

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W.E. Berdel –

Einfluss von Alloantigenen und deren Expressionsmuster auf den GvT-Effekt
im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Urh, Jennifer Marie

aus München

2015

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. M. Stelljes

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Groll

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W.E. Berdel –
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. M. Stelljes
Koreferent: Prof. Dr. med. A. Groll

Zusammenfassung

Einfluss von Alloantigenen und deren Expressionsmuster auf den GvT-Effekt
im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation
Urh, Jennifer Marie

Einleitung: Die hämatopoetische Stammzelltransplantation ist bei einer Vielzahl von leukämischen Erkrankungen eine effektive Therapieoption. Dabei ist die größte Limitierung die Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (*engl.* Graft-versus-Host Disease, GvHD), bei der Immunzellen des Spenders gegen das Empfängergewebe reagieren. Mit einer GvHD assoziiert ist aber auch ein Spender-gegen-Tumor-Effekt (*engl.* Graft-versus-Tumor, GvT), der zur Tumorremission und einer geringeren Rezidivrate beitragen kann. Zielstrukturen für die im GvT-Effekt beteiligten Immunzellen können Tumorantigene, mHAgS (*engl.* minor Histocompatibility Antigen) oder disparate MHC-Moleküle (*engl.* Major Histocompatibility Complex) sein. Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von Alloantigenen auf den GvT-Effekt zu charakterisieren. Dabei wurde insbesondere der Einfluss des Expressionsmusters (ubiquitär vs. exklusiv auf dem Tumor) untersucht.

Material und Methoden: In dieser Arbeit wurde ein murines haploidentes *parent-into-F1*-Transplantationsmodell verwendet (genehmigt durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen). Dabei wurden BALB/c-Mäuse (H-2K^d) als Spender und die F1-Generation F1[BALB/cxCBA/J] (H-2K^{dk}) als Empfänger verwendet. Als Modelltumor wurde das aus BALB/c stammende Lymphom MPC-11 (H-2K^d) gewählt. Dieses war im Vorfeld mit den zum Spender inkompatiblen MHC-Alloantigenen H-2K^k bzw. H-2K^b transfiziert und auf seine Stabilität *in vivo* getestet worden. Für die Untersuchung des GvT-Effektes wurde in bestimmten Intervallen das Gewicht, der GvHD-Score sowie die Tumorausdehnung gemessen. Am Ende jedes Versuches wurden per Durchflusszytometrie sowohl der Chimarismus der Versuchstiere als auch die Stabilität der transfizierten Tumoren untersucht.

Ergebnisse: Es wurde gezeigt, dass die transfizierten Alloantigene H-2K^k bzw. H-2K^b in BALB/c-Mäusen immunogen waren. Weiterhin wurde gezeigt, dass der GvT-Effekt stark mit einer GvHD assoziiert ist; das Tumorwachstum aller Tumoren war in GvHD-Gruppen (Knochenmark- und Milzzellen im Transplantat) im Vergleich zu entsprechenden Kontrollgruppen (nur Knochenmark) signifikant reduziert. Außerdem wurde beobachtet, dass die zusätzlichen Alloantigene zu einem verstärkten GvT-Effekt führten, bei H-2K^k allerdings nur in der frühen Phase nach Transplantation. Dieser machte sich durch eine verstärkte Supprimierung des Tumorwachstums und im Falle von H-2K^b durch den Verlust des exklusiven Alloantigens bemerkbar. Es wurden spezifische T-Zellen gegen das exklusive Alloantigen H-2K^b mittels IFN- γ -ELISpots nachgewiesen.

Diskussion: MHC-Alloantigene haben einen Einfluss auf den GvT-Effekt, vor allem bei exklusiver Expression auf dem Tumor. Der aktuelle Trend geht allerdings dahin, mHAgS und Tumorantigene als Zielstrukturen für eine spezifische Tumorthherapie zu erforschen, z.B. durch Vakzinierung oder adoptiven T-Zell-Transfer.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2015

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Einfluss von Alloantigenen und deren Expressionsmuster

auf den GvT-Effekt im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Medizinischen Klinik und Poliklinik A des Universitätsklinikums Münster

unter der Anleitung von:

Prof. Dr. med. M. Stelljes

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Sankt Augustin,

Ort, Datum

Jennifer Marie Urh

Name/ Unterschrift

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
BCR/ABL	<i>engl.</i> Breakpoint Cluster Region/Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog
CD	<i>engl.</i> Cluster of Differentiation (Nomenklatur der Oberflächenmarker)
CLL	chronische leukämische Leukämie
<i>ELISpot</i>	<i>engl.</i> Enzyme Linked Immuno Spot Essay
G-CSF	<i>engl.</i> Granulocyte-Colony-Stimulating
GFP	<i>engl.</i> green fluorescent protein
GvHD	<i>engl.</i> Graft-versus-Host Disease (Transplantat-gegen-Empfänger Reaktion)
GvL/GvT	<i>engl.</i> Graft-versus-Leukemia/Tumor (Transplantat-gegen-Leukämie/Tumor)
H2	murines Histokompatibilitäts-Antigen
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HvG	<i>engl.</i> Host-versus-Graft (Empfänger-gegen-Transplantat)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KIR	Killerzell-Immunoglobulin-ähnlicher Rezeptor
MDS	myelodysplastisches Syndrom
mHAg	<i>engl.</i> Minor-Histocompatibility-Antigen (minor-Histokompatibilitäts-Antigen)
MHC	<i>engl.</i> Major-Histocompatibility-Complex (Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex)
PR1	ein aus der Proteinase 3 abgeleitetes Peptid
SZT	(Hämatopoetische) Stammzelltransplantation
TAA	tumor-assoziiertes Antigen
TBI	<i>engl.</i> Total Body Irradiation (Ganzkörperbestrahlung)
T _H	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSA	tumor-spezifisches Antigen
WT1	Wilmstumor-Suppressorgen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	1
1.1.1	Arten der SZT	1
1.1.2	Stammzellpräparation	2
1.1.3	Konditionierungstherapie	3
1.1.4	Indikation	4
1.2	Komplikationen/Immunreaktionen nach SZT	5
1.2.1	Graft-versus-Host Disease	5
1.2.2	Pathophysiologie der akuten GvHD	6
1.2.3	Host-versus-Graft-Reaktion	8
1.2.4	Graft-versus-Tumor-Effekt	9
1.3	Molekulare Grundlagen der Immunreaktionen	10
1.3.1	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexe	10
1.3.2	Minor-Histokompatibilitätsantigene	11
1.3.3	Tumorantigene	12
1.4	Fragestellung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Tierexperimentelle Methoden	16
2.1.1	Mäuse	16
2.1.2	Präparation von Milzzellen	17
2.1.3	Präparation von Knochenmarkstammzellen	17
2.1.4	Tumorzellapplikation	18
2.1.5	Transplantation der Mäuse	18
2.1.6	Monitoring der Tiere	19
2.2	Zellkultur	20
2.2.1	Kultivierung muriner Tumorzelllinien	20
2.2.2	Auftauen von Zellen	20
2.2.3	Einfrieren von Zellen	21
2.2.4	Zählung von Zellen	21
2.2.5	<i>ELISpot</i>	21
2.2.6	Bestrahlung von Tumorzellen	22

2.3	Transfektionen	22
2.3.1	Vektor pcDNA-UTY-GFP#62 und pcDNA3.1-GFP	22
2.3.2	Elektroporation	23
2.3.3	Nanofectin	23
2.3.4	Magnetofection™	24
2.3.5	DreamFect™ Gold	25
2.3.6	Testen der Zellen und Subklonierung	26
2.4	Durchflusszytometrie	26
2.4.1	Grundlagen	26
2.4.2	Antikörper	27
2.4.3	Vorbereitung der <i>ex vivo</i> Tumoren für die Durchflusszytometrie	27
2.4.4	Antikörperfärbung von Tumorzellen und Milzzellen	28
2.5	Statistische Auswertungsverfahren	29
2.5.1	Bestimmung der Standardabweichung und des SEM	29
2.5.2	Bestimmung der Signifikanz	29
2.6	Transplantationsmodell	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Transfektionen von UTY in LLC	31
3.2	Vorversuche	33
3.2.1	Wachstumskinetik und Stabilität von MPC-11-H-2K ^k	33
3.2.2	Immunogenität von MPC-11-H-2K ^k	34
3.2.3	Immunogenität von MPC-11-H-2K ^b	36
3.3	Tumorwachstum nach syngener Transplantation (BALB/c→BALB/c)	38
3.4	Allogene Transplantationen BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J]	40
3.4.1	GvT-Reaktionen gegen das ubiquitär exprimierte Alloantigen H-2K ^k	40
3.4.2	Stabilität des mit H-2K ^k transfizierten Tumors im BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J]-Transplantationsmodell	52
3.4.3	GvT-Reaktionen gegen das exklusiv auf dem Tumor exprimierte Alloantigen H-2K ^b	54
3.4.4	Nachweis von spezifischen T-Zellen gegen das Alloantigen H-2K ^b mittels <i>ELISpot</i>	61
3.4.5	Chimärismus der transplantierten Tiere	63
4	Diskussion	65
5	Literaturverzeichnis	75

6	Lebenslauf.....	87
7	Danksagung	89
8	Anlagen	I

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (SZT) ist ein etabliertes Therapieverfahren, dessen Bedeutung und Durchführung im letzten Jahrzehnt deutlich zugenommen hat (44). Im Zeitraum von 1990 bis 2010 stiegen die SZTs in Europa von ca. 4.000 auf über 30.000 pro Jahr an (94). Bei der SZT wird nach einer Konditionierungstherapie das blutbildende System – bei einer allogenen SZT zusätzlich das zelluläre Immunsystem – durch ein anderes ersetzt bzw. bei der autologen SZT das eigene erneuert. Prinzipiell reicht eine einzige Stammzelle aus, um das gesamte lymphohämatopoetische System zu ersetzen (112).

1.1.1 Arten der SZT

Die SZT wird je nach der Beziehung zwischen Spender und Empfänger in eine autologe, syngene oder allogene SZT unterteilt.

Bei der autologen SZT wird patienteneigenes Knochenmark verwendet, das vor einer Hochdosischemotherapie gesammelt und kryokonserviert wurde.

Bei der syngenen SZT wird Knochenmark eines genetisch identischen Spenders verwendet, sie ist also nur bei Vorhandensein eines eineiigen Zwillings möglich.

Bei der allogenen SZT werden Stammzellen von Spendern verwendet, die genetisch nicht identisch mit dem Patienten sind. Das Hauptaugenmerk bei der allogenen Spenderauswahl liegt auf der Gewebeverträglichkeit, der sogenannten Histokompatibilität. Bei dieser spielen die HLA-Merkmale (Humanes Leukozyten Antigen) auf der Zelloberfläche eine zentrale Rolle. Um die Gewebeverträglichkeit zu untersuchen, werden fünf HLA-Loci (HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1) von Spender und Empfänger typisiert; passen alle Allele von Spender und Empfänger zueinander, wird es als 10/10-Match bezeichnet.

In etwa einem Drittel der Fälle steht ein passendes Familienmitglied – meist Geschwister – für die Spende zur Verfügung (103). In den anderen Fällen wird ein HLA-kompatibler Fremdspender über entsprechende Datenbanken wie das zentrale Knochenmarkspender-Register in Ulm gesucht. Für Patienten mit kaukasischer Abstammung wird in etwa 80% ein passender Spender gefunden. Bei Patienten mit einer anderen ethnischen Herkunft ist die Wahrscheinlichkeit, einen Spender zu finden, deutlich geringer (96).

Steht weder ein HLA-identer Familienspender noch ein HLA-kompatibler Fremdspender zur Verfügung, kann auch eine allogene Transplantation mit einem haploidenten Familienspender (Eltern, Geschwister, Kinder) durchgeführt werden. Für fast jeden Patienten gibt es einen solchen Spender (10,57). Die haploidente allogene SZT kommt vor allem dann in Betracht, wenn bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium nicht auf einen kompatiblen Fremdspender aus einer Datenbank gewartet werden kann oder dieser nicht gefunden wird (56,92).

1.1.2 Stammzellpräparation

Für die SZT werden hämatopoetische Vorläuferzellen benötigt, die sich zu sämtlichen Zellen des lymphohämatopoetischen Systems differenzieren können. Diese Vorläuferzellen exprimieren CD34 (*engl.* Cluster of Differentiation) und können aus peripherem Blut nach G-CSF-Stimulation (*engl.* Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor) aus Knochenmark oder Nabelschnurblut gewonnen werden (30,88,111).

In den Anfängen der SZT wurden die Stammzellen hauptsächlich durch Punktion und Aspiration von Knochenmark aus dem Beckenkamm gewonnen. Nachteile dieser Methode sind die Belastungen für den Spender, wie das allgemeine Anästhesierisiko, die Invasivität des Eingriffs und eine relative lange Erholungsphase von ca. drei Wochen (82).

In den letzten Jahren ist die Gewinnung von Stammzellen aus dem peripheren Blut sowohl in der Praxis als auch in der Forschung in den Vordergrund gerückt (2,30,95). Vorteile dieser Methode sind die geringeren Kosten und die einfachere Gewinnung der Stammzellen, was auch mit einer geringeren Belastung und weniger Komplikationen für den Spender einhergeht (82). Normalerweise zirkuliert im peripheren Blut nur eine geringe Anzahl an Stammzellen, weshalb im Vorfeld eine Hormonbehandlung mit G-CSF erfolgt (40). G-CSF ist ein Peptidhormon, das unter anderem die Anzahl zirkulierender Stammzellen erhöht (2). Es initiiert die Ausschüttung von Proteasen, welche die Verankerungen zwischen Vorläuferzellen und Knochenmark zerstören, wodurch diese ins Blut ausgeschwemmt werden (21,70). Die CD34⁺-Zellen können dann mittels Apherese abgesammelt werden.

Die Nutzung von Nabelschnurblut als Stammzellquelle ist aufgrund der geringen Ressourcen weniger stark verbreitet. Sie hat allerdings den Vorteil, dass das Nabelschnurblut gelagert werden kann und somit schnell verfügbar ist. Vor allem Kinder mit akuten Leukämien, für die ein HLA-identer Familien- oder Fremdspender nicht rechtzeitig zur Verfügung steht, ist eine Transplantation mit teilweise HLA-

gematchtem Nabelschnurblut eine Alternative (67). Der Einsatz bei erwachsenen Patienten ist durch die geringe Zellzahl einer Spende oft limitiert; eine Transplantation mit zwei Nabelschnurblutspenden ist aber möglich (18).

Das Transplantat kann zusätzlich noch lymphozytendepletiert werden. Für die T-Zell-Depletion werden hauptsächlich mono- oder polyklonale Antikörper eingesetzt, die zur Zerstörung der Zielzelle führen (29,52).

1.1.3 Konditionierungstherapie

Die Konditionierungstherapie hat zwei Ziele: zum einen die Unterdrückung des patienteneigenen Immunsystems, sodass sich das Transplantat etablieren kann, und zum anderen die Elimination der Tumorzellen (109). Die Therapie umfasst eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung (*engl.* Total Body Irradiation, TBI) mit Zytostatikagabe oder eine Chemotherapie (z.B. Busulfan und Cyclophosphamid). Die positiven Effekte einer hohen Intensität der Therapie wie ein geringeres Rezidivrisiko und ein besseres Engraftment des Transplantats gehen zu Lasten einer höheren therapie-assoziierten Mortalität (4,108,109).

Myeloablative Konditionierungsregime, die mit einer irreversiblen Zytopenie einhergehen, sind aufgrund der hohen Toxizität nicht für jeden Patienten geeignet. Das betrifft vor allem Patienten mit Komorbiditäten, einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium oder einem fortgeschrittenen Alter (4,45,108). Gerade bei der AML (akute myeloische Leukämie), deren Inzidenz mit dem Alter zunimmt und ein medianes Erkrankungsalter von 67 Jahren hat, ist eine myeloablative Konditionierungstherapie mit nachfolgender SZT oft nicht möglich (45). Deshalb wurde in den letzten zehn Jahren vermehrt an intensitäts-reduzierten Konditionierungstherapien geforscht. Diese führen zu einer erheblichen, aber nicht irreversiblen, Zytopenie. Dadurch konnten die therapie-assoziierte Morbidität und Mortalität deutlich verringert werden (77). Das Rezidivrisiko wird durch eine hohe Intensität der Konditionierungstherapie positiv beeinflusst (3,109). Allerdings zeigte eine prospektive randomisierte Studie mit Patienten, die sich in der ersten kompletten Remission einer AML befanden, keinen Unterschied im Rezidivrisiko bei myeloablativer versus intensitäts-reduzierter Konditionierung (17). Bei Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium wiederum ist das Rezidivrisiko bei einer intensitäts-reduzierten höher als bei einer myeloablativen Konditionierung (3). Daher geht der Trend immer mehr zu einer auf den Patienten individuell zugeschnittenen Therapie, da viele verschiedene Faktoren den Verlauf beeinflussen.

1.1.4 Indikation

Für die SZT gibt es eine Reihe von Indikationsstellungen, die man grob in zwei Gruppen aufteilen kann: zum einen lymphoproliferative Neoplasien und zum anderen nicht-maligne Erkrankungen wie genetisch bedingte oder erworbene Funktionsstörungen des lymphohämatopoetischen Systems oder Stoffwechselstörungen (44). Dabei sind Leukämien und lymphoproliferative Neoplasien wie das Multiple Myelom die häufigsten Indikationen für eine SZT (94).

Bei der Therapie von Malignomen ist die Radio-/Chemotherapie oft aufgrund ihrer hohen Toxizität vor allem in Bezug auf das Knochenmark dosislimitiert. Die autologe oder allogene SZT ermöglicht dagegen eine Maximierung der Therapie und so eine effektivere Tumorelimination.

Die SZT ist mittlerweile Bestandteil bei einer Vielzahl von Therapieschemata bei lymphoproliferativen Malignomen wie AML, CLL (chronische leukämische Leukämie), Multiplem Myelom, Hodgkin-Lymphom und Non-Hodgkin-Lymphom (72,95).

Obwohl die SZT eine kurative Tumortherapie ermöglicht, bestehen trotzdem eine hohe Letalität und Morbidität, die auch auf die Toxizität der Konditionierungstherapie und die SZT selber zurückzuführen sind. Aus diesem Grund wird die Indikation für eine SZT restriktiv gestellt, da die therapie-assoziierte Mortalität durch viele Risikofaktoren steigt. Dazu gehören Krankheitsstadium, hohes Patientenalter, Komorbiditäten, CMV-Infektionen, Zeit zwischen Diagnosestellung und SZT, sowie Empfänger-Spender-Konstellationen wie z.B. weiblicher Spender/ männlicher Empfänger (72).

So ist die SZT etablierter Bestandteil der Therapie einer Hochrisiko-AML (27,116), hat bei der AML mit geringem Risiko gegenüber einer reinen Chemotherapie jedoch keine besseren Ergebnisse gebracht (62).

Die SZT stellt bei angeborenen oder erworbenen Erkrankungen des blutbildenden Systems wie z.B. der Thalassämie und der Sichelzellanämie eine alternative Therapieoption zu regelmäßigen Bluttransfusionen dar (28,47). Die symptomatische Therapie mittels Bluttransfusionen birgt Risiken wie Eisenüberladung oder Alloimmunisierung und Unverträglichkeitsreaktionen vor allem nach langjähriger Therapie (16,80,98). Im Gegensatz zu den Bluttransfusionen stellt die SZT eine kurative Therapie dar, hat aber ihre eigenen Risiken wie die Entwicklung von immunologischen Spender-gegen-Empfänger Reaktionen (28). Die Indikation für oder gegen eine SZT ist daher individuell zu stellen.

Weitere angeborene Erkrankungen wie der kombinierte T- und B-Zell-Defekt (*engl.* Severe Combined Immunodeficiency, SCID) oder lysosomale Speichererkrankungen wie der Morbus Hurler stellen weitere mögliche Indikationen für die SZT als kurative Therapie dar (22,65).

1.2 Komplikationen/Immunreaktionen nach SZT

Die Konditionierungstherapie zerstört nicht nur Tumor- und Knochenmarkzellen sondern auch gesunde Zellen. Dadurch kann es zu Schädigungen an verschiedenen Organen wie der Leber, dem Herzen oder den Augen kommen (3,108). Sich schnell replizierende Zellen wie die Mukosa des Gastrointestinaltraktes sind besonders betroffen, was zu Übelkeit, Erbrechen und Durchfall führen kann (123). Außerdem kann es durch die Toxizität der Behandlung zur Unfruchtbarkeit kommen, weswegen eine vorherige Kryokonservierung von Spermien oder Eizellen angeboten wird. Zudem ist die Infektanfälligkeit durch das supprimierte Immunsystem erhöht, besonders in Bezug auf opportunistische Infektionen (3,125). Eine T-Zell-Depletierung des Transplantats verzögert die Immunrekonstruktion zusätzlich (85,125).

Weiterhin können nach einer SZT verschiedene immunologische Reaktionen auftreten. Sie werden nach Aggressor und Ziel der Reaktion unterteilt:

- die Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion (*engl.* Graft-versus-Host Disease, GvHD), bei der das Transplantat Empfängerzellen angreift,
- die Transplantat-gegen-Tumor-Reaktion (*engl.* Graft-versus-tumor/leukemia, GvT/GvL), bei der das Transplantat das Malignom angreift,
- die Empfänger-gegen-Transplantat-Reaktion (*engl.* Host-versus-Graft, HvG), bei der das Immunsystem des Empfängers das Transplantat angreift.

1.2.1 Graft-versus-Host Disease

Die GvHD besitzt einen großen Einfluss auf die transplantatabhängige Morbidität und Letalität und wird klinisch und pathologisch in eine akute und eine chronische GvHD unterteilt (34,39). Die akute GvHD tritt vornehmlich in den ersten 100 Tagen nach Transplantation auf und betrifft vor allem den Gastrointestinaltrakt, die Leber und die Haut, die chronische GvHD betrifft vermehrt die Haut und Mukosa (34,48).

1.2.2 Pathophysiologie der akuten GvHD

Nach Billingham müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein, damit es zu einer GvHD kommen kann (13). Zunächst darf der Empfänger zumindest zeitweise nicht in der Lage sein, das Transplantat abzustößen. Weiterhin muss das Transplantat genügend immunkompetente Zellen enthalten. Außerdem müssen im Empfänger Gewebeantigene vorkommen, die der Spender nicht besitzt; diese Unterschiede müssen die Spenderzellen aktivieren können. Die relevanten Gewebeantigene sind vor allem die Haupthistokompatibilitätskomplexe (*engl.* Major-Histocompatibility-Complex, MHC), aber auch die minor-Histokompatibilitätsantigene (*engl.* minor Histocompatibility-Antigen, mHAg) können eine Immunantwort auslösen (119). Je größer das Mismatch ist, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten einer GvHD (34).

Die Entstehung der GvHD kann in drei Phasen unterteilt werden.

In der ersten Phase werden die antigenpräsentierenden Zellen aktiviert. Antigenpräsentierende Zellen sind dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen. Im Rahmen der Konditionierung (Radio- und/oder Chemotherapie) wird Gewebe verletzt, und es kommt zu Zelluntergängen. Dabei werden proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1) in unphysiologischer Menge freigesetzt (129,139). Diese Alarmsignale, der „Zytokinsturm“, lösen einen Chemokingradienten aus und führen zudem zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, costimulativen Molekülen und MHC-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (50,79). Dies steigert die Fähigkeit dieser Zellen, T-Zellen zu rekrutieren. Eine besondere Rolle bei der Aktivierung von residualen antigenpräsentierenden Zellen spielen mikrobielle Lipopolysaccharide, die durch die Konditionierungstherapie im Gastrointestinaltrakt freigesetzt werden (50,129). Es wird vermutet, dass dort in den sekundären lymphatischen Organen des Gastrointestinaltrakts, den Peyer Plaques, auch der erste Kontakt zwischen antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers und Spender-T-Zellen stattfindet (86). Für die Initiierung der akuten GvHD sind die antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers maßgeblich, im Verlauf können jedoch antigenpräsentierende Zellen des Spenders deren Funktion für die Aufrechterhaltung der GvHD übernehmen. Dabei werden Empfängerantigene mittels *cross-priming* durch antigenpräsentierende Zellen des Spenders präsentiert (130).

Da die Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen ursächlich mit der Konditionierungstherapie und der damit einhergehenden Gewebeverletzung

Einleitung

zusammenhängt, liegt hier ein Ansatzpunkt für die Beeinflussung der GvHD. So kann versucht werden, durch reduzierte Konditionierungsregime die Freisetzung von mikrobiellen Lipopolysacchariden zu minimieren und so weniger antigenpräsentierende Zellen zu aktivieren. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Blockierung oder Mediation der involvierten Zytokine (129).

In der zweiten Phase kommt es zur Aktivierung, Differenzierung und Migration von Spender-T-Zellen.

Durch die Signale der antigenpräsentierenden Zellen wird die Differenzierung und Proliferation der alloreaktiven T-Zellen eingeleitet. Dabei reagieren $CD4^+$ -Zellen mit MHC-Klasse-II-Molekülen und $CD8^+$ -Zellen mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Für die Aktivierung der T-Zellen werden zwei Signale benötigt, zum einen die Bindung vom T-Zell-Rezeptor mit dem Alloantigen, das über ein MHC-Molekül präsentiert wird, und zum anderen eine Kostimulation über einen Zell-Zell-Kontakt mit der antigenpräsentierenden Zelle. Ohne dieses kostimulative Signal wird die T-Zelle nicht aktiviert und eine Anergie (Toleranz) gegen das Alloantigen entwickelt (129). Es gibt eine Reihe von möglichen Kostimulatoren wie B7-1 und B7-2, die mit CD28 und CTLA-4 auf der T-Zelle eine Verbindung eingehen, oder auch das Rezeptor-Liganden-Paar CD40/CD40L (120). Abhängig vom Zytokinmilieu differenzieren $CD4^+$ -Zellen in T_H1 -, T_H2 - oder T_H17 -Zellen (T-Helfer-Zelle), wobei T_H1 -Zellen maßgeblich bei der akuten GvHD beteiligt sind. Diese Differenzierung beeinflusst die Erscheinungsform der GvHD, da die verschiedenen Subgruppen in unterschiedliche Gewebe migrieren und jeweils eigene Kombinationen an Zytokinen ausschütten. T_H1 -Zellen sind mit Gastrointestinaltrakt und Leber assoziiert, während T_H2 -Zellen eher in der Lunge zu finden sind (140). Naive $CD8^+$ -Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, wobei das von T_H1 -Zellen ausgeschüttete IL-2 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von zytotoxischen T-Zellen spielt.

Die aktivierten T_H -Zellen und zytotoxischen T-Zellen migrieren zu den Zielgeweben, was durch Adhäsionsmoleküle wie Selektin und Integrin und ihre Liganden sowie Chemokinrezeptoren und Chemokinfreisetzung im Gewebe beeinflusst wird (138).

In der dritten Phase, der Effektorphase, kommt es zur Schädigung des Zielorgans ausgelöst durch ein komplexes Zusammenspiel von zellulären Effektoren und Zytokinen. Dabei kommt es zu einem synergetischen Effekt der inflammatorischen Zytokine und der zellulären Effektorzellen, welcher die Zerstörung begünstigt und

verstärkt (34). Aktivierte T-Zellen schütten Zytokine aus, die zum einen andere T-Zellen aktivieren und zum anderen andere Effektorzellen wie Monozyten und natürliche Killerzellen rekrutieren (39).

T_H1-Zellen produzieren IL-2 und IFN- γ . Dadurch werden die Differenzierung und Proliferation von zytotoxischen T-Zellen angeregt und natürliche Killerzellen und Makrophagen aktiviert (32). Die aktivierten Makrophagen produzieren unter anderem TNF- α und Stickstoffmonoxid, die direkt zur Gewebeschädigung fähig sind (69,71). TNF- α führt außerdem zu einer vermehrten Zytokinproduktion und Expression von MHC-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen, was eine verstärkte Rekrutierung von Effektorzellen und Aktivierung von T-Zellen zur Folge hat (34,51).

T_H2-Zellen produzieren IL-4, IL-6 und IL-10. Sie inhibieren die T_H1-Zell-Antwort sowie Makrophagen und induzieren eine humorale Immunantwort durch Anregung der Proliferation und Differenzierung von B-Zellen. Somit können T_H2-Zellen die T_H1-Zell-vermittelte akute GvHD abschwächen, sind aber mit dem Auftreten einer chronischen GvHD assoziiert (39,89,140). Da T-Zellen ein integraler Bestandteil der GvHD sind, reduziert eine T-Zell-Depletierung des Transplantats das Risiko, eine GvHD zu entwickeln (135). Der Nachteil dieser Methode liegt allerdings in der verzögerten Immunrekonstruktion und somit einer verstärkten Infektanfälligkeit (125).

Zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen können die Zielzelle auf unterschiedlichen Wegen zerstören – dazu zählen die Fas/FasL (Fas-Ligand)-Interaktion und die Perforin-Granzym-Ausschüttung. Fas bindet an FasL, und ein DISC (*engl.* Death Inducing Signal Complex) wird gebildet, welcher zur Aktivierung von Caspasen und damit zur Apoptose führt (33). Perforin bindet an die Zielzellmembran und öffnet eine Pore, durch die Granzyme in die Zielzelle gelangen. Dort initiieren sie die Apoptose durch Aktivierung von Caspasen oder durch die Freisetzung von Cytochrom-P aus den Mitochondrien (118).

1.2.3 Host-versus-Graft-Reaktion

Bei der HvG-Reaktion richtet sich das Immunsystem des Empfängers gegen das Transplantat. Die HvG-Reaktion spielt vor allem bei der Transplantation von Organen eine Rolle, da in diesem Fall der Empfänger immunkompetent ist und das Transplantat abstoßen kann. Bei der SZT hat die HvG-Reaktion eine geringere Bedeutung, da das Immunsystem des Empfängers durch die vorangegangene Konditionierungstherapie entweder zerstört oder in seiner Funktion stark eingeschränkt ist und somit nicht suffizient auf das Transplantat reagieren kann. Dennoch kann auch bei der SZT die

HvG-Reaktion zu einem Transplantatversagen führen. Risikofaktoren dafür sind HLA-Disparitäten, vorherige Alloimmunisierung des Empfängers (z.B. durch Transfusionen), ein T-Zell-depletiertes Transplantat, eine unzureichende Konditionierung und eine geringe Zellzahl des Transplantats (117,137).

1.2.4 Graft-versus-Tumor-Effekt

Erstmals wurde das Auftreten eines GvT-Effektes im Zusammenhang mit einer allogenen Transplantation 1956 von Barnes und Loutit beschrieben. Mäuse, die zuerst eine experimentelle Leukämie und später ein allogenes Transplantat aus Knochenmark und Milzzellen erhalten hatten, zeigten eine Remission der Leukämie (8).

Weitere Studien zeigten, dass der GvT-Effekt durch die GvHD beeinflusst wird. Leukämiepatienten nach allogener SZT, die eine akute oder chronische GvHD entwickelten, wiesen eine geringere Rezidivrate auf als Patienten ohne GvHD (55,133). Durch diese Beziehung zur GvHD ist der GvT-Effekt vor allem eine Besonderheit der allogenen SZT.

Spender-T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei dem GvT-Effekt; so wiesen Patienten mit einem T-Zell-depletierten Transplantat eine höhere Rezidivrate auf als Patienten mit einem normalen Transplantat (55). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass die Gabe von zusätzlichen Lymphozyten im Rahmen einer Donor-Leukozyten-Infusion zur Remission führen kann (59,60).

Zu den Zielstrukturen für die zytotoxischen T-Zellen zählen Tumorantigene, virale Antigene, inkompatible MHC-Moleküle und mHAGs (14). Studien zeigen, dass der T-Zell-vermittelte GvT-Effekt in zwei verschiedene Komponenten unterteilt werden kann, eine alloreaktive und eine tumorspezifische (63,114). Die alloreaktive Komponente läuft zusammen mit einer GvHD ab und hat als Zielstruktur Alloantigene wie disparate MHC-Moleküle oder mHAGs (55,115). Die tumorspezifische T-Zell-Antwort wird durch eine GvHD und das damit einhergehende proinflammatorische Zytokinmilieu induziert; sie richtet sich vornehmlich gegen Tumorantigene, aber auch gegen gewebespezifische mHAGs, welche nicht ubiquitär exprimiert werden (84,115).

Der GvT-Effekt basiert aber nicht nur auf einer T-Zell-Antwort, natürliche Killerzellen können ebenfalls einen GvT-Effekt generieren. Die Alloreaktivität der natürlichen Killerzellen wird durch ein Zusammenspiel aus inhibierenden und aktivierenden KIR-Rezeptoren (Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren) reguliert. Körpereigene MHC-Klasse-I-Moleküle sind Liganden für inhibierende Rezeptoren (128). Bei einem

KIR-Liganden-Mismatch im Rahmen einer allogenen SZT können durch das Fehlen von inhibierenden KIR-Liganden auf Empfängerzellen die natürlichen Killerzellen des Spenders aktiviert werden (31,104,105). Aber auch bei einer HLA-identen SZT kann es zu einer Alloreaktion kommen. Hierbei wird der Effekt von aktivierenden Liganden auf natürliche Killerzellen des Spenders diskutiert (23,25,127).

1.3 Molekulare Grundlagen der Immunreaktionen

1.3.1 Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexe

Der Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (*engl.* Major Histocompatibility Complex, MHC) ist eine ca. 3,8 Mb (Megabasen) große Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21.3). 1999 wurden durch eine komplette Sequenzierung der Region 224 Gen-Loci gefunden, von denen ca. 40% für das Immunsystem kodieren (122). Unter anderem kodiert die Region für die MHC-Moleküle, die im Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Immunerkennung und Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen spielen; von diesen MHC-Molekülen leitet sich auch der Name dieser Gen-Region ab. Beim Menschen wird MHC auch als Humanes Leukozyten Antigen (HLA) bezeichnet. Das Äquivalent für HLA in der Maus sind die Histokompatibilitätsantigene-2 (H2), welche auf Chromosom 17 lokalisiert sind.

MHC-Moleküle werden in Moleküle der Klasse I, II und III unterteilt, wobei für die SZT vor allem die Klassen I und II eine Rolle spielen. Die Ausprägung des HLA-Profiles eines Menschen ist durch die bestehende Polygenie und den Polymorphismus der MHC-Gene sehr variabel, dabei sind die unterschiedlichen Allele kodominant zueinander. Allein für HLA-A gibt es hunderte verschiedene Allele (54).

MHC-Klasse-I-Moleküle sind Heterodimere, die aus einer MHC-kodierten α -Kette und dem nicht-MHC-kodierten β_2 -Mikroglobulin (Chromosom 15q) bestehen. Die α -Kette besteht aus einer zytosolischen Domäne, einer Transmembrandomäne und drei extrazellulären Immunglobulindomänen (α_1 - α_3). Das β_2 -Mikroglobulin assoziiert nicht-kovalent mit den extrazellulären Domänen der α -Kette, welche das Peptid binden.

Die HLA-Klasse-I-Gene HLA-A, -B, und -C sind hochgradig polymorph, während HLA -E, -F, und -G eine geringere Variabilität aufweisen (76). Bei der Maus kodieren H2-K, -D, und -L für MHC-Klasse-I-Moleküle (81).

MHC-Klasse-I-Moleküle werden nur auf kernhaltigen Zellen exprimiert und sind somit nicht auf Erythrozyten zu finden. Sie präsentieren den T-Zell-Rezeptoren der

Einleitung

zytotoxischen T-Zellen zytosolische Peptidfragmente (entweder zelleigene, virale oder tumorassoziierte). Werden diese Epitope als fremd oder krankhaft erkannt, wird eine Zytolyse eingeleitet, so zum Beispiel bei einer virusbelasteten Zelle oder einem Transplantat.

MHC-Klasse-II-Moleküle bestehen aus jeweils einer α -Kette und einer β -Kette, die ihrerseits jeweils aus einer zytosolischen Domäne, einer Transmembrandomäne und zwei extrazellulären Immunglobulindomänen (α_1 - α_2 bzw. β_1 - β_2) bestehen. Die distalen Immunglobulindomänen (α_1 und β_1) assoziieren nicht-kovalent, um die Peptidbindungsstelle zu formen.

MHC-Klasse-II-Moleküle sind vor allem auf spezialisierten Zellen des Immunsystems zu finden, besonders auf den antigenpräsentierenden Zellen wie B-Zellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen. Ihre Aufgabe ist die Präsentation von Epitopen extrazellulärer Herkunft für den T-Zell-Rezeptor der $CD4^+$ - T_H -Zellen (68). Dazu werden extrazelluläre Proteine durch Endozytose aufgenommen und in Endosomen verdaut. Die MHC-Klasse-II-Moleküle, die von HLA-DM und -DO kodiert werden, sind an der Peptidbeladung in den Endosomen beteiligt (66), während die Moleküle, die von HLA-DR, -DP und -DQ kodiert werden, für die Antigenpräsentation zuständig sind. Bei Mäusen werden die Gene für Moleküle der Klasse-II mit H2-A und -E bezeichnet (68).

1.3.2 Minor-Histokompatibilitätsantigene

Minor-Histokompatibilitätsantigene (mHAg) sind Alloantigene, die sowohl im Rahmen einer GvHD als auch eines GvT-Effektes von Bedeutung sind (43). Sie entstehen durch die Prozessierung von zelleigenen polymorphen Proteinen und werden über MHC-Klasse-I und -II den T-Zell-Rezeptoren präsentiert.

Die mHAg können in zwei Gruppen unterteilt werden, die ubiquitär exprimierten mHAg wie HY und HA-3 und die gewebespezifischen mHAg wie die auf die hämatopoetischen und leukämischen Zellen begrenzten Antigene HA-1 und HA-2.

Frühe Anzeichen für die Relevanz von mHAg für die SZT wurden gefunden, als eine weibliche aplastische Patientin das Knochenmarktransplantat ihres HLA-identischen Bruders abstieß und von ihr zytotoxische T-Zellen isoliert werden konnten, die HLA-identische aber männliche Zellen lysierten (42). Weitere Hinweise für die Bedeutung der vom Y-Chromosom kodierten Antigene zeigten sich in einer retrospektiven Studie mit HLA-identen Familienspenden. Bei einer weiblichen Spenderin und einem männlichen

Empfänger war das Rezidivrisiko der Leukämie geringer als in allen anderen Geschlechterkombinationen, während das Risiko einer GvHD-Entwicklung größer war (99). Ein weiterer Hinweis für die Relevanz von mHAg ist das häufigere Auftreten einer GvHD bei einer HLA-identen Fremdspende im Vergleich zu einer HLA-identen Geschwisterspende (106,136).

Die mHAg spielen aber nicht nur in der GvHD sondern auch bei dem GvT-Effekt eine Rolle. Im Mausmodell wurde beobachtet, dass mHAg-spezifische CD8⁺-Zellen das Anwachsen einer myeloischen Leukämie, die dieses mHAg exprimierte, in NOD/SCID-Mäusen verhindern bzw. verzögern konnten (15,46).

Besonders HA-1 und HA-2 sind relevant für leukämische Erkrankungen. Patienten, die ein Rezidiv einer HA-1- oder HA-2-positiven Leukämie nach SZT entwickelten, wurde eine Donor-Leukozyten-Infusion von ihren Spendern gegeben. Diese Spender waren für das entsprechende mHAg der Leukämie negativ. Im Verlauf kam es zu einer kompletten Remission und spezifische CD8⁺-T-Zellen gegen HA-1 bzw. HA-2 konnten isoliert werden (75).

Daraus leiten sich Ansätze für eine spezielle Tumortherapie ab, die zunehmend in den Fokus der Forschung rücken.

Eine Möglichkeit ist ein adoptiver Transfer von spezifischen T-Zellen des Spenders, die gegen mHAg auf dem Tumor gerichtet sind (36,87,132)

Eine weitere Möglichkeit ist eine Impfung gegen mHAg, um die Bildung von spezifischen zytotoxischen T-Zellen zu verstärken (73,102).

1.3.3 Tumorantigene

Die Tumorantigene können in zwei Gruppen unterteilt werden, die tumor-spezifischen Antigene (TSA), auch Neoantigene genannt, die nur von Tumorzellen produziert werden, und die tumor-assoziierten Antigene (TAA), die auch auf normalen Zellen zu finden sind, auf Tumorzellen jedoch stärker exprimiert werden. Diese Einteilung ist jedoch in den Hintergrund gerückt, da Antigene, die man für tumor-spezifisch hielt, später auch auf normalen Zellen gefunden wurden. Eine weitere Einteilung der Tumorantigene ist die Einteilung anhand ihres Expressionsmusters.

Cancer-testis-Antigene entstehen durch epigenetische Veränderungen in der Tumorzelle, dabei werden normalerweise nicht exprimierte Gene reaktiviert und exprimiert (MAGE-Familie, NY-ESO-1). Im gesunden Gewebe werden diese Gene nur in den immunprivilegierten Hoden und teilweise in Plazenta oder Ovar exprimiert (24).

Einleitung

Durch die fehlende Eigentoleranz können sie auf Tumorzellen ein Angriffsziel für das humorale und zelluläre Immunsystem werden (19,126).

Onkofetale Antigene kommen nur in Tumoren und im embryonalen und fetalen Gewebe, nicht aber im erwachsenen Gewebe vor (CEA, AFP).

Differenzierungsantigene kommen in gesunden Zellen und Tumorzellen der gleichen Gewebe vor (Tyrosinase, gp100, MART-1).

Verschiedene Antigene, die auch in normalen Zellen vorkommen, können in transformierten Zellen hochreguliert werden (HER-2/neu, p53, WT1, Tyrosinase). Die Eigentoleranz gegenüber diesen Antigenen ist jedoch nicht komplett, sodass Autoantikörper und spezifische T-Zellen gebildet werden können (6,91,121). Studien haben gezeigt, dass eine Immunisierung mit den Antigenen WT1 (Wilmstumor-Suppressorgen) oder PR1 (ein aus der Proteinase 3 abgeleitetes Peptid) zur Bildung von spezifischen CD8⁺-T-Zellen führt und ein Anti-Tumor-Effekt ausgelöst werden kann (49,90,101).

Onkovirale Proteine treten bei Malignomen auf, deren Entstehung eng mit einer Virusinfektion zusammenhängen, wie z.B. bei HPV (humane Papillomaviren) und Zervixkarzinomen. Dabei werden Virusantigene auf den Tumorzellen präsentiert und können von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Ein Beispiel dafür sind die viralen Onkoproteine E6 und E7, die auf HPV-assoziierten Tumorzellen zu finden sind (41,107).

Mutationsantigene entstehen durch Punktmutationen oder durch Translokationen von Chromosomen und sind nur in Tumorzellen zu finden. Die Mutationen können sehr individuell sein und finden sich deshalb oft nur in dem Tumor eines Patienten. Davon abzugrenzen sind solche Mutationen, die ursächlich mit der Tumorentstehung zusammenhängen, wie z.B. das Fusionsprotein BCR/ABL (*engl.*: Breakpoint Cluster Region/Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog), das auch als Philadelphia-Chromosom bekannt ist. Es tritt bei über 90% der CML-Patienten und bei 30-35% der ALL-Patienten auf (1,35). BCR/ABL entsteht durch die reziproke Translokation t(9;22)(q34;q11) (110). Das ABL-Gen kodiert für eine Tyrosinkinase, die eine wichtige Rolle in der Regulierung des zellulären Wachstums spielt. Durch die Fusion mit der BCR-Region ist die Tyrosinkinase-Aktivität im Fusionsprotein ständig aktiviert, was zu einer unkontrollierten Vermehrung der Zelle führt (93,113).

1.4 Fragestellung der Arbeit

Bei der Therapie mit einer SZT ist die GvHD derzeit immer noch ein limitierender Faktor (34,39). Mit der GvHD assoziiert ist aber der GvT-Effekt, der bei malignen Erkrankungen zur Remission oder Verminderung des Rezidivrisikos führen kann (8,55,133). Eine Trennung von GvHD und GvT-Effekt, um den GvT-Effekt als effektive Tumorthherapie nutzen zu können, ist derzeit noch nicht möglich (63). T-Zellen und natürliche Killerzellen sind als Effektorzellen des GvT-Effektes bekannt (31,55,59,105). Diese richten sich gegen Antigene auf der Tumoroberfläche wie Tumorantigene oder Alloantigene (MHC-Moleküle oder mHAg) (9,14,115). Die genauen Funktionen dieser verschiedenen Antigen-Gruppen und deren Einfluss auf einen GvT-Effekt sind noch nicht genau geklärt.

Deshalb ist es nötig, die einzelnen Gruppen hinsichtlich ihrer Funktion und ihres Einflusses auf den GvT-Effekt zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein allogenes Transplantationsmodell gewählt, das die Untersuchung des Effekts von definierten Alloantigenen wie disparaten MHC-Molekülen oder mHAg auf einen GvT-Effekt ermöglicht. In das murine Lymphom MPC-11 aus dem Inzuchtstamm BALB/c (H-2K^d) wurden durch Genmanipulation die Alloantigene H-2K^k (CBA/J) oder H-2K^b (C57Bl/6) transfiziert. Als Empfänger wurde die F1-Generation [BALB/cx CBA/J] (H-2K^{dk}) und als Spender BALB/c (H-2K^d) gewählt. Durch diese Konstellation war es möglich, eine tumorspezifische von einer allospezifischen GvT-Reaktion abzugrenzen, da der Modelltumor syngon zum Spender war und somit nur tumorspezifische Reaktionen zuließ. Von besonderem Interesse war der Einfluss des Expressionsmusters der spenderinkompatiblen Alloantigene im Empfänger und Tumor auf den GvT-Effekt; das Alloantigen H-2K^k wurde ubiquitär und das Alloantigen H-2K^b nur exklusiv auf dem Tumor exprimiert. Ergänzend sollte untersucht werden, welchen Einfluss das mHAg UTY (kodiert vom Y-Chromosom) auf einen GvT-Effekt hat, wenn es nur exklusiv im Tumor exprimiert wird. Ziel war es, die Entstehung des GvT-Effektes besser zu charakterisieren und so den Weg zu bahnen, ihn von der GvHD zu entkoppeln und klinisch nutzbar zu machen.

2 Material und Methoden

Folgende Geräte und Materialien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Geräte

Autoklav	Varioklav®, H+P Labortechnik, Oberschleißheim
CO ₂ -Inkubator	Heracell, Heraeus, Hanau
CTL ImmunoSpot Analyzer	CTL Europe GmbH, Bonn
Durchflusszytometer	FACSCalibur™, BD Biosciences, Heidelberg
Einfrierbox	Nalgene, Hamburg
Elektroporator	Gene Pulser, BioRad, München
Feinwaage	PRECISA 100A, Laborbedarf Willers
Hämatocytozometer	Sysmex KX-21, Sysmex GmbH, Norderstedt
Kühl- und Gefrierschränke	Economic, Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Ohrlochzange	NAPOX KN-292B
Phasenkontrastmikroskop	Axiovert 25, Karl Zeiss GmbH, Oberkochen
Photometer, Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	Calimatic 766, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetus akku, Hirschmann, Eberstadt
Rasiergerät	Model 5-55L, Oster®
Sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus, Hanau
Vortexer 40Hz	Velp Scientific, Usmate
Waage	Mettler PB 1502, Mettler-Toledo, Greifensee
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zählkammer	BLAUBRAND®, Wertheim
Zentrifugen	Megafuge 3.0 R, Heraeus, Hanau Sigma KK15

Materialien

CryoTubes	NUNC™, Wiesbaden
Einmalpipetten, steril	BD, Heidelberg
Elektroporations-Küvetten	Eurogentec, Köln
Gewebekulturflaschen	NUNC™, Wiesbaden
Gewebekulturplatten	NUNC™, Wiesbaden
Glasflaschen	Brand, Wertheim

Material und Methoden

Kanülen (27G, 24G)	BD, Heidelberg
Petrischalen	NUNC™, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenröhrchen	BD, Heidelberg
Spritzen	Braun, Melsungen
Zellsieb (Cell Strainer), steril	BD, Heidelberg
Bepanthen®Augen-und Nasensalbe	Bayer AG, Leverkusen
Cotrim-ratiopharm®	ratiopharm, Ulm
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-PBS	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
<i>Erythrocyte Lysis Buffer</i>	Qiagen, Hilden
Ethanol	J.T.Baker, Groß-Gerau
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching
Geneticin (G418)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Hank's buffered saline solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ketanest® S	Pfizer, Berlin
L-Glutamin (100x)	PAA Laboratories, Pasching
Natrium-Azid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories, Pasching
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	PAA Laboratories, Pasching
Propidiumiodid	BD Biosciences, Heidelberg
RPMI 1640 mit Phenolrot und stabilem Glutamin	PAA Laboratories, Pasching
Trypanblau (0,4%)	Invitrogen Life Technologies, Darmstadt

2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.1.1 Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Inzuchtstämme BALB/c (H2-K^d) und CBA/J (H2-K^k) sowie die F1-Generation [BALB/cxCBA/J] (H2-K^{dxk}) verwendet. Die Tiere wurden in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster gezüchtet oder von Charles River Laboratories in Bad Sulzfeld bezogen. Für die Versuche wurden nur weibliche Tiere im Alter von 8–12

Wochen verwendet. Alle Versuchstiere wurden in IVC-Käfigen (individuell ventilierte Käfige) gehalten, um eine gute hygienische Abschirmung der Tiere zu gewährleisten. Alle weiteren Arbeiten mit den Versuchstieren wurden unter einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Das Tierversuchsvorhaben wurde von der LANUV NRW (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) genehmigt (AZ 9.93.2.10.36.07.196 vom 05.12.2007 und AZ 84-02.04.2012.A037 vom 10.07.2012).

2.1.2 Präparation von Milzzellen

Murine Milzzellen wurden aus Spendertieren gewonnen. Die Tötung der Tiere erfolgte mittels CO₂-Inhalation. Anschließend wurden die Spendertiere in 70%igem Ethanol desinfiziert und die Milzen unter sterilen Bedingungen entnommen. Diese wurden mit dem Stempel einer 5-ml-Spritze durch einen Cell Strainer (70µm) gedrückt und mit PBS gewaschen (360g, 6min, 4°C). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in PBS oder einem anderen serumfreien Medium resuspendiert. Entstandene Zellaggregate wurden durch mehrfaches Pipettieren aufgelöst und die Suspension nochmals mit einem Cell Strainer gefiltert. Danach wurde die Zellzahl bestimmt und die Suspension auf die erforderliche Konzentration eingestellt.

Sofern Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert werden sollten, wurde nach dem Waschen der Zellen eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt. Dazu wurde das Zellpellet in 2ml *Erythrocyte Lysis Buffer* resuspendiert und für 7min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lyse per Verdünnung mit 20ml PBS gestoppt und die Suspension nochmals zentrifugiert (360g, 6min, 4°C). Das entstandene Zellpellet wurde in 1ml FACS-PBS aufgenommen.

2.1.3 Präparation von Knochenmarkstammzellen

Murine Knochenmarkstammzellen wurden direkt aus Spendertieren gewonnen. Die Tötung erfolgte durch CO₂-Inhalation, die Desinfizierung mit 70%igem Ethanol. Anschließend wurden die Femores und Tibiae beider Hintergliedmaßen unter sterilen Bedingungen freipräpariert. Die proximalen und distalen Enden der Knochen wurden eröffnet und das Knochenmark mittels einer PBS-gefüllten 10-ml-Spritze mit aufgesetzter Kanüle (20G) in eine mit PBS gefüllte Petri-Schale ausgespült. Durch mehrfaches Pipettieren wurde eine Zellsuspension erstellt, die durch einen Cell Strainer (70µm) gefiltert wurde. Anschließend wurde die Suspension mit PBS gewaschen (360g, 5min, 4°C). Nach Abnahme des Überstandes wurde das

verbleibende Zellpellet mit PBS oder einem anderen serumfreien Medium resuspendiert. Danach erfolgte die Zellzählung in einem Hämatologie-Analysator (Sysmex KX-21, Sysmex GmbH) und die Einstellung auf die gewünschte Konzentration.

2.1.4 Tumorzellapplikation

Um sicherzustellen, dass sich die Tumorzellen in einer Wachstumsphase befanden, wurde darauf geachtet, dass sie am Tag der Applikation bis zu 80% konfluent waren. Sie wurden in serumfreiem Hanks BSS auf die gewünschte Konzentration eingestellt, meist 10^6 Zellen /100 μ l Hanks BSS.

Die Flanken der Versuchstiere wurden rasiert und die Tiere mit Ketamin narkotisiert. Anschließend wurden 100 μ l der Suspension subkutan in eine Flanke appliziert.

Wurden zwei verschiedene Tumoren appliziert, wurde der eine in die linke, der andere in die rechte Flanke gespritzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Abstand zwischen den beiden Applikationen groß genug war, um eine Vermischung der Tumoren *in vivo* zu vermeiden.

Die Augen der Mäuse wurden während der Betäubung mit Augensalbe versehen, um diese vor einem Austrocknen zu schützen.

2.1.5 Transplantation der Mäuse

Am Tag vor der Transplantation (Tag -1) erfolgte eine Konditionierungstherapie der Empfänger mit 10Gy (F1[BALB/cxCBA/J]) oder 8Gy (BALB/c) Ganzkörperbestrahlung (*engl.* Total Body Irradiation, TBI) an einem Linearbeschleuniger (Clinac 600SR, Varian Medical Systems) der Klinik für Strahlentherapie der Universitätsklinik Münster.

Am nächsten Tag (Tag 0) erhielten die Empfänger ein Transplantat aus dem Knochenmark der Spendertiere. Alle Empfänger erhielten $1,4-2 \times 10^7$ Knochenmarkzellen. Ein Teil erhielt außerdem 1×10^7 aus Spendermilzen gewonnene Zellen. Dabei wurde beachtet, dass allen Tieren das gleiche Volumen appliziert wurde. Die Injektion erfolgte in eine laterale Schwanzvene.

Um die Injektion zu erleichtern, wurden die Tiere vorher unter einer Rotlichtlampe erwärmt, was zu einer Dilatation der Schwanzvenen führte. Die Tiere befanden sich während der Injektion in einer Plexiglashalterung. Aufgrund des supprimierten Immunsystems im Rahmen der Konditionierung und der Transplantation erhielten die

Empfänger im Verlauf des Experiments eine prophylaktische Antibiotikatherapie mit Cotrimoxazol im Trinkwasser (200mg/l).

2.1.6 Monitoring der Tiere

Der Gesundheitszustand der Empfänger wurde dreimal wöchentlich mithilfe des GvHD-Scores nach Cooke (Tab. 1) ermittelt (26). Dieser Score besteht aus den fünf Parametern Gewichtsabnahme, Fellbeschaffenheit, Haltung, Aktivität und Hautintegrität. In jeder Kategorie wurden 0 bis 2 Punkte (Grad 1–3) vergeben.

Parameter	Grad 1	Grad 2	Grad 3
Gewichtsverlust	<10%	10% bis 25%	>25%
Haltung	normal	Buckel (nur in Ruhe auffallend)	Buckel mit Einschränkung der Beweglichkeit
Fellbeschaffenheit	normal	leicht bis mittelgradig rau	ausgeprägt rau / schlechte Fellpflege
Aktivität	normal	leicht bis mittelgradig vermindert	Aktivität nur nach Stimulation
Hautintegrität	normal	Hautschuppung an den Pfoten und am Schwanz	stellenweise Fellverlust

Tab. 1: GvHD-Score nach Cooke (26)

Außerdem wurde die Tumorgroße ebenfalls dreimal wöchentlich mit einer Schieblehre gemessen.

Das Tumolvolumen wurde mit folgender Formel berechnet.

$$Tumolvolumen[mm^3] = 0,5 \times \varnothing_{min}^2 \times \varnothing_{max}$$

$$\varnothing_{min} = \text{kleinster Durchmesser [mm]}$$

$$\varnothing_{max} = \text{größter Durchmesser [mm]}$$

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung muriner Tumorzelllinien

Die Kultivierung der murinen Tumorzelllinien erfolgte unter Standardbedingungen im Brutschrank (27°C, 5% CO₂, 99% Luftfeuchtigkeit) in sterilen Zellkulturflaschen. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 (mit stabilem Glutamin) mit Zusätzen verwendet.

Medium	Zusammensetzung
Standardmedium	500ml RPMI 1640 (mit stabilem Glutamin), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Natriumpyruvat
Selektionsmedium	Standardmedium, 1% G418
Einfriermedium	50% DMSO, 50% FCS
FACS-PBS	500ml PBS, 2,5% FCS, 0,1% Na-Azid

Tab. 2: Herstellung von Zellkulturmedien

Die Zellen wurden 1–2 Mal pro Woche passagiert. Dabei wurden zunächst die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mit mehrmaligem Pipettieren gelöst. Je nach Zelldichte wurde ein Teil der Suspension verworfen und der Rest mit frischem Kulturmedium aufgefüllt.

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank in laminarem Luftstrom durchgeführt.

Zelllinie	Genotyp	
MPC-11	Plasmozytom	H-2K ^d
LLC	<i>Lewis lung cell cancer</i>	H-2K ^b
BI 291	Lymphom	H-2K ^b

Tab. 3: verwendete Tumorzelllinien

2.2.2 Auftauen von Zellen

Das Cryotube wurde im Wasserbad (37°C) erwärmt, bis der Inhalt fast komplett geschmolzen war. Dann wurde das Cryotube desinfiziert und die Zellsuspension in ein 50-ml-Falcon transferiert. Anschließend wurde über 5min Standardmedium dazugegeben, um die DMSO-Konzentration langsam zu verringern. Dann wurde die

Suspension gewaschen (360g, 5min, RT) und anschließend in Standardmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen aufgeteilt.

2.2.3 Einfrieren von Zellen

Zum Kryokonservieren wurden die Zellen in der Konzentration von 2×10^6 / 900 μ l in frischem Kulturmedium aufgenommen und 10min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde Einfriermedium im Verhältnis 1:1 dazugegeben und die Suspension in Cryotubes überführt. Diese wurden unverzüglich in eine vorgekühlte Einfrierbox gestellt und danach bei -80°C eingefroren. Nach zwei bis vier Tagen erfolgte die endgültige Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff. Nach etwa sieben Tagen wurde eines der Tubes aufgetaut, um den Erfolg des Einfriervorgangs zu kontrollieren.

2.2.4 Zählung von Zellen

Milzzellen und Knochenmarkzellen wurden mithilfe eines Hämatologie-Analysators (Sysmex KX-21, Sysmex GmbH) gezählt. Die entsprechenden Zellen wurden als WBC (White Blood Count) erkannt und in $10^3/\mu\text{l}$ ausgegeben.

Murine Tumorzellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dazu wurde die Probe mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt, 10 μ l dieser Zellsuspension in die Kammer appliziert und unter einem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Durch die Verwendung von Trypanblau konnten die toten Zellen und Zelltrümmer identifiziert werden, da Trypanblau nicht durch eine vitale Zellmembran dringen kann, sich aber in toten Zellen und Zelltrümmern anreichert.

Die Zellzahl wurde unter Berücksichtigung des Kammer- und Verdünnungsfaktors sowie des gezählten Mittelwerts bestimmt.

2.2.5 ELISpot

Der Interferon- γ -*ELISpot* (*engl.* Enzyme Linked Immuno Spot Essay) ist eine Methode, um die spezifische zelluläre Aktivität von Immunzellen nachzuweisen.

Effektor-Zellen (Immunzellen) und Target-Zellen (Tumorzellen) werden gemeinsam inkubiert. Erkennt eine Effektor-Zelle ein für sie relevantes Antigen auf einer Target-Zelle, setzt sie unter anderem Interferon- γ frei.

Dieses sezernierte Interferon- γ wird von Anti-Interferon- γ -Antikörpern auf der Platte gebunden. Anschließend wird das fixierte Interferon- γ von einem zweiten mit einem

Material und Methoden

Enzym gekoppelten Antikörper nochmals gebunden. Das Enzym Streptavidin-Horseradish-Peroxidase setzt das Farbstoffsubstrat TMB um, wodurch die Zytokine als kleine blauschwarze Punkte (Spots) erscheinen. Jeder entstandene Spot repräsentiert eine aktivierte Immunzelle.

Die aus Versuchstieren entnommenen Milzen wurden wie in 2.1.2 vorbereitet. Nach Einstellung auf die gewünschte Konzentration wurden $2-2,5 \times 10^5$ Milzzellen im Verhältnis 1:1 sowie in einer Verdünnungsreihe mit bestrahlten Tumorzellen auf die 96-well *ELISpot*-Platte pipettiert. Als Negativkontrolle wurde Standardmedium verwendet. Anschließend wurde die Platte drei Tage im Inkubator kultiviert. Danach erfolgte die Entwicklung der Platten nach Herstellerangaben (MabTech). Die Zählung der Spots wurde mit einem *ELISpot*-Reader (CTL ImmunoSpot Analyzer, CTL Europe GmbH) durchgeführt.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einer logarithmischen Graphik. Da Nullwerte dort nicht abgebildet werden können, sind fehlende Messpunkte in den Graphiken als Null zu interpretieren (Abb. 21/22).

2.2.6 Bestrahlung von Tumorzellen

Als Targets für einen *ELISpot* benötigt man Zellen, bei denen die DNA-Replikation und damit die Proliferation unterbunden ist. Gleichzeitig dürfen andere physiologische Funktionen wie Antigenpräsentation und Zytokinproduktion nicht beeinträchtigt sein. Deshalb wurden die Zellen radioaktiv bestrahlt, dabei war die benötigte Strahlenintensität abhängig von der Strahlensensibilität der Zellen. Diese wurde empirisch bestimmt, für MPC-11-Tumorzellen war die benötigte Dosis 90Gy. Dies wurde mit einem Röntgenbestrahlungsgerät (BIOBEAM GM 8000, Gamma-Service Medical GmbH) der Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Münster durchgeführt.

2.3 Transfektionen

2.3.1 Vektor pcDNA-UTY-GFP#62 und pcDNA3.1-GFP

Um das mHAg UTY in die Tumorzelllinie LLC (*Lewis lung cell cancer*) zu integrieren, wurde der Vektor pcDNA-UTY-GFP#62 verwendet.

UTY ist eine Histon-Demethylase und kommt nur in männlichen Mäusen vor, da die kodierenden Sequenzen auf dem Y-Chromosom liegen. LLC ist ein Lungenkarzinom, das aus C57Bl/6-Mäusen gewonnen wurde. Für die Selektion erfolgreich transfizierter

Zellen wurde außerdem ein Neomycinresistenzgen in den Vektor integriert. Dieses Resistenzgen kodiert das Enzym Aminoglykosidphosphotransferase.

G-418 ist das Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin, welches die Proteinbiosynthese hemmt, indem es an 80S-Ribosomen bindet und somit die Elongation der Translation verhindert. Im Gegensatz zu vielen anderen Aminoglykosiden, die nur an prokaryotische 70S-Ribosomen binden können, kann G418 somit auch eukaryotische Zellen inhibieren.

Transfizierte Zellen sind durch das Vorhandensein des Enzyms Aminoglykosidphosphotransferase immun gegen G-418, da eine Phosphorylierung der Aminoglykosidgruppen den Transport des Antibiotikums in die Zelle verhindert. Somit können transfizierte Zellen im Selektionsmedium überleben. Alle anderen Zellen werden durch die Inhibition der Proteinbiosynthese eliminiert.

Das GFP-Gen kodiert GFP (*engl. green fluorescent protein*), das nach Anregung mit UV-Licht grünes Licht emittiert. GFP wurde als Reportergen für UTY verwendet, da GFP in der Durchflusszytometrie direkt gemessen werden kann.

Um eine Reaktion des Immunsystems auf GFP allein auszuschließen, wurde außerdem der Vektor pcDNA3.1-GFP verwendet. Dieser war bis auf das Vorhandensein von UTY identisch mit pcDNA-UTY-GFP#62.

2.3.2 Elektroporation

Die Transfektion fand in RPMI-1640-Medium statt, 700µl LLC-Zellsuspension und 20µg Plasmid wurden in einer Küvette gemischt.

In einem Elektroporator (Gene Pulser, BioRad) wurde die Küvette einem kurzen elektrischen Impuls mit der Spannung 250V und der Kapazität 500µF ausgesetzt. Anschließend wurde die Suspension in 12ml Standardmedium überführt und 24h inkubiert. Danach wurde die Hälfte des Mediums durch Selektionsmedium ersetzt. Weitere 24h später wurden die Zellen nach einer Zentrifugation (360g, 5min, RT) in reinem Selektionsmedium aufgenommen.

2.3.3 Nanofectin

Die Transfektion mit Nanofectin (PAA Laboratories) beruht auf dem Einsatz von positiv geladenen Nanopartikeln, die an die stark negativ geladenen Plasmide binden. Die Nanopartikel sollen einerseits die Aufnahme der Plasmide in die Zelle erleichtern und andererseits die Plasmide vor vorzeitigem Abbau in der Zelle schützen.

Material und Methoden

Auf einer 6-well-Platte wurden pro well $0,6 \times 10^6$ LLC-Zellen mit 2ml Standardmedium ausgesät. 24h später wurde die DNA-Nanofectin-Suspension nach Herstellerangaben gemischt, inkubiert und anschließend auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Es wurden verschiedene DNA-Nanofectin-Verhältnisse angewendet (Tab. 4).

Ansatz I	DNA	Nanofectin	Diluent	Ratio
1	2µg	6µl	2x100µl	2
2	2µg	9,6µl	2x100µl	3
3	2µg	12µl	2x100µl	4
4	4µg	19,2µl	2x100µl	3
Ansatz II				
1	6µg	12µl	2x100µl	2
2	6µg	19,2µl	2x100µl	3
3	6µg	24µl	2x100µl	4

Tab. 4: Transfektion mit Nanofectin

Die Ratio beschreibt die vom Hersteller vorgeschlagenen Verhältnisse zwischen DNA und Nanofectin.

Nach 2h wurde das Medium verdoppelt, und nach weiteren 48h Inkubation wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt und mit Selektionsmedium aufgefüllt.

2.3.4 Magnetofection™

Bei der Magnetofection™ werden die Plasmide mit magnetischen Partikeln gekoppelt, um dann mithilfe eines Magnetfeldes in Richtung der zu transfizierenden Zellen gezogen zu werden. Dieser Effekt erhöht die Wahrscheinlichkeit eines Kontakts zwischen Plasmid und Zelle.

In der ersten Ansatzreihe wurde das Transfektions-Reagenz PolyMag (OZ Biosciences) verwendet.

$0,5 \times 10^6$ Zellen LLC wurden am Vortag auf einer 24-well-Platte ausgesät.

Die DNA und das PolyMag wurden nach Herstellerangaben gemischt und 20 Minuten lang inkubiert (Tab. 5 Ansatz I). Anschließend wurde die Suspension auf die nach unten zentrifugierten Zellen gegeben und die 24-well-Platte 20min auf der Magnetplatte im Inkubator inkubiert. 24h später wurden die Zellen auf eine 6-well-Platte überführt, weitere 24h später wurde das Medium durch Selektionsmedium ersetzt.

In der zweiten Ansatzreihe wurden die Transfektions-Reagenzien CombiMag (OZ Biosciences) und Nanofectin verwendet. Die Nanofectin-DNA-Suspension wurde mit dem CombiMag gemischt und anschließend 30min inkubiert (Tab. 5 Ansatz II). Dann wurde sie auf die nach unten zentrifugierten Zellen gegeben und 20min auf der Magnetplatte inkubiert.

48h später wurde das Medium wieder durch Selektionsmedium ersetzt.

Ansatz I	DNA	PolyMag		
1	1µg	0,25µl		
2	1µg	0,5µl		
3	1µg	1µl		
4	1µg	2µl		
5	1µg	4µl		
Ansatz II	DNA	CombiMag	Nanofectin	Ratio
1	2µg	0,25µl	6,4µl	3
2	2µg	0,5µl	6,4µl	3
3	2µg	1µl	6,4µl	3
4	2µg	2µl	6,4µl	3
5	2µg	4µl	6,4µl	3

Tab. 5: Magnetofection™ mit PolyMag und CombiMag

Die Ratio beschreibt die vom Hersteller vorgeschlagenen Verhältnisse zwischen DNA und Nanofectin.

2.3.5 DreamFect™ Gold

DreamFect™ Gold (OZ Biosciences) ist ein Lipopolyamin, das die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zielzelle erleichtern soll.

$2,5 \times 10^5$ Zellen wurden in 250µl RPMI+Glutamin auf einer 24-well-Platte ausgesät. Die DNA und das DreamFect™ Gold wurden nach Herstellerangaben vorbereitet, 20min inkubiert und dann auf die Zellen gegeben. In den Ansätzen 1–4 wurde das Medium nach 25min mit RPMI+Glutamin verdoppelt, in den Ansätzen 5 und 6 wurde es sofort mit Standardmedium verdoppelt. Nach 5h wurde in jeden Ansatz zusätzlich 250µl Standardmedium gegeben (Tab. 6).

48h später wurde das Medium durch Selektionsmedium ersetzt.

Ansatz	DNA	DreamFect™ Gold	Diluent	Zelldichte	Medium
1	2µg	6µl	PBS	10x	RPMI+Glutamin
2	2µg	12µl	PBS	10x	
3	2µg	6µl	RPMI	10x	
4	2µg	12µl	RPMI	10x	
5	2µg	6µl	RPMI	1x	Standardmedium
6	2µg	12µl	RPMI	1x	

Tab. 6: Transfektion mit DreamFect™ Gold

2.3.6 Testen der Zellen und Subklonierung

Die verschiedenen Ansätze wurden im Verlauf auf das Vorhandensein des Plasmids per Durchflusszytometrie getestet – als Marker diente GFP.

Um aus den transfizierten Zellen eine monoklonale Zelllinie zu generieren, wurden für das Plasmid positive Ansätze subkloniert. Dazu wurden die Zellen auf einer 96-well-Platte auf 1–5 Zellen pro well vereinzelt. Nach 2–3 Tagen wurden die angewachsenen Zellen nochmals per Durchflusszytometrie überprüft. Positive Populationen wurden wieder mit einer Zelle pro well subkloniert. Nach weiteren 2–3 Tagen wurden die Zellen erneut per Durchflusszytometrie überprüft, die positiven Populationen wurden in Zellkulturflaschen überführt und kultiviert.

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Grundlagen

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei dem Zellen in hoher Geschwindigkeit an einem Laser vorbeifließen. Die dabei entstehende Beugung (FSC=*Forward Scatter*) und Brechung (SSC=*Side Scatter*) des Lichts wird von einem Detektor gemessen, dies lässt auf die Form und Struktur der Zelle schließen. Zusätzlich können die Zellen mit Antikörpern, an die ein Fluorochrom gekoppelt ist, markiert werden. Fluorochrome sind fluoreszierende Stoffe, die durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden können und wenige Nanosekunden später Licht mit einer anderen Wellenlänge emittieren. Die Wellenlängen der Exzitation und der Emission sind spezifisch für das jeweilige Fluorochrom. Deshalb können unterschiedliche Fluorochrome gleichzeitig gemessen werden. Dies ermöglicht die Untersuchung von mehrfach gefärbten Zellen. Alle Messungen wurden am

FACSCalibur (BD Bioscience) durchgeführt. Die weitergehende Auswertung erfolgte mit dem Prorammm *FlowJo*.

2.4.2 Antikörper

Für die Analyse der Tumorzellen und Milzzellen wurden Antikörper gegen verschiedene murine Antigene auf der Zelloberfläche benutzt. Diese waren gegen H-2K^k, H-2K^b und H-2K^d gerichtet. H-2K kodiert ein murines MHC-Klasse-I-Molekül; *k*, *b* und *d* sind verschiedene Haplotypen dieses Gens.

Fluorochrom	Exzitationsmaximum	Emissionsmaximum	Kanal
PE (R-Phycoerythrin)	496nm	578nm	FL2
FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)	494nm	520nm	FL1
GFP	498nm	509nm	FL1
Propidiumiodid	535nm	617nm	FL2

Tab. 7: Fluorochrome

FL1 und FL2 bezeichnen verschiedene Fluoreszenzdetektoren im Durchflusszytometer.

Um eine unspezifische Bindung der fluoreszenz-markierten Antikörper an Fc-Rezeptoren der Zellen zu verhindern, wurde ein Antikörper gegen CD16/CD32 (Fc-Block) eingesetzt. CD16 und/oder CD32 sind unter anderem auf natürlichen Killerzellen, Monozyten, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen zu finden.

Alle verwendeten Antikörper wurden von BD Science bezogen.

2.4.3 Vorbereitung der *ex vivo* Tumoren für die Durchflusszytometrie

Den durch CO₂-Inhalation getöteten und mit 70%igem Ethanol desinfizierten Versuchstieren wurden die subkutan gewachsenen Tumoren entnommen. Diese wurden mithilfe einer Schere herausgetrennt und anschließend mit dem Stempel einer 5-ml-Spritze durch einen Cell Strainer (70µm) gedrückt, um eine Zellsuspension zu erhalten. Diese wurde mit PBS gewaschen (1800rpm, 5min, RT), der Überstand wurde verworfen.

War das zurückbleibende Zellpellet intensiv rot, was auf eine hohe Anzahl Erythrozyten schließen ließ, wurde eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt. Dazu wurde das Zellpellet mit 1ml *Erythrocyte Lysis Buffer* resuspendiert und 6min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lyse mit der Zugabe von 20ml PBS gestoppt und die

Suspension nochmals gewaschen (1800rpm, 5min, RT). Das entstandene Zellpellet wurde mit 1ml FACS-PBS resuspendiert. War die Tumormasse sehr gering, wurde weniger Medium verwendet.

2.4.4 Antikörperfärbung von Tumorzellen und Milzzellen

Für die Durchflusszytometrie-Analyse wurden die Zellsuspensionen der Tumoren oder Milzzellen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert.

Dazu wurden 50µl der Zellsuspension auf eine 96-well-Platte gegeben und nach unten zentrifugiert (1800rpm, 5min, RT). Nach der makroskopischen Zellpellet-Kontrolle wurde das Medium abgeschlagen, die Zellpellets mit 100µl der Antikörper-Suspension (Tab. 8) resuspendiert und 20min auf Eis unter Ausschluss von Licht inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 150µl FACS-PBS gewaschen (1800rpm, 5min, 4°C), der Überstand abgeschlagen und das Zellpellet erneut in 100µl FACS-PBS aufgenommen. Danach erfolgte die Durchflusszytometrie-Analyse.

Antikörper	Verdünnung mit PBS	Hersteller
FITC anti mouse (H-2K ^d)	1:100	BD Bioscience
PE anti mouse (H-2K ^k)	1:100	BD Bioscience
PE anti mouse (H-2K ^b)	1:100	BD Bioscience
Fc-Block	1:50	BD Bioscience

Tab. 8: Antikörper und ihre Verdünnung

2.5 Statistische Auswertungsverfahren

2.5.1 Bestimmung der Standardabweichung und des SEM

Die Standardabweichung σ ist ein Maß für die Streuung der Messwerte und wird mit folgender Formel berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

x_i =einzelne Messwerte

\bar{x} =Stichprobenmittelwert

n =Stichprobengröße

Der mittlere Standardfehler SEM (*engl. Standard Error of Mean*) ist die Länge der Fehlerbalken der Kurven. Er wird durch folgende Formel berechnet:

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

2.5.2 Bestimmung der Signifikanz

Ein Unterschied zwischen zwei Messwerten ist statistisch signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit p , dass der Unterschied auf einem Zufall beruht, unter 5% liegt, also $p < 0,05$. Zur Berechnung des p -Wertes wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Wenn nicht anders angegeben bezieht sich die Signifikanz auf das Signifikanzniveau $p < 0,05$. Das verwendete Statistikprogramm war SPSS.

2.6 Transplantationsmodell

Für die Transplantationsversuche wurde das haploidente *parent-into*-F1-Modell verwendet (Abb. 1). Es beruht auf einer MHC-disparaten Spender/Empfänger-Konstellation.

Der Inzuchtstamm BALB/c fungierte als Spender und exprimierte den MHC-Lokus H-2K^d. Der Empfänger, die F1-Generation [BALB/cxCBAJ], exprimierte sowohl H-2K^d als auch H-2K^k (H2-K^{dxk}). Somit war nur ein MHC-Haplotyp des Spenders identisch mit dem des Empfängers. Durch die Wahl des Spenders war eine HvG ausgeschlossen,

Material und Methoden

da sowohl Spender als auch Empfänger H2-K^d trugen. Eine GvHD jedoch war möglich, weil H-2K^k im Empfänger durch das Transplantat als fremd/allogen erkannt wurde.

In der murinen Milz ist ein hoher Anteil Lymphozyten (T- und B-Zellen) vorhanden, die eine wichtige Rolle in der Auslösung einer GvHD spielen. Deshalb wurde einem Teil der Empfänger zusätzlich zum Knochenmark Milzzellen transplantiert, um eine stärkere GvHD zu erzeugen.

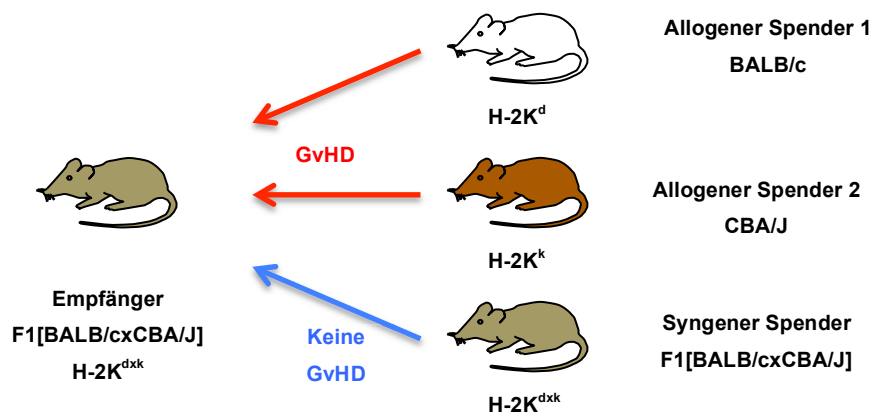


Abb. 1: Murines Transplantationsmodell

Dargestellt sind die möglichen Spender/Empfänger-Konstellationen im murinen Transplantationsmodell. Nur bei parentalem Spender (BALB/c (H-2K^d) oder CBA/J (H-2K^k)) kommt es zu einer GvHD-Reaktion, weil das jeweils andere MHC-Molekül als fremd erkannt wird. Dagegen wird keine HvG ausgelöst, weil der Empfänger selber alle MHC-Moleküle des jeweiligen Spenders enthält. Bei einer syngenen Transplantation kommt es weder zu einer GvHD noch einer HvG, weil die MHC-Moleküle identisch sind.

3 Ergebnisse

Für die Versuche standen zwei MPC-11-Tumorzelllinien, die mit H-2K^k bzw. H-2K^b transfiziert wurden, zur Verfügung. Diese waren bereits im Vorfeld in der Arbeitsgruppe mittels Elektroporation transfiziert und erfolgreich auf ihre Stabilität *in vitro* getestet worden. Beide waren in ihrer Expression von H-2K^k bzw. H-2K^b über Wochen stabil und somit für die weiteren Versuche *in vivo* geeignet.

Es sollte außerdem noch eine Tumorzelllinie mit dem Minor-Histokompatibilitätsantigen UTY erstellt werden. Entsprechende Ansätze blieben aber ohne Erfolg.

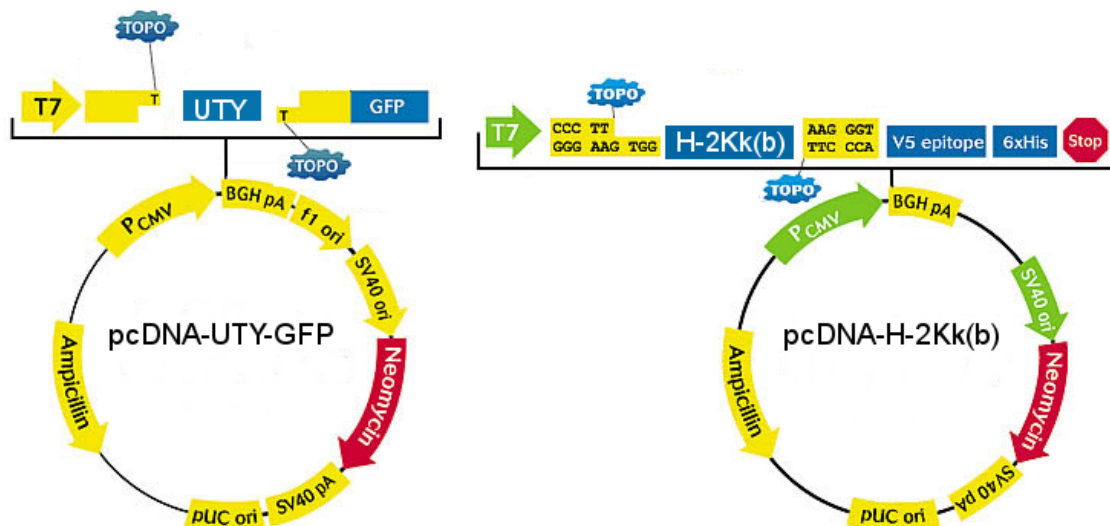


Abb. 2: Karten der Expressionsvektoren pcDNA-UTY-GFP und pcDNA-H-2K[k bzw. b]

Dargestellt sind die TOPO®-Klonierungsstellen, die das Einfügen eines PCR-Produkts ermöglichen, sowie der CMV-Promoter (Cytomegalievirus), der eine starke Expression des rekombinanten Proteins auslöst. Das pUC origin ermöglicht eine hohe Replikation in E.coli. Weiterhin dargestellt sind die Resistenzgene Ampicillin und Neomycin, die eine Selektion in E.coli bzw. eukaryotischen Zellen erlaubt. SV40 löst eine effiziente Expression von Neomycin aus. (Abbildung verändert nach Invitrogen Corporation, Carlsbad)

3.1 Transfektionen von UTY in LLC

Um die Vektoren pcDNA-UTY-GFP bzw. pcDNA3.1-GFP in die Tumorzelllinie LLC zu integrieren, wurden verschiedene Methoden angewandt. Die Ansätze waren transient leicht positiv für den transfizierten Vektor. Die besten Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefasst. Dabei war zu beobachten, dass GFP immer ein besseres Ergebnis zeigte als UTY-GFP.

Ergebnisse

Die Ansätze Nanofectin II.3 und Dreamfect Gold 5 wurden subkloniert, da sie im Vergleich das beste Ergebnis transient zeigten. Allerdings wurde im Verlauf kein positiver Klon für GFP bzw. UTY-GFP gefunden (Abb. 3).

Methode	bester Ansatz	% GFP positiv	% UTY-GFP positiv
Elektroporation	-	0,68	0,42
Nanofectin (s. Tab. 4)	II.3	3,29	0,33
Magnetofektion (s. Tab. 5)			
+Polymag	I.4	0,2	0,12
+Combimag +Nanofectin	II.3	0,2	0
Dreamfect Gold (s. Tab. 6)	5	1,57	0,11

Tab. 9: Übersicht der erfolgreichsten Ansätze

Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte bei Dreamfect Gold an Tag 9, bei allen anderen Ansätzen an Tag 1.

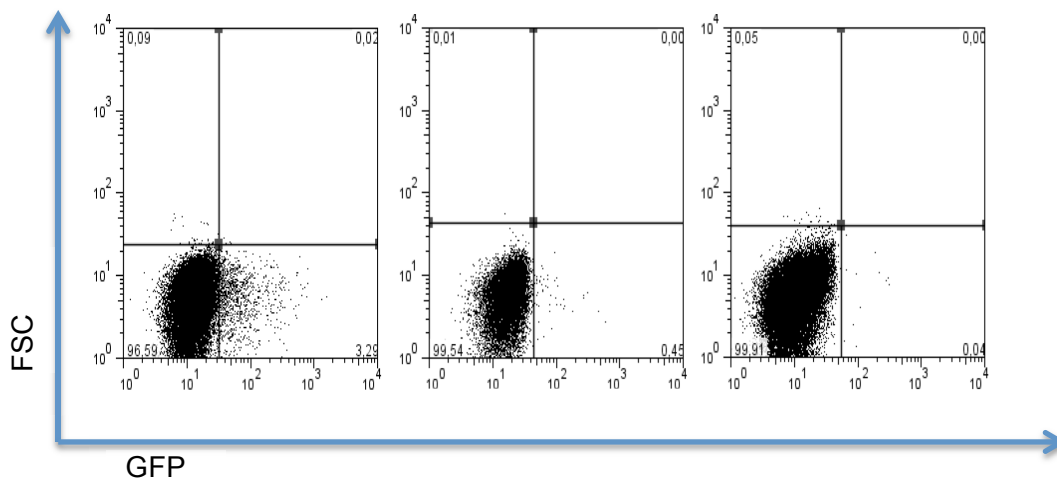


Abb. 3: Auswertung der Durchflusszytometrie-Analyse vom Ansatz Nanofectin II. 3

Dargestellt sind die Messungen der transfizierten Zellen in der Durchflusszytometrie an Tag 1, 7 und 14 nach Transfektion. GFP-positive Zellen sind im rechten unteren Quadranten zu finden. Die Rohdaten wurden mit dem Programm FlowJo aufgearbeitet. Tote und nicht gefärbte Zellen wurden ausgeblendet.

3.2 Vorversuche

3.2.1 Wachstumskinetik und Stabilität von MPC-11-H-2K^k

Um zu untersuchen, ob die mit H-2K^k transfizierte MPC-11-Tumorzelllinie auch *in vivo* eine stabile Expression von H-2K^k aufweist, wurden die Tumoren 14 Tage nach subkutaner Applikation in sechs Tieren der F1-Generation-[BALB/cxCBA/J] (H-2K^{dxk}) entfernt und per Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurden sie mit PE-gekoppelten Mouse-Anti-Mouse-H-2K[k]-Antikörpern gefärbt.

Alle *ex vivo* Tumorzellpopulationen zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich positives Signal für PE und somit auch für H-2K^k (Abb. 4).

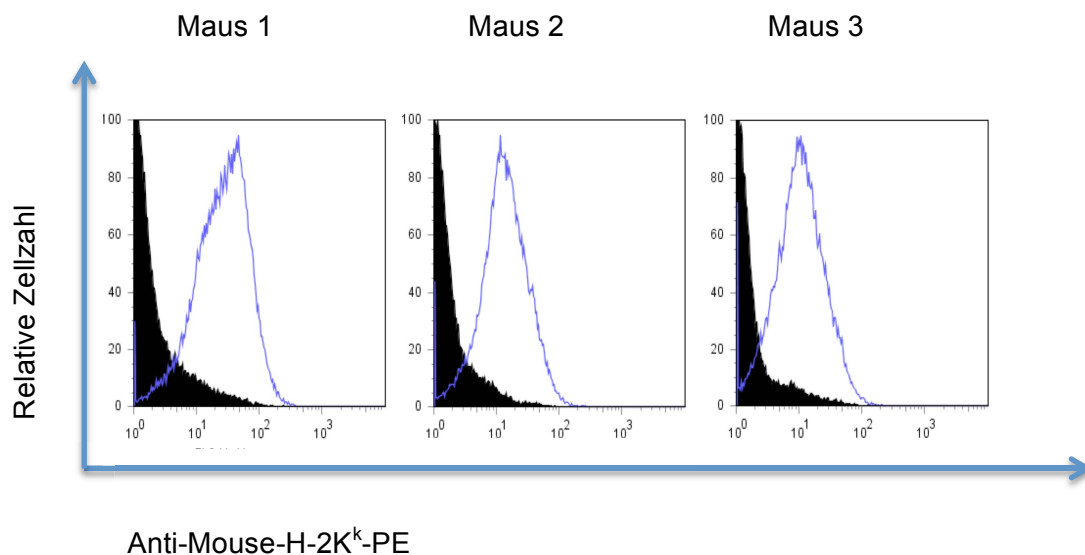


Abb. 4: Stabilität von mit H-2K^k transfizierten MPC-11-Zellen

Durchflusszytometrie-Analyse 14 Tage nach Applikation von transfizierten und Wildtyp-Tumorzellen in die F1-Generation-[BALB/cxCBA/J] (schwarz unterlegt: Wildtyp-Populationen; blaue Linie: transfizierte Zellen). Gefärbt mit einem PE-gekoppelten Mouse-Anti-Mouse-H-2K[k]-Antikörper. Dargestellt sind Zellen aus drei verschiedenen Versuchstieren.

Außerdem wurde die Wachstumskinetiken des mit H-2K^k transfizierten Tumors und des Wildtyp-Tumors verglichen. Dazu wurden beide Tumoren in sechs Mäuse der F1-Generation [BALB/cxCBA/J] appliziert, in die linke Flanke der Wildtyp, in die rechte Flanke der transfizierte Tumor.

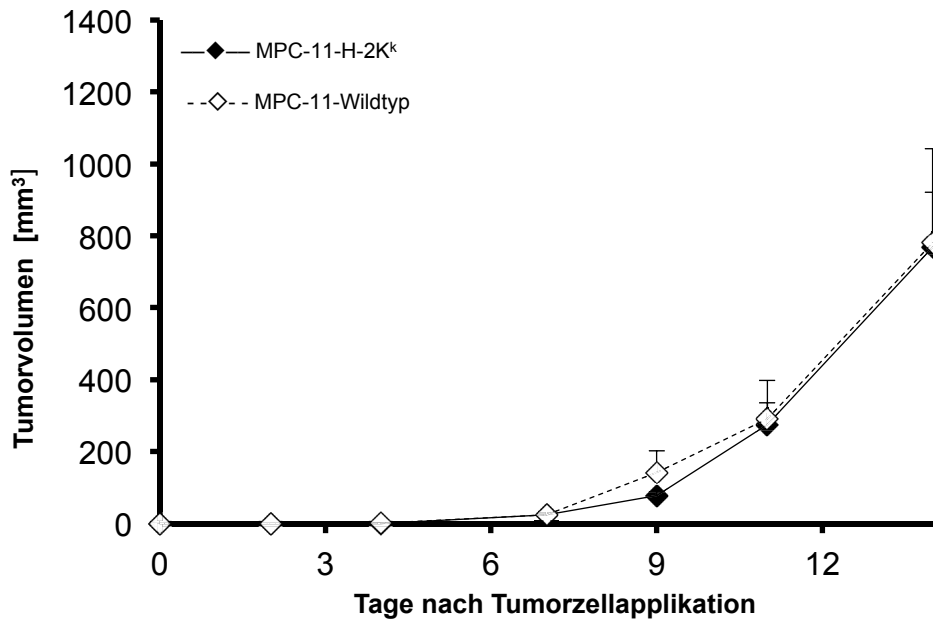


Abb. 5: Tumorwachstum [mm³] des Wildtyp-Tumors (gestrichelte Linie) und des mit H-2K^k transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) in F1[BALB/cxCBA/J]

Sechs F1[BALB/cxCBA/J]-Mäusen wurden jeweils 1×10^6 Wildtyp-Tumor-Zellen in die linke Flanke und 1×10^6 transfizierte Tumor-Zellen in die rechte Flanke s.c. appliziert. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Tumolvolumina [mm³], Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler SEM.* ($p < 0,05$)

Es zeigte sich ein progredientes Wachstum beider Tumoren, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen dem Tumolvolumen des Wildtyps und des mit H-2K^k transfizierten Tumors zu beobachten war (Abb. 5).

In der Wiederholung des Versuch mit fünf Versuchstieren war ein ähnliches Wachstumsverhalten der beiden Tumoren zu beobachten. Beide Tumoren wuchsen progredient, wobei der transfizierte Tumor etwas zeitverzögert anwuchs. Allein an Tag 10 bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Tumoren. Sowohl der Wildtyp als auch der transfizierte Tumor waren in allen Versuchstieren angewachsen.

Aufgrund des ähnlichen Wachstumsverhaltens der beiden Tumoren konnten sie für die Transplantationsversuche benutzt werden.

3.2.2 Immunogenität von MPC-11-H-2K^k

Zur Feststellung der Immunogenität des transfizierten Tumors wurden dieser und der Wildtyp in sechs BALB/c-Mäuse (H-2K^d) appliziert. Im Verlauf wurde das Wachstum des mit H-2K^k transfizierten Tumors und des Wildtyps gemessen und verglichen.

Ergebnisse

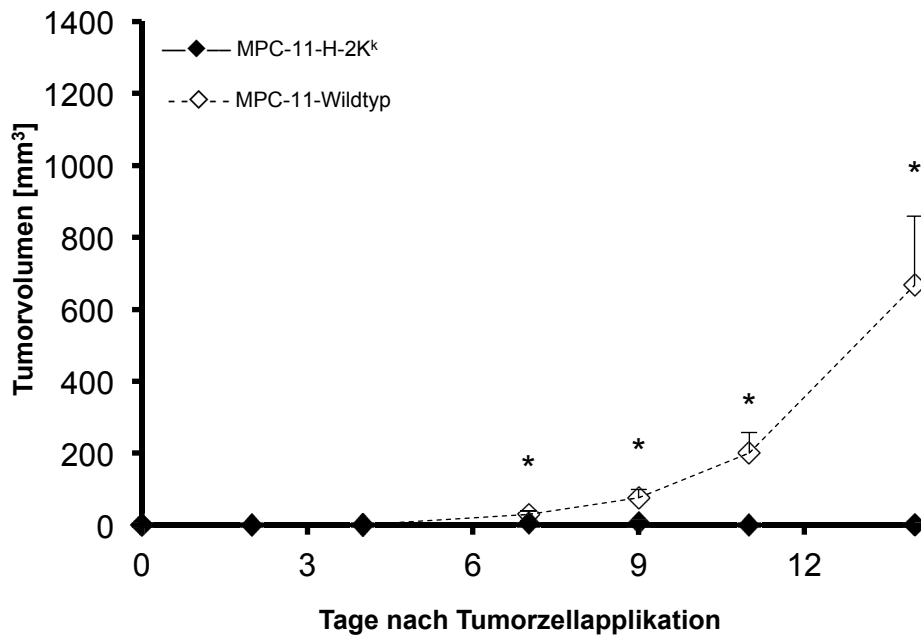


Abb. 6: Tumorwachstum [mm³] des Wildtyp-Tumors (gestrichelte Linie) und des mit H-2K^k transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) in BALB/c-Mäusen

Sechs BALB/c-Mäusen wurden 1×10^6 Zellen des Wildtyp-Tumors in die linke Flanke und 1×10^6 Zellen des transfizierten Tumors in die rechte Flanke s.c. appliziert. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Tumorzellvolumina [mm³], die Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler SEM. * ($p < 0,05$)

Der Wildtyp MPC-11 wuchs in allen sechs Versuchstieren an und zeigte ein progredientes Wachstum. Der transfizierte Tumor wuchs nur in zwei der Versuchstiere an und wurde ab Tag 9 abgestoßen.

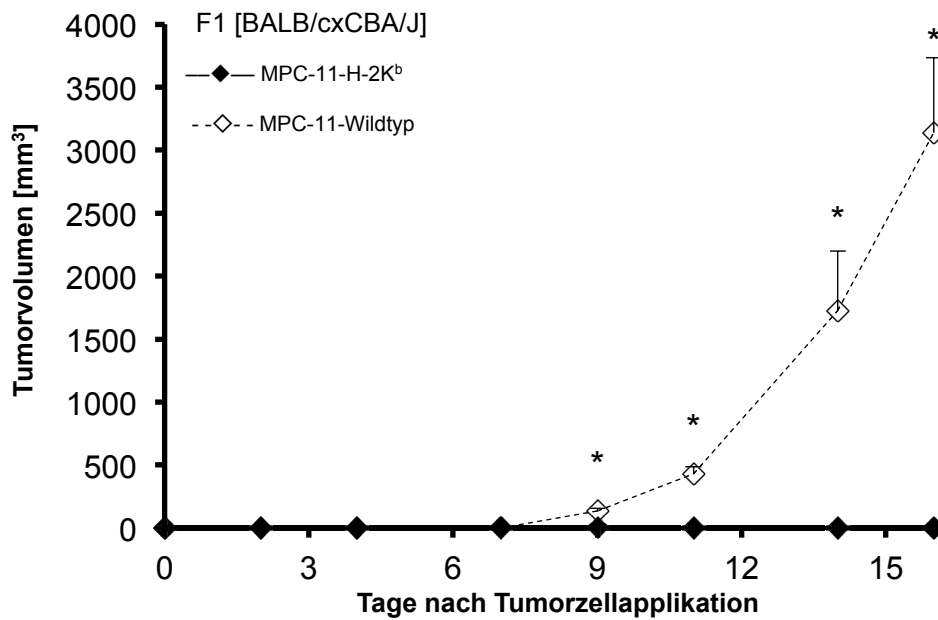
Ab Tag 7 bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem transfizierten Tumor (Abb. 6).

Dieser Immunisierungs-Versuch hat gezeigt, dass das transfizierte Alloantigen H-2K^k immunogen ist und eine Abstoßungsreaktion des Tumors aufgrund der Alloantigenerkennung auslöst.

3.2.3 Immunogenität von MPC-11-H-2K^b

Zur Überprüfung der Immunogenität des mit H-2K^b transfizierten Tumors wurde dieser und der Wildtyp Versuchstieren vom Stamm BALB/c und der F1-Generation [BALB/cxCBA/J] appliziert. Vier BALB/c-Tiere und drei F1-Tiere erhielten je 1×10^6 Tumorzellen MPC-11, und jeweils vier BALB/c- und F1-Tiere erhielten je 1×10^6 Zellen des mit H-2K^b transfizierten Tumors.

A



Ergebnisse

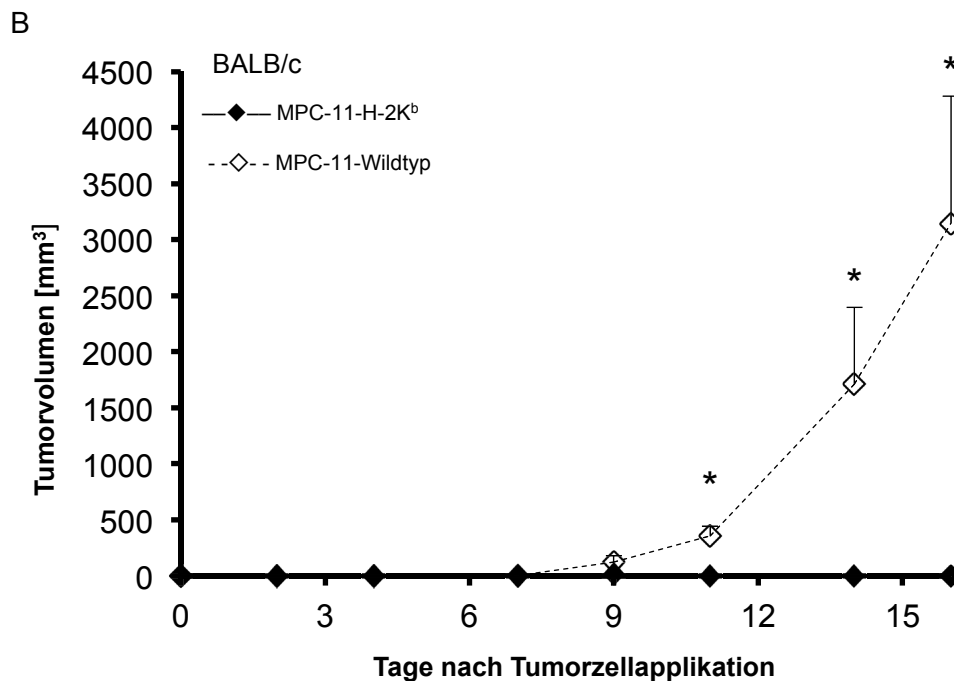


Abb. 7: Tumorwachstum [mm³] des Wildtyp-Tumors (gestrichelte Linie) und des mit H-2K^b transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) in Tieren der F1-Generation [BALB/cxCBA/J] (A), und BALB/c (B)

Drei F1[BALB/cxCBA/J]-Mäusen wurden 1×10^6 Wildtyp-Tumor-Zellen und vier F1[BALB/cxCBA/J]-Mäusen 1×10^6 transfizierte Tumor-Zellen in die rechte Flanke s.c. appliziert. Jeweils vier BALB/c-Mäusen wurden 1×10^6 Zellen des Wildtyps bzw. des transfizierten Tumors in die rechte Flanke s.c. appliziert. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Tumolvolumina [mm³], die Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler SEM. * (<0,05). Im Vorhinein konnte eine Abweichung der Kurve des transfizierten Tumors nach unten angenommen werden, daher wurde bei diesen kleinen Stichproben die Signifikanz in einem einseitigen Test ermittelt.

MPC-11 wuchs in jedem Versuchstier an und zeigte sowohl in BALB/c als auch in F1[BALB/cxCBA/J] ein progredientes Wachstum (Abb. 7). Aufgrund der Größe des Wildtyp-Tumors (>3000mm³) wurde der Versuch an Tag 16 beendet.

Der mit H-2K^b transfizierte Tumor wuchs nur in jeweils zwei von vier Versuchstieren pro Gruppe an. Ab Tag 11 kam es zu einer Abstoßungsreaktion, der Tumor war zudem im Verlauf in beiden Gruppen nicht mehr messbar (Abb. 7). In beiden Gruppen ergaben sich ab Tag 9 bzw. 11 signifikante Unterschiede der Volumina des Wildtyps und des transfizierten Tumors.

Dieser Versuch hat gezeigt, dass das Alloantigen H-2K^b immunogen ist und zu einer Abstoßungsreaktion des Tumors führt.

3.3 Tumorwachstum nach syngener Transplantation (BALB/c→BALB/c)

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen mit je sechs Tieren aufgeteilt. Nach einer Bestrahlung mit 8Gy wurden sie am darauffolgenden Tag mit BALB/c-Knochenmark transplantiert. Zwei Gruppen wurden zusätzlich mit Milzzellen transplantiert. An Tag 4 wurde allen Gruppen MPC-11 in die linke Flanke und ein mit H-2K^k oder H-2K^b transfizierter Tumor in die rechte Flanke s.c. appliziert (vgl. Tab. 10). Alle Gruppen erlitten einen initialen Gewichtsverlust von ca. 25% in den ersten 6 Tagen, bis zum Ende des Versuchs stieg das Gewicht wieder auf die Ausgangswerte. Der GvHD-Score stieg bis Tag 6 auf durchschnittlich 4 an und fiel innerhalb von einer Woche auf Werte unter 1 ab.

Gruppe	KM	MZ	Tumor WT	Tumor(K ^k)	Tumor(K ^b)
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	-	+
3	+	-	+	+	-
4	+	-	+	-	+

Tab. 10: Übersicht der syngen Transplantation und Tumorapplikation der vier Gruppen

KM = Knochenmark, MZ = Milzzellen.

Der Wildtyp-Tumor MPC-11 wuchs in allen Versuchstieren an und zeigte danach ein progredientes Wachstum.

In der Gruppe mit Milzzellen und dem mit H-2K^k transfizierten Tumor verstarb ein Versuchstier vorzeitig. Der transfizierte Tumor wuchs in drei von fünf Tieren an. Ab Tag 25 bestand ein signifikanter Unterschied im Tumolvolumen zwischen dem Wildtyp und dem transfizierten Tumor (Abb. 8A).

In der Gruppe mit Milzzellen und dem mit H-2K^b transfizierten Tumor wuchs der transfizierte Tumor in drei von sechs Versuchstieren an. Ab Tag 20 bestand ein signifikanter Unterschied zwischen dem Tumolvolumen des Wildtyps und des transfizierten Tumors (Abb. 8C).

In der Gruppe ohne Milzzellen und dem mit H-2K^k transfizierten Tumor überlebten vier von sechs Tieren bis zum Ende des Versuchs. Der transfizierte Tumor wuchs in zwei von vier Tieren an und zeigte vom Trend her ein progredientes Wachstum. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in den Tumolvolumina (Abb. 8B).

In der Gruppe ohne Milzzellen und dem mit H-2K^b transfizierten Tumor verstarb ein Versuchstier vorzeitig. Der transfizierte Tumor wuchs in vier von fünf Tieren an und

Ergebnisse

zeigte ein kontinuierliches Wachstum. Im Vergleich zum Wildtyp war das Wachstum schwächer und weniger progredient. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen den Tumoren aufgrund der geringen Zahl auswertbarer Versuchstiere und der hohen Varianz im Tumorstadium nicht (Abb. 8D).

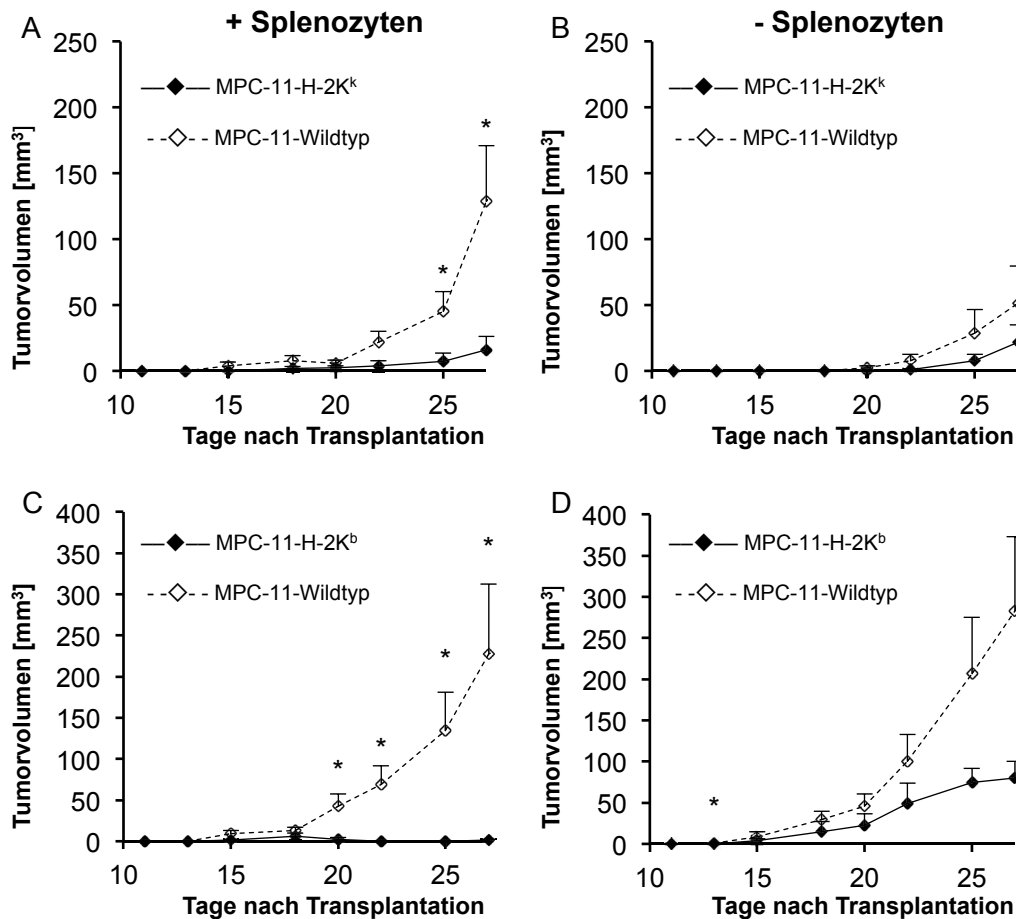


Abb. 8: Tumorstadium [mm³] des Wildtyp-Tumors (gestrichelte Linie) und des mit H-2K^k (A und B) bzw. H-2K^b (C und D) transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) in mit BALB/c transplantierten BALB/c.

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen mit je sechs Tieren unterteilt. Am Tag nach der Bestrahlung (8Gy, Tag 0) wurden alle mit $1,4 \times 10^7$ Zellen Knochenmark aus BALB/c transplantiert. Zwei Gruppen (A und C) wurden zusätzlich mit 1×10^7 Milzzellen transplantiert. An Tag 4 wurden 1×10^6 Zellen des Wildtyp-Tumors und des mit H-2K^k (A und B) bzw. H-2K^b (C und D) transfizierten Tumors in die linke bzw. die rechte Flanke s.c. appliziert. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Tumorstadien [mm³], Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler SEM. * ($p < 0,05$)

3.4 Allogene Transplantationen BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J]

Die folgenden Versuche beschäftigen sich mit der Fragestellung der Arbeit, der Untersuchung des GvT-Effekts in Abhängigkeit von der Lokalisation des Alloantigens. Dabei wurde unterschieden, ob das Alloantigen nur exklusiv auf dem Tumor (H-2K^b) oder ubiquitär (H-2K^k) vorhanden ist. Die Versuche wurden mit F1[BALB/cxCBA/J]-Tieren als Empfänger und BALB/c als Spender durchgeführt. Die verwendeten Tumoren waren der Wildtyp MPC-11 sowie die mit H-2K^k bzw. H-2K^b transfizierten MPC-11-Tumorzelllinien.

3.4.1 GvT-Reaktionen gegen das ubiquitär exprimierte Alloantigen H-2K^k

Die GvHD-Gruppe (n=12) erhielt ein Transplantat aus Knochenmark und Milzzellen, um eine starke GvHD zu induzieren. Die Kontrollgruppe (n=12) erhielt nur ein Transplantat aus Knochenmark, welches allenfalls eine geringe GvHD induziert.

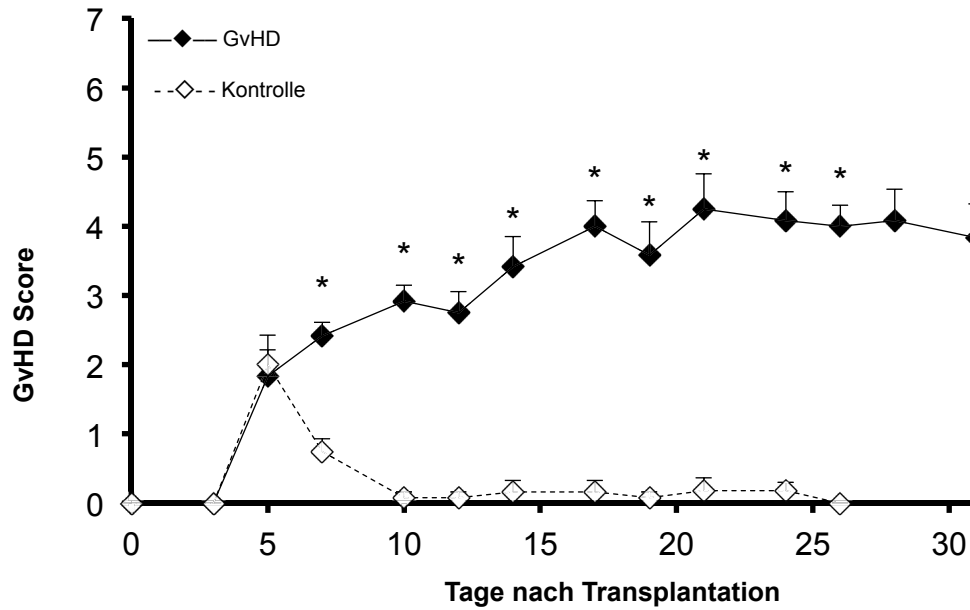
Nach der initialen Verschlechterung des Gesundheitszustands durch die Bestrahlung und den Stress der Narkose in beiden Gruppen verbesserte sich der Zustand der Kontrollgruppe wieder auf die Ausgangswerte. Die GvHD-Gruppe entwickelte eine GvHD-Reaktion, die sich vor allem durch eine Buckelbildung und einen verschlechterten Fellzustand bemerkbar machte (Abb. 9A). Ab Tag 7 bestand ein signifikanter Unterschied im GvHD-Score zwischen beiden Gruppen. Dagegen gab es bzgl. des Gewichtes nur punktuell signifikante Unterschiede. In beiden Gruppen stieg das Gewicht nach einem anfänglichen Verlust von ca. 10–20% bis zum Ende des Versuchs wieder auf das Anfangsniveau (Abb. 9B).

In der Kontrollgruppe verstarb eine Maus vorzeitig während des Versuchs.

Die Auswertung der Tumoren und der Milzen der Kontrollgruppe wurde bereits an Tag 26 durchgeführt, da einzelne Tiere durch die Größe der gewachsenen Tumoren stark beeinträchtigt wurden.

Ergebnisse

A



B

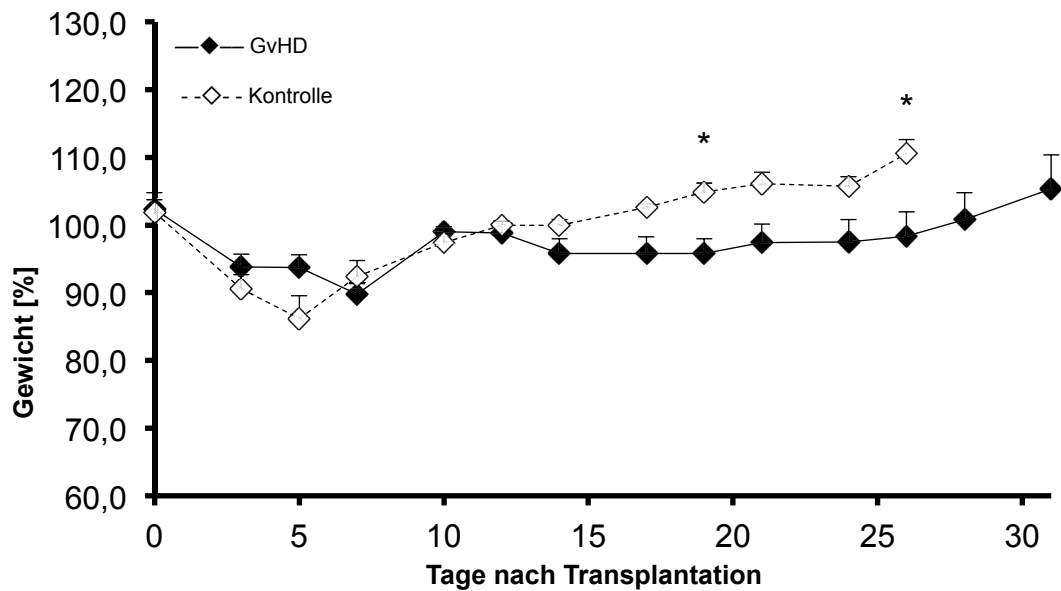


Abb. 9: GvHD im BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J]-Transplantationsmodell

F1[BALB/cx CBA/J]-Tiere wurden am Tag nach der Bestrahlung (10Gy) mit BALB/c transplantiert. Die Kontrollgruppe (\diamond ; n=12) wurde mit 2×10^7 Zellen Knochenmark transplantiert, die GvHD-Gruppe (\blacklozenge ; n=12) zusätzlich mit $0,9 \times 10^7$ Milzzellen. (A) GvHD-Score, (B) Gewicht [%] vom Anfangsgewicht. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Stichprobe, Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler SEM.

* (p<0,05)

Ergebnisse

Der Wildtyp-Tumor wies in der Kontrollgruppe und in der GvHD-Gruppe ein progredientes Wachstum auf. Dabei war das Wachstum in der Kontrollgruppe stärker progredient als in der GvHD-Gruppe (Abb. 10A). Ab Tag 12 bestanden signifikante Unterschiede im Tumolvolumen.

Auch der mit H-2K^k transfizierte Tumor zeigte in beiden Gruppen ein progredientes Wachstum. In der Kontrollgruppe hatte er die Tendenz zu einem schnelleren Wachstum, allerdings bestand nur an Tag 14 und 26 ein statistisch signifikanter Unterschied im Tumolvolumen zur GvHD-Gruppe (Abb. 10B).

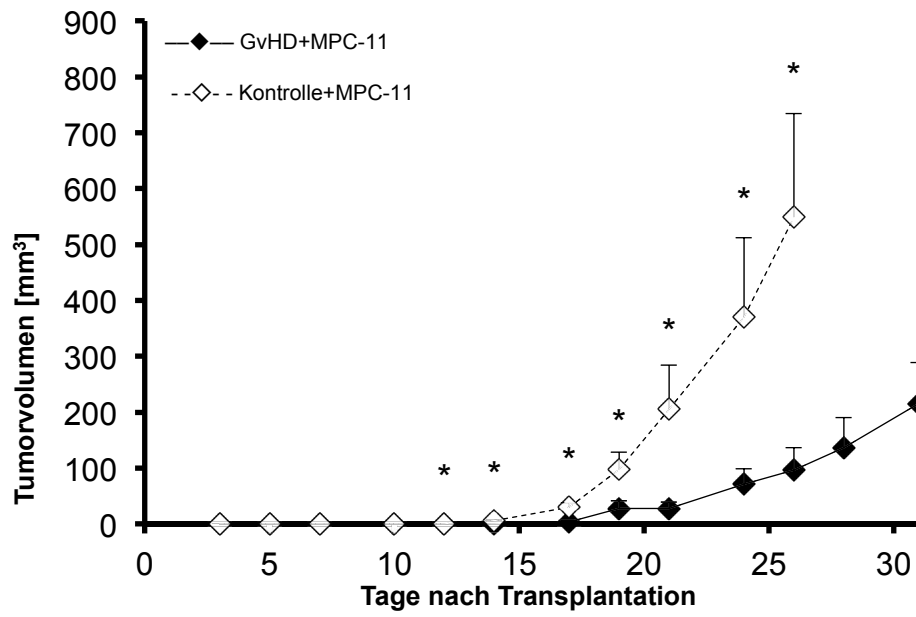
In der Kontrollgruppe hatten der Wildtyp- und der transfizierte Tumor ein ähnlich progredientes Wachstum. Nur an Tag 12 bestand ein signifikanter Unterschied im Tumolvolumen (Abb. 10C).

Auch in der GvHD-Gruppe wiesen beide Tumoren ein ähnlich progredientes Wachstum auf. Allerdings wuchs der Wildtyp-Tumor deutlich früher an als der transfizierte Tumor. Dadurch ergaben sich signifikante Unterschiede des Tumolvolumens zwischen Tag 24 und 31 (Abb. 10D).

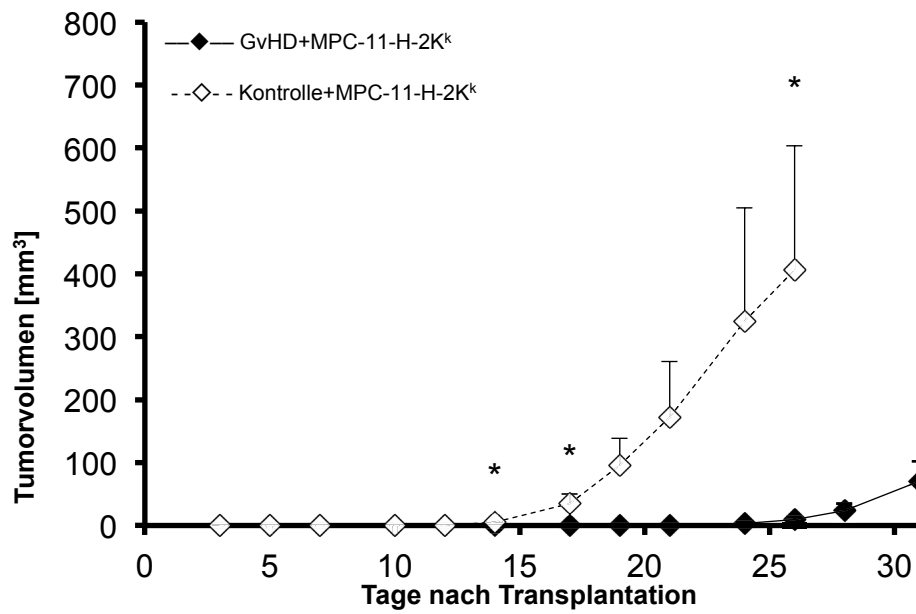
In der Kontrollgruppe wuchs der Wildtyp-Tumor in zehn von elf Tieren an, der transfizierte Tumor in acht von elf. In der GvHD-Gruppe wuchs der Wildtyp-Tumor in allen Versuchstieren an, der transfizierte Tumor in zehn von zwölf Tieren.

Ergebnisse

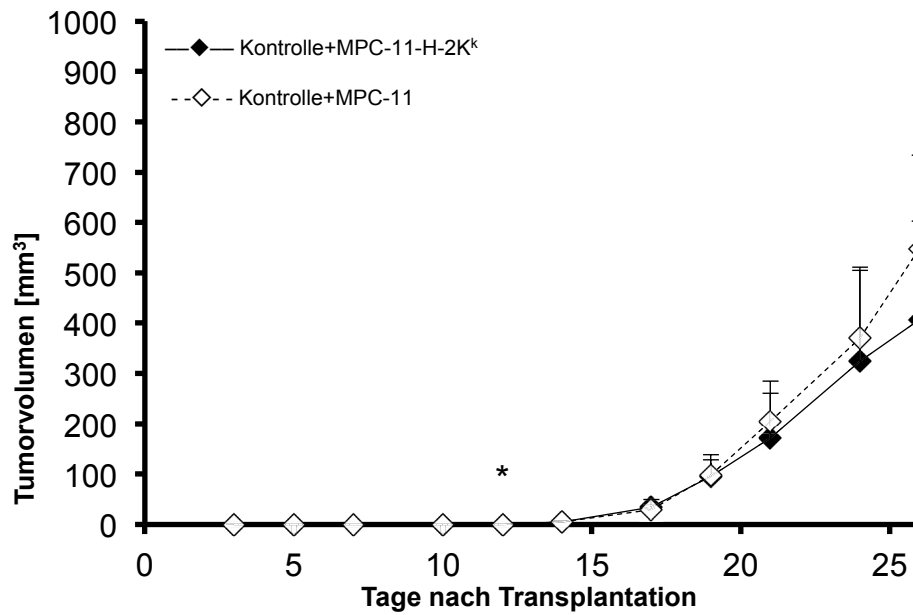
A



B



C



D

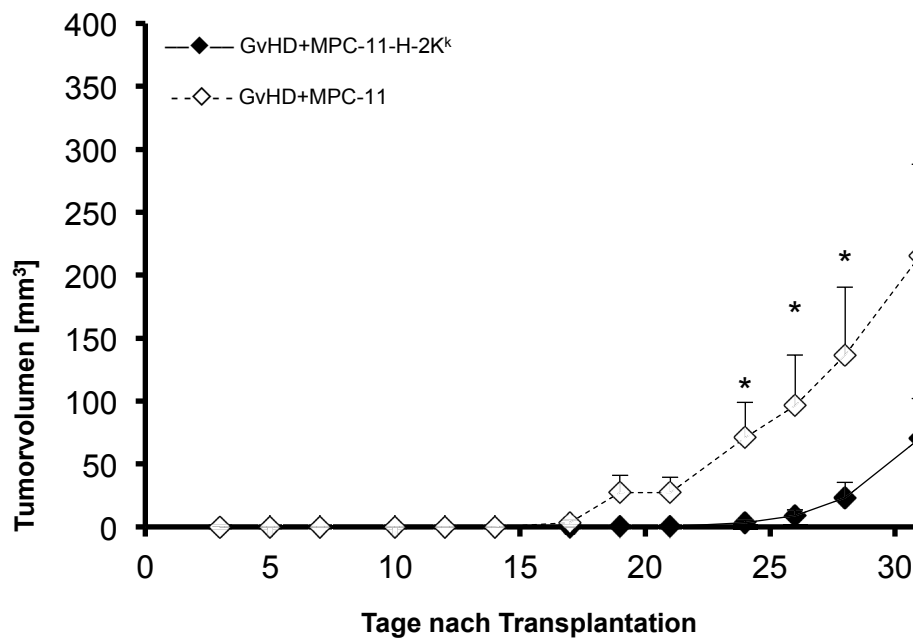


Abb. 10: Tumorwachstum [mm³] des Wildtyp-Tumors (gestrichelte Linie) und des mit H-2K^k transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) in der GvHD- und Kontrollgruppe im BALB/c→F1[BALB/cx CBA/J]-Transplantationsmodell

Die Kontrollgruppe (◇; n=12) wurde am Tag nach der Bestrahlung (10Gy) mit Knochenmark transplantiert, die GvHD-Gruppe (◆; n=12) zusätzlich mit Milzzellen. An Tag 3 nach Transplantation wurden beiden Gruppen 1x10⁶-Zellen Wildtyp-Tumor und transfizierter Tumor in die linke bzw. rechte Flanke s.c. appliziert. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Tumolvolumina [mm³], Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler SEM. * (p<0,05)

Ergebnisse

Bei der Wiederholung des Versuchs unter ähnlichen Bedingungen (Tumorgabe an Tag 2 anstatt Tag 3, $1,5 \times 10^7$ anstatt 2×10^7 Knochenmarkzellen und $0,8 \times 10^7$ anstatt $0,9 \times 10^7$ Milzzellen) erholte sich die Kontrollgruppe ebenfalls nach der initialen Verschlechterung des Gesundheitszustandes vollständig, während die GvHD-Gruppe eine GvHD-Reaktion entwickelte. Dabei lag der durchschnittliche GvHD-Score der GvHD-Gruppe zwischen 3 und 5, ab Tag 6 waren die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen signifikant. Nach der anfänglichen Gewichtsabnahme von bis zu 20% in beiden Gruppen stieg das Gewicht bis zum Ende des Versuchs in der GvHD-Gruppe auf 105% des Anfangsgewichtes, in der Kontrollgruppe auf 121%. Im Gegensatz zum ersten Versuch bestanden auch signifikante Unterschiede im Gewicht ab Tag 15.

Bis auf eine Maus in der GvHD-Gruppe überlebten alle Tiere bis zum Ende des Versuchs. Der Wildtyp MPC-11 wuchs in elf von zwölf Tieren der Kontrollgruppe sowie in neun von elf der GvHD-Gruppe an. Der mit H-2K^k transfizierte Tumor wuchs in der Kontrollgruppe in neun von zwölf und in der GvHD-Gruppe in neun von elf Tieren an.

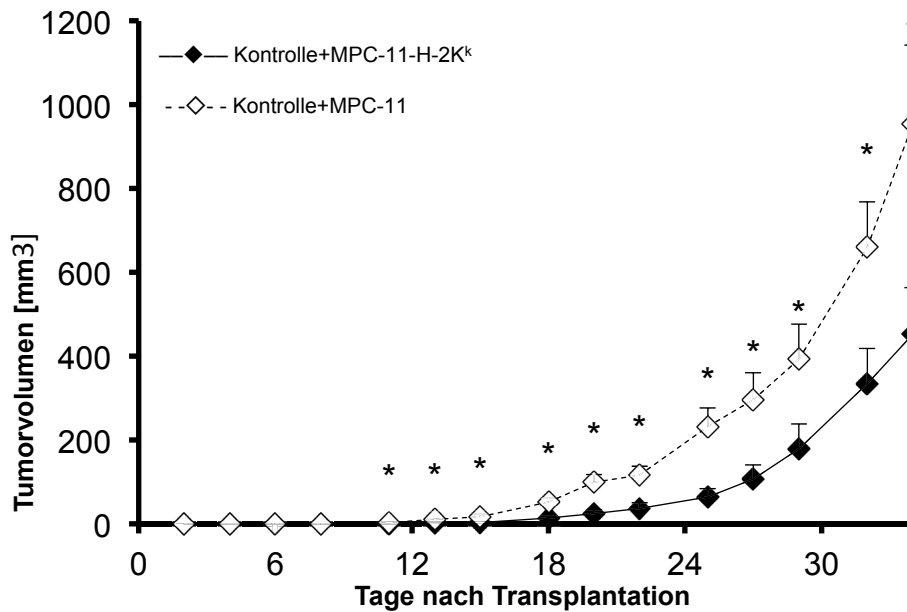
Analog zum ersten Versuch wuchsen der Wildtyp-Tumor und der transfizierte Tumor in der Kontrollgruppe deutlich progredienter als in der GvHD-Gruppe. Für den Wildtyp bestanden signifikante Unterschiede im Tumolvolumen ab Tag 11, für den transfizierten Tumor ab Tag 18.

In der Kontrollgruppe wuchsen der Wildtyp und der transfizierte Tumor ähnlich progredient. Dabei war zu beobachten, dass der Wildtyp früher anwuchs als der transfizierte Tumor. Dadurch ergaben sich signifikante Unterschiede im Tumolvolumen ab Tag 11 (Abb. 11A).

In der GvHD-Gruppe hatte der Wildtyp ein progredientes Wachstum und wuchs früher an als der transfizierte Tumor. Der transfizierte Tumor wuchs vom Trend her ebenfalls progredient. Bei Beendigung des Versuchs hatte er allerdings nur eine geringe Größe von durchschnittlich 41 mm^3 erreicht. Signifikante Unterschiede im Tumolvolumen zwischen den beiden Tumoren bestanden ab Tag 18 (Abb. 11B).

Ergebnisse

A



B

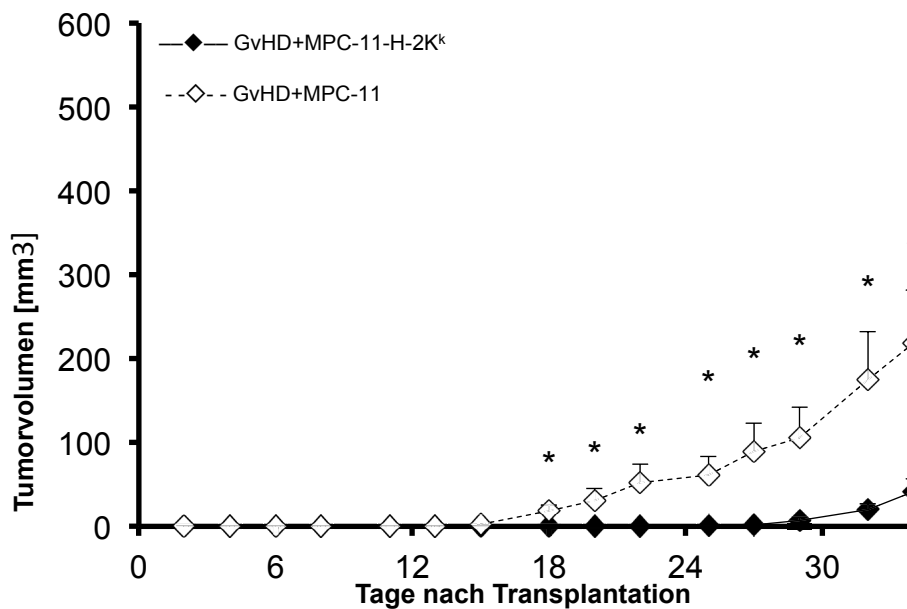


Abb. 11: Tumolvolumen [mm³] des Wildtyp-Tumors (gestrichelte Linie) und des mit H-2K^k transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) in der Kontroll- und GvHD-Gruppe im BALB/c→F1[BALB/cx CBA/J]-Transplantationsmodell

Die Kontrollgruppe (◇; n=12) wurde am Tag nach der Bestrahlung (10Gy) mit $1,5 \times 10^7$ Zellen Knochenmark transplantiert, die GvHD-Gruppe (◆; n=12) zusätzlich mit $0,8 \times 10^7$ Milzzellen. An Tag 2 nach Transplantation wurden beiden Gruppen jeweils 1×10^6 Zellen Wildtyp-Tumor und transfizierter Tumor in die linke bzw. rechte Flanke s.c. appliziert. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Tumolvolumina [mm³], Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler SEM. * (p<0,05)

Ergebnisse

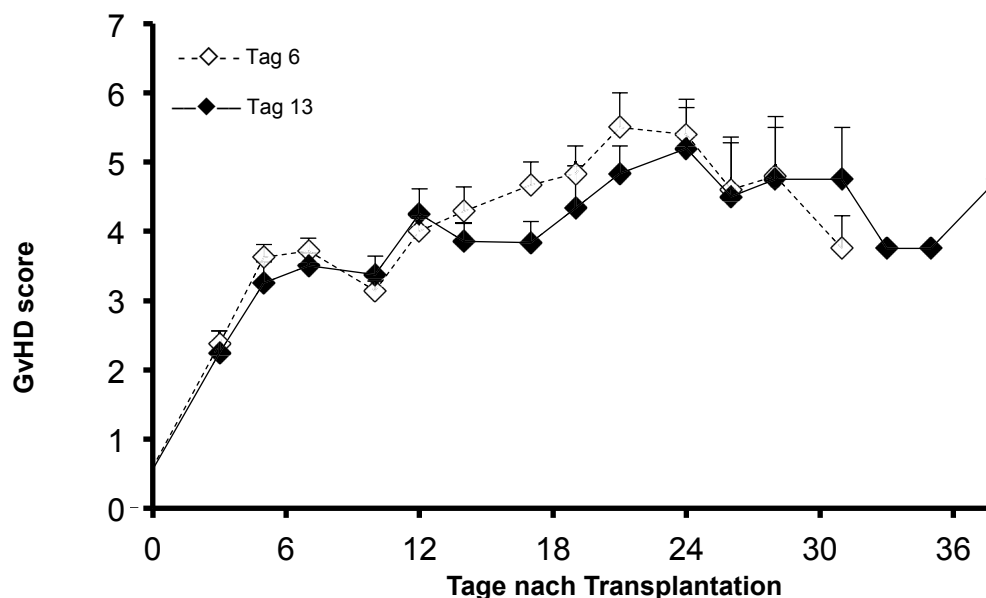
In beiden Versuchen mit der Tumorgabe an Tag 3 bzw. 2 wuchs der transfizierte Tumor in der GvHD-Gruppe und im Wiederholungsversuch auch in der Kontrollgruppe verzögert an. Dabei hatte er vom Trend her ein ähnlich progredientes Wachstumsverhalten wie der Wildtyp.

Um die frühe Tumorgabe als Ursache für das verzögerte Anwachsen zu untersuchen, wurden Versuche mit späteren Tumorgaben durchgeführt.

Zwei Gruppen mit je acht F1[BALB/cxCBA/J]-Tieren wurden mit Knochenmark und Milzzellen transplantiert. Der einen Gruppe wurde der Wildtyp und der mit H-2K^k transfizierte Tumor an Tag 6 appliziert, der anderen Gruppe an Tag 13.

Die Gruppe „Tag 6“ wurde an Tag 31 beendet, die Gruppe „Tag 13“ an Tag 38, sodass die Tumoren die gleiche Zeit *in vivo* waren. In beiden Gruppen verstarben jeweils vier von acht Versuchstieren bis zum Ende des Versuchs. Beide Gruppen entwickelten eine vergleichbare GvHD mit einem GvHD-Score zwischen 3 und 5,5 und verloren zunächst bis zu 25% ihres Anfangsgewichtes. Bis zum Ende des Versuchs erreichte das Gewicht wieder bis zu 90% des Anfangswertes (Abb. 12A/B).

A



Ergebnisse

B

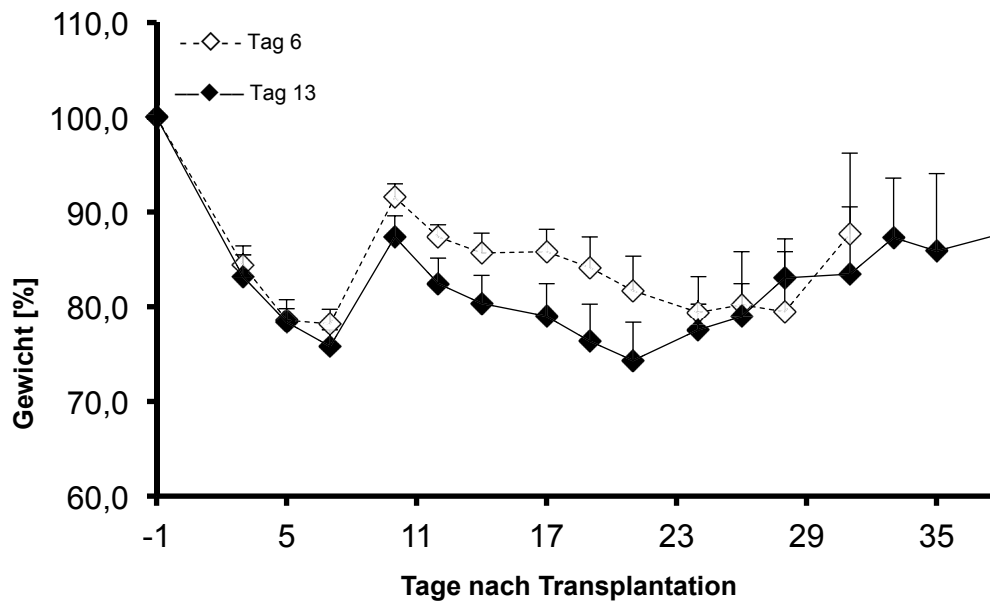


Abb. 12: GvHD im BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J]-Transplantationsmodell bei später Tumorgabe

F1[BALB/cxCBA/J]-Tiere wurden am Tag nach der Bestrahlung (10Gy) mit BALB/c transplantiert. Beide Gruppen „Tag 6“ (◇; n=8, Tumorgabe an Tag 6) und „Tag 13“ (◆; n=8, Tumorgabe an Tag 13) wurden mit $1,8 \times 10^7$ Zellen Knochenmark und $1,0 \times 10^7$ Milzzellen transplantiert. (A) GvHD-Score, (B) Gewicht [%] vom Anfangsgewicht. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Stichprobe, Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler SEM. * ($p < 0,05$)

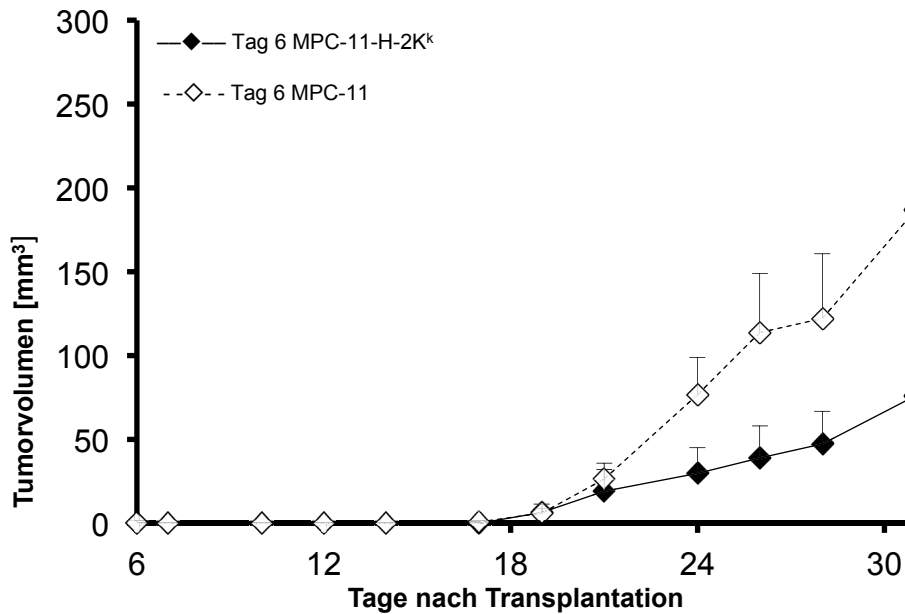
In der Gruppe „Tag 6“ wuchsen beide Tumoren in allen vier überlebenden Versuchstieren an.

Der Wildtyp-Tumor wies ein progredientes Wachstum auf. Der transfizierte Tumor wuchs vom Trend her progredient, aber langsamer als der Wildtyp. Signifikante Unterschiede im Tumolvolumen zwischen dem Wildtyp und dem transfizierten Tumor gab es nicht (Abb. 13A).

In der Gruppe „Tag 13“ wuchsen beide Tumoren in drei von den vier überlebenden Versuchstieren an. Sowohl der Wildtyp als auch der transfizierte Tumor wuchsen ähnlich progredient. Signifikante Unterschiede im Tumolvolumen bestanden nicht (Abb. 13B).

Ergebnisse

A



B

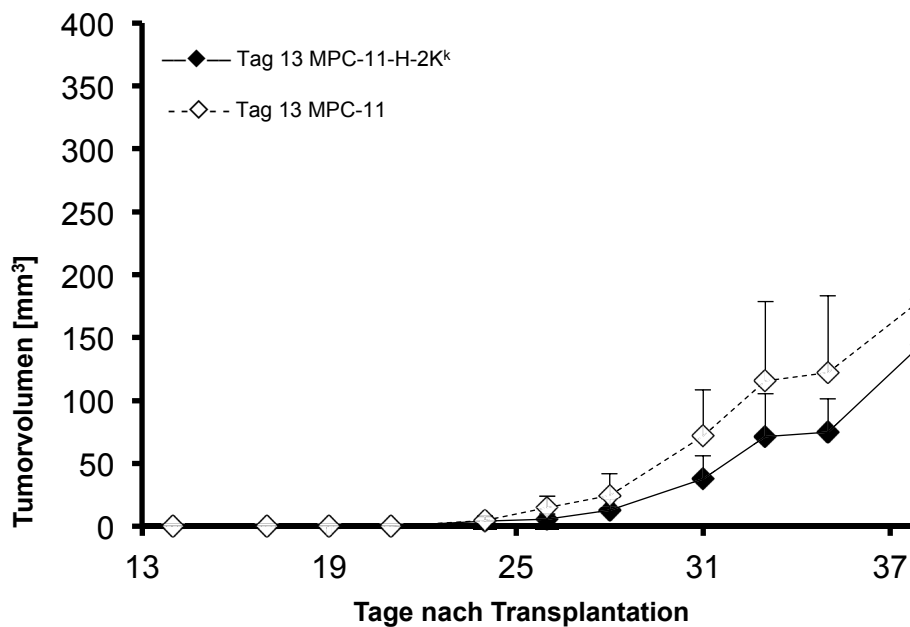


Abb. 13: Tumorzvolumen [mm³] des Wildtyp-Tumors (gestrichelte Linie) und des mit H-2K^k transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) im BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J]-Transplantationsmodell bei Tumorzvolumenmessung an Tag 6 bzw. 13

F1[BALB/cxCBA/J]-Tiere wurden am Tag nach der Bestrahlung (10Gy) mit BALB/c transplantiert. Beide Gruppen „Tag 6“ (n=8) und „Tag 13“ (n=8) wurden mit $1,8 \times 10^7$ Zellen Knochenmark und $1,0 \times 10^7$ Milzzellen transplantiert. An Tag 6 bzw. Tag 13 wurden den Gruppen jeweils 1×10^6 Zellen Wildtyp und transfizierter Tumor in die linke bzw. rechte Flanke s.c. appliziert. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Tumorzvolumina [mm³], Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler (SEM). * (p<0,05)

Ergebnisse

Da in diesem Versuch in beiden Gruppen die Hälfte der Versuchstiere verstorben war, wurde ein weiterer Versuch mit später Tumorapplikation durchgeführt.

Die Tiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt und mit Knochenmark und Milzzellen transplantiert. Die Tumorapplikation erfolgte an den Tagen 3, 7 und 14.

In den Gruppen „Tag 3“ und „Tag 14“ verstarb ein Versuchstier vor Beendigung des Versuches, in Gruppe „Tag 7“ überlebten alle Versuchstiere.

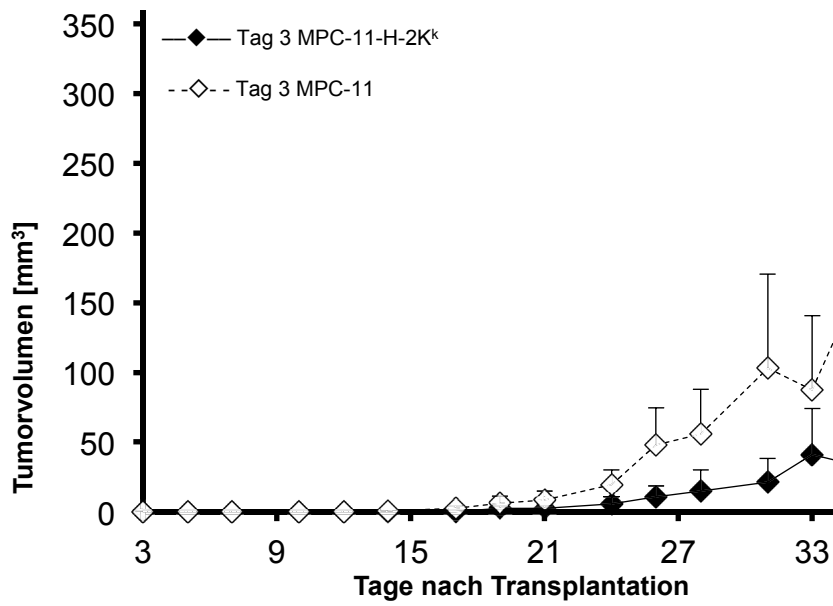
Alle drei Gruppen entwickelten eine GvHD-Reaktion mit Werten im GvHD-Score zwischen 3 und 6. Nach dem anfänglichen Gewichtsverlust von bis zu 30% stieg das Gewicht bis zum Ende wieder auf bis zu 90% des Ausgangswertes.

In den Gruppen „Tag 3“ und „Tag 7“ wuchs der Wildtyp progredient. Der transfizierte Tumor wuchs in beiden Gruppen später an und hatte ein schwächeres Wachstum. Signifikante Unterschiede im Tumolvolumen zwischen Wildtyp und transfiziertem Tumor bestanden nicht (Abb. 14A/B). Der Wildtyp wuchs in der Gruppe „Tag 3“ in drei von fünf und in der Gruppe „Tag 7“ in sechs von sieben Tieren an. Der transfizierte Tumor wuchs in der Gruppe „Tag 3“ in drei von fünf und in der Gruppe „Tag 7“ in fünf von sieben Tieren an.

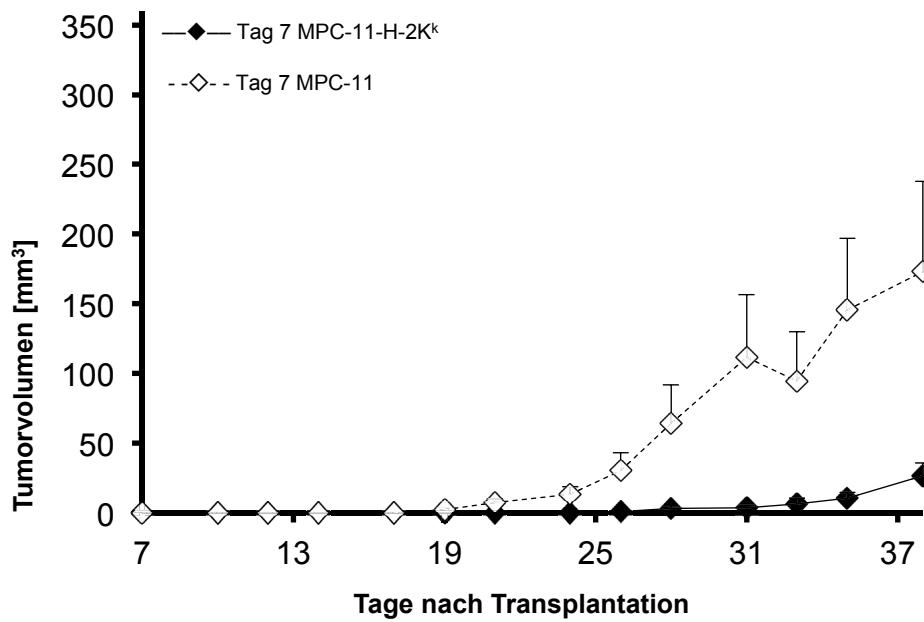
In der Gruppe „Tag 14“ wuchsen beide Tumoren zeitgleich an und hatten ein ähnlich progredientes Wachstum. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede im Tumolvolumen (Abb. 14C). Der Wildtyp wuchs in sechs von sieben Tieren an, der transfizierte Tumor in fünf von sieben.

Ergebnisse

A



B



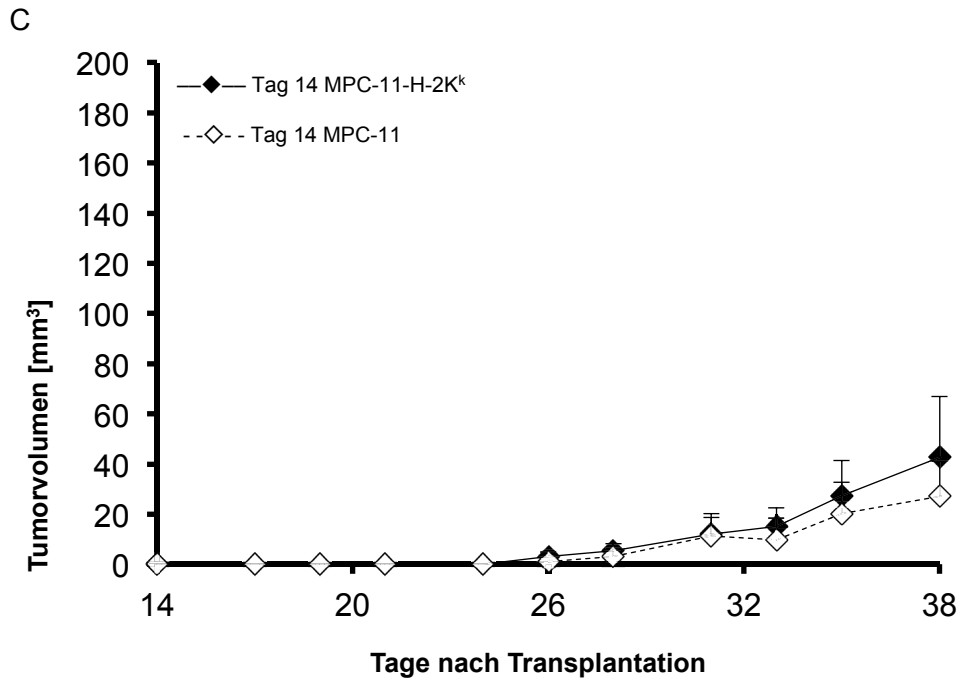


Abb. 14: Tumorwachstum [mm³] des Wildtyp-Tumors (gestrichelte Linie) und des mit H-2K^k transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) im BALB/c→F1[BALB/cx3B6/J]-Transplantationsmodell bei später Tumorapplikation

F1[BALB/cx3B6/J]-Tiere wurden am Tag nach der Bestrahlung (10Gy) mit BALB/c transplantiert. Alle drei Gruppen „Tag 3“ (n=6), „Tag 7“ (n=7) und „Tag 14“ (n=8) wurden mit $1,8 \times 10^7$ Zellen Knochenmark und $1,0 \times 10^7$ Milzzellen transplantiert. An Tag 3, Tag 7 bzw. Tag 14 wurden den Gruppen jeweils 1×10^6 Zellen Wildtyp und transfizierter Tumor in die linke bzw. rechte Flanke s.c. appliziert. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Tumolvolumina [mm³], Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler (SEM).

* (p<0,05)

Bei ubiquitärer Expression eines MHC-Alloantigens und später Applikation des Tumors bestand somit kein zusätzlicher GvT-Effekt nach allogener Knochenmarktransplantation.

3.4.2 Stabilität des mit H-2K^k transfizierten Tumors im BALB/c→F1[BALB/cx3B6/J]-Transplantationsmodell

Es wurde bereits überprüft, dass der mit H-2K^k transfizierte Tumor in nativen F1[BALB/cx3B6/J]-Tieren stabil H-2K^k exprimiert. Nach Beendigung eines jeden Transplantationsversuches wurden die in den Versuchstieren gewachsenen Tumoren erneut auf ihre H-2K^k-Expriemierung überprüft. Die Messung erfolgte mit Fluoreszenzantikörpern gegen H-2K^k im Durchflusszytometer.

Ergebnisse

Die *ex vivo* Wildtyp-Tumoren waren negativ für H-2K^k, während bei allen *ex vivo* transfizierten Tumoren ein deutlich positives Signal für H-2K^k zu messen war (Abb. 15). Die transfizierten Tumoren waren somit auch in transplantierten Versuchstieren stabil.

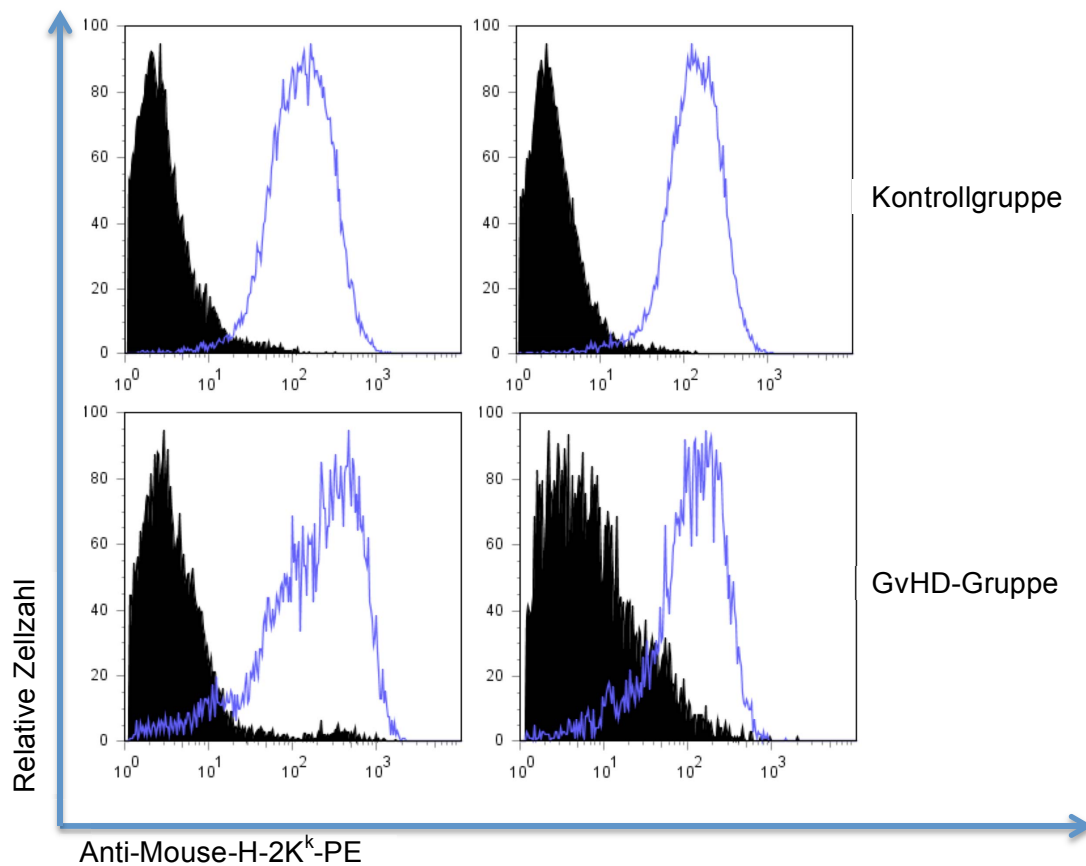


Abb. 15: Stabilitätstest des mit H-2K^k transfizierten Tumors im BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J] (H-2K^{dxk})-Transplantationsmodell

Dargestellt sind der transfizierte Tumor (blaue Linie) und der Wildtyp (schwarz unterlegt) aus zwei Mäusen der Kontrollgruppe (obere Reihe) und aus zwei Mäusen der GvHD-Gruppe (untere Reihe). Die Tumoren wurden nach Beendigung der Versuche mit dem fluoreszierenden Antikörper Anti-Mouse-H-2K[k]-PE gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert. Für alle übrigen Mäuse ergaben sich analoge Ergebnisse.

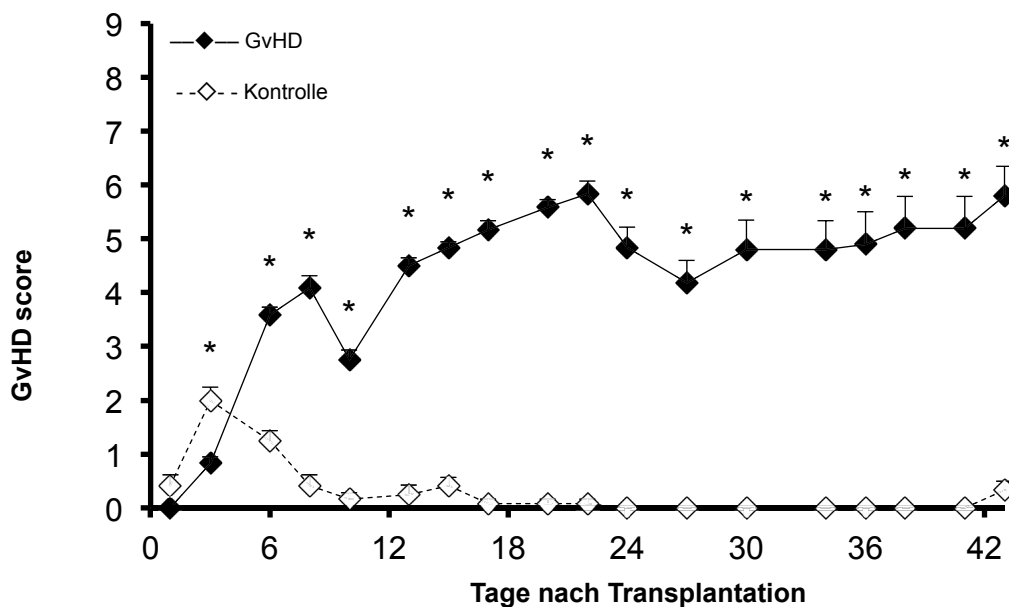
3.4.3 GvT-Reaktionen gegen das exklusiv auf dem Tumor exprimierte Alloantigen H-2K^b

Die GvHD-Gruppe (n=12) wurde mit Knochenmark und Milzzellen, die Kontrollgruppe (n=12) nur mit Knochenmark transplantiert.

Nach einer anfänglichen Verschlechterung des Gesundheitszustandes und einer Abnahme des Gewichtes um bis zu 25% erholte sich die Kontrollgruppe vollständig auf die Ausgangswerte. Die GvHD-Gruppe entwickelte eine relevante GvHD von durchschnittlich 4–6 im GvHD-Score. Bis zum Ende des Versuches verloren sie bis zu 30% ihres Anfangsgewichtes. Es bestanden sowohl im GvHD-Score als auch im Gewicht signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abb. 16A/B).

In der GvHD-Gruppe überlebten zehn von zwölf, in der Kontrollgruppe neun von zwölf Tieren bis zum Ende des Versuches.

A



Ergebnisse

B

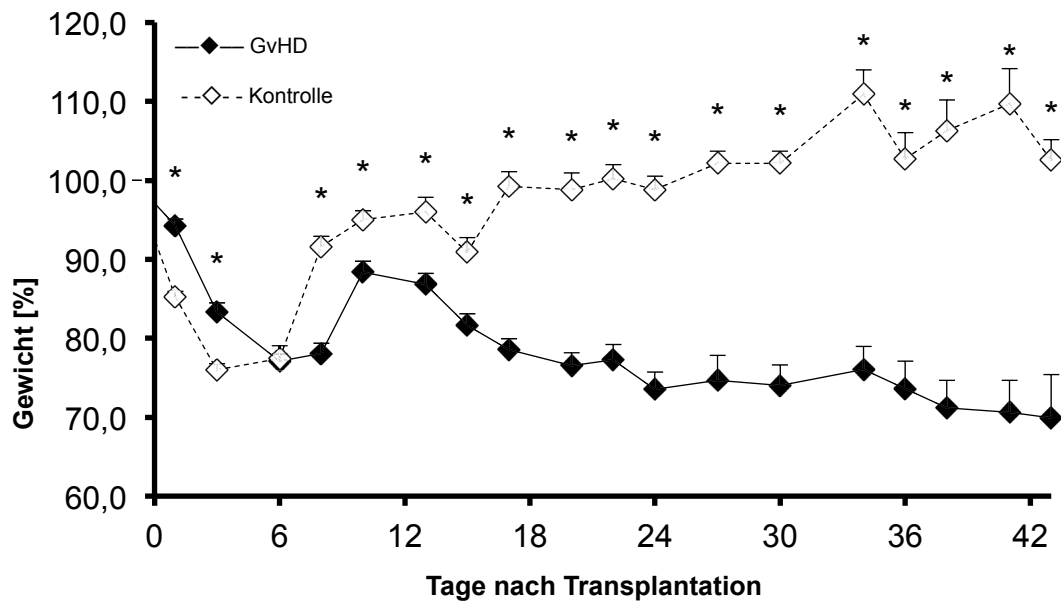


Abb. 16: GvHD im BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J]-Transplantationsmodell

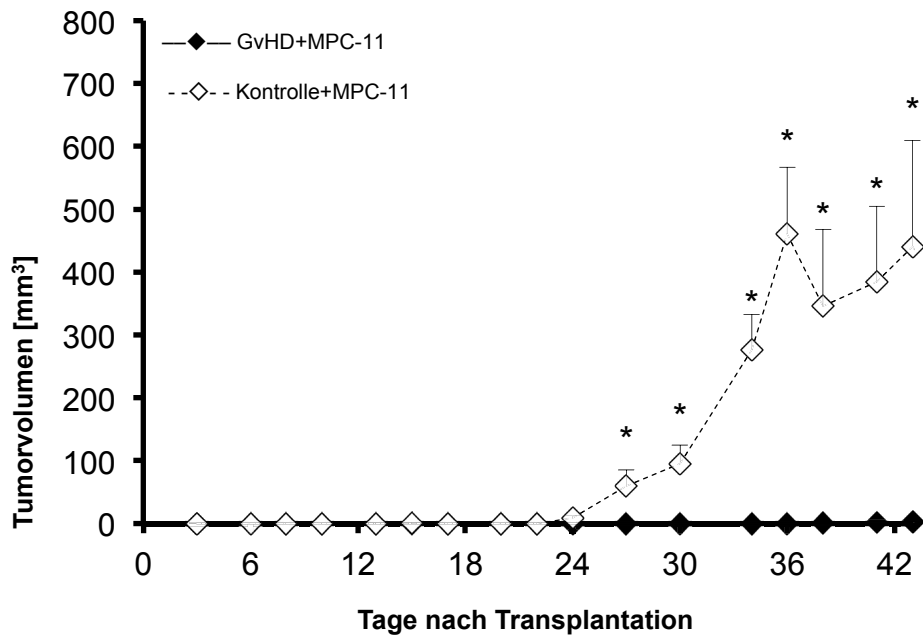
F1[BALB/cxCBA/J]-Tiere wurden am Tag nach der Bestrahlung (10Gy) mit BALB/c transplantiert. Die Kontrollgruppe (\diamond ; n=12) wurde mit $1,8 \times 10^7$ Zellen Knochenmark transplantiert, die GvHD-Gruppe (\blacklozenge ; n=12) zusätzlich mit $1,0 \times 10^7$ Milzzellen. (A) GvHD-Score, (B) Gewicht [%] vom Anfangsgewicht. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Stichprobe, Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler (SEM). * ($p < 0,05$)

In der Kontrollgruppe wuchs der Wildtyp progredient. Der mit H-2K^b transfizierte Tumor wuchs anfangs vom Trend her ebenfalls progredient, ab Tag 36 verringerte sich das Tumolvolumen kontinuierlich im Sinne einer Abstoßungsreaktion (Abb. 17C). Ab Tag 36 bestanden signifikante Unterschiede im Volumen der beiden Tumoren. Der Wildtyp wuchs in allen neun Tieren und der transfizierte Tumor in sieben von neun Tieren an.

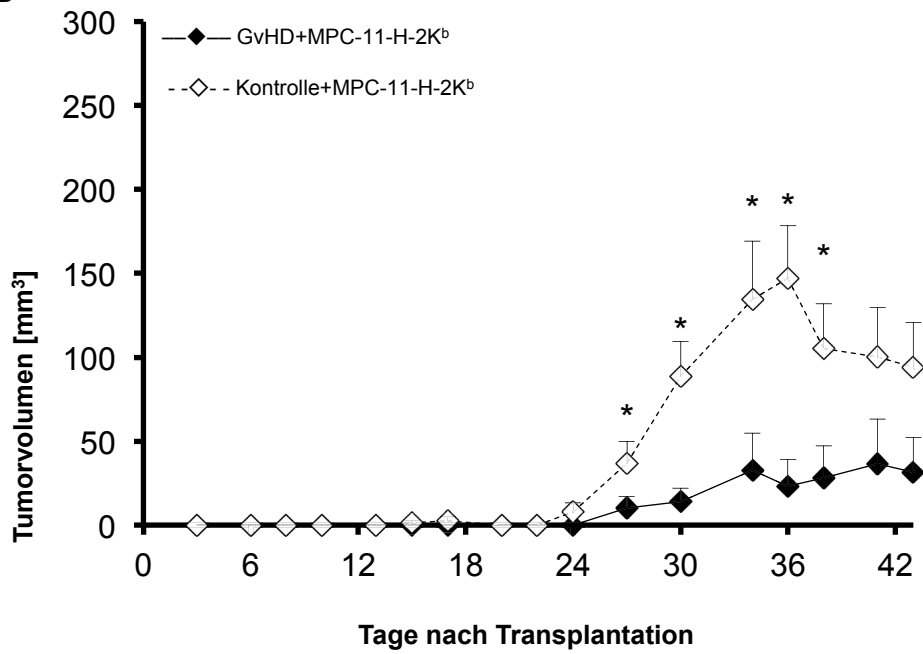
In der GvHD-Gruppe zeigten weder der Wildtyp noch der transfizierte Tumor ein eindeutiges Wachstumsverhalten. Es bestanden zwischen ihnen keine signifikanten Unterschiede im Tumolvolumen (Abb. 17D). Zudem wuchsen die beiden Tumoren nur in jeweils drei von zehn Tieren an, dies vermindert die Aussagekraft der Ergebnisse in dieser Gruppe.

Ergebnisse

A



B



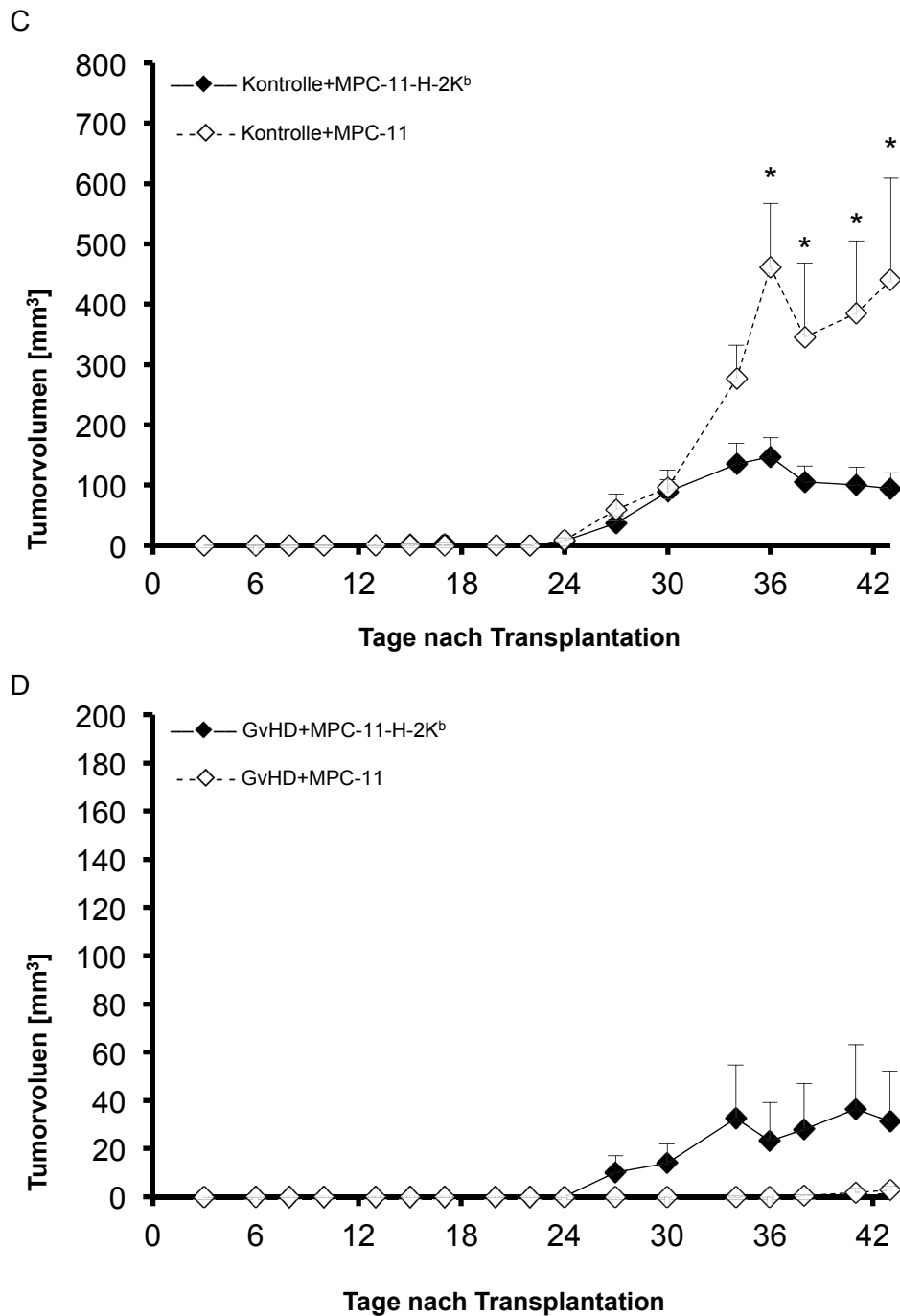


Abb. 17: Tumorwachstum [mm³] des Wildtyp-Tumors (gestrichelte Linie) und des mit H-2K^b transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) in der GvHD- und Kontrollgruppe im BALB/c→F1[BALB/cx CBA/J]-Transplantationsmodell

Die Kontrollgruppe (◇; n=12) wurde am Tag nach der Bestrahlung (10Gy) mit Knochenmark transplantiert, die GvHD-Gruppe (◆; n=12) zusätzlich mit Milzzellen. An Tag 3 nach Transplantation wurden beiden Gruppen jeweils 1x10⁶ Zellen Wildtyp-Tumor und transfizierter Tumor in die linke bzw. rechte Flanke s.c. appliziert. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Tumorumfänge [mm³], Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler (SEM). * (p<0,05)

Ergebnisse

Die transfizierten *in vivo* Tumoren, soweit vorhanden, wurden nach Beendigung des Versuchs bezüglich ihrer Expression von H-2K^b per Durchflusszytometrie untersucht. Dabei zeigte sich, dass in der GvHD-Gruppe zwei von drei getesteten Tumoren stabil blieben und einer nur teilweise positiv für das Alloantigen war. In der Kontrollgruppe waren drei von sechs stabil, zwei teilweise positiv und einer negativ für H-2K^b (Abb. 18).

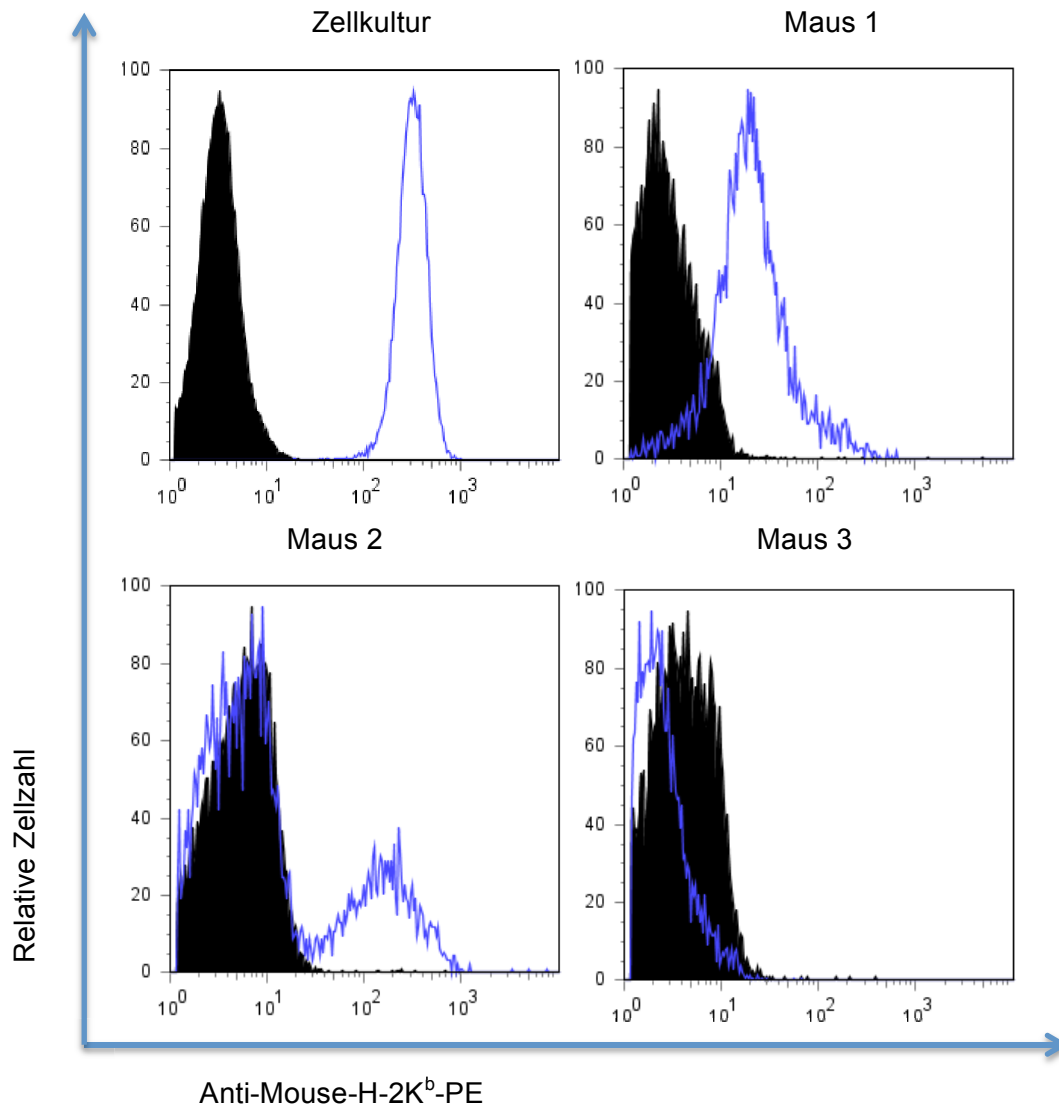


Abb. 18: Stabilitätstest des mit H-2K^b transfizierten Tumors im BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J] (H-2K^{dxk})-Transplantationsmodell

Dargestellt sind der transfizierte Tumor (blaue Linie) und der Wildtyp (schwarz unterlegt) aus der Zellkultur und drei Versuchstieren. Die Tumoren wurden nach Beendigung des Versuchs mit dem fluoreszierenden Antikörper Anti-Mouse-H-2K[b]-PE gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert. Maus 1 ist ein Beispiel für einen stabil gebliebenen, Maus 2 für einen teilweise stabil gebliebenen, und Maus 3 für einen nicht stabil gebliebenen transfizierten Tumor.

Ergebnisse

Da in der Kontrollgruppe nach vollständigem Engraftment des allogenen Knochenmarks, etwa ab Tag 30, der transfizierte Tumor abgestoßen wurde, kann von einem zusätzlichen GvT-Effekt ausgegangen werden. In der Durchflusszytometrie waren jedoch nicht alle Tumoren stabil für das Alloantigen H-2K^b, deswegen wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Dabei wurde nur der transfizierte Tumor appliziert, um eine Vermischung *in vivo* mit dem Wildtyp auszuschließen.

In diesem zweiten Versuch verlor die Kontrollgruppe in den ersten Tagen bis zu 20% ihres Anfangsgewichtes, die GvHD-Gruppe bis zu 30%. Bis zum Ende des Versuches stieg das Gewicht der Kontrollgruppe wieder auf 100% an, das der GvHD-Gruppe auf 90% des Anfangsgewichtes. Es bestanden signifikante Unterschiede im Gewicht ab Tag 6 mit zwei Ausnahmen an Tag 10 und 41. In der GvHD-Gruppe entwickelte sich eine GvHD-Reaktion mit einem durchschnittlichen GvHD-Score zwischen 3 und 5, ab Tag 3 bestanden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. In der GvHD-Gruppe überlebten sechs von zwölf Tiere bis zum Ende des Versuchs, in der Kontrollgruppe alle zwölf.

In der Kontrollgruppe wuchs der mit H-2K^b transfizierte Tumor anfangs progredient, ab Tag 24 stagnierte das Wachstum und es kam zu keiner weiteren Volumenzunahme. In der GvHD-Gruppe wuchs der transfizierte Tumor später an als in der Kontrollgruppe und zeigte im Verlauf ein progredientes Wachstum (Abb. 19).

In der GvHD-Gruppe wuchs der Tumor in fünf von sechs Tieren an, in der Kontrollgruppe in allen Tieren. Allerdings wuchs der Tumor in drei von zwölf Tieren der Kontrollgruppe intramuskulär und nicht subkutan. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und der somit fehlenden Vergleichbarkeit wurden diese Tiere nicht zur Berechnung der Tumorkurven berücksichtigt.

Ergebnisse

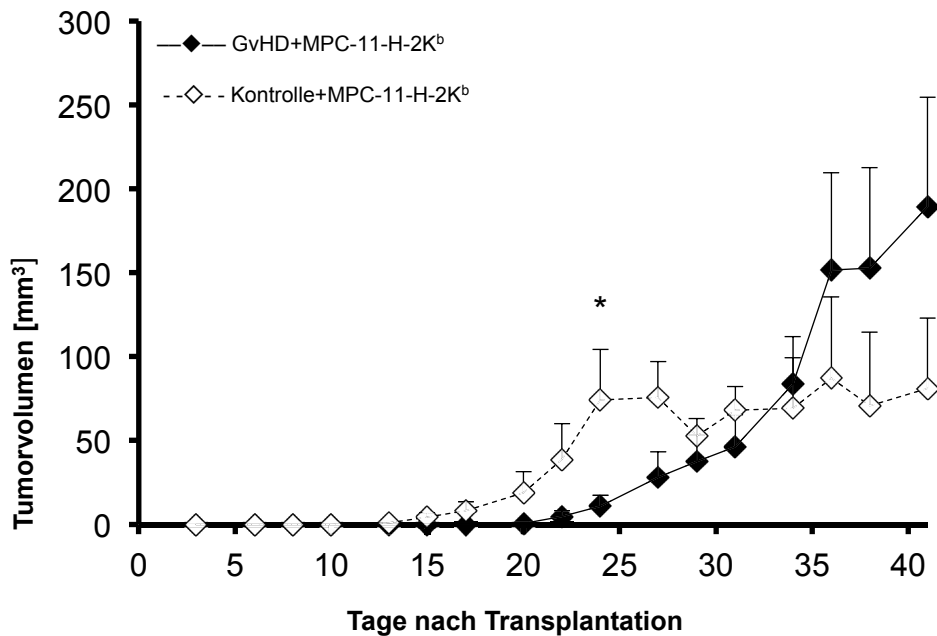


Abb. 19: Tumorwachstum [mm³] des MPC-11 Wildtyp-Tumors (gestrichelte Linie) und des mit H-2K^b transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) in der GvHD- und Kontrollgruppe im BALB/c → F1[BALB/cx CBA/J]-Transplantationsmodell

Die Kontrollgruppe (◇; n=12) wurde am Tag nach der Bestrahlung (10Gy) mit $1,8 \times 10^7$ -Zellen Knochenmark transplantiert, die GvHD-Gruppe (◆; n=12) zusätzlich mit $1,0 \times 10^7$ Milzzellen. An Tag 3 nach Transplantation wurden beiden Gruppen 1×10^6 Zellen des transfizierten Tumors in die rechte Flanke s.c. appliziert. Messwerte sind angegeben als Mittelwerte der Tumorumfänge [mm³], Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler (SEM). * (p < 0,05)

Von fünf getesteten Tumoren in der GvHD-Gruppe waren zwei negativ für H-2K^b und drei teilweise positiv für das Alloantigen. In der Kontrollgruppe war nur einer von zwölf explantierten Tumoren positiv, der Rest war komplett negativ für das Alloantigen (Abb. 20).

Ergebnisse

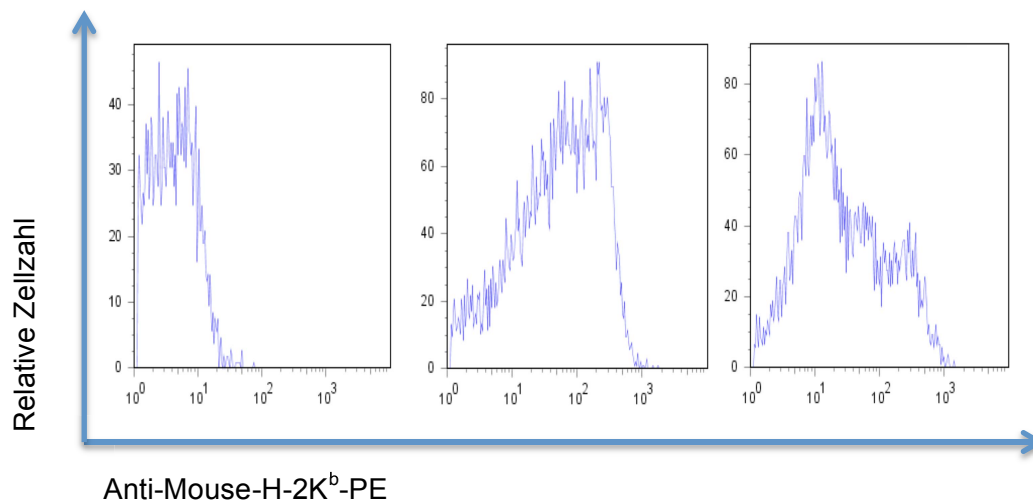


Abb. 20: Stabilitätstest des mit H-2K^b transfizierten Tumors im BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J] (H-2K^{dkk})-Transplantationsmodell

Dargestellt sind die explantierten Tumoren aus drei Versuchstieren. Sie wurden nach Beendigung der Versuche mit dem fluoreszierenden Antikörper Anti-Mouse-H-2K[b]-PE gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert. Maus 1 ist ein Beispiel für einen H-2K^b negativen, Maus 2 für einen positiven und Maus 3 für einen teilweise positiven Tumor.

3.4.4 Nachweis von spezifischen T-Zellen gegen das Alloantigen H-2K^b mittels *ELISpot*

Um spezifische T-Zellen gegen das Alloantigen H-2K^b nachzuweisen, wurden Interferon- γ -*ELISpots* durchgeführt.

Dazu wurden an Tag 50 nach Transplantation jeweils eine Milz der GvHD- und Kontrollgruppe aus dem ersten Transplantationsversuch mit dem mit H-2K^b transfizierten Tumor entnommen. Aus diesen Milzen wurden die Effektorzellen für den *ELISpot* gewonnen. Die Targets waren Medium, bestrahlte MPC-11-Zellen (Negativkontrollen), mit H-2K^b transfizierte MPC-11-Zellen und BL 291-Zellen (H-2K^b) (Positivkontrolle).

Es zeigte sich, dass in den Ansätzen mit den Targets BL 291 und dem mit H-2K^b transfizierten Tumor mehr Spots vorhanden waren als in dem Ansatz mit MPC-11. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 21).

Ergebnisse

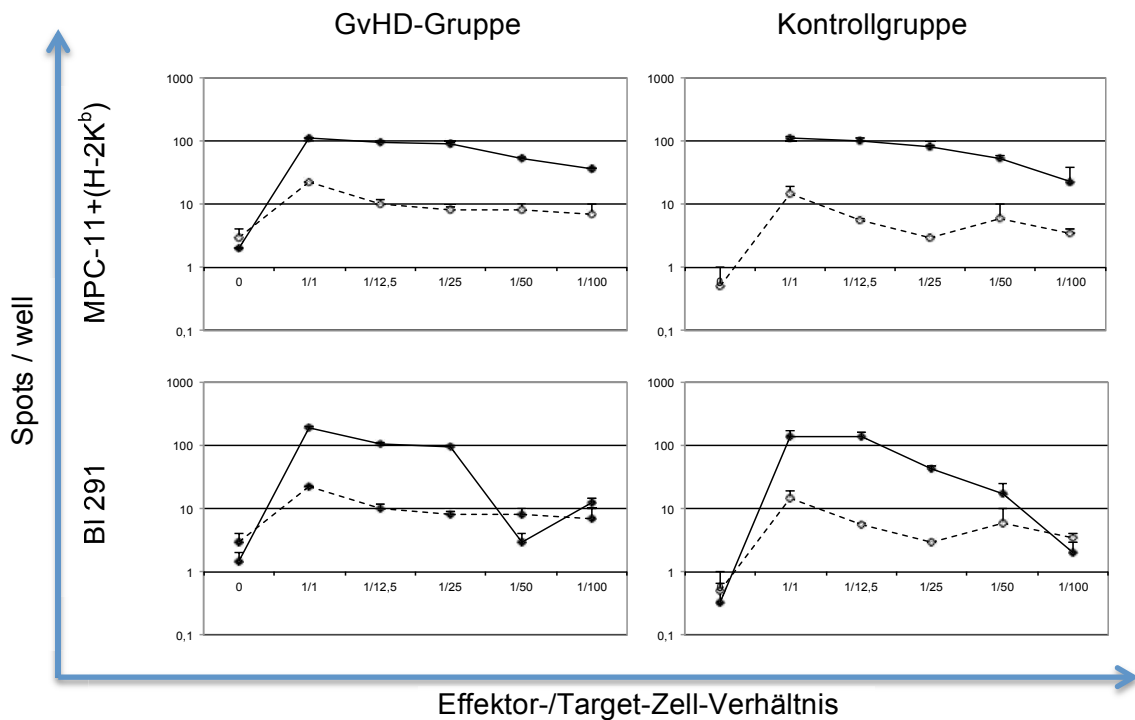


Abb. 21: Nachweis H-2K^b-spezifischer T-Lymphozyten im BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J] (H-2K^{dkk})-Transplantationsmodell nach Applikation des mit H-2K^b transfizierten Tumors

Nach Beendigung des Versuches wurde eine Milz aus der GvHD-Gruppe und eine aus der Kontrollgruppe entnommen und die Lymphozyten isoliert. Diese wurden als Effektorzellen mit Medium, bestrahlten MPC-11-Zellen (gestrichelte Linie), mit H-2K^b transfizierten MPC-11-Zellen (durchgezogene Linie, obere Reihe) und BL291 (H-2K^b) (durchgezogene Linie, untere Reihe) als Targets inkubiert. Die Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler (SEM). * ($p < 0,05$).

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob ein vorheriger Kontakt mit dem Antigen H-2K^b einen Effekt auf die Expression von spezifischen T-Zellen *in vivo* hat. Dazu wurden als Effektorzellen Milzzellen aus BALB/c und F1[BALB/cxCBA/J] benutzt. Die Versuchstiere wurden 16 Tage vorher mit MPC-11, dem mit H-2K^b transfizierten MPC-11 oder keinem Tumor immunisiert.

Als Targetzellen wurden bestrahlte MPC-11 und mit H-2K^b transfizierte Tumorzellen verwendet.

Bei den Ansätzen mit den naiven BALB/c- bzw. F1[BALB/cxCBA/J]-Tieren war kein signifikanter Unterschied zwischen der Reaktion auf MPC-11 und auf den transfizierten Tumor als Targets festzustellen. Das gleiche galt für die Ansätze, bei denen die Tiere mit dem Wildtyp MPC-11 immunisiert wurden.

Bei den Ansätzen, die im Vorfeld den mit H-2K^b transfizierten Tumor erhalten hatten, reagierten sowohl die BALB/c-Lymphozyten als auch die F1[BALB/cxCBA/J]-

Ergebnisse

Lymphozyten signifikant stärker ($p \leq 0,05$) auf den mit H-2K^b transfizierten Tumor als auf den Wildtyp (Abb. 22).

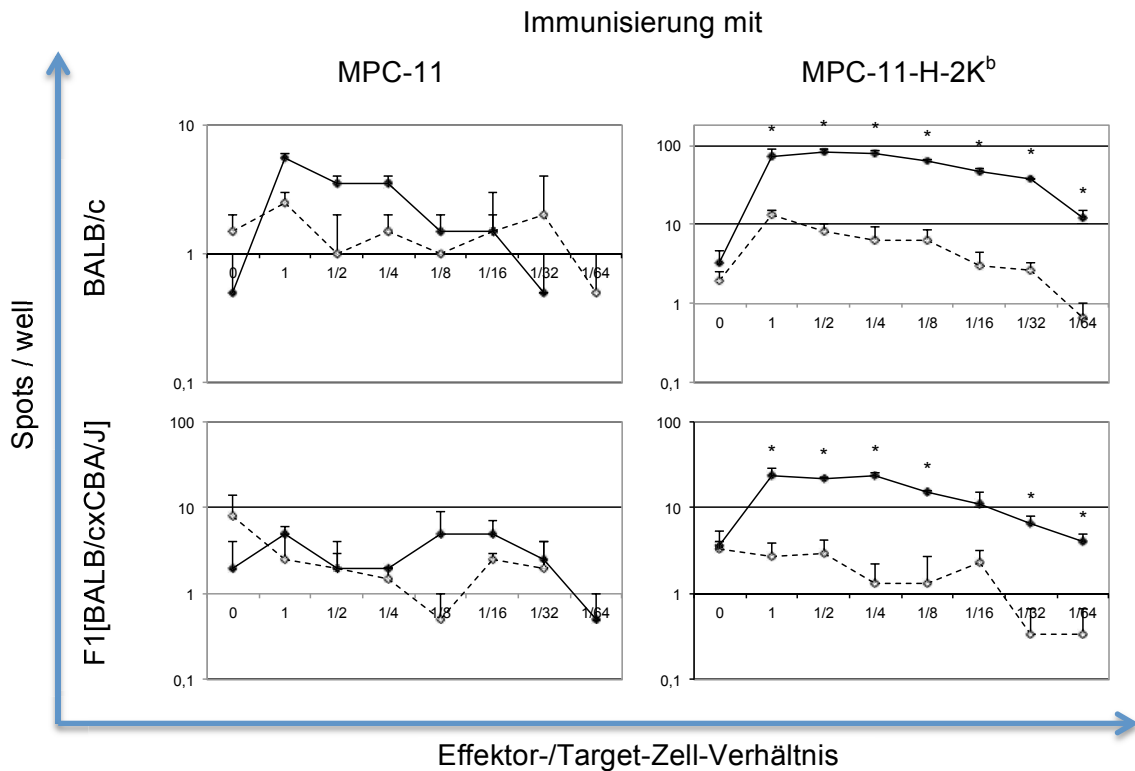


Abb. 22: Einfluss einer vorhergehenden Immunisierung mit dem Alloantigen H-2K^b auf die Entstehung von spezifischen T-Lymphozyten gegen H-2K^b.

BALB/c (obere Reihe) und F1[BALB/cxCBA/J]-Lymphozyten (untere Reihe) wurden mit MPC-11 (linke Spalte) oder dem mit H-2K^b transfizierten Tumor (rechte Spalte) immunisiert. Nach 16 Tagen wurden die Milzen entnommen und die Lymphozyten separiert. Diese wurden mit Medium, bestrahlten MPC-11-Zellen (gestrichelte Linie) und bestrahlten Zellen des transfizierten Tumors (durchgezogene Linie) auf *ELISpot*-Platten inkubiert. Die Balken repräsentieren den mittleren Standardfehler (SEM). * ($p \leq 0,05$)

3.4.5 Chimärismus der transplantierten Tiere

Nach Beendigung jedes Versuches wurde das Engraftment des Transplantats in den Empfängern getestet. Dazu wurde eine Chimärismusanalyse der Empfänger milzen per Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Milzzellen wurden mit zwei fluoreszierenden Antikörpern gegen H-2K^d und H-2K^k gefärbt und in der Durchflusszytometrie der Anteil der H-2K^d bzw. der H-2K^k positiven Zellen bestimmt (Abb. 23). Die verwendeten Antikörper waren Mouse-Anti-Mouse-H-2K[k]-PE und Mouse-Anti-Mouse-H-2K[d]-FITC.

Ergebnisse

In den beiden Versuchen mit dem mit H-2K^k transfizierten Tumor und früher Tumorgabe waren die 23 Milzen aus den Kontrollgruppen zu 96,5% ± 1,0 (Mittelwert ± mittlerer Standardfehler) positiv für H-2K^d. Der Median betrug 98,7%.

Die 22 Milzen aus den GvHD-Gruppen waren zu 93,2% ± 2,0 positiv für H-2K^d mit einem Median von 98,1%.

In den Versuchen mit später Tumorgabe von dem mit H-2K^k transfizierten Tumor waren die 27 untersuchten Milzen aus den GvHD-Gruppen zu 92,4% ± 1,4 positiv für H-2K^d. Der Median betrug 94,9%.

In den Versuchen mit dem mit H-2K^b transfizierten Tumor waren die 20 untersuchten Milzen aus den Kontrollgruppen zu 97,9% ± 0,6 positiv für H-2K^d mit einem Median von 98,6%. Die 10 untersuchten Milzen aus den GvHD-Gruppen waren zu 96,1% ± 1,0 positiv für H-2K^d mit einem Median von 97,0%.

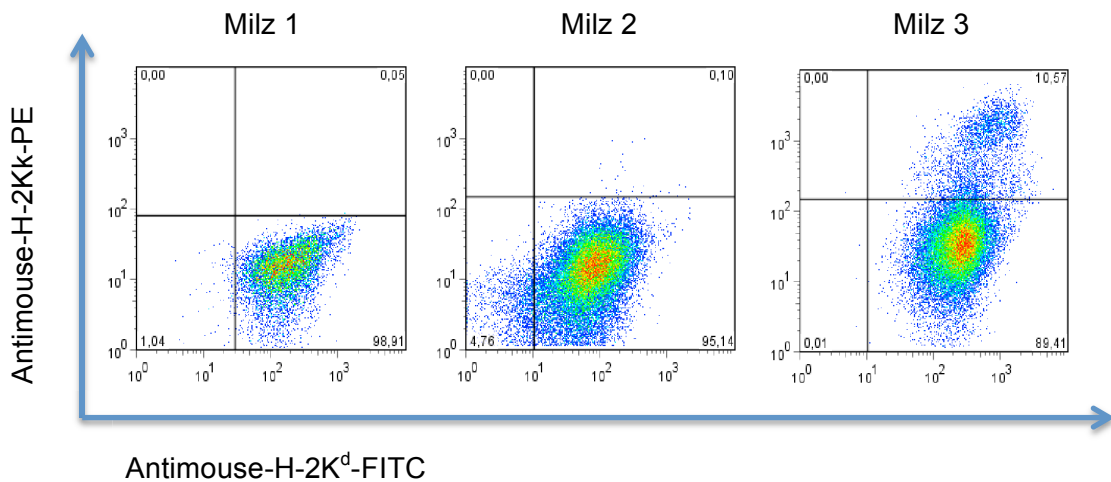


Abb. 23: Chimärismusanalyse von Empfängermilzen im BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J] (H-2K^{dxk})-Transplantationsmode

Abgebildet sind die Ergebnisse von drei verschiedenen Milzen aus den BALB/c→F1[BALB/cx CBA/J] (H-2K^{dxk})-Transplantationsversuchen. Die Milzen wurden nach Beendigung der Versuche mit fluoreszierenden Antikörpern gegen H-2K^d und H-2K^k gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert. Der rechte untere Quadrant enthält die H-2K^d positiven und H-2K^k negativen Zellen.

4 Diskussion

Gegenstand der Arbeit war die Untersuchung, welchen Einfluss Alloantigene wie MHC-Moleküle oder mHAgS auf einen GvT-Effekt nach allogener SZT haben. Von besonderem Interesse war dabei, ob das Expressionsmuster der Alloantigene – ubiquitär in Maus und Tumor vs. exklusiv nur im Tumor – den GvT-Effekt beeinflusst. Experimentelle Basis für die Untersuchungen war ein murines *parent-into-F1*-Transplantationsmodell (BALB/c→F1[BALB/cxCBA/J]).

Um den Einfluss der Expression von allogenen mHAgS zu untersuchen, sollte eine stabile Tumorzelllinie erstellt werden, in die das mHAg UTY transfiziert werden sollte. UTY wird vom Y-Chromosom kodiert und ist somit für weibliche Spender/Empfänger allogon. Um den Erfolg der Transfektion bzw. die Stabilität der transfizierten Zellen zu untersuchen, wurde GFP als Marker in das Plasmid integriert. Da eine immunologische Reaktion auf den Marker GFP alleine nicht ausgeschlossen werden konnte, erfolgten Transfektionen nur mit GFP, sodass dieses separat getestet werden konnte.

Für die Transfektion wurden verschiedene nicht-virale Verfahren verwendet. Zwar konnten keine stabilen Tumorzelllinien etabliert werden, jedoch war zu beobachten, dass Transfektionen mit GFP alleine transient bessere Ergebnisse erzielten als UTY-GFP. Dieser Unterschied kann zum einen daran gelegen haben, dass UTY-GFP größer war und deshalb bei gleicher DNA-Menge weniger Kopien des Plasmids für die Reaktion vorhanden waren (134). Zum anderen kann die Größe des Plasmids selbst das Problem für das Fehlschlagen der Transfektionen gewesen sein (64). Weitere Transfektionen, evtl. mit einem retroviralen Verfahren, bleiben nachfolgenden Untersuchungen vorbehalten.

Für die *in vivo* Versuche wurden deshalb nur die bereits von der Arbeitsgruppe etablierten MPC-11-Tumorzelllinien, in die die MHC-Moleküle H-2K^k bzw. H-2K^b transfiziert wurden, verwandt. Diese waren bereits im Vorfeld erfolgreich auf ihre Stabilität bezüglich des Alloantigens *in vitro* getestet worden.

In Vorversuchen wurden die Eigenschaften der Tumoren im Hinblick auf die späteren Transplantationsversuche untersucht. Es wurde gezeigt, dass sowohl der mit H-2K^k als auch der mit H-2K^b transfizierte Tumor in naiven BALB/c-Tieren (H-2K^d), den späteren Spendern, immunogen war. Beide Tumoren wuchsen entweder nicht an oder wurden im Verlauf abgestoßen. Weiterhin wurden beide Tumoren in naiven

Diskussion

F1[BALB/cxCBA/J]-Tieren (H-2K^{dxk}), den späteren Empfängern, getestet. Der mit H-2K^b transfizierte Tumor war auch hier immunogen. Der mit H-2K^k transfizierte Tumor zeigte ein progredientes Wachstum, welches mit dem Wachstum des Wildtypen vergleichbar war. Er war nicht immunogen, da die MHC-Moleküle zu der F1-Maus (H-2K^{dxk}) ident waren. Außerdem wurde mittels Durchflusszytometrie gezeigt, dass das transfizierte Antigen H-2K^k auch *in vivo* stabil exprimiert wurde. Dadurch, dass das Wachstum der beiden Tumoren in naiven Mäusen vergleichbar war, konnten Effekte, die nur gegen das ubiquitär exprimierte Alloantigen gerichtet waren, in allogenen Transplantationsversuchen untersucht werden. Ein im Vergleich zum Wildtyp vermindertes Wachstum des transfizierten Tumors wäre dann auf einen zusätzlichen/verstärkten GvT-Effekt gegen das ubiquitäre Alloantigen zurückzuführen.

Weiterhin wurde das Wachstumsverhalten der Tumoren im Rahmen einer syngenen Transplantation (BALB/c→BALB/c) untersucht. In dieser Konstellation konnte es nicht zu einer GvHD kommen, da Spender und Empfänger aus dem gleichen Inzuchtstamm stammten und deshalb keine MHC-Disparitäten vorlagen. Andere Effekte der Transplantation, wie z.B. die durch die Konditionierungstherapie ausgelösten Zelluntergänge und die Entzündungsreaktion, blieben aber bestehen. Dadurch konnte die Reaktion auf die Alloantigene losgelöst von einer GvHD untersucht werden.

Aufgrund der Konditionierungstherapie verloren die Versuchstiere anfänglich an Gewicht. Da ein Gewichtsverlust in die Berechnung des GvHD-Scores eingeht, war dieser anfänglich erhöht, obwohl im Verlauf keine GvHD gemessen wurde. Gegen beide Alloantigene (H-2K^k und H-2K^b) fand eine Anti-Tumor-Reaktion statt. Dieser Effekt war in Gruppen, die Milzzellen und somit immunkompetente Zellen wie T-Zellen erhalten hatten, stärker ausgeprägt. Die Reaktion auf die beiden Alloantigene war vergleichbar, beide wiesen nur ein geringes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp auf. Somit bestand kein oder nur ein geringer Unterschied in der Immunogenität der Alloantigene. Ein Unterschied im Wachstumsverhalten in den allogenen Transplantationsversuchen lässt sich deshalb auf das Expressionsmuster der Alloantigene zurückführen.

In den auf die Vorversuche folgenden allogenen Transplantationsversuchen wurde ein *parent-into-F1*-Transplantationsmodell verwendet. In diesem wird davon ausgegangen, dass das Spender-System das Empfänger-System komplett ersetzt und somit alle immunologischen Effekte vom Spender ausgehen. Um dies zu überprüfen, wurden

Diskussion

Chimärismusanalysen nach den Versuchen durchgeführt, die das Verhältnis von Spender- zu Empfänger-Zellen bestimmen. Das Probenmaterial war eine Suspension aus Milzzellen, bei der keine Leukozytenseparation durchgeführt wurde. Dadurch konnte allerdings nicht gewährleistet werden, dass die Probe frei von Stromazellen des Empfängers war. Deshalb wurde ein Wert von über 90% Spenderzellen als ausreichender/vollständiger Chimärismus interpretiert. Die durchgeführten allogenen Transplantationen konnten alle als erfolgreich gewertet werden, da bis auf wenige Ausnahmen die Versuchstiere einen Chimärismus von über 90% Spenderzellen aufwiesen. Dadurch waren die Versuche im Hinblick auf immunologische Effekte verwertbar.

Das Ziel der Arbeit war, den GvT-Effekt im Rahmen einer allogenen SZT zu untersuchen. Da dieser stark mit einer GvHD assoziiert ist (55,133), wurde diese in einem Teil der Empfänger induziert, indem zusätzlich Milzzellen transfundiert wurden (GvHD-Gruppe). Die zahlreichen in der Milz befindlichen Lymphozyten sind für die GvHD bedeutend (9,55,60). Die entstandene GvHD machte sich vor allem durch Fellverlust und Hautveränderungen bemerkbar. Es war nicht auszuschließen, dass diese Veränderungen in der Haut das Wachstum des Tumors beeinflussten, z.B. durch eine GvHD-bedingte Devaskularisierung nutritiver Gefäße und somit eine Unterversorgung des Tumors (7,11). Welche Einflüsse auf die Tumoren von der GvHD und welche von einem GvT-Effekt ausgingen, konnte nicht vollständig differenziert werden.

Die Tiere, die nur Knochenmarkzellen erhalten hatten (Kontrollgruppe), zeigten eine ähnliche Reaktion auf die Konditionierungstherapie bzw. die Transplantation wie die Tiere nach syngener Transplantation. Nach einem anfänglichen Gewichtsverlust erholten sich die Tiere wieder, und es wurde im Verlauf nur eine geringe bis keine GvHD gemessen. Dass trotz der bestehenden MHC-Disparitäten keine relevante GvHD entstand, ist durch das Fehlen einer ausreichenden Anzahl immunkompetenter Zellen zu erklären (29,135).

In den GvHD-Gruppen wurde das Tumorwachstum generell supprimiert. Sowohl der Wildtyp als auch die mit H-2K^k oder H-2K^b transfizierten Tumoren zeigten in den allogenen transplantierten Gruppen, die sowohl Knochenmark als auch Milzzellen erhielten, ein geringeres Wachstum als in den entsprechenden Kontrollgruppen ohne zusätzliche Milzzellengabe.

Diskussion

Dies war besonders deutlich im ersten Versuch mit dem H-2K^b transfizierten Tumor zu beobachten. Die beiden Tumoren in der GvHD-Gruppe wuchsen nur in wenigen Tieren an und hatten in diesen ein signifikant reduziertes Wachstum. Im Vergleich zu den GvHD-Gruppen der anderen Versuche war der GvHD-Score hier höher.

Eine einzige Ausnahme in den Versuchen stellte der Versuch mit dem H-2K^b transfizierten Tumor dar, bei dem allein der transfizierte Tumor appliziert wurde. Dort hatte der Tumor in der GvHD-Gruppe anfänglich ein geringeres Wachstum, wurde im Verlauf des Versuches jedoch größer als der Tumor der Kontrollgruppe. Allerdings überlebten in der GvHD-Gruppe nur sechs von zwölf Tieren, und der Tumor wuchs nur in fünf Tieren an, während in der Kontrollgruppe neun Tumoren in die Statistik eingingen. Weiterhin ergab die Analyse der Tumoren nach dem Versuch, dass diese zum Teil das Alloantigen H-2K^b verloren hatten; die Tumoren waren also nicht mehr homogen. Dies und die relative kleine Anzahl auswertbarer Tiere reduzierten die statistische Aussagekraft bezüglich des Vergleichs des Tumorwachstums in diesem Versuch.

Zielstrukturen der Immunzellen sind bei der GvHD hauptsächlich disparate MHC-Moleküle (34), diese können auch Ziel bei einem GvT-Effekt sein. Dass auch der Wildtyp, der MHC-identisch zum Spender ist, in den GvHD-Gruppen supprimiert wurde, liegt an der Existenz von Tumorantigenen auf der Tumoroberfläche, die als Zielstrukturen für die Effektorzellen fungieren. Dafür kommen verschiedene Strukturen wie mHAg, tumor-assoziierte oder tumor-spezifische Antigene in Frage (14). Dieser tumorspezifische GvT-Effekt kann durch einen Transfer von Effektorzellen auf andere Mäuse übertragen werden (115). Sowohl der Wildtyp als auch die transfizierten Tumoren waren von diesem GvT-Effekt betroffen.

Das im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant reduzierte Tumorwachstum in den GvHD-Gruppen lag zum einen daran, dass in den Kontrollgruppen nur sehr wenige Immunzellen wie T- oder NK-Zellen vorhanden waren. Für einen GvT-Effekt und somit eine Supprimierung der Tumoren sind diese Zellen jedoch essentiell (31,55,60). Außerdem ist der GvT-Effekt stark mit einer GvHD assoziiert (8,55,133). Ohne das Zytokinmilieu einer GvHD kommt es nur zu einer unzureichenden Aktivierung von Effektorzellen und somit auch nicht zu einem starken GvT-Effekt (9,37). Dadurch trat der GvT-Effekt in den Gruppen mit zusätzlichen Milzzellen (und somit mit einer GvHD) stärker zutage.

Diskussion

Dies passt sowohl mit klinischen als auch experimentellen Daten zusammen, nach denen eine GvHD bzw. eine Donor-Leukozyten-Infusion zu einer Tumorremission führen kann (8,14,55,114,115).

Die These, ob ein zusätzliches MHC-Alloantigen eine verstärkte GvT-Reaktion auslöst, sollte mit dieser Arbeit geklärt werden. Dabei wurde unterschieden, ob das betreffende Alloantigen ubiquitär oder nur exklusiv auf dem Tumor exprimiert wurde. Im verwendeten allogenen Transplantationsmodell mit dem Empfänger F1[BALB/cxCBA/J] (H-2K^{dxk}) war das Antigen H-2K^k ubiquitär und das Antigen H-2K^b exklusiv auf dem Tumor vorhanden.

Zuerst wurde das ubiquitär exprimierte Alloantigen H-2K^k getestet. Es wurde per Durchflusszytometrie gezeigt, dass das Antigen H-2K^k in allen Versuchen bis zum Ende stabil exprimiert wurde. Dadurch war ein Vergleich der Wachstumskurven von transfiziertem Tumor und Wildtyp bezüglich eines allospezifischen GvT-Effektes möglich.

Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe hatten bereits gezeigt, dass ein ubiquitär exprimiertes MHC-Klasse-I-Alloantigen keinen zusätzlichen GvT-Effekt generiert. Es war also zu erwarten, dass auch hier der Wildtyp und der transfizierte Tumor innerhalb der Gruppen das gleiche Wachstum hatten. Entgegen dieser Annahme wuchsen die beiden Tumoren in der GvHD-Gruppe jedoch unterschiedlich. Der Kurvenverlauf bzw. die Progredienz war ähnlich, aber der transfizierte Tumor wuchs später an, wodurch sich signifikante Unterschiede im Tumolvolumen ergaben. Dies wurde in einer Wiederholung des Versuchs bestätigt. Hier wuchs der transfizierte Tumor auch in der Kontrollgruppe verzögert an, sodass sich in beiden Gruppen signifikante Unterschiede im Tumolvolumen ergaben.

Dieses divergierende Ergebnis (gegenüber den früheren Arbeiten) kann verschiedene Ursachen haben. Das verzögerte Anwachsen des transfizierten Tumors kann daran gelegen haben, dass weniger Zellen des transfizierten Tumors appliziert wurden oder dass er sich zum Zeitpunkt der Applikation in einer anderen Wachstumsphase als der Wildtyp befand (methodische Fehler). Eine weitere Ursache konnte der Zeitpunkt der Tumorgabe sein. In beiden Versuchen wurde der Tumor früh, an Tag 2 bzw. 3 nach Transplantation, gegeben. Zu diskutieren ist, ob das ubiquitäre Alloantigen in dieser frühen Phase eine Rolle für die GvT-Reaktion spielt, während sich im Verlauf eine Toleranz entwickelt.

Diskussion

Um die Möglichkeit einer frühen Reaktion auf das Alloantigen zu überprüfen, wurden Versuche mit einer späteren Tumorgabe in GvHD-Gruppen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Wachstumsverläufe der beiden Tumoren sich umso mehr annäherten je später die Tumorapplikation erfolgte. In einem ersten Versuch mit Tumorgabe an Tag 6 bzw. 13 wuchsen der transfizierte Tumor und der Wildtyp nicht signifikant unterschiedlich, wobei in der Gruppe mit Tumorgabe an Tag 13 die beiden Wachstumskurven einen ähnlicheren Verlauf hatten. Die Aussagekraft dieses Versuches war allerdings durch das Versterben der Hälfte der Versuchstiere und die damit kleine Anzahl auswertbarer Tiere begrenzt. In einer Wiederholung des Versuchs mit Tumorgaben an den Tagen 3, 7 und 14 wuchs der transfizierte Tumor bei den frühen Tumorgaben verzögert an, während er bei der Tumorgabe an Tag 14 das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp aufwies. Diese Ergebnisse erhärten die Vermutung, dass der Zeitpunkt der Tumorgabe für die unterschiedlichen Wachstumsverläufe ursächlich war. Unspezifische Effektorzellen wie T- oder natürliche Killer-Zellen aus dem Transplantat können für diesen frühen GvT-Effekt verantwortlich sein. Im Verlauf entwickelt sich offenbar eine Toleranz gegenüber dem ubiquitären Alloantigen, sodass ein verstärkter GvT-Effekt später nicht mehr nachweisbar ist.

Erste Beweise für die Existenz einer erworbenen Allotoleranz wurden von Billingham et. al. erbracht (12). Toleranz beschreibt das Ausbleiben einer Reaktion gegenüber einem bestimmten Antigen bei erhaltener globaler Immunkompetenz. Weitere Studien zeigten, dass die Toleranzentwicklung zwei verschiedene Komponenten hat; zum einen die zentrale Toleranz, bei der es zu einer Elimination von autoreaktiven T-Zellen im Thymus kommt, und zum anderen eine periphere Toleranz, bei der T-Zellen in der Peripherie supprimiert, eliminiert oder zur Anergie angeregt werden.

Als nächstes wurden Versuche mit dem mit H-2K^b transfizierten Tumor durchgeführt, das Alloantigen wurde also nur exklusiv im transfizierten Tumor exprimiert. Die Hypothese war, dass es hier zu einem zusätzlichen allospezifischen GvT-Effekt kommt. Diese Überlegung beruht darauf, dass gegen ein ubiquitär exprimiertes Alloantigen eine Toleranz entwickelt werden kann. Bei einem nur auf dem Tumor vorkommenden Alloantigen ist dies aufgrund der fehlenden Expression von H-2K^b im Thymus nicht möglich.

In einem ersten Versuch war die GvHD-Gruppe hinsichtlich eines zusätzlichen GvT-Effektes nur eingeschränkt auswertbar, da durch eine starke GvHD beide Tumoren so stark beeinträchtigt waren, dass sie jeweils nur in 3 von 10 Tieren anwuchsen. In der

Kontrollgruppe wurde erwartet, dass beide Tumoren einen gleichen Wachstumsverlauf zeigen, da keine Effektorzellen vorhanden waren, die einen GvT-Effekt auslösen konnten. Anfänglich wurde genau dieser Verlauf beobachtet, aber ab Tag 30 divergierten die Tumoren. Der mit H-2K^b transfizierte Tumor stagnierte erst und wurde dann kleiner. Diese Veränderung konnte als späte Abstoßungsreaktion bzw. GvT-Effekt gewertet werden. Da sich die Tumoren bis auf das Alloantigen H-2K^b komplett glichen, musste diese Reaktion gegen das Alloantigen gerichtet sein. Für die Abstoßungsreaktion verantwortliche Zellen wie T- oder natürliche Killer-Zellen waren jedoch nicht im Transplantat der Kontrollgruppe enthalten. Bis zu einem kompletten Engraftment der SZT und somit auch einer Rekonstruktion des Immunsystems kann es einige Wochen dauern (53,114). Der Beginn der verzögerten Abstoßungsreaktion gegen den Tumor konnte somit mit einer Neubildung von immunkompetenten T-Zellen zeitlich zusammenhängen.

Um das Vorhandensein von spezifischen T-Zellen, die gegen das Alloantigen H-2K^b gerichtet sind, zu überprüfen, wurden nach Beendigung des Versuchs Interferon- γ -*ELISpots* durchgeführt. Diese ergaben, dass Milzzellen sowohl aus der Kontrollgruppe als auch aus der GvHD-Gruppe ca. 10-fach stärker auf einen BL291-Tumor (H-2K^b) bzw. den mit H-2K^b transfizierten Tumor reagierten als gegen den Wildtyp-Tumor. Diese Ergebnisse waren allerdings aufgrund der geringen Fallzahlen nicht signifikant, da wegen der geringen Anzahl der Effektorzellen pro Tumor nur zwei Ansätze durchgeführt werden konnten.

Eine weitere denkbare Fehlerquelle bestand wegen einer möglichen *cold target inhibition*. MPC-11 ist ein Lymphom und metastasiert daher auch in die Milz. Da im *ELISpot* Milzzellen als Effektorzellen verwendet wurden, hätte das Effektorzellgemisch auch metastasierte Tumorzellen enthalten können. Dies hätte zur Folge gehabt, dass die Milzzellen nicht nur gegen die bestrahlten Tumorzellen reagierten, sondern auch gegen die metastasierten Tumorzellen und somit das Ergebnis verzerrten. Die gesammelten Daten zeigten, dass die Anzahl der Spots mit der Verdünnung der Targets abnahm. Dies macht eine *cold target inhibition* wenig wahrscheinlich, da sonst auch bei starker Verdünnung der bestrahlten Tumorzellen mehr Spots zu sehen gewesen wären.

Um die Entstehung der spezifischen T-Zellen weiter zu untersuchen, wurde ein Immunisierungs-Versuch mit nicht transplantierten Mäusen durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass die Reaktion auf das Alloantigen H-2K^b größer war, wenn die Maus vorher mit dem mit H-2K^b transfizierten Tumor immunisiert wurde. Milzzellen einer nicht

Diskussion

immunisierten bzw. mit dem Wildtyp immunisierten Maus zeigten keine stärkere Reaktion auf den mit H-2K^b transfizierten Tumor als auf den Wildtyp. Dies korrespondiert mit der gängigen Lehrmeinung, dass für eine effiziente Immunität ein vorheriger Antigenkontakt bestanden haben muss.

Neben den H-2K^b-spezifischen T-Zellen waren die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, die jeweils nach Beendigung der Versuche durchgeführt wurde, ein weiteres Indiz für einen allospezifischen GvT-Effekt gegen das Alloantigen H-2K^b. Diese zeigten, dass nicht alle transfizierten Tumoren das Alloantigen stabil exprimierten, in einem Teil der Tumoren kam es zu einem teilweisen bis kompletten Verlust des Alloantigens H-2K^b. Für diesen Verlust kann es verschiedene Ursachen geben.

Der Tumor hätte *in vivo* generell nicht stabil sein können. Dagegen spricht allerdings, dass der Tumor in einer anderen Arbeit der Arbeitsgruppe in mit BALB/c transplantierten F1[C57Bl/6xBALB/c] (H-2K^{bxd})-Mäusen *in vivo* stabil geblieben war.

Weiterhin wäre es denkbar, dass der Aufbau des Versuches dieses Ergebnis bedingte. Jeder Maus wurden sowohl der transfizierte, als auch der Wildtyp-Tumor appliziert (einer in die linke, einer in die rechte Flanke). Deswegen hätte es zu einer Vermischung der beiden Tumoren *in vivo* kommen können, also zu einem Transfer von Wildtyp-Zellen zur Stelle des transfizierten Tumors. Um diese Möglichkeit auszuschließen und das Verhalten des transfizierten Tumors weiter zu untersuchen, wurde ein Versuch nur mit dem transfizierten Tumor durchgeführt.

Die Kontrollgruppe zeigte einen ähnlichen Verlauf wie im vorherigen Versuch – nach anfänglicher Progredienz stagnierte das Wachstum des transfizierten Tumors. Auch hier setzte der GvT-Effekt erst nach einer gewissen Zeit (hier Tag 25) ein, und das Alloantigen wurde nicht in jedem Tumor bis zum Ende stabil exprimiert. In der GvHD-Gruppe war das Alloantigen am Ende des Versuchs ebenfalls nicht mehr in allen Tumoren nachweisbar. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe wuchs der transfizierte Tumor hier jedoch bis zum Ende progredient. Somit konnte eine Vermischung von Wildtyp und transfiziertem Tumor *in vivo* als Ursache für den Antigen-Verlust ausgeschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch einen allospezifischen GvT-Effekt Selektionsdruck auf den Tumor ausgeübt wurde und Zellklone mit geringer oder keiner Expression von H-2K^b dadurch einen Überlebensvorteil hatten.

So kann das beobachtete unterschiedliche Wachstumsverhalten auch durch diesen Selektionsdruck erklärt werden, da der GvT-Effekt zu unterschiedlichen Zeiten

einsetzte. In der GvHD-Gruppe setzte der GvT-Effekt durch die im Transplantat enthaltenen Effektorzellen früh ein. Dadurch erfolgt die Selektion und somit der Verlust des Antigens ebenfalls früh, und der nun H-2K^b-negative Tumor konnte danach größtenteils unbeeinträchtigt weiterwachsen. In der Kontrollgruppe fehlten anfangs jedoch entsprechende Effektorzellen. Der GvT-Effekt und somit die Selektion setzte hier erst nach Rekonstitution des Immunsystems ein, wodurch es zur makroskopisch sichtbaren Stagnation bzw. Abstoßung des Tumors kam.

Ein ähnlicher Verlust von disparaten MHC-Molekülen auf dem Tumor wurde auch von Vago et al. beschrieben (124). Die Untersuchungsgruppe waren AML- bzw. MDS-Patienten (myelodysplastisches Syndrom) nach einer haploidenten SZT. Entstehende Rezidive der Leukämie wurden HLA-typisiert und mit den Ursprungstumoren verglichen. Dabei zeigte sich bei 5 von 17 Patienten, dass die zum Spender disparaten HLA-Merkmale in den Rezidiven nicht mehr vorhanden waren. Vom Spender und Patienten isolierte T-Zellen reagierten zwar gegen den Ursprungstumor, nicht aber gegen das mutierte Rezidiv. Der Verlust der Antigenstruktur führte auch hier zu einem Überlebensvorteil und somit zum Rezidiv des Tumors.

Tumoren können auf unterschiedlichen Wegen einer T-Zell-vermittelten Zerstörung entgehen. Zum einen können sie das Immunsystem direkt beeinflussen, z.B. durch die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs), die die Immunantwort abschwächen (83,141) oder durch oxidativen Stress, der die Effektorfunktion von T-Zellen inhibiert (61,97). Zum anderen können Tumoren durch eine Form der Selektion dem Immunsystem entgehen, dabei ist vor allem eine Herunterregulierung bzw. ein Verlust von MHC oft zu beobachten (5,20,38). Dadurch können sie nicht mehr von T-Zellen erkannt werden und werden somit nicht zerstört. Das Phänomen *tumor escape* kommt auch bei anderen spezifischen Therapien vor, z.B. bei der *targeted therapy* mit monoklonalen Antikörpern (Trastuzumab) gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor Her-2/neu bei Mamma-Ca (131).

Die These, dass ein zusätzliches MHC-Alloantigen einen verstärkten GvT-Effekt auslöst, konnte mit dieser Arbeit experimentell bestätigt werden. Dies gilt vor allem dann, wenn das Alloantigen nicht ubiquitär exprimiert wird.

Bei ubiquitär exprimierten MHC-Alloantigenen wurde ein nur kurz nach der Transplantation auftretender allospezifischer GvT-Effekt beobachtet. Dieser wurde im Verlauf offenbar durch entstehende Toleranzmechanismen unterbunden.

Weitere Untersuchungen zu diesem Phänomen sind nötig, um ihn bezüglich des zeitlichen Verlaufs und der involvierten Effektorzellen weiter zu charakterisieren. Dazu gehören z.B. *parent-into-F1*-Versuche mit unterschiedlichen MHC-Konstellationen und Modelltumoren, um zu überprüfen, ob dieser frühe Effekt generell existiert und nicht von speziellen Faktoren der hier gewählten Konstellation abhängt. Weiterhin ist die Fragestellung zu klären, bis zu welchem Zeitpunkt dieser frühe Effekt auftaucht und wann eine Alloantigentoleranz einsetzt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung des mHAGs UTY, da sich der GvT-Effekt neben MHC-Alloantigenen auch gegen mHAGs richtet. Entsprechende Transplantationsversuche waren jedoch aufgrund der nicht erfolgreichen Transfektionen mit UTY nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit.

Sowohl mHAGs als auch Tumorantigene befinden sich aktuell im Fokus der Forschung als Zielstruktur für eine spezifische T-Zell-Therapie. Für diese Therapie gibt es zwei Ansätze, zum einen ein adoptiver Transfer von spezifischen T-Zellen und zum anderen eine Vakzinierung mit Antigenfragmenten, um eine T-Zell-Antwort gegen den Tumor zu induzieren oder zu verstärken.

Fontaine et. al. zeigten in einem murinen Modell, dass der Transfer von mHAG-spezifischen T-Zellen zu einer kompletten Tumoreradikation führte (36). Aber auch klinische Studien zeigen das Potential dieser Therapie (74,132). Vor allem gewebespezifische mHAGs wie HA-1 oder HA-2, welche nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, scheinen ein vielversprechendes Ziel zu sein (75,87).

Probleme dieser Therapie sind unter anderem die aufwändige Expandierung und Aktivierung der T-Zellen *in vitro* sowie eine nur kurze Persistenz der spezifischen T-Zellen *in vivo* (74,132).

Tumorantigene wie WT1, PR1 und BCR/ABL sind derzeit im Fokus für die Entwicklung einer Vakzinierungstherapie (78,101). Aus den Antigenen entwickelte Peptide sollen eine CD8⁺-T-Zell-Antwort stimulieren. In verschiedenen klinischen Studien mit Patienten, die an einer AML oder einem MDS erkrankt waren, kam es nach einer Vakzinierung mit WT1-Peptiden zu einer Vermehrung von WT1-spezifischen zytotoxischen T-Zellen sowie einer Reduktion von WT1-mRNA (58,90,101). Dabei war die Effektivität der Vakzinierung geringer bei Patienten mit aktiver AML im Vergleich zu Patienten in kompletter Remission oder *minimal residual disease* (58). Weitere Herausforderungen sind die oft nur kurze Dauer der Immunität sowie die Stimulierung einer möglichst starken T-Zell-Antwort (100).

5 Literaturverzeichnis

(1) An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR, Jr, Chen ZS (2010) BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk.Res.* 34 (10): 1255-1268

(2) Anderlini P, Champlin RE (2008) Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges. *Blood* 111 (4): 1767-1772

(3) Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, Shimoni A, Ruutu T, Kolb HJ, et al. (2005) Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 19 (12): 2304-2312

(4) Appelbaum FR (2009) Optimising the conditioning regimen for acute myeloid leukaemia. *Best Pract.Res.Clin.Haematol.* 22 (4): 543-550

(5) Atkins D, Breuckmann A, Schmahl GE, Binner P, Ferrone S, Krummenauer F, et al. (2004) MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *International Journal of Cancer* 109 (2): 265-273

(6) Baharav E, Merimski O, Shoenfeld Y, Zigelman R, Gilbrud B, Yechezkel G, et al. (1996) Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. *Clin.Exp.Immunol.* 105 (1): 84-88

(7) Baker MB, Altman NH, Podack ER, Levy RB (1996) The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *The Journal of Experimental Medicine* 183 (6): 2645-2656

(8) Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE (1956) Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br.Med.J.* 2 (4993): 626-627

(9) Barrett AJ (2008) Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br.J.Haematol.* 142 (6): 877-888

(10) Bayraktar UD, Champlin RE, Ciurea SO (2012) Progress in Haploidentical Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 18 (3): 372-380

(11) Biedermann BC (2008) Vascular endothelium and graft-versus-host disease. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 21 (2): 129-138

(12) Billingham RE, Brent L, Medawar PB (1953) Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172 (4379): 603-606

(13) Billingham RE (1966) The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 62: 21-78

(14) Bleakley M, Turtle CJ, Riddell SR (2012) Augmentation of anti-tumor immunity by adoptive T-cell transfer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev.Hematol.* 5 (4): 409-425

(15) Bonnet D, Warren EH, Greenberg PD, Dick JE, Riddell SR (1999) CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96 (15): 8639-8644

(16) Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, et al. (2005) Survival and Complications in Thalassemia. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1054 (1): 40-47

(17) Bornhäuser M, Kienast J, Trensche R, Burchert A, Hegenbart U, Stadler M, et al. (2012) Reduced-intensity conditioning versus standard conditioning before allogeneic haemopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia in first complete remission: a prospective, open-label randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 13 (10): 1035-1044

(18) Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, DeFor TE, Gooley TA, et al. (2010) Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood* 116 (22): 4693-4699

(19) Caballero OL, Chen Y (2009) Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Science* 100 (11): 2014-2021

(20) Carretero R, Romero J, Ruiz-Cabello F, Maleno I, Rodriguez F, Camacho F, et al. (2008) Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics* 60 (8): 439-447

(21) Cashen AF, Lazarus HM, Devine SM (2007) Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF? *Bone Marrow Transplant.* 39 (10): 577-588

(22) Cavazzana-Calvo M, André-Schmutz I, Fischer A (2013) Haematopoietic stem cell transplantation for SCID patients: where do we stand? *Br.J.Haematol.* 160 (2): 146-152

(23) Chen C, Busson M, Rocha V, Appert ML, Lepage V, Dulphy N, et al. (2006) Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant.* 38 (6): 437-444

(24) Chen Y, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci Ö, Gure AO, Tsang S, et al. (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences Bd* 94 (5): 1914-1918

(25) Cook M, Briggs D, Craddock C, Mahendra P, Milligan D, Fegan C, et al. (2006) Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* 107 (3): 1230-1232

- (26) Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Jr, Crawford JM, et al. (1996) An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88 (8): 3230-3239
- (27) Cornelissen JJ, Breems D, van Putten WLJ, Gratwohl AA, Passweg JR, Pabst T, et al. (2012) Comparative Analysis of the Value of Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With Monosomal Karyotype Versus Other Cytogenetic Risk Categories. *Journal of Clinical Oncology* 30 (17): 2140-2146
- (28) Dallas MH, Triplett B, Shook DR, Hartford C, Srinivasan A, Laver J, et al. (2013) Long-Term Outcome and Evaluation of Organ Function in Pediatric Patients Undergoing Haploidentical and Matched Related Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 19 (5): 820-830
- (29) Daniele N, Scerpa MC, Caniglia M, Ciammetti C, Rossi C, Bernardo ME, et al. (2012) Overview of T-cell depletion in haploidentical stem cell transplantation. *Blood Transfus.* 10 (3): 264-272
- (30) Eapen M, Rocha V, Sanz G, Scaradavou A, Zhang M, Arcese W, et al. (2010) Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *The Lancet Oncology* 11 (7): 653-660
- (31) Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100 (6): 1935-1947
- (32) Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W (1996) The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells* 14 (5): 473-489
- (33) Ferrara JL, Reddy P (2006) Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin.Hematol.* 43 (1): 3-10
- (34) Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* 373 (9674): 1550-1561
- (35) Fielding AK (2011) Current Treatment of Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *ASH Education Program Book* 2011 (1): 231-237
- (36) Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C (2001) Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat.Med.* 7 (7): 789-794
- (37) Fowler DH, Gress RE (2000) Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma. *Leuk.Lymphoma* 38 (3-4): 221-234
- (38) Garrido F, Algarra I, Garcia-Lora AM (2010) The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions. *Cancer Immunol.Immunother.* 59 (10): 1601-1606

- (39) Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ (2001) Acute graft-vs-host disease: Pathobiology and management. *Exp.Hematol.* 29 (3): 259-277
- (40) Goldman J (1995) Peripheral blood stem cells for allografting [editorial] [see comments]. *Blood* 85 (6): 1413-1415
- (41) Goodwin EC, DiMaio D (2000) Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (23): 12513-12518
- (42) Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA, Van Rood JJ (1976) Alloimmunity to human H-Y. *Lancet.* 308 (7996): 1206
- (43) Goulmy E (1996) Human minor histocompatibility antigens. *Curr.Opin.Immunol.* 8 (1): 75-81
- (44) Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J (2013) Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe. *Curr.Opin.Hematol.* 20 (6): 485-493
- (45) Gyurkocza B, Storb R, Storer BE, Chauncey TR, Lange T, Shizuru JA, et al. (2010) Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *J.Clin.Oncol.* 28 (17): 2859-2867
- (46) Hambach L, Nijmeijer BA, Aghai Z, Schie ML, Wauben MH, Falkenburg JH, et al. (2006) Human cytotoxic T lymphocytes specific for a single minor histocompatibility antigen HA-1 are effective against human lymphoblastic leukaemia in NOD/scid mice. *Leukemia* 20 (2): 371-374
- (47) Hamidieh AA, Hamidi Z, Nedaeifard L, Heshmat R, Alimoghaddam K, Larijani B, et al. (2013) Changes of bone density in pediatric patients with beta-thalassemia major after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Arch.Iran.Med.* 16 (2): 88-92
- (48) Harris AC, Ferrara JLM, Levine JE (2013) Advances in predicting acute GVHD. *Br.J.Haematol.* 160 (3): 288-302
- (49) Hashii Y, Sato-Miyashita E, Matsumura R, Kusuki S, Yoshida H, Ohta H, et al. (2012) WT1 peptide vaccination following allogeneic stem cell transplantation in pediatric leukemic patients with high risk for relapse: successful maintenance of durable remission. *Leukemia* 26 (3): 530-532
- (50) Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL (1997) Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 90 (8): 3204-3213
- (51) Hill GR, Teshima T, Rebel VI, Krijanovski OI, Cooke KR, Brinson YS, et al. (2000) The p55 TNF- α Receptor Plays a Critical Role in T Cell Alloreactivity. *The Journal of Immunology* 164 (2): 656-663

(52) Ho VT, Soiffer RJ (2001) The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 98 (12): 3192-3204

(53) Hoepfl J, Miething C, Grundler R, Gotze KS, Peschel C, Duyster J (2002) Effects of imatinib on bone marrow engraftment in syngeneic mice. *Leukemia* 16 (9): 1584-1588

(54) Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Noreen HJ, Kempenich JH, et al. (2009) The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 73 (2): 95-170

(55) Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. (1990) Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75 (3): 555-562

(56) Huang W, Li H, Gao C, Bo J, Wang Q, Zhao Y, et al. (2012) Unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical peripheral blood stem cell transplantation for high-risk hematologic malignancies. *Transfusion* 52 (6): 1354-1362

(57) Huang XJ (2008) Current status of haploidentical stem cell transplantation for leukemia. *J.Hematol.Oncol.* 1: 27-8722-1-27

(58) Keilholz U, Letsch A, Busse A, Asemussen AM, Bauer S, Blau IW, et al. (2009) A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* 113 (26): 6541-6548

(59) Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. (1990) Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76 (12): 2462-2465

(60) Kolb H, Schattenberg A, Goldman J, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, et al. (1995) Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia [see comments]. *Blood* 86 (5): 2041-2050

(61) Kono K, Salazar-Onfray F, Petersson M, Hansson J, Masucci G, Wasserman K, et al. (1996) Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur.J.Immunol.* 26 (6): 1308-1313

(62) Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, et al (2009) Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: Systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA* 301 (22): 2349-2361

(63) Kotsiou E, Davies JK (2013) New ways to separate Graft-versus-Host Disease and Graft-versus-Tumour effects after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br.J.Haematol.* 160 (2): 133-145

- (64) Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Charriol O, Airiau M, et al. (1999) Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res.* 27 (19): 3792-3798
- (65) Krivit W (2004) Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of lysosomal and peroxisomal metabolic diseases. *Springer Semin.Immunopathol.* 26 (1-2): 119-132
- (66) Kropshofer H, Vogt AB, Thery C, Armandola EA, Li BC, Moldenhauer G, et al. (1998) A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 17 (11): 2971-2981
- (67) Kurtzberg J, Prasad VK, Carter SL, Wagner JE, Baxter-Lowe LA, Wall D, et al. (2008) Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. *Blood* 112 (10): 4318-4327
- (68) Landsverk OJB, Bakke O, Gregers TF (2009) MHC II and the Endocytic Pathway: Regulation by Invariant Chain. *Scand.J.Immunol.* 70 (3): 184-193
- (69) Langrehr JM, White DA, Hoffman RA, Simmons RL (1993) Macrophages produce nitric oxide at allograft sites. *Ann.Surg.* 218 (2): 159-166
- (70) Lapidot T, Petit I (2002) Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp.Hematol.* 30 (9): 973-981
- (71) Laster SM, Wood JG, Gooding LR (1988) Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *The Journal of Immunology* 141 (8): 2629-2634
- (72) Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, et al. (2010) Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant.* 45 (2): 219-234
- (73) Manzo T, Hess Michelini R, Basso V, Ricupito A, Chai J, Simpson E, et al. (2011) Concurrent Allorecognition Has a Limited Impact on Posttransplant Vaccination. *The Journal of Immunology* Bd 186 (3): 1361-1368
- (74) Marijt E, Wafelman A, van der Hoorn M, van Bergen C, Bongaerts R, van Luxemburg-Heijs S, et al. (2007) Phase I/II feasibility study evaluating the generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte lines for treatment of patients with relapsed leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 92 (1): 72-80
- (75) Marijt WA, Heemskerk MH, Kloosterboer FM, Goulmy E, Kester MG, van der Hoorn MA, et al. (2003) Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100 (5): 2742-2747
- (76) Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. (2005) Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens* 65 (4): 301-369

- (77) Martino R, Iacobelli S, Brand R, Jansen T, van Biezen A, Finke J, et al. (2006) Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 108 (3): 836-846
- (78) Maslak PG, Dao T, Gomez M, Chanel S, Packin J, Korontsvit T, et al. (2008) A pilot vaccination trial of synthetic analog peptides derived from the BCR-ABL breakpoints in CML patients with minimal disease. *Leukemia* 22 (8): 1613-1616
- (79) Matzinger P (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296 (5566): 301-305
- (80) Meerpohl JJ, Antes G, Rucker G, Fleeman N, Motschall E, Niemeyer CM, et al. (2012) Deferasirox for managing iron overload in people with thalassaemia. *Cochrane Database Syst.Rev.* 2: CD007476
- (81) Mellor A (1986) The class I MHC gene family in mice. *Immunol.Today* Bd 7 (1): 19-24
- (82) Miller JP, Perry EH, Price TH, Bolan Jr. CD, Karanes C, Boyd TM, et al. (2008) Recovery and Safety Profiles of Marrow and PBSC Donors: Experience of the National Marrow Donor Program. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 14 (9, Supplement): 29-36
- (83) Miyara M, Sakaguchi S (2007) Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol.Med.* 13 (3): 108-116
- (84) Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, et al. (2000) Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat.Med.* 6 (9): 1018-1023
- (85) Mulanovich VE, Jiang Y, de Lima M, Shpall EJ, Champlin RE, Ciurea SO (2011) Infectious complications in cord blood and T-cell depleted haploidentical stem cell transplantation. *Am.J.Blood Res.* 1 (1): 98-105
- (86) Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A, et al. (2003) Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat.Immunol.* 4 (2): 154-160
- (87) Mutis T, Blokland E, Kester M, Schrama E, Goulmy E (2002) 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* 100 (2): 547-552
- (88) Nielsen JS, McNagny KM (2008) Novel functions of the CD34 family. *Journal of Cell Science* 121 (22): 3683-3692
- (89) Nishimori H, Maeda Y, Tanimoto M (2013) Chronic graft-versus-host disease: disease biology and novel therapeutic strategies. *Acta Med.Okayama* 67 (1): 1-8

- (90) Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, et al. (2004) Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (38): 13885-13890
- (91) Oshita C, Takikawa M, Kume A, Miyata H, Ashizawa T, Iizuka A, et al. (2012) Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: phase II clinical trial. *Oncol.Rep.* 28 (4): 1131-1138
- (92) Palma J, Salas L, Carrión F, Sotomayor C, Catalán P, Paris C, et al. (2012) Haploidentical stem cell transplantation for children with high-risk leukemia. *Pediatric Blood & Cancer* 59 (5): 895-901
- (93) Panjarian S, Iacob RE, Chen S, Engen JR, Smithgall TE (2013) Structure and dynamic regulation of Abl kinases. *J.Biol.Chem.* 288 (8): 5443-5450
- (94) Passweg JR, Baldomero H, Gratwohl A, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, et al. (2012) The EBMT activity survey: 1990-2010. *Bone Marrow Transplant.* 47 (7): 906-923
- (95) Passweg JR, Baldomero H, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, et al. (2013) Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. *Bone Marrow Transplant.* 48 (9): 1161-1167
- (96) Pidala J, Kim J, Schell M, Lee SJ, Hillgruber R, Nye V, et al. (2013) Race/ethnicity affects the probability of finding an HLA-A, -B, -C and -DRB1 allele-matched unrelated donor and likelihood of subsequent transplant utilization. *Bone Marrow Transplant.* 48 (3): 346-350
- (97) Poschke I, Mougiakakos D, Kiessling R (2011) Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol.Immunother.* 60 (8): 1161-1171
- (98) Prati D (2000) Benefits and complications of regular blood transfusion in patients with beta-thalassaemia major. *Vox Sang.* 79 (3): 129-137
- (99) Randolph SSB, Gooley TA, Warren EH, Appelbaum FR, Riddell SR (2004) Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 103 (1): 347-352
- (100) Rezvani K, Yong AS, Mielke S, Jafarpour B, Savani BN, Le RQ, et al. (2011) Repeated PR1 and WT1 peptide vaccination in Montanide-adjuvant fails to induce sustained high-avidity, epitope-specific CD8+ T cells in myeloid malignancies. *Haematologica* 96 (3): 432-440
- (101) Rezvani K, Yong ASM, Mielke S, Savani BN, Musse L, Superata J, et al. (2008) Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood* 111 (1): 236-242

(102) Rice J, Dunn S, Piper K, Buchan SL, Moss PA, Stevenson FK (2006) DNA Fusion Vaccines Induce Epitope-Specific Cytotoxic CD8+ T Cells against Human Leukemia-Associated Minor Histocompatibility Antigens. *Cancer Research* 66 (10): 5436-5442

(103) Rosenmayr A, Pointner-Prager M, Mitterschiffthaler A, Bozic L, Pelzmann B, Tuchler H, et al. (2012) What are a patient's current chances of finding a matched unrelated donor? Twenty years' central search experience in a small country. *Bone Marrow Transplant.* 47 (2): 172-180

(104) Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. (1999) Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 94 (1): 333-339

(105) Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Capanni M, Carotti A, Aloisi T, et al. (2008) NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 40 (1): 84-90

(106) Saber W, Opie S, Rizzo JD, Zhang MJ, Horowitz MM, Schriber J (2012) Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia. *Blood* 119 (17): 3908-3916

(107) Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63 (6): 1129-1136

(108) Servais S, Baron F, Beguin Y (2011) Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) after reduced intensity conditioning. *Transfusion Apheresis Sci.* 44 (2): 205-210

(109) Shimoni A, Nagler A (2011) Optimizing the conditioning regimen for allogeneic stem-cell transplantation in acute myeloid leukemia; dose intensity is still in need. *Best Pract.Res.Clin.Haematol.* 24 (3): 369-379

(110) Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E (1985) Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315 (6020): 550-554

(111) Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C (2000) Therapeutic Relevance of CD34 Cell Dose in Blood Cell Transplantation for Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology* 18 (6): 1360-1377

(112) Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241 (4861): 58-62

(113) Stam K, Heisterkamp N, Reynolds FH,Jr, Groffen J (1987) Evidence that the *phl* gene encodes a 160,000-dalton phosphoprotein with associated kinase activity. *Mol.Cell.Biol.* 7 (5): 1955-1960

(114) Stelljes M, Specht C, Albring J, Volkmann S, Schlosser V, Pauels HG, et al. (2007) Differential requirement for a cellular type-1 immune response in tumor-associated versus alloantigen-targeted GvT effects. *Transplantation* 83 (3): 314-322

(115) Stelljes M, Strothotte R, Pauels H, Poremba C, Milse M, Specht C, et al. (2004) Graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation induces a CD8+ T cell-mediated graft-versus-tumor effect that is independent of the recognition of alloantigenic tumor targets. *Blood* 104 (4): 1210-1216

(116) Stelljes M, Beelen DW, Braess J, Sauerland MC, Heinecke A, Berning B, et al. (2011) Allogeneic transplantation as post-remission therapy for cytogenetically high-risk acute myeloid leukemia: landmark analysis from a single prospective multicenter trial. *Haematologica* 96 (7): 972-979

(117) Storb RF, Champlin R, Riddell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH (2001) Non-Myeloablative Transplants for Malignant Disease. *ASH Education Program Book 2001* (1): 375-391

(118) Susanto O, Trapani JA, Brasacchio D (2012) Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens* 80 (6): 477-487

(119) Takami A (2013) The role of non-HLA gene polymorphisms in graft-versus-host disease. *Int.J.Hematol.* 98 (3): 309-318

(120) Tanaka J, Asaka M, Imamura M (2000) T-cell co-signalling molecules in graft-versus-host disease. *Ann.Hematol.* 79 (6): 283-290

(121) Tarhini AA, Leng S, Moschos SJ, Yin Y, Sander C, Lin Y, et al. (2012) Safety and immunogenicity of vaccination with MART-1 (26-35, 27L), gp100 (209-217, 210M), and tyrosinase (368-376, 370D) in adjuvant with PF-3512676 and GM-CSF in metastatic melanoma. *J.Immunother.* 35 (4): 359-366

(122) The MHC sc (1999) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401 (6756): 921-923

(123) Tuncer HH, Rana N, Milani C, Darko A, Al-Homsi SA (2012) Gastrointestinal and hepatic complications of hematopoietic stem cell transplantation. *World J.Gastroenterol.* 18 (16): 1851-1860

(124) Vago L, Perna SK, Zanussi M, Mazzi B, Barlassina C, Stanghellini MTL, et al. (2009) Loss of Mismatched HLA in Leukemia after Stem-Cell Transplantation. *N.Engl.J.Med.* 361 (5): 478-488

(125) van Burik JH, Carter SL, Freifeld AG, High KP, Godder KT, Papanicolaou GA, et al. (2007) Higher Risk of Cytomegalovirus and Aspergillus Infections in Recipients of T Cell-Depleted Unrelated Bone Marrow: Analysis of Infectious Complications in Patients Treated with T Cell Depletion Versus Immunosuppressive Therapy to Prevent Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 13 (12): 1487-1498

(126) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, van den Eynde B, et al. (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 (5038): 1643-1647

- (127) Verheyden S, Schots R, Duquet W, Demanet C (2005) A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 19 (8): 1446-1451
- (128) Verheyden S, Demanet C (2008) NK cell receptors and their ligands in leukemia. *Leukemia* 22 (2): 249-257
- (129) Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM (2003) Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu.Rev.Med.* 54: 29-52
- (130) Wang X, Li H, Matte-Martone C, Cui W, Li N, Tan HS, et al. (2011) Mechanisms of antigen presentation to T cells in murine graft-versus-host disease: cross-presentation and the appearance of cross-presentation. *Blood* 118 (24): 6426-6437
- (131) Wang YC, Morrison G, Gillihan R, Guo J, Ward RM, Fu X, et al. (2011) Different mechanisms for resistance to trastuzumab versus lapatinib in HER2-positive breast cancers--role of estrogen receptor and HER2 reactivation. *Breast Cancer Res.* 13 (6): R121
- (132) Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, et al. (2010) Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood* 115 (19): 3869-3878
- (133) Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. (1979) Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N.Engl.J.Med.* 300 (19): 1068-1073
- (134) White RE, Wade-Martins R, Hart SL, Frampton J, Huey B, Desai-Mehta A, et al. (2003) Functional delivery of large genomic DNA to human cells with a peptide-lipid vector. *J.Gene Med.* 5 (10): 883-892
- (135) Wolschke C, Zabelina T, Ayuk F, Alchalby H, Berger J, Klyuchnikov E, et al. (2014) Effective prevention of GVHD using in vivo T-cell depletion with anti-lymphocyte globulin in HLA-identical or -mismatched sibling peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 49 (1): 126-130
- (136) Woolfrey A, Lee SJ, Gooley TA, Malkki M, Martin PJ, Pagel JM, et al. (2010) HLA-allele matched unrelated donors compared to HLA-matched sibling donors: role of cell source and disease risk category. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 16 (10): 1382-1387
- (137) Woolfrey A, Anasetti C (1999) Allogeneic hematopoietic stem-cell engraftment and graft failure. *Pediatr.Transplant.* 3: 35-40
- (138) Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS (2005) Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 105 (11): 4191-4199

Literaturverzeichnis

(139) Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB (1994) Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* 83 (8): 2360-2367

(140) Yi T, Chen Y, Wang L, Du G, Huang D, Zhao D, et al. (2009) Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood* 114 (14): 3101-3112

(141) Yu H, Huang X, Liu X, Jin H, Zhang G, Zhang Q, et al. (2013) Regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells contribute to the immune escape of papillary thyroid cancer coexisting with multinodular non-toxic goiter. *Endocrine* 44 (1): 172-181

Lebenslauf


6 Lebenslauf

Danksagung

7 Danksagung

8 Anlagen

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Gegen Empfangsbekanntnis
Herrn
Dr. med. Matthias Stelljes
Medizinische Klinik und Poliklinik A
Domagkstr. 9a
48129 Münster

Auskunft erteilt:
Herr Skoff
Direktwahl 02361/305-3478
Fax 02361/305-3439
poststelle@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen
9.93.2.10.36.07.196
bei Antwort bitte angeben
Ihre Nachricht vom:
Ihr Aktenzeichen:

Tierschutz
Durchführung von Tierversuchen; Genehmigung gem. § 8 Tierschutzgesetz
Ihr Antrag vom 10.07.2007
Mein Schreiben vom 26.11.2007, Ihre E-Mail vom 01.12.2007

Datum: 05.12.2007

Hauptsitz:
Leibnizstraße 10
45659 Recklinghausen
Telefon 02361 305-0
Fax 02361 305-3215
poststelle@lanuv.nrw.de
www.lanuv.nrw.de

Sehr geehrter Herr Dr. Stelljes,

Dienstgebäude:
Hauptsitz Recklinghausen

auf Grund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Bekanntmachung der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206) erteile ich Ihnen unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Tierversuches

Öffentliche Verkehrsmittel:
Ab Recklinghausen Hbf mit Buslinie 236 bis Haltestelle "Siemensstraße" oder mit Buslinie 235 bis Haltestelle "Blitzkuhlenstraße" und 10 Min. Fußweg in Richtung Trabrennbahn bis Siemensstraße

„Untersuchungen zur Kontrolle von Tumortoleranz und -immunität durch das proinflammatorische Mikromilieu und der Interaktion von spender-gegen-Tumor-Interaktion nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation“

Ihrem Genehmigungsantrag entsprechend obliegt die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens folgenden Personen:

Bankverbindung:
Landeskasse Düsseldorf
Konto-Nr.: 41 000 12
West LB AG
(BLZ 300 500 00)
BIC-Code: WELADED
IBAN-Code: DE 41 3005 0000 0004 1000 12

Verantwortlicher Leiter: Herr Dr. Matthias Stelljes
Stellvertretender Leiter: Herr Dr. med. Christian Scheffold

Diese Genehmigung ist für die Dauer von 24 Monaten ab dem 05.12.2007 befristet bis zum

31.12.2009.

Die Genehmigung wird unter den folgenden Bedingungen erteilt und mit folgenden Auflagen verbunden:

Seite 2 / 05.12.2007

1.

Für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens darf folgende Tierart in folgender Anzahl verwendet werden:

1922 Mäuse

2.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgt in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Medizinischen Fakultät der Universität Münster.

Es ist ein Tierbestandsbuch zu führen. Sie haben über die Herkunft und den Verbleib der Tiere Aufzeichnungen zu machen und diese drei Jahre lang aufzubewahren.

3.

An der Durchführung des Tierversuchsvorhabens dürfen neben dem Leiter und dem Stellvertreter des Versuchsvorhabens folgende Personen beteiligt werden:

Frau Dipl.-Biochem. Sarah Völkmann

Frau Dipl.-Biol. Verena Schlösser

Frau Dipl.-Biol. Corinna Opitz

4.

- a) Für die Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes sowie der hier erteilten Auflagen ist der/die in dieser Genehmigung bezeichnete Leiter/in des Tierversuchsvorhabens oder der/die in dieser Genehmigung bezeichnete Vertreter/in verantwortlich (§ 9 Abs. 3 TierSchG).
- b) Jeder beabsichtigte Wechsel der Versuchsleiter- oder Stellvertreterposition ist dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW unverzüglich anzuzeigen (§ 8 Abs. 4 Satz 2 TierSchG).

5.

- a) Diese Genehmigung gilt nur für die Art, Durchführung und Dauer der Eingriffe oder Behandlungen im Umfang des von Ihnen schriftlich beantragten Tierversuchsvorhabens.
- b) Änderungen genehmigter Versuchsvorhaben sind dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW anzuzeigen (§ 8a Abs. 7 Satz 2 TierSchG).

6.

- a) Der Widerruf dieser Genehmigung kann erfolgen, wenn gegen eine der Bedingungen oder eine der Auflagen dieser Genehmigung verstoßen wird.
- b) Die Durchführung des Tierversuchsvorhabens wird gemäß § 8a Abs. 5 TierSchG untersagt, wenn Tierversuche entgegen tierschutzrechtlicher Bestimmungen durchgeführt werden oder wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer gesetzten Frist abgeholfen wird.

7.

Natürliche und juristische Personen und nicht rechtsfähige Personenvereinigungen haben der zuständigen Behörde auf Verlangen die Auskünfte zu erteilen, die zur Durchführung der der Behörde durch das Tierschutzgesetz übertragenen Aufgaben erforderlich sind, § 16 Abs. 2 TierSchG. Der Inhaber dieser Genehmigung ist auskunftspflichtig nach § 16 Abs. 3 Satz 2 TierSchG und hat die mit der Überwachung beauftragten Personen zu unterstützen.

8.

Die Kennzeichnungen der Käfige oder Einrichtungen, in denen Versuchstiere gehalten werden, sind mit dem zuständigen beamteten Tierarzt abzustimmen.

9.

Ist ein Transport der Versuchstiere zwischen Operations- und Tierhaltungsraum unvermeidbar, so ist dafür Sorge zu tragen, dass mit Hilfe geeigneter Behältnisse dieser Transport so durchgeführt wird, dass negative Beeinflussungen durch äußere Einflüsse (z. B. Witterung, Lärm etc.) ausgeschlossen sind. Es ist insbesondere darauf zu achten, dass die Tiere keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann nunmehr innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist schriftlich bei mir, dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW; Leibnizstraße 10, 45659 Recklinghausen, einzulegen oder dort zur Niederschrift zu erklären. Falls die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden sollte, würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Hinweise:

Seite 4 / 05.12.2007

1.

Diese Genehmigung ist zeitlich bis zum dem o. g. Termin befristet.

Hierzu werden folgende Hinweise gegeben:

- a) Vor Ablauf der Genehmigungsfrist ist ggf. der Abschluss des Tierversuchsvorhabens mitzuteilen.
- b) Sollte das Tierversuchsvorhaben innerhalb des zeitlichen Genehmigungsrahmens noch nicht abgeschlossen sein, ist rechtzeitig vor Ende der Genehmigungsfrist – über den zuständigen Tierschutzbeauftragten – ein Antrag auf Verlängerung des Tierversuchsvorhabens zu stellen.
- c) Sollte die Absicht bestehen, nach Abschluss dieses Versuches einen gleichen oder ähnlichen Versuch durchzuführen, weise ich schon jetzt darauf hin, dass mit den erneuten Antragsunterlagen gleichzeitig ein zusammenfassender Ergebnisbericht über das jetzt genehmigte Versuchsvorhaben vorzulegen ist.

2.

Auf die Einhaltung der allgemeinen Vorschriften des Tierschutzgesetzes in Bezug auf die Haltung, Betreuung, Ernährung und Pflege der Versuchstiere (§ 2 TierSchG) sowie der Vorschriften für die Durchführung von Tierversuchsvorhaben (§§ 9 und 9a TierSchG) i. V. m. den Straf- und Bußgeldvorschriften der §§ 17 bis 20 TierSchG wird hingewiesen.

3.

Evtl. erforderliche Ausnahmegenehmigungen nach dem Tierschutzgesetz (§ 9 Abs. 1 und Abs. 2 Nr. 7) oder anderen gesetzlichen Bestimmungen bleiben von dieser Genehmigung unberührt.

4.

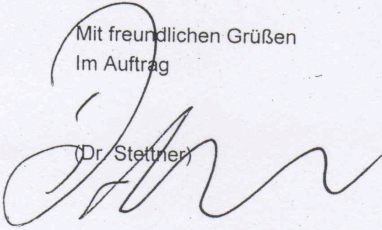
Wer Tierversuche nach § 7 Abs. 1 TierSchG an Wirbeltieren durchführt, ist nach der Verordnung über die Meldung zu Versuchszwecken oder zu bestimmten anderen Zwecken verwendeter Wirbeltiere vom 4. November 1999 (BGBl. I S. 2156) - Versuchstiermeldeverordnung – verpflichtet, der zuständigen Behörde für jedes Kalenderjahr bis zum 31. März des folgenden Jahres Meldungen nach dem Muster der Anlage zur Versuchstiermeldeverordnung zu erstatten. Zuständige Behörde nach § 1 der Verordnung über Zuständigkeiten auf dem Gebiet des Tierschutzrechts (GV. NW. S. 508) ist hier die Kreisordnungsbehörde.

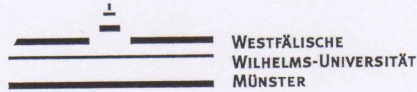
Dieser Bescheid ist nicht gebührenpflichtig.

Bitte geben Sie bei Änderungsanzeigen, Rückfragen oder sonstigen Ergänzungen stets das Aktenzeichen: **9.93.2.10.36.07.196** an.

Es wird empfohlen, allen an der Tierversuchsdurchführung beteiligten Personen diese Genehmigung zur Kenntnis zu geben.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag


(Dr. Stettner)



Universitätsklinikum Münster • Medizinische Klinik und Poliklinik A
48129 Münster

LANUV NRW
Postfach 10 10 52
45610 Recklinghausen

Medizinische Klinik und Poliklinik A

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Berdel

Albert-Schweitzer-Straße 33
48149 Münster

**KMT-Zentrum,
Domagkstr. 9A, 48149 Münster**

Durchwahl: (02 51) 83 – 52801
Fax: (02 51) 83 – 52804

Vermittlung: (02 51) 83 – 0

Münster, 11.12.2009

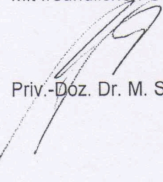
Verlängerung Tierversuchsgenehmigung
9.93.2.10.36.07.196

Sehr geehrte Damen und Herren,
sehr geehrter Herr Dr. Stettner,

Wir bitten um Verlängerung der Tierversuchsgenehmigung, die bis 31.12.2009 gilt um ein Jahr bis 31.12.2010. Aufgrund von Umbauarbeiten in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Medizinischen Fakultät der Universität Münster bis 2009, die mit einer starken Lärmbelastung verbunden waren, hatten wir eine deutlich geringere Nachkommenzahl in den Mauszuchten. Große Versuchsansätze haben wir deshalb nicht durchführen können, zumal die Lärmbelastung auch zu Stress bei den Mäusen führt, der die Versuchsergebnisse beeinflusst.

Außerdem sollten folgende Labormitarbeiter auch an den Tierversuchsvorhaben beteiligt werden: Christine Baumgart, Felix Rosenow, Ricarda Saßmannshausen, Jennifer Urh. Die Teilnahmebestätigungen für den Versuchstierkudkurs legen wir bei.

Mit freundlichen Grüßen



Priv.-Doz. Dr. M. Stelljes

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn
Dr. med. Matthias Stelljes
Medizinische Klinik und Poliklinik A
Domagkstr. 9a
48129 Münster

Auskunft erteilt:
Herr Skoff
Direktwahl 02361/305-3478
Fax 02361/305-3439
FB87-TSchutz@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen
9.93.2.10.36.07.196
bei Antwort bitte angeben
Ihre Nachricht vom:
Ihr Aktenzeichen:

Datum: 16.12.2009

Hauptsitz:
Leibnizstraße 10
45659 Recklinghausen
Telefon 02361 305-0
Fax 02361 305-3215
poststelle@lanuv.nrw.de
www.lanuv.nrw.de

Tierschutz

Durchführung von Tierversuchen; Genehmigung gem. § 8 Tierschutzgesetz
Ihr Schreiben vom 11.12.2009, eingegangen am 15.12.2009

**„Untersuchungen zur Kontrolle von Tumortoleranz und -immunität durch
das proinflammatorische Mikromilieu und der Interaktion von spender-
gegen-Tumor-Interaktion nach allogener hämatopoetischer Stammzell-
transplantation“**

Dienstgebäude:
Hauptsitz Recklinghausen

Sehr geehrter Herr Dr. Stelljes,

antragsgemäß genehmige ich die Verlängerung des o.g. Versuchsverfahrens
bis zum 31.12.2010.

Dieses Schreiben ist Bestandteil meiner Genehmigungsverfügung vom
05.12.2007.

Öffentliche Verkehrsmittel:
Ab Recklinghausen Hbf mit
Buslinie 236 bis Haltestelle
"Siemensstraße" oder mit Busli-
nie 235 bis Haltestelle "Blitzkuh-
lenstraße" und 10 Min. Fußweg
in Richtung Trabrennbahn bis
Siemensstraße

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

(D. Skoff)

Bankverbindung:
Landeskasse Düsseldorf
Konto-Nr.: 41 000 12
West LB AG
(BLZ 300 500 00)
BIC-Code: WELADED3333
IBAN-Code: DE 41 3005
0000 0004 1000 12

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn
Dr. med. Matthias Stelljes
Medizinische Klinik und Poliklinik A
Domagkstr. 9a
48129 Münster

Auskunft erteilt:
Herr Skoff
Direktwahl 02361/305-3478
Fax 02361/305-3439
FB87-TSchutz@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen
9.93.2.10.36.07.196
bei Antwort bitte angeben
Ihre Nachricht vom:
Ihr Aktenzeichen:

Tierschutz
Durchführung von Tierversuchen; Genehmigung gem. § 8 Tierschutzgesetz
Ihr Schreiben vom 10.11.2010; eingegangen am 12.11.2010

Datum: 17.11.2010

**„Untersuchungen zur Kontrolle von Tumortoleranz und -immunität durch
das proinflammatorische Mikromilieu und der Interaktion von spender-
gegen-Tumor-Interaktion nach allogener hämatopoetischer Stammzell-
transplantation“**

Hauptsitz:
Leibnizstraße 10
45659 Recklinghausen
Telefon 02361 305-0
Fax 02361 305-3215
poststelle@lanuv.nrw.de
www.lanuv.nrw.de

Sehr geehrter Herr Dr. Stelljes,

Dienstgebäude:
Hauptsitz Recklinghausen

antragsgemäß genehmige ich die Verlängerung des o.g. Versuchsverfahrens
letztmalig um ein Jahr bis zum 31.12.2011.

Dieses Schreiben ist Bestandteil meiner Genehmigungsverfügung vom
05.12.2007.

Öffentliche Verkehrsmittel:
Ab Recklinghausen Hbf mit
Buslinie 236 bis Haltestelle
"Siemensstraße" oder mit Busli-
nie 235 bis Haltestelle "Blitzkuh-
lenstraße" und 10 Min. Fußweg
in Richtung Trabrenn-bahn bis
Siemensstraße

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

(Dr. Dagmar Hieronymus)

Bankverbindung:
Landeskasse Düsseldorf
Konto-Nr.: 41 000 12
West LB AG
(BLZ 300 500 00)
BIC-Code: WELADED
IBAN-Code: DE 41 3005
0000 0004 1000 12

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn
Prof. Dr. Matthias Stelljes
Medizinische Klinik und Poliklinik A
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Campus 1, A 12
48149 Münster

Auskunft erteilt:
Frau Kuckartz
Direktwahl 02361/305-3501
Fax 02361/305-3439
fachbereich84@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen
84-02.04.2012.A037
bei Antwort bitte angeben
Ihre Nachricht vom:
Ihr Aktenzeichen:

Tierversuchsvorhaben;

Genehmigung gem. § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz in der Bekanntmachung der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206) in der z.Zt. gültigen Fassung

Ihr Antrag vom 02.02.2012, eingegangen am 09.02.2012

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Stelljes,

auf Grund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) erteile ich Ihnen unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Tierversuches

„GvT-Reaktionen in murinen Modellen“.

Ihrem Genehmigungsantrag entsprechend obliegt die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens folgenden Personen:

Verantwortlicher Leiter: Prof. Dr. med. Matthias Stelljes
Stellvertretender Leiter: Dr. rer. nat. Dipl.-Biologin Karin Frebel

Diese Genehmigung ist für die Dauer von **36** Monaten ab dem 10.07.2012 befristet bis zum

31.07.2015

Datum: 10.07.2012

Hauptsitz:
Leibnizstraße 10
45659 Recklinghausen
Telefon 02361 305-0
Fax 02361 305-3215
poststelle@lanuv.nrw.de
www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:
Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:
Ab Recklinghausen Hbf mit
Buslinie 236 bis Haltestelle
"Siemensstraße" und 5 Min.
Fußweg oder mit Buslinie SB 20
bis Haltestelle "Hohenhorster
Weg" und 15 Min. Fußweg in
Richtung Trabrennbahn bis
Leibnizstraße

Bankverbindung:
Landeskasse Düsseldorf
Konto-Nr.: 41 000 12
West LB AG
(BLZ 300 500 00)
BIC-Code: WELADED
IBAN-Code: DE 41 3005
0000 0004 1000 12

Die Genehmigung wird unter den folgenden Bedingungen erteilt und mit folgenden Auflagen verbunden: Seite 2 / 4

1.
Für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens darf folgende Tierart in folgender Anzahl verwendet werden:

Mäuse : 3.198

2.
Die Haltung der Versuchstiere erfolgt in **der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Medizinischen Fakultät der Universitätsklinik Münster.**

Es ist ein Tierbestandsbuch zu führen. Sie haben über die Herkunft und den Verbleib der Tiere Aufzeichnungen zu machen und diese drei Jahre lang aufzubewahren.

3.
An der Durchführung des Tierversuchsvorhabens dürfen neben dem Leiter und dem Stellvertreter des Versuchsvorhabens folgende Personen beteiligt werden:

- **Frau Dr. Corinna Opitz**
- **Frau Stella Roberts**
- **Frau Alessia Grabowski**
- **Frau Claudia Dahrenmöller**
- **Frau Jennifer-Marie Urh**

Die bezeichneten Personen dürfen ausschließlich die im Genehmigungsantrag aufgeführten Eingriffe oder Behandlungen im Rahmen der zulässigen Verantwortlichkeitsstufe durchführen.

Personen, die Eingriffe und Behandlungen innerhalb des Versuchsvorhabens durchführen sollen und die Voraussetzungen nach § 9 Abs. 1 Satz 2 und 3 des TierSchG nicht erfüllen, dürfen erst nach Erteilung einer Ausnahmegenehmigung gem. § 9 Abs. 1 Satz 4 des TierSchG eingesetzt werden.

4.

Seite 3 /

- a) Für die Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes sowie der hier erteilten Auflagen ist der/die in dieser Genehmigung bezeichnete Leiter/in des Tierversuchsvorhabens oder der/die in dieser Genehmigung bezeichnete Vertreter/in verantwortlich (§ 8 Abs. 3 TierSchG).
- b) Jeder beabsichtigte Wechsel der Versuchsleiter- oder Stellvertreterposition ist dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW unverzüglich anzuzeigen (§ 8 Abs. 4 Satz 2 TierSchG).

5.

- a) Diese Genehmigung gilt nur für die Art, Durchführung und Dauer der Eingriffe oder Behandlungen im Umfang des von Ihnen schriftlich beantragten Tierversuchsvorhabens.
- b) Änderungen genehmigter Versuchsvorhaben sind dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW anzuzeigen (§ 8a Abs. 7 Satz 2 TierSchG).

6.

- a) Der Widerruf dieser Genehmigung kann erfolgen, wenn gegen eine der Bedingungen oder eine der Auflagen dieser Genehmigung verstoßen wird.
- b) Die Durchführung des Tierversuchsvorhabens wird gemäß § 8a Abs. 5 TierSchG untersagt, wenn Tierversuche entgegen tierschutzrechtlicher Bestimmungen durchgeführt werden oder wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer gesetzten Frist abgeholfen wird.

7.

Natürliche und juristische Personen und nicht rechtsfähige Personenvereinigungen haben der zuständigen Behörde auf Verlangen die Auskünfte zu erteilen, die zur Durchführung der der Behörde durch das Tierschutzgesetz übertragenen Aufgaben erforderlich sind, § 16 Abs. 2 TierSchG. Der Inhaber dieser Genehmigung ist auskunftspflichtig nach § 16 Abs. 3 Satz 2 TierSchG und hat die mit der Überwachung beauftragten Personen zu unterstützen.

8.

Die Kennzeichnungen der Käfige oder Einrichtungen, in denen Versuchstiere gehalten werden, sind mit dem zuständigen beamteten Tierarzt abzustimmen.

9.
Ist ein Transport der Versuchstiere zwischen Operations- und Tierhaltungsraum unvermeidbar, so ist dafür Sorge zu tragen, dass mit Hilfe geeigneter Behältnisse dieser Transport so durchgeführt wird, dass negative Beeinflussungen durch äußere Einflüsse (z. B. Witterung, Lärm etc.) ausgeschlossen sind. Es ist insbesondere darauf zu achten, dass die Tiere keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann nunmehr innerhalb eines Monats nach Zustellung Klage erhoben werden. Die Klage ist schriftlich vor dem **Verwaltungsgericht Münster, Piusallee 38, 48147 Münster;(Postfach 80 48, 48043 Münster)** einzureichen, oder zur Niederschrift beim Urkundsbeamten der Geschäftsstelle zu erklären.

Hinweise:

1.

Diese Genehmigung ist zeitlich bis zum dem o. g. Termin befristet.

Hierzu werden folgende Hinweise gegeben:

- a) Vor Ablauf der Genehmigungsfrist ist ggf. der Abschluss des Tierversuchsvorhabens mitzuteilen.
- b) Sollte das Tierversuchsvorhaben innerhalb des zeitlichen Genehmigungsrahmens noch nicht abgeschlossen sein, ist rechtzeitig vor Ende der Genehmigungsfrist – über den zuständigen Tierschutzbeauftragten – ein Antrag auf Verlängerung des Tierversuchsvorhabens zu stellen.
- c) Sollte die Absicht bestehen, nach Abschluss dieses Versuches einen gleichen oder ähnlichen Versuch durchzuführen, weise ich schon jetzt darauf hin, dass mit den erneuten Antragsunterlagen gleichzeitig ein zusammenfassender Ergebnisbericht über das jetzt genehmigte Versuchsvorhaben vorzulegen ist.

2.

Auf die Einhaltung der allgemeinen Vorschriften des Tierschutzgesetzes in Bezug auf die Haltung, Betreuung, Ernährung und Pflege der Versuchstiere (§ 2 TierSchG) sowie der Vorschriften für die Durchführung von Tierversuchsvorhaben (§§ 9 und 9a TierSchG) i. V. m. den Straf- und Bußgeldvorschriften der §§ 17 bis 20 TierSchG wird hingewiesen.

3.
Evtl. erforderliche Ausnahmegenehmigungen nach dem Tierschutzgesetz (§ 9 Abs. 1 Satz 4 und Abs. 2 Nr. 7) oder anderen gesetzlichen Bestimmungen bleiben von dieser Genehmigung unberührt.

4.
Wer Tierversuche nach § 7 Abs. 1 TierSchG an Wirbeltieren durchführt, ist nach der Verordnung über die Meldung zu Versuchszwecken oder zu bestimmten anderen Zwecken verwendeter Wirbeltiere vom 4. November 1999 (BGBl. I S. 2156) - Versuchstiermeldeverordnung – verpflichtet, der zuständigen Behörde für jedes Kalenderjahr bis zum 31. März des folgenden Jahres Meldungen nach dem Muster der Anlage zur Versuchstiermeldeverordnung zu erstatten. Zuständige Behörde nach § 1 der Verordnung über Zuständigkeiten auf dem Gebiet des Tierschutzrechts (GV. NW. S. 508) ist hier die Kreisordnungsbehörde.

Dieser Bescheid ist nicht gebührenpflichtig.

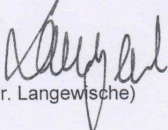
Bitte geben Sie bei Änderungsanzeigen, Rückfragen oder sonstigen Ergänzungen stets das Aktenzeichen

84-02.04.2012.A037 an.

Es wird empfohlen, allen an der Tierversuchsdurchführung beteiligten Personen diese Genehmigung zur Kenntnis zu geben.

Der Tierschutzbeauftragte (Herr Dr. Martin Lücke) und die zuständige Kreisordnungsbehörde erhalten eine Durchschrift dieser Genehmigung.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag


(Dr. Langewische)