aus gesunden Spender-PBMC bzw. murine CD90.2⁺ T Zellen aus Balb/cJ-Splenozyten eingesetzt. In anfänglich durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* ablaufenden Schritte des Adhäsionsvorgangs, *tethering*, *rolling* sowie initiale und feste Adhäsion, mit Hilfe des Flusskammer-Aufbaus *in vitro* erfolgreich simuliert und analysiert werden konnten. In der vorliegenden Arbeit erfolgte ausschließlich die Analyse der Adhäsionsvorgänge. Anhand der gesammelten Daten wäre jedoch auch eine nachträgliche Untersuchung des Einflusses funktionsblockierender mAb auf *tethering* und *rolling* hinsichtlich der bearbeiteten Fragestellungen möglich. Die Adhäsion aller untersuchten Zellen im Flusskammer-Aufbau konnte signifikant gesteigert werden, sofern eine Stimulation der Endothelzellen mit niedrigen, physiologisch relevanten Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α erfolgte. Dieses Phänomen ist aus der Literatur bekannt und in der Hochregulation induzierbarer Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 (CD106) oder MAdCAM begründet [269, 275, 276]. Die Adhäsion humaner T Zellen an ruhende, nicht vorstimulierte murine Endothelzellen war demgegenüber deutlich verringert. Zusätzlich erfolgte eine vergleichende Analyse des Adhäsionsverhaltens von ruhenden, frisch isolierten und über Nacht polyklonal vorstimulierten T Zellen an die Endothelzellen. Hier war ebenfalls, jedoch in deutlich geringerem Umfang, zu erkennen, dass eine Vorstimulation zu einer erhöhten Adhäsionsstärke führte. Dies ist mutmaßlich ebenfalls in der induzierten Hochregulation der Expression von Adhäsionsmolekülen auf den T Zellen begründet. Zwar konnte mittels Durchflusszytometrie keine signifikante Steigerung der analysierten Integrin-Untereinheiten festgestellt werden, jedoch existiert eine Reihe weiterer, durch polyklonale Stimulation induzierbarer Adhäsionsmoleküle wie z.B. das Glykoprotein CD44 oder die Familie der JAMs (engl.: *junctional adhesion molecules*), die als Auslöser des beobachteten Effekts in Frage kommen [277-279]. Alle nachfolgenden Experimente wurden somit unter Vorstimulation sowohl der Endothelzellen als auch der T Zellen durchgeführt.

Der Einsatz funktions-blockierender mAb gegen einzelne Adhäsionsmoleküle erfolgte vergleichend auf der etablierten murinen Endothelzell-Linie bEND.3, ursprünglich aus mikrovaskulären Gefäßen der Blut-Hirn-Schranke gewonnen sowie primären murinen Endothelzellen, gewonnen aus der Lunge. Grundsätzlich war zu beobachten, dass die Adhäsion sowohl humaner als auch muriner T Zellen an ruhende primäre murine Lungen-Endothelzellen deutlich höher war als an ruhende bEND.3 Endothelzellen. Dies steht in Einklang mit der Beobach-

tung, dass das Adhäsionsverhalten Gewebe-abhängig ist und im Allgemeinen Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke weniger adhäsiv gegenüber Lymphozyten sind [280, 281]. Eine maximale Adhäsion wurde hingegen auf allen untersuchten Endothelzellen nur durch Vorstimulation von Endothelzellen und T Zellen erreicht. Der Einsatz funktions-blockierender mAb auf bEND.3 Endothelzellen zeigte deutlich, dass die Adhäsion humaner T Zellen sowohl in Abhängigkeit der LFA-1–ICAM-Interaktion als auch der VLA-4–VCAM-1-Interaktion erfolgt. Speziell die Blockade der Bindung von VLA-4 an VCAM-1 führte zu einer nahezu kompletten Inhibition der Adhäsion. Im Fall der LFA-1–ICAM-Interaktion war eine signifikante Abhängigkeit von der α_L -Integrin Untereinheit CD11a zu beobachten. Die Blockade der β_2 -Integrin Untereinheit CD18 hingegen führte zu keiner signifikanten Reduktion der Adhäsion. Auch die Blockade des Integrin-Liganden ICAM-2 (CD102) zeigte nur geringen Einfluss auf die Adhäsion. Da auf bEND.3 Endothelzellen keine Expression des alternativen Integrin-Liganden ICAM-1 (CD54) nachgewiesen werden konnte, ist es möglich, dass zusätzlich alternative Liganden, wie PECAM-1 (CD31) oder Komponenten der ECM, an der Adhäsion beteiligt sind. Mit Hilfe weiterer Blockade-Studien könnte die Rolle alternativer Integrin-Liganden genauer untersucht werden. Murine T Zellen wiesen ein ähnliches Adhäsions-Verhalten auf, auch hier führte im Besonderen die Inhibition VLA-4–VCAM-1-Interaktion zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Adhäsion. Der Einfluss der einzelnen, an der LFA-1–ICAM-Interaktion beteiligten Moleküle war hingegen weniger prominent als bei den humanen T Zellen. Die Blockade aller beteiligten Moleküle führte zu einer sichtbaren Reduktion der Adhäsionsstärke muriner T Zellen an bEND.3 Endothelzellen. Diese war jedoch deutlich schwächer als die durch die Blockade der α_L -Integrin Untereinheit CD11a ausgelöste Inhibition der Adhäsion humaner T Zellen. Somit erfolgt die Adhäsion humaner und muriner polyklonal voraktivierter T Zellen an vorstimulierte murine bEND.3 Endothelzellen nach ähnlichen Mechanismen. Für beide Spezies spielen primär die VLA-4–VCAM-1-Interaktion und sekundär die LFA-1–ICAM-Interaktion eine Rolle.

Die Adhäsion polyklonal voraktivierter humaner T Zellen an vorstimulierte primäre murine Lungen Endothelzellen erfolgte nach einem ähnlichen Muster wie die Adhäsion an die Zelllinie bEND.3. Bedingt durch ein alternatives Expressionsmuster der Endothelzellen konnte hier zusätzlich die Rolle des Integrin-Liganden ICAM-1 (CD54) untersucht werden. Auch hier war zu erkennen, dass die Adhäsion generell in Abhängigkeit von der Funktionalität sowohl der VLA-4–VCAM-1- als auch der LFA-1–ICAM-1-Interaktion erfolgt. Für humane T Zellen führte die Blockade der beteiligten Moleküle ähnlich zu den auf bEND.3 EC erzielten Ergebnissen zu einer signifikant reduzierten Adhäsion. Unterschiede waren hier für das LFA-1 Integrin zu beobachten. Im Gegensatz zu den auf bEND.3 Endothelzellen durchgeführten Versuchen führte hier die Blockade der β_2 -Integrin Untereinheit CD18 anstatt der α_L -Integrin Untereinheit CD11a zu einer drastischen Reduktion der Adhäsionsstärke. Die Blockade von

ICAM-2 (CD102) zeigte analog nur geringen Einfluss, jedoch war hier eine signifikante Beteiligung des alternativen Integrin-Liganden ICAM-1 (CD54) zu beobachten. Die kombinierte Blockade der Integrin-Hauptliganden ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106) reduzierte die Adhäsion auf ein mit der Negativ-Kontrolle vergleichbares Niveau. Auch die kombinierte Blockade der Integrin α -Untereinheiten CD11a und CD49d senkte die Adhäsionsstärke signifikant ab, jedoch weniger drastisch als nach Blockade der Integrin-Hauptliganden ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106). Da Integrine zusätzlich zur α - auch eine β -Untereinheit besitzen, kann die alternative Nutzung dieser Moleküle zur Aufrechterhaltung der Adhäsionsstärke den beobachteten Effekt erklären. Der Einsatz muriner T Zellen auf primären murinen Lungen Endothelzellen zeigte ein ähnliches Adhäsions-Verhalten auf. Allgemein war auch hier eine Abhängigkeit der Adhäsion von den VLA-4–VCAM-1- und LFA-1–ICAM-1-Interaktionen zu erkennen, jedoch konnten die Einflüsse einzelner Moleküle weniger deutlich zugeordnet werden. Diese Ergebnisse sind eventuell durch alternative mechanistische Pfade zu erklären, die nur im autogenen murinen System vorhanden sind [263].

6.3.2 Funktionale Untersuchung des Transmigrationsmechanismus humaner T Lymphozyten über murines Endothel

Im Anschluss an die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens humaner T Zellen erfolgte die Analyse der beteiligten Moleküle am Prozess der Transmigration in Transwell Transmigrations-Studien unter Einsatz von murinen bEND.3 und bEND.5 Endothelzellen. Die eingeschränkte Verfügbarkeit der primären murinen Lungen Endothelzellen erlaubte keinen Einsatz im Transwell Assay. Zwar konnte die Transmigration prinzipiell auch mit Hilfe des Flusskammer-Versuchsaufbaus induziert und untersucht werden, was eine kontinuierliche Untersuchung erlaubt hätte, jedoch war die Quantifizierung der transmigrierten Zellen gegenüber dem Transwell-Assay bedeutend schwieriger. Die Untersuchung erfolgte ebenfalls vergleichend sowohl für humane als auch murine T Zellen. Analog zu den bereits erzielten Ergebnissen wurde auch hier deutlich, dass die Transmigration humaner und muriner T Zellen über murines Endothel im Prinzip homolog verläuft. Die Blockade der auch zuvor als wichtig herausgestellten Interaktionen zwischen den Rezeptor-Liganden-Paaren VLA-4–VCAM-1 und LFA-1–ICAM-1 führte in beiden Spezies zu einer signifikanten Reduktion der Transmigrationsrate. Entgegen der zuvor erzielten Ergebnisse fiel dem Integrin-Liganden ICAM-2 (CD102) im Prozess der Transmigration eine einflussreichere Rolle zu – die Inhibition reduzierte die Transmigration in beiden Spezies signifikant, jedoch in geringerem Umfang als die Blockade des alternativen Liganden ICAM-1 (CD54). Im Vergleich zu den Ergebnissen der Adhäsionsstudien, bei denen der VLA-4–VCAM-1-Interaktion die größte Bedeutung zukam, scheinen bei der Transmigration beide Rezeptor-Liganden-Paare in gleichem Umfang beteiligt zu sein.

6.3.3 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich *in vitro* das Adhäsions- und Transmigrationsverhalten humaner T Zellen über murines Endothel analysiert und mit dem autogenen Verhalten muriner T Lymphozyten verglichen werden. Es existiert eine Vielzahl an Variablen, die Einfluss auf die Extravasation nehmen können. Dazu zählt z.B. die gewebliche Herkunft des untersuchten Endothels, der Aktivierungszustand der T Lymphozyten, die Expression von Chemokin-Rezeptoren sowie die Art und Präsenz von Chemokinen und Zytokinen (siehe Abschnitt 2.3). Aufgrund der starken Einschränkungen bei der Auswahl der jeweiligen Variablen können in der vorliegenden Arbeit nur grundsätzliche Aussagen bezüglich des Verhaltens humaner T Zellen bei der Transmigration über murines Endothel getroffen werden. Die erzielten Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass humane und murine T Zellen mechanistisch ähnlich über murines Endothel extravasieren. Für beide Spezies konnte ein Zusammenhang zwischen erfolgreicher Adhäsion und Transmigration und identischen Adhäsionsmolekülen auf zwei unterschiedlichen murinen Endothelzellen hergestellt werden. Dabei handelt es sich um die Rezeptor-Liganden-Paare VLA-4–VCAM-1 und LFA-1–ICAM-1. Deren dominante Rollen bei der Extravasation humaner T Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien und Geweben ist bereits hinlänglich dokumentiert [90, 118, 131, 272, 280]. Die weniger ausgeprägte Abhängigkeit der Adhäsion muriner T Zellen von einzelnen Adhäsionsmolekülen könnte ein Hinweis darauf sein, dass im autogenen System zusätzliche, alternativ nutzbare Pfade existieren, die den humanen T Zellen verschlossen bleiben. Alternativ können auch die strukturellen Unterschiede zwischen humanen und murinen Adhäsionsmolekülen eine Rolle spielen [282-286].

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Lowenberg, B., J.R. Downing, and A. Burnett, *Acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. **341**(14): p. 1051-62.
2. Ferrara, J.L. and H.J. Deeg, *Graft-versus-host disease*. N Engl J Med, 1991. **324**(10): p. 667-74.
3. Soiffer, R.J., et al., *Impact of immune modulation with anti-T cell antibodies on outcomes of reduced intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies*. Blood, 2011.
4. Ailles, L.E., et al., *Growth characteristics of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate malignant hematopoiesis in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1761-72.
5. Bonnet, D., *In vivo evaluation of leukemic stem cells through the xenotransplantation model*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2008. **Chapter 3**: p. Unit 3 2.
6. Ehninger, G., *Akute myeloische Leukämie*. 2008: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH.
7. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
8. Bennett, J.M., et al., *Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group*. Ann Intern Med, 1985. **103**(3): p. 460-2.
9. Bennett, J.M., et al., *Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO)*. Br J Haematol, 1991. **78**(3): p. 325-9.
10. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2292-302.
11. Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Vardiman, J.W., *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. IARC Press, Lyon. 2001. 168-170.
12. Redaelli, A., et al., *Epidemiology and clinical burden of acute myeloid leukemia*. Expert Rev Anticancer Ther, 2003. **3**(5): p. 695-710.
13. Sandler, D.P. and J.A. Ross, *Epidemiology of acute leukemia in children and adults*. Semin Oncol, 1997. **24**(1): p. 3-16.
14. Deschler, B. and M. Lubbert, *Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology*. Cancer, 2006. **107**(9): p. 2099-107.
15. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
16. Bhatia, S. and J.P. Neglia, *Epidemiology of childhood acute myelogenous leukemia*. J Pediatr Hematol Oncol, 1995. **17**(2): p. 94-100.
17. Hellenbrecht A, M.N., Gokbuget N. *Häufigkeit von Leukämien bei Erwachsenen in Deutschland*. 2003 [cited; Available from: http://www.kompetentnetz-leukaemie.de/kn_home/InfoAerzte/epidemiologie.htm].
18. Tallman, M.S., D.G. Gilliland, and J.M. Rowe, *Drug therapy for acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1154-63.
19. Goldstone, A.H., et al., *Attempts to improve treatment outcomes in acute myeloid leukemia (AML) in older patients: the results of the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1302-11.
20. Erba, H.P., *Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007: p. 420-8.
21. Shipley, J.L. and J.N. Butera, *Acute myelogenous leukemia*. Exp Hematol, 2009. **37**(6): p. 649-58.
22. Ries, L. *SEER Cancer statistics review 1975-2003*. 2006 [cited; Available from: http://seer.cancer.gov/1975_2003].

23. Zipursky, A., et al., *Myelodysplasia and acute megakaryoblastic leukemia in Down's syndrome*. Leuk Res, 1994. **18**(3): p. 163-71.
24. Smith, M.T., et al., *Benzene, the exposome and future investigations of leukemia etiology*. Chem Biol Interact, 2011.
25. Passegue, E., et al., *Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11842-9.
26. Lane, S.W. and D.G. Gilliland, *Leukemia stem cells*. Semin Cancer Biol, 2009. **20**(2): p. 71-6.
27. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. **81**(11): p. 2844-53.
28. Lorenz, E., et al., *Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections*. J Natl Cancer Inst, 1951. **12**(1): p. 197-201.
29. Till, J.E. and C.E. Mc, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiat Res, 1961. **14**: p. 213-22.
30. Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. **197**: p. 452-4.
31. Lemischka, I.R., D.H. Raulet, and R.C. Mulligan, *Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells*. Cell, 1986. **45**(6): p. 917-27.
32. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.
33. Li, L. and T. Xie, *Stem cell niche: structure and function*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 605-31.
34. Yin, T. and L. Li, *The stem cell niches in bone*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1195-201.
35. Oguro, H. and A. Iwama, *Life and death in hematopoietic stem cells*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(5): p. 503-9.
36. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-44.
37. Park, C.H., D.E. Bergsagel, and E.A. McCulloch, *Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay*. J Natl Cancer Inst, 1971. **46**(2): p. 411-22.
38. Wodinsky, I., J. Swiniarski, and C.J. Kensler, *Spleen colony studies of leukemia L1210. 3. Differential sensitivities of normal hematopoietic and resistant L1210 colony-forming cells to 6-mercaptopurine (NSC-755)*. Cancer Chemother Rep, 1968. **52**(2): p. 251-5.
39. Blair, A., et al., *Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3104-12.
40. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
41. Miyoshi, H., et al., *t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10431-4.
42. Downing, J.R., et al., *Alterations of the AML1 transcription factor in human leukemia*. Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(5): p. 347-60.
43. Miyamoto, T., et al., *Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia*. Blood, 1996. **87**(11): p. 4789-96.
44. Turhan, A.G., et al., *Highly purified primitive hematopoietic stem cells are PML-RARA negative and generate nonclonal progenitors in acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1995. **85**(8): p. 2154-61.
45. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 645-8.

46. Mrozek, K., N.A. Heerema, and C.D. Bloomfield, *Cytogenetics in acute leukemia*. Blood Rev, 2004. **18**(2): p. 115-36.
47. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2009. **115**(3): p. 453-74.
48. Mrozek, K., *Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype*. Semin Oncol, 2008. **35**(4): p. 365-77.
49. Zhu, J. and S.G. Emerson, *Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3295-313.
50. Alcalay, M., et al., *Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5680-94.
51. Tenen, D.G., *Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(2): p. 89-101.
52. Licht, J.D. and D.W. Sternberg, *The molecular pathology of acute myeloid leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2005: p. 137-42.
53. Chan, P.M., *Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model*. Protein Cell, 2011.
54. Zheng, R. and D. Small, *Mutant FLT3 signaling contributes to a block in myeloid differentiation*. Leuk Lymphoma, 2005. **46**(12): p. 1679-87.
55. Renneville, A., et al., *Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature*. Leukemia, 2008. **22**(5): p. 915-31.
56. Delia, D., et al., *bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells*. Blood, 1992. **79**(5): p. 1291-8.
57. Packham, G., et al., *Selective regulation of Bcl-XL by a Jak kinase-dependent pathway is bypassed in murine hematopoietic malignancies*. Genes Dev, 1998. **12**(16): p. 2475-87.
58. Tourneur, L., et al., *Absence or low expression of fas-associated protein with death domain in acute myeloid leukemia cells predicts resistance to chemotherapy and poor outcome*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 8101-8.
59. Grimwade, D., et al., *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2322-33.
60. Betz, B.L. and J.L. Hess, *Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century*. Arch Pathol Lab Med, 2010. **134**(10): p. 1427-33.
61. Falini, B., et al., *Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications*. Leukemia, 2009. **23**(10): p. 1731-43.
62. Pabst, T., et al., *Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia*. Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 263-70.
63. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells*. Blood, 1993. **82**(4): p. 1110-9.
64. Rosnet, O., et al., *Close physical linkage of the FLT1 and FLT3 genes on chromosome 13 in man and chromosome 5 in mouse*. Oncogene, 1993. **8**(1): p. 173-9.
65. Sheikhha, M.H., et al., *Prognostic significance of FLT3 ITD and D835 mutations in AML patients*. Hematol J, 2003. **4**(1): p. 41-6.
66. Stirewalt, D.L. and J.P. Radich, *The role of FLT3 in haematopoietic malignancies*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(9): p. 650-65.
67. Nakao, M., et al., *Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 1996. **10**(12): p. 1911-8.
68. Stirewalt, D.L., et al., *FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3589-95.

69. Abu-Duhier, F.M., et al., *FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group*. Br J Haematol, 2000. **111**(1): p. 190-5.
70. Thiede, C., et al., *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4326-35.
71. Yamamoto, Y., et al., *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2434-9.
72. Carow, C.E., et al., *Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias*. Blood, 1996. **87**(3): p. 1089-96.
73. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells*. Leukemia, 1996. **10**(2): p. 238-48.
74. Lyman, S.D., et al., *Plasma/serum levels of flt3 ligand are low in normal individuals and highly elevated in patients with Fanconi anemia and acquired aplastic anemia*. Blood, 1995. **86**(11): p. 4091-6.
75. Zhang, S., C. Mantel, and H.E. Broxmeyer, *Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(3): p. 372-80.
76. Zhang, S. and H.E. Broxmeyer, *Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(1): p. 195-9.
77. Hayakawa, F., et al., *Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines*. Oncogene, 2000. **19**(5): p. 624-31.
78. Lisovsky, M., et al., *Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3987-97.
79. Cheson, B.D., et al., *Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 1990. **8**(5): p. 813-9.
80. Cheson, B.D., et al., *Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia*. J Clin Oncol, 2003. **21**(24): p. 4642-9.
81. Kimby, E., P. Nygren, and B. Glimelius, *A systematic overview of chemotherapy effects in acute myeloid leukaemia*. Acta Oncol, 2001. **40**(2-3): p. 231-52.
82. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood. **115**(3): p. 453-74.
83. Riva, C.M., Y.M. Rustum, and H.D. Preisler, *Pharmacokinetics and cellular determinants of response to 1-beta-arabinofuranosylcytosine (ara-C)*. Semin Oncol, 1985. **12**(2 Suppl 3): p. 1-8.
84. Booser, D.J. and G.N. Hortobagyi, *Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance*. Drugs, 1994. **47**(2): p. 223-58.
85. Ambudkar, S.V., et al., *Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 361-98.
86. Ross, D.D., *Novel mechanisms of drug resistance in leukemia*. Leukemia, 2000. **14**(3): p. 467-73.
87. Rowe, J.M., *Optimal induction and post-remission therapy for AML in first remission*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 396-405.
88. Alt, F.W., et al., *VDJ recombination*. Immunol Today, 1992. **13**(8): p. 306-14.
89. Holtmeier, W. and D. Kabelitz, *gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses*. Chem Immunol Allergy, 2005. **86**: p. 151-83.

90. Murphy, K.T.P.W., M., *Janeway's Immunobiology*. Seventh Edition ed. 2008: Garland Science.
91. Rabb, H., *The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney*. *Kidney Int*, 2002. **61**(6): p. 1935-46.
92. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
93. Horton, R., et al., *Gene map of the extended human MHC*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(12): p. 889-99.
94. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. First of two parts*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(10): p. 702-9.
95. Payne, R., et al., *A New Leukocyte Isoantigen System in Man*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1964. **29**: p. 285-95.
96. Colombani, J. and J. Dausset, [*Statistical Study of Leukocytic Iso-Antigens. Relation between Skin Graft Tolerance and the Leukocyte Formulas of Donors and Recipients*]. *Bibl Haematol*, 1964. **19**: p. 405-11.
97. Gonzalez-Galarza, F.F., et al., *Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **39**(Database issue): p. D913-9.
98. Mungall, A.J., et al., *The DNA sequence and analysis of human chromosome 6*. *Nature*, 2003. **425**(6960): p. 805-11.
99. Bjorkman, P.J., et al., *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*. *Nature*, 1987. **329**(6139): p. 506-12.
100. Jones, E.Y., *MHC class I and class II structures*. *Curr Opin Immunol*, 1997. **9**(1): p. 75-9.
101. Brown, J.H., et al., *Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1*. *Nature*, 1993. **364**(6432): p. 33-9.
102. Schafer, P.H., S.K. Pierce, and T.S. Jardetzky, *The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers*. *Semin Immunol*, 1995. **7**(6): p. 389-98.
103. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 975-1028.
104. Cresswell, P., *Assembly, transport, and function of MHC class II molecules*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 259-93.
105. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. *Lancet*, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
106. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(2): p. 108-17.
107. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 111-35.
108. Holter, W., et al., *The role of CD2 as a regulator of human T-cell cytokine production*. *Immunol Rev*, 1996. **153**: p. 107-22.
109. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, *CD28/B7 system of T cell costimulation*. *Annu Rev Immunol*, 1996. **14**: p. 233-58.
110. Wingren, A.G., et al., *T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles*. *Crit Rev Immunol*, 1995. **15**(3-4): p. 235-53.
111. Bluestone, J.A., *Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance?* *J Immunol*, 1997. **158**(5): p. 1989-93.
112. McCoy, K.D. and G. Le Gros, *The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses*. *Immunol Cell Biol*, 1999. **77**(1): p. 1-10.
113. Obhrai, J.S., et al., *Effector T cell differentiation and memory T cell maintenance outside secondary lymphoid organs*. *J Immunol*, 2006. **176**(7): p. 4051-8.
114. Seder, R.A. and R. Ahmed, *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(9): p. 835-42.

115. Jameson, S.C. and D. Masopust, *Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches*. *Immunity*, 2009. **31**(6): p. 859-71.
116. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 745-63.
117. Hamann, A. and U. Syrbe, *T-cell trafficking into sites of inflammation*. *Rheumatology (Oxford)*, 2000. **39**(7): p. 696-9.
118. Marelli-Berg, F.M., et al., *The highway code of T cell trafficking*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p. 179-89.
119. Rosen, S.D., *Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 129-56.
120. Sperandio, M., *Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo*. *FEBS J*, 2006. **273**(19): p. 4377-89.
121. McEver, R.P. and C. Zhu, *Rolling cell adhesion*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009. **26**: p. 363-96.
122. Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Structural basis of integrin regulation and signaling*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 619-47.
123. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. *Cell*, 1992. **69**(1): p. 11-25.
124. Pribila, J.T., et al., *Integrins and T cell-mediated immunity*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 157-80.
125. Kinashi, T., *Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(7): p. 546-59.
126. Tuckwell, D.S. and M.J. Humphries, *Molecular and cellular biology of integrins*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1993. **15**(2): p. 149-71.
127. Chen, J., A. Salas, and T.A. Springer, *Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster*. *Nat Struct Biol*, 2003. **10**(12): p. 995-1001.
128. Hordijk, P.L., *Endothelial signalling events during leukocyte transmigration*. *FEBS J*, 2006. **273**(19): p. 4408-15.
129. van Buul, J.D. and P.L. Hordijk, *Endothelial signalling by Ig-like cell adhesion molecules*. *Transfus Clin Biol*, 2008. **15**(1-2): p. 3-6.
130. Smith, C.W., 3. *Adhesion molecules and receptors*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(2 Suppl): p. S375-9; quiz S414.
131. Elangbam, C.S., C.W. Qualls, Jr., and R.R. Dahlgren, *Cell adhesion molecules--update*. *Vet Pathol*, 1997. **34**(1): p. 61-73.
132. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 787-820.
133. Miyasaka, M. and T. Tanaka, *Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(5): p. 360-70.
134. Wurbel, M.A., B. Malissen, and J.J. Campbell, *Complex regulation of CCR9 at multiple discrete stages of T cell development*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(1): p. 73-81.
135. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(9): p. 678-89.
136. Marshall, B.T., et al., *Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules*. *Nature*, 2003. **423**(6936): p. 190-3.
137. Lawrence, M.B., et al., *Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E)*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(3): p. 717-27.
138. Laudanna, C. and R. Alon, *Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes*. *Thromb Haemost*, 2006. **95**(1): p. 5-11.
139. Shulman, Z., et al., *Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin*. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 384-96.

140. Millan, J. and A.J. Ridley, *Rho GTPases and leucocyte-induced endothelial remodelling*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 2): p. 329-37.
141. Thomas, E.D., et al., *Bone-marrow transplantation (second of two parts)*. N Engl J Med, 1975. **292**(17): p. 895-902.
142. Thomas, E.D., et al., *Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man*. J Clin Invest, 1959. **38**: p. 1709-16.
143. Buchholz, S. and A. Ganser, [*Hematopoietic stem cell transplantation. Indications, foundations and perspective*]. Internist (Berl), 2009. **50**(5): p. 572-80.
144. Zittoun, R.A., et al., *Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups*. N Engl J Med, 1995. **332**(4): p. 217-23.
145. Fefer, A., et al., *Graft versus leukemia effect in man: the relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic marrow transplantation*. Prog Clin Biol Res, 1987. **244**: p. 401-8.
146. Champlin, R., et al., *Harnessing graft-versus-malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy*. Br J Haematol, 2000. **111**(1): p. 18-29.
147. Gupta, V., M.S. Tallman, and D.J. Weisdorf, *Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns*. Blood, 2010. **117**(8): p. 2307-18.
148. Sorrow, M.L., et al., *Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities*. Blood, 2004. **104**(4): p. 961-8.
149. Diaconescu, R., et al., *Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared with myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA-matched related donors*. Blood, 2004. **104**(5): p. 1550-8.
150. Canals, C., et al., *Strategies to reduce transplant-related mortality after allogeneic stem cell transplantation in elderly patients: Comparison of reduced-intensity conditioning and unmanipulated peripheral blood stem cells vs a myeloablative regimen and CD34+ cell selection*. Exp Hematol, 2003. **31**(11): p. 1039-43.
151. Horowitz, M.M., et al., *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation*. Blood, 1990. **75**(3): p. 555-62.
152. Shelburne, N. and M. Bevans, *Non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Semin Oncol Nurs, 2009. **25**(2): p. 120-8.
153. Rezvani, A.R. and R.F. Storb, *Separation of graft-vs.-tumor effects from graft-vs.-host disease in allogeneic hematopoietic cell transplantation*. J Autoimmun, 2008. **30**(3): p. 172-9.
154. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
155. Appelbaum, F.R., *The current status of hematopoietic cell transplantation*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 491-512.
156. Bleakley, M. and S.R. Riddell, *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 371-80.
157. Vogelsang, G.B., L. Lee, and D.M. Bensen-Kennedy, *Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 29-52.
158. Barnes, D.W. and J.F. Loutit, *Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II*. Br J Haematol, 1957. **3**(3): p. 241-52.
159. Gale, R.P. and R.E. Champlin, *How does bone-marrow transplantation cure leukaemia?* Lancet, 1984. **2**(8393): p. 28-30.
160. Fefer, A., M.A. Cheever, and P.D. Greenberg, *Identical-twin (syngeneic) marrow transplantation for hematologic cancers*. J Natl Cancer Inst, 1986. **76**(6): p. 1269-73.

161. Champlin, R.E. and R.P. Gale, *Role of bone marrow transplantation in the treatment of hematologic malignancies and solid tumors: critical review of syngeneic, autologous, and allogeneic transplants*. Cancer Treat Rep, 1984. **68**(1): p. 145-61.
162. Marmont, A.M., et al., *T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia*. Blood, 1991. **78**(8): p. 2120-30.
163. Collins, R.H., Jr., et al., *Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation*. J Clin Oncol, 1997. **15**(2): p. 433-44.
164. Apperley, J.F., et al., *Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse*. Bone Marrow Transplant, 1986. **1**(1): p. 53-66.
165. Atkinson, K., et al., *A comparative study of T-cell depleted and non-depleted marrow transplantation for hematological malignancy*. Aust N Z J Med, 1987. **17**(1): p. 16-23.
166. Maraninchi, D., et al., *Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias*. Lancet, 1987. **2**(8552): p. 175-8.
167. Kolb, H.J., et al., *Adoptive immunotherapy in canine chimeras*. Transplantation, 1997. **63**(3): p. 430-6.
168. Kolb, H.J., et al., *Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2462-5.
169. Slavin, S., et al., *Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2195-204.
170. Weiden, P.L., et al., *Infusion of donor lymphocytes into stable canine radiation chimeras: implications for mechanism of transplantation tolerance*. J Immunol, 1976. **116**(5): p. 1212-9.
171. Kolb, H.J., *Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4371-83.
172. Talmadge, J.E., *Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(8): p. 1121-43.
173. Steer, H.J., et al., *Harnessing the immune response to treat cancer*. Oncogene, 2010. **29**(48): p. 6301-13.
174. Reichert, J.M., et al., *Monoclonal antibody successes in the clinic*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(9): p. 1073-8.
175. Heslop, H.E., et al., *Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients*. Blood, 2009. **115**(5): p. 925-35.
176. Leen, A.M., et al., *Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1160-6.
177. Riddell, S.R., et al., *Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones*. Science, 1992. **257**(5067): p. 238-41.
178. Porter, D.L., et al., *Adoptive immunotherapy with donor mononuclear cell infusions to treat relapse of acute leukemia or myelodysplasia after allogeneic bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1996. **18**(5): p. 975-80.
179. Schmid, C., et al., *Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party*. J Clin Oncol, 2007. **25**(31): p. 4938-45.
180. Van Driessche, A., et al., *Antigen-specific cellular immunotherapy of leukemia*. Leukemia, 2005. **19**(11): p. 1863-71.
181. Smits, E.L., Z.N. Berneman, and V.F. Van Tendeloo, *Immunotherapy of acute myeloid leukemia: current approaches*. Oncologist, 2009. **14**(3): p. 240-52.

182. Akatsuka, Y., et al., *Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions*. *Cancer Sci*, 2007. **98**(8): p. 1139-46.
183. Bonnet, D., et al., *CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(15): p. 8639-44.
184. Falkenburg, J.H., et al., *Growth inhibition of clonogenic leukemic precursor cells by minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes*. *J Exp Med*, 1991. **174**(1): p. 27-33.
185. Distler, E., et al., *Acute myeloid leukemia (AML)-reactive cytotoxic T lymphocyte clones rapidly expanded from CD8(+) CD62L((high)+) T cells of healthy donors prevent AML engraftment in NOD/SCID IL2Rgamma(null) mice*. *Exp Hematol*, 2008. **36**(4): p. 451-63.
186. Berger, C., et al., *Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(2): p. 224-32.
187. Albrecht, J., et al., *IL-21-treated naive CD45RA+ CD8+ T cells represent a reliable source for producing leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes with high proliferative potential and early differentiation phenotype*. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. **60**(2): p. 235-48.
188. Ohminami, H., M. Yasukawa, and S. Fujita, *HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide*. *Blood*, 2000. **95**(1): p. 286-93.
189. Eljaafari, A., et al., *Generation of helper and cytotoxic CD4+T cell clones specific for the minor histocompatibility antigen H-Y, after in vitro priming of human T cells by HLA-identical monocyte-derived dendritic cells*. *Transplantation*, 2001. **71**(10): p. 1449-55.
190. Amrolia, P.J., et al., *Allorestricted cytotoxic T cells specific for human CD45 show potent antileukemic activity*. *Blood*, 2003. **101**(3): p. 1007-14.
191. Thomas, S., H.J. Stauss, and E.C. Morris, *Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer*. *Immunology*, 2010. **129**(2): p. 170-7.
192. Leen, A.M., C.M. Rooney, and A.E. Foster, *Improving T cell therapy for cancer*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 243-65.
193. Gattinoni, L., et al., *Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(6): p. 1616-26.
194. Bosma, G.C., R.P. Custer, and M.J. Bosma, *A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse*. *Nature*, 1983. **301**(5900): p. 527-30.
195. Mosier, D.E., et al., *Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency*. *Nature*, 1988. **335**(6187): p. 256-9.
196. Kikutani, H. and S. Makino, *The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains*. *Adv Immunol*, 1992. **51**: p. 285-322.
197. Makino, S., et al., *Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice*. *Jikken Dobutsu*, 1980. **29**(1): p. 1-13.
198. Anderson, M.S. and J.A. Bluestone, *The NOD mouse: a model of immune dysregulation*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 447-85.
199. Shultz, L.D., et al., *Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice*. *J Immunol*, 1995. **154**(1): p. 180-91.
200. Ito, M., et al., *NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells*. *Blood*, 2002. **100**(9): p. 3175-82.
201. Shultz, L.D., et al., *Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells*. *J Immunol*, 2005. **174**(10): p. 6477-89.
202. Traggiai, E., et al., *Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice*. *Science*, 2004. **304**(5667): p. 104-7.

203. Ishii, N., et al., *Impairment of ligand binding and growth signaling of mutant IL-2 receptor gamma-chains in patients with X-linked severe combined immunodeficiency*. J Immunol, 1994. **153**(3): p. 1310-7.
204. Agliano, A., et al., *Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains*. Int J Cancer, 2008. **123**(9): p. 2222-7.
205. Sanchez, P.V., et al., *A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2009. **23**(11): p. 2109-17.
206. Faber, L.M., et al., *Generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte clones from the HLA-identical bone marrow donor of a patient with leukemia*. J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1283-9.
207. Barbui, A.M., et al., *Clinical grade expansion of CD45RA, CD45RO, and CD62L-positive T-cell lines from HLA-compatible donors: high cytotoxic potential against AML and ALL cells*. Exp Hematol, 2006. **34**(4): p. 475-85.
208. Falkenburg, J.H., et al., *Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes*. Blood, 1999. **94**(4): p. 1201-8.
209. Hauzenberger, E., et al., *Porcine endothelium supports transendothelial migration of human leukocyte subpopulations: anti-porcine vascular cell adhesion molecule antibodies as species-specific blockers of transendothelial monocyte and natural killer cell migration*. Transplantation, 2000. **69**(9): p. 1837-49.
210. Brown, M. and C. Wittwer, *Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology*. Clin Chem, 2000. **46**(8 Pt 2): p. 1221-9.
211. Horan, P.K. and S.E. Slezak, *Stable cell membrane labelling*. Nature, 1989. **340**(6229): p. 167-8.
212. Greiner, D.L., R.A. Hesselton, and L.D. Shultz, *SCID mouse models of human stem cell engraftment*. Stem Cells, 1998. **16**(3): p. 166-77.
213. Cheifetz, S., et al., *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19027-30.
214. Lapidot, T., Y. Fajerman, and O. Kollet, *Immune-deficient SCID and NOD/SCID mice models as functional assays for studying normal and malignant human hematopoiesis*. J Mol Med, 1997. **75**(9): p. 664-73.
215. Nijmeijer, B.A., R. Willemze, and J.H. Falkenburg, *An animal model for human cellular immunotherapy: specific eradication of human acute lymphoblastic leukemia by cytotoxic T lymphocytes in NOD/scid mice*. Blood, 2002. **100**(2): p. 654-60.
216. Bonnet, D., et al., *Cytokine treatment or accessory cells are required to initiate engraftment of purified primitive human hematopoietic cells transplanted at limiting doses into NOD/SCID mice*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(3): p. 203-9.
217. Terpstra, W., et al., *Facilitated engraftment of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient mice following a single injection of Cl2MDP liposomes*. Leukemia, 1997. **11**(7): p. 1049-54.
218. Feuring-Buske, M., et al., *Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2-microglobulin-deficient NOD/SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors*. Leukemia, 2003. **17**(4): p. 760-3.
219. Ishikawa, F., et al., *Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1565-73.
220. Ishikawa, F., et al., *Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(11): p. 1315-21.
221. Sarry, J.E., et al., *Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgammac-deficient mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(1): p. 384-95.
222. Shultz, L.D., F. Ishikawa, and D.L. Greiner, *Humanized mice in translational biomedical research*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 118-30.

223. Rombouts, W.J., A.C. Martens, and R.E. Ploemacher, *Identification of variables determining the engraftment potential of human acute myeloid leukemia in the immunodeficient NOD/SCID human chimera model*. *Leukemia*, 2000. **14**(5): p. 889-97.
224. Rombouts, W.J., et al., *Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the *Flt3* gene*. *Leukemia*, 2000. **14**(4): p. 675-83.
225. Lumkul, R., et al., *Human AML cells in NOD/SCID mice: engraftment potential and gene expression*. *Leukemia*, 2002. **16**(9): p. 1818-26.
226. Levis, M., et al., *Internal tandem duplications of the *FLT3* gene are present in leukemia stem cells*. *Blood*, 2005. **106**(2): p. 673-80.
227. Pearce, D.J., et al., *AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML*. *Blood*, 2006. **107**(3): p. 1166-73.
228. Witte, K.E., et al., *High proportion of leukemic stem cells at diagnosis is correlated with unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia*. *Pediatr Hematol Oncol*, 2011. **28**(2): p. 91-9.
229. Blair, A., D.E. Hogge, and H.J. Sutherland, *Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR*. *Blood*, 1998. **92**(11): p. 4325-35.
230. Hosen, N., et al., *CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(26): p. 11008-13.
231. Jin, L., et al., *Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2009. **5**(1): p. 31-42.
232. Jin, L., et al., *Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells*. *Nat Med*, 2006. **12**(10): p. 1167-74.
233. Majeti, R., et al., *CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells*. *Cell*, 2009. **138**(2): p. 286-99.
234. Kikushige, Y., et al., *TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(6): p. 708-17.
235. Kong, Y., et al., *CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL*. *Leukemia*, 2008. **22**(6): p. 1207-13.
236. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. *Nature*, 1996. **382**(6592): p. 635-8.
237. Nagasawa, T., *A chemokine, SDF-1/PBSF, and its receptor, CXC chemokine receptor 4, as mediators of hematopoiesis*. *Int J Hematol*, 2000. **72**(4): p. 408-11.
238. Peled, A., et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*. *Science*, 1999. **283**(5403): p. 845-8.
239. Voermans, C., et al., *In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation*. *Blood*, 2001. **97**(3): p. 799-804.
240. Mohle, R., et al., *The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1*. *Blood*, 1998. **91**(12): p. 4523-30.
241. Mohle, R., et al., *Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2000. **110**(3): p. 563-72.
242. Voermans, C., et al., *Migratory behavior of leukemic cells from acute myeloid leukemia patients*. *Leukemia*, 2002. **16**(4): p. 650-7.
243. Rombouts, E.J., et al., *Relation between CXCR-4 expression, *Flt3* mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2004. **104**(2): p. 550-7.
244. Monaco, G., et al., *Engraftment of acute myeloid leukemia in NOD/SCID mice is independent of CXCR4 and predicts poor patient survival*. *Stem Cells*, 2004. **22**(2): p. 188-201.

245. Smit, W.M., et al., *Generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes from HLA-identical donors of patients with chronic myeloid leukemia using modifications of a limiting dilution assay*. Bone Marrow Transplant, 1998. **21**(6): p. 553-60.
246. Daudt, L., et al., *Interleukin-15 favors the expansion of central memory CD8+ T cells in ex vivo generated, antileukemia human cytotoxic T lymphocyte lines*. J Immunother, 2008. **31**(4): p. 385-93.
247. Jedema, I., et al., *Successful generation of primary virus-specific and anti-tumor T cell responses from the naive donor T-cell repertoire is determined by the balance between antigen-specific precursor T cells and regulatory T cells*. Haematologica, 2011.
248. Montagna, D., et al., *Single-cell cloning of human, donor-derived antileukemia T-cell lines for in vitro separation of graft-versus-leukemia effect from graft-versus-host reaction*. Cancer Res, 2006. **66**(14): p. 7310-6.
249. Montagna, D., et al., *Generation and ex vivo expansion of cytotoxic T lymphocytes directed toward different types of leukemia or myelodysplastic cells using both HLA-matched and partially matched donors*. Exp Hematol, 2003. **31**(11): p. 1031-8.
250. Montagna, D., et al., *Ex vivo generation and expansion of anti-tumor cytotoxic T-cell lines derived from patients or their HLA-identical sibling*. Int J Cancer, 2004. **110**(1): p. 76-86.
251. Marijt, E., et al., *Phase I/II feasibility study evaluating the generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte lines for treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation*. Haematologica, 2007. **92**(1): p. 72-80.
252. Klebanoff, C.A., et al., *Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9571-6.
253. Loiseau, P., et al., *HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(8): p. 965-74.
254. Kawase, T., et al., *HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: implications for the molecular mechanism*. Blood, 2009. **113**(12): p. 2851-8.
255. Nijmeijer, B.A., et al., *Responses to donor lymphocyte infusion for acute lymphoblastic leukemia may be determined by both qualitative and quantitative limitations of antileukemic T-cell responses as observed in an animal model for human leukemia*. Exp Hematol, 2005. **33**(10): p. 1172-81.
256. Landmeier, S., et al., *Cytotoxic T cells transduced with chimeric anti-CD19 receptors prevent engraftment of primary lymphoblastic leukemia in vivo*. Leukemia, 2010. **24**(5): p. 1080-4.
257. Hambach, L., et al., *Human cytotoxic T lymphocytes specific for a single minor histocompatibility antigen HA-1 are effective against human lymphoblastic leukaemia in NOD/scid mice*. Leukemia, 2006. **20**(2): p. 371-4.
258. Breart, B., et al., *Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1390-7.
259. Sun, J.C., M.A. Williams, and M.J. Bevan, *CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection*. Nat Immunol, 2004. **5**(9): p. 927-33.
260. Wang, X., et al., *Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice*. Blood. **117**(6): p. 1888-98.
261. Brenner, D., P.H. Krammer, and R. Arnold, *Concepts of activated T cell death*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. **66**(1): p. 52-64.
262. Macchiarini, F., et al., *Humanized mice: are we there yet?* J Exp Med, 2005. **202**(10): p. 1307-11.
263. Etzioni, A., C.M. Doerschuk, and J.M. Harlan, *Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies*. Blood, 1999. **94**(10): p. 3281-8.

264. Schneider, M.K., et al., *Human leukocyte transmigration across Galalpha(1,3)Gal-negative porcine endothelium is regulated by human CD18 and CD99*. *Transplantation*, 2009. **87**(4): p. 491-9.
265. Robinson, L.A., et al., *The role of adhesion molecules in human leukocyte attachment to porcine vascular endothelium: implications for xenotransplantation*. *J Immunol*, 1998. **161**(12): p. 6931-8.
266. Bistrrian, R., et al., *Shear stress-mediated adhesion of acute myeloid leukemia and KG-1 cells to endothelial cells involves functional P-selectin*. *Stem Cells Dev*, 2009. **18**(8): p. 1235-42.
267. Hintze, C., et al., *Erythrocytic precursor cells show potent shear stress resistant adhesion and home to hematopoietic tissue in vivo*. *Transfusion*, 2009. **49**(10): p. 2122-30.
268. Ruster, B., et al., *Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells*. *Blood*, 2006. **108**(12): p. 3938-44.
269. Henninger, D.D., et al., *Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse*. *J Immunol*, 1997. **158**(4): p. 1825-32.
270. Rothlein, R., et al., *A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1*. *J Immunol*, 1986. **137**(4): p. 1270-4.
271. Staunton, D.E., M.L. Dustin, and T.A. Springer, *Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1*. *Nature*, 1989. **339**(6219): p. 61-4.
272. Dustin, M.L. and T.A. Springer, *Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells*. *J Cell Biol*, 1988. **107**(1): p. 321-31.
273. Takada, Y., J.L. Strominger, and M.E. Hemler, *The very late antigen family of heterodimers is part of a superfamily of molecules involved in adhesion and embryogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(10): p. 3239-43.
274. Bevilacqua, M.P., et al., *Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(24): p. 9238-42.
275. Pober, J.S., *Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Physiology and pathology*. *Am J Pathol*, 1988. **133**(3): p. 426-33.
276. Barks, J.L., J.J. McQuillan, and M.F. Iademarco, *TNF-alpha and IL-4 synergistically increase vascular cell adhesion molecule-1 expression in cultured vascular smooth muscle cells*. *J Immunol*, 1997. **159**(9): p. 4532-8.
277. DeGrendele, H.C., et al., *CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation*. *J Immunol*, 1997. **159**(6): p. 2549-53.
278. Immenschuh, S., et al., *Transcriptional induction of junctional adhesion molecule-C gene expression in activated T cells*. *J Leukoc Biol*, 2009. **85**(5): p. 796-803.
279. Johnson, P. and B. Ruffell, *CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009. **8**(3): p. 208-20.
280. Greenwood, J., Y. Wang, and V.L. Calder, *Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1*. *off. Immunology*, 1995. **86**(3): p. 408-15.
281. Lim, Y.C., et al., *Heterogeneity of endothelial cells from different organ sites in T-cell subset recruitment*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(5): p. 1591-601.
282. Hession, C., et al., *Cloning of murine and rat vascular cell adhesion molecule-1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **183**(1): p. 163-9.
283. Horley, K.J., et al., *Molecular cloning of murine intercellular adhesion molecule (ICAM-1)*. *EMBO J*, 1989. **8**(10): p. 2889-96.
284. Neuhaus, H., et al., *Cloning and expression of cDNAs for the alpha subunit of the murine lymphocyte-Peyer's patch adhesion molecule*. *J Cell Biol*, 1991. **115**(4): p. 1149-58.
285. Shuster, D.E., B.T. Bosworth, and M.E. Kehrli, Jr., *Sequence of the bovine CD18-encoding cDNA: comparison with the human and murine glycoproteins*. *Gene*, 1992. **114**(2): p. 267-71.

286. Xu, H., et al., *Characterization of murine intercellular adhesion molecule-2*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4909-14.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	<i>antigen presenting cell</i> , Antigen präsentierende Zelle
APML	Akute promyelozytäre Leukämie
AS	Aminosäure
B-LCL	<i>B-lymphoblastoid cell line</i> , B-lymphoblastoide Zelllinie
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i> , gemeinsamer lymphoider Vorläufer
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMP	<i>common myeloid progenitor</i> , gemeinsamer myeloider Vorläufer
CRP	C-reaktives Protein
CTL	<i>cytotoxic t lymphocyte</i> , zytotoxische T Zelle
DLI	Donor Lymphozyten Infusion
DC	<i>dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ECM	<i>extracellular matrix</i> , Extrazellulär-Matrix
FAB	Französisch-Amerikanisch-Britisch
FIt3	<i>fms-like tyrosine kinase receptor-3</i>
GPCR	<i>g protein coupled receptor</i> , G-Protein gekoppelter Rezeptor
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i> , Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung
GvL	<i>Graft-versus-leukemia</i> , Transplantat-gegen-Leukämie
HEV	<i>high endothelial venules</i> , hohe endotheliale Venulen
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , humans Leukozyten Antigen
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> , hämatopoetischen Stammzelle

HSCT	<i>hematopoetic stem cell transplantation</i> , hämatopoetische Stammzell-Transplantation
IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin g
ITD	Interne Tandem-Duplikation
LAA	Leukämie-assoziiertes Antigen
LSC	<i>leukemic stem cell</i> , leukämische Stammzelle
LDH	Laktatdehydrogenase
LT-HSC	<i>long term HSC</i> , langzeit HSC
mAb	<i>monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
mHAg	<i>minor histocompatibility antigen</i> , minor Histokompatibilitäts-Antigen
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
MLLC	<i>mixed lymphocyte leukemia culture</i> , gemischte Lymphozyten-Leukämie-Kultur
MRD	<i>minimal residual disease</i> , minimale Resterkrankung
MSC	<i>mesenchymal stroma cell</i> , mesenchymale Stromazelle
NPM-1	<i>Nucleophosmin-1</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre periphere Blutzellen
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RIC	<i>reduced intensity conditioning</i> , Dosis-reduzierte Konditionierung
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
SLO	sekundäre lymphatische Organe
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzel-Nukleotid Polymorphismus
TCR	<i>t cell receptor</i> , T Zell Rezeptor
TEM	Transendotheliale Migration
TNF α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
USA	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika