

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer

**Phänotypische Charakterisierung humaner T-Zell-
Progenitoren in Leukapheresat, Knochenmark und
Nabelschnurblut und Versuch der Induktion von T-Zell-
Progenitoren aus CD34⁺ hämatopoetischen
Stammzellen mittels neuartiger 3D-Zellkultursysteme**

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Katharina Koch-Büttner

aus München

München, Juli 2013

Referent: Professor Dr. med. M. Eyrich

Koreferent: Professor Dr. med. A. Müller

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2014

Die Promovendin ist Ärztin

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Hämatopoese und die Rolle der T-Zell-Immunität bei der Stammzelltransplantation	1
1.2 Ablauf der Stammzelltransplantation	3
1.3 Komplikationen bei der Stammzelltransplantation	3
1.4 Graft-versus-Host Reaktion (Transplantat-gegen-Empfänger Reaktion)	4
1.5 Stand der Forschung	9
1.6 Wissenschaftliche Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Laborbedarf	17
2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze	17
2.1.4 Chemikalien und sonstige Reagenzien	17
2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie-Analyse	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Durchflusszytometrie	19
2.2.2 Protokoll	20
2.2.3 Gatingstrategie	21
2.2.4 Auswertung der Daten	22
2.2.5 Statistische Analyse	22
2.3 Technik zur <i>in vitro</i> Generierung von T-Zellen mit Hilfe einer neuartigen 3D-Zellkulturmatrix	23
2.3.1 Durchflusszytometrische Analyse der Zellkulturergebnisse	24

Inhaltsverzeichnis

2.3.2	Gating-Strategie	25
2.3.3	Zellzählung	26
2.3.4	Statistische Analyse	26
3.	Ergebnisse	27
3.1	Phänotypische Charakterisierung von humanen T-Zell-Progenitoren aus Leukapheresat im Vergleich zu Knochenmark und Nabelschnurblut	27
3.1.1	CD34 ⁺ lin ⁻ Zellen im Knochenmark, Leukapheresat und Nabelschnurblut	27
3.1.2	CD34 ⁺ lin ⁻ CD45RA ^{hi} CD7 ⁺ Zellen im Knochenmark, Leukapheresat und Nabelschnurblut	30
3.1.3	CD34 ⁺ lin ⁻ CD10 ⁺ CD24 ⁻ Zellen im Knochenmark, Leukapheresat und Nabelschnurblut	31
3.2	3D-Zellkulturmatrix	32
3.2.1	Kokultur der CD34 ⁺ Progenitoren mit humanem Thymus als Stromazellquelle	32
3.2.2	Kokultur der CD34 ⁺ Zellen mit humanen Hautfibroblasten	35
4.	Diskussion	37
4.1	Hämatopoetische Stammzellen mit lymphoidem Potential	38
4.2	CD34 ⁺ lin ⁻ im Leukapheresat, Knochenmark und Nabelschnurblut	39
4.3	CD34 ⁺ lin ⁻ CD45RA ^{hi} CD7 ⁺ Zellen im Knochenmark, Leukapheresat und Nabelschnurblut	41
4.4	lin ⁻ CD34 ⁺ CD10 ⁺ CD24 ⁻ Zellen im Leukapheresat, Knochenmark und Nabelschnurblut	42
4.5	T-Zell-Reifung auf 3D Matrix	42
4.6	Kokultur mit humanen Hautfibroblasten	43
4.7	Kokultur mit humanen Thymusfragmenten	44

Inhaltsverzeichnis

4.8	Ausblick	45
4.8.1	Bedeutung des Notch-Signalwegs für die T-Zell-Reifung	45
5.	Zusammenfassung	47
6.	Literaturverzeichnis	49
	Danksagung	
	Lebenslauf	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
CB	Cord Blood, Nabelschnurblut
CD	Cluster of differentiation
CD3 ⁺	T-Zellen
CD3 ⁺ CD8 ⁻ / CD3 ⁺ CD4 ⁺	T-Helferzellen
CD3 ⁺ CD8 ⁺	Zytotoxische T-Zellen
CD13 ⁺	Aminopeptidase N z.B. auf Monozyten, Granulozyten
CD14 ⁺	Lipopolysaccharid Rezeptor z.B. auf Monozyten
CD15 ⁺	Lewis X z.B. auf Granulozyten
CD16 ⁺	FCGR3A z.B. auf NK Zellen
CD19 ⁺	B-Zellen
CD33 ⁺	myeloische Vorläuferzellen
CD34 ⁺	Stammzellen
CD45RA ⁺ /CD45R0 ⁻	Naive Zellen
CD45R0 ⁺ /CD45RA ⁻	Gedächtniszellen
CD34 ⁺ lin ⁻ CD10 ⁺ CD24 ⁻	T-Vorläuferzellen
CD34 ⁺ lin ⁻ CD45RACD7 ⁺	T-Vorläuferzelle
CD56 ⁺	NK-Zellen
CMP	common myeloid progenitor
CLP	common lymphoid progenitor
Et al.	Et alii
FACS	fluorescent activated cell sorter
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter
GMP	granulocyte-monocyte progenitor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease

Abkürzungsverzeichnis

HSZ	hämatopoetische Stammzelle
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IL	Interleukin
kDA	kilo Dalton
KM	Knochenmark
KWT	Kruskal-Wallis-Test
LPH	Leukapherese
MEP	myeloid-erythroid progenitor
NK	Natürliche Killer-Zelle
PB	Peripheres Blut
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PBSC	Stammzelle aus dem peripheren Blut
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridin Chlorophyll Protein Komplex
Tab.	Tabelle
Th	T-Helferzelle

1. EINLEITUNG

1.1 Hämatopoese und die Rolle der T-Zell-Immunität bei der Stammzelltransplantation

Die zellulären Bestandteile des Blutes entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) im Knochenmark, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung haben. Diese frühen Stammzellpopulationen differenzieren zu multipotenten Progenitoren und erzeugen u.a. zwei spezialisierte Typen von Vorläuferzellen: eine gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor, CLP), aus der T- und B-Lymphozyten entstehen, und eine gemeinsame myeloide Vorläuferzelle (common myeloid progenitor, CMP), aus der sich Thrombozyten, Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten entwickeln. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass CLPs nicht wie bisher angenommen nur Vorläuferzellen von Lymphozyten darstellen, sondern darüber hinaus ein gewisses Potential zur Differenzierung in die myeloische Reihe beibehalten haben (Six et al. 2007). Im Rahmen der T-Zellentstehung wandern CLPs aus dem Knochenmark aus, differenzieren zu Progenitoren, die den Thymus besiedeln (TSPs), und durchlaufen im Thymusgewebe die letzten Reifungsschritte zu T-Zellen.

Bei vielen immunologischen Erkrankungen spielt ein dysfunktionales T-Zell-Abwehrsystem eine zentrale Rolle und eine verzögerte Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation gefährdet durch die damit einhergehende erhöhte Infektionsgefahr in vielen Fällen das Überleben der Patienten.

Dem besseren Verständnis der T-Zell-Entwicklung kommt deshalb besonders unter klinischen Aspekten bei der Behandlung von Immundefekten (AIDS, primär angeborene Immundefekte), aber auch bei der Bekämpfung von Komplikationen nach Stammzelltransplantation eine zentrale Bedeutung zu.

Die Stammzelltransplantation ist ein Verfahren, bei dem nach der Elimination des erkrankten Knochenmarks des Patienten eine Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen eines gesunden Spenders durchgeführt wird.

Einleitung

Ziel ist, aus diesen transplantierten Zellen die Regeneration einer gesunden Hämatopoese herbeizuführen.

Für die Gewinnung von Stammzellen stehen derzeit drei mögliche Verfahren zur Verfügung: die Punktion und Aspiration von Knochenmark, die Sammlung peripherer Blutstammzellen mittels Leukapherese oder aus frischem oder asserviertem Nabelschnurblut.

Die Entnahme durch Knochenmarkpunktion wird seit den 50iger Jahren eingesetzt und gilt als das klassische Verfahren für die Transplantation von Stammzellen (Thomas et al. 1957).

Ein Meilenstein in der Geschichte der Stammzelltransplantation war die Entdeckung von hämatopoetischen Stammzellen im peripheren Blut von Mäusen (Goodman et al. 1962). Aufgrund der geringen Frequenz der Stammzellen im Blut (ca. 0,06%) stellte die Transplantation von peripheren Blutstammzellen jedoch lange Jahre keine machbare Alternative zur Knochenmarktransplantation dar. In den 80er Jahren entdeckte man, dass durch eine Stimulation mit G-CSF (granulocyte colony stimulation factor) vermehrt Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut auswandern (Welte et al. 1985, Gianni et al. 1989). Die Frequenz der Stammzellen konnte durch die Gabe von G-CSF so gesteigert werden, dass die Sammlung ausreichender Mengen an Stammzellen möglich wurde und die Transplantation von peripheren Blutstammzellen als Alternative zur Knochenmarktransplantation fortan zur Verfügung stand. Heute ist die Zahl der Knochenmarkentnahmen aufgrund der großen Vorteile der Gewinnung peripherer Blutstammzellen mittels Leukapherese deutlich zurückgegangen (Link et al. 1997, Koca et al. 2008). Zum einen kann bei einer Entnahme von peripheren Blutstammzellen auf eine Narkose verzichtet werden, zum anderen kommt es zu einer schnelleren Immunrekonstitution sowie einer kürzeren Neutropeniedauer (Bensinger et al. 2012).

Einsatzgebiete von Stammzelltransplantationen sind u. a. die Therapie von Leukämien, Hämoglobinopathien und angeborenen Immundefekten.

In den letzten Jahrzehnten hat die Stammzelltransplantation große Fortschritte gemacht und ermöglicht heute die wirkungsvolle Therapie vieler maligner und

nichtmaligner Krankheiten, die lange als unheilbar galten. Die Möglichkeit neben HLA-identischen Familienspendern auch Stammzellen von HLA-nicht identischen Fremdspendern und nicht-identischen Spendern aus der Familie zu transplantieren, ist eine der größten Errungenschaften der modernen Medizin und führt dazu, dass heutzutage für nahezu jeden Patienten ein passender Spender gefunden werden kann (Aversa und Martelli 2004).

1.2 Ablauf der Stammzelltransplantation

In der Vorbereitungsphase werden die Patienten einer myeloablativen Konditionierungstherapie unterzogen (Buckner et al. 1974, Thomas et al. 1975), bei der die Patienten entweder eine Chemotherapie oder eine Kombination aus Chemotherapie und Bestrahlung erhalten (Radiochemotherapie). Diese sog. Konditionierungsphase hat drei Ziele:

1. Elimination der Grundkrankheit (z.B. maligne Leukämieklone)
2. Raumschaffung für das Transplantat durch Erzeugung einer Aplasie
3. Immunsuppression zur Prävention einer Abstoßungsreaktion (Storb et al. 1998)

Hierfür werden je nach Therapieschema verschiedene Zytostatika (z.B. Cyclophosphamid, Busulfan, Fludarabin, Etoposid, Melphalan) und ggf. eine Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI) eingesetzt.

Die eigentliche Transplantation erfolgt nach der Sammlung und eventuellen Aufbereitung der gewonnenen Stammzellen. Die Stammzellen werden dem Empfänger intravenös verabreicht und beginnen sich daraufhin im Knochenmark anzusiedeln (sog. homing).

1.3 Komplikationen bei der Stammzelltransplantation

Stammzelltransplantationen sind trotz der großen wissenschaftlichen Fortschritte auf diesem Gebiet immer noch mit einem erheblichen Risiko potentiell letaler Komplikationen behaftet. Dabei kann es einerseits zu Abstoßungsreaktionen des Empfängers im Sinne eines Transplantatversagens

(graft failure/ rejection) und andererseits zu immunologischen Reaktionen des Transplantats gegen Empfängergewebe (GvH) kommen. In beiden Fällen stehen alloreaktive T-Zellen im Zentrum der immunologischen Reaktion.

Besonders gefährdet sind die Patienten in den ersten Wochen und Monaten nach der Stammzelltransplantation. In dieser Zeit kommen die toxischen Nebenwirkungen der Konditionierungsphase, mit der das körpereigene Immunsystem eliminiert wurde, zum Tragen. Durch die Knochenmarkssuppression ist der Patient einem hohen Risiko einerseits für systemische Infektionen und andererseits für ein Rezidiv der Grunderkrankung ausgesetzt. Die aufgrund der Konditionierungsphase toxisch geschädigten Schleimhäute der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts können dabei als Eintrittspforte für bakterielle und fungale Infektionen dienen (Mulanovich et al. 2011, Youssef et al 2007, Person et al. 2010). Die hohe Infektionsgefahr in der ersten Zeit nach der Transplantation macht eine Unterbringung in einer Spezialpflegeeinheit nötig (Überdruckbelüftung, hepa-filtrierte Raumluft) und kann die Lebensqualität der Patienten in hohem Maße beeinflussen.

1.4 Graft-versus-Host Reaktion (Transplantat-gegen-Empfänger Reaktion)

Die akute GvH stellt eines der größten Risiken der allogenen Stammzelltransplantation dar.

Bei diesem akuten Krankheitsbild kommt es zu einer Immunreaktion von im Transplantat verbliebenen T-Zellen gegen gesundes Empfängergewebe. Ursächlich für die Immunreaktion ist die Erkennung von allogenen Oberflächenantigenen durch immunkompetente Spender T-Zellen. An diesem Erkennungsprozess sind insbesondere Humane-Leukozyten-Antigen (HLA) Merkmale beteiligt, die die individuelle immunologische Identität definieren (Sangiolo et al. 2010). Diese HLA-Moleküle binden kurze Peptidsequenzen von Proteinen im Inneren der Zelle, transportieren sie an die Oberfläche und präsentieren sie dort den körpereigenen T-Zellen. Kommt es im Rahmen einer Stammzelltransplantation zu einer Übertragung von Blutzellen des Spenders mit differentem HLA-Typ, so können die darin enthaltenen T-Zellen des Spenders die vom HLA-System präsentierten Antigene auf den Zellen des

Einleitung

Empfängers als fremd erkennen und eine Immunantwort auslösen (Penas und Zaman 2010). Die Folge kann die Entwicklung einer Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion sein.

Die drei immunologischen Voraussetzungen für diese Reaktion wurden von Billingham in seiner berühmten Harvey Lecture formuliert (Billingham 1966):

1. Das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten,
2. Der Empfänger muss dem Transplantat als „fremd“ erscheinen,
3. Der Empfänger muss in seiner Immunabwehr derart geschwächt sein, dass der Angriff des Transplantats nicht abgewehrt werden kann.

Bei der akuten Graft-versus-Host Erkrankung schädigen die transplantierten T-Zellen vor allem die Haut (makulopapulöses Exanthem, Erythrodermie), den Darm (Enteritis) und die Leber (Hepatitis) (Martin et al. 2004, McDonald et al. 2006, Jacobsohn 2007).

Das Risiko, eine GvH-Reaktion zu entwickeln, hängt, wie bereits beschrieben, von der Ähnlichkeit der Gewebemerkmale zwischen Spender und Empfänger ab und ist deshalb bei der Transplantation von HLA-identischen Zwillingen am geringsten. Bei Spenden durch Verwandte oder Fremde, deren HLA-Oberflächenmerkmale nicht identisch mit denen des Empfängers sind, nimmt das Risiko hingegen zu (Abb. 1.1).

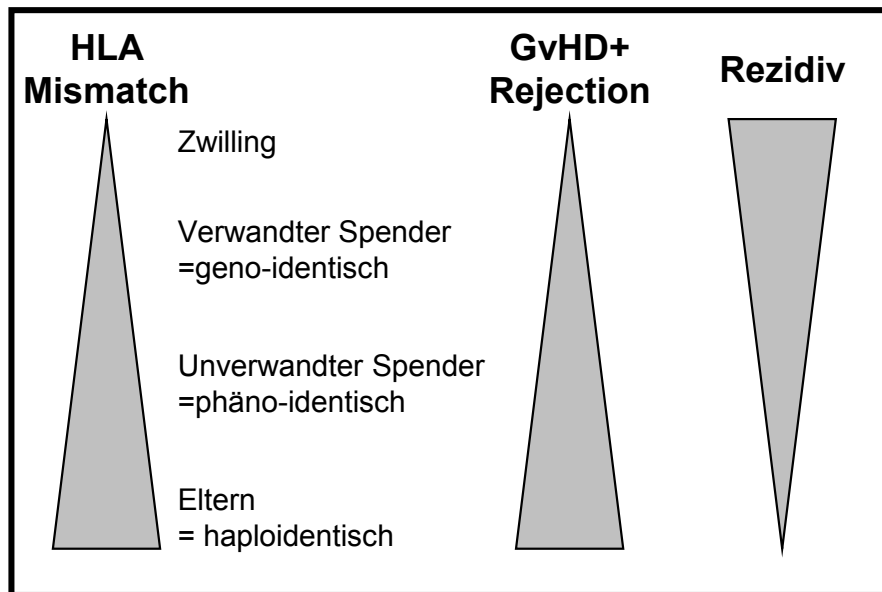


Abbildung 1.1: Immunologische Reaktion zwischen Spender- und Empfängerzellen (nach Koehl U., http://www.radeke.de/Lehre/Immunrek-GvL-GvHD-2007_HHR.pdf). Dargestellt ist der Einfluss der HLA-Disparität auf die Entwicklung einer GvHD. Je ähnlicher die HLA-Merkmale von Spender und Empfänger sind, desto geringer ist das Risiko einer GvHD oder einer Transplantatabstoßungsreaktion, aber desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs.

Im international anerkannten drei-Phasen-Modell der Pathophysiologie der GvH beschreibt die erste Phase die Schädigung des Empfängergewebes durch die toxischen Nebenwirkungen der zur Konditionierung verwandten Radio-/Chemotherapie, infolge der es zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie TNF α , Interleukin 1 und Interleukin 6 kommt. In der zweiten Phase kommt es zur Aktivierung und Proliferation der im Transplantat verbliebenen T-Zellen, die als Auslöser der GvH gelten. In dem durch die Phase 1 generierten pro-inflammatorischen Zytokin-Milieu werden die Empfängerantigene durch die transplantierten T-Zellen als fremd erkannt. In der dritten Phase der GvH kommt es zu einer Schädigung der Zielorgane Haut, Leber und Darm entweder durch eine direkte zytotoxische Wirkung oder aber durch den Zytokin-vermittelten Zelltod (Hill und Ferrara 2000) (Abb. 1.2).

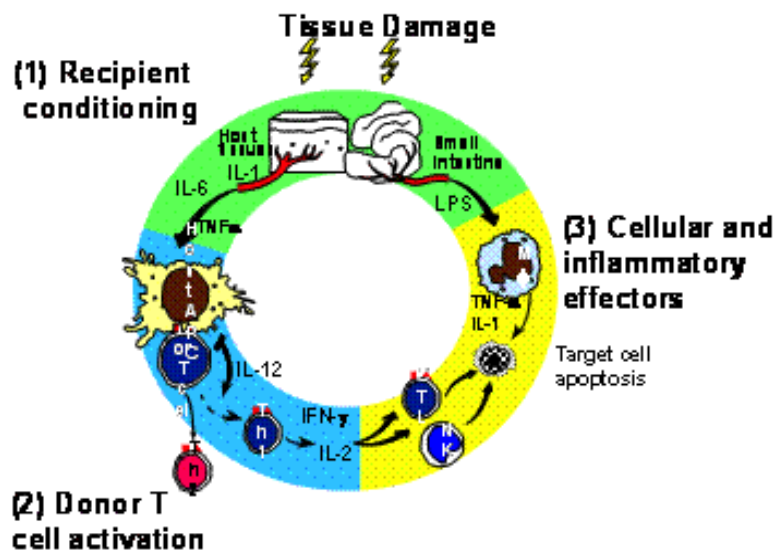


Abbildung 1.2: 3-Phasen-Modell zur Entstehung der GvH Reaktion (Hill und Ferrara 2000).

Neben der gefürchteten GvH Komplikation haben die transplantierten T-Zellen aber auch erwünschte Effekte auf den Empfängerorganismus: Sie fördern das Anwachsen der Stammzellen im Knochenmark, schützen vor Infektionen durch Viren und Pilze und eliminieren darüber hinaus eventuell im Empfängerorganismus verbliebene maligne Zellen (Graft-versus-Leukämie-Effekt, GvL).

Die Haupttodesursache nach Stammzelltransplantation stellt jedoch immer noch das Rezidiv der malignen Grunderkrankung dar. Patienten nach HLA nicht-identischer allogener Stammzelltransplantation haben hingegen ein vermindertes Risiko eines Rezidivs, aber ein erhöhtes Risiko für Transplantatabstoßungen und GvHD (Kolb et al. 2008, Xia et al. 2006). Aus diesem Grund gilt der GvL-Effekt heutzutage als erwünschter Therapieeffekt, der die Heilungschancen maßgeblich verbessert (Sprangers et al. 2007, Warren et al 2013).

Ein wichtiges Forschungsziel ist seit vielen Jahren die effektive Prophylaxe der GvH bei Stammzelltransplantationen. Neben dem Einsatz von Cyclosporin A und Methotrexat zur Immunsuppression stellt die Entfernung der T-Zellen aus dem Stammzelltransplantat einen möglichen Ansatz zur Prävention der GvH dar. Die sogenannte T-Zell-Depletion des Transplantats konnte sogar bei

Einleitung

Transplantationen über HLA-Grenzen hinweg das Risiko der gefährlichen Graft-versus-Host Komplikation minimieren. Zugleich zeigten sich allerdings eine erhöhte Rezidivrate der Grunderkrankung (Jakubowski et al. 2007, Wang et al. 2012), insbesondere in der Therapie von akuten und chronischen Leukämien, sowie eine erhöhte Zahl von Transplantatabstoßungen (Petersen et al. 2007).

Der deutliche Vorteil der Vermeidung einer GvH ist demzufolge mit einem neuen Risiko verbunden: Die Entfernung der T-Zellen aus dem Transplantat führt zu einer Verzögerung der T-Zell-Rekonstitution nach Transplantation. Die Patienten sind somit länger dem lebensbedrohlichen Risiko von Infektionen ausgesetzt. Zum anderen ist die Gefahr der Rekurrenz des Grundleidens stärker gegeben.

Hier liegt das sogenannte „T-Zell-Dilemma“: Der Versuch, eine GvH-Reaktion möglichst zu vermeiden, ist gekoppelt an die Inkaufnahme einer erhöhten Gefahr von Infektionen und Transplantatabstoßungen sowie an ein erhöhtes Rezidivrisiko (Abb. 1.3).

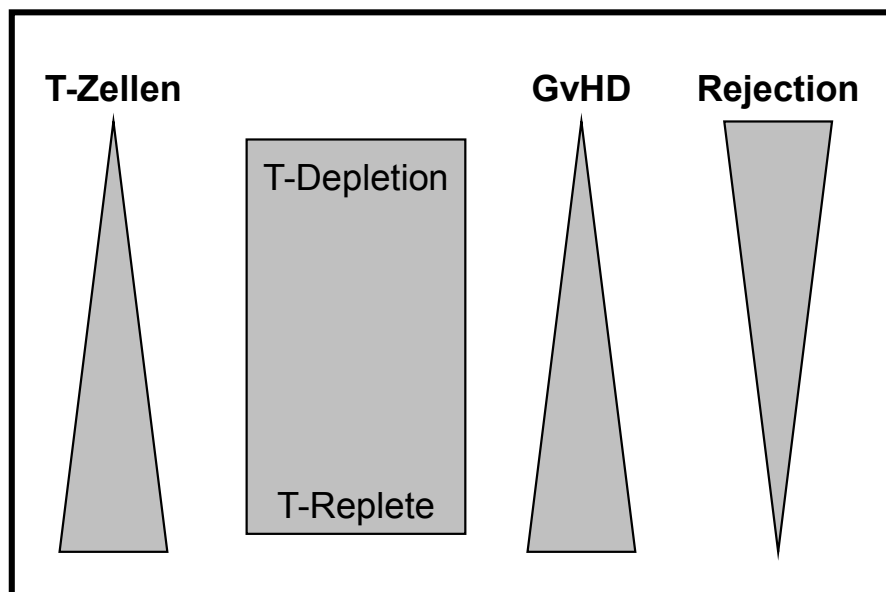


Abbildung 1.3: Wirkung der T-Zellen auf die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer GvHD oder einer Abstoßungsreaktion (nach Koehl U., http://www.radeke.de/Lehre/Immunrek-GvL-GvHD-2007_HHR.pdf). Werden T-Zellen aus dem Transplantat entfernt, sinkt das Risiko einer GvHD, gleichzeitig steigt die Wahrscheinlichkeit einer Transplantatabstoßungsreaktion (Rejection).

1.5 Stand der Forschung

Für die Forschung und Therapie von immunologischen Erkrankungen aus dem Bereich der T-Zelldefizienz ist das Verständnis der T-Lymphopoese eine wichtige Grundlage. Eine offene Frage dabei ist, welche phänotypischen Charakteristika diejenigen Progenitorzellen aufweisen, die den Thymus besiedeln (Yang et al. 2010). Bisher ist trotz intensiver Forschung ein lückenloses Verständnis der T-Zellreifung nicht gelungen.

Das frühere Modell der Hämatopoese ging davon aus, dass durch Zellteilung und Differenzierungsvorgänge zwei Vorläuferzellen gebildet werden: Die myeloide Progenitorzelle als Vorläuferzelle von Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten sowie die lymphoide Stammzelle als Vorläuferzelle von T-, B- und NK-Zellen.

Durch die Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper konnten viele Reifungsschritte der Hämatopoese in den letzten Jahren differenzierter betrachtet und das Modell der Hämatopoese in vielen Versuchen kritisch überprüft werden: Vor mehr als 20 Jahren wurde auf der Suche nach lymphoiden Vorläuferzellen im fetalen Knochenmark eine lin^-CD10^+ Zellpopulation entdeckt, die in der Lage war, die ersten Reifungsschritte im Thymus zu durchlaufen (Hokland et al. 1987). Linienmarker-negative Zellen (lin^-) kennzeichnen in diesem Zusammenhang frühe Progenitorzellen. Vor einigen Jahren kam auf dieser Grundlage die Erkenntnis hinzu, dass eine $lin^-CD34^+CD45RA^+CD10^+$ Stammzellpopulation nach der Geburt im Knochenmark zu finden ist und das Potential hat, in B-, T-, NK- und dendritische Zellen zu differenzieren (Galy et al. 1995). Zur näheren Differenzierung des lymphoiden Potentials wurden diese $lin^-CD34^+CD45RA^+CD10^+$ Zellen aus dem Nabelschnurblut mit einer bis dahin unbekanntem $CD34^+CD45RA^{hi}CD7^+$ Population aus dem Nabelschnurblut verglichen. Unter bestimmten Bedingungen konnte die $CD34^+CD45RA^{hi}CD7^+$ Population alle 3 lymphoiden Zellen generieren, wobei die Entwicklung in T- und NK-Zellen am häufigsten war. Die bekannte $CD34^+CD45RA^{hi}Lin^-CD10^+$ Vorläuferpopulation zeigte außerdem ein starkes B-Zellentwicklungspotential (Haddad et al. 2004).

Dieses lymphoide Potential von $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD10}^+$ Zellen im Gegensatz zu $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD10}^-$ Zellen, die vor allem erythro-myeloides Potential aufweisen, wurde mehrfach bestätigt (Bell et al. 2008). Darüber hinaus konnte im Knochenmark und im Nabelschnurblut eine $\text{CD34}^+ \text{CD10}^+ \text{CD24}^-$ Zellpopulation gefunden werden, die ein geringes myeloides, aber hohes B-, T- und NK-Zell-Potential aufweist (Six et al. 2007).

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass die Hämatopoese weitaus komplexeren Reifungsvorgängen unterliegt als zunächst angenommen. T-Zell-Progenitoren folgen nicht wie bisher angenommen, einem strikten Differenzierungsweg der T-Zell-Linie, sondern können in verschiedenen Reifungsstadien noch in andere Zellreihen differenzieren. Dies kann biologisch z.B. dazu führen, dass T-Zell-Vorläufer, die ihren T-Zell-Rezeptor nicht erfolgreich umschreiben konnten, eine zweite Entwicklungschance bekommen.

In anderen Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass verschiedene Progenitorphänotypen in der Lage sind, T-Zellen zu generieren. Neben den bereits erwähnten $\text{CD34}^+ \text{CD45RA}^{\text{hi}} \text{CD7}^+$ und $\text{CD34}^+ \text{CD10}^+ \text{CD24}^-$ Progenitorzellen konnten unter anderem im Thymus innerhalb der $\text{CD4}^- / \text{CD8}^-$ Zellpopulation auch noch andere Progenitoren gefunden werden, die T-Zellen generieren können (Rolink et al. 2006, Zlotoff et al. 2008).

Insgesamt konnte in verschiedenen Versuchen zur Lymphopoese eine hohe Redundanz bezüglich des Phänotyps und der Differenzierungsmöglichkeiten festgestellt werden. Eine Progenitor-Population, die singularär nur der T-Zell-Reihe zuzuordnen war, konnte in keinem der Versuche gefunden werden (Abb. 1.4).

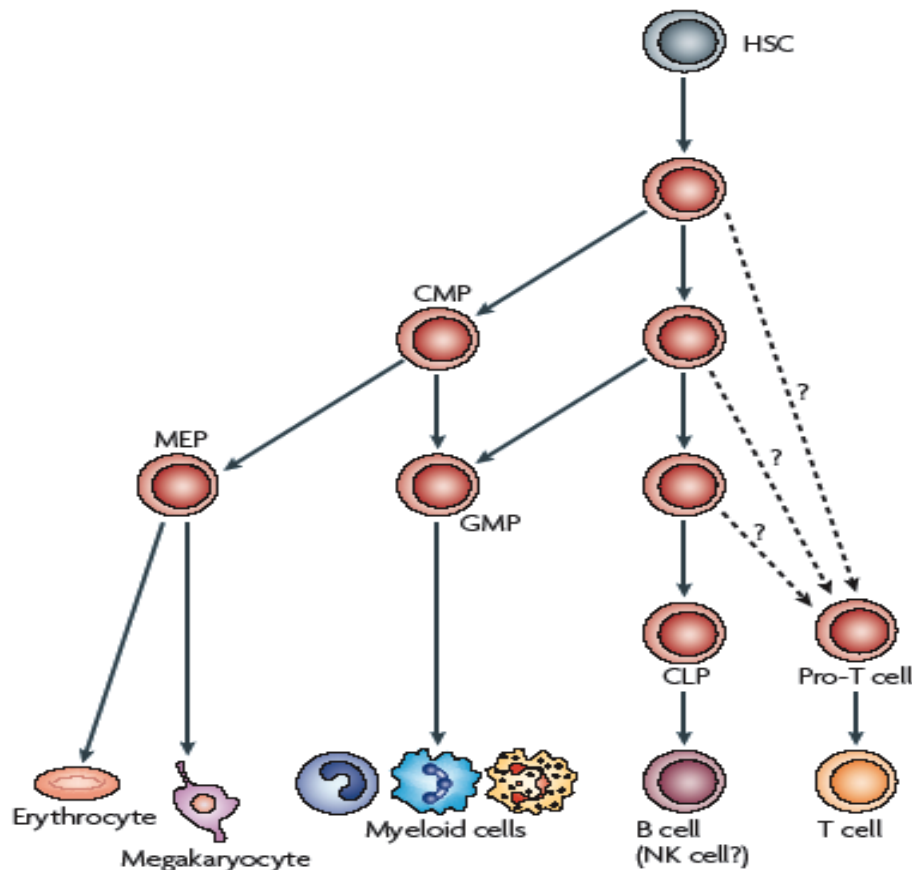


Abbildung 1.4: Modell der Hämatopoese. Die Abbildung zeigt die Entwicklung der Blutzellen aus einer hämatopoetischen Stammzelle. Zusätzlich wird die Unsicherheit über die phänotypischen Charakteristika der T-Zell-Progenitoren und die mögliche Beziehung zu anderen Vorläuferzellen im Rahmen der Hämatopoese schematisch dargestellt. Abkürzungen: CLP, common lymphoid progenitor; CMP, common myeloid progenitor; GMP, granulocyte-monocyte progenitor; HSC, hematopoietic stem cell (Nach Ceredig et al. 2009).

Bisher wurden allerdings nur T-Zell-Progenitoren im Knochenmark sowie im Nabelschnurblut untersucht. Periphere Blutstammzellen aus Leukapheresat wurden nicht auf frühe T-Zell-Progenitoren hin überprüft.

Weltweit beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen damit, die Phase der Lymphopenie bei Patienten nach cART (combined Anti-Retroviral Therapy) bei AIDS, Chemotherapie oder Stammzelltransplantation therapeutisch zu verkürzen und eine rasche T-Zell-Rekonstitution zu unterstützen. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Stammzelltransplantation die T-Zell-Rekonstitution im Vergleich zur B- und NK-Zell-Rekonstitution deutlich verzögert ist und für die meisten schwerwiegenden infektiösen Komplikationen verantwortlich gemacht werden kann (Hakim et al. 1997, Davison et al. 2000,

Nachbaur et al. 2000). Für die T-Zell-Rekonstitution bei lymphopenen Patienten existieren zwei Wege: der Thymus-unabhängige und der Thymus-abhängige Weg. Der erste Weg entstammt der peripheren Expansion reifer, mittransplantierte T-Zellen (Mackall et al. 1993 u. 1997). Der zweite, Thymus-unabhängige Weg der T-Zell-Regeneration führt zu einer *de novo* Generierung von naiven T-Zellen im Thymus aus den transplantierten Vorläuferzellen. Die komplette Ausreifung und Erziehung der naiven T-Zellen läuft dabei im Empfängerorganismus ab.

Ein Ansatz zur Unterstützung der Regeneration des Immunsystems nach Transplantation ist die therapeutische Gabe von reifen Spender-T-Zellen. Es wurde in diesem Zusammenhang einerseits die Verabreichung von unselektionierten Spender-T-Zellen (DLI – donor lymphocyte infusion) (Tomblyn et al. 2008) und andererseits die Gabe von *in vitro* generierten zytotoxischen T-Zellen (CTLs) getestet (Mutis et al. 2002). Beide Verfahren zeigten allerdings Nachteile: Die unselektionierten Spender-T-Zellen trugen nicht durchgehend zu einer Verbesserung der Immunrekonstitution nach Transplantation bei (Verfuerth et al. 2000) und die zytotoxischen T-Zellen waren methodisch sehr aufwendig zu produzieren.

Bei beiden Ansätzen zur Verbesserung der T-Zell-Rekonstitution werden reife T-Zellen auf den Empfänger übertragen. Inwieweit diese ihre Funktion dann wahrnehmen können oder ob sie einer erhöhten Apoptoserate unterliegen, bleibt unklar (Hebib et al. 1999, Petersen SL 2007).

In letzter Zeit ist zunehmend die thymusabhängige Regeneration naiver T-Zellen in den Brennpunkt wissenschaftlichen Interesses gerückt. Diese reifen im Empfänger nach Transplantation aus CD34⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen heran und sind durch positive und negative Selektion im Empfängerthymus gegenüber dem Empfängergewebe tolerant geworden (Kyewski et al. 2004, Hogquist et al. 2005). Ihr Auftreten ist nicht mit einer GvH Reaktion verbunden.

Naive T-Zellen tragen maßgeblich zur Rekonstitution des T-Zell-Abwehrsystems nach Transplantation bei (Douek et al. 2000; Eyrich et al. 2002).

Einleitung

Für die Generierung neuer, naiver T-Zellen ist das besondere Mikromilieu des Thymus essentiell. Dies konnte insbesondere an Untersuchungen thymektomierter KM-Empfänger gezeigt werden, bei denen die CD4⁺CD45RA⁺ Zellzahl im Gegensatz zu thymustragenden Empfängern auch 24 Monate nach KMT noch nicht rekonstituiert war (Heitger et al. 1997).

In den letzten Jahren wurden verschiedene *in vitro* Kultursysteme entwickelt, um die Erzeugung naiver T-Zellen im Thymus experimentell nachvollziehen zu können. Mit der Verwendung von sog. fetalen Thymuskulturen (FTOC) aus Mäusen konnten in diesem Zusammenhang die besten Ergebnisse erzielt und einige Reifungsschritte von T-Zellen besser verstanden werden (Saito et al. 2002, Ueno et al. 2005, Nitta et al. 2013).

Darüber hinaus zeigten die Versuche, dass die dreidimensionale Architektur des Thymus mit seinem bindegewebigen Maschenwerk und der daraus resultierenden Interaktion zwischen Thymusepithelzellen, dendritischen Zellen und Thymozyten für eine effektive T-Zellreifung von großer Bedeutung ist (Gray et al. 2005, Rezzani et al. 2008). Diese Erkenntnis hat zur Entwicklung neuartiger Zellkulturmatrices geführt, welche die dreidimensionale Architektur des Thymus simulierten (Bobyne et al. 1999, Vianello et al. 2007). Diese neuartige Zellkulturmatrix stellt ein 3D-Gerüst für Zellen dar und bietet diesen übergangsweise eine gewebespezifische Umgebung für die Zellproliferation.

In einem Versuch von Poznansky et al. wurde die 3D Matrix von murinem Thymusgewebe aus mit Stromazellen besiedelt und danach mit humanen CD34⁺ Progenitoren beimpft, die über eine Beckenkammpunktion entnommen worden waren. Ziel war es, ein möglichst physiologisches Milieu für die *in vitro* Reifung von T-Zellen zu generieren. Nach 14 Tagen Kulturzeit konnten tatsächlich CD3⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Poznansky et al. 2000).

Inwieweit periphere CD34⁺ Blutstammzellen, die durch Leukapherese gewonnen wurden (PBSC), auf diesem neuen Zellkultursystem unter bestimmten Bedingungen T-Zellen bilden können, wurde bisher noch nicht untersucht, obwohl die Transplantation von PBSC das weltweit am häufigsten angewandte Verfahren zur Stammzelltransplantation ist.

Einleitung

Hier liegt der Ansatz der vorliegenden Arbeit: Unter verschiedenen Kulturbedingungen wurden in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe humane periphere Blutstammzellen in dem von Poznanski et al. beschriebenen Kultursystem mehrere Wochen kultiviert und auf neu generierte T-Zellen überprüft. Damit wurde der Frage nachgegangen, ob es möglich ist, aus CD34⁺PBSC *in vitro* naive T-Zellen entstehen zu lassen. Neben humanem Thymusgewebe wurde auch humane Haut als Stromazellquelle genutzt (Abb.1.5). Auf der Grundlage der Versuchsaufbauten von Poznansky et al. sollte ein möglichst physiologisches, dem Thymusgewebe nachempfundenen Milieu für die Reifung von T-Zellen geschaffen werden. Die besondere Innovation dieses Kultursystemes liegt in der dreidimensionalen Struktur der Matrix und der Ähnlichkeit zum thymischen Mikromilieu, die dadurch erzielt werden kann. Klares Ziel dieser Versuche war es, auf einer neuartigen dreidimensionalen Zellkulturmatrix, aus CD34⁺ PBSC voll funktionsfähige humane, naive T-Zellen zu generieren.

Die praktische Durchführung dieser Zellkulturversuche erfolgte bereits in einer früheren experimentellen Phase unserer Arbeitsgruppe. Da dieses umfangreiche Datenmaterial jedoch niemals systematisch ausgewertet worden ist, beschäftigt sich der zweite Teil der vorliegenden Arbeit mit der Auswertung und Beurteilung dieser Zellkulturdaten.

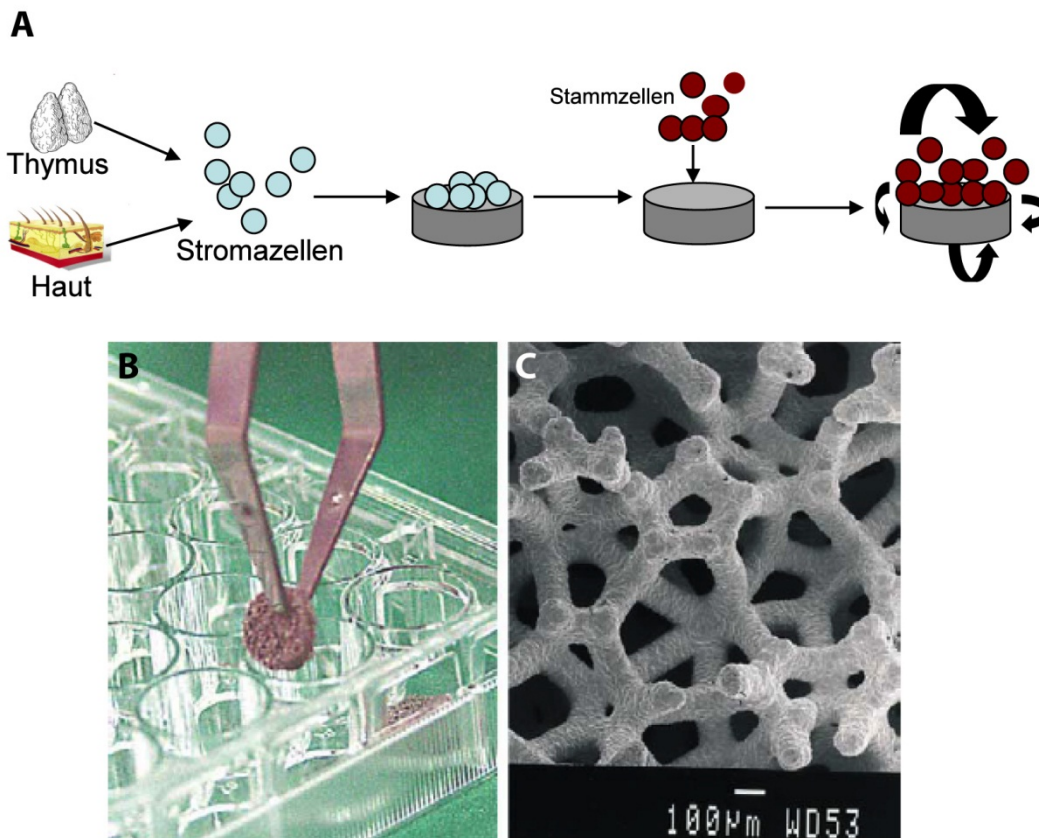


Abbildung 1.5: Generierung von T-Zellen auf dreidimensionaler Zellkulturmatrix. A) Versuchsaufbau: humane Haut bzw. Thymuszellen dienen als Stromazellquelle, Kultivierung der Stromazellen auf 3D- Matrix für 22-35 Tage, dann Zugabe von CD34⁺ Stammzellen, Proliferation und Ausdifferenzierung in reife T-Zellen. Die Darstellung des Versuchsaufbaus ist einer Abbildung aus der Publikation von Poznansky et al. (2000) nachempfunden. (B) Zur Vorbereitung eines Zellkulturversuches werden die dreidimensionalen Zellkulturplättchen in eine 24-Loch Schale eingebracht. (C) elektronenmikroskopische Aufnahme des 3D-Gerüsts der Matrix. Die technisch erzeugte Porengröße von 80-100 ppi (pores per inch) hatte sich in Vorversuchen als optimal für die T-Zellkultur herausgestellt.

1.6 Wissenschaftliche Zielsetzung

Der wissenschaftlichen Unschärfe bezüglich des Phänotyps von T-Zell-Progenitoren steht das sichere Wissen über die entscheidende Rolle des besonderen Mikromilieus des Thymus bei der Heranreifung von T-Zellen aus Stammzellen gegenüber.

Beide Forschungsgebiete haben dennoch ein gemeinsames wissenschaftliches Ziel: Die Suche nach Wegen, naive T-Zellen *in vitro* zu generieren und sie anschließend zu transplantieren, um damit das Risiko von gefährlichen Komplikationen bei immungeschwächten Patienten zu minimieren. Hierzu ist

Einleitung

die Kenntnis der Lymphopoese eine ebenso wichtige Grundlage wie die Forschung an *in vitro* Kultursystemen zur Erzeugung von T-Zellen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich unter klinischen Aspekten mit den zusammenhängenden Fragestellungen:

1. Lassen sich in den klinisch genutzten Stammzellquellen Nabelschnurblut und Knochenmark ähnliche Frequenzen von T-Zell-Progenitoren finden wie in der Literatur beschrieben?
2. Lassen sich im Leukapheresat (mobilisierte, periphere Blutstammzellen) ähnliche Progenitoren mit vergleichbarer Frequenz finden?
3. Können in einem neuartigen dreidimensionalen Matrixsystem, das der Thymusarchitektur nachempfunden ist, naive T-Zellen generiert werden? Insbesondere die Fähigkeit von humanen, mobilisierten CD34⁺ Blutstammzellen zur T-Zellgenerierung soll dabei untersucht werden. Zur Beantwortung dieser Frage sollten umfangreiche Vorversuche unserer Arbeitsgruppe ausgewertet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD, Heidelberg
Pipetten	Eppendorf Research/ Reference 5µl, 20µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Vortexgerät	Vortex REAX control	Heidolph, Nürnberg
Zentrifuge	Mikro 22 R, Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Laborbedarf

Artikel / Beschreibung	Herstellung
Pipettenspitzen 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	NUNC, Roskilde, Dänemark
Reagenzgläser	NUNC, Roskilde, Dänemark

2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Reagenzien	Hersteller
PBS (Dubecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma, Taufkirchen

2.1.4 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Produkt	Hersteller
FACS – Lysing Solution	BD, New Jersey, USA
FACS Flow	BD, New Jersey, USA
FACS Rinse	BD, New Jersey, USA
FACS Clean	BD, New Jersey, USA

Material und Methoden

2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie-Analyse

Antikörper	Ursprung	Markierung	Absorptions- wellenlänge (nm)	Emissions- wellenlänge (nm)	Hersteller
CD 3	Maus	PE	566	576	BD, Heidelberg
CD 7	Maus	FITC	492	520	BD, Heidelberg
CD 8	Maus	PE	566	576	BD, Heidelberg
CD 10	Maus	APC FITC	650 492	670 520	BD, Heidelberg
CD 13	Maus	PE	566	576	BD, Heidelberg
CD 14	Maus	PE	566	576	BD, Heidelberg
CD 15	Maus	PE	566	576	BD, Heidelberg
CD 16	Maus	PE	566	576	BD, Heidelberg
CD 19	Maus	PE	566	576	BD, Heidelberg
CD 24	Maus	FITC	492	520	BD, Heidelberg
CD 33	Maus	PE	566	576	BD, Heidelberg
CD 34	Maus	PerCP	490	675	BD, Heidelberg
CD 45RA	Maus	APC	650	670	BD, Heidelberg
CD 56	Maus	PE	566	576	BD, Heidelberg
GlyA	Maus	PE	566	576	BD, Heidelberg

Linien-Cocktail: CD3, CD4, CD8, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD33, CD56, GlyA (dient dem Ausschluss undifferenzierter Zellen)

CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen

Die Stammzellen für die Untersuchung von T-Zell-Progenitoren wurden freundlicherweise vom Stammzelllabor der Kinderklinik der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Es wurde Knochenmark von 9 Patienten, Leukapheresat von 5 Patienten und Nabelschnurblut von 3 Neugeborenen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Abnahme untersucht.

2.2 Methoden

2.2.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung der Markerexpression auf hämatopoetischen Zellen. Die Morphologie der Zellen kann durch die charakteristische Streuung von Laserstrahlen erkannt werden. Das Seitwärtsstreulicht (SSC=Sideward Scatter) ist ein Maß für die Granularität einer Zelle. Mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC=Forward Scatter) kann die Größe einer Zelle festgestellt werden. Monozyten haben einen höheren Forward Scatter als die kleineren Lymphozyten. Granulozyten hingegen haben aufgrund ihrer Granularität einen höheren Sideward Scatter als Lymphozyten. Neben der Streuung kann man die Zellen in der Durchflusszytometrie anhand der Expression von Oberflächenmarkern, die mit Hilfe von farbstoffmarkierten monoklonalen Antikörpern markiert werden können, charakterisieren. Das Durchflusszytometer ist hierfür mit Photodetektoren ausgerüstet, die die Fluoreszenzfarbstoffe der gebundenen Antikörper erkennen können. Jede Zelle kann durch die Durchflusszytometrie anhand ihrer Morphologie und Oberflächeneigenschaften einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden.

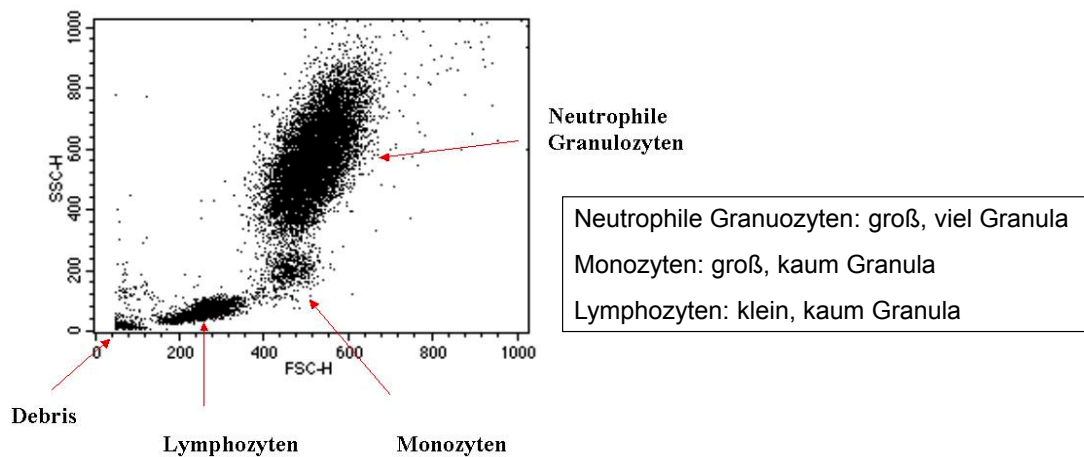


Abbildung 2.1: Darstellung der normalen Verteilung der Leukozyten in der Durchflusszytometrie.

2.2.2 Protokoll

- 20µl Leukapheresat, Knochenmark oder Nabelschnurblut in ein Reagenzglaschen geben
- 5 µl der gewünschten Antikörper hinzufügen, vortexen
- Für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren
- 1000µl FACS – Lyse zugeben, vortexen
- Für weitere 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren
- 5 Minuten bei 20 °C zentrifugieren, Überstand dekantieren
- 2 Mal mit 2 ml PBS waschen und anschließend zentrifugieren, Überstand abkippen
- Zum Schluss mit 500µl PBS auffüllen
- Messung im Durchflusszytometer

Röhrchen	FITC	PE	PerCP	APC
1	Isokontrolle	Isokontrolle	Isokontrolle	Isokontrolle
2	CD 7	Lin	CD 34	CD 45RA
3	CD 10	Lin	CD 34	CD 45RA
4	CD 7	Lin	CD 34	CD 10
5	CD 24	Lin	CD 34	CD 10

Tabelle 2.1: Färbungen für die Durchflusszytometrie

2.2.3 Gatingstrategie

Das gezielte Auswählen einer bestimmten Zellpopulation in der durchflusszytometrischen Analyse wird als „Gaten“ bezeichnet. Hierbei wird um die Zellpopulation, die näher charakterisiert werden soll, eine „Region“ gelegt. Um die Zellen einer Region in ihre Subpopulationen einzuteilen, werden die so definierten Zellen in einem separaten Punktdiagramm dargestellt. Aus dem Dot plot A werden dementsprechend nur die Zellen in die weitere Analyse miteinbezogen, die anhand ihrer FSC und SSC Eigenschaften als Lymphozyten zu erkennen sind (Abb. 2.2 A Region 6). In der weiteren Analyse ist es nun möglich, die Lymphozyten auf die Oberflächenmarker CD34-PerCP und lineage-PE zu testen (Abb. 2.2 B). Der lineage-Cocktail ist eine Mischung aus verschiedenen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3, CD8, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD33, CD56 und GlyA. Diese Zusammensetzung wurde gewählt, um alle reiferen Zellen auszuschließen und nur die unreifen lymphozytären Vorläuferzellen zu erfassen. Die Zellen, die einen der Oberflächenantigene aus dem lineage-Cocktail tragen, werden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen, indem eine weitere Region R2 um die Zellen gelegt wird, die lineage negativ und CD34 positiv sind.

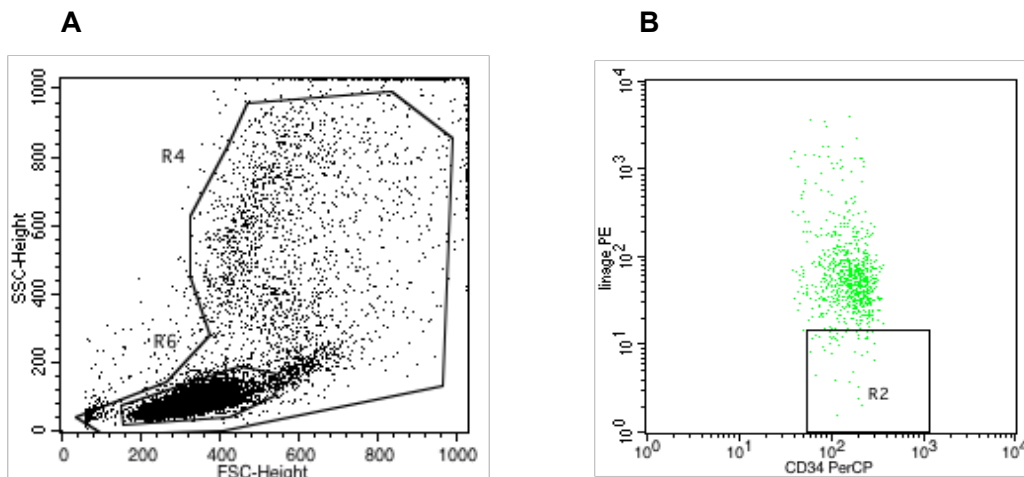


Abbildung 2.2: Gatingstrategie zur Identifizierung der unreifen Stammzellen: A) normale Verteilung der Leukozyten in der Durchflusszytometrie. Lymphozyten (geringer SSC, geringer FSC) und Monozyten/Granulozyten (höherer SSC, höherer FSC), B) um die $CD34^{+}lin^{-}$ Population wird die Region R2 gelegt.

Anschließend stellt man in einem Dot Plot die ausgewählten $CD34^{+}lin^{-}$ Zellen der Region R2 den Markern CD45RA-APC und CD7-FITC gegenüber (Abb. 2.3

A). Die $CD34^{+}lin^{-}$ Zellen werden somit auf das Vorhandensein der Oberflächenmarker CD45RA und CD7 überprüft. $CD34^{+}lin^{-}$ Zellen, die CD45RA positiv und CD7 positiv sind, entsprechen frühen T-Zell-Progenitoren. Alternativ werden die $CD34^{+}lin^{-}$ Zellen auf die Expression von CD10 und CD24 getestet (Abb. 2.3 B). $CD34^{+}lin^{-}$ Zellen, die CD10 positiv und CD24 negativ sind, sind lymphoide Vorläuferzellen.

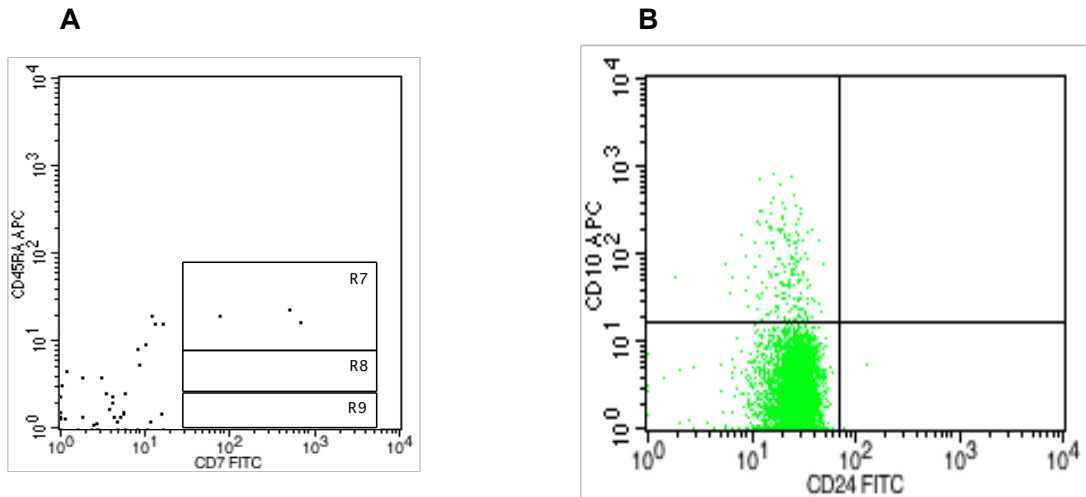


Abbildung 2.3: Gatingstrategie zur Identifizierung der Stammzell-Subpopulationen: A) CD45RA gegen CD7. Die doppelt positiven bilden die Region R7 (CD45RAhigh), R8 (CD45RAintermediate) und R9 (CD45RALow), B) CD10 gegen CD24.

2.2.4 Auswertung der Daten

Die Analyse der in der Durchflusszytometrie erhobenen Daten wurde mit dem Programm BD *CellQuest Pro* software 2002, Becton, Dickinson and Company durchgeführt.

2.2.5 Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test, einem nicht parametrischen Test für mehr als zwei unverbundene Stichproben, geprüft. Dabei wurde ein p-Wert $< 0,01$ als statistische Signifikanzschwelle festgelegt.

2.3 Technik zur *in vitro* Generierung von T-Zellen mit Hilfe einer neuartigen 3D-Zellkulturmatrix

Der Versuchsaufbau und die Durchführung der T-Zell-Kulturversuche wurden bereits in früheren Experimenten vor dieser Dissertation in unserer Arbeitsgruppe von Herrn Dipl.biol. Gernot Wollny durchgeführt. Die dabei erhobenen Daten wurden jedoch nie systematisch ausgewertet und analysiert. Neben der phänotypischen Analyse der T-Zell-Progenitoren war es Gegenstand meiner Arbeit, diese gesammelten Datensätze auszuwerten.

Im Gegensatz zu den bislang publizierten Versuchen an der neuartigen 3D-Zellkulturmatrix, in denen ausschließlich murines Gewebe verwendet wurde, diente in den Versuchen von Herrn Wollny nur humanes Gewebe (Haut, Thymus) als Stromazellquelle. Dem Ersatz des xenogenen Materials durch humanes lag die Annahme zugrunde, dass humanes Gewebe ein noch physiologischeres Milieu generieren könnte. Zudem mußte im Hinblick auf eine potentielle klinische Anwendung ein Kultursystem ohne xenogenes Material etabliert werden.

Zellen wachsen in Kultur in der Regel als sog. „Monolayer“ nebeneinander wie Pflastersteine auf einer Straße. Im Körper sind Zellen jedoch komplex räumlich organisiert, sodass im Hinblick auf die Generierung einer möglichst natürlichen Umgebung dreidimensionale Zellkulturen entwickelt wurden, mit dem Ziel die physiologische Wirklichkeit zu simulieren, in der Zellen *in vivo* heranwachsen. Mit den Methoden des „Tissue Engineering“, das insbesondere durch die Wiederherstellung von Knorpelgewebe bekannt ist, können dreidimensionale Gewebekonstruktionen sowohl in Monokultur- als auch in Kokulturmodellen generiert werden, die diese natürliche Umgebung nachahmen.

Die Grundlage des im ausgewerteten Versuch verwendeten Kultursystems bildet ein dreidimensionales Kohlenstoffgerüst, auf welches bei hoher Temperatur Tantalum aufgebracht wurde. Tantalum ist ein inertes, biokompatibles Metall, welches sich als Oberflächenmaterial in der Endoprothetik bereits seit längerem bewährt hat und welches auch mit Zellkultur kompatibel ist. Von besonderer Bedeutung ist hier die Porendichte. In Vorversuchen hatte sich eine Porendichte von 80 ppi als optimal erwiesen

(Abbildung 1.5), vermutlich weil dieser Abstand nach Besiedlung mit Stromazellen das Mikromilieu im Thymus am besten widerspiegelt. Im ersten Schritt wurde dieses Gerüst mit Zellkulturmedium bedeckt, Thymusgewebe oder Hautfragmenten als Stromazellquelle wurde aufgebracht und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 3-5 Tage zu jeweils $\frac{2}{3}$ erneuert. Nach 22-35 Kulturtagen wurden das Thymus- oder Hautfragment entfernt und hochaufgereinigte CD34⁺ Progenitorzellen (1×10^5) auf die mit Stromazellen kultivierte Zellkulturmatrix gegeben. Je nach experimentellen Bedingungen wurden die Zytokine IL-7 und IL-15 zugegeben. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Kontamination mit initial vorhandenen Thymozyten zu verhindern, wurde in einigen Versuchen die lymphotoxische Substanz Fludarabin zu den Kontrollversuchen hinzugefügt.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik Tübingen begutachtet (Nr. #24/2003V).

2.3.1 Durchflusszytometrische Analyse der Zellkulturergebnisse

Die bereits beschriebene Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellen anhand ihrer Granularität, Größe und Oberflächenantigene auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften.

Die Zellen, die am Ende der Kulturperiode aus den 3D-Matrices durch kräftiges Auf- und Abpipettieren herausgelöst werden können, wurden gezählt und auf ihre Expression von CD34, CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CD56 und TCR $\gamma\delta$ mittels des 4-Farben-Durchflusszytometers FACSCalibur (alle Fa. BD, Heidelberg, Germany) hin untersucht.

Bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Zellkulturzellen als auch bei der Untersuchung von Knochenmark, Leukapheresat und Nabelschnurblut auf T-Zellprogenitoren handelt es sich um eine deskriptive Analyse. Es standen keine biologischen Materialien (z.B. Zelllinien, transfizierte Zellen), die als Positivkontrollen hätten dienen können, zur Verfügung. Zur Reduzierung des Hintergrundes und zur Erfassung unspezifischer Bindungen wurden jedoch bei allen Untersuchungen Isotypenkontrollen mitgeführt.

2.3.2 Gating-Strategie

Die Sichtung, Auswertung und Interpretation der von Herrn Wollny erhobenen Rohdaten war vollumfänglich Gegenstand dieser Promotionsarbeit. Im ersten Schritt wird eine Region um die Lymphozyten gelegt (R1), um nur noch diese in die weitere Analyse miteinzubeziehen (Abb. 2.4 A). Die Lymphozyten werden in den nächsten dot plot eingeschleust (gated), um sie in ihre Subpopulationen (B-Lymphozyten und T-Lymphozyten) einzuteilen. Der T-Lymphozyten Marker CD3 wird gegen SSC (Abb. 2.4 B) aufgetragen. Die Zellen, die für CD3 positiv sind, bilden eine neue Region (R10). Die CD3 positiven Zellen aus der Region R10 werden in den nächsten dot plot eingeschleust, um sie auf die Expression von CD8 (T-Zytotoxische-Zelle) und CD4 (T-Helfer-Zelle) zu überprüfen. CD4 wird gegen CD8 aufgetragen (Abb. 2.5 A). Die $CD3^+ CD4^+$ Zellen und die $CD3^+ CD8^+$ Zellen bilden jeweils eine neue Region (Region 5 und Region 6). Alternativ werden die $CD3^+ CD4^+$ Zellen und die $CD3^+ CD8^+$ Zellen gegen CD45RA, einem Marker für naive T-Zellen, aufgetragen (Abb. 2.5 B).

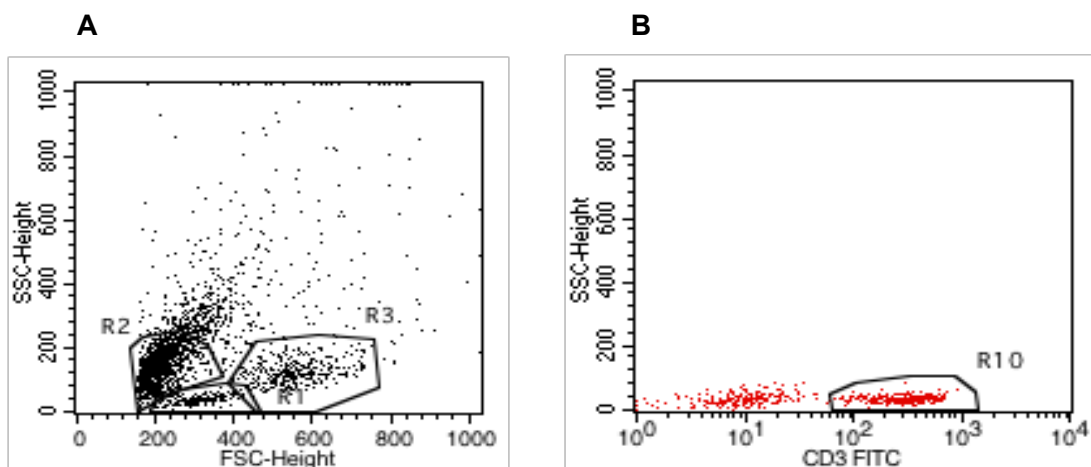


Abbildung 2.4: Gating Strategie zur Identifizierung der Subpopulationen: A) normale Verteilung der Leukozyten in der Durchflusszytometrie, B) SSC gegen CD3.

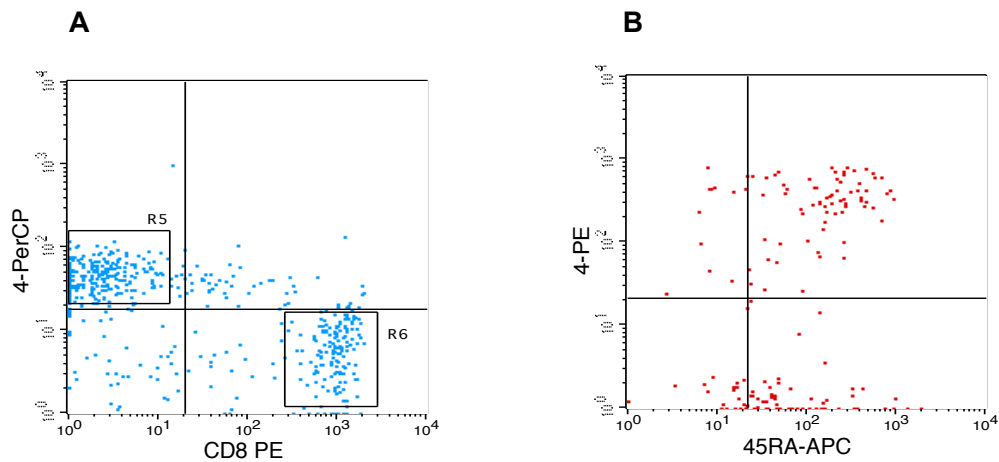


Abbildung 2.5: Gatingstrategie zur Identifizierung der Subpopulationen: A) CD4 gegen CD8, B) CD4 gegen CD45RA.

2.3.3 Zellzählung

Nicht adhärenente Zellen aus allen Kulturen wurden zu festgelegten Zeitpunkten vorsichtig entfernt und mittels eines Zellzählers (Advia 120, Siemens, Erlangen, Deutschland) ausgezählt.

2.3.4 Statistische Analyse

Zum Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Gruppen wurde der nicht parametrische Rangsummentest (Kruskal-Wallis-Test für 3 und Wilcoxon-Test für 2 unverbundene Stichproben) genutzt. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die Untersuchungsergebnisse werden, soweit nicht anders bezeichnet, als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1 Phänotypische Charakterisierung von humanen T-Zell-Progenitoren aus Leukapheresat im Vergleich zu Knochenmark und Nabelschnurblut

Frühe T-Zell-Progenitoren sind unter anderem durch die Oberflächenmarker CD34, CD10 bzw. CD7 sowie CD45RA, einem Marker für naive T-Zellen zu charakterisieren. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurden in unserem Versuch Zellen mit diesen Oberflächenmarkern in peripheren Blutstammzellen (PBSC), Knochenmark und Nabelschnurblut gesucht. Für die Messungen standen 9 Knochenmarksproben, 5 Proben von PBSC aus LPH und 3 Nabelschnurblutproben zur Verfügung. Die Aquisition der Proben, die Analyse, Auswertung und Interpretation dieses ersten Teiles 3.1 der Promotionsarbeit wurden von der Promovendin selbstständig durchgeführt.

3.1.1 CD34⁺ lin⁻ Zellen im Knochenmark, Leukapheresat und Nabelschnurblut

Im Knochenmark fanden sich im Mittel 1,2% CD34⁺ Zellen, von diesen waren 30,7% ohne Linienmarker (lin⁻). Im Leukapheresat konnten wir ähnlich hohe Zellzahlen an CD34⁺ Zellen (MW 1,4%) messen, wohingegen der Anteil der Zellen ohne Linienmarker an der CD34⁺ Zellpopulation mit 2,0% geringer ausfiel. Im Nabelschnurblut fanden sich 0,7% CD34⁺ Zellen, von diesen waren 5,1% ohne Linienmarker.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Anteil der CD34⁺lin⁻ Zellen im Knochenmark mit 30,7% höher war als der Anteil der CD34⁺lin⁻ Zellen im Leukapheresat und im Nabelschnurblut (2,0% vs. 5,1%). (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Das Ergebnis wurde aufgrund des p-Wertes von 0,0023 als statistisch signifikant eingestuft (KWT). Überdies zeigte sich, dass der Anteil der CD34⁺ Zellen im Leukapheresat mit 1,4% etwas höher lag als im Knochenmark (1,2%) und im Nabelschnurblut (0,7%), wobei das Ergebnis mit einem p-Wert von 0,2130 als nicht statistisch signifikant eingestuft werden konnte.

Ergebnisse

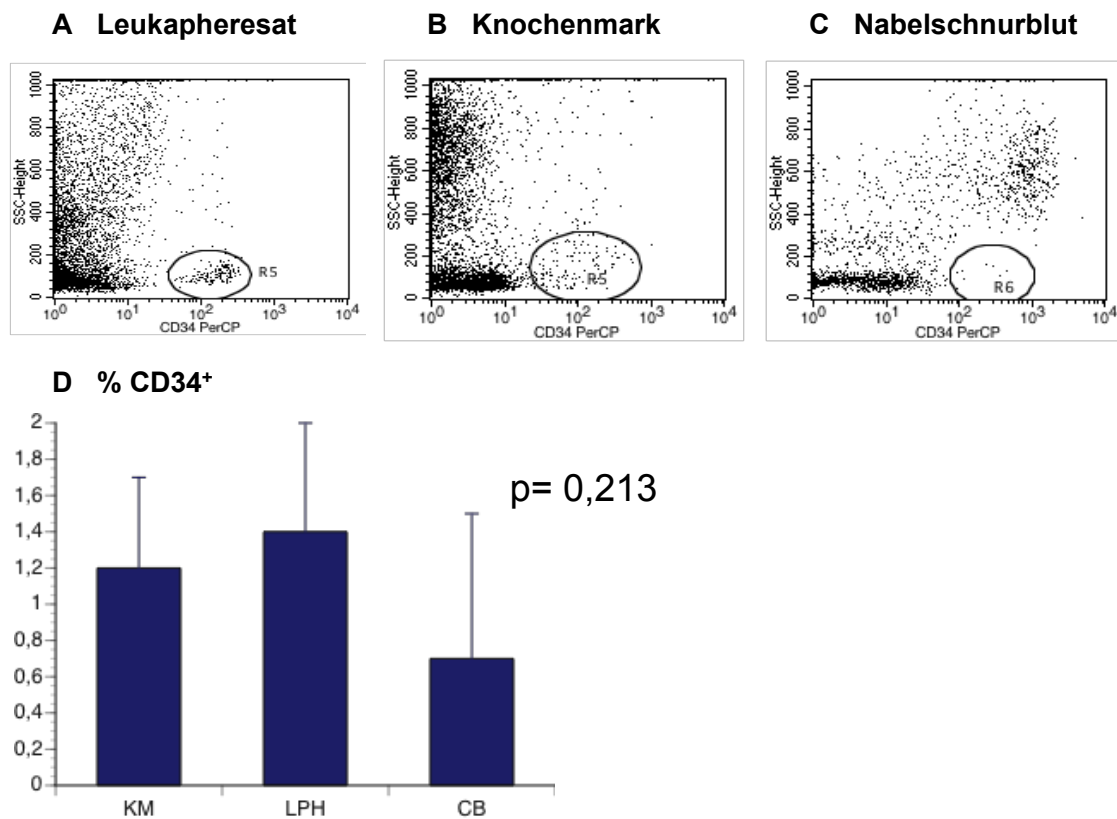


Abbildung 3.1: A,B,C : Repräsentative Beispiele für CD34⁺ Zellen im LPH, KM und CB: A) CD34⁺ Zellen im Leukapheresat (1,67%) (n= 5), B) CD34⁺ Zellen im Knochenmark (1,24%) (n=9), C) CD34⁺ Zellen im Nabelschnurblut (0,67%) (n=3), D) Grafische Darstellung der CD34⁺ Zellen in Prozent in allen Messungen. Die Balkendiagramme in dieser wie in den folgenden Abbildungen zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken). Abkürzungen: KM, Knochenmark; LPH, Leukapheresat; CB, Nabelschnurblut (engl. Cord Blood); SSC, Sideward Scatter. Die Meßwerte entsprechen den CD34⁺ Ereignissen bezogen auf die Gesamtpopulation.

Ergebnisse

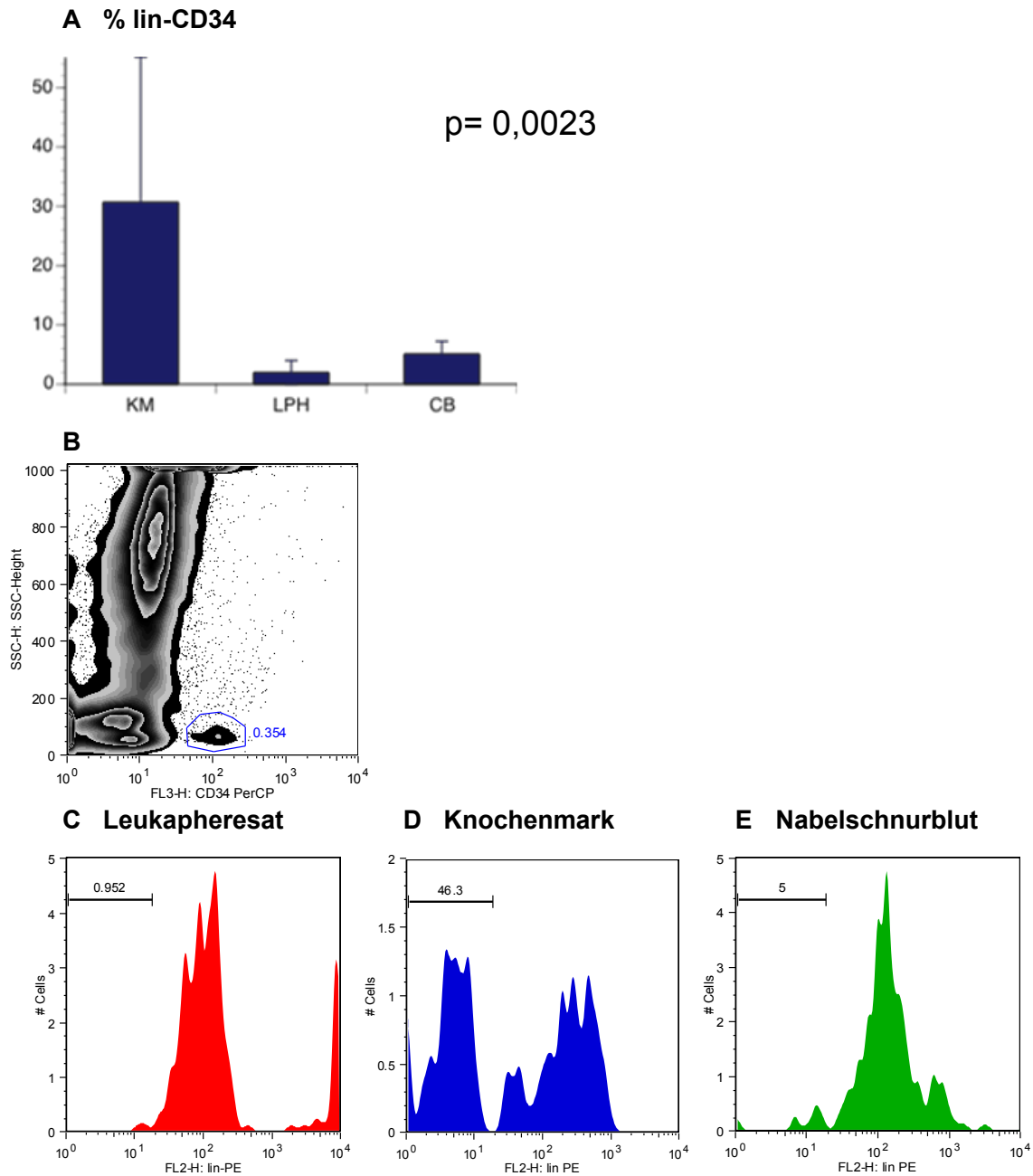


Abbildung 3.2: A) Grafische Darstellung der lin⁻CD34⁺ Zellen in allen Messungen in Prozent, B) Dargestellt sind alle Ereignisse SSC gegen CD34 mit definierender Region der CD34⁺ Zellen. C, D, E: Repräsentative Beispiele für C) den Anteil der lin⁻ Zellen an den gemessenen CD34⁺ Zellen im Leukapheresat (0,952%), D) den Anteil der lin⁻ Zellen an den gemessenen CD34⁺ Zellen im Knochenmark (46,3%), E) den Anteil der lineage negativen Zellen an den gemessenen CD34⁺ Zellen im Nabelschnurblut (5%). Abkürzungen: KM, Knochenmark; LPH, Leukapheresat; CB, Nabelschnurblut (engl. Cord Blood); SSC, Sideward Scatter. MW \pm -SD

3.1.2 CD34⁺lin⁻CD45RA^{hi}CD7⁺ Zellen im Knochenmark, Leukapheresat und Nabelschnurblut

In unseren Analysen wurde nach einer CD34⁺lin⁻CD45RA^{hi}CD7⁺ T-Progenitorzellpopulation im kindlichen Knochenmark und Leukapheresat sowie im Nabelschnurblut gesucht. Die bereits erwähnten CD34⁺lin⁻ Zellen (Abb. 3.2) wurden hierfür auf die Expression der Oberflächenmarker CD45RA und CD7 hin überprüft. Im Knochenmark fanden sich 0,6% CD45RA^{hi}CD7⁺ Zellen in der CD34⁺lin⁻ Zellpopulation. Im Leukapheresat waren es 1,7% CD45RA^{hi}CD7⁺ Zellen in der CD34⁺lin⁻ Zellpopulation. Im Nabelschnurblut konnten keine CD45RA^{hi}CD7⁺ CD34⁺lin⁻ Zellen gefunden werden (Abb. 3.3).

Zusammenfassend konnte in unserer Analyse nur eine sehr geringe Frequenz an CD45RA^{hi}CD7⁺CD34⁺lin⁻ Zellen im Knochenmark und Leukapheresat gefunden werden. Im Nabelschnurblut wurden keine Zellen dieser Population gefunden. Die Ergebnisse konnten als nicht statistisch signifikant eingestuft werden (p=0,2685).

Ergebnisse

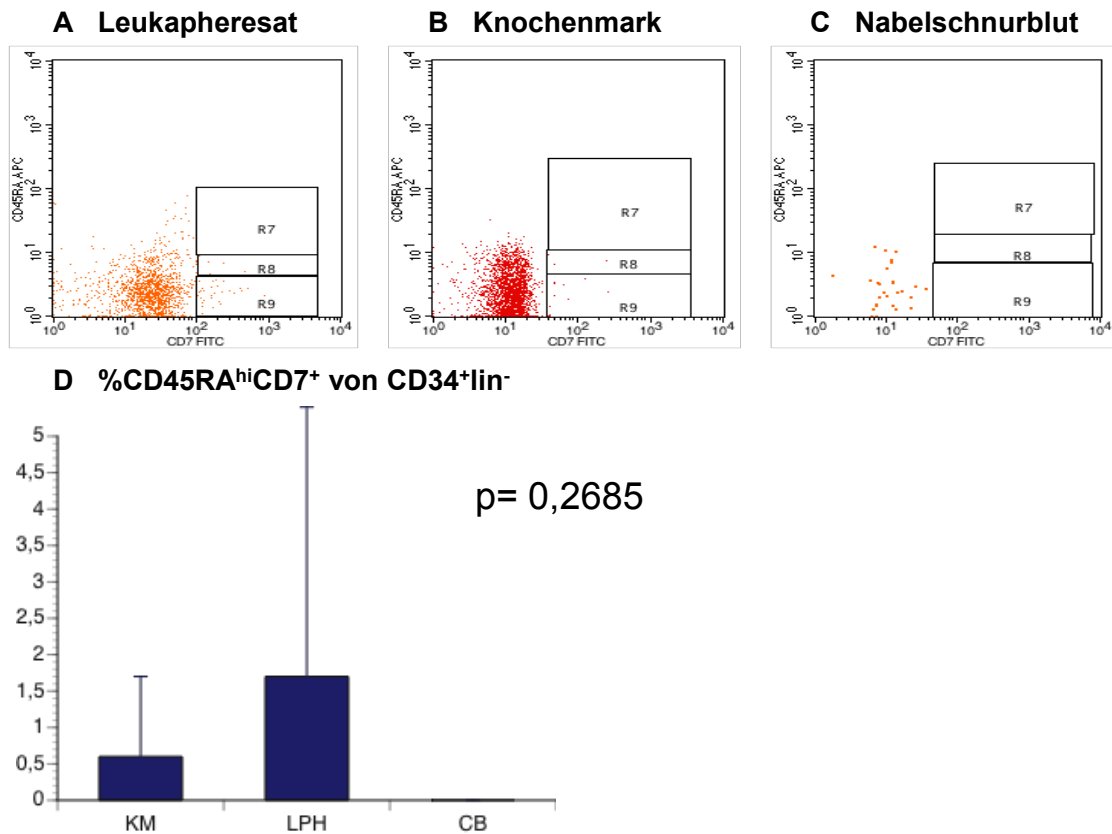


Abbildung 3.3: A,B,C Ausgewählte Beispiele für A) den Anteil der CD45RA^{hi}CD7⁺CD34⁺lin⁻ Zellen im Leukapheresat (R7 = 0%), B) den Anteil der CD45RA^{hi}CD7⁺ CD34⁺lin⁻ Zellen im Knochenmark (R7 = 0,06%), C) den Anteil der CD45RA^{hi}CD7⁺ CD34⁺lin⁻ Zellen im Nabelschnurblut (R7 = 0%), D) Grafische Darstellung der CD45RA^{hi}CD7⁺CD34⁺lin⁻ Zellen in allen Messungen in Prozent. Abkürzungen: KM, Knochenmark; LPH, Leukapheresat; CB, Nabelschnurblut (engl. Cord Blood).

3.1.3 CD34⁺lin⁻CD10⁺CD24⁻ Zellen im Knochenmark, Leukapheresat und Nabelschnurblut

Eine weitere beschriebene T-Progenitor-Population sind Zellen mit dem Phänotyp CD34⁺lin⁻CD10⁺CD24⁻. Diese Zellen haben ein geringes myeloides Potential, können aber B-, T- und NK-Zellen generieren. In der vorliegenden Analyse wurde Leukapheresat, Knochenmark und Nabelschnurblut auf diese CD34⁺lin⁻CD10⁺CD24⁻ Zellpopulation untersucht. Im Knochenmark fanden sich 5,2% Zellen mit dem Phänotyp CD10⁺CD24⁻ in der CD34⁺lin⁻ Zellpopulation. Im Leukapheresat wurde ein Anteil von 4,85% CD10⁺CD24⁻ an der CD34⁺lin⁻ Zellpopulation gezählt. Im Nabelschnurblut konnte ein Zellanteil von 3,0% CD10⁺CD24⁻ Zellen in der CD34⁺lin⁻ Zellpopulation gefunden werden (Abb. 3.4).

Ergebnisse

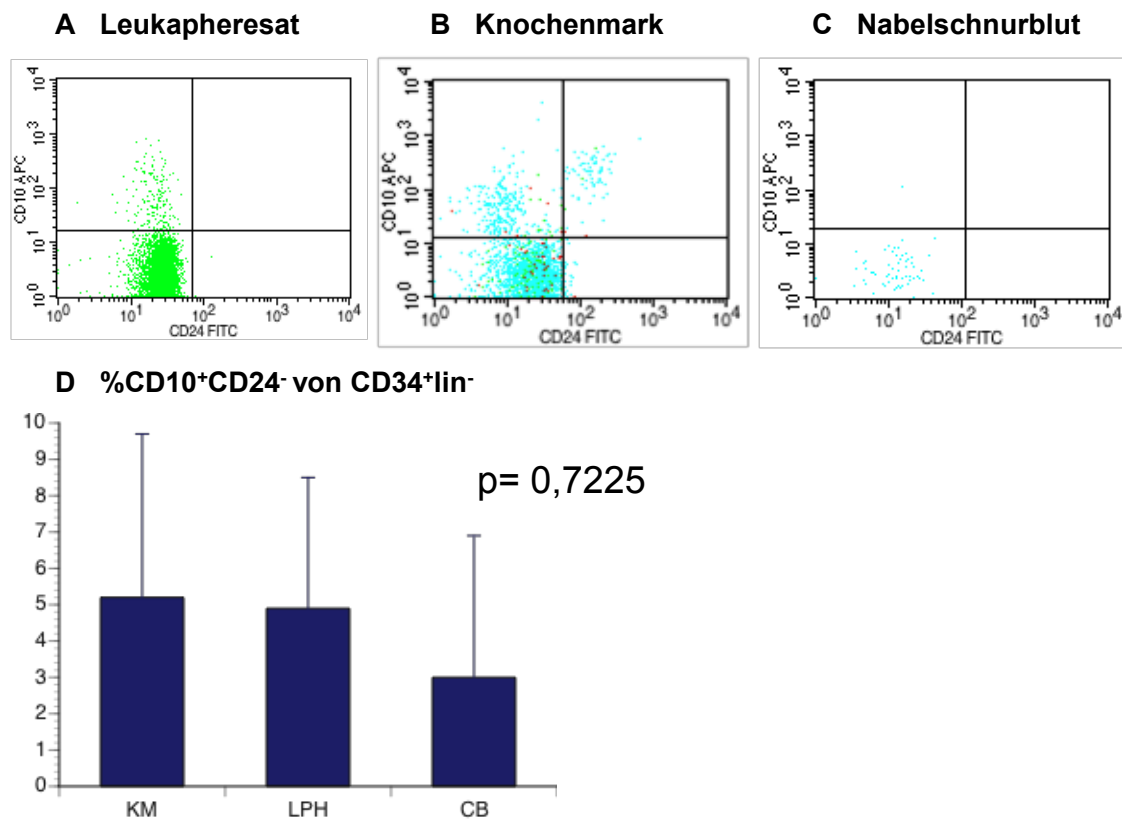


Abbildung 3.4: A, B, C Repräsentative Beispiele für A) den Anteil der CD34⁺ lin⁻ CD10⁺CD24⁻ Zellen im Leukapheresat (4,52%), B) den Anteil der CD34⁺ lin⁻ CD10⁺CD24⁻ Zellen im Knochenmark (13,46%), C) den Anteil der CD34⁺ lin⁻ CD10⁺CD24⁻ Zellen im Nabelschnurblut (1,62%), D) Anteil der CD34⁺ lin⁻ CD10⁺CD24⁻ Zellen in allen Messungen in Prozent. Abkürzungen: KM, Knochenmark; LPH, Leukapheresat; CB, Nabelschnurblut (engl. Cord Blood)

Es konnten demnach in den Stammzellquellen Knochenmark und Leukapheresat ähnlich hohe Zellzahlen an CD34⁺lin⁻CD10⁺CD24⁻ Zellen gefunden werden (5,2% vs. 4,85%), wohingegen diese Zellpopulation im Nabelschnurblut in etwas geringerer Frequenz auftrat (3,0%) (p= 0,7225).

3.2 3D-Zellkulturmatrix

3.2.1 Kokultur der CD34⁺ Progenitoren mit humanem Thymus als Stromazellquelle

Auf der Grundlage der Versuche von Poznansky et al. wurden CD34⁺ Zellen auf einer 3D-Zellkulturmatrix kultiviert, mit dem Ziel, *in vitro* naive T-Zellen zu

Ergebnisse

erzeugen. Die praktische Durchführung dieser 3.2 erwähnten Experimente war bereits vor einigen Jahren von Herrn Dipl.biol. Gernot Wollny erfolgt, die Auswertung und Interpretation dieser Daten war nun Gegenstand des zweiten Teiles dieser Promotionsarbeit.

Im ersten Schritt wurde die 3D-Zellkulturmatrix mit Stromazellen aus Thymusgewebe besiedelt, danach wurden humane CD34⁺ PBSC aus Leukapheresat zugegeben. Die Kokulturen mit CD34⁺ Zellen enthielten nach 21 Kulturtagen $4,5 \pm 1,9 \times 10^4$ Zellen (MW \pm SD). Diese Zellen wurden aufgrund ihrer Eigenschaften in der Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht-Darstellung der mononukleären Reihe zugeordnet (Abb. 3.5 A). Die Negativkontrollen, bei denen die Stromakulturen ohne CD34⁺ Zellen weiterkultiviert worden waren, zeigten eine wesentlich geringere Zellzahl ($1,4 \pm 1,1 \times 10^4$ Zellen) (Abb. 3.5 B).

Die Anzahl der Zellen in der Monozytenregion in der Kultur mit CD34⁺ Zellen war signifikant höher als in derselben Zellregion in der Zellkultur ohne CD34⁺ Zellen ($p = 0,0094$) (Abb. 3.5 A vs. 3.5 B).

Am 7. Tag nach der Zugabe der CD34⁺ Zellen konnten schon 5×10^3 nicht adhärenente CD3⁺CD34⁻ T-Zellen gezählt werden, wobei die Zellzahl am 14. und 21. Tag langsam bis auf 1×10^4 Zellen anstieg (Abb. 3.5 D und 3.5 E). Die Rate von CD4:CD8 war $0,51 \pm 0,39$ %.

24 ± 14 % dieser Zellen waren doppelt positiv für CD4 und CD8 (MW \pm SD).

Auf den ersten Blick lag die Vermutung nahe, dass hier eine *de novo* Erzeugung von T-Zellen stattgefunden hatte.

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt durch die Zugabe von Zytokinen noch stimuliert werden könnte, wurden in einigen Kulturen die Interleukine 7 und/oder 15 hinzugefügt. Hierbei konnte jedoch keine Beeinflussung des Wachstums festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Kontroll-Kulturen ohne Zugabe von CD34⁺ HSZ enthielten allerdings bei der Überprüfung genauso viele CD3⁺ Zellen wie die Kulturen mit CD34⁺ Zellen (Abb. 3.5 D). Darüber hinaus konnte in der Kultur ohne CD34⁺ HSZ eine ähnlich große Population von CD4⁺CD8⁺ T-Zellen gefunden werden wie in der Kultur, die CD34⁺ Zellen enthielt. Diese Ergebnisse wurden als ein Hinweis darauf gewertet, dass es sich bei den detektierten T-Zellen um Thymozyten aus dem

Ergebnisse

Thymusgewebe handelt und nicht, wie zunächst angenommen, eine *de novo* Erzeugung von T-Zellen stattgefunden hatte.

Diese Vermutung konnte durch die Zugabe von Fludarabin, einer lymphotoxischen Substanz, zu der CD34⁺ Kontroll-Kultur bestätigt werden, da die T-Zellen in dieser Kultur vollständig verschwanden (Abb. 3.5 C).

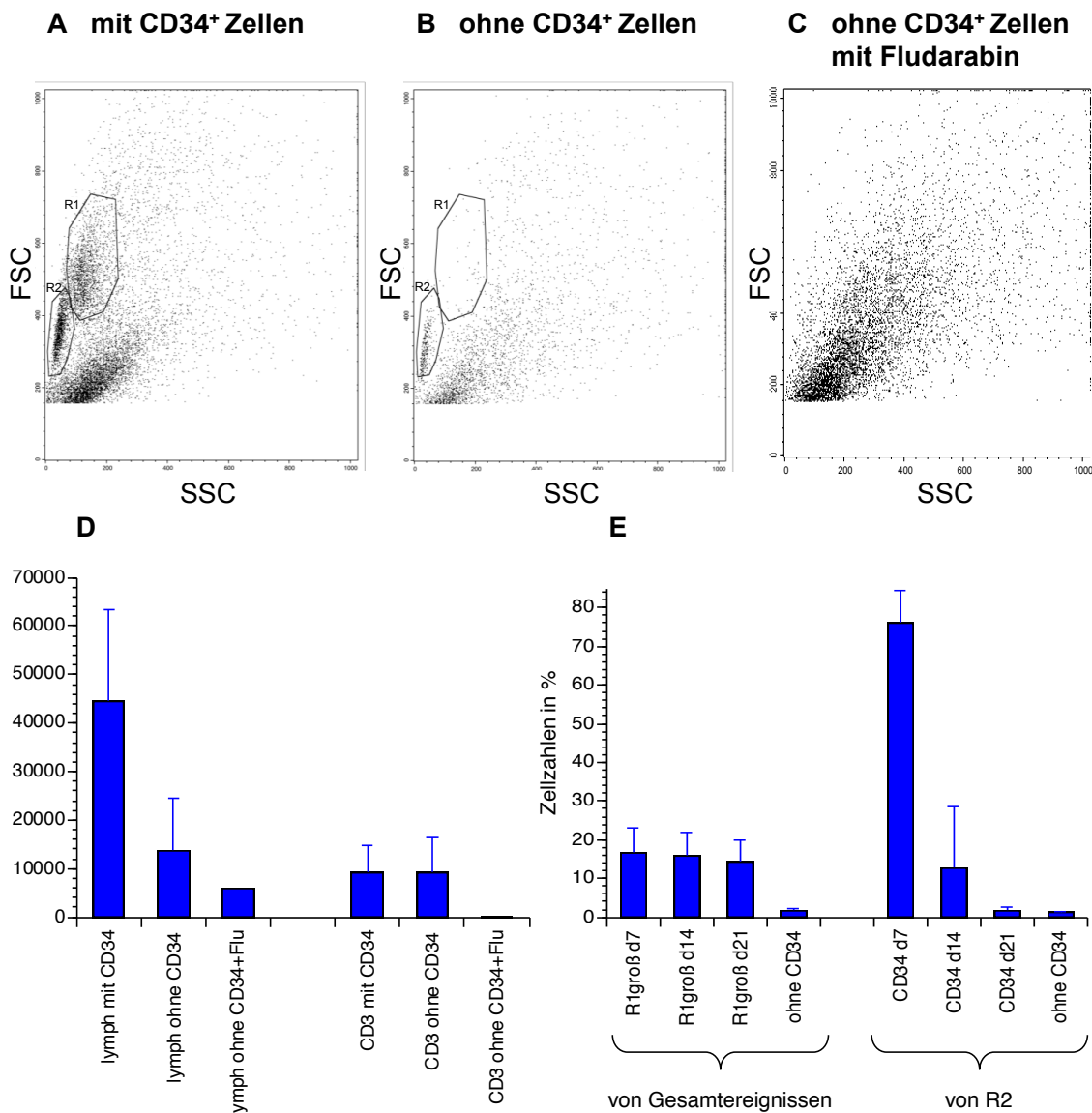


Abbildung 3.5: 3D-Kokultur von humanen adulten peripheren Blutstammzellen (PBSC) auf humanem Thymusgewebe. A) Die 3D-Matrix wurde mit Stromazellen von humanem Thymus beschichtet, mit 1×10^5 humanen adulten CD34⁺ PBSC beimpft und für 27 Tage kultiviert. Die Morphologie der Zellen nach 3 Kokultur-Wochen ist in der Abbildung A zu sehen, B) die Negativkontrolle enthält Kulturen ohne CD34⁺ PBSC, C) Negativkontrolle ohne CD34⁺ PBSC aber unter Zugabe von Fludarabin, einem lymphotoxischen Stoff zur Beseitigung von Restlymphozyten aus dem Thymusgewebe, D) absolute Zellzahlen der geernteten Zellen nach dreiwöchiger Kokultur, E) dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen mit Makrophagen/unreifen Monozyten-

Eigenschaften (R1) von allen Ereignissen (linke Säulen) sowie der Anteil der CD34⁺ Ereignisse in R2 rechte Säulen, jeweils in Abhängigkeit von der Kulturzeit. Abkürzungen: 3D, dreidimensional; PBSC, periphere Blutstammzellen; FSC, forward scatter; SSC, sideward scatter.

3.2.2 Kokultur der CD34⁺ Zellen mit humanen Hautfibroblasten

Die Möglichkeit menschliche Haut als Stromazellquelle für die Reifung von Zellen zu nutzen wurde von Upton et al. berichtet (Upton et al. 2003). Aufgrund der breiten Verfügbarkeit würde die Verwendung von menschlicher Haut als Stromazellquelle einen großen klinischen Vorteil erbringen.

Dementsprechend wurde im nächsten Versuch von Herrn Wollny untersucht, ob menschliche Hautstromazellen die Reifung von T-Zellen in einem *in vitro* Kultursystem unterstützen könnten. Analog zu den Thymuskulturen wurde die 3D-Matrix zunächst mit zwei verschiedenen Konzentrationen von CD34⁺ Zellen beimpft. Auch in diesem Versuchsaufbau zeigten die meisten Zellen, ähnlich wie in dem Ansatz mit humanem Thymus als Stromazellquelle, monozytäre Eigenschaften in der FSC/SSC Darstellung (Abb. 3.6 A).

Nach 14-19 Tagen Kulturzeit war die Zahl der monozytären Zellen $4,2 \pm 1,7 \times 10^4$ in der Kultur mit $1,5 \times 10^6$ CD34⁺ Zellen und $4,8 \pm 4,7 \times 10^3$ in der Kultur mit 1×10^5 CD34⁺ Zellen (MW \pm SD). Im Vergleich zu den Kulturen mit humanem Thymus als Stromazellquelle bedeutete dies ein 10fach geringeres Wachstum der Zellen (Abb. 3.6 C).

Von den 9 angelegten Kulturen mit humanen Hautfibroblasten zeigte lediglich eine Kultur eine kleine Population von CD3⁺ Zellen (1,2 % von allen Zellen) (Abb. 3.6 A). In der genaueren Analyse hatten diese Zellen jedoch zu 98% den Phänotyp CD4⁺CD45RO⁺, was den Schluss nahe legt, dass es sich hierbei um Gedächtniszellen handelt. Darüber hinaus war keine Zelle doppelt positiv für CD4 und CD8.

Ergebnisse

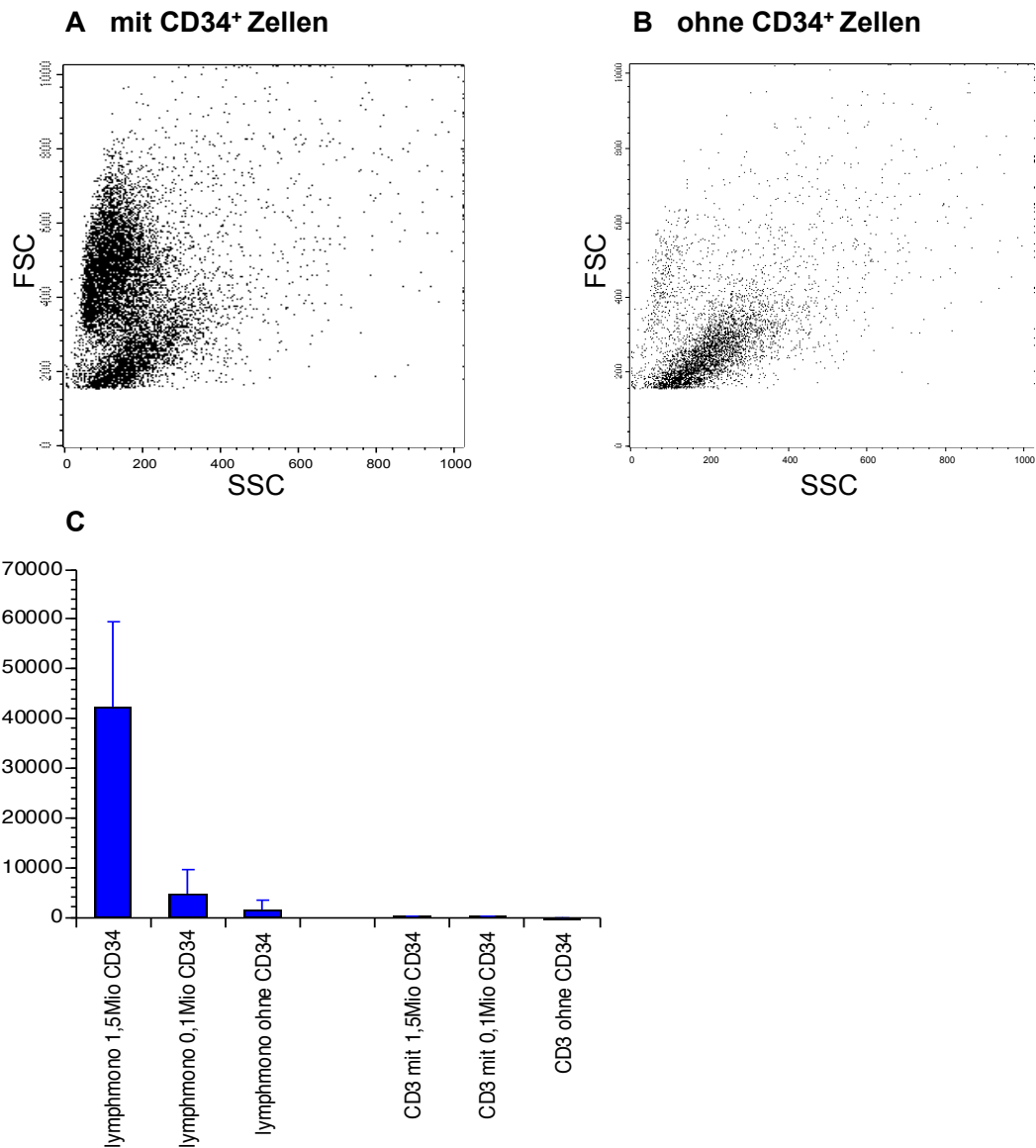


Abbildung 3.6: 3D-Kokultur von humanen adulten peripheren Blutstammzellen (PBSC) auf humanen Hautstromazellen. A, B) Die 3D-Matrix wurde mit humanen Hautstromazellen beschichtet, dann mit humanen adulten CD34⁺ PBSC beimpft und für 22-35 Tage kultiviert. A) Morphologie der Zellen mit CD34⁺ Zellen in FSC/SSC, B) Morphologie der Zellen ohne Zugabe von CD34⁺ Zellen in FSC/SSC, C) absolute Zellzahlen der geernteten Zellen mit mononukleären Eigenschaften nach 19 Tagen Kokultur mit $1,5 \times 10^6$ CD34⁺ Zellen, $0,1 \times 10^6$ CD34⁺ Zellen oder ohne Zugabe von CD34⁺ Zellen. Abkürzungen: 3D, dreidimensional; PBSC, periphere Blutstammzellen; FSC, forward scatter; SSC, sideward scatter.

4. DISKUSSION

Die T-Zell vermittelte Immunabwehr spielt eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Die HIV-Epidemie hat in diesem Zusammenhang die Bedeutung von CD4⁺ T-Helferzellen deutlich gemacht: immungeschwächte Patienten, die unter einem Mangel an CD4⁺ T-Helferzellen leiden, sind besonders gefährdet an opportunistischen Infektionen oder Lymphomen zu erkranken.

Die Forschung an T-Zellen steht aufgrund ihrer großen klinischen Bedeutung seit Jahren im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses. Insbesondere die genaue Kenntnis der frühen Reifungsstadien von T-Lymphozyten könnte unter Umständen große Fortschritte bei der Therapie von Immundefekten ermöglichen. Eine der Behandlungsoptionen wäre die Therapie von Immundefekten mit *in vitro* hergestellten naiven T-Zellen.

T-Zellen haben ihren Ursprung in hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks (HPSZ) und durchlaufen ihre letzten Reifungsschritte im Thymus.

Bei der Reifung zu T-Zellen verlieren die Progenitorzellen dabei ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und bilden Oberflächenantigene aus, anhand derer man sie einer bestimmten Zelllinie zuordnen kann (CD4 → T-Helferzelle, CD8 → T-Zytotoxische Zelle). Trotz intensiver Forschung am Reifungsprozess von T-Zell-Progenitoren bleibt weiterhin unklar, welche Charakteristika die T-Zell-Progenitoren aufweisen, die aus dem Knochenmark auswandern und den Thymus besiedeln.

Im vorliegenden Versuch wurden deshalb CD34⁺ Stammzellen auf bestimmte T-Zell-Progenitormerkmale hin untersucht. Die Grundlage hierfür waren die Publikationen von Haddad et al. aus dem Jahr 2004 und Six et al. aus dem Jahr 2007. Beide Forschungsgruppen hatten CD34⁺ Stammzellen aus Knochenmark und Nabelschnurblut auf ihr Potential, Lymphozyten zu generieren, untersucht. In unserem Versuch wurde neben CD34⁺ Stammzellen aus Knochenmark und Nabelschnurblut auch Stammzellen aus Leukapheresat analysiert. Ziel hierbei

war es, frühe Progenitorzellen zu identifizieren, die ein erhöhtes lymphoides Potential aufweisen.

4.1 Hämatopoetische Stammzellen mit lymphoidem Potential

Die hämatopoetische Stammzelle als Ursprung aller Blutzellen hat die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur Differenzierung in alle lymphatischen oder myeloiden Reihen. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass die Annahme einer Differenzierung der hämatopoetischen Progenitorzellen in eine Progenitorzelle mit strikt lymphoidem (CLP) oder myeloischem Potential (CMP) vermutlich nicht zutrifft. Es zeigte sich vielmehr, dass frühe lymphoide Progenitorzellen eine heterogene Gruppe darstellen, die bis zu einem gewissen Grad die Möglichkeit der Differenzierung in andere Zelllinien behalten (Bell et al. 2008, Wada et al. 2008).

Auf der Suche nach definierten lymphoiden Progenitorzellen wurden viele verschiedene Phänotypen mit lymphoidem Potential gefunden (Petrie und Kincade 2005, Bhandoola et al. 2006, Wu et al. 2006).

Im Mausmodell konnte eine hämatopoetische Stammzelle mit einem umfassenden Linienpotential gefunden werden, die keine linienspezifischen Marker trägt (lin^-), sondern den Tyrosinkinase-rezeptor c-Kit und das Stammzellantigen Ly-6A/E (Sca-1) hoch exprimiert (Ikuta und Weissmann 1992, Morrison und Weissman 1995). Innerhalb dieser Lin^- Sca-1 c -Kit Stammzellpopulation konnten verschiedene Populationen gefunden werden, die die Fähigkeit haben, den Thymus zu besiedeln und T-Zellen zu generieren.

Eine andere T-Progenitor-Zellpopulation konnte überdies innerhalb der $CD4^-$ $CD8^-$ Zellpopulation (double negative = DN) im Thymus gefunden werden (Fowlkes et al. 1985, Ceredig et al. 1983). Diese DN Population konnte durch die Expression von CD25 und CD44 in Subpopulationen (DN1, DN2, DN3) geteilt werden. Die meisten Progenitorzellen gehörten einer $CD25^+CD44^-$ (DN1) Population an und konnten B-, T- und NK-Zellen generieren (Bhandoola et al. 2006).

Im Nabelschnurblut wurden darüber hinaus zwei lymphoide Progenitorpopulationen identifiziert, die eine erhöhte Homingkapazität für den

Thymus aufweisen: Die eine Population waren $lin^-CD34^+CD45RA^{hi}CD7^+$ hämatopoetische Progenitorzellen, die auch im Knochenmark gefunden wurden. Diese Zellen zeigten das Potential zur Differenzierung in alle 3 lymphatischen Zellreihen, wobei die meisten Zellen in die T- und NK-Zelllinie differenzierten (Haddad et al. 2004). Die andere Progenitorpopulation wurde ebenso im Knochenmark wie im Nabelschnurblut gefunden. Es handelte sich um eine $lin^-CD34^+CD10^+CD24^-$ Zellpopulation, die ein geringes Potential zur Differenzierung in myeloische Zellen zeigte, aber B-, T- und NK-Zellen generieren konnte (Six et al. 2007).

In der Gesamtbetrachtung zeigt sich durch die zahlreichen Vorarbeiten, dass es viele verschiedene Progenitorpopulationen gibt, die T-Zellen generieren können. In welcher Frequenz Zellen mit erhöhtem T-Zellpotential auftreten, ist allerdings unklar. Um herauszufinden, ob es Unterschiede bezüglich der Frequenz der Progenitoren in verschiedenen Stammzellquellen gibt, wurden in der vorliegenden Arbeit auf der Grundlage der Arbeiten von Six et al. und Haddad et al., lymphoide Progenitorpopulationen im Leukapheresat, Knochenmark und Nabelschnurblut untersucht.

4.2 CD34⁺lin⁻ im Leukapheresat, Knochenmark und Nabelschnurblut

Im Leukapheresat, Knochenmark und Nabelschnurblut konnten wir ähnliche Frequenzen von CD34⁺ Stammzellen feststellen. Es fanden sich im Leukapheresat 1,4%, im Knochenmark 1,2% und im Nabelschnurblut 0,7% CD34⁺ Zellen. Um die CD34⁺ Stammzellen näher zu untersuchen, wurden sie auf ihre Expression von Linienmarkern untersucht. Durch die Gatingstrategie wurden nur die Zellen mit in die weitere Analyse einbezogen, die noch nicht bezüglich der Differenzierung in eine bestimmte Linie festgelegt sind. Lineage positive, reifere Zellen exprimieren hingegen die Antigene CD3 (T-Zellen), CD13 (Monozyten, Granulozyten), CD14 (Monozyten), CD15 (Granulozyten), CD16 (NK-Zellen, Granulozyten), CD 19 (B-Zellen), CD33 (myeloische Zellen), CD56 (NK-Zellen) und wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Ziel dabei war es nur die Zellen zu untersuchen, die noch keine Differenzierungsmarker tragen.

Diskussion

Interessanterweise konnten wir feststellen, dass der Anteil der Linienmarker negativen Zellen an der CD34⁺ Zellpopulation im Knochenmark mit 30,7% signifikant höher war als im Leukapheresat (2%) und im Nabelschnurblut (5,1%) ($p=0,0023$). Die Zahl der frühen, unreifen Progenitorzellen war demnach im Knochenmark innerhalb der CD34⁺ Population signifikant höher als im Leukapheresat und im Nabelschnurblut.

Mit der Entdeckung, Charakterisierung und klinischen Nutzung von G-CSF (Welte et al. 1985) bot sich in den 80er Jahren zum ersten Mal eine Alternative zur Stammzellgewinnung durch Knochenmarkentnahme. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von G-CSF beim Menschen eine Mobilisierung von CD34⁺ Stammzellen in das periphere Blut bewirkt (Gianni et al. 1989). Für den Empfänger bietet die mit G-CSF mobilisierten PBSC den Vorteil einer schnelleren hämatopoetischen Regeneration und einer niedrigeren Rate an febrilen Neutropenien (Byrne et al. 1998, Bensinger et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der frühen, unreifen, Linienmarker-negativen Progenitoren im Knochenmark höher war als im Leukapheresat. Die Frequenz der Zellen mit lymphoidem Potential war jedoch nicht statistisch signifikant verschieden (Abb. 3.3). Physiologischerweise reifen lymphoide Progenitoren bis zu einem gewissen Grad im Knochenmark heran und gelangen daraufhin über den Blutweg zur weiteren Reifung in den Thymus. Unsere Ergebnisse legen jedoch die Vermutung nahe, dass sich die Zahl der Progenitoren mit lymphoidem Potential (CTLPs) im Knochenmark nicht von der im Leukapheresat unterscheidet. Möglicherweise werden durch die Gabe von G-CSF nur bestimmte, reifere Subpopulationen von Progenitorzellen zur Auswanderung ins periphere Blut stimuliert. Bisherige Analysen zur phänotypischen Charakterisierung von unterschiedlichen Zellsubpopulationen im Knochenmark im Vergleich zu Leukapheresat fokussieren insbesondere auf myeloische Progenitoren und zeigen deren erhöhte Frequenz im Leukapheresat im Vergleich zu Knochenmark (Theilgaard-Mönch et al. 2003, Ho et al. 1996). Auch Daten unserer Arbeitsgruppe belegen, daß es sich bei den G-CSF mobilisierten

hämatopoetischen Stammzellen um ausschließlich $CD34^+CD38^+$ Zellen handelt (Eyrich et al. 2011).

In verschiedenen Studien konnte ein schnelleres Engraftment, d.h. eine schnellere Etablierung und Funktionsaufnahme der Spenderstammzellen im Empfängerorganismus nach peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSZT) im Vergleich zur Knochenmarkstransplantation gezeigt werden (Glaspy et al. 1996, Blaise et al. 2000)

Es ist zu vermuten, daß das schnelle Engraftment nach peripherer Blutstammzelltransplantation durch die höhere Frequenz an myeloiden Progenitoren im Leukapheresat im Vergleich zu Knochenmark erklärt werden kann.

4.3 $CD34^+lin^-CD45RA^{hi}CD7^+$ Zellen im Knochenmark, Leukapheresat und Nabelschnurblut

Um das Ziel, T-Vorläuferzellen zu finden, weiterzuverfolgen, wurde Leukapheresat, Knochenmark und Nabelschnurblut auf eine Stammzellpopulation ($CD34^+lin^-CD45RA^{hi}CD7^+$) hin untersucht, von deren lymphoiden Potential die Forschungsgruppe um Haddad et al. berichtet hatte.

In unseren Analysen zeigte sich, dass diese Progenitorpopulation mit 0,6% im Knochenmark und 1,7% im Leukapheresat zu finden war. Im Nabelschnurblut lagen diese Progenitorzellen unter der Nachweisgrenze unserer Meßmethode.

In Übereinstimmung mit der Publikation von Haddad et al. lässt sich folglich diese $CD34^+lin^-CD45RA^{hi}CD7^+$ Zellpopulation im Knochenmark, in unserem Versuch jedoch nicht im Nabelschnurblut finden. In der durchflusszytometrischen Analyse liegt die Nachweisgrenze für Zellpopulationen bei 0,01%, sodass möglicherweise durch eine sensitivere Methode der Nachweis der gesuchten Zellen im Nabelschnurblut erfolgen könnte.

Ein Absolutvergleich der Zellzahlen ließ sich allerdings aufgrund von fehlenden Angaben in der Publikation von Haddad et al. nicht durchführen.

4.4 lin⁻CD34⁺CD10⁺CD24⁻ Zellen im Leukapheresat, Knochenmark und Nabelschnurblut

In einem weiteren Ansatz wurde Leukapheresat, Knochenmark und Nabelschnurblut auf der Grundlage von Six et al. auf die Frequenz von lin⁻CD34⁺CD10⁺CD24⁻ Zellen hin untersucht. Es fanden sich innerhalb der lin⁻CD34⁺ Fraktion 5,2% CD10⁺CD24⁻ Zellen im Knochenmark, 4,85% im Leukapheresat und 3,0% im Nabelschnurblut. Im Vergleich zu Six et al. fällt die Frequenz dieser lin⁻CD34⁺CD10⁺CD24⁻ Zellpopulation in unserem Versuch wesentlich geringer aus. Six et al. berichtet von 12% CD10⁺CD24⁻ Zellen innerhalb der lin⁻CD34⁺ Zellpopulation. Eine ähnlich hohe Zellzahl ergibt sich in unserem Versuch bezüglich des Anteils der CD10⁺CD24⁻ Zellen innerhalb der CD34⁺ Gesamtzellpopulation. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass in der Publikation von Six et al. die lineage positiven Zellen nicht ausgeschlossen wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beiden T-Zellprogenitor-Populationen, die in den Publikationen von Haddad et al. und Six et al. beschrieben werden, grundsätzlich zu finden sind. Ein genauere Vergleich unserer Analysen mit den in den oben genannten Publikationen beschriebenen Ergebnissen war nicht möglich, da in den Publikationen von Six et al. und Haddad et al. detaillierte Angaben zu den Ergebnissen fehlen.

In unseren Messungen konnten wir darstellen, dass die Zahl der CD34⁺lin⁻CD45RA^{hi}CD7⁺ Progenitoren im Leukapheresat tendenziell höher, aber nicht signifikant verschieden war als im Knochenmark und Nabelschnurblut. Die Frequenz der lin⁻CD34⁺CD10⁺CD24⁻ Progenitoren war in allen drei untersuchten Stammzellquellen etwa gleich.

4.5 T-Zell-Reifung auf 3D Matrix

Die oben beschriebenen CTLPs sind vermutlich ideale Ausgangsprogenitoren um auch *in vitro* rasch eine artifizielle T-Zell-Differenzierung induzieren zu können.

In den letzten Jahren sind verschiedene *in vitro* Kultursysteme entwickelt worden, um die Reifung von T-Zellen im Thymus besser nachvollziehen zu können. Die dreidimensionale Architektur des Thymus mit seinem Maschenwerk und der daraus resultierenden Zell-Zell-Interaktion hat sich in diesem Zusammenhang als besonders essentiell für die T-Zell-Reifung herausgestellt (Bobyne et al. 1999). Auf der Grundlage dieser Erkenntnis wurde eine Zellkulturmatrix entwickelt, die als biokompatibles Material bereits zur Therapie von Knochendefekten eingesetzt wurde. Auf ein feinretikuläres Karbonskelett wird hierzu bei hoher Temperatur Tantalum aufgebracht, ein in der Medizin häufig verwendetes biokompatibles Material. (Bobyne et al. 1999, Black et al. 1994). Die großen Vorteile dieses dreidimensionalen Systems konnten auch für die Reifung von T-Zellen festgestellt werden. Es zeigte sich, dass nach der Zugabe von CD34⁺ Zellen auf diese neue Zellkulturmatrix tatsächlich *de novo* generierte CD3⁺ T-Zellen gefunden werden konnten (Poznansky et al. 2000).

Viele verschiedene Studien zu *in vitro* T-Zell-Kulturen wurden bisher veröffentlicht. Dabei wurden verschiedene Stammzellquellen auf ihre Möglichkeit T-Zellen zu generieren untersucht. Zu erwähnen sind hierbei: CD34⁺ Zellen aus fetaler Leber (Schmitt et al. 2002), Knochenmark (De Smedt et al. 2004), Nabelschnurblut und postnatalem Thymus (Van Coppenolle et al. 2009). Bisher ist nicht untersucht worden, inwieweit auch aus G-CSF mobilisierte CD34⁺ PBSZ in der Lage sind, auf einem artifiziellen Kultursystem CD3⁺ T-Zellen zu bilden. In unserem Versuch wurden deshalb CD34⁺ Zellen aus Leukapheresat auf ihr Potential getestet, auf einer mit Stromazellen beschichteten Zellkulturmatrix T-Zellen zu generieren. Als Stromazellquelle dienten humane Hautfibroblasten bzw. humane Thymusfragmente.

4.6 Kokultur mit humanen Hautfibroblasten

Der Einsatz von humaner Haut als Stromazellquelle wurde bereits in einem Abstract publiziert und würde einen großen klinischen Vorteil aufgrund der breiten Verfügbarkeit erbringen (Upton et al. 2003).

Im ersten Schritt wurde deshalb die dreidimensionale Zellkulturmatrix mit humanen Hautfibroblasten als Stromazellquelle beschichtet und mit CD34⁺ peripheren Blutstammzellen kokultiviert. Nach 14-19 Tagen Kulturzeit zeigte lediglich eine der neun angelegten Kulturen eine kleine Population von CD3⁺ Zellen. Der Großteil der Zellen war hingegen in der FSC/SSC Analyse in der monozytären Region zu finden. Die CD3⁺ Zellen waren hauptsächlich CD4⁺, 98% dieser Zellen exprimierten CD45RO, einen Marker für T-Gedächtniszellen bzw. aktivierte T-Zellen. Es konnten keine CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven Thymozyten gemessen werden. Dies führte zu der Annahme, dass die in der Analyse gemessenen CD3⁺ T-Zellen nicht *de novo* generiert worden sind, sondern Abkömmlinge von residuellen T-Zellen aus den CD34⁺ Stammzellpräparaten waren oder sich in den Hautfragmenten befanden, die als Stromazellquelle genutzt wurden. Die von uns eingesetzten CD34⁺ Stammzellen differenzierten zu myelomonozytären Zellen (Abb.5 E).

4.7 Kokultur mit humanen Thymusfragmenten

Bei der Kultur mit humanen Thymusfragmenten als Stromazellquelle zeigte sich nach der Zugabe von CD34⁺ ein ähnliches Ergebnis. Die Mehrzahl der Zellen wurde im FACS in der Monozyten-Region gefunden. Darüber hinaus konnten am 7 Tag 5×10^3 CD3⁺ Zellen entdeckt werden. Von diesen waren 24 \pm 14% doppelt positiv für CD4 und CD8. Die Vermutung, dass in dieser Zellkultur eine *de novo* Erzeugung von T-Zellen stattgefunden hatte, konnte dennoch nicht bestätigt werden. Die Kontrollkulturen, die nicht mit CD34⁺ Zellen beimpft wurden, enthielten bei der Überprüfung genauso viele CD3⁺ Zellen wie die Kulturen mit CD34⁺ Zellen. In der Kontrollkultur konnte außerdem eine ähnliche Rate an doppelt positiven CD4/CD8 Zellen gemessen werden. Mit der Zugabe von Fludarabin, einem lymphotoxischen Stoff, zu den CD34⁻ Kontrollkulturen verschwanden die T-Zellen vollständig.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse von Poznansky et al. und Upton et al. in unseren Versuchen nicht bestätigt werden. Weder mit humaner Haut noch mit humanem Thymus als Stromazellquelle konnten auf der 3D-Zellkultur T-

Zellen generiert werden. Es wurden vielmehr überwiegend Zellen mit monozytäre Eigenschaften erzeugt und die CD3⁺ Zellen, die gemessen wurden, konnten als Residuen aus den Stammzellpräparaten oder den Stromazellquellen identifiziert werden.

4.8 Ausblick

4.8.1 Bedeutung des Notch-Signalwegs für die T-Zell-Reifung

Notch-Proteine gehören zu einer Familie von Transmembranproteinen, deren Rezeptoren und Liganden in Zellen und Organen des Immunsystems exprimiert werden und an dessen Regulation beteiligt sind. Eine besondere Rolle von Notch und seinen Liganden konnte bei der Differenzierung von lymphatischen Zellen im Knochenmark und Thymus festgestellt werden. Für die frühe T-Zell-Differenzierung ist eine Aktivierung durch den Notch-Rezeptor-Ligand *Delta like 1* (DLL1) erforderlich. Dieser fördert die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen in T-Zellen und verhindert die Differenzierung in B-Zellen (Schmitt und Zúñiga-Pflücker 2002, Awong et al. 2009).

Ein möglicher Grund für das fehlende Wachstum von T-Zellen in unserem Experiment könnte sein, dass die Expression von Notch und seinen Liganden in diesem System nicht definiert wurde. Der für die T-Zell-Reifung wichtige Ligand DLL1 wird zwar von Epithelzellen des Thymus exprimiert, aber nicht nur die Existenz, sondern auch die Expressionsstärke der DLL1 Liganden scheint eine wichtige Rolle zu spielen (Dallas et al. 2005).

Das schnelle Wachstum von Monozyten/Makrophagen in unserem Versuch könnte darüber hinaus das Heranreifen von T-Zellen durch die Sekretion von Osteopontin, einem sauren Phosphoprotein, gestört haben. Osteopontin reduziert die Expression von Notch 1 in CD34⁺ Zellen (Iwata et al. 2004). Die besondere Rolle der Notch Rezeptoren und seiner Liganden bezüglich der T-Zellreifung könnte ebenso das fehlende Wachstum von T-Zellen in der 3D-Kultur mit humanen Hautfibroblasten erklären. Humane Hautfibroblasten exprimieren weder DLL1 noch Jagged 1, einen weiteren Notch Liganden. Wir

konnten dementsprechend den erfolgreichen Einsatz von humaner Haut als Stromazellquelle zur Reifung von T-Zellen (Upton et al. 2003) nicht bestätigen. Als Konsequenz aus der vorliegenden Arbeit und unter Berücksichtigung der Bedeutung der Notch-Signalgebung für die Zellentwicklung wurden $CD34^+$ Stammzellen aus Nabelschnurblut und Leukapheresat (PBSCs) in einem anschließenden Versuch mit OP9/N-DLL-1 Stromazellen kokultiviert (Eyrich et al. 2011). Nach 10 Tagen konnten $CD34^+CD45RA^+CD7^+$ T-Zell-Progenitoren (CTLPs) gemessen werden.

Diese Daten zeigen die erfolgreiche Ausreifung von $CD34^+$ PBSCs auf DLL1 hochexprimierenden murinen OP9 Stromazellen in CTLPs im Gegensatz zum fehlenden Wachstum von reifen T-Zellen oder T-Zell-Progenitoren auf DLL-1⁻ Stromazellen. In beiden Zellkulturen konnten jedoch keine reifen $CD3^+$ T-Zellen aus $CD34^+$ Stammzellen generiert werden. In einem weiteren ergänzenden Versuch wurden CTLPs in einem NOD-ScidIL2R γ Mausmodell auf 6 Wochen alte immundefiziente Mäuse übertragen. Sowohl die Transplantation von CTLPs als auch die singuläre Transplantation von PBSCs führten nach 4 Wochen nicht zum Wachstum von T-Zellen. Im Gegensatz dazu konnten bei der Kotransplantation von CTLPs und PBSCs im Mausmodell tatsächlich bereits nach 4 Wochen *de novo* generierte reife $CD4^+$ T-Zellen gemessen werden (Eyrich et al. 2011). Die Reifung von T-Zellen durch die gleichzeitige Transplantation von CTLPs und PBSCs im Mausmodell stellt offensichtlich einen Synergismus zwischen beiden Zelltypen dar und könnte in Zukunft eine mögliche Beschleunigung der T-Zell-Rekonstitution nach einer Stammzelltransplantation bedeuten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die *in vitro*-Generierung naiver T-Zellen wäre ein wichtiger Fortschritt in der Therapie verschiedenster Erkrankungen mit T-Zelldefizienz (HIV, Immundefekte, Stammzell-transplantierte Patienten). Zur Erreichung dieses Ziels wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Teilprojekte bearbeitet: a) die Bestimmung der Frequenz $CD34^+$ Stammzellen in Knochenmark, Nabelschnurblut und Leukapheresat, die über ein bevorzugtes lymphoides Differenzierungspotential verfügen. Desweiteren wurde in diesem Zusammenhang nach zwei Phänotypen spezifischer lymphoider Progenitorpopulationen gesucht: $CD34^+lin^-CD45RA^{hi}CD7^+$ und $CD34^+lin^-CD10^+CD24^-$. b) die Auswertung von *in vitro* Zellkulturversuchen, bei denen mit Hilfe einer neuartigen Zellkulturmatrix, eine Generierung naiver T-Zellen aus humanen $CD34^+$ Stammzellen möglich sein soll.

Unsere Analysen ergaben, dass die $CD34^+lin^-CD45RA^{hi}CD7^+$ Progenitorpopulation im Knochenmark und im Leukapheresat zu identifizieren war, im Nabelschnurblut jedoch unter der Nachweisgrenze lag. Ebenso konnte die $CD34^+lin^-CD10^+CD24^-$ Progenitorpopulation im Knochenmark, Leukapheresat und Nabelschnurblut gefunden werden, allerdings in deutlich niedrigeren Frequenzen als bislang berichtet. Interessanterweise lag der Anteil Linienmarker-negativer Zellen, d.h. der unreifen Vorläuferzellen, im Knochenmark signifikant höher als im Leukapheresat und Nabelschnurblut. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, daß ins periphere Blut nur reifere Subpopulationen von Progenitorzellen mobilisiert werden.

In den Zellkulturversuchen zeigte sich, daß auch mit Hilfe einer neuartigen 3D-Zellkulturmatrix weder mit humanen Hautfibroblasten noch mit humanen Thymusfragmenten als Stromazellquelle aus $CD34^+$ peripheren Blutstammzellen T-Zellen *in vitro* generiert werden konnten. Es entstanden vielmehr überwiegend Zellen mit monozytärem Phänotyp, und die $CD3^+$ T-Zellen, die in einigen Versuchen gemessen worden waren, erwiesen sich als Residuen aus dem Thymusgewebe. Diese Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu einer publizierten methodischen Arbeit, die mit murinem

Zusammenfassung

Thymusgewebe als Stromazellquelle erfolgreich naive T-Zellen generieren konnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass lymphoide Progenitoren in klinischen Routinepräparaten wie Knochenmark oder Leukapheresat in niedriger Frequenz natürlicherweise enthalten sind. Da mit derzeit verfügbaren Kultursystemen die *in vitro* Generierung reifer T- Zellen schwierig bzw. noch nicht möglich ist, stellt sich die Frage, ob nicht zumindest lymphoide Progenitoren in einem noch weiter zu optimierenden *in vitro* Zellkultursystem differenziert werden können. Durch Kotransplantation dieser Zellen könnte man die Frequenz der lymphoiden Progenitoren im Blut erhöhen und dadurch die T-Zellregeneration beschleunigen. Dieser Ansatz wird in Nachfolgeexperimenten unserer Arbeitsgruppe weiter verfolgt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aversa F, Martelli MF. Transplantation of haploidentically mismatched stem cells for the treatment of malignant diseases. *Springer Semin Immunopathol.* 2004;26:155-68.
- Awong G, Herer E, Surh CD, Dick JE, La Motte-Mohs RN, Zúñiga-Pflücker JC. Characterization in vitro and engraftment potential in vivo of human progenitor T cells generated from hematopoietic stem cells. *Blood* 2009;114:972-82.
- Bhandoola A, Sambandam A. From stem cell to T-cell: one route oder many? *Nat. Rev. Immunol* 2006;6:117-126.
- Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for t-cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 2008;452:764-767.
- Bensinger WI: Allogeneic Transplantation: Peripheral Blood versus Bone Marrow. *Curr Opin Oncol.* 2012;24:191–196.
- Bensinger WI, Storb R. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Rev Clin Exp Hematol.* 2001 ;5:67-86.
- Billingham RE. The biology of graft versus host reactions. *Harvey lect.* 1966;62:21-78.
- Blaise D, Kuentz M, Fortanier C et al. Randomized trial of bone marrow vs. lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia, a report from Societe Francaise de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol* 2000;18:537-546.
- Bobyn JD, Stackpool GJ, Hacking SA, Tanzer M, Krygier JJ. Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:729-734.
- Buckner CD, Clift RA, Fefer A, Lerner KG, Neiman PE, Storb R, Thomas ED. Marrow transplantation for the treatment of acute leukemia using HLA identical siblings. *Transplant Proc.* 1974;6:365-366.
- Byrne JL, Russel NH. Peripheral Blood stem cell transplant. *J Clin Pathol* 1998;51:351-355.
- Ceredig R, Rolink AG, Brown G. Model of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nature Reviews Immunology* 2009;9:293-300.
- Dallas M, Varnum-Finney B, Delaney C, Kato K, Bernstein I. Density of the Notch ligand Delta1 determines generation of B and T cell precursors from the Transplantation 2000;69:1341-7.

Literaturverzeichnis

- Davison GM, Novitzky N, Kline A, Thomas V, Abrahams L, Hale G, Waldmann H. Immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation depleted of T cells. *Transplantation*. 2000;69:1341-7.
- De Smedt M, Hoebecke I, Plum J. Human bone marrow CD34⁺ progenitor cells mature to T cells on OP9-DL1 stromal cell line without thymus microenvironment. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:227-232.
- Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 2000;355:1875-1881.
- Eyrich M, Croner T, Leiler C, Lang P, Bader P, Klingebiel T, et al. Distinct contributions of CD4⁺ and CD8⁺ naive and memory T-cell subsets to overall TCR-repertoire complexity following transplantation of T-cell depleted CD34 selectes hematopoietic progenitor cells from unrelated donors. *Blood* 2002;100:1915-8.
- Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995;3:459-473.
- Gianni AM, Siena S, Bregni M, Tarella C, Stern AC, Pileri A, Bonadonna G. Granulocyte-macrophage stimulating factor to harvest circulating haematopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet* 1989;2:580-5.
- Glaspy J, Davis MW, Parker WRL, Foote MA, McNiece I. Biology and clinical potential of stem-cell-factor. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996;38(suppl):53-57.
- Goodmann JW, Hodgson GS. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 1962;19:702-714.
- Gray DH, Ueno T, Chidgey AP, Malin M, Goldberg GL, Takahama Y, Boyd RL. Controlling the thymic microenvironment. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:137-43.
- Haddad R, Guardiola P, Izac B, Thibault C, Radich J, Delezoide A.L, Baillou C, Lemoine F.M, Gluckman J.C, Pflumio F, Canque B. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood* 2004;104:3918-3926.
- Haddad R, Guimiot F, Six E, Jourquin, Setterblad N, Kahn E, Yagello M, Schiffer C, Andre Schmutz I, Cavazzana-Calvo, et al. Dynamics of thymus colonizing cells during human development. *Immunity* 2006;24:217-230.
- Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, Mackall CL, McAlee N, Zujewski J. et al. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic

Literaturverzeichnis

insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood* 1997;90:3789-98.

- Hebib NC, Deas O, Rouleau M, Durrbach A, Charpentier B, Beaujean F. Peripheral blood T-cells generated after allogeneic bone marrow transplantation; lower levels of bcl-2 protein and enhanced sensitivity to spontaneous and CD95-mediated apoptosis in vitro. Abrogation of the apoptotic phenotype coincides with the recovery of normal naive/primed T-cell profiles. *Blood* 1999;94:1803-1813.
- Heitger A, Neu N, Kern H, et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA⁺) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997;90:850-857.
- Hill GR, Ferrara JLM. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host-disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95:2754-2759.
- Ho AD, Young D, Maruyama M et al. Pluripotent and lineage committed CD34⁺ subsets in leukapheresis products mobilized by G-CSF, GM-CSF vs. a combination of both. *Exp Haematol* 1996;24:1460-1468.
- Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(7):772-82.
- Hokland P, Hokland M, Daley J, Ritz J, Identification and cloning of a prethymic precursor T lymphocyte from a population of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA)-positive fetal bone marrow cells. *J. Exp. Med.* 1987;165:1749-1754.
- Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:1502-1506.
- Iwata M, Awaya N, Graf L et al. Human marrow stromal cells activate monocytes to secrete osteopontin, which downregulates notch 1 gene expression in CD34⁺ cells. *Blood* 2004;103:4496-4502.
- Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2007;2:35.
- Jakubowski AA, Small TN, Young JW, Kernan NA, Castro-Malaspina H, Hsu KC, Perales MA, Collins N, Cisek C, Chiu M, van den Brink MR, O'Reilly RJ, Papadopoulos EB. T cell depleted stem-cell transplantation for adults with hematologic malignancies: sustained engraftment of HLA-matched related donor grafts without the use of antithymocyte globulin. *Blood*. 2007;110:4552-9.

Literaturverzeichnis

- Koca E, Champlin RE. Peripheral blood progenitor cell or bone marrow transplantation: controversy remains. *Curr Opin Oncol*. 2008;20:220-6.
- Kolb HJ: Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112:4371-83.
- Kyewski B, Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:688-98.
- Link H, Kolb HJ, Ebell W, Hossfeld DK, Zander A, Niethammer D, Wandt H, Gosse-Wilde H, Schäfer UW. Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. *Medizinische Klinik I und II* 1997;92:480-545.
- Mackall CL, Ganger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic derives versus thymic-independent progeny. *Blood* 1993;82:2585-2594.
- Mackall CL, Gress RE. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol. Rev*. 1997;157:61-72.
- Martin PJ, McDonald GB, Sanders JE, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg HJ, Nash RA, Petersdorf EW, Hansen JA, Storb R. Increasingly frequent diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host-disease after allogeneic haematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplantation* 2004;10:320-327.
- McDonald GB: Review article: management of hepatic disease following haematopoietic cell transplantation. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:441-452.
- Morrison SJ, Uchida N, Weissmann IL. The biology of haematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Bio*. 1995;11:35-71.
- Mulanovich VE, Jiang Y, Lima M, Shpall EJ, Champlin RE, Ciurea SO: Infectious complications in cord blood and T-cell depleted haploidentical stem cell transplantation. *Am J Blood Res*. 2011;1:98–105.
- Mutis T, Blokland E, Kester M, Schrama E, Goulmy E. Generation of minor histocompatibility antigen HA-1-specific cytotoxic T cells restricted by nonself HLA molecules: a potential strategy to treat relapsed leukemia after HLA-mismatched stem cell transplantation. *Blood* 2002;100:547-552.
- Nachbaur D, Kropshofer G, Heitger A, Lätzer K, Glassl H, Ludescher C, Nussbaumer W, Niederwieser D. Phenotypic and functional lymphocyte recovery after CD34+-enriched versus non-T cell-depleted autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000;9:727-36.

Literaturverzeichnis

- Nitta T, Ohigashi I, Takahama Y. The development of T Lymphocyte in fetal thymus organ culture. *Methods Mol Biol.* 2013;946:85-102.
- Penas, P.F. & Zaman, S. Many faces of graft-versus-host disease. *Australas J. Dermatol.* 2010;51:1-10.
- Person AK, Dimitrios P, Kontoyiannis L, Alexander BD: Fungal Infections in Transplant and Oncology Patients. *Infect Dis Clin North Am.* 2010;24:439–459.
- Petersen SL. Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Dan Med Bull.* 2007;54:112-39.
- Petrie and Kincade. Many roads, one destination for T-cell-progenitors. *J.Exp.Med* 2005;202:11-13.
- Poznansky MC, Evans RH, Foxall RB, Olszak IT, Piascik AH, Hartmann KE, et al. Efficient generation of human T cells from a tissue- engineered thymic organoid. *Nat Biotechnol* 2000;18:907-934.
- Rezzani R, Bonomini F, Rodella LF. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Prog Histochem Cytochem.* 2008;43:73-120.
- Rolink AG, Massa S, Balciunaite G, Ceredig R. Early lymphocyte development in bone marrow and thymus. *Swiss Med Wkly.* 2006;136:679-83.
- Saito Y, Kametani Y, Hozumi K, Mochida N, Ando K, Ito M, Nomura T, Tokuda Y, Makuuchi H, Tajima T, Habu S. The in vivo development of human T cells from CD34 (+) cells in the murine thymic environment. *Int Immunol.* 2002;14:1113-24.
- Sangiolo, D., Storb, R., Deeg, H.J., Flowers, M.E., Martin, P.J., Sandmaier, B.M., Kiem, H.P., Nash, R.A., Doney, K., Leisenring, W.M. & Georges, G.E. (2010): Outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation from HLA-identical siblings for severe aplastic anemia in patients over 40 years of age. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:1411-1418.
- Schmitt TM , Zuniga Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like 1 in vitro. *Immunity* 2002;17:749-56.
- Six E, Bonhomme D, Monteiro M, Beldjord K, Jurkowska M, Cordier-Garcia C, Garrigue A, Dal Cortivo L, Rocha Bénédicta, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, André-Schmutz I. A human postnatal lymphoid

progenitor capable of circulating and seeding the thymus. *J Exp Med* 2007;204:3058-93.

- Sprangers B, Van Wijmeersch B, Fevery S, Waer M, Billiau AD. Experimental and clinical approaches for optimization of the graft-versus-leukemia effect. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007 ;4:404-14.
- Theilgaard-Mönch K, Raaschau-Jensen K, Schjødt K; Heilmann C, Vindeløv L, Jacobson N, Dickmeiss E. Pluripotent and myeloid-committed CD34⁺ subsets in hematopoietic stem cell allografts. *Bone Marrow Transplant* 2003;32:1125-1133.
- Thomas ED, Lochte HL, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 1957;257:491-496.
- Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone marrow transplantation (Second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:896-902.
- Tomblyn M, Lazarus HM. Donor lymphocyte infusions: the long and winding road: how should it be traveled? *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:569-79.
- Ueno T, Liu C, Nitta T, Takahama Y. Development of T-lymphocytes in mouse fetal thymus organ culture. *Methods Mol Biol.* 2005;290:117-33.
- Upton T, Bechtel D, Huynh V et al. De novo synthesis of T- Cells from mPB CD34⁺ cells cultured in a 3-D- dimensional thymic organoid. *Blood* 2003;18:729–734.
- Van Coppennolle S, Verstichel G, Timmermans F et al. Functionally mature CD4 and CD8 TCRalpha cells are generated in OP9-DL1 cultures from CD34⁺ hematopoietic cells. *Immunol* 2009;83:4859-70.
- Verfuërth S, Peggs K, Vyas P, Barnett L, O'Reilly RJ, Mackinnon S. Logitudinal monitoring of immune reconstitution by CD3 size spectratyping after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplant and the effect of donor lymphocyte infusions on T-cell repertoire. *Blood* 2000;95:3990-5.
- Vianello F, Poznansky MC. Generation of a tissue-engineered thymic organoid. *Methods Mol Biol.* 2007;380:163-70.
- Warren EH, Deeg HJ. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens.* 2013;81:183-93.
- Wang HX, Yan HM, Wang ZD, Xue M, Liu J, Guo ZK. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in hematologic malignancies with G-CSF mobilized bone marrow plus peripheral blood stem cells grafts

without T cell depletion: a single center report of 29 cases. *Leuk Lymphoma*. 2012;53:654-9.

- Welte K, Platzer E, Gahrhove JC, Lu L, Levi E, Polivka A, Mertelsmann R, Moore MA. Purification to apparent homogeneity and biochemical characterization of human pluripotent haematopoietic colony stimulating factor. *Haematol Blood Transfus* 1985;29:398-401.
- Wu L et al. T-lineage progenitors: the earliest steps en route to T-lymphocytes. *Curr. Opin. Immuno* 2006;18:121-126.
- Xia G, Truitt RL, Johnson BD. Graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactions after donor lymphocyte infusion are initiated by host-type antigen-presenting cells and regulated by regulatory T cells in early and long-term chimeras. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:397-407.
- Yang Q, Bell JJ, Bhandoola A. T-cell lineage determination. *Immunological Reviews* 2010;238:12-22.
- Youssef S, Rodriguez G, Rolston KV, Champlin RE, Raad II, Safdar A: *Streptococcus pneumoniae* infections in 47 hematopoietic stem cell transplantation recipients: clinical characteristics of infections and vaccine-breakthrough infections, 1989-2005. *Medicine (Baltimore)*. 2007;86:69-77.
- Zlotoff DA, Bhandoola A. Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011;1217:122-138.
- Zlotoff DA, Schwarz BA, Bhandoola A. The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man. *Semin Immunopathol*. 2008;30:371-82.

Danksagung

DANKSAGUNG

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Stammzell-Labor der Kinderklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Professor Dr. M. Eyrich angefertigt. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank für seine herzliche Betreuung und Unterstützung.

Für die Möglichkeit an der Universitätskinderklinik zu promovieren, möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. C. P. Speer, dem Direktor der Klinik, bedanken.

Ich danke meiner Familie von ganzem Herzen für die liebevolle und immer zuverlässige Unterstützung während des Studiums. Mein ganz besonderer Dank geht an Thomas Klingebiel, der mich inhaltlich, sowie strukturell beraten und das gesamte Studium mit großem Interesse begleitet hat.

VERZEICHNIS BISHER VERÖFFENTLICHTER ARBEITEN

Eyrich M, Schreiber SC, Wollny G, Ziegler H, Schlenker R, Koch-Büttner K, Wöfl M, Schlegel PG, Schilbach K. Pre-differentiated human committed T-lymphoid progenitors promote peripheral T-cell re-constitution after stem cell transplantation in immunodeficient mice. Eur J Immunol. 2011;41:3596-603