

**Die Bedeutung von Interleukin-7 für die hämatopoetische
Rekonstitution nach Knochenmarktransplantation**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Oliver Feyen

aus Emmerich, jetzt Emmerich am Rhein

Düsseldorf

2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Referent: Prof. Dr. Ulrich Göbel
2. Korreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn
3. Korreferent: PD Dr. Tim Niehues

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2004

Diese Arbeit ist meiner lieben Familie gewidmet;
und allen Kindern, deren viel zu kurzes Leben zu Arbeiten motiviert.

I. Einleitung	1
1.1. Die Biologie von Interleukin 7 (IL-7)	1
1.1.1. Gen und Struktur des IL-7	1
1.1.2. IL-7 produzierende Zellen	1
1.1.3. Der IL-7 Rezeptor	1
1.1.4. Phänotyp der IL-7 ^{-/-} Maus	2
1.1.5. IL-7 ähnliche Zytokine.....	3
1.2. Effekte von IL-7 auf Zellen des Immunsystems.....	3
1.2.1. Thymozyten und Vorläufer T-Zellen	3
1.2.2. Konventionelle T-Zellen (CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen)	5
1.2.3. Unkonventionelle T-Zellen	6
1.2.3.1. DN T-Zellen und NKT-Zellen	6
1.2.3.2. TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen	6
1.2.4. B-Zellen.....	7
1.2.5. NK-Zellen	8
1.2.6. Granulozyten und Monozyten	8
1.3. IL-7 als Regulator der Immunrestitution nach KMT	8
1.3.1. Mechanismen der T-Zellrestitution.....	8
1.3.2. Konzentrationsanstieg von IL-7 in Patienten ohne T-Zellen.....	9
1.3.3. Exogenes IL-7: Effekte von supraphysiologischen IL-7 Konzentrationen auf die Immunrestitution (Präklinische Studien).....	9
1.4. Vorarbeiten: Generierung einer Interleukin-7 defizienten Mauslinie.....	10
II. Fragestellung	12
III. Versuchstiere, Material und Methoden	16
Versuchstiere	16
3.1. Mauslinien.....	16
3.1.1. C57BL/6.....	16
3.1.2. C57BL/6 ; 129 ^{tmIL-7}	16
Materialien	16
3.2. Chemikalien	16
3.3. Enzyme	16
3.4. Stämme, Plasmide und Medien.....	17
3.4.1. Bakterienstamm zur Amplifikation der IL-7 cDNA-Sonde.....	17
3.4.2. Prokaryotische Klonierungsvektoren.....	17
3.4.3. Medien zur Anzucht der Bakterienstämme.....	17
3.5. Synthetische Oligonukleotide für den Nachweis von IL-7 cDNA.....	18
3.6. Zellkulturmedien	18
3.7. Antibiotika für den Einsatz in Mäusen	18
3.8. Ganzchromosom-Sonden zur Detektion der Geschlechtschromosomen.....	19
3.9. Monoklonale, fluoreszenzmarkierte Antikörper	19
3.10. Sonstiges	20

Methoden	20
3.11. Versuchstiere: Haltung und Zucht	20
3.11.1. Haltungseinrichtung.....	20
3.11.2. Einstreu.....	21
3.11.3. Temperaturbereich.....	21
3.11.4. Relative Luftfeuchte.....	21
3.11.5. Beleuchtung.....	21
3.11.6. Trinkwasser.....	21
3.11.7. Futtermittel.....	21
3.12. Etablierung einer C57BL/6 IL-7 ^{-/-} Mauslinie	22
3.12.1. Rückkreuzung von IL-7 ^{-/-} Mäusen in den Stamm C57BL/6	22
3.12.2. Embryonentransfer zur Sanierung von Tieren.....	23
3.12.3. Dokumentation der Rückkreuzungen.....	23
3.13. Molekularbiologische Techniken zur Validierung des IL-7 Genotyps in C57BL/6 IL-7 ^{+/+} und C57BL/6 IL-7 ^{-/-} Mäusen	24
3.13.1. Transformation von Bakterien mittels Elektroporation.....	24
3.13.2. Isolierung von Nukleinsäuren.....	24
3.13.2.1. Plasmid-Midi- und Maxipräparation	24
3.13.2.2. Isolierung von genomischer DNA	24
3.13.3. Spezifischer Nachweis von IL-7 DNA (Genom-Analysen)	24
3.13.3.1. Southern Blotting (Transfer von DNA auf Nylonmembranen).....	24
3.13.3.1.1. Herstellung der radioaktiv markierten IL-7 cDNA Sonde, ‚random primed‘ Methode.....	25
3.13.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.14. Transplantationsprotokoll.....	27
3.14.1. Klinische Überwachung der Tiere während der gesamten Versuchszeit	28
3.14.1.1. Gewichtsbestimmung	28
3.14.1.2. Mikrobiologische Analyse von Stuhlproben	28
3.14.1.3. Tötung von Versuchstieren.....	28
3.14.2. Vorphase (Tag -7 bis Tag 0).....	29
3.14.2.1. Beginn der Antibiotikabehandlung der Tiere	29
3.14.2. Konditionierung (Tag -1).....	30
3.14.3. Transplantation von Knochenmark (Tag 0).....	30
3.14.3.1. Transplantat: Knochenmarkentnahme, -Aufbereitung und -Zusammensetzung.....	30
3.14.3.2. Transplantation des Knochenmarks	31
3.14.3.3. Bestrahlungskontrollen	32
3.14.3.4. Syngenes Transplantationsmodell: Einteilung der Versuchstiere in Versuchsgruppen mit vier unterschiedlichen Transplantations-Konstellationen.....	32
3.14.4. Posttransplantationsphase (Tag+1 bis Tag+140)	35
3.14.4.1. Kapillarblutabnahme	35
3.14.4.2. Gesamtleukozytenzahlbestimmung nach Neubauer	35
3.14.4.3. Differentialblutbild (Färbung nach Pappenheim)	35
3.14.4.4. Chimärismusanalyse mittels Fluoreszenz- <i>In Situ</i> -Hybridisierung (FISH) der Geschlechtschromosomen.....	36
3.14.4.5. Durchflußzytometrie	37
3.14.4.5.1. Antikörper-Färbung und gewählte Kombinationen	38
3.14.4.5.2. FACS-Messung	39
3.14.4.6. Pathologie der verstorbenen oder getöteten Tiere.....	39
3.15. Datenanalyse und Statistik	40
3.15.1. Datenanalyse und Definitionen.....	40
3.15.2. Statistik	41

IV. Ergebnisse.....	42
4.1. Beschreibung des syngen KMT-Modells	42
4.1.1. Rückkreuzung der Mäuse auf den Stamm C57BL/6	42
4.1.2. IL-7 Genotypisierung der rückgekreuzten Mäuse.....	42
4.1.3. Phänotypisierung der rückgekreuzten Tiere: Ausgangswerte der IL-7 ^{+/+} und IL-7 ^{-/-} Empfänger vor Transplantation.....	44
4.1.4. Die Anzahl der $\alpha\beta$ T-Zellrezeptoren auf den T-Zellen der IL-7 ^{+/+} und IL-7 ^{-/-} Empfänger vor Transplantation	45
4.2. Nachweis der Aplasiogenität und Letalität der Konditionierung.....	46
4.3. Nachweis der Anwesenheit der Spender-Zellen (Spender-Engraftment).....	47
4.4. Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmark-Transplantates.....	48
4.5. Einfluß von IL-7 auf das Überleben von transplantierten Mäusen.....	51
4.5.1. Überleben der transplantierten Tiere bis Tag+140 nach KMT	51
4.5.2. Todesursachen der verstorbenen transplantierten Tiere bis Tag+140.....	52
<i>Einfluß von IL-7 auf die myelomonozytäre und lymphozytäre Rekonstitution</i>	57
4.6. Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger	57
4.6.1. Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Monozyten	57
4.6.2. Lymphozyten.....	58
4.6.3. T-Zellen.....	59
4.6.3.1. CD4 ⁺ -Zellen	60
4.6.3.1.1. Naive CD4 ⁺ -Zellen.....	61
4.6.3.1.2. Gedächtnis CD4 ⁺ -Zellen	62
4.6.3.2. CD8 ⁺ -Zellen	62
4.6.3.2.1. Naive CD8 ⁺ -Zellen.....	64
4.6.3.2.2. Gedächtnis CD8 ⁺ -Zellen	65
4.6.3.3. DN T-Zellen	66
4.6.4. B-Zellen.....	68
4.6.5. NK-Zellen und NKT-Zellen.....	69
4.7. Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat.....	72
4.7.1. Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Monozyten	72
4.7.2. Lymphozyten.....	73
4.7.3. T-Zellen.....	74
4.7.3.1. CD4 ⁺ -Zellen	75
4.7.3.1.1. Naive und Gedächtnis CD4 ⁺ -Zellen.....	76
4.7.3.2. CD8 ⁺ -Zellen	76
4.7.3.2.1. Naive und Gedächtnis CD8 ⁺ -Zellen.....	77
4.7.3.3. DN T-Zellen	77
4.7.4. B-Zellen.....	79
4.7.5. NK-Zellen und NKT-Zellen.....	79
4.8. Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger und im Transplantat	82
4.8.1. Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Monozyten	82
4.8.2. Lymphozyten.....	82
4.8.3. T-Zellen.....	83
4.8.3.1. CD4 ⁺ -Zellen	84
4.8.3.1.1. Naive und Gedächtnis CD4 ⁺ -Zellen.....	85
4.8.3.2. CD8 ⁺ -Zellen	86
4.8.3.2.1. Naive und Gedächtnis CD8 ⁺ -Zellen.....	86
4.8.3.3. DN T-Zellen	87
4.8.4. B-Zellen.....	88
4.8.5. NK-Zellen und NKT-Zellen.....	89

V. Diskussion.....	91
5.1. Der Phänotyp der C57BL/6 IL-7 ^{-/-} Mauslinie: Fehlen von reifen B-Zellen und T-Zellen bei relativ erhöhtem Anteil an DN T-Zellen (TCRαβ ^{low} /CD4 ⁻ /CD8 ⁻), NK1.1 ⁺ - und TCRαβ/CD19 ⁻ /NK1.1 ⁻ -Zellen im peripheren Blut.....	91
5.2. Der Vergleich von IL-7 ^{+/+} und IL-7 ^{-/-} Knochenmark-Transplantat: weniger Sca-1 ⁺ Stammzellen und keine B-Zellen im IL-7 ^{-/-} KM, aber gleicher Gehalt an reifen T-Zellen wie im IL-7 ^{+/+} KM	93
5.3. Ergebnisse im syngenen Transplantationsmodell: Das Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger und/oder im Transplantat führt zu einem schlechteren Überleben aufgrund einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen	96
5.4. Bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger kommt es zu einer zügigen Rekonstitution von DN T-Zellen, die Rekonstitution reifer CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen sowie von B-Zellen bleibt aber aus	98
5.5. Bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat kommt es zu einer Verzögerung der Rekonstitution von DN T-Zellen und NK-Zellen in der frühen Posttransplantationsphase..	102
5.6. Letal bestrahlte IL-7 ^{-/-} Mäuse können nach KMT ohne IL-7 überleben und zeigen eine teilweise Immunrekonstitution	103
5.7. Mögliche klinische Bedeutung der Ergebnisse	105
VI. Zusammenfassung	108
VII. Abkürzungsverzeichnis.....	109
VIII. Literaturverzeichnis	110

I. Einleitung

1.1. Die Biologie von Interleukin 7 (IL-7)

1.1.1. Gen und Struktur des IL-7

Das humane IL-7 Gen ist auf Chromosom 8q12-13 lokalisiert, umfaßt 6 Exone und hat ein offenes Leseraster von 534 Basenpaaren (entspricht 177 Aminosäuren) ⁽³⁹⁾. Das murine IL-7 Gen liegt auf Chromosom 3 und beinhaltet 5 Exone. Die Homologie zwischen der humanen und der murinen IL-7 Sequenz beträgt für die kodierende Region 81%. Humanes IL-7 hat eine molekulare Größe von 25 kDa, und wird als Typ 1 Kurzketten-Zytokin der Familie der Hämatopoetine zugeordnet. Zu dieser Gruppe gehören auch IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15, GM-CSF („granulocyte macrophage colony stimulating factor‘), M-CSF und der Stammzellefaktor (SCF).

1.1.2. IL-7 produzierende Zellen

Interleukin-7 wird bei Säugern von MHC Klasse II positiven, epithelialen Stromazellen (CD106⁺/CD117^{low}) hauptsächlich im Knochenmark und im Thymus, aber auch von einer Vielzahl anderer Stromazellen gebildet ^(72; 93). Weitere Produktionsorte sind das intestinale Epithel ⁽⁴⁴⁾, Keratinozyten ⁽³⁰⁾, die fötale ⁽²⁵⁾ und die adulte Leber ⁽²³⁾, dendritische Zellen ^(14; 80) sowie folliculäre Dendritische Zellen ⁽³⁵⁾. Dendritische Zellen, die von Knochenmark abstammen, scheinen nur sehr geringe Mengen an IL-7 zu produzieren ⁽⁴²⁾. Die Bestimmung des Gehalts an IL-7 mRNA in unterschiedlichen Geweben führte zu der Erkenntnis, dass Lymphozyten selbst kein Interleukin-7 produzieren ⁽⁵⁾.

1.1.3. Der IL-7 Rezeptor

Der IL-7 Rezeptor (IL-7R) besteht aus zwei Komponenten: Der „gemeinsamen Zytokin-Gamma-Kette“ (γ c-chain), die ubiquitär auf allen lymphatischen Zellen zu

finden ist ^(5; 33; 59; 98), und der IL-7 Rezeptor alpha-Kette (IL-7R α oder CD127), die auf frühen prä-B-Zellen und unreifen B-Zellen identifiziert wird, aber auch auf Thymozyten sowie reifen, (noch) nicht aktivierten T-Zellen ^(4; 84). Zur Signalübertragung über den IL-7R werden beide Komponenten (γ c und IL-7R α) benötigt; intrazellulär läuft die Aktivierung über Jak/STAT, Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) und eine Tyrosin-Kinase. Die Signalübertragung verläuft im Menschen und in der Maus identisch. Der IL-7R α wird außerdem noch von dem IL-7 ähnlichen Zytokin TSLP (thymic stromal-derived lymphopoietin') als Bindungsstelle benutzt ^(18; 49; 64; 65; 70; 78). Mutationen im γ c-Teil ⁽¹⁰⁾ führen beim Menschen zum schweren kombinierten Immundefekt: SCID (severe combined immune deficiency'). Den Patienten mit dieser Erkrankung fehlen die T- und NK-Zellen, sie verfügen jedoch über B-Zellen. Liegt die Mutation im IL-7R α , so fehlen lediglich die T-Zellen. IL-7 scheint somit im humanen System für die B-Zellentwicklung nicht absolut notwendig zu sein ⁽⁶⁹⁾, für die B-Zellentwicklung im murinen System ist es jedoch unabdingbar (s.u.).

1.1.4. Phänotyp der IL-7^{-/-} Maus

Ein wichtiger Schritt bei der Charakterisierung der Biologie von IL-7 im murinen Modell war die Inaktivierung des IL-7 Gens durch Gentransfer in die murine Keimbahn und Züchtung der daraus resultierenden IL-7^{-/-} Mäuse von Von Freeden *et al.* ⁽⁹²⁾. IL-7^{-/-} Mäuse weisen sowohl im peripheren Blut als auch in den lymphatischen Organen eine starke Lymphopenie auf. Die B-Lymphopoese im Knochenmark ist zwischen dem Reifungsschritt von der pro-B- zur prä-B-Zelle geblockt. Der Anteil der B-Zellen in der Milz ist nicht nur reduziert, er zeigt in adulten Tieren auch eine abnorme Population an unreifen B-Zellen (s.u.). Die Gesamtlymphozytenzahl in der Milz der IL-7^{-/-} Maus ist um das 10fache reduziert. Die Lymphozyten der Milz zeigen eine normale Antwort nach Mitogen-Stimulation. Die Anzahl der T-Zellen im Thymus ist um das 20-fache gegenüber den IL-7^{+/+} reduziert, jedoch ist die CD4⁺/CD8⁺ Ratio normal. Nachdem *in vitro* die essentielle Bedeutung von IL-7 für die

Reifung junger Thymozyten erkannt wurde ⁽¹³⁾, ergaben Analysen von Thymozyten-Subpopulationen bei IL-7^{-/-} Mäusen eine partielle Inhibierung der Differenzierung mit einer gleichzeitigen Akkumulation der „Triple-Negativen“ (TN)-Thymozyten ⁽⁴⁹⁾. Die Ursachen des Reifungsstops auf Thymozytenebene sind allerdings noch nicht genau identifiziert. Die Daten aus der IL-7^{-/-} Maus weisen daraufhin, dass eine vollständige B- und T-Zellentwicklung von der Anwesenheit von IL-7 abhängig ist. Es wird postuliert, dass IL-7 für die Lymphopoese nicht redundant ist ⁽⁹²⁾.

1.1.5. IL-7 ähnliche Zytokine

Die Akkumulation verschieden weit entwickelter T-Zellphänotypen in der IL-7^{-/-} Maus und der IL-7R α ^{-/-} Maus darauf hin, dass andere Moleküle bei der frühen T-Zellentwicklung den IL-7R α mitbenutzen müssen. So wird der IL-7R α außerdem noch von dem IL-7 ähnlichen Zytokin TSLP (‘thymic stromal-derived lymphopoietin’) als Bindungsstelle benutzt (s.o.). Weitere Synergien bei der Reifung sich entwickelnder B-Zellen erzielt IL-7 zusammen mit SDF-1 (‘stromal derived factor’, auch CXCR12 genannt), oder auch mit SCF (‘stem cell factor’, auch c-kit Ligand genannt), die ebenfalls an den IL-7R α binden ^(47; 57). Die Kombination von IL-7 mit flt3 Ligand führt *in vitro* zu einer starken Expansion von B-Zellen ⁽⁵³⁾. Desweiteren können IL-7 und flt3 Ligand die Bildung von B-Zellen innerhalb des Thymus unterstützen ⁽⁴⁶⁾. Es erscheint daher möglich, dass Faktoren wie SDF-1, SCF oder auch flt3 Ligand bei der Regulation der B- und T-Zellentwicklung mit IL-7 zusammenarbeiten.

1.2. Effekte von IL-7 auf Zellen des Immunsystems

1.2.1. Thymozyten und Vorläufer T-Zellen

Die Entwicklung der T-Zellen im Thymus durchläuft eine Vielzahl an Schritten. Zu Anfang der positiven und negativen Selektion im Thymus sind die unreifen Thymozyten als Tripel-Negative (TN) Thymozyten mit dem Oberflächenprofil

CD3/CD4/CD8⁻ gekennzeichnet. Ihre weitere Reifung ist dann an der An- bzw. Abwesenheit der Marker CD44 und CD25 abzulesen: T1-Zellen sind CD44⁺/CD25⁻, die folgenden T2-Zellen sind CD44⁺/CD25⁺, die T3-Zellen tragen CD44⁻/CD25⁺, um dann als T4-Zelle CD44⁻/CD25⁻ zu sein. Darauf gehen sie in das CD4⁺/CD8⁺ Doppelt-Positive (DP) Stadium über, um schließlich zu CD4⁺ oder CD8⁺ Einfach-Positiven (EP) Thymozyten zu werden, die auch die reifen T-Zellen enthalten. 98% aller T-Vorläuferzellen werden durch Apoptose im Rahmen der negativen Selektion eliminiert. Die Reifung von Thymozyten ist vor allem von der Bereitstellung von Wachstumsfaktoren durch Epithelzellen (Stromazellen), aber auch Dendritischer Zellen, Fibroblasten sowie eine Reihe weiterer Zelltypen abhängig. IL-7 wird im Thymus schon in 13 Tage alten murinen Embryonen nachgewiesen, zeitgleich mit einer ersten Ausschüttung von Thymozyten⁽⁹³⁾.

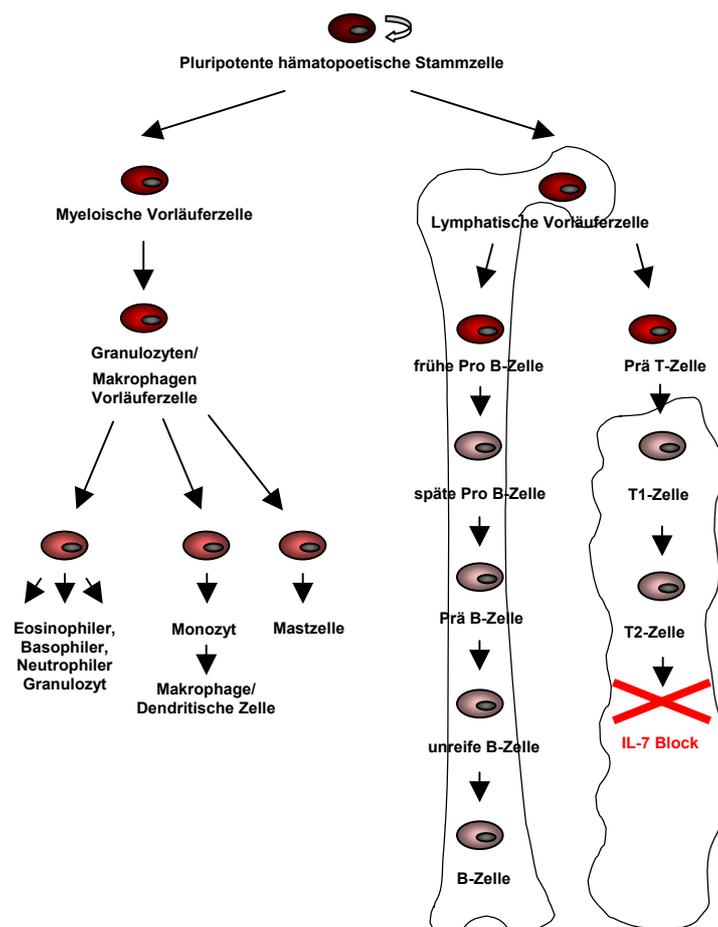


Diagramm 1: Schematische Darstellung der gestörten T-Zellentwicklung im Thymus der IL-7^{-/-} Maus. Durch das Fehlen von IL-7 wird im Thymus die Weiterentwicklung von der T2-Zelle (CD44⁺/CD25⁺) zur T3-Zelle (CD44⁻/CD25⁺) blockiert. Die Entwicklung der monomyeloischen Reihe (auf der linken Seite dargestellt) findet ebenfalls im Knochenmark statt.

Von Freedon-Jeffry *et al.* zeigten 1997, dass in T1-Zellen (CD44⁺/CD25⁻, s.o. Diagramm 1) oder in den TNs der IL-7^{-/-} Maus der Apoptoseinhibitor bcl-2 deutlich erniedrigt vorliegt, was mit einer vermehrten Apoptose dieser Zellen einhergeht ⁽⁹¹⁾. Die antiapoptotische Wirkung von IL-7 schließt auch bax mit ein, ein Mitglied der proapoptotischen Familie ⁽³²⁾. Es wird daher angenommen, dass eine Hauptaufgabe des IL-7 innerhalb des Thymus in der Apoptosemodulation mit Hilfe der bcl-2 Familie besteht.

Nach dem Einwandern der Vorläuferzellen in die subkapsuläre Zone des Thymus fördert IL-7 die Selektion der TN-Vorläufer durch antiapoptotische Signale. Diese über den IL-7R α vermittelte Überlebenssignale scheinen eine wichtige Rolle während der T-Zellrezeptor-Bildungsphase zu spielen. Die auf den DP-Thymozyten runterregulierte Expression der IL-7R α -Kette läßt die Annahme zu, dass IL-7 in diesem Stadium weniger von Bedeutung ist. In der EP-Phase wird die Expression der IL-7R α -Kette auf der Oberfläche wieder hochreguliert. Der Einfluß von IL-7 auf diese reifen EP-Zellen wird im Folgenden vorgestellt.

1.2.2. Konventionelle T-Zellen (CD4⁺- und CD8⁺-Zellen)

IL-7 dient als Kostimulus bei der Aktivierung reifer T-Zellen, indem es die Proliferation und die Zytokinproduktion steigert. Außerdem steigert IL-7 die Expression des Chemokin-Rezeptors CXCR4, der von einem Teil der Gedächtnis CD4⁺-Zellen exprimiert wird ⁽³¹⁾. Dieser Rezeptor spielt beim Homing der T-Zellen in die lymphatischen Gewebe auf Grund seiner Bindung mit SDF-1 (CXCL12) eine wichtige Rolle. Des weiteren stellt IL-7 auch für reife T-Zellen durch Hochregulation der bcl-2 Moleküle ein Überlebenssignal dar ^(8; 20; 88). IL-7 sichert in Langzeitkulturen das Überleben von T-Zellen ⁽⁴⁰⁾.

IL-7 ist für die Entwicklung von Gedächtnis T-Zellen wichtig, allerdings ist IL-15 für die Expansion von Gedächtnis T-Zellen ebenfalls von größerer Bedeutung ⁽⁷⁵⁾.

1.2.3. Unkonventionelle T-Zellen

1.2.3.1. DN T-Zellen und NKT-Zellen

Durch *in vitro* Stimulation mit IL-7 proliferieren humane Doppeltnegative T-Zellen (DN T-Zellen; TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^-$ /CD8 $^-$) stark ⁽⁸³⁾. Ihre exakte biologische Funktion ist unklar; so wird ihnen im murinen Modell die Befähigung zugeschrieben, Autoimmunprozesse (durch Apoptoseinduktion syngener CD8 $^+$ -Zellen) ^(82; 96) und Transplantationsfolgen (durch Verhindern von Abstoßungsreaktionen) ⁽⁹⁵⁾ zu regulieren. Außerdem sind sie in der Lage, die Generierung von zytotoxischen CD8 $^+$ -Zellen überhaupt zu inhibieren ⁽⁷¹⁾. Ihre Herkunft ist unklar. Reife murine CD8 $^+$ -Zellen, die durch die Anwesenheit hoher Dosen an IL-4 aktiviert werden, ändern ihren Phänotyp in den der DN T-Zellen ⁽¹⁵⁾. Andere Studien schlagen eine extrathymische Herkunft vor: Knochenmark ⁽⁶³⁾, Appendix ⁽⁹⁴⁾ oder die Leber ⁽⁷⁷⁾, bzw. sehen sogar in TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen die Vorläufer ⁽¹⁹⁾. Eine Subpopulation der DN T-Zellen exprimiert zusätzlich den NK1.1 $^+$ -Oberflächenmarker ⁽⁵⁸⁾; diese Zellen werden NKT-Zellen (Natürliche Killer T-Zellen) genannt. Untersuchungen an der IL-7 $^{-/-}$ Maus zeigen, dass sich die NKT-Zellen unabhängig von IL-7 normal entwickeln, jedoch funktionell die Freisetzung des von diesem Zelltyp sezernierten IL-4 reduziert ist. Durch exogene Gaben an IL-7 lässt sich jedoch die Produktion von IL-4 wieder erhöhen ⁽⁹⁰⁾.

1.2.3.2. TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen

IL-7 scheint unerlässlich für die Entwicklung der TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen zu sein. In unterschiedlichen IL-7R $\alpha^{-/-}$ Mausstämmen konnten keine TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen nachgewiesen werden ^(28; 45). Obwohl die TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellentwicklung vorherrschend im Thymus stattfindet, wird davon ausgegangen, dass es auch eine extrathymische TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellentwicklung im Intestinum gibt ⁽³⁸⁾. Die Expression von transgenem IL-7 im intestinalen Epithel von IL-7 $^{-/-}$ Mäusen führte zur Wiederherstellung einer extrathymischen TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellentwicklung. So spielt IL-7 eine essentielle Rolle bei der Generierung aus dem Thymus stammender TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen sowie extrathymischer TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen ⁽³⁶⁾.

1.2.4. B-Zellen

1988 wurde die Eigenschaft von IL-7 entdeckt, das Wachstum unreifer B-Lymphozyten zu induzieren (24; 36; 51; 52). In der IL-7^{-/-} Maus wurde ein Entwicklungsstopp von der Pro-B-Zelle zur Prä-B-Zelle identifiziert (92); in der IL-7Rα^{-/-} Maus ist mit der Prä-Pro-B-Zelle sogar eine noch frühere Phase betroffen (67). Desweiteren konnte in eben diesem Stadium der IL-7 induzierten Reifung die Wichtigkeit des Kontaktes mit Stromazellen nachgewiesen werden, da in Abwesenheit von Stromazellen *in vitro* eine Reifungsstopp der B-Zellen gezeigt werden konnte (26; 27).

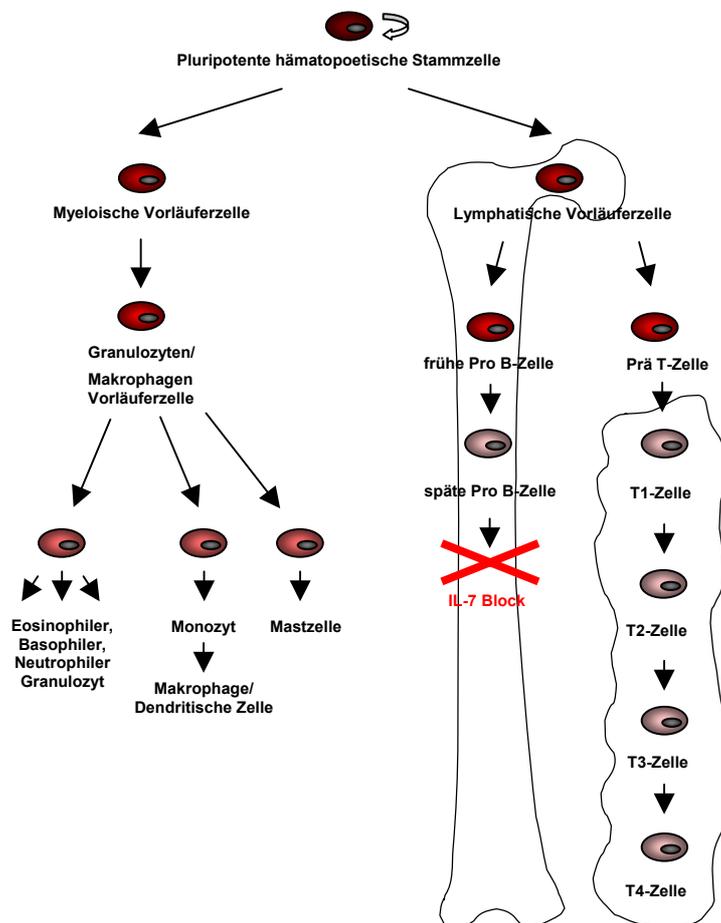


Diagramm 2: Schematische Darstellung der gestörten B-Zellentwicklung im Knochenmark der IL-7^{-/-} Maus. Durch das Fehlen von IL-7 wird im Knochenmark die Weiterentwicklung von der späten Pro B-Zelle zur Prä B-Zelle blockiert. Die Entwicklung der monomyeloischen Reihe (auf der linken Seite dargestellt) findet ebenfalls im Knochenmark statt.

IL-7 nimmt auf reife B-Zellen keinen Einfluß ⁽¹¹⁾. Trotz des Entwicklungsstopps von der Pro-B-Zelle zur Prä-B-Zelle (s.o.) können reife B-Zellen in der IL-7^{-/-} Maus nachgewiesen werden. Es handelt sich um Marginalzonen B-Zellen und B1-Zellen, die bereits fötal im Peritoneum gebildet werden. Es wird postuliert, dass sie sich in der IL-7^{-/-} Maus auch ohne IL-7 im weiteren Verlauf durch periphere Expansion erhalten können ⁽¹¹⁾.

1.2.5. NK-Zellen

Die Natürlichen Killer (NK-) Zellen (NK1.1⁺) entstehen ebenfalls aus lymphatischen Vorläuferzellen. Sie sind, anders als T- und B-Zellen, auch in immundefizienten sowie athymischen Mäusen zu finden (NOD/SCID Mäuse, Nacktmäuse). Ihre Entwicklung wird hauptsächlich von IL-15 beeinflusst ⁽⁹⁰⁾, wohingegen IL-7 keinen Einfluß zu haben scheint. Sowohl IL-7^{-/-} als auch IL-7R^{-/-} Mäuse haben normale NK-Zellzahlen.

1.2.6. Granulozyten und Monozyten

Der Einfluß von IL-7 auf myeloische und erythroide Vorläuferzellen aus humanem Knochenmark wurde *in vitro* untersucht ⁽⁸⁹⁾. Ein Einfluß von IL-7 auf die Entwicklung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie Erythrozyten war nicht zu erkennen, allerdings stimulierte IL-7 exklusiv die eosinophilen Granulozyten zur Koloniebildung (also zur Reifung). Dies geschieht möglicherweise über die Induktion von IL-5, das insbesondere für Eosinophile den essentiellen Wachstumsfaktor darstellt.

1.3. IL-7 als Regulator der Immunrestitution nach KMT

1.3.1. Mechanismen der T-Zellrestitution

Es gibt zwei Mechanismen der T-Zellrestitution. Bei der *thymusabhängigen* T-Zellrestitution reifen transplantierte Stammzellen zu Vorläufer T-Zellen heran,

die vom Knochenmark aus in den Thymus einwandern, dort positiv selektioniert werden und den Thymus als sogenannte RTE's („recent thymic emigrants“) wieder verlassen. Bei der *thymusunabhängigen* Rekonstitution kommt es zu einer Proliferation von reifen Spender T-Zellen, die auch als *Periphere Expansion* bezeichnet wird. RTE's und proliferierende Zellen der Peripheren Expansion konkurrieren miteinander um Wachstumsfaktoren und hier insbesondere um das IL-7^(22; 42). Neben Wachstumsfaktoren haben bei der Immunrekonstitution nach Knochenmarktransplantation (KMT) Alter, Konditionierung, transplantierte Zellzahl, Infektionen und Auftreten von GvH („graft yesus host“) einen Einfluß auf die T-Zellrekonstitution^(12; 43).

1.3.2. Konzentrationsanstieg von IL-7 in Patienten ohne T-Zellen

In Situationen, in denen T-Zellen depletiert werden, z.B. nach Konditionierung für die KMT, oder bei Patienten, die eine Chemotherapie erhalten, sowie bei HIV-Infizierten mit CD4⁺-Depletion, werden erhöhte IL-7 Spiegel gemessen^(21; 54). Daraus kann gefolgert werden, dass eine T-Zell Depletion über einen bisher unbekanntem Rückkopplungs-Mechanismus zu einer erhöhten Konzentrationen an IL-7 zu führen scheint. Erhöhte IL-7 Konzentrationen begünstigen sowohl die Periphere Expansion als auch die thymusabhängige Reifung von T-Zellen, und damit die Wiederherstellung normaler T-Zellzahlen.

1.3.3. Exogenes IL-7: Effekte von supraphysiologischen IL-7 Konzentrationen auf die Immunrekonstitution (Präklinische Studien)

Die Applikation von exogenem IL-7 nach Knochenmark-Transplantation oder cytotoxischer Chemotherapie in Mäuse führt zu einer Steigerung der T-Zell Immunrekonstitution^(7; 50). Um die Immunrekonstitution nach Depletion der T-Zellen zu fördern, wurde exogenes IL-7 in verschiedenen murinen Modellen appliziert. Nach Transplantation syngenen Knochenmarks und Applikation von IL-7 nimmt die

Größe des Thymus um das 12fache zu ⁽¹⁾, und führt im Vergleich zur Gabe von Kochsalzlösung zu einer beschleunigten Normalisierung der T-Zell-populationen und damit zu einem verbesserten Überleben ⁽⁹⁾. Außerdem wurde nach IL-7 Applikation im Anschluß an eine KMT eine vermehrte Anzahl reifer aus dem Thymus stammender T-Zellen beschrieben ⁽⁴²⁾. So ist festzuhalten, dass die Gabe von exogenem IL-7 nach bestrahlungs- oder chemotherapieinduzierter Lymphopenie die Thymopoese unterstützt.

Die meisten der genannten Untersuchungen zur T-Zellrekonstitution sind an IL-7^{+/+} Mäusen durchgeführt worden und es ist unklar, zu welchen Anteilen *endogen* produziertes und *exogen* appliziertes IL-7 zu der T-Zellrekonstitution beigetragen haben. Es ist darüber hinaus unbekannt, wie sich ein Fehlen von IL-7 im Spender bzw. im Empfänger auf die allgemeine Immunrekonstitution auswirkt, und ob eine Rekonstitution in völliger Abwesenheit von IL-7 überhaupt möglich ist. Bisher gibt es noch keine Arbeiten zur T-Zellrekonstitution in einem komplett IL-7 freien System, d.h. in einem Tiermodell, in dem kein endogen produziertes IL-7 zur Verfügung steht.

1.4. Vorarbeiten: Generierung einer Interleukin-7 defizienten Mauslinie

Im syngenem Transplantationsmodell wurde in dieser Arbeit sowohl ein IL-7 Wildtyp (IL-7^{+/+}) als Standard benötigt, als auch eine gendeletierte knockout (IL-7^{-/-}) Mutante. Die Vorarbeit dazu wurde 1994 an der Universitäts-Kinderklinik Düsseldorf von Frau Ursula von Freedon begonnen, bevor sie ihre Arbeit mit einem Teil der Tiere im DNAX-Institut in Palo Alto, Kalifornien vollendete. Die Arbeit wurde 1995 veröffentlicht ⁽⁹²⁾.

Die Generierung von transgenen IL-7^{-/-} Mutanten sieht den Einbau einer Gensequenz mittels homologer Rekombination in den entsprechenden Genabschnitt vor. Hierzu werden in der Regel bakterielle Antibiotika-Resistenz-Gene verwendet. Das häufig

genutzte Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Neo-Gen) verleiht über seine Resistenz gegen Neomycin und seinen Derivat (z.B. G418) eine Identifizierung transfizierter Klone. Der Nachweis des korrekten Einbaus erfolgt entweder unter Verwendung spezifischer Primer mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) oder durch Southern Blot Analyse (siehe 3.13.3.). Dazu müssen im Ziel-Konstrukt geeignete Restriktionsschnittstellen vorhanden sein, um durch enzymatische Reaktionen und anschließender Hybridisierungsanalyse einen Restriktionspolymorphismus zwischen IL-7^{+/+} Sequenz und homolog rekombinierter Sequenz detektieren zu können. Um die größtmögliche Homologie zwischen Ziel-Sequenz und dem IL-7 Locus zu erreichen, wurde der IL-7 Ziel-Vektor unter Verwendung genomischer DNA konstruiert, die aus einer Phagen-DNA-Bank (basierend auf dem Mausstamm 129/SV) isoliert wurde. Zwei 2,3 kb große Fragmente wurden an das 5'- und das 3'-Ende des Neomycinresistenz-Gens kloniert. Bei anschließender homologer Rekombination führt dies zu einer Deletion des Exons 4 und damit zu einer vollständigen Inaktivierung von IL-7. Nach erfolgter Transfektion embryonaler Stammzellen (ES) wurden die positiv selektionierten Klone per Southern Blot Analyse daraufhin untersucht, ob eine homologe Rekombination stattgefunden hat. Die mutierten Klone wurden in C57BL/6-Blastozysten injiziert und in pseudopregnante B6xCBA-Weibchen implantiert. Die resultierenden männlichen Chimären wurden wiederum mit C57BL/6-Weibchen verpaart ⁽⁹²⁾.

Als mit den Untersuchungen begonnen wurde, befanden sich die Mäuse im dritten Rückkreuzungs-Stadium aus dem ursprünglichen IL-7^{-/-} Stamm 129/SV in den Stammhintergrund C57BL/6 (siehe 3.12.).

II. Fragestellung

Der klinische Einsatz von Zytokinen erfordert die präzise Kenntnis ihrer biologischen Funktion (z.B. bei Transplantationen). Die Charakterisierung der biologischen Eigenschaften von Zytokinen *in vivo* ist aufgrund ihrer Pleiotropie und Redundanz schwierig. In der Originalarbeit zur Beschreibung der IL-7^{-/-} Maus wird das Paradigma vertreten, IL-7 sei ein nicht-redundantes Zytokin für die B- und T-Lymphopoese⁽⁹²⁾. Es wird gezeigt, dass IL-7 eine entscheidende Rolle bei der B- und T-Lymphopoese spielt; für die NK-Lymphopoese und die Granulopoese spielt es eine untergeordnete Rolle. Ein Mangel an IL-7 produzierenden Zellen, wie er nach Konditionierung im Rahmen einer Stammzelltransplantation entsteht, hätte damit für die Lymphopoese und die Rekonstitution des Immunsystems und das Überleben schwerwiegende Folgen. In Mausmodellen ist eine entscheidende Rolle von IL-7 für die stammzellabhängige Reifung und periphere Expansion von T-Zellen postuliert worden, und exogene Gaben von IL-7 zeigen nach Transplantationen im Mausmodell vielversprechende Ergebnisse. In dieser Arbeit wird die Rolle von endogenem IL-7 für die lymphozytäre und myelomonozytäre Rekonstitution und das Überleben nach Knochenmark-Transplantation untersucht. Dazu wird ein syngenes Maus-Transplantationsmodell geschaffen; durch Rückkreuzungen stehen IL-7^{-/-} Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund zur Verfügung. Die Verwendung der C57BL/6 Maus als Stammhintergrund hat den Vorteil, dass sie in der Literatur einen etablierten Referenzstamm darstellt, der auch schon häufig als KMT-Modell eingesetzt wurde. Abb. 1 zeigt das Modell.

Als Positivkontrolle für die physiologische Rolle von IL-7 bei der hämatopoetischen Rekonstitution dient in diesem Modell die Transplantation von IL-7^{+/+} Knochenmark (WT-KM) in IL-7^{+/+} Empfänger (Abb. 1, ▲). Das Überleben und die Rekonstitution der Lymphozyten bzw. Granulozyten in dieser Konstellation stellt den „Goldstandard“ für die Rolle von IL-7 dar, da sowohl im Transplantat als auch im Empfänger IL-7 produzierende Zellen vorhanden sind. Als Negativkontrolle für die Rolle von IL-7 bei der lympho- und myelomonozytären Rekonstitution dient die Transplantation von IL-7^{-/-} Knochenmark (ko-KM) in IL-7^{-/-} Empfänger (Abb. 1, —).

In dieser Konstellation fehlen IL-7 produzierende Zellen sowohl im Empfänger als auch im Spender; es ist also während der Transplantation *kein* IL-7 im System. Hier wird aufgrund der von Freedom-Jeffry ⁽⁹²⁾ postulierten Nicht-Redundanz von IL-7 für die Lymphopoese *nicht* mit einem Überleben der transplantierten Tiere gerechnet.

Untersuchung des Einflusses von IL-7 produzierenden Zellen auf die Rekonstitution von Lymphozyten und Granulozyten

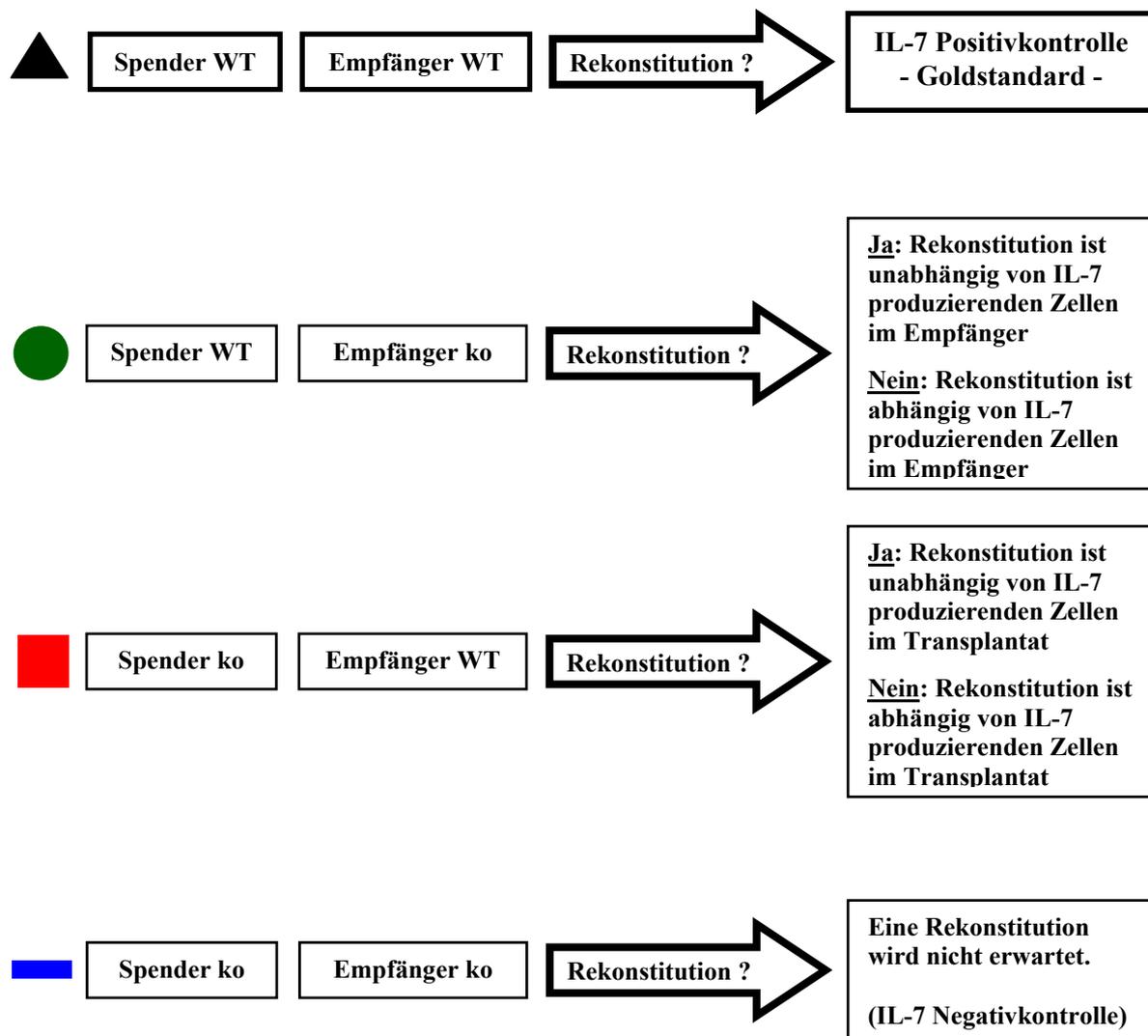


Abbildung 1: Sygenes Transplantationsmodell zur Untersuchung des Einflusses von IL-7 auf die Rekonstitution nach KMT in Bezug auf die Anwesenheit von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger. In den Diagrammen des Ergebnisteils (siehe Kap. IV) werden die Tiere des Goldstandards mit einem schwarzen Dreieck symbolisiert, IL-7^{-/-} Empfänger des IL-7^{+/+} Knochenmarks mit grünen Kreisen, IL-7^{+/+} Empfänger des IL-7^{-/-} Knochenmarks mit roten Quadraten, und die Tiere der Negativkontrolle werden mit blauen Balken dargestellt. WT bedeutet IL-7^{+/+}, ko bedeutet IL-7^{-/-}.

Wird WT-KM in IL-7^{-/-} Empfänger (ko-Empfänger) transplantiert (Abb. 1, ●) und würde eine vollständige Rekonstitution beobachtet, so wäre die Rekonstitution unabhängig von der Anwesenheit IL-7 produzierender Zellen im Empfänger. Dagegen spräche eine verzögerte oder fehlende Rekonstitution für eine Abhängigkeit der Rekonstitution von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger. Aufgrund der Daten aus der IL-7^{-/-} Maus und der Tatsache, dass IL-7 ausschließlich von nicht-hämatopoetischen Zellen produziert wird, wird in dieser Konstellation eine verzögerte Rekonstitution der T- und B-Zellen und damit ein schlechteres Überleben erwartet.

Das Modell erlaubt schließlich Aussagen im Bezug auf den Einfluß von IL-7 produzierenden Zellen im KM-Transplantat. Wird IL-7^{-/-} Knochenmark in IL-7^{+/+} Empfänger transplantiert (Abb. 1, ■) und würde eine Rekonstitution beobachtet, so wäre die Rekonstitution unabhängig von der Anwesenheit IL-7 produzierender Zellen im Transplantat. Dagegen spräche eine verzögerte oder fehlende Rekonstitution für eine Abhängigkeit der Rekonstitution von IL-7 produzierender Zellen im Transplantat. Im KM machen nicht-hämatopoetische Zellen nur einen kleinen Teil des Transplantates aus. Ob ein Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat sich auf die lymphozytäre und myelomonozytäre Rekonstitution und das Überleben negativ auswirken, erscheint zweifelhaft.

Folgende Fragen sind in der vorliegenden Arbeit zu prüfen:

Fragenkomplex I

Entspricht die in Düsseldorf vorhandene IL-7^{-/-} Maus den Qualitätsbestimmungen der ursprünglich von Frau von Freeden zur Verfügung gestellten Maus? Sind die C57BL/6 IL-7^{-/-} Mäuse lebensfähig? Kann die Hämatopoese von C57BL/6 IL-7^{-/-} Mäusen und IL-7^{+/+} Mäusen nach letaler Bestrahlung durch Infusion von syngenen

Knochenmark dauerhaft rekonstituiert werden? Voraussetzungen für das syngene KMT-Modell sind zunächst zu etablieren: Die Konditionierung des Empfängers mittels Bestrahlung ist aplasiogen und erlaubt das Anwachsen der Spenderzellen. Ohne KMT führt die Konditionierung durch die Knochenmarksaplasie zum Tod der Tiere.

Fragenkomplex II

Ist im Vergleich zum Überleben nach Transplantation von syngenen IL-7^{+/+} KM in IL-7^{+/+} Empfänger das Fehlen von IL-7 im Empfänger mit einem schlechteren Überleben nach Transplantation verbunden, während das Fehlen von IL-7 im Transplantat nicht zu einem schlechteren Überleben nach Transplantation führt? Ist bei vollständigem Fehlen von IL-7 im Empfänger und im Transplantat überhaupt ein Überleben möglich?

Fragenkomplex III

Kommt es bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger zu einer zeitlich verzögerten Rekonstitution von B- und T-Zellen, während NK-Zellen und granulozytäre Populationen eine normale Rekonstitution zeigen? Führt das Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat zu einer Verzögerung der B- und T-Zell Rekonstitution?

III. Versuchstiere, Material und Methoden

Versuchstiere

3.1. Mauslinien

3.1.1. C57BL/6

Maus Inzuchtstamm (IL-7^{+/+} Wildtyp)

3.1.2. C57BL/6 ; 129 ^{tmIL-7}

Transgene Mauslinie, z.Z. 6. Rückkreuzungsgeneration C57BL/6 x SV129 ^{tmIL-7}
(s. 3.12.1.)

Materialien

3.2. Chemikalien

Die verwendete Agarose stammt von Biozym (Hessisch Oldendorf), das LB-Medium und das LB-Fertigagar von Sigma (Deisenhofen), die May-Grünwalds-Eosin-Methylenblau-Lösung, die Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung und die Puffertabletten (Pufferlösung-pH 7,2 nach Weise) von Merck (Darmstadt), sowie DAPI von Vysis (Stuttgart)

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Life Technologies (Karlsruhe), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) oder ICN Biomedicals (Eschwege) bezogen.

3.3. Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt)
Taq-DNA-Polymerase („ <i>Taq</i> PCR Core Kit“)	Qiagen (Hilden)
RNase A	Qiagen (Hilden)

3.4. Stämme, Plasmide und Medien

3.4.1. Bakterienstamm zur Amplifikation der IL-7 cDNA-Sonde

Stamm	Genotyp	Quelle
XL1 Blue	<i>SupE44 hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac⁻ lacI^q proAB⁺ lacZΔM15 tn10 (tet^r)</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987

Tabelle 1: E. coli Stamm

3.4.2. Prokaryotische Klonierungsvektoren

Plasmid	Beschreibung, Funktion	Quelle
pBlueScript II SK ⁺	Kompetenz zur α-Komplementation, ColE1, Amp ^r , F1 origin;	Stratagene
pBlueScript II SK ⁺ IL-7	pBlueScript II SK ⁺ mit 3,1 kb <i>HindIII BamHI</i> IL-7 cDNA Fragment (IL-7 cDNA Sonde)	Freedman-Jeffrey <i>et al.</i> , 1995

Tabelle 2: Bakterienplasmide

3.4.3. Medien zur Anzucht der Bakterienstämme

LB-Flüssigmedium enthält 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt und 1% NaCl. Feste LB-Nährböden enthalten zusätzlich 2% Agar. Zur Selektion auf Zellen mit plasmidkodierter Antibiotikaresistenz wird dem Medium 100µg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Bakterien werden bei einer Temperatur von 37°C unter ständigem Schütteln bei 180 U/min kultiviert.

3.5. Synthetische Oligonukleotide für den Nachweis von *IL-7* cDNA

Die verwendeten Primer sind von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert worden.

Name	Oligonukleotidsequenz (5'→3')	T _M (°C)	T _A (°C)	Beschreibung
5'ex4S	CTG GGT GTA ACT AAG GGA CAG	64	60	5' <i>IL-7</i> Exon4
Ex4delrgnA	TTC ACT GAT ATT CAT TTT AAG A	55	51	3' <i>IL-7</i> Exon4
HSVprA	TTC GCC AAT GAC AAG ACG CTG G	68	64	3' HSV-Promotor (Positivkontrolle für den <i>IL-7</i> ^{-/-} Genotyp)

Tabelle 3: DNA-Oligonukleotide. T_M ist die vom Gehalt an Nucleotiden abhängige Schmelztemperatur (3.13.3.2.). Die in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Einsatz kommende optimale Primer-Bindungstemperatur T_A ermittelt sich nach der Formel: T_A = T_M - 4°C.

3.6. Zellkulturmedien

Das zur Kultur von eukaryotischen Zellen (z.B. Knochenmarkzellen) oder zur Aufbewahrung der KM-Spenderknochen verwendete Medium Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) wird von der Firma Sigma bezogen und vor Gebrauch mit 20% (v/v) fötalem Kälberserum (FKS; Life Technologies), 2mM Glutamin (Sigma) und 1mM Natriumpyruvat (Sigma) versetzt.

3.7. Antibiotika für den Einsatz in Mäusen

Vancomycin (Hejzlar *et al.*, 1967 ⁽²⁹⁾)

Abbot, Wiesbaden

Enrofloxacin (Blagburn *et al.*, 1991 ⁽⁶⁾)

Bayer, Leverkusen

3.8. Ganzchromosom-Sonden zur Detektion der Geschlechtschromosomen

- Ganz-Maus X-Chromosom DNA-Sonde, Fluoreszein markiert (grünes Fluorochrom, Anregung bei 515nm)
- Ganz- Maus Y-Chromosom DNA-Sonde, Rhodamin markiert (rotes Fluorochrom, Anregung bei 590nm)

Beide DNA-Sonden werden von Fa. Q BIOGene (Heidelberg) bezogen

3.9. Monoklonale, fluoreszenzmarkierte Antikörper

Alle aufgeführten Antikörper werden von der Fa. BD PharMingen (Heidelberg) bezogen.

Anti-murines TCR $\alpha\beta$ ⁺ mit FITC/PE	Klon: H57-597
Anti-murines CD4 ⁺ mit FITC/PE/PerCP	Klon: GK1.5
Anti-murines CD8 ⁺ mit FITC/PE/PerCP	Klon: 53-6.7
Anti-murines CD19 ⁺ mit FITC/PE	Klon: 1D3
Anti-murines CD45RB ⁺ mit FITC/PE	Klon: 16A
Anti-murines NK1.1 ⁺ mit FITC/PE	Klon: PK136
Anti-murines TCR $\gamma\delta$ ⁺ mit FITC/PE	Klon: GL3
Anti-murines CD106 ⁺ mit FITC/PE	Klon: 429 (MVCAM.A)
Anti-murines CD117 ⁺ mit FITC/PE	Klon: 2B8
Anti-murines Sca-1 ⁺ mit FITC/PE	Klon: E13-161.7

FITC = Fluoreszein-Isothiocyanath (grün)

PE = Phycoerythrin (hellrot)

PerCP = Peridinin Chlorophyll Protein (dunkelrot)

3.10. Sonstiges

DNA-Längenmarker (100bp)	Life Technologies (Karlsruhe)
Nitrozellulosemembran („Hybond-N“)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Röntgenfilme („Biomax-MR“)	Kodak (Stuttgart)
Dibromol Tinktur (farblos)	Trommsdorff (Alsdorf)
Mausbestrahlungsbehälter	Eigenbau
Zwangsröhre	Ebeco (Castrop Rauxel)
Scalpel (# 21)	Feather (Japan)
Schere	Roth (Karlsruhe)
Pinzette	Roth (Karlsruhe)
10ml Spritzen (Omnifix)	Braun (Melsungen)
1ml Spritzen (Tuberkulin)	Dispomed (Gelnhausen)
Kanülen (Microlance)	BD (Becton Dickinson, Heidelberg)
Petrischale (10cm)	Falcon (BD, Heidelberg)
Zellsieb (70µm)	Falcon (BD, Heidelberg)
Cryogengefäß (2,0ml)	Corning
Kunststoff-Blutgaskapillare	in-vitro-Diagnostikum
Kapillarblutentnahmegefäß (100µl)	KABE (Nümbrecht-Eisenroth)

Methoden

3.11. Versuchstiere: Haltung und Zucht

3.11.1. Haltungseinrichtung

Die Tiere werden im Rahmen der Transplantationsexperimente laut Tierschutzgesetz einer mäßigen Belastung ausgesetzt. Nach der erforderlichen Konditionierung besteht in der Aplasie die Gefahr von Infektionen, welche die Tiere beeinträchtigen könnte. Daher wird versucht, Infektionen der Tiere nach Konditionierung und KMT durch den anschließenden Aufenthalt in Filterkäfigen weitestgehend zu vermeiden.

Dazu dient der Sterilfilterkäfig Typ III (bis 5 Mäuse); 800cm², Höhe 20cm. Nach Abschluß der Untersuchungen werden die Tiere in konventionellen Käfigen gehalten: Käfigtyp II (2-3 Mäuse); 350cm², Höhe 14cm, oder Käfigtyp III (5 Mäuse); 800cm², Höhe 15cm

3.11.2. Einstreu

Autoklaviertes, entstaubtes Weichholzgranulat

3.11.3. Temperaturbereich

22°C ± 2°C

3.11.4. Relative Luftfeuchte

55% ± 5%

3.11.5. Beleuchtung

6.00 Uhr – 18.00 Uhr mit 320 Lux

3.11.6. Trinkwasser

Ozonisiertes Wasser, angesäuert mit HCl auf einen pH-Wert von 2,6 – 3,0

3.11.7. Futtermittel

Maus-/ Nacktmausfutter: ssniff Nacktmausfutter (Spezialdiäten GmbH, Soest)

Rohnährstoffe:	Rohprotein 25,0 %, Rohfett 5,8 %, Rohasche 6,7 %, Rohfaser 3,7 %
Spurenelemente:	Kupfer (5,0 mg/kg)
Vitamine:	A (18.000 µg/kg) D ₃ (1.200 µg/kg) E (120 µg/kg)

Ergänzungsfuttermittel: Nutri plus Gel (virbac, Carros, Frankreich)

Zusammensetzung:	Sojaöl, Melasse, Lebertranöl, Fleischextrakt, Mineralstoffmischung, Vitaminmischung
Inhaltsstoffe:	Rohprotein 1,1 %, Rohfett 30,8 %, Rohasche 0,8 %, Rohfaser 0,3 %

Zusatztherapiemittel nach Antibiotikagabe: Bird Bene-Bac (Albrecht, Aulendorf)

Zusammensetzung: Lactobacillus fermentum, L. casei, L. plantarum,
L. acidophilus, Streptococcus faecium
Insgesamt 10 Mio. koloniebildende Einheiten

3.12. Etablierung einer C57BL/6 IL-7^{-/-} Mauslinie

3.12.1. Rückkreuzung von IL-7^{-/-} Mäusen in den Stamm C57BL/6

Rückkreuzungen zweier genetisch verschiedener Stämme (hier SV129; IL-7^{-/-} und C57BL/6; IL-7^{+/+}) werden durchgeführt, um eine neue syngene IL-7^{-/-} Linie zu etablieren. Um eine neue Linie zu generieren ist es im Allgemeinen üblich, mindestens sechs Rückkreuzungen des einen Stammes mit dem anderen Stammhintergrund durchzuführen. Bei jeder Rückkreuzung wird der Anteil des ursprünglichen Genoms reduziert, wohingegen der Anteil des „neuen“ Genoms ständig anwächst, wobei nach sechs Rückkreuzungen mit über 98% eine neue, syngene Linie generiert ist. Die Rückkreuzungen werden auch als Parentalkreuzung bezeichnet. Danach wird die heterozygote F1-Generation wieder miteinander verpaart, die daraus resultierende F2-Generation anschließend genotypisiert (3.13.3.). Von den so identifizierten homozygoten IL-7^{-/-} Mäusen (mendelkonform ungefähr ¼ der Tiere) werden pro Rückkreuzung alternierend männliche oder weibliche Nachkommen ausgewählt, um erneut mit entsprechenden C57BL/6 Tieren verpaart zu werden. Der Einsatz von weiblichen IL-7^{-/-} Tieren hat die Intention, die ausschließlich maternal vererbte mitochondriale DNA dem neuen Genotyp anzupassen. Mit der Schwangerschaft und Aufzucht werden die weiblichen IL-7^{-/-} Tiere allerdings derart belastet, dass diese z.T. nicht überleben bzw. in der Lage wären, ihren Nachwuchs bis zum Absatz zu versorgen. Demgegenüber steht bei Verwendung von männlichen IL-7^{-/-} Tieren kein Belastungspotential für das Tier selbst; in der Regel gelingt diese Verpaarung komplikationsfrei.

3.12.2. Embryonentransfer zur Sanierung von Tieren

Ein Embryonen-Transfer (ET) wird durchgeführt, um einen Tierstamm bezüglich seines momentanen pathogenen und fakultativ pathogenen Erregerrepertoires zu sanieren. Dies ist hier als reine Vorsichtsmaßnahme geschehen. Hierzu werden unter steriler Atmosphäre schwangeren Weibchen nach deren Sacrifizierung die Embryonen entnommen und diese in Ammen mit einem neuen hygienischen Status überführt. So erhält man Individuen, die einen identischen Keimstatus aufweisen.

3.12.3. Dokumentation der Rückkreuzungen

Dargestellt sind die Zuchtkäfige, in denen IL-7^{-/-} Tiere mit IL-7^{+/+} Tiere verpaart worden sind. Im Anschluss werden die Nachkommen der 2. Filialgeneration auf IL-7^{-/-} genotypisiert, die bei positivem Ergebnis dann erneut mit IL-7^{+/+} verpaart werden (s. Abbildung 2).

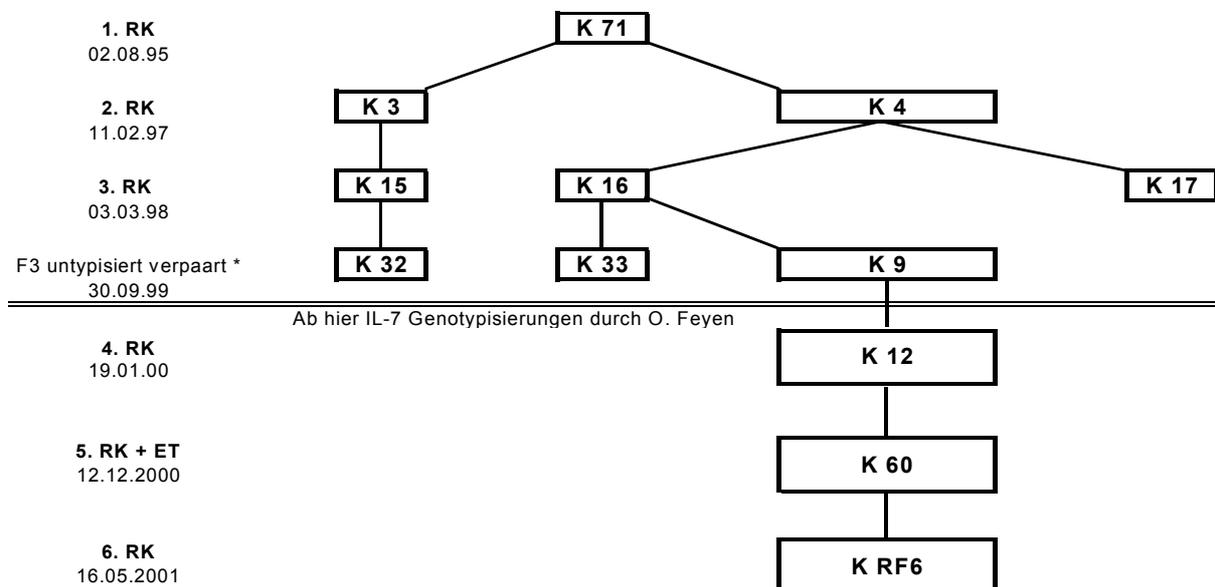


Abbildung 2: Dokumentation der Rückkreuzungen des IL-7^{-/-} Mäusestammes in C57BL/6. Die Daten zu den Käfigen (Abstammung der Eltern, Geburt, Geschlecht und Anzahl der Nachkommen) sind in der hiesigen Tierversuchsanlage dokumentiert. K steht für die Zuchtkäfignummer, RK bedeutet Rückkreuzung, ET steht für Embryonentransfer. Anmerkung zu (*): da der Stamm über eineinhalb Jahre nicht für Experimente eingesetzt worden ist, wurde hier zum Erhalt der 3. Rückkreuzungs-Generation die 3. Filialgeneration untypisiert miteinander verpaart. Dieses Reservoir stellte zu Beginn dieser Arbeit den Ausgangspunkt der ersten Genotypisierungen dar.

3.13. Molekularbiologische Techniken zur Validierung des IL-7 Genotyps in C57BL/6 IL-7^{+/+} und C57BL/6 IL-7^{-/-} Mäusen

3.13.1. Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Zur Vermehrung von Plasmiden wird der *E.coli*-Stamm XL1-Blue verwendet. Die Transformation der zu amplifizierenden Plasmid-DNA wird mit Hilfe des Bio-Rad „*E.coli*-Pulsers“ entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.13.2. Isolierung von Nukleinsäuren

3.13.2.1. Plasmid-Midi- und Maxipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien z.B. zur Generierung einer IL-7 cDNA-Sonde (siehe 3.13.3.1.1.) ist in verschiedenen quantitativen Größenordnungen möglich. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA in ausreichenden Mengen zur Klonierung von Vektoren ⁽⁷³⁾ werden Plasmid-Midi- oder Maxi-Präparationen („Plasmid Midi-/Maxi-Preparation Kit“; Qiagen, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

3.13.2.2. Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus den Mausschwanzspitzen für Southern Blot-Analysen (3.13.3.1.) oder analytische PCRs (3.13.3.2) wird der „DNEasy Tissue Kit“ von Qiagen verwendet. Dabei werden dem Anwendungsprotokoll entsprechend etwa 6-8mm Mausschwanzspitze zur Gewinnung von 10 bis 20µg DNA eingesetzt.

3.13.3. Spezifischer Nachweis von IL-7 DNA (Genom-Analysen)

3.13.3.1. Southern Blotting (Transfer von DNA auf Nylonmembranen)

Bei dieser Methode nach Sambrook *et al.* ⁽⁷³⁾ wird die genomische Mäuse-DNA mit Restriktionsendonucleasen geschnitten und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird anschließend zur Depurinierung der DNA in HCl

inkubiert, dann erfolgt ein Denaturierungsschritt in NaOH und NaCl, gefolgt von einem Neutralisierungsschritt in Tris und NaCl. Der Transfer der denaturierten DNA auf eine Nylon-Membran erfolgt durch „Kapillar-Blotting“ in 20x SSC über Nacht. Die getrocknete Membran wird anschließend unter UV-Licht fixiert. Für die radioaktive Hybridisierung werden die Nylonmembranen angefeuchtet und in eine Prähybridisierungs-Lösung gegeben. Zur Hybridisierung der membrangebundenen DNA mit der ^{32}P markierten IL-7 cDNA Sonde wird die Membran in Hybridisierungs-Lösung mit ca. 50ng markierter Sonden-DNA über Nacht inkubiert. Die markierte DNA wird zuvor aufgereinigt und dann denaturiert. Anschließend erfolgten die Waschschrte in aufsteigender Stringenz. Nach Einkleben der Membranen in dünne Folie wird ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Autoradiographie erfolgt schließlich über 1 bis 14 Tage.

3.13.3.1.1. Herstellung der radioaktiv markierten IL-7 cDNA Sonde, ‚random primed‘ Methode

Bei der ‚random primed‘-Methode nach Feinberg und Vogelstein, 1983 ⁽¹⁷⁾ werden mit ^{32}P markierte Nukleotide während einer nicht-zyklischen Polymerisationsreaktion, bei der ein Hexanukleotidgemisch zufälliger Sequenz als Primer verwendet wird, in den neu entstehenden DNA-Strang eingebaut. Für höchste spezifische Aktivitäten werden 25 bis 100ng DNA eingesetzt. Die nicht markierte DNA bleibt im Markierungsansatz zurück und kompetitiert in der Hybridisierung die radioaktiv markierten Fragmente. Die zu markierende DNA wird durch Restriktionsspaltung des entsprechenden Plasmids gewonnen (3.4.2.).

Die DNA wird durch 10min Erhitzen auf 95°C und schnelles Abkühlen auf Eis denaturiert. Man pipettiert CTG-Mix (je 0,5mM dCTP, dTTP, dGTP) in den Ansatz und gibt dann Hexanukleotide-Mix in 10x Klenow-Puffer zu. Anschließend gibt man Klenow-Polymerase (entspricht 2U, Boehringer Mannheim) zu. Nach Zugabe von α - ^{32}P dATP (spezifische Aktivität 800Ci/mmol) wird der Ansatz für 30 bis 60min bei 37°C inkubiert.

3.13.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide, die als Primer für eine hitzestabile DNA-Polymerase dienen. Alle Ansätze werden mit dem „Taq PCR Core Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt und je nach Bedarf durch Zugabe von „Q-Solution“, Variierung der Primer-Bindungstemperatur oder der DNA-Menge optimiert.

Analytische PCRs zur Generierung von Fragmenten für Typisierungen werden in der Regel in einem 50µl Ansatz mit 100 bis 500ng DNA, je 10-20pmol ‚forward‘- und ‚reverse‘-Primer, 200µM pro dNTP und 2,5U Taq-Polymerase in einem Gene Amp® PCR System 2700 (AB Applied Biosystems) durchgeführt. Die Temperatur zur Primer-Bindung (Annealing Temperatur = T_A) wird entsprechend der Länge und des GC-Gehaltes der Primer gewählt (Maniatis *et al.*, pro G oder C +4°C, pro A oder T +2°C = Schmelztemperatur = T_M). Die geeignete Temperatur für eine optimale Primer-Bindung wird dann berechnet: $T_A = T_M - 4^\circ\text{C}$ (s. Tabelle 3). Die Dauer der Elongation richtete sich nach der Fragmentlänge der zu amplifizierenden Sequenz (30 Sek. pro kb der zu amplifizierenden Sequenz). Für die IL-7 PCR werden folgende optimale Bedingungen etabliert.

Temperaturprofil:

	4 Min.	94°C	Denaturierung	
30-35 x	{	30 Sek.	94°C	Denaturierung
		1 Min.	50 bzw. 60°C	Primer-Bindung (je nach Primer, 3.5.)
		1 Min.	72°C	Elongation
		10 Min.	72°C	terminale Elongation

Nach Beendigung der PCR wird die Probe auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und die Größe des amplifizierten Fragments anhand eines mitgeführten DNA-Längenmarkers bestimmt.

3.14. Transplantationsprotokoll

Die KMT gliedert sich in vier Phasen auf: eine Vorphase (Tag -7 bis Tag 0), die Konditionierungsphase (an Tag -1), die Transplantationsphase (an Tag 0), und die Posttransplantationsphase (ab Tag+1).

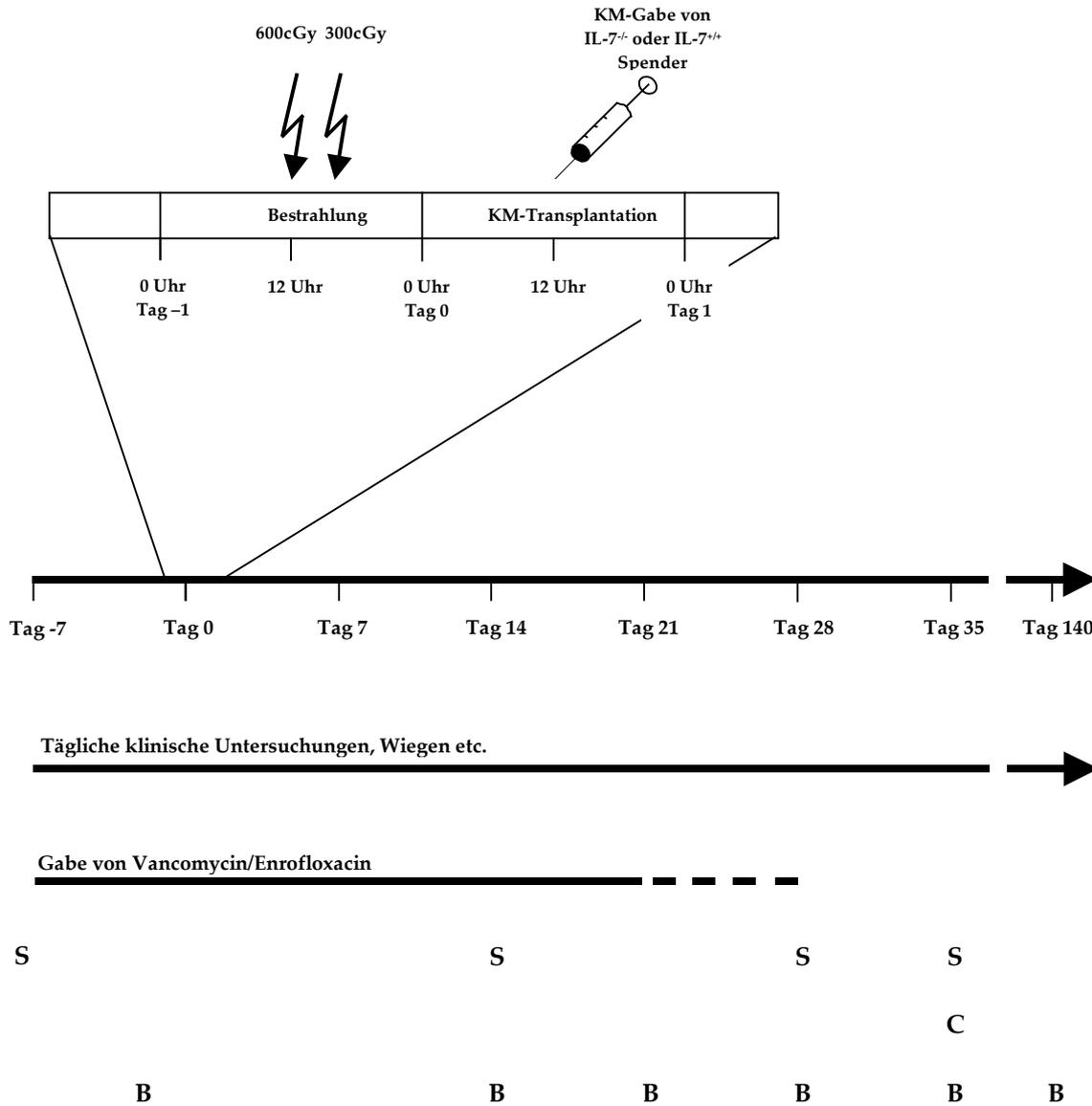


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Transplantationsprotokolls. S = Stuhlproben, B = Blutproben, C = Spender-Chimärismus, und KM = Knochenmark.

3.14.1. Klinische Überwachung der Tiere während der gesamten Versuchszeit

Neben der täglichen Kontrolle des klinischen Allgemeinzustandes der im Experiment befindlichen Tiere wird eine Reihe weiterer Untersuchungen vorgenommen.

3.14.1.1. Gewichtsbestimmung

Die transplantierten Tiere werden wöchentlich gewogen, um die Entwicklung des Körpergewichtes im Verlauf des Experimentes zu dokumentieren. In kritischen Fällen (siehe 3.14.1.3.) erfolgt tägliches Wiegen. Dazu wird vorab das Gewicht der sterilen Zwangsröhre bestimmt, die daraufhin mit der entsprechenden Maus erneut gewogen wird. Nach Abzug des Gewichtes der Röhre resultiert das Körpergewicht des Versuchstieres.

3.14.1.2. Mikrobiologische Analyse von Stuhlproben

Außerdem werden regelmäßig Stuhlproben bakteriologisch analysiert. Stuhl von stichprobenartig ausgewählten Versuchstieren wird vor der Behandlung (Gabe von Antibiotika und Bestrahlung), unmittelbar danach, und zu einem späteren Zeitpunkt (nach abgeschlossener Immunrekonstitution) untersucht. Somit wird die durch die Bestrahlung gefährdete Darmflora ständig überwacht.

3.14.1.3. Tötung von Versuchstieren

Laut des genehmigten Tierversuchsantrags (Az.: 23.05.230-3-12/00; Punkt 1.6.5) heißt es: „Die vorgesehene Bestrahlung der Mäuse entspricht einem Standardverfahren zur Vorbereitung auf Knochenmarkstransplantationen. Die letale Bestrahlung der Tiere führt zur Eliminierung der Knochenmarkszellen und damit zu einem Ausfall des Immunsystems (Aplasie). Weiterhin ist mit Schädigungen von Schleimhaut- und

Darmgewebe zu rechnen.“ Um ein unnötiges Leiden der Tiere zu vermeiden werden folgende Kriterien benutzt, die zu einer vorzeitigen Tötung des Tieres führen:

- Gewichtsabnahme um 25%
- auffälliges Verhalten (Apathie, Aggressivität, motorische Auffälligkeit, abnormale Körperhaltung)
- wirkungslose KM-Transplantation (keine Immunrekonstitution nach spätestens 2 Monaten) im Anschluß an eine Bestrahlung“

3.14.2. Vorphase (Tag -7 bis Tag 0)

3.14.2.1. Beginn der Antibiotikabehandlung der Tiere

In Folge der Bestrahlung im Rahmen der Konditionierung ist mit Darmschädigungen und einer Sepsis durch endogene Darmkeime der Tiere zu rechnen (siehe 3.14.1.3.). Ab Tag -7 werden die Tiere daher, angelehnt an die Erfahrungen aus der humanen Transplantationsmedizin, mit Antibiotika-angereichertem Trinkwasser vorbehandelt, um ein Ausbreiten darmspezifischer Erreger im immunsupprimierten Zustand nach Bestrahlung zu verhindern. Die eingesetzte Antibiotikadosis wird auf das Gewicht der Tiere und ihren Tagesverbrauch an Trinkwasser bezogen. Dieser wird von der hiesigen Tierschutzbeauftragten Fr. Dr. Treiber mit 5ml Trinkwasser/Tag für ein Tier von 20g definiert. Als Dosis kommen 20mg/kg/d/5ml Trinkwasser Vancomycin und 10mg/kg/d/5ml Trinkwasser Enrofloxacin zum Einsatz. Das Trinkwasser wird täglich erneuert. Die Antibiotikabehandlung wird fortgeführt bis eine Woche nach Rekonstitution der lymphozytären und myelomonozytären Zellpopulationen, mindestens jedoch bis 3 Wochen nach KMT.

3.14.2. Konditionierung (Tag -1)

Die Konditionierung der weiblichen Versuchstiere mit insgesamt 900cGy erfolgt durch eine γ -Strahlenquelle (Gammacell1000 Elite, MDS Nordion, Ottawa); das verwendete Isotop ist Cs137. Die Bestrahlung erfolgt in zwei Phasen; durch die Fraktionierung ist gewährleistet, dass eventuell die erste Bestrahlung überlebendes autologes Knochenmark durch die zweite Bestrahlung doch zum Absterben gebracht wird. Der zeitliche Verzug schützt das Tier vor einer zu starken Strahlen-Akkumulation und ist standardisiert. Vormittags erfolgt die erste Ganzkörper-Bestrahlung der Empfängermaus mit 600cGy, ca. 4h später erfolgt dann die zweite Ganzkörper-Bestrahlung der Empfängermaus mit 300cGy. Die Empfänger-Mäuse befinden sich während der Konditionierung separat in autoklavierten Behältnissen mit sterilem Luftfilter. Ein Umsetzen der Mäuse aus dem sterilen Haltungskäfig in den sterilen Konditionierungsbehälter findet immer unter der Sterilbank statt.

3.14.3. Transplantation von Knochenmark (Tag 0)

3.14.3.1. Transplantat: Knochenmarkentnahme, -Aufbereitung und -Zusammensetzung

Die Tötung der männlichen Spendermaus in der Tierversuchsanlage erfolgt durch cervicale Dislokation. Femur und Tibia werden unter sterilen Bedingungen ausgelöst, direkt in Medium (IMDM) überführt und bei Raumtemperatur ins Labor gebracht. Dort werden die Knochen in Petrischalen mit Medium gegeben. Anschließend werden die Enden mit Pinzette und Skalpell auf einer weiteren trockenen Petrischale abgeschnitten. Mit einer Spritze wird dann Medium mittels einer Kanüle durch den Röhrenknochen gespült, die Suspension wird anschließend durch ein 70 μ m Zellsieb in ein 50ml Falcon-Röhrchen gegeben. Eine Probe wird zur Zellzahlbestimmung im Zählgerät entnommen; eine Überprüfung sowohl der Zellzahl der kernhaltigen Zellen als auch deren Vitalität wird mit Trypanblau in einer Neubauerkammer durchgeführt. Das Knochenmark wird auf eine Konzentration von 5×10^6 kernhaltigen Zellen/100 μ l eingestellt.

Das so aufbereitete Transplantat wird auf Eis gekühlt in sterilen Cryoröhrchen in die Tierversuchsanlage transportiert. Zur Transplantation werden Tuberkulin-Spritzen (1ml, ohne Totvolumen) mit grauen Kanülen (27G^{3/4}; 0,4x20mm) unmittelbar vor den einzelnen Transplantationen vorbereitet. Pro Transplantation werden je 200µl mit 1×10^7 kernhaltigen Zellen appliziert (3.14.3.2.).

Um die zelluläre Zusammensetzung des Knochenmark-Transplantates zu ermitteln, wird das Knochenmark wie unter Punkt 3.14.3.1. beschrieben aus männlichen Spender-Tieren in einem Alter von im Mittel 12 Wochen gewonnen. Als Spender werden hier jeweils $n=5$ IL-7^{+/+} und $n=5$ IL-7^{-/-} ausgewählt. Die Zusammensetzung sowohl des IL-7^{+/+} als auch des IL-7^{-/-} Knochenmark-Transplantates wird durch Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern mit Hilfe des Durchflußzytometers (FACS, siehe 3.14.3.6) bestimmt.

3.14.3.2. Transplantation des Knochenmarks

Die weibliche Empfängermaus wird unter einer Sterilbank in eine Zwangsröhre gesetzt; der Schwanz wird mit den Fingern der linken Hand fixiert, dabei etwas gestreckt, und mit Dibromol besprüht. Diese Behandlung führt zum einen zu einer lokalen Desinfektion, zum anderen werden durch den hohen Anteil an Alkohol im Dibromol die Venen geweitet. Es erfolgt die Applikation des Transplantates in einem möglichst flachen Winkel zum Tier hin in entweder die linke oder die rechte Vene. Danach wird erneut der Schwanz besprüht und abgetupft. Für die erste Einstichstelle wird ein Venenabschnitt ausgewählt, der von der Schwanzwurzel möglichst weit entfernt liegt. Abschließend erfolgt die Markierung, das Wiegen und das Rücksetzen der Maus in den Filterkäfig sowie das Einsammeln von Probenmaterial (Kot) für tierpathologische Untersuchungen.

3.14.3.3. Bestrahlungskontrollen

Um die Letalität der Konditionierung zu überprüfen, wurden drei Tiere wie unter 3.14.2. beschrieben einer Ganzkörperbestrahlung unterzogen, anschließend wurde ihnen allerdings kein Knochenmark transplantiert.

Gruppe 0	KM-Spender				KM-Empfänger			
	Geschlecht	Genotyp	Gewicht (Gramm)	Alter (Wochen)	Geschlecht	Genotyp	Gewicht (Gramm)	Alter (Wochen)
Kontrolle 1	/	/	/	/	w	IL-7 +/+	23	13
Kontrolle 2	/	/	/	/	w	IL-7 +/+	23	13
Kontrolle 3	/	/	/	/	w	IL-7 +/+	22	13

Tabelle 4: Die Tiere der Bestrahlungskontrolle (Gruppe 0). Das weibliche Geschlecht wird mit w abgekürzt, der WT mit IL-7^{+/+} gekennzeichnet, KM bedeutet Knochenmark.

3.14.3.4. Syngenes Transplantationsmodell: Einteilung der Versuchstiere in Versuchsgruppen mit vier unterschiedlichen Transplantations-Konstellationen

Nach Etablierung der notwendigen Bedingungen für eine erfolgreiche syngene Transplantation wird in vier möglichen Konstellationen transplantiert:

Gruppe I: IL-7^{+/+} Spender-Knochenmark in IL-7^{+/+} Empfänger (WT-KM in WT, n=7)

Gruppe II: IL-7^{+/+} Spender-Knochenmark in IL-7^{-/-} Empfänger (WT-KM in ko, n=10)

Gruppe III: IL-7^{-/-} Spender-Knochenmark in IL-7^{+/+} Empfänger (ko-KM in WT, n=12)

Gruppe IV: IL-7^{-/-} Spender-Knochenmark in IL-7^{-/-} Empfänger (ko-KM in ko, n=11)

Die Konstellation IL-7^{+/+} Spender-Knochenmark in IL-7^{+/+} Empfänger (WT-KM in WT) stellt die IL-7 Positivkontrolle dar, in der sowohl Spender als auch Empfänger über IL-7 produzierende Zellen verfügen, in Zukunft auch als der „**Goldstandard**“ bezeichnet.

Gruppe I	KM-Spender				KM-Empfänger			
	Geschlecht	Genotyp	Gewicht (Gramm)	Alter (Wochen)	Geschlecht	Genotyp	Gewicht (Gramm)	Alter (Wochen)
WT-WT 1	m	IL-7 +/+	22	12	w	IL-7 +/+	23	13
WT-WT 2	m	IL-7 +/+	22	12	w	IL-7 +/+	22	13
WT-WT 3	m	IL-7 +/+	22	12	w	IL-7 +/+	23	13
WT-WT 4	m	IL-7 +/+	22	12	w	IL-7 +/+	21	13
WT-WT 5	m	IL-7 +/+	23	12	w	IL-7 +/+	21	13
WT-WT 6	m	IL-7 +/+	23	12	w	IL-7 +/+	22	13
WT-WT 7	m	IL-7 +/+	23	12	w	IL-7 +/+	21	13
Mittelwert			22,4	12,0			21,9	13,0

Tabelle 5: Zusammensetzung der Versuchsgruppe der Tiere des Goldstandards (IL-7^{+/+} Knochenmark in IL-7^{+/+} Empfänger, Gruppe I). Das weibliche Geschlecht wird mit w abgekürzt, dass männliche mit m. Der IL-7 Wildtyp wird mit IL-7^{+/+} gekennzeichnet. KM bedeutet Knochenmark.

Es folgt die Transplantation in den weiteren Konstellationen in zeitlich versetzten Abständen, da die Tiere unmittelbar nach der Konditionierung und der sich anschließenden Transplantation einer intensiven Pflege bedürfen.

Gruppe II	KM-Spender				KM-Empfänger			
	Geschlecht	Genotyp	Gewicht (Gramm)	Alter (Wochen)	Geschlecht	Genotyp	Gewicht (Gramm)	Alter (Wochen)
WT-ko 1	m	IL-7 +/+	32	15	w	IL-7 -/-	20	10
WT-ko 2	m	IL-7 +/+	32	15	w	IL-7 -/-	21	10
WT-ko 3	m	IL-7 +/+	21	13	w	IL-7 -/-	23	13
WT-ko 4	m	IL-7 +/+	22	13	w	IL-7 -/-	23	13
WT-ko 5	m	IL-7 +/+	21	13	w	IL-7 -/-	22	13
WT-ko 6	m	IL-7 +/+	21	13	w	IL-7 -/-	22	13
WT-ko 7	m	IL-7 +/+	32	15	w	IL-7 -/-	21	10
WT-ko 8	m	IL-7 +/+	32	15	w	IL-7 -/-	21	10
WT-ko 9	m	IL-7 +/+	32	15	w	IL-7 -/-	20	10
WT-ko 10	m	IL-7 +/+	21	13	w	IL-7 -/-	24	13
WT-ko 11	m	IL-7 +/+	21	13	w	IL-7 -/-	24	13
WT-ko 12	m	IL-7 +/+	21	13	w	IL-7 -/-	21	13
Mittelwert			25,7	13,8			21,8	11,8

Tabelle 6: Zusammensetzung der Versuchsgruppe der Tiere der Konstellation IL-7^{+/+} Knochenmark in IL-7^{-/-} Empfänger zur Untersuchung des Einflusses des Fehlens von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger (Gruppe II). Das weibliche Geschlecht wird mit w abgekürzt, dass männliche mit m. Der IL-7 Wildtyp wird mit IL-7^{+/+} gekennzeichnet, die IL-7 knockout Maus mit IL-7^{-/-}. KM bedeutet Knochenmark.

Zwischen den einzelnen Transplantationsansätzen liegen unterschiedlich lange Zeitintervalle, jedoch sind die Bedingungen für die Transplantationen immer identisch.

Gruppe III	KM-Spender				KM-Empfänger			
	Geschlecht	Genotyp	Gewicht (Gramm)	Alter (Wochen)	Geschlecht	Genotyp	Gewicht (Gramm)	Alter (Wochen)
ko-WT 1	m	IL-7 -/-	24	16	w	IL-7 +/+	22	11
ko-WT 2	m	IL-7 -/-	21	14	w	IL-7 +/+	20	11
ko-WT 3	m	IL-7 -/-	22	14	w	IL-7 +/+	22	11
ko-WT 4	m	IL-7 -/-	21	14	w	IL-7 +/+	22	11
ko-WT 5	m	IL-7 -/-	23	14	w	IL-7 +/+	22	11
ko-WT 6	m	IL-7 -/-	23	16	w	IL-7 +/+	22	11
ko-WT 7	m	IL-7 -/-	24	16	w	IL-7 +/+	22	11
ko-WT 8	m	IL-7 -/-	24	16	w	IL-7 +/+	22	11
ko-WT 9	m	IL-7 -/-	23	16	w	IL-7 +/+	22	11
ko-WT 10	m	IL-7 -/-	23	16	w	IL-7 +/+	22	11
Mittelwert			22,8	15,2			21,8	11,0

Tabelle 7: Zusammensetzung der Versuchsgruppe der Tiere der Konstellation IL-7^{-/-} Knochenmark in IL-7^{+/+} Empfänger zur Untersuchung des Einflusses des Fehlens von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat (Gruppe III). Das weibliche Geschlecht wird mit w abgekürzt, dass männliche mit m. Der IL-7 Wildtyp wird mit IL-7^{+/+} gekennzeichnet, die IL-7 knockout Maus mit IL-7^{-/-}. KM bedeutet Knochenmark.

Die Mäuse werden in Gruppen von fünf bis zehn Tieren nacheinander transplantiert. Bei mehr als einem Gruppenansatz werden diese ihrer Konstellation entsprechend in der Auswertung zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst.

Gruppe IV	KM-Spender				KM-Empfänger			
	Geschlecht	Genotyp	Gewicht (Gramm)	Alter (Wochen)	Geschlecht	Genotyp	Gewicht (Gramm)	Alter (Wochen)
ko-ko 1	m	IL-7 -/-	23	16	w	IL-7 -/-	21	12
ko-ko 2	m	IL-7 -/-	20	10	w	IL-7 -/-	20	12
ko-ko 3	m	IL-7 -/-	20	10	w	IL-7 -/-	21	12
ko-ko 4	m	IL-7 -/-	21	11	w	IL-7 -/-	21	12
ko-ko 5	m	IL-7 -/-	21	12	w	IL-7 -/-	21	13
ko-ko 6	m	IL-7 -/-	22	12	w	IL-7 -/-	22	13
ko-ko 7	m	IL-7 -/-	23	16	w	IL-7 -/-	24	12
ko-ko 8	m	IL-7 -/-	23	16	w	IL-7 -/-	20	12
ko-ko 9	m	IL-7 -/-	20	10	w	IL-7 -/-	21	12
ko-ko 10	m	IL-7 -/-	21	11	w	IL-7 -/-	21	12
ko-ko 11	m	IL-7 -/-	21	11	w	IL-7 -/-	21	13
Mittelwert			21,4	12,3			21,2	12,3

Tabelle 8: Zusammensetzung der Versuchsgruppe der Tiere der Konstellation IL-7^{-/-} Knochenmark in IL-7^{-/-} Empfänger zur Untersuchung des Einflusses des Fehlens von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger und im Transplantat (Negativkontrolle, Gruppe IV). Das weibliche Geschlecht wird mit w abgekürzt, dass männliche mit m. Die IL-7 knockout Maus wird mit IL-7^{-/-} gekennzeichnet. KM bedeutet Knochenmark.

3.14.4. Posttransplantationsphase (Tag+1 bis Tag+140)

3.14.4.1. Kapillarblutabnahme

Mit einem sterilen Skalpell wird die Spitze des Schwanzes (ca. 0,5mm) abgeschnitten; ist dies schon mehrfach geschehen wird das Schwanzende mit dem Skalpell lediglich angeritzt, die sich an der Schwanzspitze absetzenden Blutropfen werden mit einer 110µl Kunststoff-Blutgaskapillare, die mit Lithium-Heparin beschichtet ist, aufgenommen. Der Inhalt wird daraufhin in ein mit EDTA beschichtetes Kapillarblutentnahmegefäß überführt und bei RT den folgenden Analysen als Vollblutprobe zugeführt.

3.14.4.2. Gesamtleukozytenzahlbestimmung nach Neubauer

Die Neubauerkammer ist eine flache Glaskammer von definierter Tiefe mit graduierter Unterteilung der Bodenfläche („Zählnetz“). Sie dient hier als Hämozytometer zur mikroskopischen Auszählung verschiedener Blutzellen (hier der Leukozyten). Die ermittelte Zahl erlaubt unter Bezug auf das bekannte Kammervolumen und den Grad der Probenverdünnung die Bestimmung der Anzahl an z. B. Leukozyten pro Volumeneinheit.

3.14.4.3. Differentialblutbild (Färbung nach Pappenheim)

Die Färbung von luftgetrockneten Blutausrichen erfolgt im Tauchverfahren. Zuerst werden die Präparate für 5 Minuten in eine May-Grünwald-Lösung gegeben, dann für 3 Minuten in Pufferlösung nach Weise gewaschen, worauf sie für 15 Minuten in eine 1:20 verdünnte Giemsa-Lösung getaucht werden, um zuletzt für 5 Minuten nochmals in Pufferlösung nach Weise gewaschen werden. Anschließend erfolgt die mikroskopische Auswertung des relativen Anteils der unterschiedlichen

Leukozyten-Subpopulationen (Lymphozyten, Granulozyten, Eosinophile, Basophile und Monozyten) im angefärbten Blutausschlag.

3.14.4.4. Chimärismusanalyse mittels Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung (FISH) der Geschlechtschromosomen

Die Zellen werden 35 Tage nach Transplantation fluoreszenzmikroskopisch untersucht, um zu überprüfen, ob nach einer Knochenmark-Transplantation in weibliche Empfänger (Karyotyp: **XX**) tatsächlich nur noch männliche Spenderzellen (Karyotyp: **XY**) im Blut nachzuweisen sind. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem inversen Durchlichtmikroskop („Axiovert 25“; Carl Zeiss, Oberkochen), ausgestattet mit einer Quecksilber-Lampe sowie einem 515nm Filter (Fluoreszein, grün) und einem 590nm Filter (Rhodamin, rot).

Um aus der entnommenen Vollblutprobe die kernhaltigen Zellen zu erhalten, werden zuerst die Erythrozyten durch die Zugabe von 3%iger Essigsäure lysiert. Die verbliebenen Zellen werden dann für 5min bei 1.700UpM auf einen Objektträger zentrifugiert; nach Abnehmen des Überstandes läßt man sie für 3min bei 3.400UpM trocken zentrifugieren und fixiert sie anschließend für 5min in einem 75%:25% Methanol-Eisessig-Gemisch. Nach erfolgter Trocknung hydriert man die Präparate für 30sek in einem 40% Eisessig- 60% Wasser-Gemisch, welches mit 2xSSC-Puffer abgewaschen werden muß. Ein solches Waschen erfolgte im Folgenden nach jedem weiteren Zwischenschritt. Anschließend werden die Präparate für eine Stunde in eine auf 37°C vorgewärmte RNase A Lösung (Gebrauchskonzentration: 100µg/ml) gegeben, was später die Stringenz der Bindung der DNA-Sonden an die Chromosomen erhöht. Zur Dehydrierung wird eine in ihrer Konzentration von 70% über 95% bis 100% ansteigenden Ethanolreihe bei -20°C verwandt. Auf das im Anschluß getrocknete Präparat wird dann sowohl die X-chromosomspezifische als auch die Y-chromosomspezifische DNA-Sonde gegeben (3.8.), mit einem Deckglas (Runddeckglas, 15mm) beklebt und anschließend auf einer auf 72°C aufgeheizten

Thermoplatte kodenaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer abgedunkelten und humidisierten Kammer bei 37°C. Nach Ablösen des Deckglases, Waschen des Präparates und anschließender Behandlung zur Verhinderung vorzeitigen Ausbleichens kann die Anwesenheit der X- und Y-Chromosome im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (3.14.3.5.). Pro Versuchstier wurden je nach Qualität der Präparation zwischen 100 und 200 Zellkerne unabhängig von zwei Personen (O.F. und A.S.) ausgezählt.

3.14.4.5. Durchflußzytometrie

Mit Hilfe eines Durchflußzytometers (FACS = ‚Fluorescence-activated cell sorting‘) können verschiedene Parameter einer Zelle erfaßt werden. Neben der Zellgröße und Granularität ermöglicht die Durchflußzytometrie auch den Nachweis von Oberflächenmolekülen nach Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Für die Messung werden die Zellen einzeln an einem Argon-Laser vorbeigeleitet. Nach Anregung bei 488nm können von verschiedenen Detektoren unterschiedliche Lichtemissionen jeder einzelnen Zelle erfaßt werden: Das Vorwärtsstreulicht (‚forward light scatter‘, FSC), das Seitwärtsstreulicht (‚sideward light scatter‘, SSC) und die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe im grünen (525nm; FL1-Detektor), roten (578nm; FL2-Detektor) oder dunkelroten Wellenlängenbereich (680nm; FL3-Detektor). In der vorliegenden Arbeit werden grün bzw. rot fluoreszierende Farbstoffe (3.9.) einzeln oder als Antikörperkonjugate verwendet.

Das FSC ist ein Maß für die Größe der Zelle, während die intrazelluläre Granularität durch das SSC erfaßt wird. Durch eine Dot-Plot-Darstellung des FSC gegen das SSC können tote Zellen oder Partikel aufgrund ihrer geringen Größe und Granularität von lebenden Zellen unterschieden und dann von der Analyse ausgeschlossen werden.

3.14.4.5.1. Antikörper-Färbung und gewählte Kombinationen

Pro Ansatz werden 10µl Vollblut mit 90µl PBS versetzt und in einem FACS-Röhrchen (Falcon, Heidelberg) aufgenommen. Zur Anfärbung von Oberflächenmolekülen (3.9.) in Vollblut wird ein FITC-, PE- oder PerCP-markierter Antikörper gegen das nachzuweisende Molekül entsprechend der vom Hersteller angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Nach Zugabe des Antikörpers zur Zellsuspension wird der Ansatz gemischt und 10min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Unmittelbar darauf folgte die Erythrozyten-Lyse (BD-Lyse, Becton Dickinson). Zu jedem Ansatz wird 1ml BD-Lyse gegeben, die dann für 5 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert werden. Daran schließt sich der erste Waschschrift an (Zentrifugation 1.600 UpM, 5min, RT); der Überstand wird dekantiert. Anschließend werden 2ml PBS zugegeben, die Proben erneut zentrifugiert und der Überstand wieder dekantiert. Die Zellen werden abschließend in 200µl PBS resuspendiert, in eine abgedunkelte Aufbewahrungsdose aus Styropor auf Eis gestellt und anschließend gemessen (3.14.3.6.2).

Sowohl für die FACS-Analysen des peripheren Blutes als auch des Knochenmarks werden die fünf nun aufgeführten kombinierten Antikörper (AK)-Färbungen standardisiert eingesetzt. Der erstgenannte AK ist an FITC, der zweite an PE, und die oder der dritte an PerCP konjugiert:

1. Isotypkontrolle (Hamster bzw. Ratte Anti Maus Immunglobuline)
2. CD3⁺/CD19⁺
3. CD45RB⁺/CD4⁺/CD8⁺
4. TCRαβ⁺/TCRγδ⁺
5. TCRαβ⁺/NK1.1⁺/CD4⁺ und CD8⁺

Zur Identifizierung der Zusammensetzung des Knochenmarks werden zusätzliche Färbungen durchgeführt:

6. CD106⁺/CD117⁺
7. CD106⁺/Sca-1⁺

Mit diesen Antikörperfärbungen werden folgende Zellpopulationen erfasst:

Peripheres Blut:	Antikörper
Reife T-Zellen	TCR $\alpha\beta$ ⁺ oder TCR $\gamma\delta$ ⁺
Reife T-Helferzellen	TCR $\alpha\beta$ ⁺ /CD4 ⁺
Naive T-Helferzellen	CD4 ⁺ /CD45RB ^{high}
Gedächtnis T-Helferzellen	CD4 ⁺ /CD45RB ^{low}
Reife Cytotoxische T-Zellen	TCR $\alpha\beta$ ⁺ /CD8 ⁺
Naive Cytotoxische T-Zellen	CD8 ⁺ /CD45RB ^{high}
Cytotoxische Gedächtnis T-Zellen	CD8 ⁺ /CD45RB ^{low}
Doppelnegative T-Zellen	TCR $\alpha\beta$ ⁺ /CD4 ⁻ /CD8 ⁻
Reife B-Zellen	CD19 ⁺
Reife NK-Zellen	NK1.1 ⁺ /TCR $\alpha\beta$ ⁻
Zusätzlich im Knochenmark:	
Hämatopoetische Vorläuferzellen	CD117 ⁺
Hämatopoetische Stammzellen	Sca-1 ⁺
Stromazellen	CD106 ⁺ /CD117 ^{low}

Tabelle 9: Zusammenstellung der im FACS untersuchten Zell-Populationen. CD45RB^{high} entspricht dabei naiven, CD45RB^{low} Gedächtniszellen (16; 37; 68).

3.14.4.5.2. FACS-Messung

Zur FACS-Analyse werden die Antikörper-markierten Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit einem FACScan oder FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg). Zur Datenerfassung werden mindestens 10.000 Partikel pro Ansatz aufgenommen, die anschließende Auswertung wird an einem Apple Power Macintosh G3 mit „CellQuest“ Software (Becton Dickinson) durchgeführt.

3.14.4.6. Pathologie der verstorbenen oder getöteten Tiere

Verstirbt ein Versuchstier oder trifft eines der unter 3.14.1.3. genannten Tötungskriterien zu, so wird sein Kadaver in Zusammenarbeit mit dem Tierpathologischen Labor der hiesigen Tierversuchsanstalt untersucht. Außerdem wird ein bakteriologischer Befund erstellt und dokumentiert; Organteile werden in Formalin fixiert, teilweise paraffiniert und anschließend archiviert.

3.15. Datenanalyse und Statistik

3.15.1. Datenanalyse und Definitionen

Die Gesamtleukozytenzahl nach Neubauer wird in Zellzahl/ μl , d.e. Zellzahl/ μl , bestimmt. Der relative Anteil granulozytärer bzw. lymphatischer Zellen im differenzierten Blutbild wird in Prozent (%) angegeben, wobei auf ganzzahlige Werte gerundet wird. Anschließend wird die absolute Anzahl an Granulozyten bzw. an Lymphozyten anhand des Produktes aus Gesamtleukozytenzahl und prozentualen Anteil an Granulozyten bzw. Lymphozyten errechnet. Der im FACS ermittelte relative Anteil lymphatischer Subpopulationen wird auf die absolute Lymphozytenzahl bezogen. So erhält man die absoluten Angaben der Subpopulationen.

Zur Darstellung in den Diagrammen kommt die Zellzahl in Prozent bezogen auf den Ausgangswert vor KMT. Die Werte vor der Behandlung der Mäuse (Tag -2, siehe Tabelle 11) werden gleich 100% (Referenzwert) gesetzt.

Definition I:

Als *Engraftment* (Anwachsen) der Spender-Zellen wird die Situation nach KMT beschrieben, in der bei den IL-7^{+/+} Empfängern ≥ 500 Leukozyten/ μl nachgewiesen werden können, und bei den IL-7^{-/-} Empfängern ≥ 100 Leukozyten/ μl , entsprechend dem Anteil von ca. 20% an Leukozyten, welche die IL-7^{-/-} Tiere im Vergleich zu den IL-7^{+/+} vor KMT aufweisen.

Definition II:

Der Zeitpunkt der myelomonozytären bzw. lymphozytären *Rekonstitution* ist als der Zeitpunkt definiert, an dem der Mittelwert der Gruppe zum ersten Mal nach KMT wieder $\geq 100\%$ des Ausgangswertes vor KMT ist.

Von einer *verzögerten Rekonstitution* wird gesprochen, wenn die untersuchte Gruppe diesen Wert zu einem späteren Zeitpunkt als die Goldstandardgruppe erreicht.

Bei einer *unvollständigen Rekonstitution* werden zu keinem Zeitpunkt die 100% des Ausgangswertes vor KMT wieder erreicht.

3.15.2. Statistik

Hierzu wird in Zusammenarbeit mit dem Universitätsrechenzentrum, insbesondere unter Mithilfe von Herrn Dr. R. Willers, ein paarweiser Vergleich der vier transplantierten Gruppen mit dem Wilcoxon Rangsummentest durchgeführt und, ggf. nach Bonferoni-Hohn adjustiert, auf eine eventuelle statistische Signifikanz hin untersucht. Für eine ausführliche Analyse nach ANOVA war die Menge an Ereignissen zu gering.

Die Angaben zu den etwaigen Signifikanzen sind dem Buch von Volker Harms entnommen „Biomathematische Statistik und Dokumentation“, 5. neubearbeitete Auflage, Harms Verlag, Kiel (1988). Hiernach werden die Wertangaben wie folgt zusammengefaßt:

p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant

p-Werte $> 0,05$ als nicht signifikant (n.s.)

IV. Ergebnisse

4.1. Beschreibung des syngen KMT-Modells

4.1.1. Rückkreuzung der Mäuse auf den Stamm C57BL/6

Der ursprüngliche IL-7^{-/-} Ausgangsstamm von Frau von Freedon-Jeffry ist der Stamm 129/SV; er befand sich zu Beginn dieser Arbeit in der dritten Rückkreuzungsgeneration in den Stamm C57BL/6. Im Verlauf dieser Arbeit sind drei weitere Rückkreuzungen durchgeführt worden. Wie unter 3.12.1. beschrieben wird bei der Kreuzung von Stämmen der genetische Anteil des gewünschten Genotyps mit jeder erfolgten Rückkreuzung sukzessive erhöht: nach der 1. Rückkreuzung (Rk) beträgt der Anteil des IL-7^{-/-} Genoms in der nachfolgenden Generation 50%, nach der 2. Rk 75%, 3. Rk 87,5%, 4. Rk 93,75%, 5. Rk 96,875% und nach der 6. Rk 98,4375%; womit mit über 98% eine neue, als syngen anerkannte C57BL/6-Linie generiert ist.

4.1.2. IL-7 Genotypisierung der rückgekreuzten Mäuse

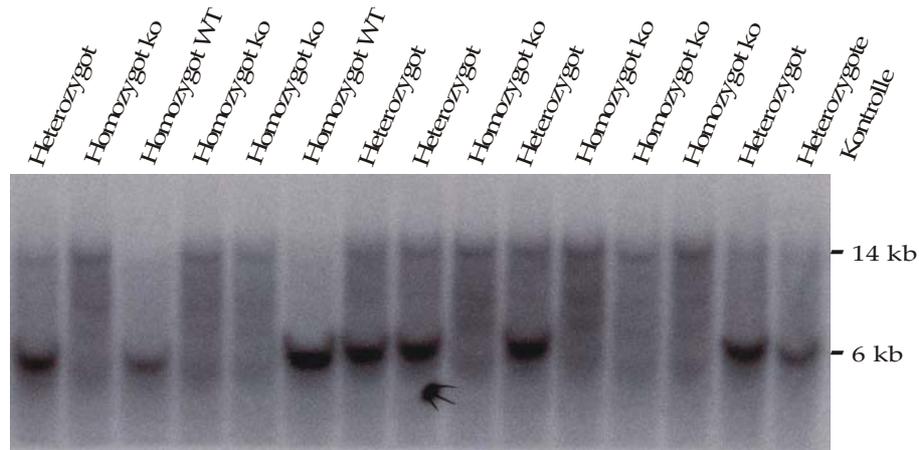
Aus der zu Beginn dieser Arbeit übernommenen, noch nicht genotypisierten 3. Rückkreuzungsgeneration resultieren lediglich zwei transgene IL-7^{-/-} Tiere. Beide Weibchen werden mit C57BL/6 Männchen verpaart. Unter den 24 IL-7^{-/-} Nachkommen aus der 6. Rückkreuzungsgeneration sind beide Geschlechter vertreten. Ab hier wird mit der Inzucht für die kommenden Transplantationsexperimente begonnen. Im Folgenden zeigt Tabelle 10 einen Überblick über die 245 Typisierungen, die nach den Rückkreuzungen durchgeführt worden sind.

Datum	Rückkreuzung	Methode	Genotyp			
			homozygot knockout	heterozygot -/+	homozygot Wildtyp	nicht eindeutig
03 1998	3	Southern	2	3	5	14
01 2000	4	Southern	41	52	14	15
12 2000	5	Southern	4	0	2	6
05 2001	6	PCR	24	42	21	0

Tabelle 10: IL-7 Genotypisierungen von IL-7^{-/-}, IL-7^{+/-} und IL-7^{+/+} Mäusen. IL-7^{-/-} und IL-7^{+/-} Tiere werden miteinander verpaart (Parentalgeneration). Die Kinder der ersten Filialgeneration sind alle heterozygot und werden in Inzucht miteinander weiterverpaart, worauf die zweite Filialgeneration entsteht. Insgesamt wurden 245 Tiere der entsprechenden zweiten Filialgeneration entweder per Southern Blot Analyse (Southern, s. 3.13.3.1.), oder per Polymerasen-Kettenreaktion (PCR, s. 3.13.3.2.) auf ihren IL-7 Genotyp hin untersucht. Identifizierte IL-7^{-/-} Tiere werden dann erneut mit IL-7^{+/-} verpaart.

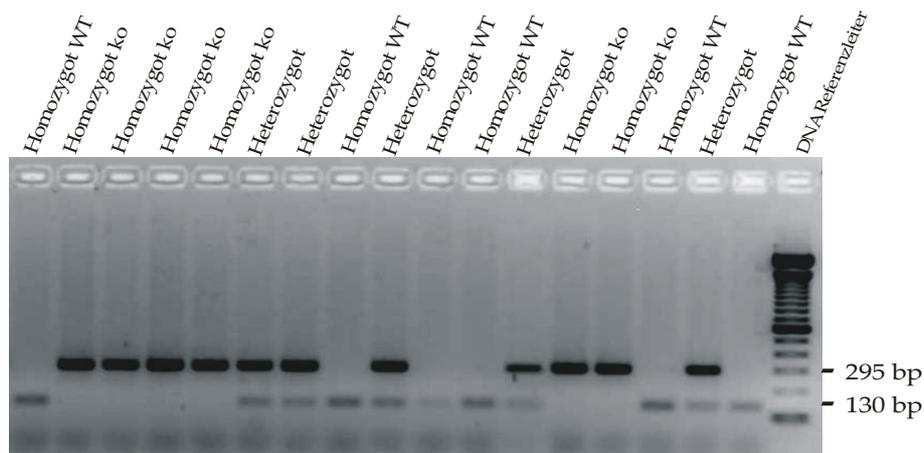
Die aus den jeweiligen Rückkreuzungen resultierenden Mäuse werden alle bezüglich ihres IL-7 Genotyps analysiert. Bis Mai 2001 wurden die Typisierungen per Southern Blot Analyse durchgeführt. Diese Methode (2.13.3.1., und unten) zeigt in 35 von 158 Typisierungen keine eindeutigen Ergebnisse. Daher wurde ab Mai 2001 auf die Polymerase Ketten Reaktion (PCR, 2.13.3.2., und unten) umgestellt, was zu eindeutigen Ergebnissen führt.

Abbildung 4: Genotypisierung von IL-7^{-/-} Kandidaten. Vergleichende Darstellung von Southern Blot (A) und PCR (B).



A

In beiden Fällen wird genomische DNA mit Hilfe des DNEasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Für den Southern Blot (A, 3.13.3.1.) werden 10µg Ausgangs-DNA eingesetzt, anschließend wird mit der radioaktiv markierten IL-7 Sonde ein Bereich der restringierten DNA komplementiert, der im IL-7 Genlocus sowohl in der IL-7^{+/+}, als auch in der IL-7^{-/-} Variante vorhanden ist. So erhält man für den Fall der IL-7^{+/+} eine 6kb große Bande (untere Bande), im gendeletierten Fall wird durch die Insertion des Neomycin-Phosphotransferase-Gens eine 14kb-Bande (obere Bande) detektiert. Heterozygote Genotypen weisen beide Banden auf.



B

Für die PCR (B, 3.13.3.2.) werden lediglich 0,1-0,5µg DNA eingesetzt. Derselbe 5'-Primer wird in zwei Reaktionen eingesetzt. Er bindet in einer Region unmittelbar vor dem IL-7 Exon4. Ein 3'-Primer bindet innerhalb von Exon4. Da bei der Gendeletion Exon4 ausgeschnitten wird, muss im Falle einer Reaktion der Genotyp gleich IL-7^{+/+} sein (130bp). Mit dem alternativen 3'-Primer wird ein Fragment amplifiziert, welches bei der Geninsertion neu mit eingebracht worden ist (HSV-Promotor). In diesem Fall ist ein 295bp-Fragment zu erkennen. Heterozygote Genotypen weisen beide Fragmente auf.

4.1.3. Phänotypisierung der rückgekreuzten Tiere: Ausgangswerte der IL-7^{+/+} und IL-7^{-/-} Empfänger vor Transplantation

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der FACS-Analysen aus dem peripheren Blut von 12-14 Wochen alten IL-7^{+/+} und IL-7^{-/-} Mäusen an Tag -2 dargestellt. Diese Werte bilden die Ausgangswerte der Knochenmark-Empfänger vor Transplantation.

Zellen im PB	PB IL-7 ^{+/+} (n=12)		PB IL-7 ^{-/-} (n=12)		Signifikanz (p-Value)
	Absolut (x1000/mm ³)	%	Absolut (x1000/mm ³)	%	
Leukozyten	11,4 ± 4,3	100,0	2,4 ± 1,0	100,0	.0000004
Lymphozyten	10,3 ± 3,8	90,0	1,2 ± 0,4	49,0	.00000004
Neutrophile Granulozyten	0,7 ± 0,3	7,0	1,1 ± 0,7	41,0	n.s.
Eosinophile	0,2 ± 0,3	1,0	0,09 ± 0,04	4,0	n.s.
Basophile	0,09 ± 0,1	1,0	0,08 ± 0,06	3,0	n.s.
Monozyten	0,08 ± 0,1	1,0	0,07 ± 0,06	3,0	n.s.
Reife T-Zellen (TCRαβ⁺)	3,3 ± 1,6	31,6	0,4 ± 0,2	33,5	.0000016
Reife CD4⁺-Zellen (TCRαβ⁺/CD4⁺)	2,0 ± 1,0	18,5	0,04 ± 0,02	3,6	.0000007
Naive CD4 ⁺ -Zellen (CD4 ⁺ /CD45RB ^{high})	0,2 ± 0,1	10,0% CD4 ⁺	≤ 0,03	n.b.	.0006
Gedächtnis CD4 ⁺ -Zellen (CD4 ⁺ /CD45RB ^{low})	1,7 ± 0,8	90,0% CD4 ⁺	≤ 0,03	n.b.	.0000002
Reife CD8⁺-Zellen (TCRαβ⁺/CD8⁺)	1,2 ± 0,5	11,6	0,06 ± 0,04	5,2	.0000001
Naive CD8 ⁺ -Zellen (CD8 ⁺ /CD45RB ^{high})	1,2 ± 0,5	97,5% CD8 ⁺	≤ 0,03	n.b.	.0000002
Gedächtnis CD8 ⁺ -Zellen (CD8 ⁺ /CD45RB ^{low})	0,03 ± 0,01	2,5% CD8 ⁺	≤ 0,03	n.b.	.004
Doppelnegative T-Zellen (TCRαβ⁺/CD4⁻/CD8⁻)	0,2 ± 0,1	1,5	0,3 ± 0,1	24,7	.037
Reife B-Zellen (CD19⁺)	6,7 ± 2,3	65,5	0,05 ± 0,03	4,4	.000000001
Reife NK-Zellen (NK1.1⁺/TCRαβ⁻)	0,3 ± 0,2	3,3	0,4 ± 0,2	37,2	n.s.
Summe der reifen T- /B- / und NK-Zellen	10,3 ± 4,1	100,4	0,85 ± 0,43	75,1	

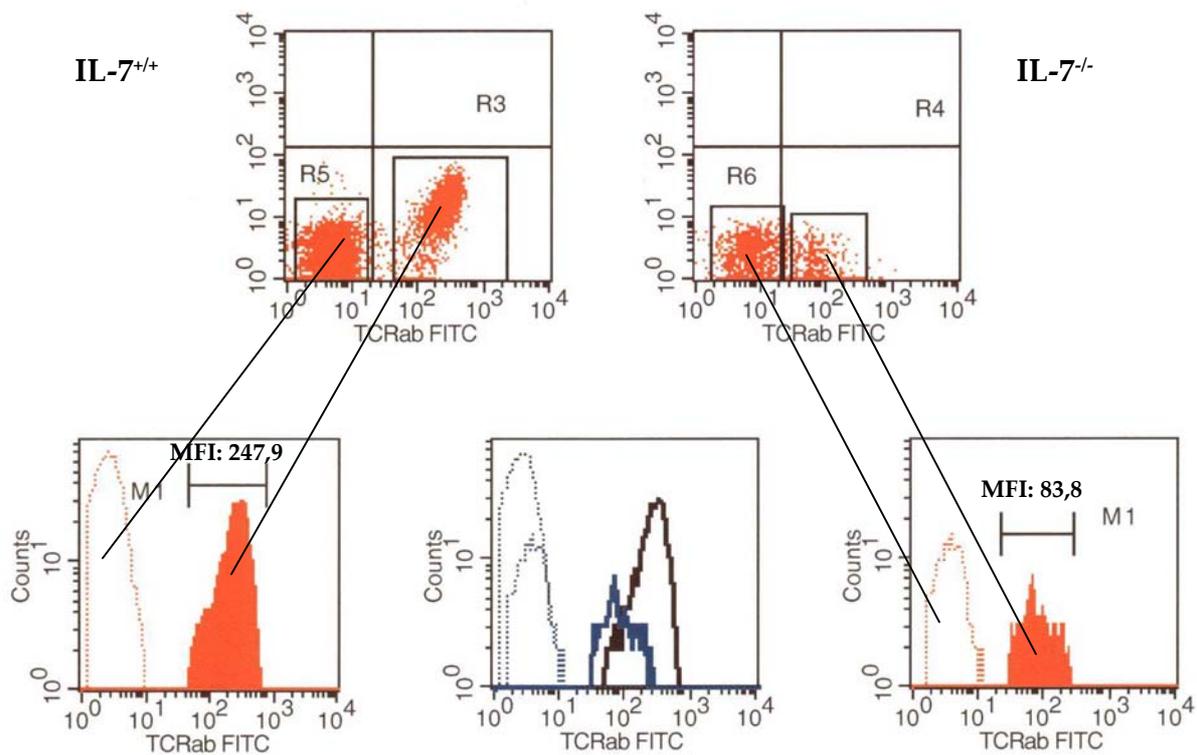
Tabelle 11: Phänotypischer Vergleich des peripheren Blutes (PB) von IL-7^{+/+} und IL-7^{-/-} Mäusen am Tag -2. Von je n=12 12-14 Wochen alten weiblichen Tieren wurde das periphere Blut isoliert (3.14.4.1.), und ein differenziertes Blutbild erstellt. Nach Färbung der PBMNC mit Antikörpern wurden diese durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist der jeweils absolute Zahlenwert mit seiner Standardabweichung sowie sein relativer Anteil an den Lymphozyten im peripheren Blut. Mit Hilfe des Studentischen T-Tests ermittelte Signifikanzen beziehen sich auf die Mittelwerte der Absolutwerte; n.s. bedeutet nicht signifikant, n.b. heißt nicht bestimmbar.

In der IL-7^{-/-} Maus findet sich eine signifikante Lymphopenie. Bei den Lymphozytensubpopulationen sind insbesondere die T- und B-Zellen bei der IL-7^{-/-} Maus signifikant erniedrigt, während die gleiche Anzahl an NK-Zellen in IL-7^{-/-} und IL-7^{+/+} Mäusen nachgewiesen wird. Die Summe aus reifen T-, B- und NK-Zellen ergeben bei den IL-7^{+/+} Mäusen 100% der Lymphozyten, während bei den IL-7^{-/-} Mäusen nur 75% der Lymphozyten diesen Zellen zugeordnet werden können. Interessanterweise machen dabei die DN T-Zellen mehr als 70% aller T-Zellen des peripheren Blutes der IL-7^{-/-} Maus aus; damit haben sie signifikant mehr DN T-Zellen als IL-7^{+/+} Mäuse.

Bei den Subpopulationen der Granulozyten, den Neutrophilen, den Eosinophilen, und den Basophilen, aber auch bei den Monozyten, liegt für die IL-7^{+/+} kein signifikanter Unterschied gegenüber den IL-7^{-/-} Tieren vor.

4.1.4. Die Anzahl der $\alpha\beta$ T-Zellrezeptoren auf den T-Zellen der IL-7^{+/+} und IL-7^{-/-} Empfänger vor Transplantation

Eine weitere Auffälligkeit bei der Analyse der lymphozytären Ausgangszahlen vor KMT besteht bei der unterschiedlich vorhandenen Anzahl an $\alpha\beta$ T-Zellrezeptoren auf den T-Zellen der untersuchten Tiere. Als Maß dafür gilt die nach Antikörperkopplung gemessene Fluoreszenzintensität MFI (‘mean fluorescent intensity’) im FACS (s. Histogrammanalyse 1). Hierbei zeigen die T-Zellen der IL-7^{+/+} Mäuse (n=12) mit einem MFI-Wert von im Mittel 252±8 eine etwa doppelt so hohe Fluoreszenzintensität wie die T-Zellen der IL-7^{-/-} Maus (n=11) mit einem MFI-Wert von im Mittel 123±26. Man kann also davon ausgehen, dass die T-Zellen der IL-7^{-/-} Mäuse damit auch nur etwa halb so viel TCR $\alpha\beta$ Rezeptoren auf der Oberfläche exprimieren wie die IL-7^{+/+} Mäuse.



Histogrammanalyse 1: Nach Färbung mit Antikörpern gegen $\alpha\beta$ TCR auf Lymphozyten des peripheren Blutes wird im FACS die Anzahl der $\alpha\beta$ T-Zellrezeptoren (obere Reihe) in Form der Fluoreszenzintensität (MFI = mean fluorescent intensity) im Histogramm dargestellt. Auf der linken Seite sind repräsentative Ergebnisse aus einer IL-7^{+/+} Maus, auf der rechten Seite die einer IL-7^{-/-} Maus gezeigt. In der Mitte sind die Histogramme zum direkten Vergleich übereinander gelegt; entsprechend den im Weiteren verwendeten Farben stellen die schwarzen Kurven den Wildtyp dar, die blauen Linien stehen für die IL-7^{-/-}. Die schmalen gestrichelten Linien zeigen den ungefärbten Hintergrund an, die fetten Linien geben den Anteil an TCR $\alpha\beta$ -Zellen wieder. Deutlich ist der Unterschied der beiden MFIs zu erkennen.

4.2. Nachweis der Aplasiogenität und Letalität der Konditionierung

Um zu untersuchen ob die gewählte Bestrahlungsdosis aplasiogen und letal ist, wird die Konditionierung bei n=3 Mäusen durchgeführt, ohne dass anschließend Knochenmark transplantiert wird. Vor Bestrahlung liegt der Wert der Leukozyten im Mittel bei 7700/ μ l bzw. der Lymphozyten bei 6700/ μ l. Sieben Tage nach der Bestrahlung sinkt die Leukozytenzahl auf 50-100/ μ l, Lymphozyten sind nicht mehr nachzuweisen. Innerhalb der nächsten drei Tage versterben alle Tiere. In anschließenden tierpathologischen Untersuchungen zeigt sich eine vollständige Aplasie sowohl des peripheren Blutes als auch des Knochenmarks.

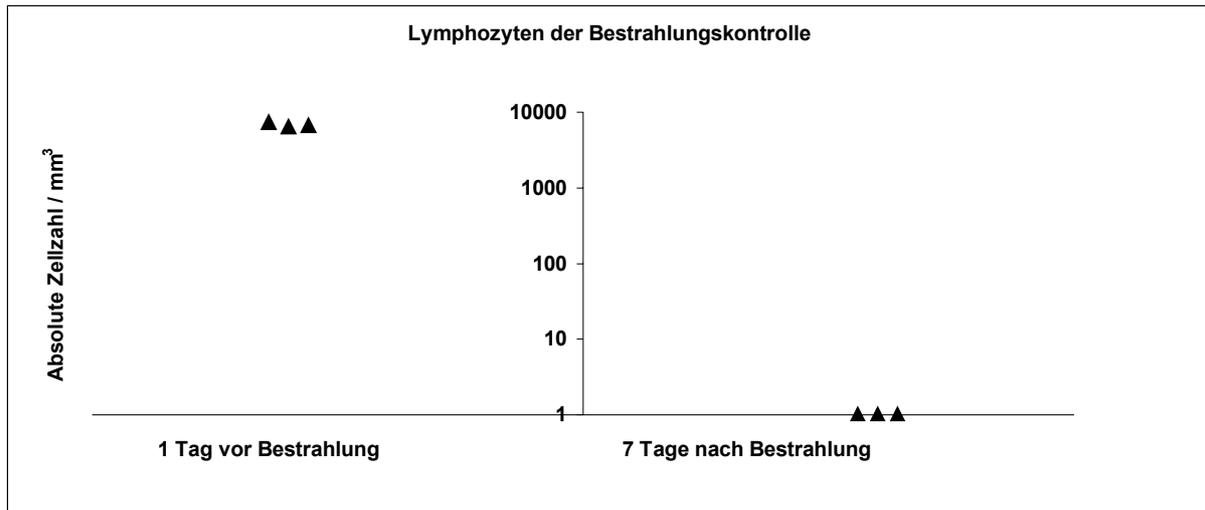


Abbildung 5: Lymphozyten der Bestrahlungskontrollen. Den zu bestrahlenden Tieren (n=3) wurde an den angegebenen Tagen relativ zur Bestrahlung Blut über die Schwanzvene abgenommen und die Zusammensetzung durch Auswertung des Differenzierten Blutbild bestimmt. Der Wert lag für die Lymphozyten vor der Bestrahlung (Σ 900cGy) im Mittel bei 6700/ μ l, danach waren im Blutausrich keine Lymphozyten mehr nachweisbar.

4.3. Nachweis der Anwesenheit der Spender-Zellen (Spender-Engraftment)

Am Tag+14 nach KMT ist in allen vier Transplantationsgruppen ein leukozytäres Engraftment nachweisbar (Gruppe I: 3967 ± 2099 , Gruppe II: 2167 ± 1660 , Gruppe III: 5550 ± 4846 und Gruppe IV: 2083 ± 1246 Leukozyten/ μ l). Am Tag+35 nach KMT wird den Mäusen erneut Blut abgenommen, um die Präsenz des männlichen Y-Chromosoms mit Hilfe der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung zu detektieren (s. Abbildung 6). Bei allen 23 überlebenden Tieren, die transplantiert worden sind, kann fünfunddreißig Tage nach KMT nach Auszählung von 100-200 Zellkernen ein Spender-Chimärismus von mehr als 98% nachgewiesen werden. Damit ist gezeigt, dass die Rekonstitution der kernhaltigen Zellen zu diesem Zeitpunkt heterolog, d.h. durch gespendete Zellen erfolgt ist; eine autologe Rekombination durch eigene Zellen ist nicht eingetreten.

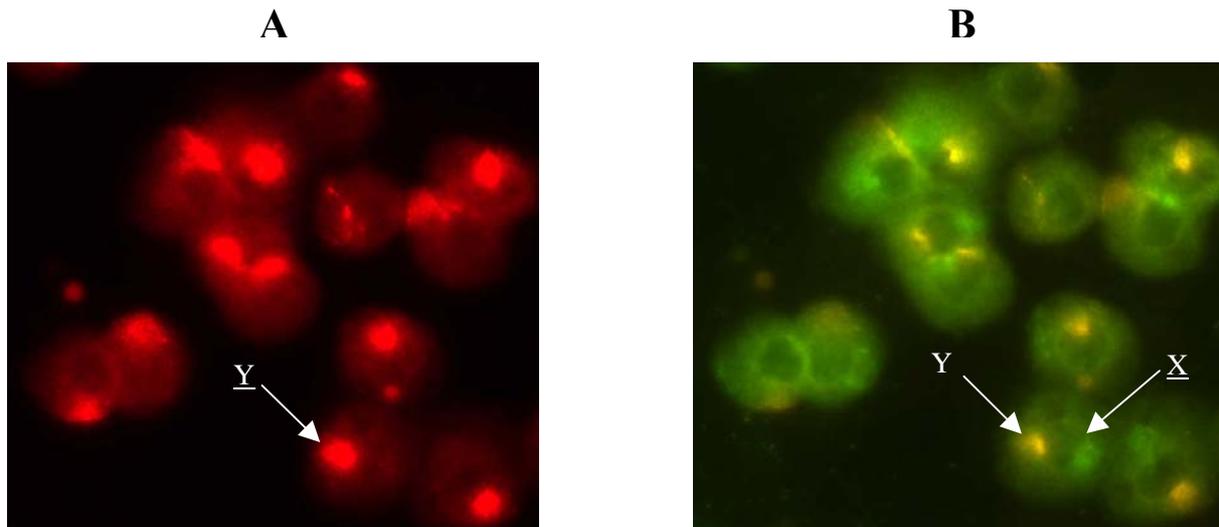


Abbildung 6: Zellkernaufnahme eines identischen Bildausschnitts nach Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung (FISH) am Tag+35 nach KMT mit roter (A) oder grüner (B) Anregung. Die Erythrozyten werden durch Behandlung mit 3%iger Essigsäure lysiert, so dass nur Leukozyten verbleiben. Diese werden in einer Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht und anschließend von ihren Proteinen und Lipiden befreit (3.14.3.5.1.). Lediglich die Nuklei bleiben zurück und werden zusammen mit Ganzchromosom-Sonden (QBIOGene) hybridisiert. Die Sonde für das Y-Chromosom als Nachweis für eine männliche Spenderzelle ist an Rhodamin gekoppelt und leuchtet bei Anregung mit Licht aus einem 590nm Bandpass-Filter rot (s. beispielhaft Pfeil Y in A). Die Sonde für das X-Chromosom ist an Fluoreszein gekoppelt und leuchtet bei Anregung mit Licht aus einem 515nm Bandpass-Filter grün (s. Pfeil X in B). In diesem FISH ist das rote Leuchten des Y-Chromosoms allerdings so stark, dass es sogar mit durch den Grünfilter dringt, wie in B als gelblich-oranger Schatten zu sehen (s. Y-Pfeil).

4.4. Zelluläre Zusammensetzung des Knochenmark-Transplantates

Die erzielte Gesamtausbeute der Knochenmarkisolation (je n=5) beträgt bei den IL-7^{+/+} im Mittel $6,4 \pm 0,5 \times 10^7$ kernhaltige KM-Zellen, bei den IL-7^{-/-} $4,6 \pm 1,9 \times 10^7$ kernhaltige KM-Zellen. Alle Empfänger werden mit $1,0 \times 10^7$ kernhaltigen KM-Zellen transplantiert. Die Anzahl der Lymphozyten im Transplantat liegt zwar im IL-7^{+/+} Transplantat signifikant höher als im IL-7^{-/-} Transplantat (61,5% zu 50,3%, p=.027), die Differenz erklärt sich jedoch vorwiegend durch das Fehlen von B-Zellen im IL-7^{-/-} KM (s. Tabelle 12).

Der Anteil an Granulozyten ist im IL-7^{-/-} Transplantat signifikant höher als im IL-7^{+/+} Transplantat (33,9% zu 26,7%, p=.015).

Zellen im Transplantat	IL-7 ^{+/+} KM-Transplantat		IL-7 ^{-/-} KM-Transplantat		Signifikanz (p-Value)
	Absolutwert (x10 ⁶)	%	Absolutwert (x10 ⁶)	%	
Lymphozyten	6,15 ± 0,66	61,5	5,03 ± 0,66	50,3	.027
Granulozyten	2,67 ± 0,37	26,7	3,39 ± 0,39	33,9	.015
Reife T-Zellen (TCRαβ⁺)	0,83 ± 0,17	8,3	1,05 ± 0,23	10,5	n.s.
Reife CD4⁺-Zellen (TCRαβ⁺/CD4⁺)	0,43 ± 0,04	4,3	0,34 ± 0,12	3,4	n.s.
Naive CD4 ⁺ -Zellen (CD4 ⁺ /CD45RB ^{high})	0,27 ± 0,03	57,0% CD4 ⁺	0,16 ± 0,04	47,0% CD4 ⁺	.001
Gedächtnis CD4 ⁺ -Zellen (CD4 ⁺ /CD45RB ^{low})	0,21 ± 0,04	43,0% CD4 ⁺	0,17 ± 0,84	53,0% CD4 ⁺	n.s.
Reife CD8⁺-Zellen (TCRαβ⁺/CD8⁺)	0,51 ± 0,05	5,1	0,35 ± 0,07	3,5	.003
Naive CD8 ⁺ -Zellen (CD8 ⁺ /CD45RB ^{high})	0,32 ± 0,02	63,0% CD8 ⁺	0,13 ± 0,02	44,0% CD8 ⁺	.000001
Gedächtnis CD8 ⁺ -Zellen (CD8 ⁺ /CD45RB ^{low})	0,18 ± 0,01	37,0% CD8 ⁺	0,17 ± 0,03	56,0% CD8 ⁺	n.s.
Doppelnegative T-Zellen (TCRαβ⁺/CD4⁻/CD8⁻)	0,13 ± 0,03	1,3	0,12 ± 0,09	1,2	n.s.
Reife B-Zellen (CD19⁺)	1,96 ± 0,22	19,6	0,17 ± 0,04	1,7	.00000007
Reife NK-Zellen (NK1.1⁺/TCRαβ⁻)	0,11 ± 0,03	1,1	0,13 ± 0,02	1,3	n.s.
Hämatopoetische Vorläuferzellen (CD117⁺)	1,64 ± 0,29	16,4	2,16 ± 0,18	21,6	.0002
Hämatopoetische Stammzellen (Sca-1⁺)	1,17 ± 0,33	11,7	0,50 ± 0,15	5,0	.00001
Stromazellen	0,82 ± 0,13	8,2	1,03 ± 0,19	10,3	n.s.

Tabelle 12: Vergleich der Zusammensetzung von je 1,0x10⁷ kernhaltigen KM-Zellen/200µl zwischen IL-7^{+/+} und IL-7^{-/-} Transplantat. Aus je n=5 männlichen Knochenmark-Spendern wurde das Knochenmark isoliert (3.14.3.1.). Nach Färbung der Knochenmark-MNC mit Antikörpern wurden diese durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist der jeweils absolute Zahlenwert mit seiner Standardabweichung sowie sein relativer Anteil am Transplantat. Mit Hilfe des Studentischen T-Tests ermittelte Signifikanzen beziehen sich auf die Mittelwerte der Absolutwerte; n.s. bedeutet nicht signifikant.

Ein Unterschied besteht in der etwas niedrigen Anzahl an CD8⁺ Zellen im IL-7^{-/-} KM, die durch das Fehlen naiver CD8⁺ Zellen bedingt ist. Interessanterweise weisen die Stammzellen im KM der IL-7^{-/-} Mäuse einen etwas differenzierteren Phänotyp auf; es finden sich bei den IL-7^{-/-} Mäusen signifikant mehr Vorläuferzellen (CD117⁺; ⁽⁶¹⁾), während bei den IL-7^{+/+}Mäusen signifikant mehr undifferenzierte Stammzellen (Sca-1⁺; ⁽⁸¹⁾) nachweisbar sind;. Im IL-7^{+/+} ist gegenüber den IL-7^{-/-} Tieren eine signifikant erhöhte Anzahl an reifen CD8⁺-Zellen (p= .003) zu erkennen.

Der Anteil der Stromazellen (CD106⁺/CD117^{low}; ⁽⁸⁷⁾) am IL-7^{+/+} Transplantat beträgt 8,2%, im IL-7^{-/-} Transplantat ist er zu 10,3% enthalten. Mit p= .06 ist der Unterschied nicht signifikant.

Zwischenzusammenfassung I:

Die Hypothese I lässt sich bestätigen. Durch Rückkreuzung lässt sich genotypisch und phänotypisch eine C57BL/6 IL-7^{-/-} Mauslinie herstellen. Charakteristisch für den Phänotyp der C57BL/6 IL-7^{-/-} Maus ist die ausgeprägte Lymphopenie. Die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen vor KMT im PB zeigt ein beinahe komplettes Fehlen der B-Zellen und eine ungewöhnliche Expansion von DN T-Zellen. Das KM-Transplantat von IL-7^{-/-} Spendern hat zwar signifikant weniger Lymphozyten, B-Zellen, CD8⁺-Zellen und naive CD4⁺-Zellen, doch enthält es signifikant mehr neutrophile Granulozyten. Sowohl mit IL-7^{+/+} als auch mit IL-7^{-/-} Transplantat lässt sich ein dauerhaftes Spenderengraftment erreichen. Im Folgenden wird das Überleben innerhalb der verschiedenen Transplantationsgruppen dargestellt.

4.5. Einfluß von IL-7 auf das Überleben von transplantierten Mäusen

4.5.1. Überleben der transplantierten Tiere bis Tag+140 nach KMT

Insgesamt haben von den dargestellten Gruppen bis zum Tag+140 nach KMT 23 von 40 Tieren überlebt (s. Tabelle 13). Abbildung 7 zeigt eine genaue zeitliche Darstellung des Überlebens nach Kaplan-Meier.

Knochenmark-Spender		Anzahl Mäuse	Leben	Verstorben	Überlebensrate (in %)
Spender	Empfänger				
IL-7 +/+	IL-7 +/+	7	6	1	85,7
Wildtyp	Wildtyp				
IL-7 -/-	IL-7 +/+	10	6	4	60,0
knockout	Wildtyp				
IL-7 +/+	IL-7 -/-	12	6	6	50,0
Wildtyp	knockout				
IL-7 -/-	IL-7 -/-	11	5	6	45,5
knockout	knockout				
Insgesamt:		40	23	17	60,3

Tabelle 13: Überleben der transplantierten Tiere am Tag+140.

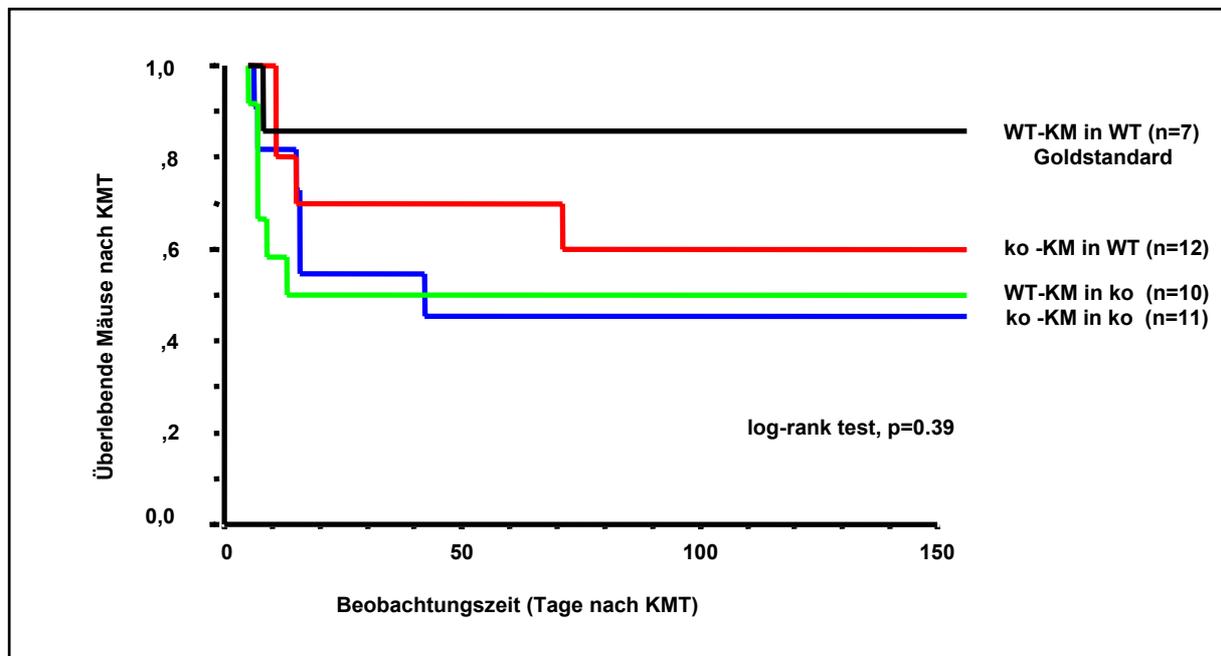


Abbildung 7: Überleben der transplantierten Mäuse nach Kaplan-Meier (Vergleich aller Konstellationen miteinander). Die Zahl der Tiere in den jeweiligen Transplantationsgruppen wird gleich 1,0 gesetzt (Y-Ordinate). Im Verlauf der Beobachtungszeit (X-Ordinate) wird das Ableben eines Tieres (durch Krankheit oder Tötung) mit einem Absinken der Kurve dargestellt. Das Maß für diese Erniedrigung bezieht sich auf seinen Ausgangswert, der innerhalb der Gruppen unterschiedlich ist.

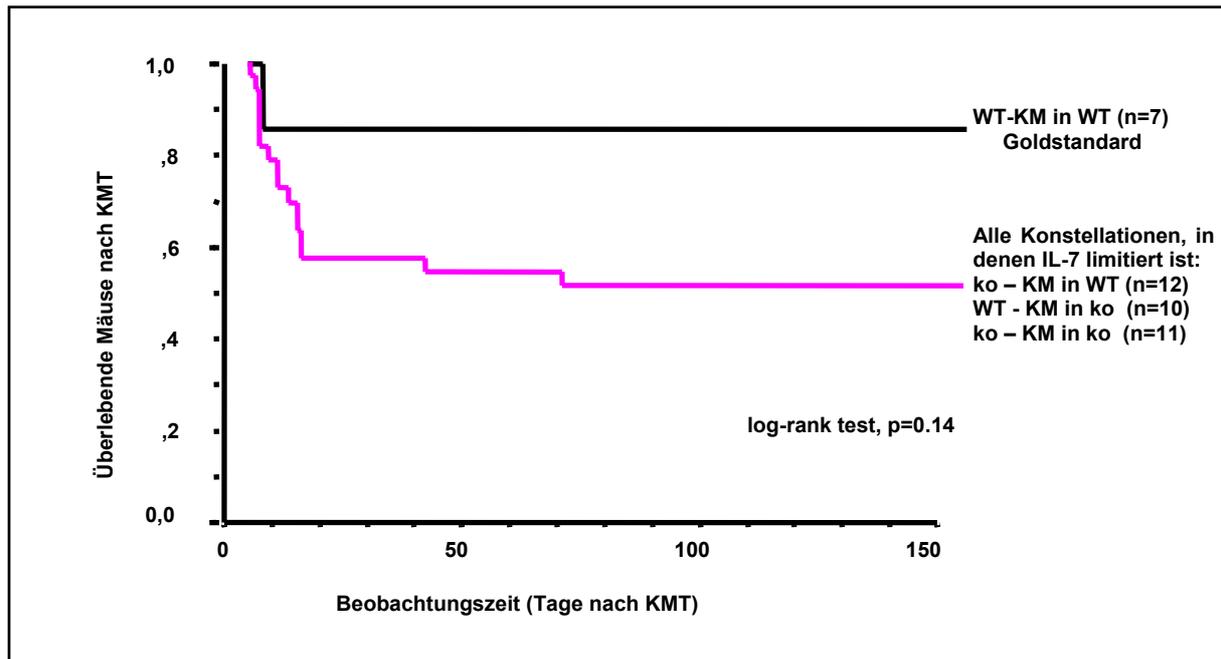


Abbildung 8: Überleben der transplantierten Mäuse nach Kaplan-Meier (Vergleich Goldstandard mit IL-7 limitierten Konstellationen). Die Zahl der Tiere in den jeweiligen Transplantationsgruppen wird gleich 1,0 gesetzt (Y-Ordinate). Im Verlauf der Beobachtungszeit (X-Ordinate) wird das Ableben eines Tieres (durch Krankheit oder Tötung) mit einem Absinken der Kurve dargestellt. Das Maß für diese Erniedrigung bezieht sich auf seinen Ausgangswert, der innerhalb der Gruppen unterschiedlich ist.

Im direkten Vergleich aller transplantierten Gruppen miteinander ergibt sich kein signifikanter Unterschied für das bevorzugte Überleben einer einzelnen Gruppe (s. Abb. 7). Stellt man dem Goldstandard die drei anderen transplantierten Gruppen zusammengefaßt gegenüber, zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied für das Überleben des Goldstandards (s. Abb. 8), aber ein deutlicher Trend zu einem schlechteren Überleben in den Konstellationen, in denen IL-7 limitiert ist, wird erkennbar.

4.5.2. Todesursachen der verstorbenen transplantierten Tiere bis Tag+140

Von den dargestellten Gruppen sind insgesamt bis zum Tag+140 nach KMT 17 Tiere gestorben, 7 Tiere sind davon getötet worden. (siehe 3.14.1.3., Kriterien für eine vorzeitige Tötung; Punkt 1.6.5 des genehmigten Tierversuchantrages Az.: 23.05.230-3-12/00). Die frisch verstorbenen oder getöteten Tiere wurden in der hiesigen Tierversuchsanlage pathologisch untersucht. Es wird sowohl nach makroskopischen

Veränderungen des Tieres bzw. der Organe gesucht, als auch die Besiedlung mit bakteriellen Erregern überprüft. Weil der Tod viermal einige Zeit unentdeckt blieb (z.B. 24 Stunden nach der letzten Kontrolle oder an einem Wochenende), so dass autolytische Prozesse bereits eingesetzt hatten, war eine genaue Untersuchung nicht mehr möglich. Die Todesursachen sind in Tab. 14 aufgeführt:

Todesursache	Zeitpunkt des Ablebens nach KMT				Gesamthäufigkeit	
	WT-WT	WT-ko	ko-WT	ko-ko	absolut	relativ (%)
Sepsis	Tag 9 (*)	Tag 13	Tag 11 (*) Tag 15	Tag 16 Tag 16 Tag 43 (*)	7	41,2
Tympanie (Aufgasung)		Tag 5 Tag 7 (*) Tag 9 (*)		Tag 6 (*) Tag 7 (*)	5	29,4
Herzinsuffizienz			Tag 72		1	5,9
Ursache unbekannt, Autolyse eingesetzt		Tag 7 Tag 7	Tag 11	Tag 15	4	23,5
Gesamt verstorben	1	6	4	6	17	100
Davon getötet (*)	1	2	1	3	7	41,2

Tabelle 14: Todesursache und Todestag der verstorbenen transplantierten Tiere bis Tag+140 nach KMT. Der Median für den Zeitpunkt des Ablebens beträgt bei den IL-7^{+/+} Empfängern 11 Tage, und bei den IL-7^{-/-} Empfängern 8 Tage. Hat die Autolyse eingesetzt ist eine genaue Bestimmung der Todesursache nicht mehr zu ermitteln. Die mit (*) gekennzeichneten Tiere sind gemäß den im Tierversuchsantrag vorgegebenen Kriterien getötet worden.

Bei der Sepsis ist der tierpathologische Nachweis verschiedener Erreger in z.T. mehreren Organen (Lunge, Leber, Milz, Caecum oder Dünndarm) gelungen (s. Tabelle 15).

Tier	Lunge	Leber	Milz	Caecum	Dünndarm
WT-WT 4	Serratia liquefaciens	Serratia liquefaciens	Serratia liquefaciens	Serratia l. + Ent. faecalis	Serratia liquefaciens
ko-WT 1	kN	kN	kN	kN	Ent. faecalis
ko-WT 9	kN	kN	kN	kN	Ent. faecalis
WT-ko 8	Ent. faecalis	kN	kN	kN	kN
ko-ko 6	Staph. xylosus + Ent. faecalis	Staph. xylosus + Ent. faecalis	kN	kN	kN
ko-ko 7	Ent. faecalis	Ent. faecalis	kN	kN	kN
ko-ko 9 ^(A)	kN	kN	kN	kN	kN

Tabelle 15: Die Erreger der an Sepsis verstorbenen 7 Tiere. kN steht für kein Nachweis (z.T. auch wegen einsetzender Autolyse oder Kannibalismus nicht mehr möglich). Ent. faecalis steht für Enterococcus faecalis, Staph. xylosus für Staphylococcus xylosus. ^(A): Trotz Fehlen des Erregernachweises deuten makroskopisch-histologische Befunde auf eine Sepsis hin.

Unter Tympanie bzw. Aufgasung ist ein mit bakteriell produzierten Gasen gefüllter Magen und/oder auch Darm zu verstehen, der u.a. das Zwerchfell so stark eindrückt, dass ein Atmen nicht mehr möglich ist. Dies führt zu auffälligem, gestörten Allgemeinbefinden, was zur vorzeitigen Tötung des Tieres gemäß Tierversuchsantrag führt.

Tier	Lunge	Leber	Milz	Caecum	Dünndarm
WT-ko 5	βh E. coli + vergrünende Sporenbildner	Past. pneu. + vergrünende Sporenbildner	kN	kN	βh E. coli
WT-ko 6	kN	kN	kN	kN	kN
WT-ko 9	kN	Enterococcus faecalis	kN	Enterococcus faecalis	Enterococcus faecalis
ko-ko 2	Enterobacter cloacis + vergrünende Sporenbildner	Enterobacter cloacis + vergrünende Sporenbildner	vergrünende Sporenbildner	kN	Enterobacter cloacis
ko-ko 11	kN	kN	kN	kN	kN

Tabelle 16: Die Erreger der an Tympanie (Aufgasung) verstorbenen 5 Tieren. βh E. coli steht für β-hämolyisierende Echerichia coli, Past. pneu für Pastorella pneumocystis, und kN für kein Nachweis (z.T. auch wegen einsetzender Autolyse oder Kannibalismus nicht mehr möglich).

Bei vier Tieren, einem Tier der Gruppe III, sowie drei Verstorbenen der Gruppe IV waren Ergebnisse der Blutabnahme am Tag+14 kurz vor dem Tod verfügbar. Alle anderen Tiere sind entweder vor dieser ersten Blutabnahme nach KMT verstorben, oder sie zeigen im weiteren Verlauf ein normales hämatopoetisches Engraftment.

Tiere an Tag 14	Leukozyten (x1000/mm ³)	Lymphozyten	Neutrophile Granulozyten	Eosinophile	Basophile	Monozyten
ko-WT 9	0,05	10 %	0	0	0	0
Restgruppe III (n=7)	4,9	61 %	31 %	4 %	2 %	2 %
ko-ko 1	0,85	10 %	62 %	4 %	10 %	12 %
ko-ko 6	0,15	0	1 (total)	0	0	0
ko-ko 7	0,0	0	0	0	0	0
Restgruppe IV (n=6)	2,1	43 %	47 %	1 %	5 %	3 %

Tabelle 17: Übersicht über das differenzierte Blutbild ausgewählter Gruppen am Tag+14 mit individueller Darstellung der unmittelbar danach verstorbenen Tiere. In allen Fällen ist IL-7^{-/-} KM transplantiert worden; in der oberen Gruppe in IL-7^{+/+} (Gruppe III), in der unteren Gruppe in IL-7^{-/-} Empfänger (Gruppe IV, Negativkontrolle). WT bedeutet IL-7^{+/+}, ko steht für IL-7^{-/-}.

Aus den Daten (siehe Tabelle 17) ist deutlich ersichtlich, dass die vier später verstorbenen Tiere im PB eine Lymphopenie zeigten.

Im Peripheren Blut der verstorbenen Tiere sind z.T. keine Neutrophilen Granulozyten nachzuweisen (Tabelle 17, siehe Tier ko-WT 9 oder ko-ko 6). Daher wurden Organe histologisch untersucht, um ein mögliches Nonengraftment zu überprüfen. Die Auswertung verschiedener zytopathologischer Aufnahmen nach Granulozyten-spezifischem Anfärbeverfahren (Abbildungen 9 und 10) spricht gegen ein Nonengraftment. Aufgrund der kurzen Lebensdauer der Neutrophilen Granulozyten (4-6 Tage), sind die an Tag+14 detektierten Granulozyten mit großer Wahrscheinlichkeit keine autologen Zellen, sondern stammen aus dem Knochenmark-Transplantat. Die Anwesenheit von Spender-Granulozyten in den Organen der Empfänger spricht *für* ein Engraftment des transplantierten Knochenmarks, und konnte in allen zur Verfügung stehenden Gewebeschnitten der verstorbenen Tiere validiert werden.

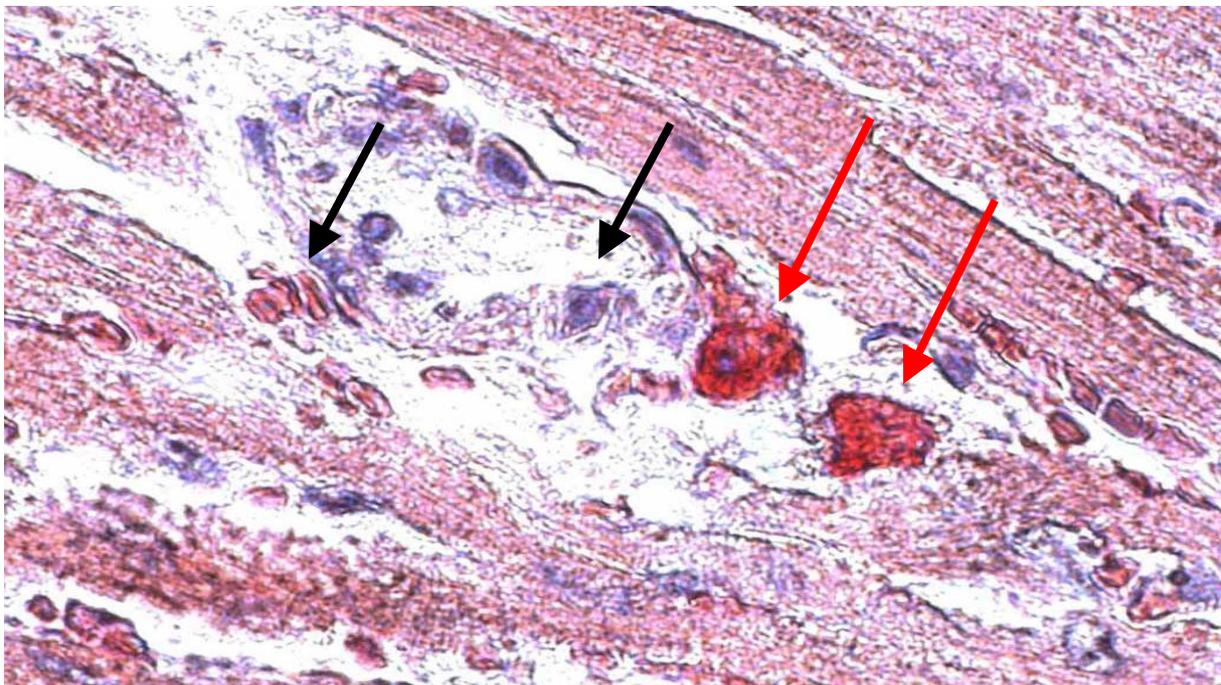


Abbildung 9: 63-fach vergrößerter Ausschnitt aus dem Herz von Maus ko-WT 9, verstorben an Sepsis (Chlor Aceton Esterase Färbung, Inverses Durchlichtmikroskop). Es sind in dieser Vergrößerung zwei aus einem Kapillargefäß ausgewanderte segmentkernige (neutrophile) Granulozyten (rote Pfeile) neben den sie umgebende Lymphozyten und Erythrozyten zu erkennen (schwarze Pfeile).

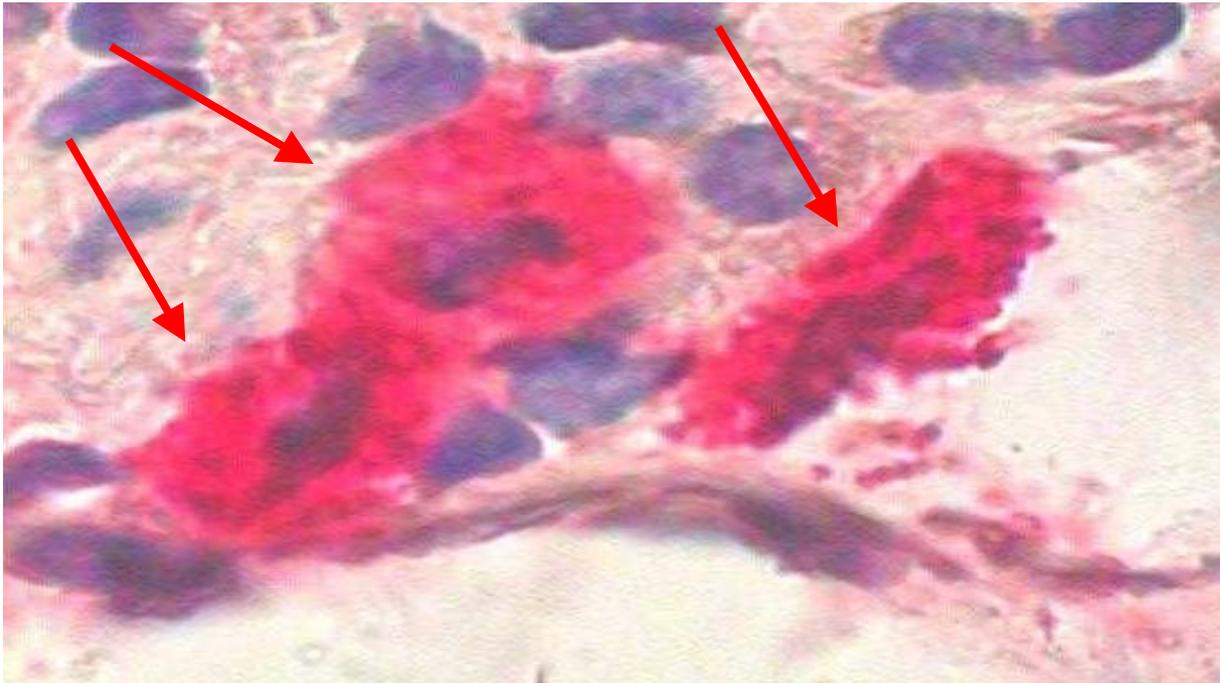


Abbildung 10: 100-fach vergrößerter Ausschnitt aus der Milz von Maus ko-ko 6, ebenfalls an Sepsis verstorben (Chlor Aceton Esterase Färbung, Inverses Durchlichtmikroskop). Es sind in dieser Vergrößerung drei aus einem Kapillargefäß ausgewanderte segmentkernige (neutrophile) Granulozyten zu erkennen (rote Pfeile).

Zwischenzusammenfassung II:

Die Hypothese II wird nur zum Teil bestätigt. Das Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger und im Transplantat führt zu einem schlechteren Überleben als bei Transplantation von IL-7^{+/+} KM in IL-7^{+/+} Empfänger. Ursache für ein schlechteres Überleben bei Konstellationen, in denen IL-7 limitiert ist, sind Infektionen, die früh nach Transplantation auftreten. In keinem der Fälle ist ein Nonengraftment nachweisbar. Überraschenderweise ist ein dauerhaftes Überleben auch dann möglich, wenn eine letal bestrahlte IL-7^{-/-} Maus ein IL-7^{-/-} Transplantat erhält, d.h. wenn keine IL-7 produzierende Zellen zur Verfügung stehen.

Einfluß von IL-7 auf die myelomonozytäre und lymphozytäre Rekonstitution

4.6. Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger

4.6.1. Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Monozyten

Die Rekonstitution der neutrophilen Granulozyten nach KMT ist in beiden Konstellationen bereits nach 14 Tagen abgeschlossen (IL-7^{+/+} Empfänger: 1095±715/μl, und IL-7^{-/-} Empfänger: 963±760/μl) (Abb. 11). Bei Goldstandard und IL-7^{-/-} Empfänger wird der Mittelwert der Ausgangswerte nach mehr als 140 Tagen um 293% (1979±634/μl) bzw. 184% (1688±536/μl) übertroffen. Während der gesamten Beobachtungszeit zeigen die Werte zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied.

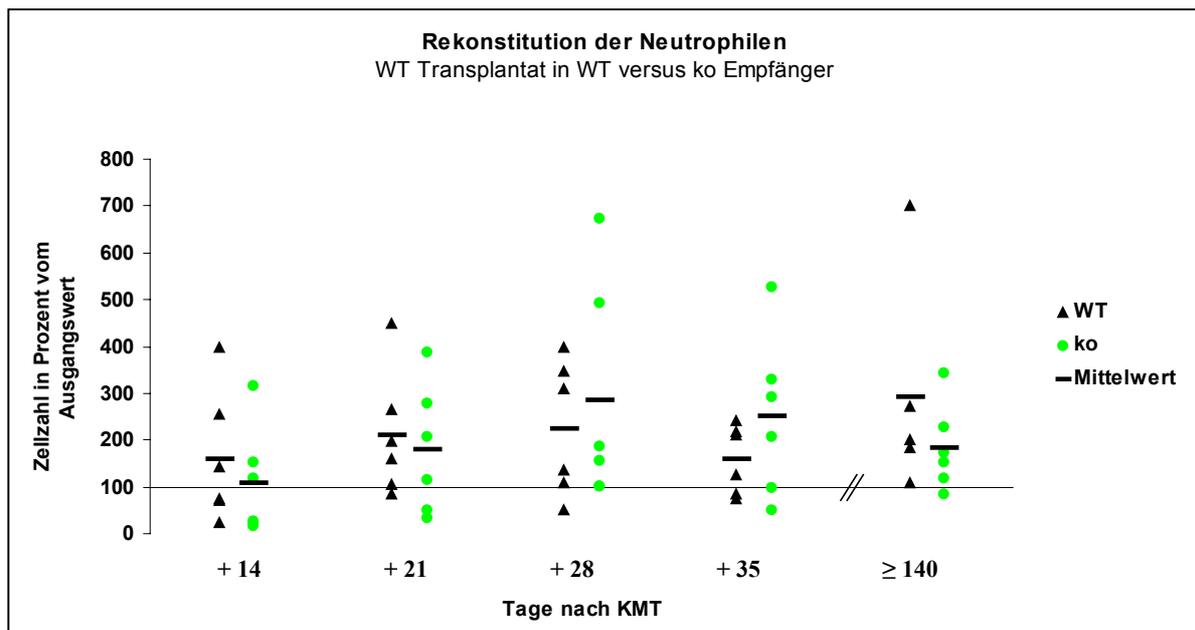


Abbildung 11: Rekonstitution der Neutrophilen Granulozyten. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

Die Eosinophilen sind beim Goldstandard am Tag+28 rekonstituiert (223±/178/μl) und am Tag ≥140 auf im Mittel 302% des Ausgangsmittelwertes angestiegen (590±/375/μl). Bei den IL-7^{-/-} Empfängern ist die Rekonstitution der Eosinophilen ebenfalls an Tag+28 abgeschlossen (149±/180/μl), und ein Anstieg auf 235% des Ausgangsmittelwertes nach 140 Tagen ist zu verzeichnen (203±/78/μl). Auch bei den

Basophilen (Rekonstitution am Tag+14) und den Monozyten (Rekonstitution am Tag+28) ist mit 457% bzw. 389% am Tag ≥ 140 beim Goldstandard, und mit 224% bei den Basophilen (Rekonstitution am Tag+14) bzw. 143% bei den Monozyten (Rekonstitution ebenfalls am Tag+14) bei den IL-7^{-/-} Empfängern eine Erhöhung gegenüber den Ausgangsmittelwerten zu verzeichnen.

4.6.2. Lymphozyten

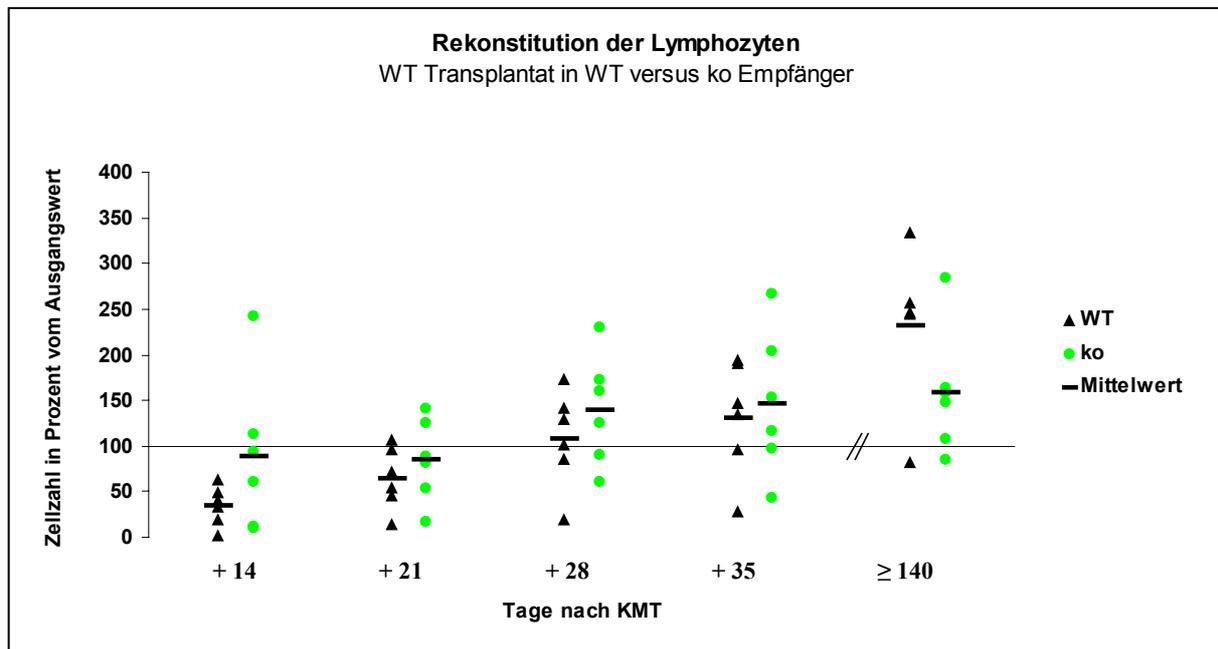


Abbildung 12: Rekonstitution der Lymphozyten. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

Die Rekonstitution der Lymphozyten (Abb. 12) ist an Tag+28 in beiden Konstellationen abgeschlossen. Beim Goldstandard wird der Ausgangsmittelwert nach mehr als 140 Tagen um 233% übertroffen ($17271 \pm 6682/\mu\text{l}$), bei den IL-7^{-/-} Empfängern um 158% ($1600 \pm 168/\mu\text{l}$). Zwischen den Gruppierungen bestehen bezüglich der Rekonstitution der Gesamtlymphozytenzahl zu keinem Zeitpunkt signifikanten Unterschiede. Dieser Befund ist zunächst unerwartet, bei der Untersuchung der lymphozytären Subpopulationen zeigen sich aber im Folgenden signifikante Unterschiede in der Rekonstitution zwischen IL-7^{+/+} und IL-7^{-/-} Empfängern.

4.6.3. T-Zellen

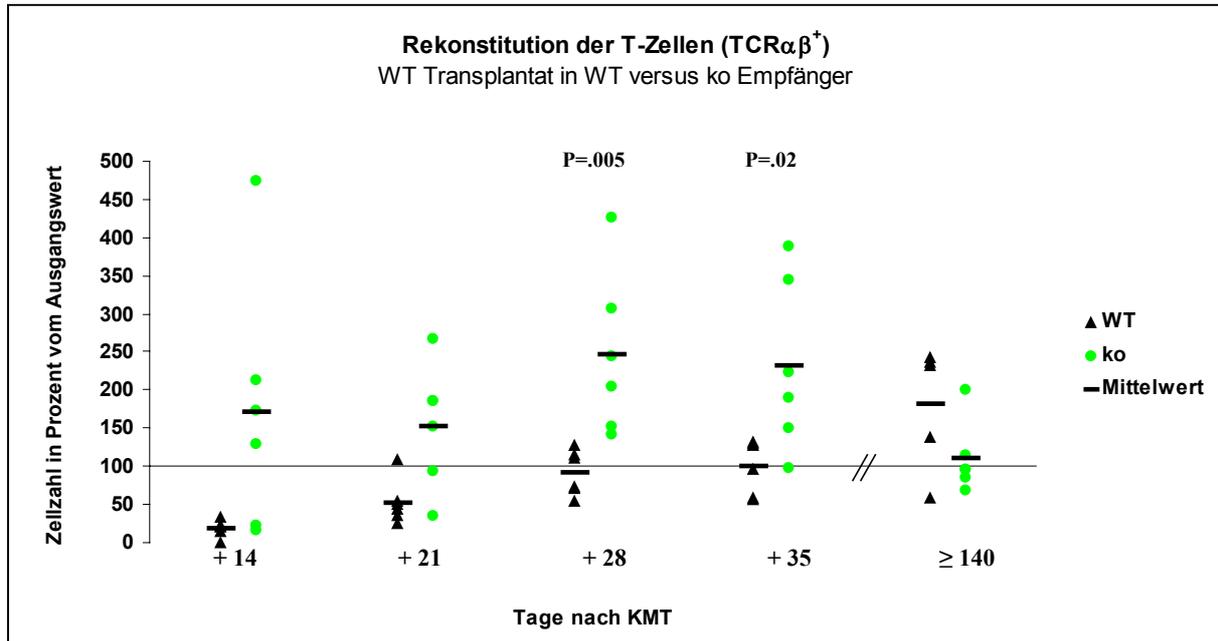


Abbildung 13: Rekonstitution der T-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

Beim Goldstandard benötigt die Rekonstitution der T-Zellen (TCR $\alpha\beta^+$) 35 Tage (Abb. 13). Die Rekonstitution der T-Zellen der IL-7^{-/-} Empfänger ist an Tag+14 abgeschlossen, was sie zu diesem Zeitpunkt fast signifikant von den IL-7^{+/+} Empfängern unterscheidet ($p=0.06$). Während der Mittelwert der T-Zellzahl des Goldstandards weiter bis auf 180% des Ausgangsmittelwertes an Tag+140 ansteigt, fällt der Wert für die IL-7^{-/-} Empfänger von 247% ($1008\pm/465/\mu\text{l}$) am Tag+28 auf 110% ($431\pm/84/\mu\text{l}$) an Tag+140 ab. Bezüglich ihrer T-Zellrekonstitution zeigen sich überraschenderweise die IL-7^{-/-} Empfänger nach Erreichen der Rekonstitution signifikant gegenüber dem Goldstandard erhöht (Tag+28 $p=0.005$, und Tag+35 $p=0.02$ nach dem Wilcoxon Rangsummentest). Die Zusammensetzung der T-Zellpopulationen wird in den folgenden Kapiteln dargestellt. Während die konventionellen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen verzögert rekonstituieren, ist dieser Unterschied durch eine Expansion der DN T-Zellen bedingt.

Der Anteil an TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen im peripheren Blut sowohl beim Goldstandard als auch bei den IL-7^{-/-} Empfängern von IL-7^{+/+} Knochenmark bleibt in der Früh- und Spätphase nach KMT niedrig ($\leq 2\%$ der Lymphozyten).

4.6.3.1. CD4⁺-Zellen

Beim Goldstandard benötigt die Rekonstitution der CD4⁺-Zellen (TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺) mehr als 35 Tage (Abb. 14). Die IL-7^{-/-} Empfänger zeigen bis zum Tag+140 hinaus keine vollständige Rekonstitution. Einzelne Tiere erreichen zwar zeitweilig ihren Ausgangswert, es kommt jedoch bei den IL-7^{-/-} Empfängern zu keiner vollständigen Rekonstitution der CD4⁺-Zellen.

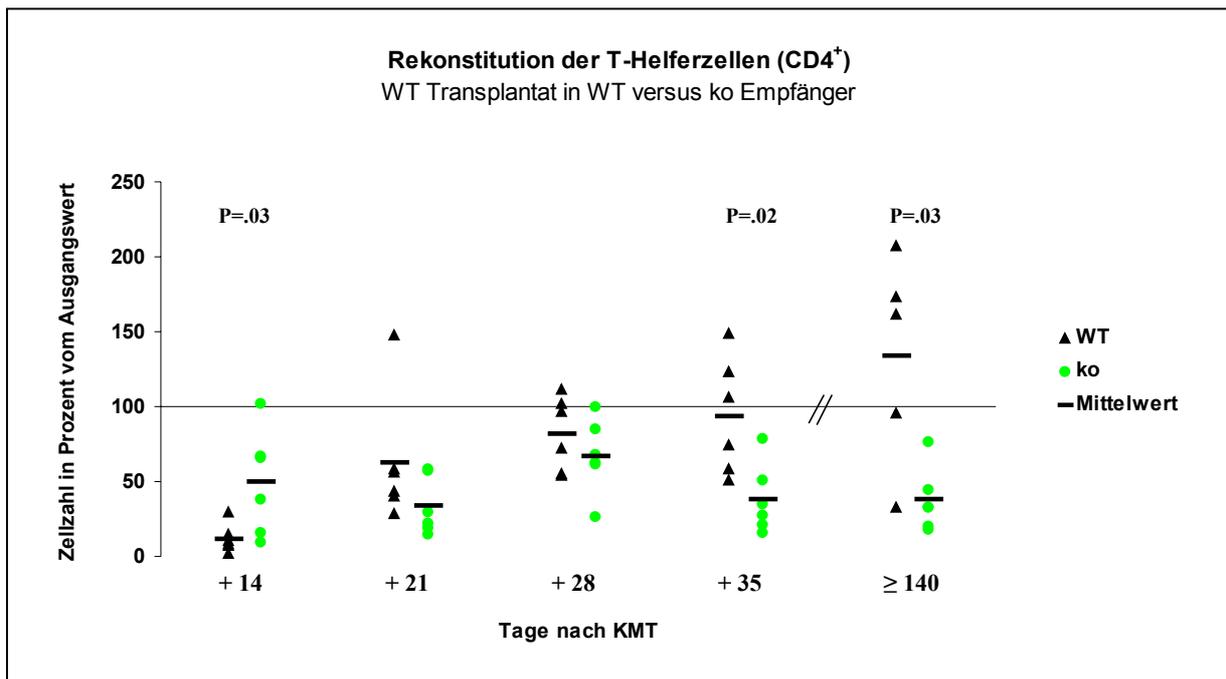


Abbildung 14: Rekonstitution der CD4⁺-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

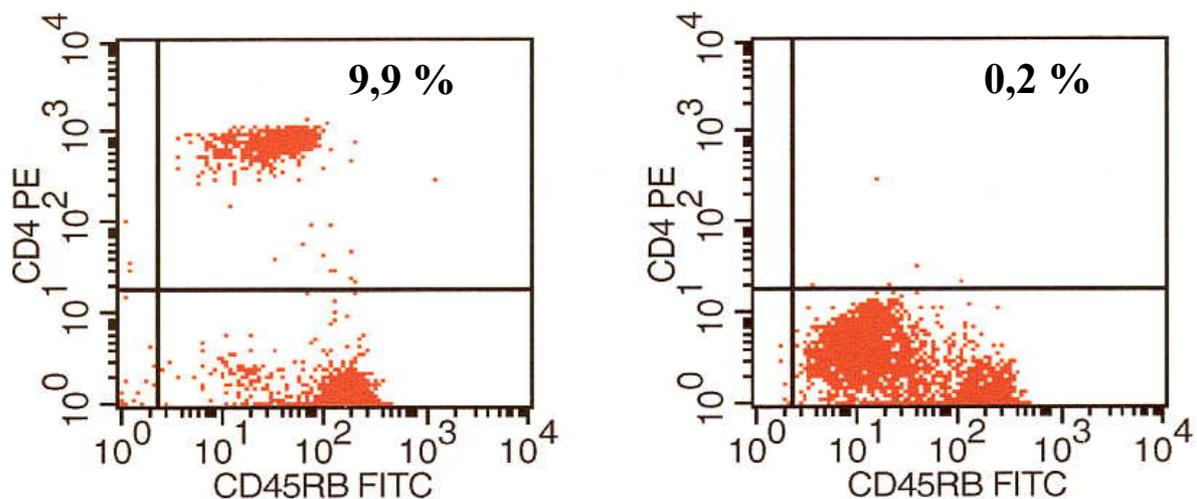


Abbildung 15: Repräsentative FACS-Analyse des PB auf Anwesenheit von CD4⁺-Zellen am Tag ≥ 140 bei Goldstandard (links) und im IL-7^{-/-} Empfänger (rechts). Der linke und der rechte obere Quadrant zeigen alle CD4⁺-Zellen.

Die Anzahl der CD4⁺-Zellen bleibt hier über den gesamten Beobachtungszeitraum weitgehend unverändert. Nach 140 Tagen liegt der Mittelwert der CD4⁺-Zellen des Goldstandards bezogen auf den Mittelwert der Ausgangswerte bei 134% (1541±641/ μ l), bei den IL-7^{-/-} Empfängern hingegen bei lediglich 38% (10±6/ μ l). Zu den späten Zeitpunkten (Tag+35 und Tag+140) zeigen die IL-7^{+/+} Empfänger eine signifikant bessere Rekonstitution als die IL-7^{-/-} Empfänger (Tag+35 p=.02 und Tag+140 p=.03). Im Folgenden wird untersucht, ob die fehlende Rekonstitution mit einer fehlenden Rekonstitution der naiven CD4⁺/CD45RB^{high} oder Gedächtnis CD4⁺/CD45RB^{low} assoziiert ist.

4.6.3.1.1. Naive CD4⁺-Zellen

Beim Goldstandard wird der Ausgangswert (60±72/ μ l) am Tag+35 wieder erreicht. Zwischen den Gruppierungen unterscheiden sich bezüglich der Rekonstitution der naiven CD4⁺-Zellen die IL-7^{-/-} Empfänger an Tag+35 signifikant zu Gunsten der IL-7^{+/+} Empfänger (p=.04). Bei den IL-7^{-/-} Empfängern wird trotz Fehlen von IL-7 nach 140 Tagen eine vollständige Rekonstitution der naiven CD4⁺-Zellen erreicht. Es ist darauf hinzuweisen, dass es sich um eine extrem niedrige Anzahl an Zellen handelt (≤ 30 Zellen/ μ l).

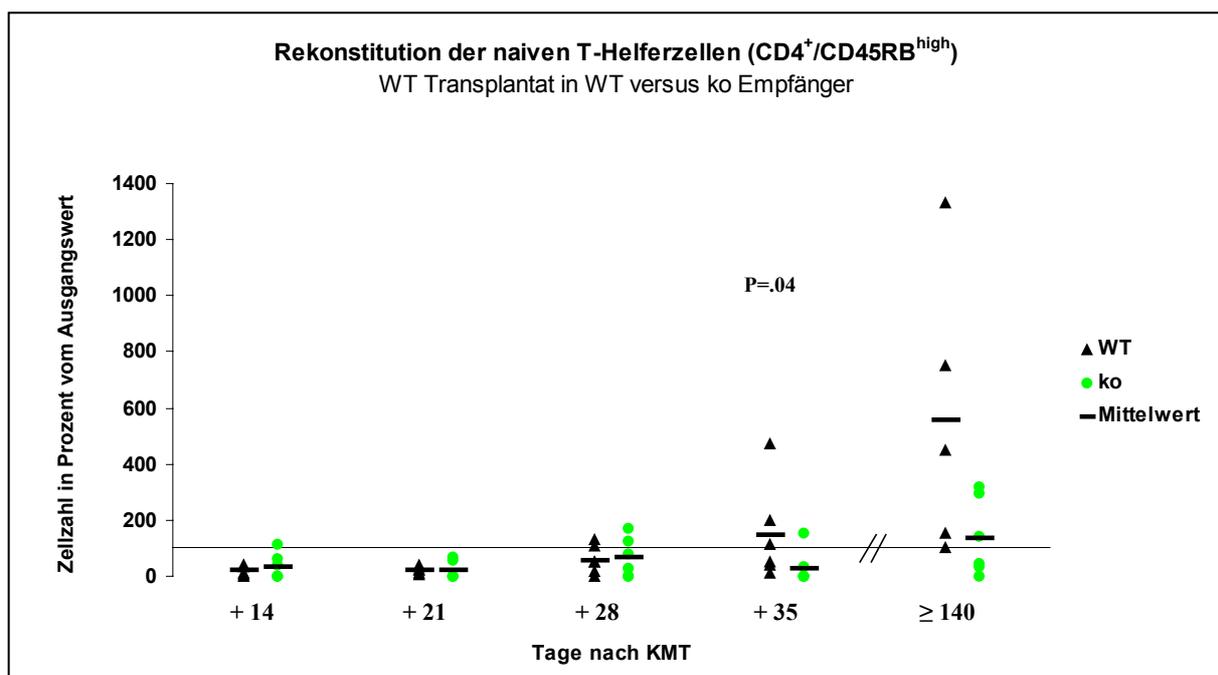


Abbildung 16: Rekonstitution der naiven CD4⁺-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

4.6.3.1.2. Gedächtnis CD4⁺-Zellen

Eine Rekonstitution der Gedächtnis-CD4⁺-Zellen (CD4⁺/CD45RB^{low}) nach KMT erfolgt nur bei der Goldstandard-Konstellation (Abb. 17); der Ausgangswert wird am Tag+140 wieder erreicht und um 132% übertroffen (1362±/572/μl). Die IL-7^{-/-} Empfänger fallen bis Tag+140 wieder auf 56% ihres Ausgangswertes ab. Es ist wieder darauf hinzuweisen, dass es sich um eine extrem niedrige Anzahl an Zellen handelt (≤ 30 Zellen/μl).

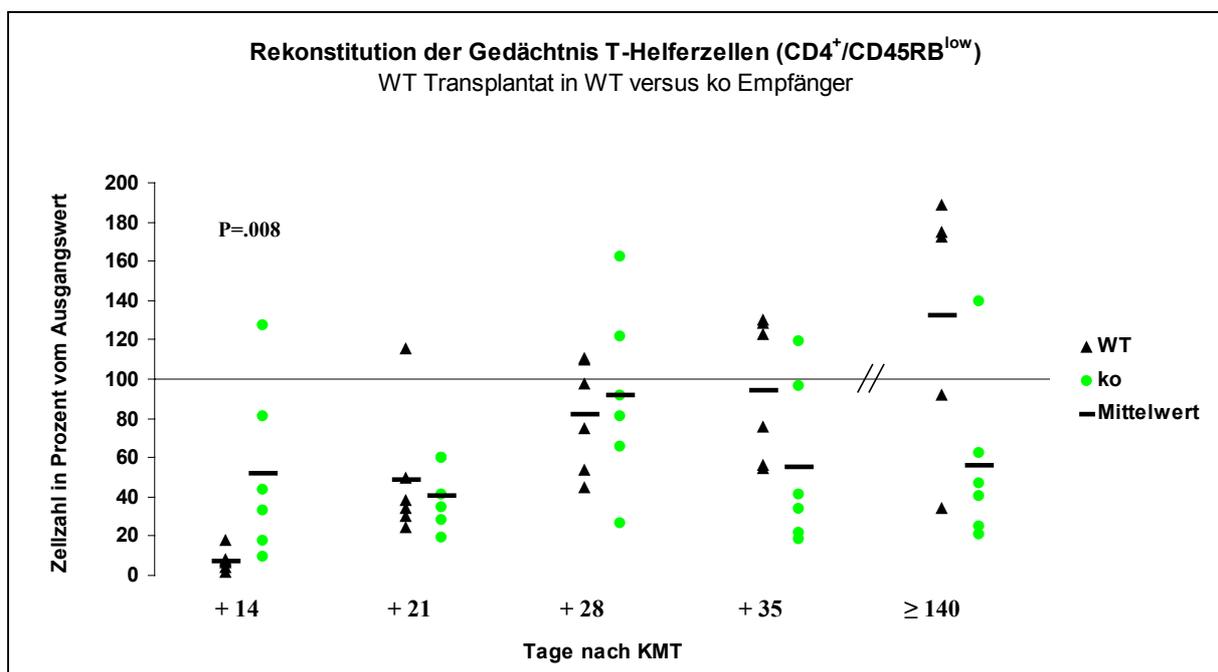


Abbildung 17: Rekonstitution der Gedächtnis CD4⁺-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

An Tag+14 besteht ein signifikant erhöhter Unterschied der Rekonstitution der Gedächtnis CD4⁺-Zellen der IL-7^{-/-} Empfänger gegenüber dem Goldstandard (p=0.008). Während bei Transplantation der IL-7^{-/-} Maus die naiven CD4⁺-Zellen vollständig rekonstituiert werden, bleiben die Gedächtnis CD4⁺-Zellen während der gesamten Beobachtungszeit unvollständig rekonstituiert.

4.6.3.2. CD8⁺-Zellen

Beim Goldstandard benötigt die Rekonstitution der CD8⁺-Zellen (TCRαβ⁺/CD8⁺) 140 Tage. Die IL-7^{-/-} Empfänger zeigen wie bei den CD4⁺-Zellen über den Tag+140 hinaus

keine vollständige Rekonstitution (Abb. 18). Nach 140 Tagen liegt der Mittelwert der CD8⁺-Zellen des Goldstandards bezogen auf den Mittelwert der Ausgangswerte bei 216% ($1770 \pm 751/\mu\text{l}$), bei den IL-7^{-/-} Empfängern hingegen bei lediglich 63% ($32 \pm 21/\mu\text{l}$).

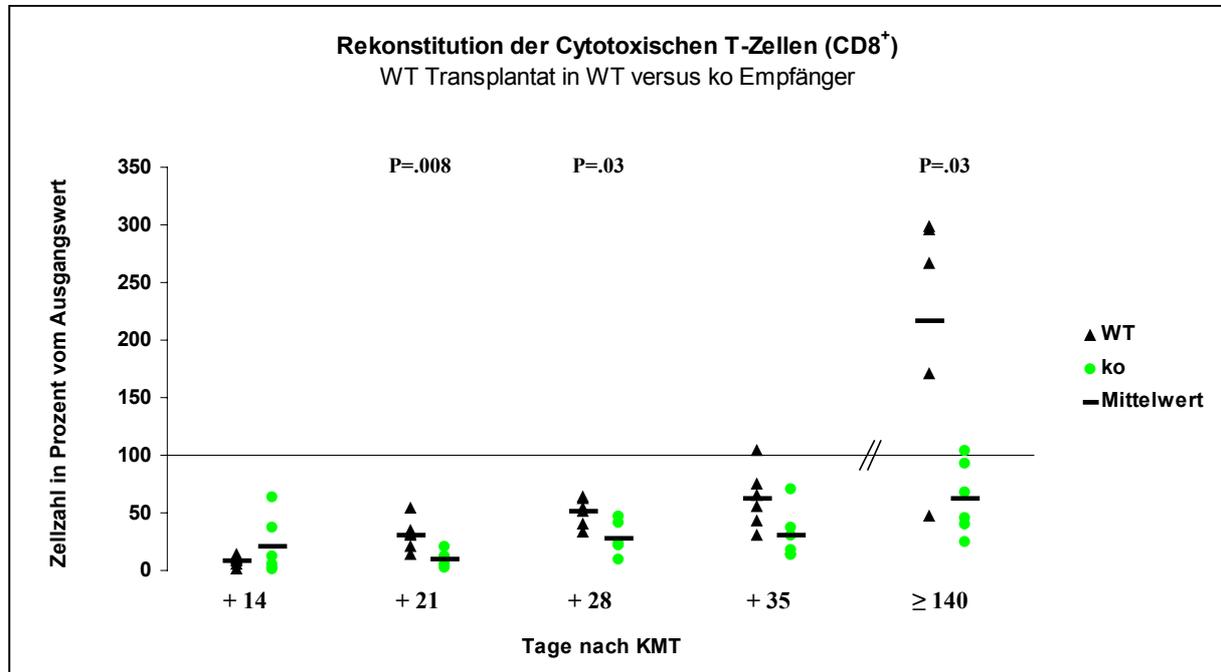


Abbildung 18: Rekonstitution der CD8⁺-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

Die Rekonstitution der CD8⁺-Zellen der IL-7^{+/+} Empfänger (wie auch bei den CD4⁺-Zellen) ist fast zu jedem Zeitpunkt signifikant höher als die von den IL-7^{-/-} Empfängern (Tag+21 p=.008, Tag+28 p=.03 und Tag+140 p=.03).

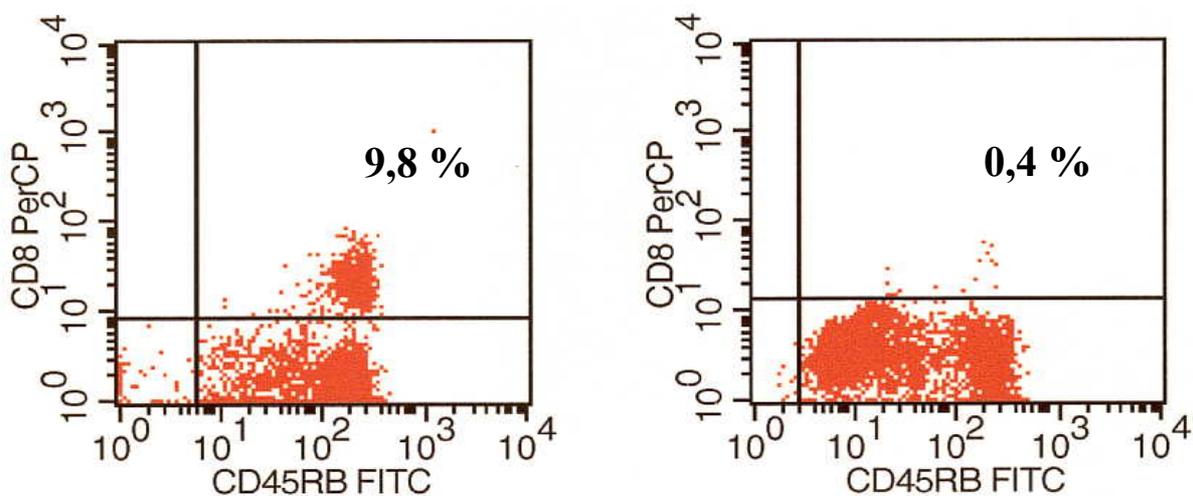


Abbildung 19: Repräsentative FACS-Analyse des PB auf Anwesenheit von CD8⁺-Zellen am Tag ≥ 140 bei Goldstandard (links) und im IL-7^{-/-} Empfänger (rechts). Der linke und der rechte obere Quadrant zeigt alle CD8⁺-Zellen.

Im Folgenden wird untersucht, wie sich die Ratio der naiven zu den Gedächtnis CD8⁺ Zellen verhält, und ob die fehlende Rekonstitution auch mit einer fehlenden Rekonstitution der naiven CD8⁺/CD45RB^{high}-oder Gedächtnis CD8⁺/CD45RB^{low}-Zellen assoziiert ist.

Bei den Tieren des Goldstandards überwiegt zu jedem Beobachtungszeitpunkt der Anteil an naiven CD8⁺-Zellen. 14 Tage nach der Knochenmark-Transplantation steigt der Anteil an Gedächtnis CD8⁺-Zellen an, bevor er im weiteren Verlauf zu Gunsten des Anteils an naiven CD8⁺-Zellen wieder abfällt (s. Abbildung 20).

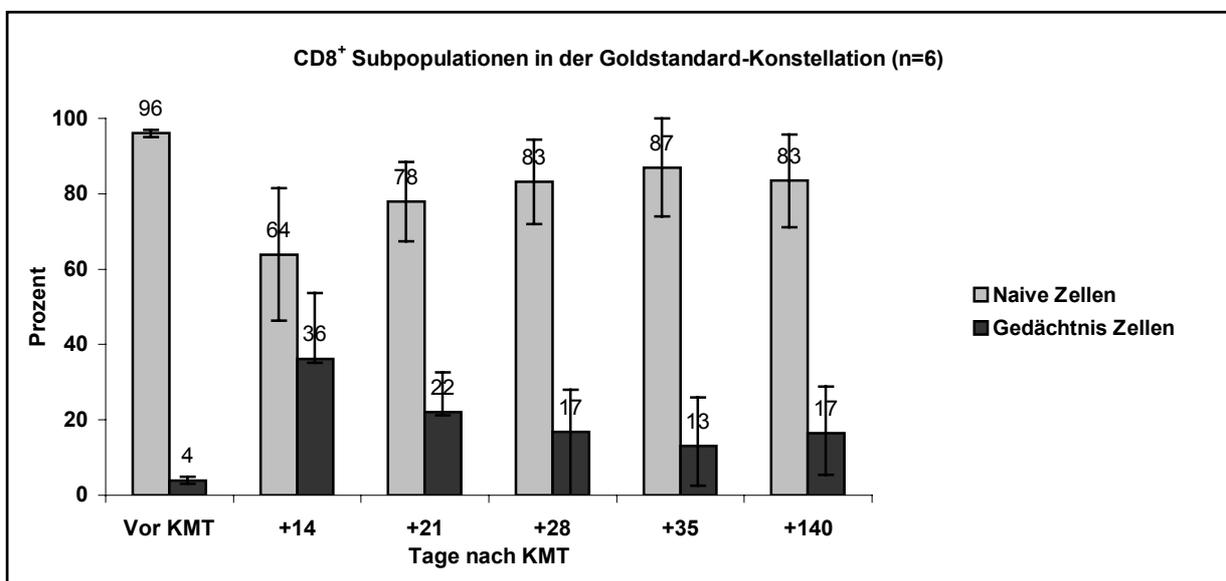


Abbildung 20: Ratio der naiven CD8⁺-Zellen zu den Gedächtnis CD8⁺-Zellen. Bezogen auf 100% CD8⁺-Zellen ist der relative Anteil an naiven und Gedächtnis Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach KMT dargestellt.

4.6.3.2.1. Naive CD8⁺-Zellen

Die Rekonstitution der naiven CD8⁺-Zellen (CD8⁺/CD45RB^{high}) nach KMT ist für den Goldstandard nach 140 Tagen vollständig abgeschlossen (Abb. 21). Der Mittelwert der Ausgangswerte wird um 205% ($1526 \pm 736/\mu\text{l}$) übertroffen. Im Unterschied zu den naiven CD4⁺-Zellen sind die naiven CD8⁺-Zellen der IL-7^{-/-} Empfänger auch nach mehr als 140 Tagen insgesamt nicht vollständig (nur bei 2 von 6 Tieren) rekonstituiert (85% des Ausgangsmittelwertes). Es ist darauf hinzuweisen, dass es

sich um eine extrem niedrige Anzahl an Zellen handelt (≤ 30 Zellen/ μl). Zwischen den Gruppierungen bestehen bezüglich der Rekonstitution der naiven CD8^+ -Zellen keine signifikanten Unterschiede.

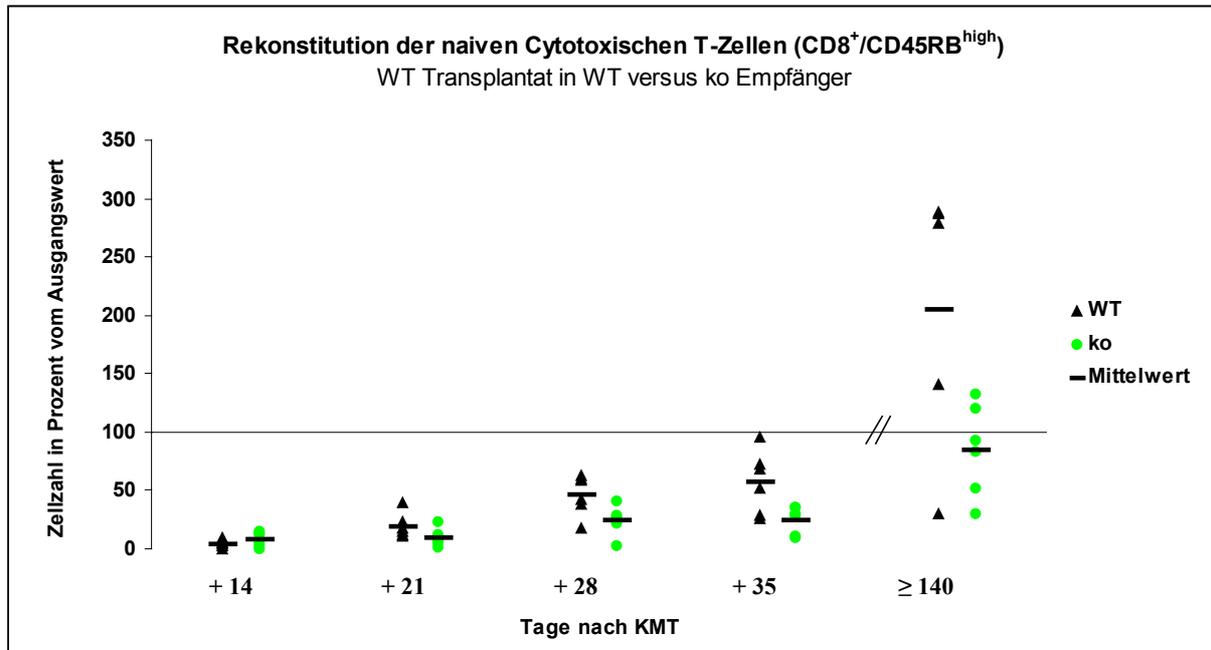


Abbildung 21: Rekonstitution der naiven CD8^+ -Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = $\text{IL-7}^{+/+}$, ko = $\text{IL-7}^{-/-}$.

4.6.3.2.2. Gedächtnis CD8^+ -Zellen

Die Rekonstitution der Gedächtnis CD8^+ -Zellen ($\text{CD8}^+/\text{CD45RB}^{\text{low}}$) nach KMT ist beim Goldstandard bereits am Tag+21 wieder erreicht. Beim Goldstandard wird der Mittelwert der Ausgangswerte nach mehr als 140 Tagen um 692% ($221 \pm 105/\mu\text{l}$) übertroffen. Im Unterschied zu den Gedächtnis CD4^+ -Zellen sind die Gedächtnis CD8^+ -Zellen der $\text{IL-7}^{-/-}$ Empfänger nach 140 Tagen vollständig rekonstituiert. Es ist darauf hinzuweisen, dass es sich um eine extrem niedrige Anzahl an Zellen handelt (≤ 30 Zellen/ μl). Von Tag+21 an unterscheidet sich die Rekonstitution der Gedächtnis CD8^+ -Zellen des Goldstandards signifikant von der Rekonstitution der $\text{IL-7}^{-/-}$ Empfänger (Tag+21 $p=0.008$, Tag+28 $p=0.005$, Tag+35 $p=0.04$ und Tag+140 $p=0.008$).

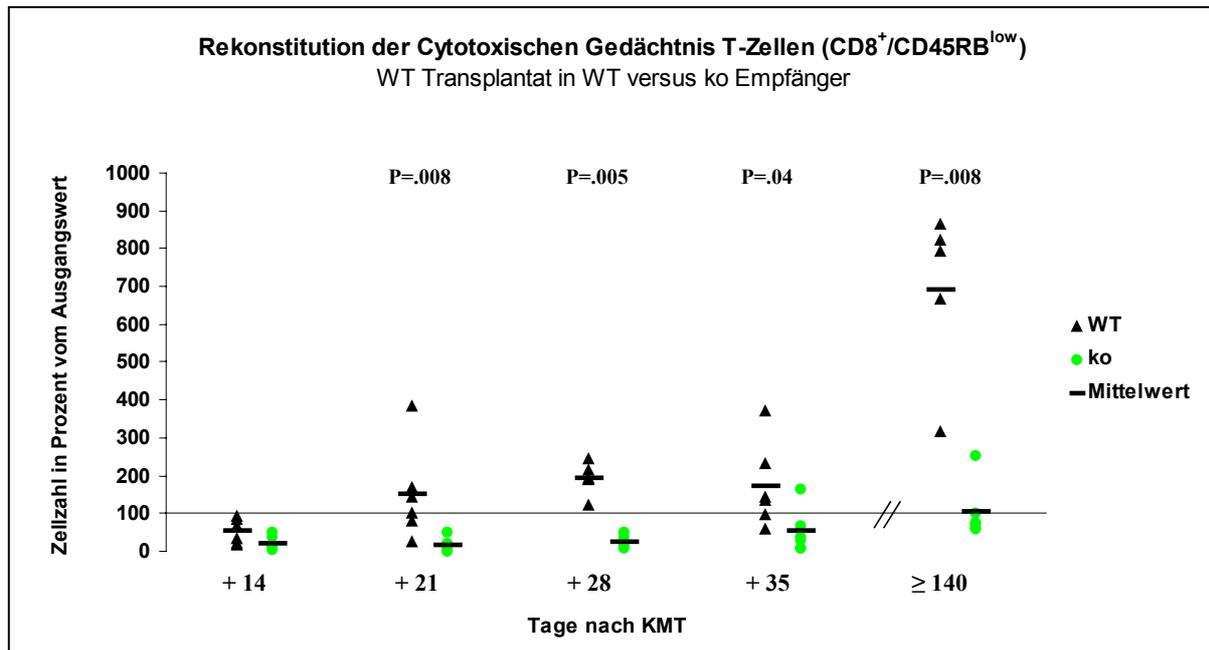


Abbildung 22: Rekonstitution der Gedächtnis CD8⁺-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

4.6.3.3. DN T-Zellen

Bereits 14 Tage nach Transplantation kommt es bei IL-7^{+/+} und IL-7^{-/-} Empfängern zu einer eindrucksvollen Expansion der DN T-Zellen. Die Mittelwerte nach 14 Tagen (WT: 186±99/μl, ko: 689±715/μl) übertreffen die Ausgangswerte um 546% bzw. 209%. Während die DN T-Zellen bei den IL-7^{-/-} Mäusen über den gesamten Beobachtungszeitraum weitgehend unverändert bleiben, kommt es bei den IL-7^{+/+} Mäusen zu einem Anstieg auf im Mittel 1147% am Tag+140 (392±169/μl) vom Ausgangswert, wo sie sich signifikant von den IL-7^{-/-} Empfängern unterscheiden (p=.01).

Wie bereits in 4.1.4. ersichtlich weisen die IL-7^{+/+} Empfänger auch in der Posttransplantationsphase mehr αβ⁺ T-Zellrezeptoren auf als die IL-7^{-/-} Empfänger (s. Abb. 24). Die Angaben auf der X-Achse beziehen sich auf die Fluoreszenz-Intensität (MFI) des gebundenen Antikörpers (IL-7^{+/+} Empfänger: MFI von ca. 90, IL-7^{-/-} Empfänger: MFI von ca. 30). Beide Werte sind somit niedriger als vor KMT.

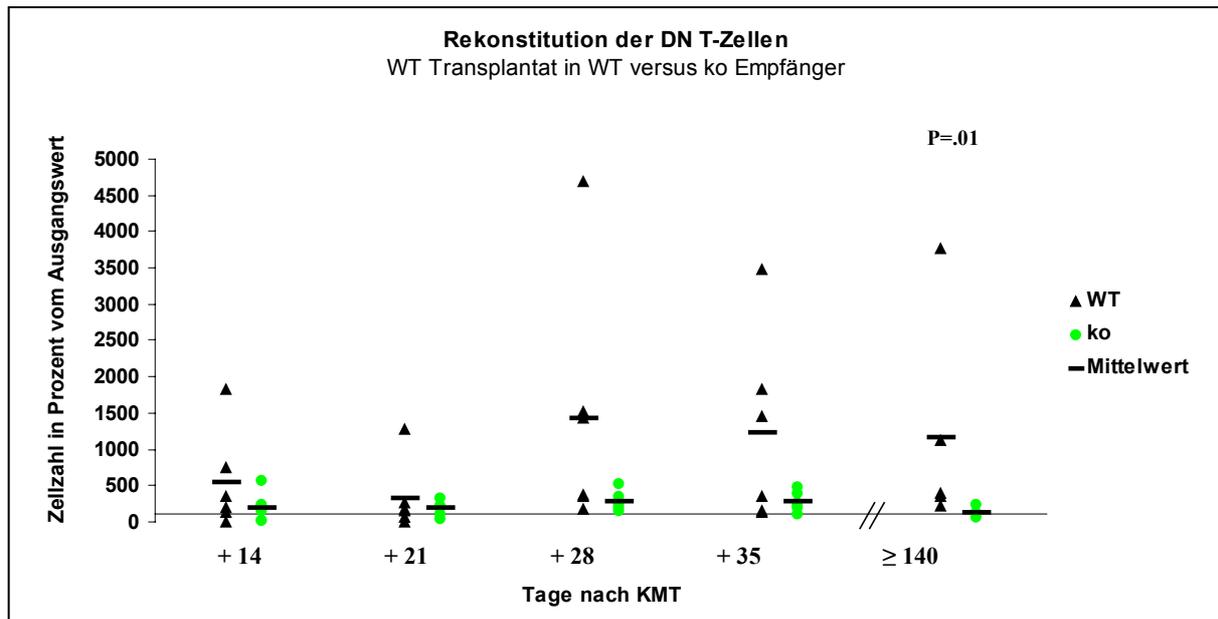


Abbildung 23: Rekonstitution der DN T-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

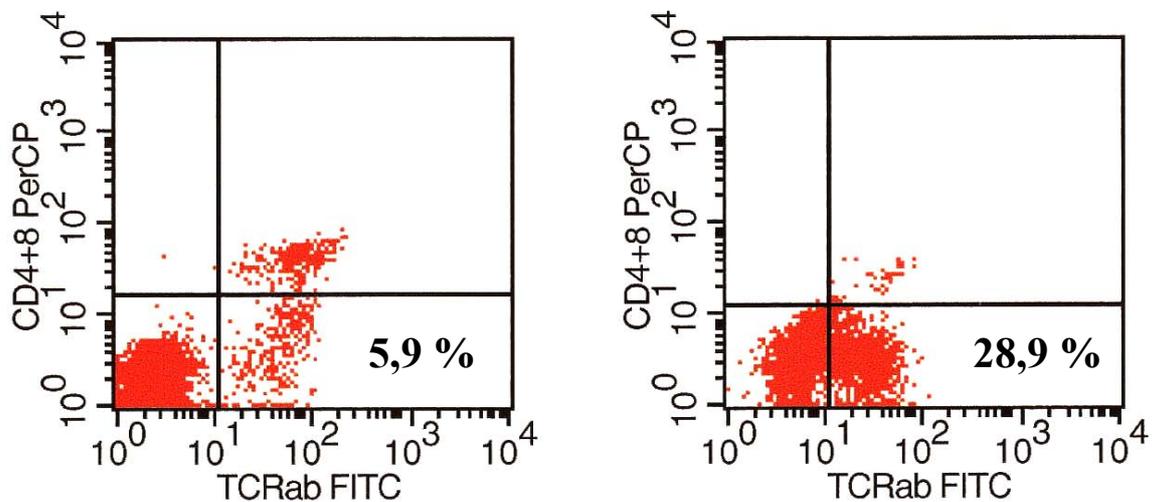


Abbildung 24: Repräsentative FACS-Analyse des PB auf Anwesenheit von DN T-Zellen (TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/CD8⁺) am Tag ≥ 140 bei Goldstandard (links) und im IL-7^{-/-} Empfänger (rechts). Der rechte untere Quadrant zeigt die DN T-Zellen.

Während der gesamten Beobachtungszeit machen die DN T-Zellen die Haupt-T-Zellpopulation bei den IL-7^{-/-} Empfängern aus, wohingegen bei den IL-7^{+/+} Empfängern der Anteil an CD4⁺- und CD8⁺-Zellen überwiegt (s. Tabelle 18).

Gruppe	T-Zellen	Vor KMT (d -2)		Frühphase (d +14)		Spätphase (d +140)	
		absolut	% TCR $\alpha\beta^+$	absolut	% TCR $\alpha\beta^+$	absolut	% TCR $\alpha\beta^+$
WT-WT	TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ und TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$	2041 \pm 550	96%	206 \pm 124	53%	3310 \pm 1392	89%
	TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^-$ /CD8 $^-$	81 \pm 56	4%	186 \pm 99	47%	392 \pm 169	11%
WT-ko	TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ und TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$	79 \pm 33	18%	24 \pm 24	3%	42 \pm 27	10%
	TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^-$ /CD8 $^-$	354 \pm 150	82%	689 \pm 715	97%	389 \pm 87	90%

Tabelle 18: Vergleich der konventionellen T-Zellen (TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ und TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$) mit unkonventionellen T-Zellen (TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^-$ /CD8 $^-$ = DN). Die Anwesenheit der Zellen ist vor KMT, in der Frühphase nach KMT, und in der Spätphase nach KMT durchflußzytometrisch bestimmt worden. Absolute Zahlen in Zellen/ μ l.

4.6.4. B-Zellen

Beim Goldstandard benötigt die Rekonstitution der B-Zellen (CD19 $^+$) 28 Tage (Abb. 25). Die IL-7 $^{-/-}$ Empfänger zeigen bis über den Tag+140 hinaus keine vollständige Rekonstitution. Einzelne Tiere erreichen zwar zeitweilig ihren Ausgangswert, im Mittel jedoch kommt es bei den IL-7 $^{-/-}$ Empfängern zu keiner vollständigen Rekonstitution der B-Zellen (61 \pm 34/ μ l).

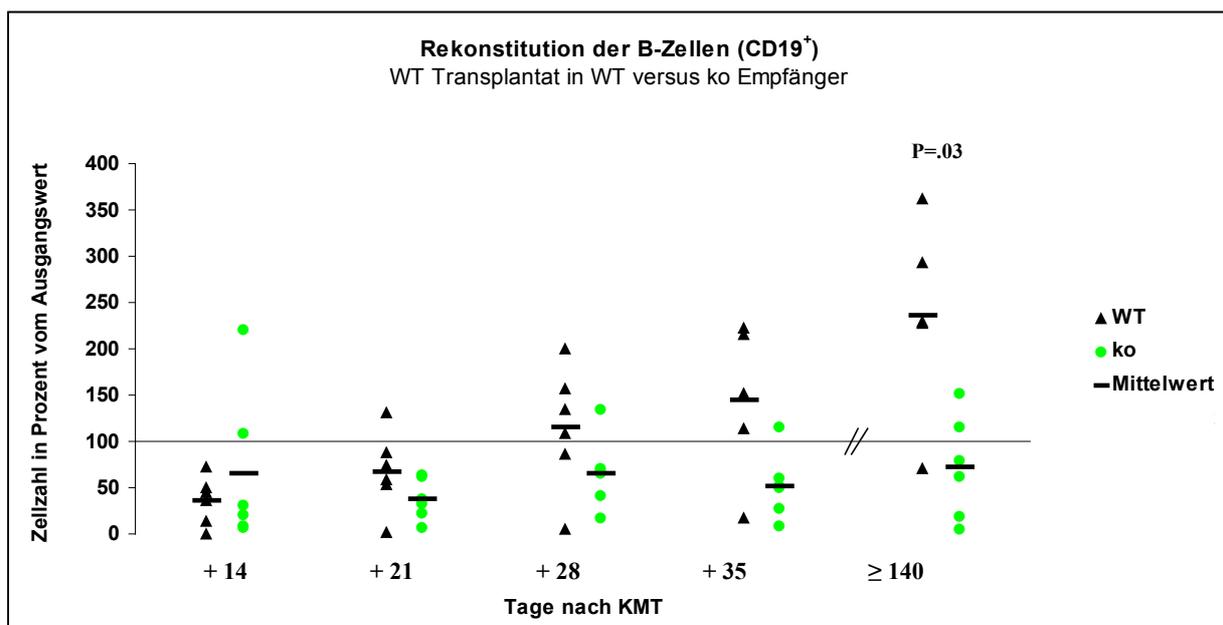


Abbildung 25: Rekonstitution der B-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7 $^{+/+}$, ko = IL-7 $^{-/-}$.

Nach 140 Tagen liegt der Mittelwert der B-Zellen des Goldstandards bezogen auf den Mittelwert der Ausgangswerte bei 237% ($12003 \pm 5678/\mu\text{l}$), bei den IL-7^{-/-} Empfängern hingegen bei lediglich 72% ($36 \pm 26/\mu\text{l}$). Im Bezug auf die Rekonstitution unterscheidet sich zu diesem Zeitpunkt der Goldstandard signifikant von den IL-7^{-/-} Empfängern (Tag+140, $p=.03$).

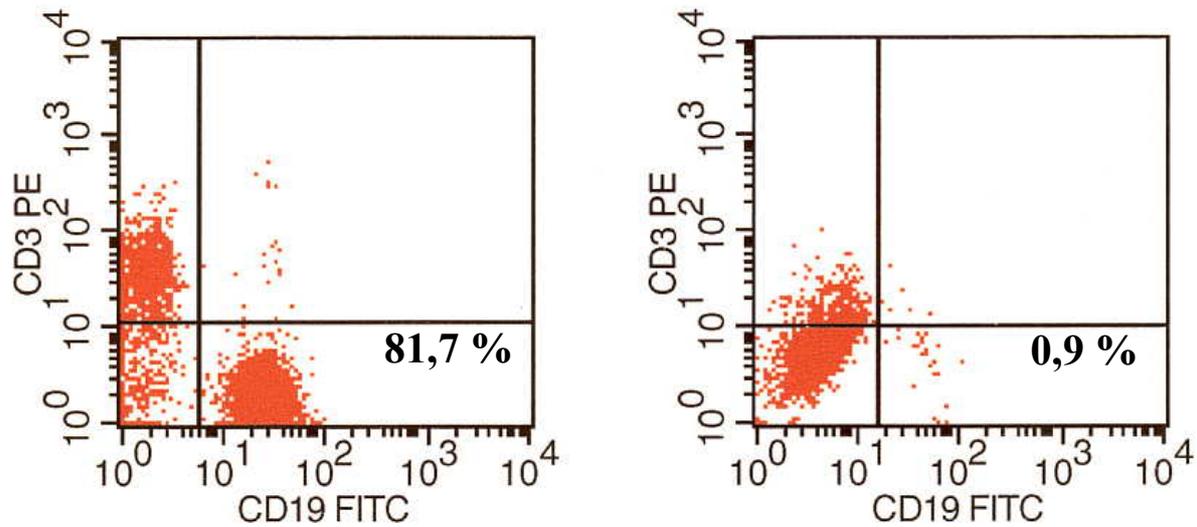


Abbildung 26: Repräsentative FACS-Analyse des PB auf Anwesenheit von CD19⁺-Zellen am Tag ≥ 140 bei Goldstandard (links) und im IL-7^{-/-} Empfänger (rechts). Der rechte untere Quadrant zeigt die CD19⁺-Zellen.

4.6.5. NK-Zellen und NKT-Zellen

Die Rekonstitution der NK-Zellen (NK1.1⁺) benötigt bei IL-7^{+/+} und IL-7^{-/-} Empfängern 28 Tage (Abb. 27). Beim Goldstandard wird der Ausgangsmittelwert ($266 \pm 63/\mu\text{l}$) nach mehr als 140 Tagen um 238% ($637 \pm 145/\mu\text{l}$) übertroffen, bei den IL-7^{-/-} Empfängern bleibt der Wert ab Tag+28 bei rund 105% ($370 \pm 116/\mu\text{l}$). Bezüglich der NK-Zellrekonstitution zeigt der Goldstandard an Tag+28 und Tag+140 signifikant höhere Werte ($p=.03$ und $p=.008$).

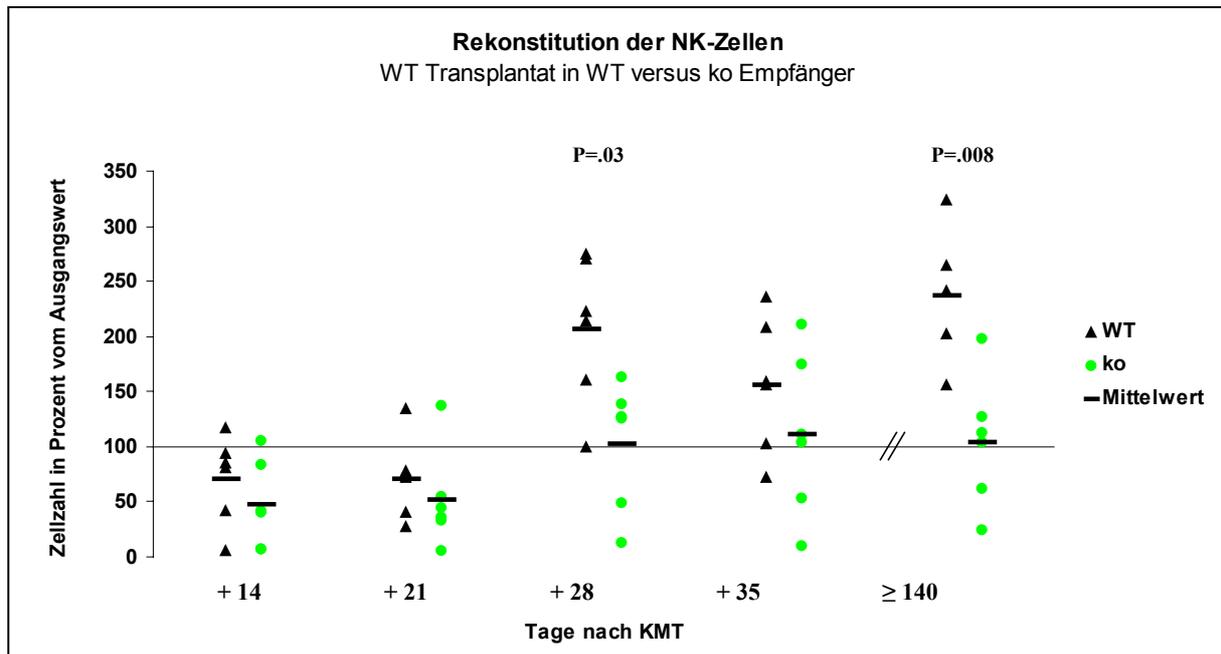


Abbildung 27: Rekonstitution der NK-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

Die Rekonstitution der NKT-Zellen (TCR $\alpha\beta^+$ /NK1.1⁺) wird beim Goldstandard nach 21 Tagen mit 175% des Ausgangsmittelwertes (210 \pm 208/ μ l) erreicht. Die IL-7^{-/-} Empfänger überschreiten ihren Ausgangsmittelwert (48 \pm 21/ μ l) nach 28 Tagen mit 174% (69 \pm 29/ μ l), woraufhin jedoch der Anteil der NKT-Zellen nach 140 Tagen wieder auf im Mittel 87% (37 \pm 27/ μ l) abfällt. Bei den IL-7^{-/-} Empfängern ist somit keine langfristige Rekonstitution der NKT-Zellen erreicht, obwohl es interessanterweise in der Frühphase nach Transplantation zu einer vorübergehenden Expansion gekommen ist.

Zwischenzusammenfassung III:

Das Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger hat keine Folgen für die Rekonstitution der myelomonozytären Zellen. Überraschenderweise ist auch die Rekonstitution der Gesamtlymphozytenzahl unbeeinträchtigt. Bei detaillierter Analyse der Lymphozytensubpopulationen (insbesondere der T- und B-Zellen) zeigen sich jedoch erhebliche Auswirkungen des Fehlens von IL-7 im Empfänger. Trotz Transplantation mit 1×10^7 nukleären Zellen aus einem vollen IL-7^{+/+} Knochenmark inklusive ca. 1×10^6 reifer T-Zellen führt das Fehlen von IL-7 im Empfänger dazu, dass eine vollständige Rekonstitution von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen auch nach mehr als 140 Tagen ausbleibt. Während es bei Fehlen von IL-7 im Empfänger bei den CD4⁺-Zellen nach 140 Tagen nicht zu einer Rekonstitution der Gedächtniszellen kommt, wird bei den Gedächtnis CD8⁺-Zellen trotz Fehlen von IL-7 eine Rekonstitution erreicht. Überraschenderweise ist trotz Fehlen von IL-7 im Empfänger die Gesamt T-Zellrekonstitution bereits nach 14 Tagen vollständig, obwohl die konventionellen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen nur unvollständig rekonstituieren. Dies wird durch eine Expansion von DN T-Zellen erklärt, die sowohl im IL-7^{+/+} als auch im IL-7^{-/-} Empfänger beobachtet wird. Trotz Transplantation von 2×10^6 reifen B-Zellen kommt es in Abwesenheit von IL-7 nicht zu einer vollständigen Rekonstitution von B-Zellen. Die Rekonstitution der NK1.1⁺-Zellen findet dagegen auch bei Fehlen von IL-7 im Empfänger statt.

4.7. Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat

4.7.1. Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Monozyten

Zwischen den Gruppierungen bestehen zu keinem Zeitpunkt bezüglich der Rekonstitution der Gesamtgranulozyten signifikante Unterschiede, trotz niedrigerem Anteil an Stammzellen im IL-7^{-/-} Transplantat (s. Tabelle 12). Die Rekonstitution der Neutrophilen Granulozyten nach KMT ist in beiden Konstellationen bereits nach 14 Tagen abgeschlossen. Bei Goldstandard und Empfängern von IL-7^{-/-} Knochenmark wird der Ausgangsmittelwert (824±405/μl bzw. 677±386/μl) nach mehr als 140 Tagen um 293% (1979±634/μl) bzw. 474% (2048±1258/μl) übertroffen.

Bei den Empfängern von IL-7^{-/-} Transplantat ist die Rekonstitution der Eosinophilen bereits nach 14 Tagen abgeschlossen, und nach mehr als 140 Tagen ein Anstieg von im Mittel 532% (1037±639/μl) bezogen auf den Ausgangsmittelwert (195±297/μl) zu verzeichnen. Auch die Basophilen erreichen an Tag+14 ihre Rekonstitution. Im weiteren Verlauf sinkt der Anteil der Basophilen jedoch wieder auf 71% (66±102/μl) des Ausgangsmittelwertes (92±106/μl) ab. Die Rekonstitution der Monozyten benötigt ebenfalls 14 Tage und zeigt ein Ansteigen auf 381% (293±252/μl) des Ausgangsmittelwertes (77±100/μl) an Tag ≥140. Im Vergleich zum Goldstandard zeigen sich bei den Eosinophilen, Basophilen und den Monozyten keine signifikanten Unterschiede.

4.7.2. Lymphozyten

Beim Goldstandard wird der Ausgangswert am Tag+28 erreicht, die lymphozytäre Rekonstitution der Empfänger von IL-7^{-/-} Knochenmark ist an Tag+140 abgeschlossen (Abb. 28). Bei Goldstandard (s.o.) und den Empfängern von IL-7^{-/-} Knochenmark (12949±3485/ μ l) wird der Ausgangsmittelwert nach mehr als 140 Tagen um 230% (s.o.) bzw. 220% (27223±8328/ μ l) übertroffen. Zwischen den Empfängern von IL-7^{+/+} und IL-7^{-/-} KM bestehen zu keinem Zeitpunkt bezüglich der Rekonstitution der Gesamtlymphozyten signifikante Unterschiede.

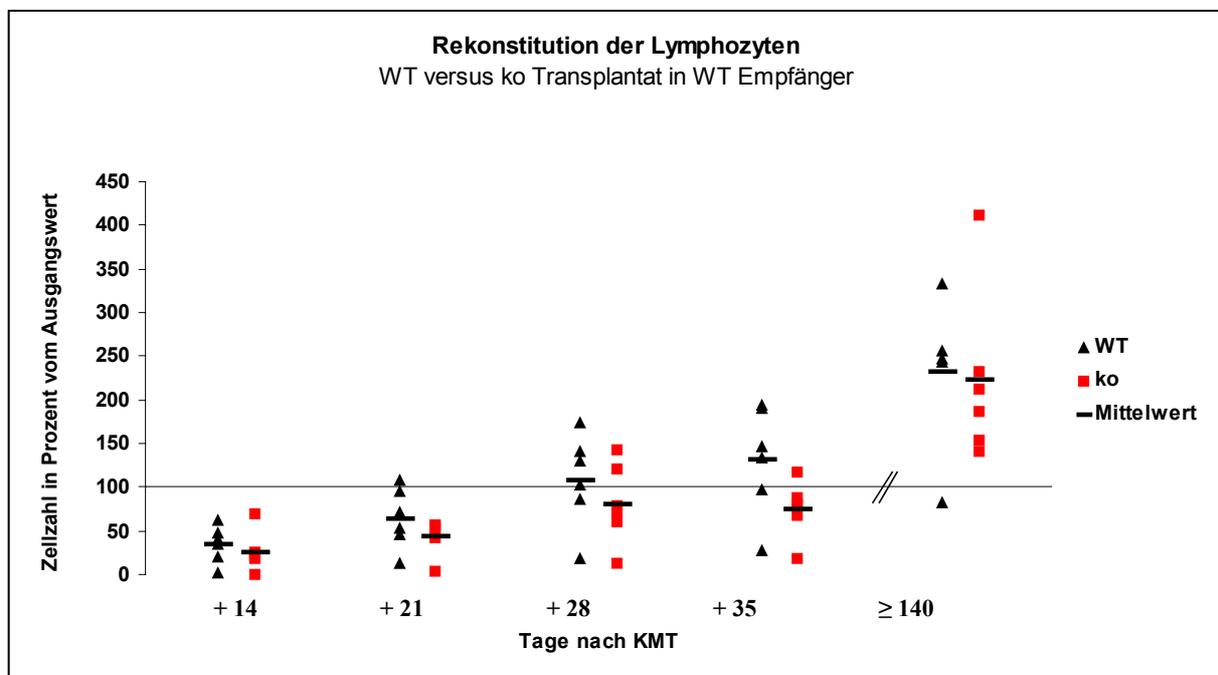


Abbildung 28: Rekonstitution der Lymphozyten. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

4.7.3. T-Zellen

Beim Goldstandard benötigt die Rekonstitution der T-Zellen ($\text{TCR}\alpha\beta^+$) 35 Tage (Abb. 29). Die Rekonstitution der T-Zellen der Empfänger von $\text{IL-7}^{-/-}$ Transplantat ist an Tag+140 vollständig abgeschlossen. Mit Ausnahme einer höheren T-Zellzahl an Tag+14 bei Empfängern des $\text{IL-7}^{+/+}$ Transplantats (19%, $391\pm 192/\mu\text{l}$ vs. 4%, $194\pm 111/\mu\text{l}$; $p=.04$) zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein deutlicher Unterschied in der T-Zellrekonstitution.

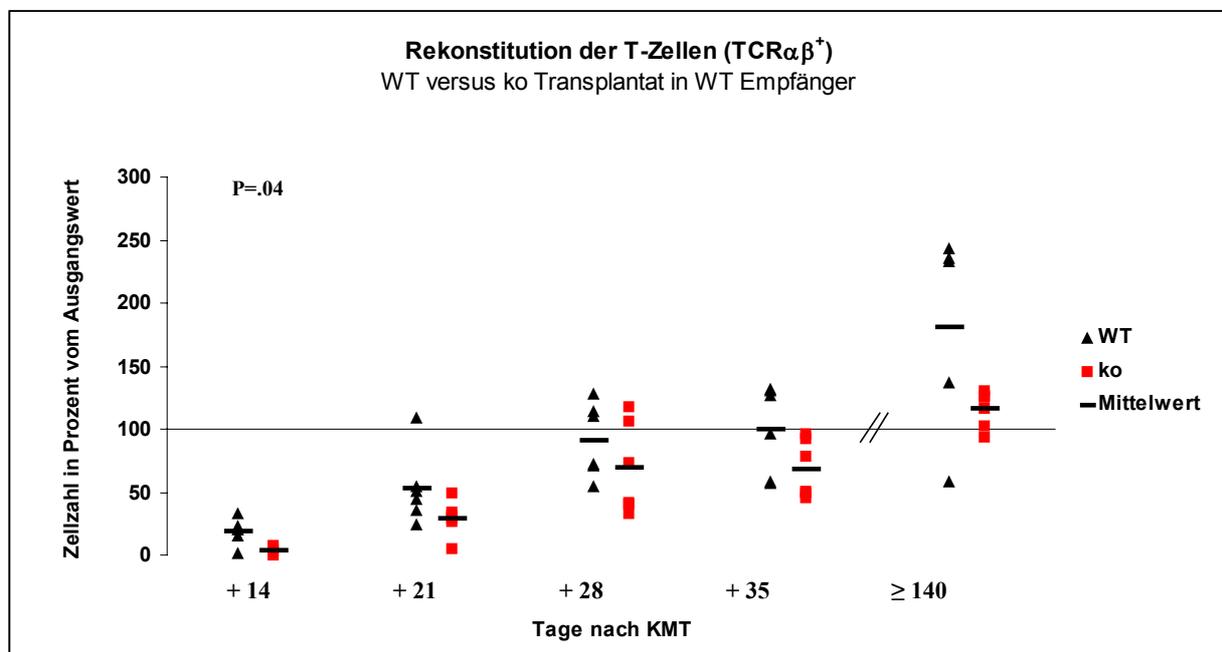


Abbildung 29: Rekonstitution der T-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = $\text{IL-7}^{+/+}$, ko = $\text{IL-7}^{-/-}$.

Der Anteil an $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen im peripheren Blut sowohl beim Goldstandard als auch bei den $\text{IL-7}^{+/+}$ Empfängern von $\text{IL-7}^{-/-}$ Knochenmark bleibt in der Früh- und Spätphase nach KMT niedrig ($\leq 2\%$ der Lymphozyten).

4.7.3.1. CD4⁺-Zellen

Die Rekonstitution der CD4⁺-Zellen (TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺) beim Goldstandard benötigt 35 Tage, (Abb. 30). Einzelne IL-7^{-/-} Transplantat Empfänger erreichen zwar zeitweilig ihren Ausgangswert, im Mittel jedoch kommt es bei den IL-7^{-/-} Transplantat Empfängern zu keiner vollständigen Rekonstitution der CD4⁺-Zellen. Nach 140 Tagen liegt der Mittelwert der CD4⁺-Zellen des Goldstandards bezogen auf den Ausgangsmittelwert bei 134%, bei den IL-7^{-/-} Transplantat Empfänger hingegen bei 90% (2404 \pm 462/ μ l). Im Folgenden wird untersucht, ob die nicht ganz vollständige Rekonstitution der CD4⁺-Zellen bei Transplantation mit IL-7^{-/-} Knochenmark mit einer unvollständigen Rekonstitution der naiven oder der Gedächtnis CD4⁺-Zellen assoziiert ist.

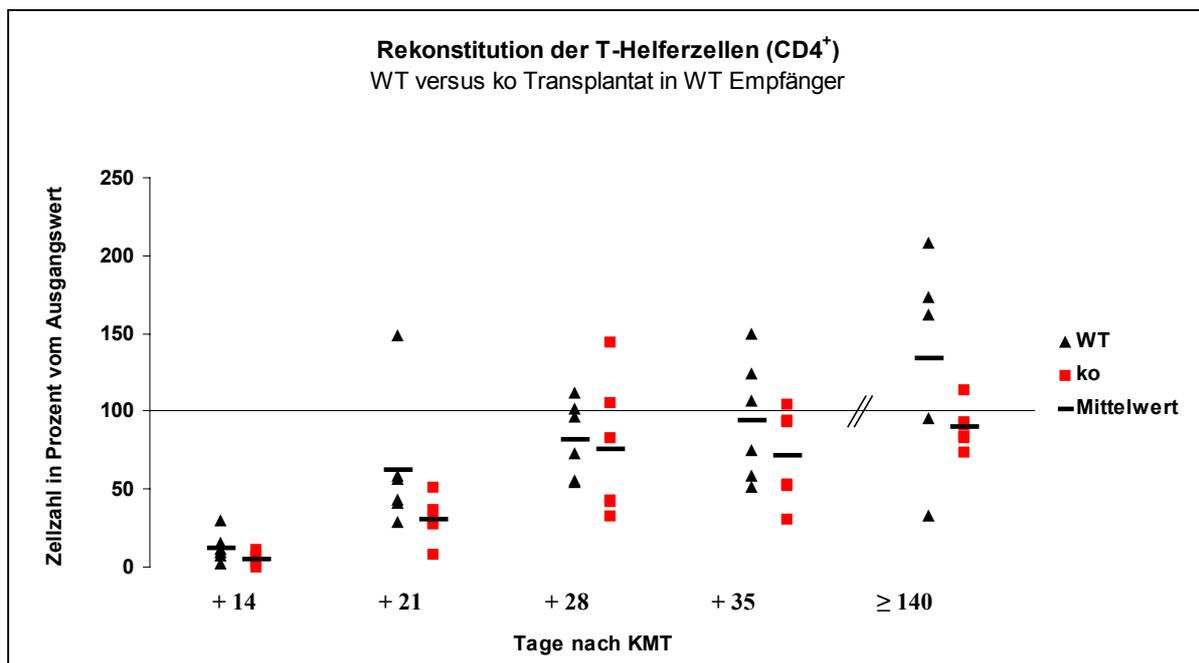


Abbildung 30: Rekonstitution der CD4⁺-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

4.7.3.1.1. Naive und Gedächtnis CD4⁺-Zellen

Die Rekonstitution der naiven CD4⁺-Zellen (CD4⁺/CD45RB^{high}) bzw. der Gedächtnis CD4⁺-Zellen (CD4⁺/CD45RB^{low}) ist beim Goldstandard am Tag+35 bzw. am Tag+140 erreicht, die naiven CD4⁺-Zellen der IL-7^{-/-} Transplantat Empfänger sind nach 140 Tagen vollständig (108% des Ausgangsmittelwertes, 331±52/μl), die Gedächtnis CD4⁺-Zellen noch nicht vollständig rekonstituiert (97% des Ausgangsmittelwertes, 2117±439/μl). Zwischen den Gruppierungen bestehen bezüglich der Rekonstitution der naiven und der Gedächtnis CD4⁺-Zellen keine signifikanten Unterschiede.

4.7.3.2. CD8⁺-Zellen

Die Rekonstitution der CD8⁺-Zellen (TCRαβ⁺/CD8⁺) beim Goldstandard und den Empfängern von IL-7^{-/-} Transplantat benötigt 140 Tage. (Abb. 31) und ist vollständig trotz der geringen Anzahl von CD8⁺-Zellen im IL-7^{-/-} KM. Nach 140 Tagen liegt der Mittelwert der CD8⁺-Zellen des Goldstandards bezogen auf den Ausgangsmittelwert bei 220%, bei den IL-7^{-/-} Transplantat Empfängern bei 122% (1872±409/μl).

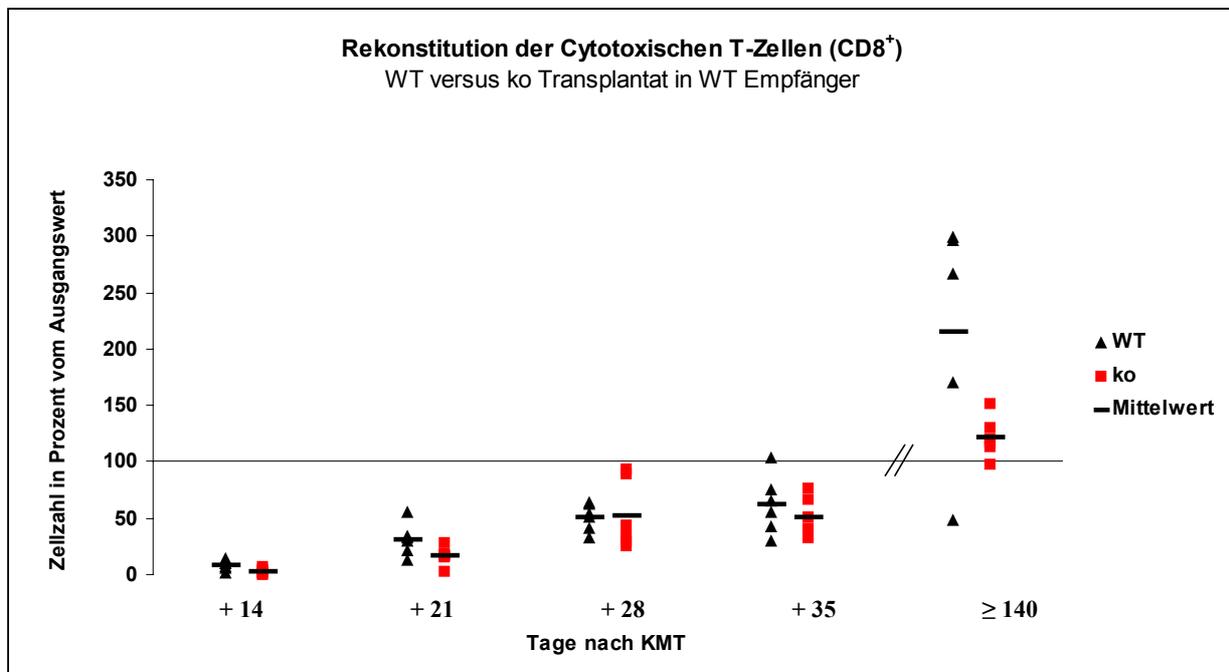


Abbildung 31: Rekonstitution der CD8⁺-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

Bezogen auf die Rekonstitution der CD8⁺-Zellen unterscheiden sich die IL-7^{-/-} Transplantat Empfänger zu keinem Zeitpunkt signifikant von den IL-7^{+/+} Empfängern.

4.7.3.2.1. Naive und Gedächtnis CD8⁺-Zellen

Die Rekonstitution der naiven CD8⁺-Zellen (CD8⁺/CD45RB^{high}) bzw. der Gedächtnis CD8⁺-Zellen (CD8⁺/CD45RB^{low}) ist beim Goldstandard am Tag+140 bzw. am Tag+21 erreicht, die naiven CD8⁺-Zellen der IL-7^{-/-} Transplantat Empfänger sind nach 140 Tagen (100% Ausgangswert, d.e. 1538±373/μl), die Gedächtnis CD8⁺-Zellen am Tag+28 (250% des Ausgangswertes, d.e. 76±37/μl) vollständig rekonstituiert. Zwischen den Gruppierungen bestehen bezüglich der Rekonstitution der naiven und der Gedächtnis CD8⁺-Zellen keine signifikanten Unterschiede.

4.7.3.3. DN T-Zellen

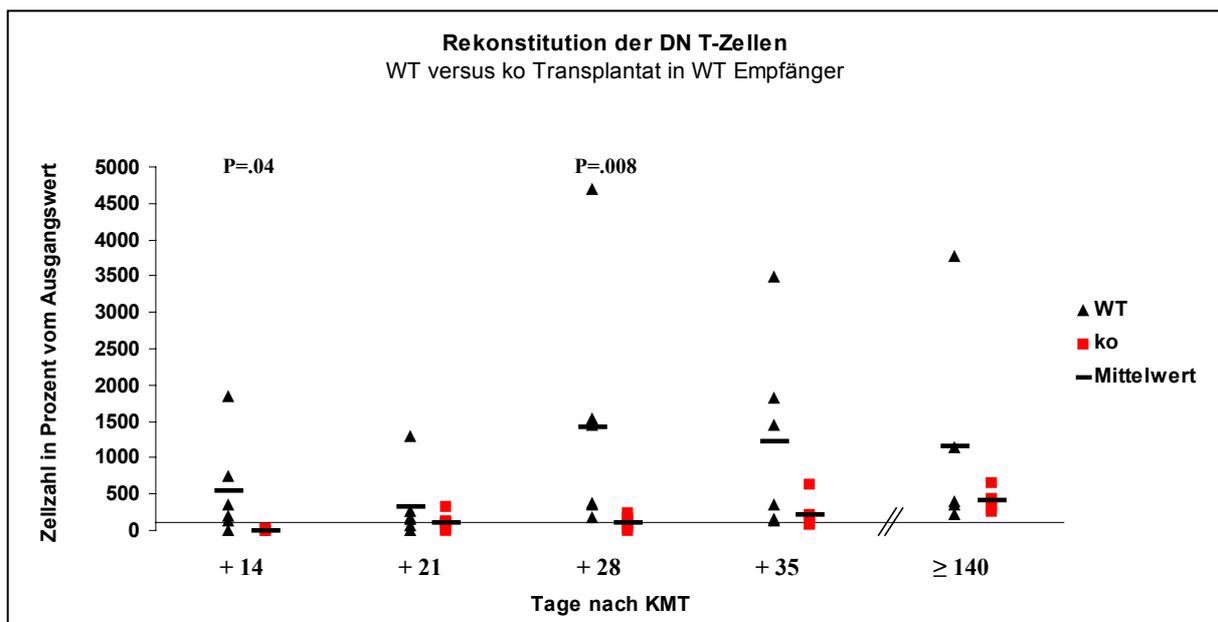


Abbildung 32: Rekonstitution der DN T-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

Die Rekonstitution der DN T-Zellen ($\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$) nach KMT ist für Empfänger von $\text{IL-7}^{+/+}$ Transplantat nach 14 bzw. für Empfänger von $\text{IL-7}^{-/-}$ Transplantat nach 21 Tagen abgeschlossen (Abb. 32). Ähnlich wie bei der vorherigen Konstellation (s. 4.6.3.3., Abb. 22) kommt es auch bei Transplantation von WT und von $\text{IL-7}^{-/-}$ Knochenmark zu einer eindrucksvollen Expansion der DN T-Zellen. Interessanterweise setzt die Expansion der DN T-Zellen aber im Unterschied zur vorherigen Konstellation erst ab Tag+35 ein.

Dies führt dazu, dass sich an Tag+14 und +28 signifikante Unterschiede ($p=0.04$ und $p=0.008$) im Vergleich zur Expansion der DN T-Zellen bei Transplantation von $\text{IL-7}^{+/+}$ Knochenmark ergeben, obwohl sich die Anzahl der transplantierten DN T-Zellen im $\text{IL-7}^{+/+}$ und $\text{IL-7}^{-/-}$ KM nicht unterscheiden. Bei Goldstandard und $\text{IL-7}^{-/-}$ Transplantat Empfängern wird der Ausgangsmittelwert nach mehr als 140 Tagen um 1170% ($392\pm 169/\mu\text{l}$) bzw. 407% ($880\pm 456/\mu\text{l}$) übertroffen.

Bei den Konstellationen mit $\text{IL-7}^{+/+}$ Empfängern überwiegt zu jedem Zeitpunkt der Anteil an konventionellen T-Zellen (s. Tabelle 19).

Gruppe	T-Zellen	Vor KMT (d -2)		Frühphase (d +14)		Spätphase (d +140)	
		absolut	% $\text{TCR}\alpha\beta^+$	absolut	% $\text{TCR}\alpha\beta^+$	absolut	% $\text{TCR}\alpha\beta^+$
WT-WT	$\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^+$ und $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD8}^+$	2041 ± 550	96%	206 ± 124	53%	3310 ± 1392	89%
	$\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$	81 ± 56	4%	186 ± 99	47%	392 ± 169	11%
ko-WT	$\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^+$ und $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD8}^+$	4321 ± 1230	95%	179 ± 122	90%	4274 ± 871	83%
	$\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$	241 ± 127	5%	20 ± 22	10%	880 ± 456	17%

Tabelle 19: Vergleich der konventionellen T-Zellen ($\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^+$ und $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD8}^+$) mit unkonventionellen T-Zellen ($\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^-/\text{CD8}^-$ = DN). Die Anwesenheit der Zellen ist vor KMT, in der Frühphase nach KMT, und in der Spätphase nach KMT durchflußzytometrisch bestimmt worden. Absolute Zahlen in Zellen/ μl .

4.7.4. B-Zellen

Im Unterschied zur vorherigen Konstellation, bei der IL-7 produzierende Zellen im Empfänger fehlen und keine vollständige Rekonstitution erreicht wurde, wird bei Transplantation von IL-7^{-/-} Knochenmark (mit komplettem Fehlen von B-Zellen im Transplantat) nach 140 Tagen eine vollständige B-Zellrekonstitution beobachtet. Nach 140 Tagen liegt der Mittelwert der B-Zellen des Goldstandards und der IL-7^{-/-} Transplantat Empfänger bezogen auf den Mittelwert der Ausgangswerte bei 237% bzw. bei 283% (20802±7855/μl). Zu keinem Zeitpunkt unterscheiden sich die IL-7^{-/-} Transplantat Empfänger signifikant von den IL-7^{+/+} Empfängern.

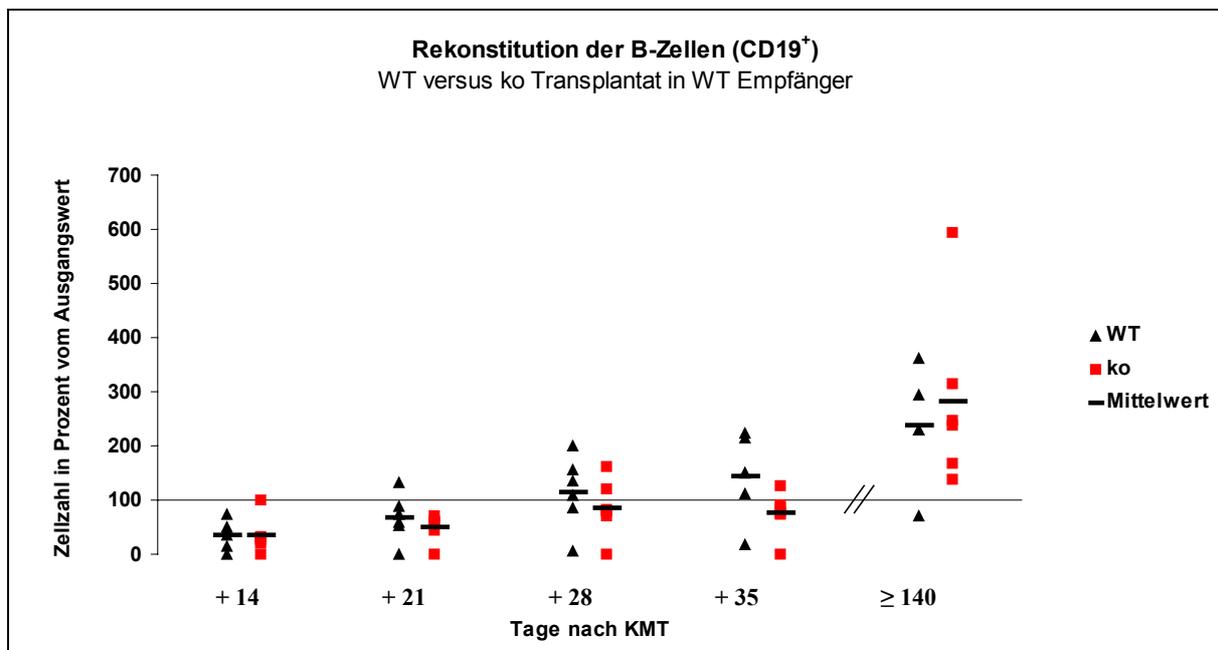


Abbildung 33: Rekonstitution der B-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

4.7.5. NK-Zellen und NKT-Zellen

Die Rekonstitution der NK-Zellen (NK1.1⁺) benötigt beim Goldstandard 28 Tage, die IL-7^{-/-} Transplantat Empfänger zeigen nach mehr als 140 Tagen eine vollständige Rekonstitution (Abb. 34). Im Unterschied zur vorherigen Konstellation (IL-7^{+/+} vs. IL-7^{-/-} Empfänger), bei der sich das Fehlen von IL-7 im Empfänger nicht auf die

Rekonstitution der NK-Zellen auswirkt, wirkt sich das Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat auf die frühe Posttransplantationsphase aus.

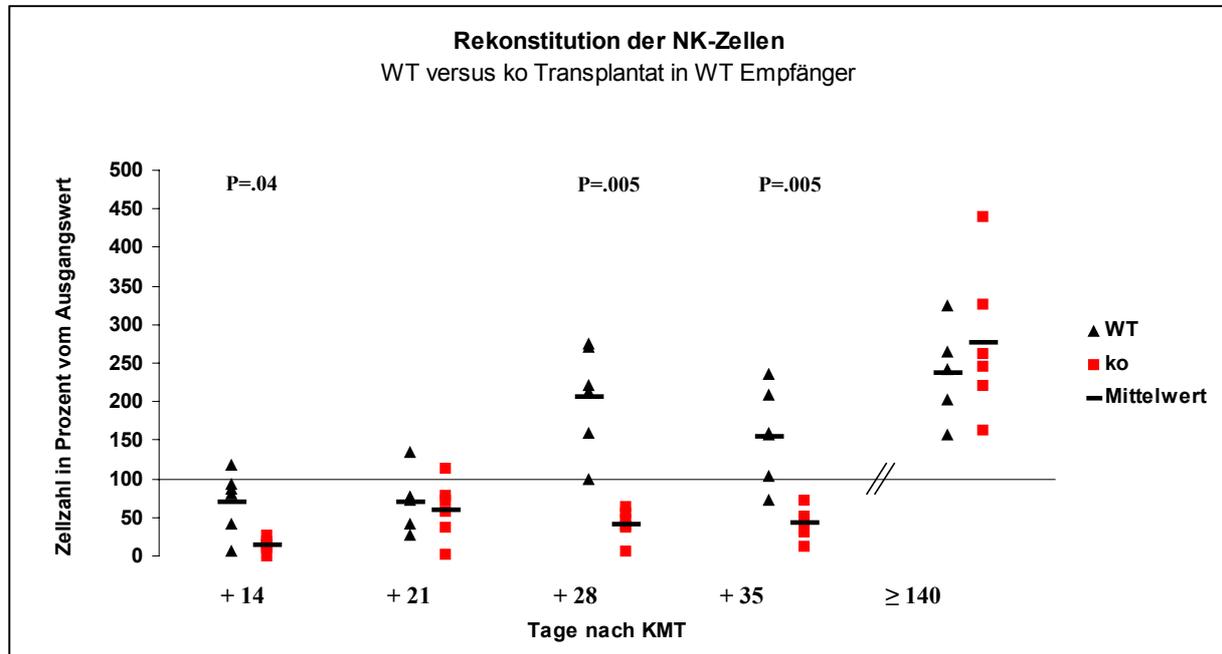


Abbildung 34: Rekonstitution der NK-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

In der Gruppe der IL-7^{-/-} Transplantatempfänger sind die Mittelwerte der NK-Zellen zu den Zeitpunkten Tag+14, Tag+28 und Tag+35 signifikant niedriger (p=.04, p=.005, und p=.005).

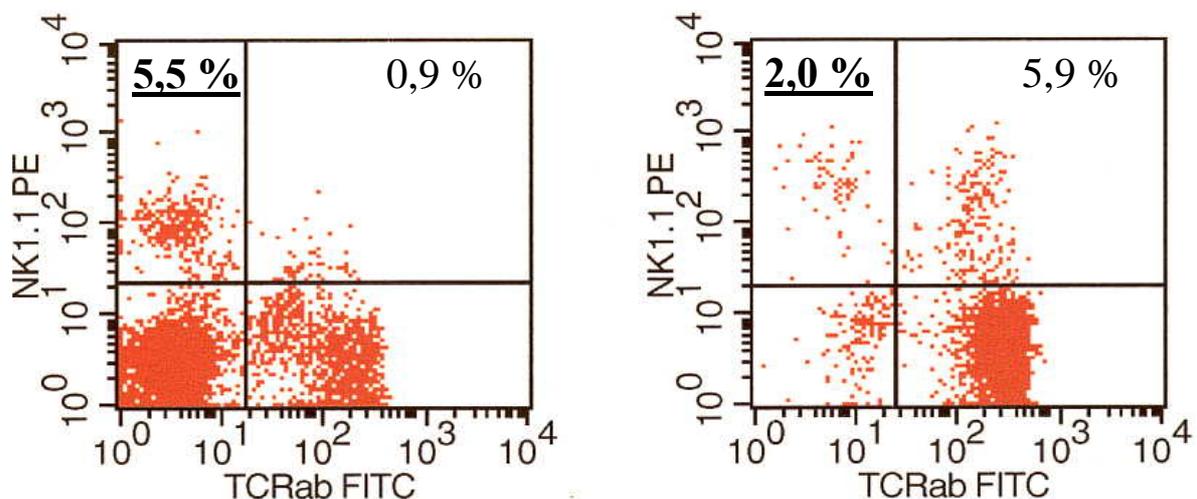


Abbildung 35: Repräsentative FACS-Analyse des PB auf Anwesenheit von NK-Zellen am Tag+28 bei Goldstandard (links) und im IL-7^{-/-} Transplantat Empfänger (rechts). Der linke obere Quadrant zeigt die NK1.1⁺-Zellen, der rechte obere Quadrant die NKT-Zellen.

Der Ausgangsmittelwert der NKT-Zellen (TCR $\alpha\beta^+$ /NK1.1 $^+$) wird beim Goldstandard erstmals nach 21 Tagen erreicht. Nach 140 Tagen beträgt die Anzahl der NKT-Zellen 164% des Ausgangsmittelwertes. Die IL-7 $^{-/-}$ Transplantat Empfänger überschreiten ihren Ausgangsmittelwert (380 \pm 139/ μ l) nach 21 Tagen mit 154% (562 \pm 327/ μ l), woraufhin der Anteil der NKT-Zellen nach 140 Tagen wieder auf im Mittel 34% (119 \pm 59/ μ l) abnimmt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Rekonstitution der NKT-Zellen mit p=.008 bei den IL-7 $^{+/+}$ Transplantat Empfängern signifikant besser. Wie bei der vorherigen Konstellation (IL-7 $^{-/-}$ Empfänger) ist auch bei den IL-7 $^{-/-}$ Transplantat Empfängern keine langfristige Rekonstitution der NKT-Zellen erreicht, obwohl es in der Frühphase nach Transplantation zu einer kurzfristigen Expansion gekommen ist.

Zwischenzusammenfassung IV:

Trotz Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat kommt es zu einer normalen myelomonozytären Rekonstitution. Im Unterschied zum Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger (vorherige Konstellation) wirkt sich ein Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat langfristig (ab Tag+28) nicht auf die Rekonstitution von CD4 $^+$ (insgesamt), CD8 $^+$, DN T-, B- und NK-Zellen aus. Lediglich der Anteil an NKT-Zellen erreicht keine langfristige Rekonstitution. In der frühen Posttransplantationsphase (bis Tag+28) kommt es bei Fehlen von IL-7 im Transplantat im Vergleich zum Goldstandard zu signifikanten Verzögerungen in der Rekonstitution von DN T-Zellen und NK-Zellen.

4.8. Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger und im Transplantat

Interessanterweise zeigt die Analyse des Überlebens (siehe 4.5.), dass auch eine Transplantation von IL-7^{-/-} Knochenmark in IL-7^{-/-} Empfänger möglich ist. Im Folgenden wird gezeigt, wie sich die Immunrekonstitution dazu verhält.

4.8.1. Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Monozyten

Die Rekonstitution der Neutrophilen Granulozyten nach KMT ist in beiden Konstellationen bereits nach 14 Tagen abgeschlossen. Bei Goldstandard und IL-7^{-/-} Tieren wird der Ausgangsmittelwert zum Zeitpunkt ≥ 140 Tage um 293% bzw. 255% ($1664 \pm 724/\mu\text{l}$) übertroffen. Während der gesamten Beobachtungszeit zeigen die Werte zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen Goldstandard und Transplantation in Abwesenheit von IL-7 produzierenden Zellen.

Trotz vollständigem Fehlen von IL-7 ist die Rekonstitution der eosinophilen Granulozyten an Tag+21 vollständig (142%, d.e. $123 \pm 285/\mu\text{l}$), und sie erreichen nach ≥ 140 Tagen 173% des Ausgangsmittelwertes ($149 \pm 68/\mu\text{l}$). Die Basophilen sind am Tag+14 rekonstituiert ($112 \pm 101/\mu\text{l}$) und übersteigen ihren Ausgangsmittelwert nach 140 Tagen um 111% ($84 \pm 50/\mu\text{l}$). Interessanterweise bleiben die Monozyten nach vorübergehender Rekonstitution in der Frühphase nach KMT am Tag+140 mit 44% ($32 \pm 33/\mu\text{l}$) deutlich unter ihrem Ausgangsmittelwert ($74 \pm 61/\mu\text{l}$).

4.8.2. Lymphozyten

Beim Goldstandard wird der Ausgangswert am Tag+28 erreicht; die IL-7^{-/-} Tiere benötigen 35 Tage, um vollständig zu rekonstituieren (Abb. 36). Beim Goldstandard wird der Mittelwert der Ausgangswerte (IL-7^{+/+}: $7694 \pm 2039/\mu\text{l}$, IL-7^{-/-}: $1142 \pm 448/\mu\text{l}$) nach mehr als 140 Tagen um 233% übertroffen, bei den IL-7^{-/-} Tieren liegt der Wert

bei 133% ($1289 \pm 178/\mu\text{l}$). Zwischen den Gruppierungen bestehen bezüglich auch der Rekonstitution der Gesamtlmphozyten keine signifikanten Unterschiede.

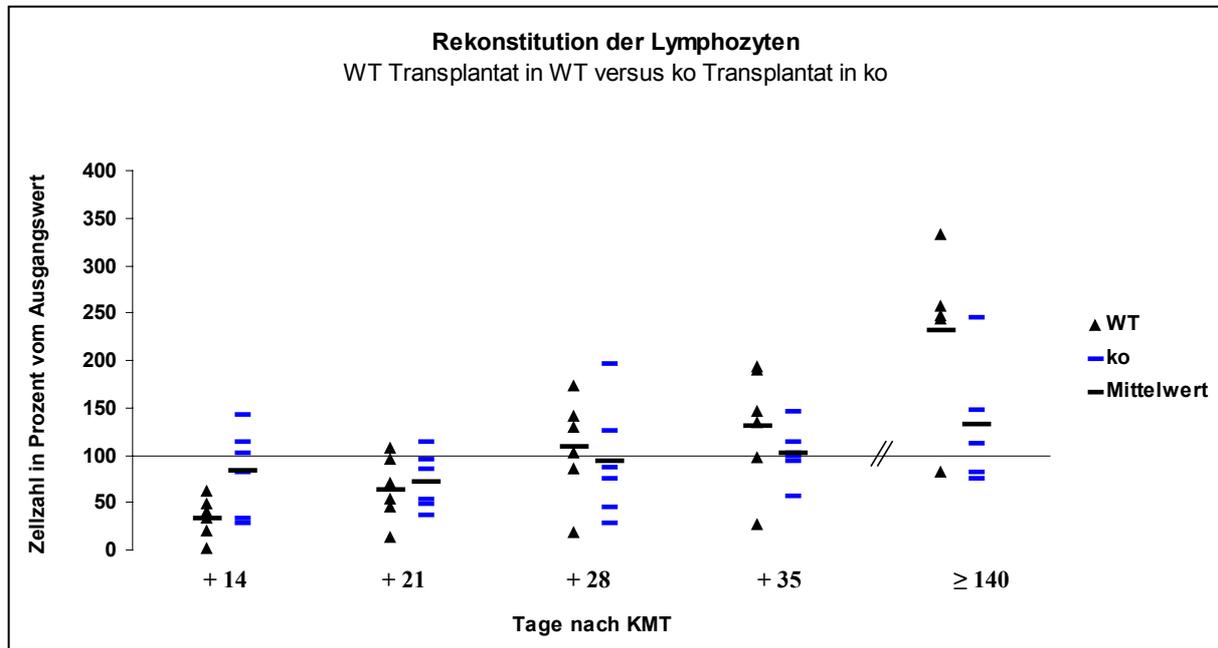


Abbildung 36: Rekonstitution der Lymphozyten. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

4.8.3. T-Zellen

Überraschenderweise ist die T-Zellrekonstitution in Abwesenheit von IL-7 produzierenden Zellen in der frühen Posttransplantationsphase im Bezug auf das Erreichen des Ausgangswertes signifikant besser als die des Goldstandards (Tag+14 $p=0.005$, und Tag+21 $p=0.03$). Die Rekonstitution der T-Zellen der IL-7^{-/-} Tiere ist an Tag+14 bereits erreicht, während beim Goldstandard 35 Tage benötigt werden (Abb. 37). Das liegt wie bei der vorherigen Konstellation an einer Expansion von DN T-Zellen in der frühen Posttransplantationsphase. Danach (≥ 28 Tage) zeigen beide Konstellationen keine signifikanten Unterschiede. Die T-Zellzahl des Goldstandards steigt an Tag+140 auf 181% ($3702 \pm 1306/\mu\text{l}$) des Ausgangsmittelwertes an, während der Wert für die IL-7^{-/-} Tiere 132% ($375 \pm 75/\mu\text{l}$) erreicht.

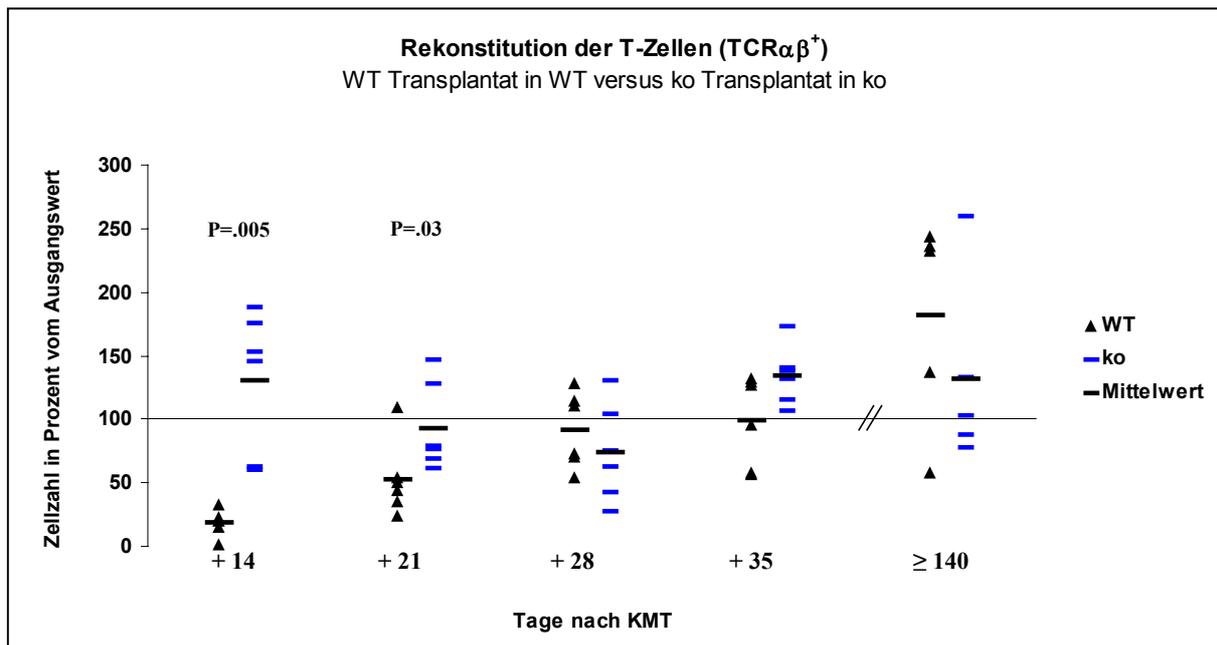


Abbildung 37: Rekonstitution der T-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

Der Anteil an TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen im peripheren Blut beim Goldstandard bleibt in der Früh- und Spätphase nach KMT niedrig ($\leq 2\%$ der Lymphozyten), während bei der IL-7 freien Konstellation erwartungsgemäß keine TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen bestimmt werden konnten.

4.8.3.1. CD4⁺-Zellen

Beim Goldstandard benötigt die Rekonstitution der CD4⁺-Zellen (TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺) 35 Tage, (Abb. 38). Die IL-7^{-/-} Tiere zeigen bis über den Tag+140 hinaus keine vollständige Rekonstitution. Nach 140 Tagen liegt der Mittelwert der CD4⁺-Zellen des Goldstandards bezogen auf den Ausgangsmittelwert bei 134%, bei den IL-7^{-/-} Tieren bei 41% ($17 \pm 5/\mu\text{l}$). In der frühen Posttransplantationsphase nach 14 Tagen zeigen die CD4⁺-Zellen der IL-7^{-/-} Tiere ähnlich wie bei der Gesamt T-Zellzahl signifikant höhere Prozentzahlen vom Ausgangswert als die IL-7^{+/+} ($p=0.01$), während dann am Tag+28 die IL-7^{+/+} signifikant höhere CD4⁺-Zellzahlen im Vergleich zum Ausgangswert als die IL-7^{-/-} Tiere aufweisen ($p=0.005$).

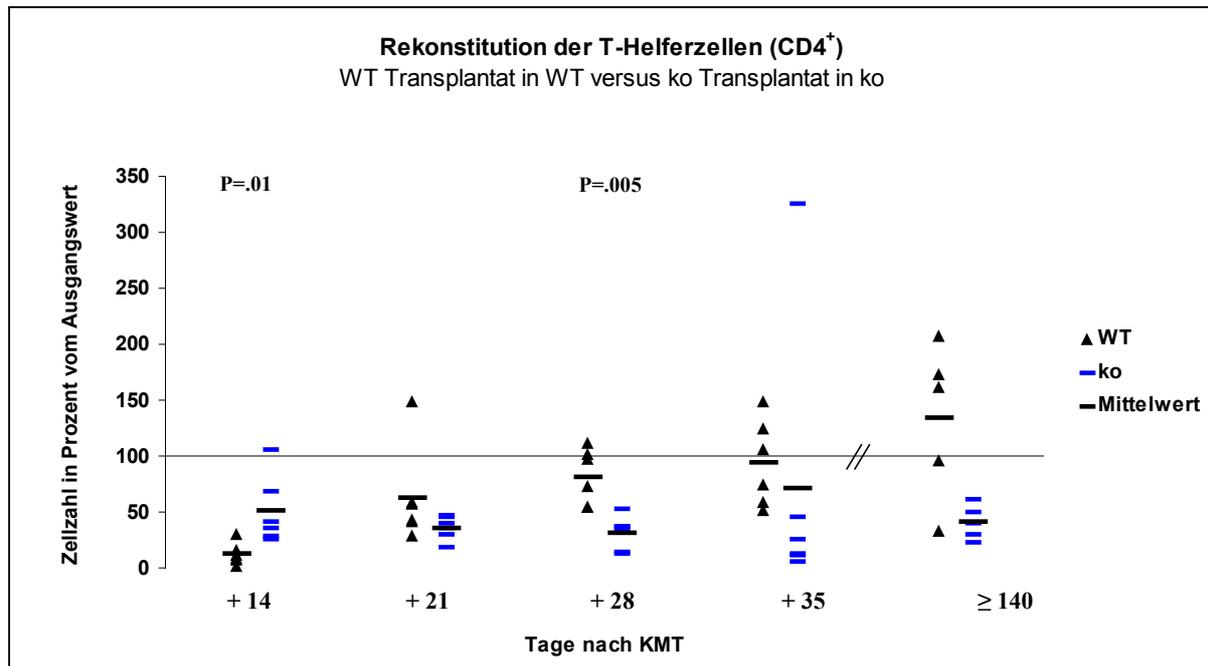


Abbildung 38: Rekonstitution der CD4⁺-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

4.8.3.1.1. Naive und Gedächtnis CD4⁺-Zellen

Die Rekonstitution der naiven CD4⁺-Zellen (CD4⁺/CD45RB^{high}) bzw. der Gedächtnis CD4⁺-Zellen (CD4⁺/CD45RB^{low}) ist bei den IL-7^{-/-} Tieren nach 140 Tagen nicht vollständig abgeschlossen (89% des Ausgangsmittelwertes der naiven bzw. 53% der Gedächtnis CD4⁺-Zellen). Eine Beurteilung des Anteils an naiven und Gedächtnis Zellen ist auf Grund der niedrigen Absolutzahlen schwierig (≤ 30 Zellen/ μ l). Bezüglich der Rekonstitution der naiven CD4⁺-Zellen unterscheiden sich die IL-7^{+/+} nach 140 Tagen durch eine signifikante Erhöhung gegenüber den IL-7^{-/-} Tieren ($p=.003$), und auch der Mittelwert des Anteils an Gedächtnis CD4⁺-Zellen ist an den Tagen +28 und +35 gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöht ($p=.008$ und $p=.002$).

4.8.3.2. CD8⁺-Zellen

Die IL-7^{-/-} Tiere zeigen wie bei den CD4⁺-Zellen über den Tag+140 hinaus keine vollständige Rekonstitution (Abb. 39). Nach 140 Tagen liegt der Mittelwert der CD8⁺-Zellen der IL-7^{-/-} Tiere bei 48% (24±9/μl). Bezogen auf die Rekonstitution der CD8⁺-Zellen unterscheiden sich an Tag+35 und Tag+140 die IL-7^{-/-} Tiere signifikant von den IL-7^{+/+} Empfängern (p=.01, p=.02).

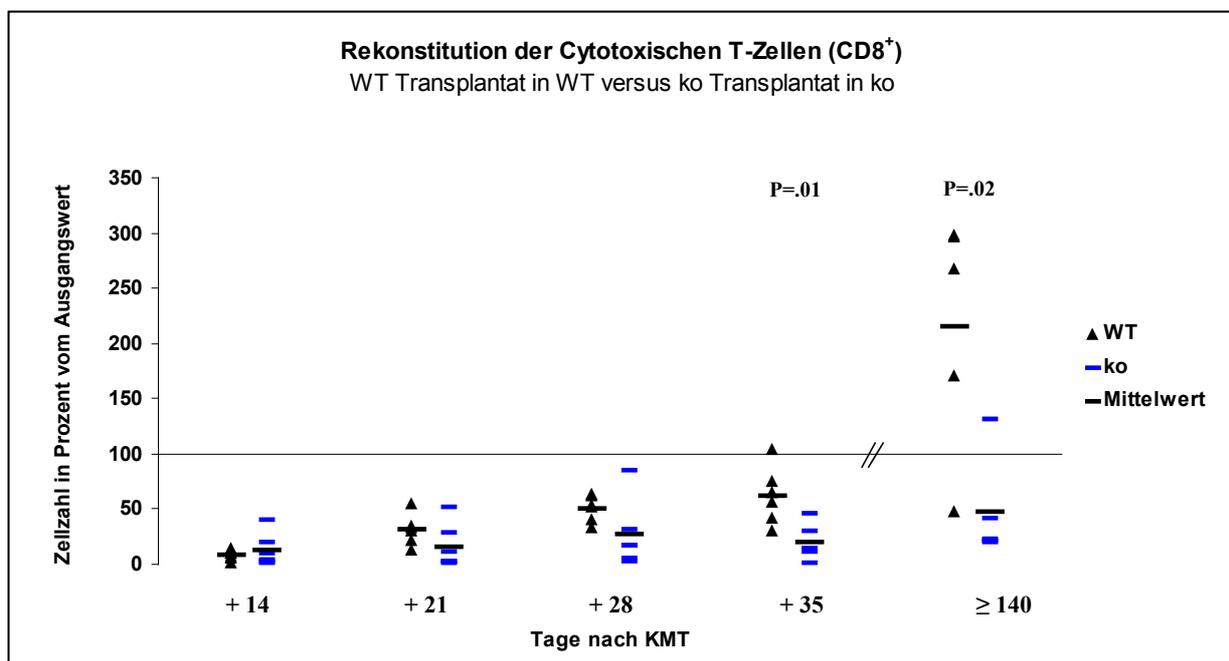


Abbildung 39: Rekonstitution der CD8⁺-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

4.8.3.2.1. Naive und Gedächtnis CD8⁺-Zellen

Interessanterweise wird auch in vollständiger Abwesenheit von IL-7 nach mehr als 140 Tagen eine Rekonstitution von Gedächtnis CD8⁺-Zellen (CD8⁺/CD45RB^{low}) mit Erreichen von 175% (24±10/μl) des Ausgangsmittelwertes beobachtet. Jedoch muß noch mal auf die niedrigen Zellzahlen hingewiesen werden. Die Mittelwerte des Goldstandards unterscheiden sich zu den verschiedenen Zeitpunkten nach KMT an den Tagen +21, +28, +35 und ≥140 signifikant zu Ungunsten der Tiere der Negativkontrolle (p=.002, p=.008, p=.002 und p=.002). Eine Rekonstitution der naiven

CD8⁺-Zellen (CD8⁺/CD45RB^{high}) nach KMT wird bei den IL-7^{-/-} Tieren auch an Tag+140 nicht erreicht. Die IL-7^{-/-} Tiere erreichen zu diesem Zeitpunkt bezogen auf den Ausgangsmittelwert lediglich 37% (12±7/μl).

4.8.3.3. DN T-Zellen

Auch in völliger Abwesenheit von IL-7 findet eine bemerkenswerte Expansion an DN T-Zellen (TCRαβ⁺/CD4⁺/CD8⁻) statt. Die Rekonstitution der DN T-Zellen nach KMT ist in An- und Abwesenheit von IL-7 bereits nach 14 Tagen abgeschlossen (Abb. 40). Bei Goldstandard und IL-7^{-/-} Tieren wird der Ausgangsmittelwert nach mehr als 140 Tagen um 1173% bzw. 179% (334±66/μl) übertroffen. An den Tagen +28 und +140 unterscheiden sich die IL-7^{+/+} Tiere bezüglich der Rekonstitution der DN T-Zellen gegenüber den IL-7^{-/-} Tieren signifikant (p=.005, p=.03).

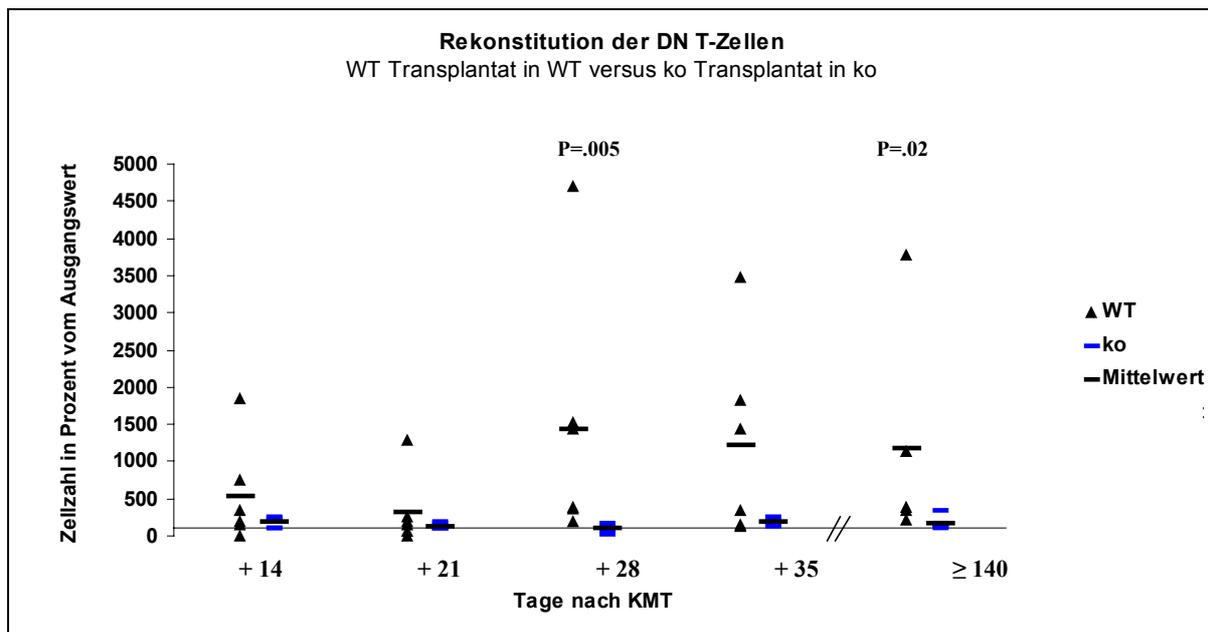


Abbildung 40: Rekonstitution der DN T-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

Dabei machen in der IL-7 freien Konstellation die unkonventionellen DN T-Zellen 63% bis 93% aller T-Zellen aus (s. Tabelle 20).

Gruppe	T-Zellen	Vor KMT (d -2)		Frühphase (d +14)		Spätphase (d +140)	
		absolut	% TCR $\alpha\beta^+$	absolut	% TCR $\alpha\beta^+$	absolut	% TCR $\alpha\beta^+$
WT-WT	TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ und TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$	2041 \pm 550	96%	206 \pm 124	53%	3310 \pm 1392	89%
	TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^-$ /CD8 $^-$	81 \pm 56	4%	186 \pm 99	47%	392 \pm 169	11%
ko-ko	TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ und TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$	121 \pm 63	37%	28 \pm 16	7%	41 \pm 14	11%
	TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^-$ /CD8 $^-$	207 \pm 80	63%	392 \pm 251	93%	334 \pm 66	89%

Tabelle 20: Vergleich der konventionellen T-Zellen (TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ und TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$) mit unkonventionellen T-Zellen (TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^-$ /CD8 $^-$ = DN). Die Anwesenheit der Zellen ist vor KMT, in der Frühphase nach KMT, und in der Spätphase nach KMT durchflußzytometrisch bestimmt worden. Absolute Zahlen in Zellen/ μ l.

4.8.4. B-Zellen

Bei der Rekonstitution der B-Zellen (CD19 $^+$) zeigen die IL-7 $^{-/-}$ Tiere bis zum Tag+140 hinaus keine vollständige Rekonstitution (Abb. 41). Nach 140 Tagen liegt der Mittelwert der B-Zellen bei den IL-7 $^{-/-}$ Tieren bei 67% (19 \pm 12/ μ l) des Ausgangsmittelwertes (41 \pm 20/ μ l). An Tag+35 und an Tag+140 ist der prozentuale Anteil der B-Zellen der IL-7 $^{-/-}$ Tiere signifikant niedriger als bei den IL-7 $^{+/+}$ Tieren (p=.04, p=.03).

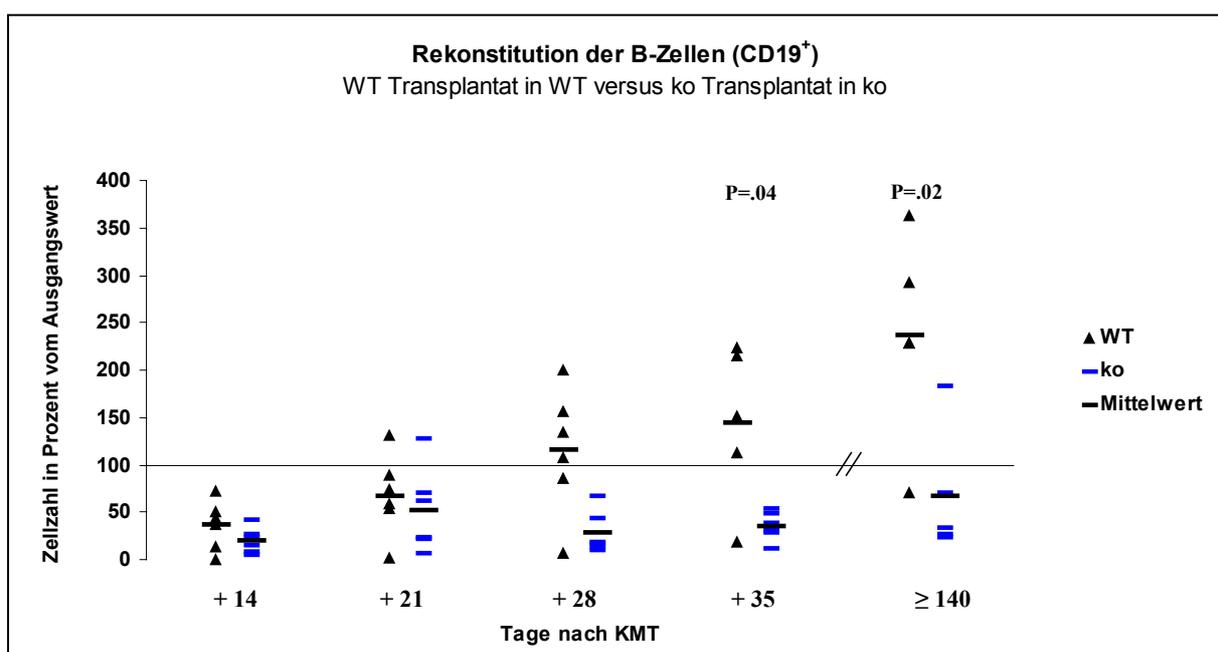


Abbildung 41: Rekonstitution der B-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7 $^{+/+}$, ko = IL-7 $^{-/-}$.

4.8.5. NK-Zellen und NKT-Zellen

Die Rekonstitution der NK-Zellen (NK1.1⁺) bleibt in Abwesenheit von IL-7 unvollständig (Abb. 42); bei den IL-7^{-/-} Tieren werden lediglich 74% (295±69/μl) des Ausgangsmittelwertes (427±198/μl) erreicht. Bezüglich der NK-Zellen zeigt der Goldstandard an den Tagen +28, +35 und +140 eine signifikant bessere Rekonstitution als die IL-7^{-/-} Tiere (p=.008, p=.01, und p=.01).

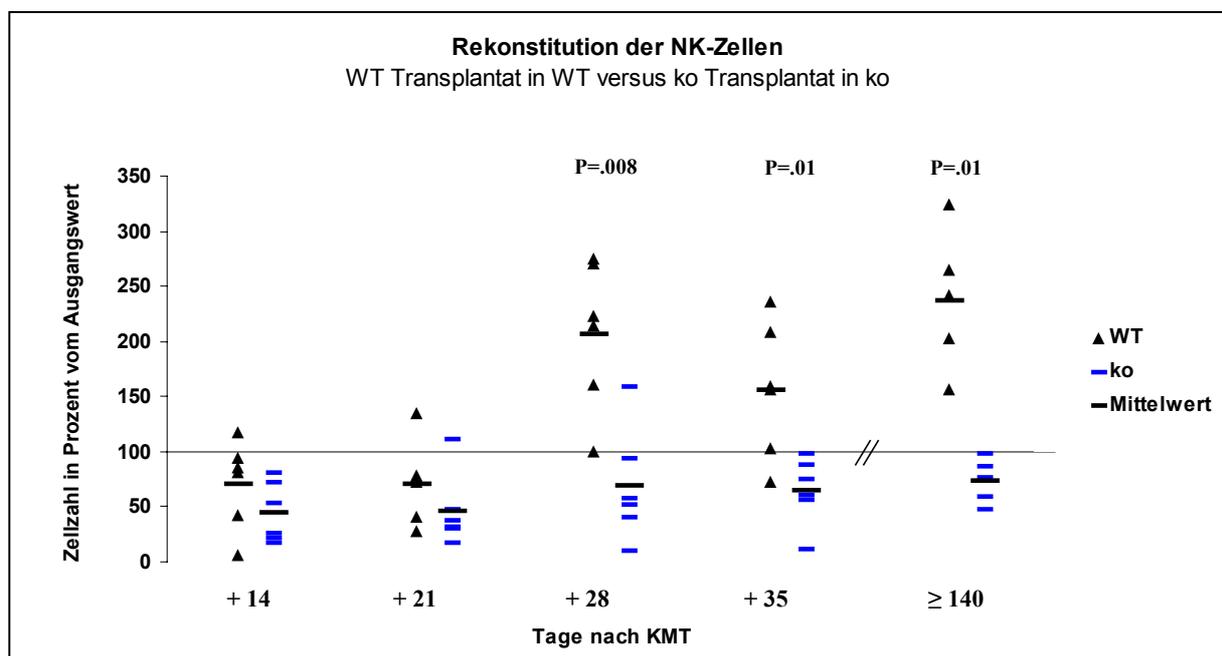


Abbildung 42: Rekonstitution der NK-Zellen. Die Referenzlinie bei 100% bezeichnet den Ausgangsmittelwert. Die Daten werden auf den Ausgangswert vor KMT bezogen. WT = IL-7^{+/+}, ko = IL-7^{-/-}.

Der Ausgangsmittelwert der NKT-Zellen (TCRαβ⁺/NK1.1⁺) wird beim Goldstandard erstmals nach 21 Tagen wieder erreicht (135±45/μl, s. 4.6.5.). Die IL-7^{-/-} Tiere überschreiten ihren Ausgangsmittelwert (35±17/μl) bereits nach 14 Tagen mit 346% (89±82/μl). Damit unterscheiden sie sich zu diesem Zeitpunkt signifikant (p=.01) vom Goldstandard, woraufhin jedoch der Anteil der NKT-Zellen nach 140 Tagen wieder auf im Mittel 85% (23±16/μl) des Ausgangsmittelwertes abfällt. Somit ist auch bei den IL-7^{-/-} Tieren keine langfristige Rekonstitution der NKT-Zellen erreicht, obwohl es auch hier interessanterweise in der Frühphase nach Transplantation zu einer kurzfristigen Erholung gekommen ist.

Zwischenzusammenfassung V:

Bei komplettem Fehlen von IL-7 im System addieren sich die Effekte aus 4.6. und 4.7. Es wird keine vollständige Rekonstitution der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen sowie der B-, NK- und NKT-Zellen (ca. 50-70% des Ausgangswertes) erreicht, die Rekonstitution bleibt langfristig (≥ 140 Tage) unvollständig. Interessanterweise ist die Rekonstitution der Gesamt T-Zellzahl in Abwesenheit von IL-7 dennoch aufgrund der expandierten DN T-Zellen möglich.

V. Diskussion

Ein unvollständig rekonstituiertes Immunsystem ist eine der Hauptursachen für die Morbidität und die Mortalität nach KMT ^(60; 79). Die Immunrekonstitution nach KMT kann durch die exogene Zugabe von Zytokinen unterstützt werden ^(1-3; 9; 20; 42; 85). Interleukin-7 ist für diesen Zweck besonders gut geeignet, da für dieses Zytokin postuliert wird, ein für die Lymphopoese nicht-redundantes Zytokin zu sein ⁽⁹²⁾. Um den Einfluß von endogenem IL-7 auf die Immunrekonstitution nach KMT untersuchen zu können, ist in dem KMT-Tiermodell dieser Arbeit die IL-7^{-/-} Maus verwendet worden. Die Rückkreuzung des IL-7^{-/-}-Ausgangsstammes auf den Stamm C57BL/6 ermöglicht die Verwendung des C57BL/6 IL-7^{+/+} Stammes in einer syngenem Transplantations-Konstellation, und lässt den direkten Vergleich mit bereits existierenden Transplantationsdaten von C57BL/6 Mäusen zu. Eine detaillierte Phänotypisierung des PB und KM vor KMT war notwendig, um die hämatopoetische Rekonstitution in dem syngenem Modell dieser Arbeit zu beschreiben, und wird im Folgenden (s. 5.1. und 5.2.) dargestellt.

5.1. Der Phänotyp der C57BL/6 IL-7^{-/-} Mauslinie: Fehlen von reifen B-Zellen und T-Zellen bei relativ erhöhtem Anteil an DN T-Zellen (TCR $\alpha\beta$ ^{low}/CD4/CD8⁻), NK1.1⁺- und TCR $\alpha\beta$ /CD19/NK1.1-Zellen im peripheren Blut

Neben der Lymphopoese haben wir erstmals auch die Subpopulationen der Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile und Basophile) und die Monozyten in der IL-7^{-/-} Maus genauer untersucht. In einer Vorarbeit ist postuliert worden, dass die Entwicklung von Eosinophilen IL-7 abhängig verläuft ⁽⁸⁹⁾. In den in dieser Arbeit untersuchten Mäusen entwickeln sich die Granulozytensubpopulationen und Monozyten unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von endogenem IL-7. Diese Unabhängigkeit von IL-7 wurde bis dato für die Entwicklung der Granulozytensubpopulationen noch nicht explizit gezeigt, sondern nur für die

Gesamtgranulozyten⁽⁹²⁾. Der periphere Anteil der Monozyten in der IL-7^{-/-} Maus wird in der Arbeit von Von Freeden-Jeffry mit 26,2% angegeben⁽⁹²⁾. Absolutzahlen stehen in der Originalarbeit nicht zur Verfügung. Der hier ermittelte Wert (Monozyten: 3,0%, s. Tab. 11) unterscheidet sich von der Originalarbeit. Möglicherweise gibt es eine Altersabhängigkeit mit höherem prozentualen Anteil an Monozyten bei jüngeren IL-7^{-/-} Mäusen. In der Originalarbeit wird eine breiter gefasste Altersgruppe von 5-14 Wochen untersucht, während in dieser Arbeit ausschließlich Tiere in einem Alter von 12 bis 14 Wochen analysiert werden.

Wie in der Originalarbeit beschrieben fehlen die reifen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen fast vollständig in der für diese Arbeit rückgekreuzten IL-7^{-/-} Maus. Die Differenzierung von naiven bzw. Gedächtnis CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen wird mit Hilfe der Fluoreszenzintensität des Aktivierungsmarkers CD45RB⁺ durchgeführt (s. Tab. 9). CD45RB^{high} entspricht dabei naiven, CD45RB^{low} Gedächtniszellen^(16; 37; 68). Allerdings werden bei den IL-7^{-/-} Mäusen aufgrund des Fehlens reifer CD4⁺- und CD8⁺-Zellen kaum naive und Gedächtnis CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen gemessen; die absolute Zellzahl dieser Populationen liegt jeweils unter 30 Zellen/ μ l. Wie erwartet konnten wir vor Transplantation auch keine TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen und B-Zellen im peripheren Blut der IL-7^{-/-} Mäuse nachweisen. Trotz des fast vollständigen Fehlens von CD4⁺-, CD8⁺-, TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen und B-Zellen haben IL-7^{-/-} Mäuse Lymphozyten, die ein weitgehend normales Überleben ermöglichen. Daher wird detailliert untersucht, aus welchen Subpopulationen die Lymphozyten bestehen.

Die DN T-Zellen machen die überwiegende T-Zellpopulation bei der IL-7^{-/-} Maus aus. Die signifikant höhere Absolutzahl an DN T-Zellen im peripheren Blut der IL-7^{-/-} Mäuse gegenüber der IL-7^{+/+} Maus ist bisher noch nicht beschrieben worden. Diese DN T-Zellen zeigen eine verminderte Intensität des TCR $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$ ^{low}), was möglicherweise auf eine andere Form der T-Zellselektion (z.B. außerhalb des Thymus) hindeutet. Der Reifungsort und auch die exakte Funktion dieser Zellpopulation in der IL-7^{-/-} Maus ist unklar. Aufgrund ihrer signifikanten Expansion

gegenüber den IL-7^{+/+} Mäusen haben die DN T-Zellen möglicherweise eine wichtige funktionelle Bedeutung für das Überleben von IL-7^{-/-} Mäusen. Die Anzahl an NK-Zellen ist gegenüber den IL-7^{+/+} Mäusen leicht, aber nicht signifikant erhöht.

Wenn man die relativen Anteile der reifen T-, B- und NK-Zellen aus Tabelle 11 addiert, summieren sich diese bei den IL-7^{+/+} Mäusen auf 100% der Lymphozyten. Bei den IL-7^{-/-} Mäusen zeigen dagegen 25% der Zellen einen unbekanntem TCRαβ/CD19/NK1.1-Phänotyp. Möglicherweise handelt es sich hierbei um lymphoide Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark ausgewandert sind. Im Folgenden wird das Knochenmark der IL-7^{-/-} Mäuse näher untersucht, weil es einerseits den Einfluß von IL-7 auf die Hämatopoese zeigt, und andererseits das Knochenmark im syngenen Transplantationsmodell als Transplantat verwandt wird.

5.2. Der Vergleich von IL-7^{+/+} und IL-7^{-/-} Knochenmark-Transplantat: weniger Sca-1⁺ Stammzellen und keine B-Zellen im IL-7^{-/-} KM, aber gleicher Gehalt an reifen T-Zellen wie im IL-7^{+/+} KM

Die Phänotypisierung des KM ist von entscheidender Bedeutung für die Interpretation der Transplantations-Konstellationen II (ko-KM in WT) und IV (ko-KM in ko). Als eine mögliche Ursache für eine verzögerte bzw. langfristig unvollständige Rekonstitution von Lymphozytensubpopulationen bei den Empfängern von IL-7^{-/-} KM könnte eine verminderte Anzahl an Stammzellen (Sca-1⁺) oder hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD117⁺) verantwortlich sein. Es ist gezeigt worden, dass Sca-1⁺-Zellen aus KM oder aus Nabelschnurblut die Hämatopoese letal bestrahlter Mäuse vollständig rekonstituieren können ^(48; 62). Interessanterweise ist die Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen (Sca-1⁺; ⁽⁸¹⁾) im Knochenmark der IL-7^{-/-} Maus hochsignifikant niedriger als in der IL-7^{+/+} Maus, während das IL-7^{-/-} KM mehr differenzierte hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD117⁺; ⁽⁶¹⁾) als das IL-7^{+/+} KM

enthält. IL-7 könnte direkt einen Einfluß auf die Anzahl von hämatopoetischen Stammzellen haben, dagegen spricht das Fehlen von IL-7R auf Stammzellen, und die normale Myelopoese in der IL-7^{-/-} Maus. Im Bezug auf die T-Lymphopoese wird die Hypothese von Moore *et al.* von 1996 widerlegt, dass naive CD4⁺-Zellen sowie junge Pro T-Zellen im Thymus und im peripheren Blut bei 4-8 Wochen alten IL-7^{-/-} Mäusen bereits im Knochenmark einen CD117⁺ Expressionsdefekt haben ⁽⁴⁹⁾. Möglicherweise ist bei den IL-7^{-/-} Mäusen die Hämatopoese durch andere Zytokine „hochreguliert“, da peripher eine Lymphozytopenie besteht. Es ist jedoch unklar, ob ein wirklicher „Verbrauch“ von Sca-1⁺-Stammzellen bei IL-7^{-/-} Mäusen stattfindet. Als Folge werden möglicherweise vermehrt lymphozytäre Vorläuferzellen (TCRαβ/CD19⁻/NK1.1⁻, s.o.) ins periphere Blut ausgeschüttet.

Wie im PB zeigen sich in der lymphozytären Zusammensetzung des Transplantats signifikante Unterschiede zum IL-7^{+/+} KM. Der Anteil an CD19⁺ B-Zellen ist auch im IL-7^{-/-} KM kaum zu messen (≤2%, s. Tabelle 12). Carvalho *et al.* haben sowohl im KM von IL-7^{-/-} als auch in IL-7^{+/+} Mäusen den Anteil an B220⁺/IgM⁻/CD19⁺-Zellen mit folgenden Ergebnissen bestimmt: in der 1. Lebenswoche 15,2% (IL-7^{+/+}: 88,7), in der 4. Woche 6,5% (IL-7^{+/+}: 81,7), gefolgt von einem Rückgang in der 7. Woche auf 0,1% (IL-7^{+/+}: 80,0). Die Ursache für diesen Rückgang an B-Zellen mit zunehmenden Alter ist unklar ⁽¹¹⁾. Trotz Fehlen von reifen B-Zellen im IL-7^{-/-} KM gelingt eine vollständige B-Zellrekonstitution, wenn der Empfänger IL-7^{+/+} ist.

Die Anzahl an T-Zellsubpopulationen, besonders die für die thymusunabhängige periphere Expansion reifer Spenderzellen wichtigen Gedächtnis CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, unterscheiden sich im IL-7^{-/-} KM nicht signifikant vom IL-7^{+/+} KM, so dass Unterschiede in der T-Zellrekonstitution nach Transplantation (und gegebenenfalls unterschiedliches Überleben) nicht durch einen verminderten Gehalt an diesen Zellen im IL-7^{-/-} KM zu erklären sind. Insbesondere bei der Rekonstitution der DN T-Zellen und der NK-Zellen zeigen sich bei Transplantation mit IL-7^{-/-} KM Unterschiede in der Rekonstitution zum Goldstandard (s. Abb. 32 und 34). Auch hier

finden sich im KM zwischen IL-7^{-/-} und IL-7^{+/+} keine signifikanten Unterschiede. Einschränkend ist darauf hinzuweisen, dass die Darstellung der Absolut- und Prozentzahlen keine funktionellen Unterschiede zwischen T-Zellen im KM der IL-7^{-/-} Maus und T-Zellen aus dem IL-7^{+/+} KM erfassen kann.

Da weder hämatopoetische Vorläuferzellen noch andere Blutzellen IL-7 produzieren können, und sich die Anzahl an reifen T-Zellen, DN T-Zellen und NK-Zellen im IL-7^{-/-} und IL-7^{+/+} KM nicht unterscheidet, ist die Population der KM-Stromazellen (CD106⁺/CD117^{low}) für die Interpretation der Transplantations-Ergebnisse in dem Modell dieser Arbeit möglicherweise von entscheidender Bedeutung. Die Stromazellen machen immerhin im Transplantat einen Anteil von ca. 10% der transplantierten Zellen aus. Die Konditionierung von Mäusen durch Bestrahlung führt zu einem Mangel an IL-7 produzierenden Zellen, und damit zu einem Thymopoesedefekt. Chung *et al.* haben bei Mäusen *in vivo* gezeigt, dass mit einer zunehmenden Bestrahlungsdosis die thymische IL-7 Produktion in der Frühphase nach KMT (gemessen wurde an den Tagen +5 und +28) stetig abnimmt ⁽¹²⁾. Die in dem Ansatz dieser Arbeit gewählte Dosis von insgesamt 900cGy liegt im Vergleich zu den veröffentlichten Daten im mittleren Bereich. Somit ist auch bei IL-7^{+/+} Empfängern in der Frühphase mit einer Schädigung der Thymusepithelzellen und damit mit einer geringeren Produktion an IL-7 zu rechnen. Jedoch erholt sich die Thymusfunktion wieder, wie der Verlauf z.B. der CD8⁺-Zellen beim Goldstandard, und dort besonders bei den thymusabhängigen naiven CD8⁺-Zellen (s. Abb. 20 und 21) zeigt. Die Anzahl der transplantierten Stromazellen im IL-7^{-/-} KM sich zwar nicht signifikant vom IL-7^{+/+} KM, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass IL-7^{+/+} Stromazellen, bedingt durch ihre Eigenschaft IL-7 zu produzieren, Einfluß auf die Rekonstitution nehmen, indem die transplantierten Stromazellen z.B. in lymphatische Organe wie den Thymus wandern. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die Besiedlung von Organen mit transplantierten Stromazellen nachzuweisen. Möglicherweise deutet das schlechtere Überleben der transplantierten Mäuse bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat auf eine wichtige

Funktion dieser Zellen in der Immunrekonstitution hin (s. 5.3.). Im Falle der IL-7^{-/-} Empfänger, die IL-7^{+/+} KM erhalten, besteht jedoch scheinbar trotz Transplantation von IL-7^{+/+} Stromazellen keine Möglichkeit, die IL-7 Produktion wieder so herzustellen, dass sich CD4⁺- und CD8⁺-Zellen nach Transplantation vollständig rekonstituieren.

5.3. Ergebnisse im syngenen Transplantationsmodell: Das Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger und/oder im Transplantat führt zu einem schlechteren Überleben aufgrund einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen

Die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Transplantation von Spenderzellen (Letalität der Konditionierung durch Bestrahlung, vollständiges Spender-Engraftment und hämatopoetische Rekonstitution) sind in dem syngenen Transplantationsmodell dieser Arbeit erfüllt: Das Engraftment der Knochenmark-Spenderzellen kann bei allen untersuchten Tieren am Tag+14 nach KMT (n=29) nachgewiesen werden (IL-7^{+/+}-Empfänger ≥ 500 Leukozyten/ μ l, knockout-Empfänger ≥ 100 Leukozyten/ μ l). Aus 100 μ l PB werden das differentielle Blutbild ermittelt, die Chimärismusanalyse durchgeführt und mittels fünf durchflußzytometrischen Antikörperbestimmungen die Immunrekonstitution zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Stellt man dem Goldstandard alle Konstellationen gegenüber, in denen IL-7 limitiert ist, so ergibt sich mit 0.14 zwar kein signifikanter p-Wert für ein schlechteres Überleben ohne endogenes IL-7. Bei einer größeren Zahl an Transplantationen wird aber Signifikanz erwartet; eine Tendenz dazu ist deutlich erkennbar (s. Abb. 7 und 8). Bei Fehlen von IL-7 produzierender Zellen im Empfänger ist ein schlechteres Überleben dokumentiert (6/12, d.e. 50,0%) als im Goldstandard (6/7, d.e. 85,7%). Damit ist Hypothese II bestätigt (schlechteres Überleben in Empfängern ohne IL-7). Anders als vermutet ist jedoch auch das Fehlen von IL-7 im Transplantat mit einem schlechteren Überleben verbunden (6/10, d.e.

60,0%, siehe weiter unten). Das Tiermodell erlaubt zu untersuchen, welche Ursachen einer erhöhten Mortalität bei Fehlen von IL-7 produzierender Zellen im Empfänger bzw. im Transplantat zugrunde liegen. Zunächst könnte die Mortalität in der frühen Posttransplantationsphase auf ein hämatopoetisches Nonengraftment oder eine autologe Rekonstitution zurückzuführen sein. Ein Nonengraftment erscheint nach histologischen Analysen unwahrscheinlich, da in allen untersuchten Organen der verstorbenen Tiere Granulozyten als Indizgeber für ein Engraftment nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 9 und 10). Dabei ist aber nicht genau zu klären, ob dies auch für das periphere Blut gilt, da routinemäßige Blutabnahmen so früh nach KMT nicht möglich waren. Eine autologe Rekonstitution der Empfängerhämatopoese als Ursache für eine erhöhte Mortalität kann aufgrund der Chimärismusanalyse bei $\geq 98\%$ der Spenderzellen an Tag+35 ausgeschlossen werden (s. Kap. 4.3.).

Der Hauptgrund für das bessere Überleben des Goldstandards bei Vorhandensein von IL-7 produzierenden Zellen scheint eine effizientere Abwehr von Infektionen in der frühen Posttransplantationsphase (Tag+7 - Tag+35) durch eine schnellere Immunrekonstitution zu sein. Dabei scheint es von Bedeutung, dass zwischen Tag+5 bis Tag+16 endogenes IL-7 vorhanden ist, da in allen drei Konstellationen mit IL-7 Mangel bzw. kompletter Abwesenheit Tiere zu diesem Zeitpunkt an Infektionen verstorben sind. Am häufigsten treten *Streptococcus faecalis* und β -hämolyzierende *Escherichia coli* auf. Das Erregerspektrum spricht für die Translokation endogener Enterobakterien aus dem Darm in die Blutbahn trotz intensiver prä- und posttransplantativ durchgeführter Antibiotikabehandlung. In Anbetracht der nicht-redundanten Funktion von IL-7 auf die Entwicklung von reifen CD4⁺- und CD8⁺-, TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen sowie B-Zellen ist die wahrscheinlichere Ursache für das infektionsbedingte Versterben der Tiere eine verzögerte bzw. unvollständige Rekonstitution lymphozytärer Subpopulationen. Im Folgenden wird die Immunrekonstitution im Bezug auf die untersuchten Zellpopulationen diskutiert.

5.4. Bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger kommt es zu einer zügigen Rekonstitution von DN T-Zellen, die Rekonstitution reifer CD4⁺- und CD8⁺-Zellen sowie von B-Zellen bleibt aber aus

Alle Granulozytensubpopulationen sowie die Monozyten zeigen im Anschluß an die KMT auch bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen eine normale Rekonstitution und werden im Weiteren nicht weiter diskutiert. Überraschenderweise ist die Rekonstitution der Gesamtlymphozytenzahl bei Fehlen IL-7 produzierender Zellen im Empfänger ebenfalls unbeeinträchtigt.

Zellen	Fehlen von IL-7 im :				Vollständige Rekonstitution von IL-7 abhängig ?
	Goldstandard	Transplantat	Empfänger	Transpl. + Empf.	
Leukozyten	Tag+28	Tag +140	Tag +21	Tag +28	nein
Lymphozyten	Tag+28	Tag +140	Tag +28	Tag +35	nein
Granulozyten/Monozyten	Tag +14 - +28	Tag +14 - +28	Tag +14 - +28	Tag +14 - +28	nein
Reife T-Zellen (TCRαβ ⁺)	Tag+35	Tag +140	Tag +14	Tag +14	nein
Reife CD4-Zellen (TCRαβ ⁺ /CD4 ⁺)	Tag+140	90% an Tag +140	38% an Tag +140	41% an Tag +140	ja
Naive CD4-Zellen (CD4 ⁺ /CD45RB ^{high})	Tag+35	Tag +140	Tag +140	89% an Tag +140	ja
Gedächtnis CD4-Zellen (CD4 ⁺ /CD45RB ^{low})	Tag+140	97% an Tag +140	56% an Tag +140	53% an Tag +140	ja
Reife CD8-Zellen (TCRαβ ⁺ /CD8 ⁺)	Tag+140	Tag +140	63% an Tag +140	48% an Tag +140	ja
Naive CD8-Zellen (CD8 ⁺ /CD45RB ^{high})	Tag+140	Tag +140	85% an Tag +140	37% an Tag +140	ja
Gedächtnis CD8-Zellen (CD8 ⁺ /CD45RB ^{low})	Tag+21	Tag +28	Tag +140	Tag +140	nein
Doppelnegative T-Zellen (TCRαβ ⁺ /CD4 ⁺ /CD8 ⁺)	Tag+14	Tag +21	Tag +14	Tag +14	nein
Reife B-Zellen (CD19 ⁺)	Tag+28	Tag +140	72% an Tag +140	67% an Tag +140	ja
Reife NK-Zellen (NK1.1 ⁺ /TCRαβ ⁺)	Tag+28	Tag +140	Tag +28	74% an Tag +140	ja
Reife NKT-Zellen (NK1.1 ⁺ /TCRαβ ⁺)	Tag+21	Tag +21	Tag +28	Tag +14	nein
Überleben	6/7	6/10	6/12	5/11	

Tabelle 21: Synoptische Darstellung: Zeitpunkte der vollständigen Rekonstitution myelomonozytärer und lymphozytärer Subpopulationen im syngenem Transplantationsmodell bzw. der Mittelwert der Zellzahl in Prozent vom Ausgangswert, der maximal erreicht wird.

Die detaillierte Analyse der Lymphozytensubpopulationen (insbesondere der T-Zellen) zeigt jedoch erhebliche Auswirkungen des Fehlens von IL-7 in den verschiedenen Transplantations-Konstellationen, die sich in einer zeitlich verzögerten und/oder langfristig unvollständigen Rekonstitution manifestieren. Bei Fehlen IL-7 produzierender Zellen im Empfänger bleibt trotz Transplantation mit 1×10^7 nukleären Zellen aus einem vollen IL-7^{+/+} Knochenmark inklusive $0,8 \times 10^6$ reifer T-Zellen eine vollständige Rekonstitution von reifen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen auch nach mehr als 140 Tagen aus (s. Tabelle 21). Damit scheint in Abwesenheit von IL-7 weder eine ausreichend stammzellabhängige Reifung von lymphozytären Progenitoren im Thymus, noch eine periphere Expansion von CD4⁺- und CD8⁺-Spenderzellen mit vollständiger Rekonstitution möglich zu sein. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass sowohl kurzfristig (wie in den folgenden zitierten Arbeiten), als auch langfristig (≥ 140 Tage) nicht mit einer Rekonstitution von naiven CD4⁺- und CD8⁺-Zellen sowie Gedächtnis CD4⁺-Zellen zu rechnen ist, wenn IL-7 im Empfänger fehlt. Die Daten bezüglich naiver und Gedächtnis CD4⁺- und CD8⁺-Zellen sind allerdings bei weitgehendem Fehlen von reifen CD4⁺- und CD8⁺-Zellen nur schwer zu interpretieren, da vor Transplantation in der IL-7^{-/-} Maus nur ≤ 30 naive oder Gedächtnis Zellen/ μl messbar sind. Daher sind Werte von ebenfalls ≤ 30 Zellen/ μl nach Transplantation wenig aussagekräftig. Im Folgenden werden Untersuchungen aus der Literatur ausgeführt, die den Einfluß von IL-7 auf die Expansion naiver bzw. Gedächtnis T-Zellen belegen. Schluns *et al.* haben naive (CD44^{low}), CFSE (5-(-6) -carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, ⁽⁴¹⁾) markierte IL-7^{+/+} T-Zellen in sublethal konditionierte (700cGy) IL-7^{-/-}, IL-7R^{-/-} und IL-7^{+/+} Mäuse transferiert ⁽⁷⁵⁾. Sie zeigten die Abhängigkeit der Expansion aller naiver T-Zellen von IL-7. Darüber hinaus konnten sie durch den Transfer von naiven CD8⁺-Zellen mit und ohne Expression des IL-7R in unbehandelte IL-7^{+/+} Mäuse zeigen, dass 8 Tage nach dem Transfer nur noch $\leq 10\%$ der Zellen ohne IL-7R in der Milz nachzuweisen waren, während die T-Zellen mit dem IL-7R zu fast 100% wiederzufinden waren. Daraus folgt, dass IL-7 über die Bindung an den IL-7R der entsprechenden Zellen für das

Überleben der naiven CD8⁺-Zellen auch außerhalb der Transplantationssituation essentiell ist. Tan *et al.* haben insgesamt $1,5 \times 10^7$ naive (CD44^{low}) CD4⁺- und CD8⁺-Zellen aus IL-7^{+/+} Lymphknoten isoliert, mit CFSE markiert, und sowohl in mit 600cGy bestrahlte IL-7^{+/+}, als auch in IL-7^{-/-} Mäuse transferiert. Die Bestimmung des Anteils der markierten naiven T-Zellen in der Milz getöteter Tiere (n=2-3) erfolgte an den Tagen +1, +17 und +30 nach Transfer. Im Vergleich zu den IL-7^{+/+} Tieren kann in IL-7^{-/-} Empfängern eine signifikant raschere Abnahme der transplantierten naiven CD4⁺- ($\leq 0,5 \times 10^6$ in IL-7^{-/-} vs. 4×10^6 in IL-7^{+/+}) und CD8⁺-Zellen ($\leq 0,5 \times 10^6$ in IL-7^{-/-} vs. 5×10^6 in IL-7^{+/+}) innerhalb von 30 Tagen beobachtet werden, d.h. dass die Expansion naiver CD4⁺ und CD8⁺-Zellen von IL-7 abhängig ist ^(85; 86). Kondrack *et al.* und Seddon *et al.* beschreiben, dass eine Woche nach Transfer von Gedächtnis CD4⁺-Zellen (2×10^6 CD44^{high}/CD4⁺/CD45.1⁺) in Milzen bzw. Lymphknoten der IL-7^{-/-} Empfänger (CD45.2⁺) nur noch $\leq 5 \times 10^4$ nachzuweisen sind, während in den IL-7^{+/+} (CD45.2⁺) immer noch bis zu 55×10^4 der Gedächtnis CD4⁺-Zellen heterologen Ursprungs sind ^(34; 76). Im Unterschied zu naiven CD4⁺-, CD8⁺- und Gedächtnis CD4⁺-Zellen scheint dagegen die Entwicklung der Gedächtnis CD8⁺-Zellen weitgehend unabhängig von der Anwesenheit von IL-7 zu verlaufen. So weisen Tan *et al.* für die Proliferation von Gedächtnis CD8⁺-Zellen im Unterschied zu den naiven CD4⁺- und CD8⁺-Zellen sowie den Gedächtnis CD4⁺-Zellen nicht IL-7, sondern IL-15 als wichtiges Zytokin nach ⁽⁸⁶⁾.

Trotz Transplantation von kompletten Knochenmark, d.h. von $2,0 \times 10^6$ reifen B-Zellen und von pluripotenten Stammzellen (Sca-1⁺) kommt es in dem Modell dieser Arbeit bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger auch nicht zu einer Rekonstitution von reifen B-Zellen. Einzelne IL-7^{-/-} Empfängertiere erreichen zwar ihren Ausgangswert an B-Zellen wieder, insgesamt ist aber bei Fehlen von IL-7 keine vollständige B-Zellrekonstitution zu erkennen (72% des Ausgangswertes). Das damit verbundene Fehlen einer humoralen Immunantwort könnte die erhöhte Mortalität bei Fehlen IL-7 produzierender Zellen im Empfänger erklären. Bei fehlenden B-Zellen ist sowohl die Antigenpräsentation, als auch die Antikörpersynthese betroffen, die speziell im Darm (IgA) wichtig für die mukosale Immunität ist.

Es stellt sich die Frage, ob die verzögerte Rekonstitution von CD4⁺-, CD8⁺- und B-Zellen, oder das Fehlen der TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen bei IL-7^{-/-} Empfängern der Grund für die erhöhte Mortalität in diesem Modell darstellt. Eindeutig liegen in der frühen Posttransplantationsphase bei den IL-7^{-/-} Empfängern absolut weniger CD4⁺-, CD8⁺- und TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen als bei den IL-7^{+/+} Empfängern vor. Da es jedoch auch bei den IL-7^{+/+} Empfängern in der Frühphase relativ viele Tiere versterben, kann die verzögerte T- und B-Zellrekonstitution zumindest nicht den Einzigen Grund für eine erhöhte Mortalität darstellen. Darüber hinaus ist trotz Fehlen von IL-7 im Empfänger die Gesamt T-Zellrekonstitution bereits nach 14 Tagen vollständig (s. Abb. 13). Das liegt an einer Expansion von DN T-Zellen (TCR $\alpha\beta^{\text{low}}$ /CD4⁻/CD8⁻), die am Tag+14 in den IL-7^{+/+} 546% des Ausgangsmittelwertes, und in den IL-7^{-/-} Empfängern 209% des Ausgangsmittelwertes erreichen. Die Expansion der unkonventionellen DN T-Zellen bei den IL-7^{+/+} Empfängern tritt vor allem in der Frühphase nach KMT auf, und der Anteil der DN T-Zellen bleibt in den IL-7^{-/-} Empfängern im Verhältnis zu den konventionellen reifen T-Zellen (10%) auch langfristig mit 90% gleich hoch. Es ist unklar, welche Rolle DN T-Zellen für die protektive Immunität nach KMT haben, eine wesentliche Funktion für das Überleben kann nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist die Expansion der DN T-Zellen Folge eines aktiven Mechanismus zur Wiederherstellung der T-Zellhomöostase.

Trotz Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger zeigt der Anteil an NKT-Zellen in der Frühphase nach KMT eine kurzfristige, vorübergehende Rekonstitution. Ein Fehlen von NKT-Zellen in der frühen Posttransplantationsphase als Ursache für das schlechtere Überleben bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger kann damit ausgeschlossen werden. Allerdings ist beschrieben, dass NKT-Zellen bei IL-7^{-/-} Mäusen funktionell defekt sind ⁽⁹⁰⁾.

5.5. Bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat kommt es zu einer Verzögerung der Rekonstitution von DN T-Zellen und NK-Zellen in der frühen Posttransplantationsphase

Im Unterschied zu dem Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger wirkt sich ein Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat lediglich geringfügig auf die reifen CD4⁺-Zellen aus, die mit 90% ihres Ausgangswertes fast vollständig rekonstituiert sind. Das Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat wirkt sich nicht auf die Rekonstitution der Gesamt CD8⁺-Zellen aus. Diese sind in Bezug auf die CD4⁺- und CD8⁺-Zellrekonstitution nicht überraschend, da im Transplantat ja genügend reife CD4⁺- und CD8⁺-Zellen zur Verfügung stehen, und zugleich bei den IL-7^{+/+} Empfängern von einer ausreichend regenerierten, stromalen IL-7 Produktion im Thymus ausgegangen werden kann.

Die Rekonstitution der DN T-Zellen ist bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat an Tag+14 und Tag+28 signifikant verzögert gegenüber dem Goldstandard. Aufgrund dieser Unterschiede könnte eine unzureichende Rekonstitution von DN T-Zellen bzw. NK-Zellen in der Frühphase nach KMT eine Ursache für die erhöhte Mortalität bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat darstellen.

Die leichte Verzögerung der B-Zellrekonstitution bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat (im Vergleich zu 28 Tagen beim Goldstandard hier erst nach 140 Tagen) lässt indirekt vermuten, dass bei IL-7^{+/+} Mäusen die B-Zellen im Transplantat zumindest zum Teil für die vollständige Rekonstitution am Tag+28 zuständig sind, und sich ein Teil der B-Zellrekonstitution über die Expansion reifer Spender B-Zellen erklären lässt. Trotz vollständigem Fehlen von B-Zellen im Transplantat finden sich im Vergleich zum Goldstandard zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede, so dass die leichte Verzögerung als Ursache für ein schlechteres Überleben unwahrscheinlich erscheint.

Bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat kommt es überraschenderweise zu einer erheblich verzögerten Rekonstitution der NK-Zellen (Tag \geq 140), obwohl NK-Zellen keinen IL-7R tragen, und ihnen damit keine Abhängigkeit von IL-7 zugeschrieben wird. Die Anwesenheit IL-7 produzierender Zellen im Transplantat scheint damit möglicherweise doch zu einer rascheren Rekonstitution von NK1.1⁺ Zellen (und von B-Zellen, s.o.) nach KMT beizutragen, der Mechanismus ist jedoch unklar. Trotz Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat zeigt der Anteil an NKT-Zellen in der Frühphase nach KMT eine kurzfristige, vorübergehende Rekonstitution. Ein Fehlen von NKT-Zellen in der frühen Posttransplantationsphase als Ursache für das schlechtere Überleben bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat kann damit ausgeschlossen werden.

5.6. Letal bestrahlte IL-7^{-/-} Mäuse können nach KMT ohne IL-7 überleben und zeigen eine teilweise Immunrekonstitution

Aufgrund der nicht-redundanten Rolle von IL-7 für die Entwicklung reifer CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen sowie für B-Zellen wurde ein Überleben der letal bestrahlten Tiere komplett ohne IL-7 nicht erwartet (Hypothese II). Dennoch haben überraschend viele (5/11) Mäuse das Experiment ohne IL-7 überlebt (d.e. 45,5%), obwohl sie durch die Gruppenhaltung mit den an Infektionen verstorbenen Tieren in direktem Kontakt lebten. Somit hat die Anwesenheit von IL-7 zwar einen Einfluß auf das Überleben, IL-7 kann aber nicht allein für das Überleben nach Transplantation verantwortlich sein. Für das Überleben nach letaler Bestrahlung in Abwesenheit von IL-7 kommen daher IL-7R abhängige und IL-7R unabhängige Mechanismen in Frage. Zum Einen ist es denkbar, dass „IL-7 likes“ über den IL-7R dafür sorgen, dass z.B. T-Zellen expandieren. Als Kandidaten für die „IL-7 likes“ mit einem möglichen funktionalen Ersatz für das IL-7 kommen c-Kit Ligand (SCF) oder CXCR12 (SDF) in Frage, weil auch sie an den IL-7R α binden können ^(47; 57). Dies nähme auf alle IL-7R tragende Zellen (CD4⁺-, CD8⁺-, DN T-, B- und NKT-Zellen) Einfluß. Alternativ

könnten andere, IL-7R unabhängige Zytokine wie IL-4, IL-15 etc. für die Expansion der T-Zellen sorgen. Schluns *et al.* und Tan *et al.* haben *in vitro* die unterstützende Wirkung des IL-4 (wie auch die von IL-15) auf die homeostatische Proliferation von Lymphozyten gezeigt, sie allerdings niedriger als die von IL-7 eingeordnet ^(75; 86).

Im Bezug auf die Rekonstitution der lymphozytären Subpopulationen addieren sich bei komplettem Fehlen von IL-7 im System die Effekte aus den Kapiteln 4.6. und 4.7. Wie weiter oben in Tabelle 21 gezeigt ist zwar immerhin eine teilweise Rekonstitution der CD4⁺- und CD8⁺-, B-, NK- und NKT-Zellen in einem Rahmen von 50% bis 70% des Ausgangswertes möglich, die Rekonstitution bleibt aber in diesem Fall auch langfristig (bis über Tag+140 hinaus) unvollständig. Interessanterweise ist eine Rekonstitution der Gesamt T-Zellzahl in Abwesenheit von IL-7 dennoch hauptsächlich aufgrund der expandierten DN T-Zellen möglich. Während die konventionellen T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) mit lediglich ≤ 30 Zellen/ μ l anwesend sind, weisen die DN T-Zellen im Mittel in der Frühphase nach KMT (bis Tag+35) 392 ± 251 Zellen/ μ l, und in der Spätphase (ab Tag+35) immer noch 334 ± 66 Zellen/ μ l auf. Damit ist ihr Anteil deutlich expandiert; vor KMT beträgt der Anteil an DN T-Zellen gegenüber den konventionellen T-Zellen in der IL-7^{-/-} Maus 63% (207 ± 80 Zellen/ μ l). Die exakte Herkunft der DN T-Zellen bleibt ungeklärt. Wie bereits vor KMT zeigen die DN T-Zellen auch nach der Transplantation eine niedrige Intensität des TCR $\alpha\beta$ ⁺ auf der Oberfläche, was u.A. auf einen Selektionsmechanismus (z.B. außerhalb des Thymus) hindeutet, der sich von konventionellen T-Zellen unterscheidet. Die Gedächtnis CD8⁺-Zellen sowie die NKT-Zellen zeigen ebenso eine weitgehend unbeeinträchtigte Rekonstitution trotz vollständigem Fehlen von IL-7 und machen ebenso einen wesentlichen Teil der lymphozytären Rekonstitution aus.

Welche lymphozytäre Subpopulation die entscheidende Rolle für eine frühe protektive Immunität und damit für ein verbessertes Überleben nach KMT spielen, kann hier letztendlich nicht geklärt werden, da wir von den verstorbenen Tieren der entsprechenden Konstellationen keine Daten bezüglich der Immunrekonstitution

haben. Es ist aber möglich, dass die Expansion der DN T-Zellen (vor allem in der komplett IL-7 freien Konstellation) in dem murinen Transplantationsmodell dieser Arbeit einen wichtigen Faktor für das Überleben nach KMT darstellt, da hier unerwartet sogar ein Anstieg dieser Population gegenüber der Ausgangssituation vor KMT ebenso wie gegenüber dem Anteil transplantierte DN T-Zellen festzustellen ist.

5.7. Mögliche klinische Bedeutung der Ergebnisse

I.) In der Klinik stellen Infektionen ein wesentliches Mortalitätsrisiko für Patienten nach Stammzelltransplantation dar. IL-7 ist nicht-redundant für die Lymphopoese, insbesondere für die Entwicklung von CD4⁺/CD8⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen und B-Zellen. Diese Arbeit zeigt, dass es bei Mangel an IL-7 nach Stammzelltransplantation zu einer unvollständigen Rekonstitution dieser Zellen kommt. Systematische Untersuchungen zu IL-7 Spiegeln vor Transplantation und Korrelationen mit der Immunrekonstitution nach KMT sind nicht bekannt. Das Transplantationsmodell dieser Arbeit zeigt, dass ein Mangel an endogenem IL-7 mit einem schlechteren Überleben nach KMT aufgrund von Infektionen verbunden ist. Daher können Situationen, bei denen ein besonders ausgeprägter Verlust an IL-7 produzierenden Zellen vor KMT besteht (z.B. nach Bestrahlung oder intensiver Chemotherapie mit Schädigung der Stromazellen), mit einem schlechteren Überleben nach Transplantation verbunden sein.

II.) Exogenes IL-7 ist im Tiermodell mehrfach zur Unterstützung der Immunrekonstitution eingesetzt worden; Erfahrungen in der Klinik fehlen noch. Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Bedeutung des endogen produzierten IL-7 in der Transplantationssituation belegen die nicht-redundante Rolle von IL-7 für die Rekonstitution lymphozytärer Subpopulationen. Ein Einsatz von IL-7 scheint insbesondere in der Frühphase nach KMT wichtig, da hier anscheinend die größte

Gefahr für Infektionen besteht. Auch wenn im Tiermodell keine wesentlich erhöhte Inzidenz von GvH nach Gaben von IL-7 beschrieben wird, so kann die Gefahr einer Induktion von GvH aufgrund der aktivierenden Wirkung des IL-7 auf T-Zellen nicht ausgeschlossen werden ^(2; 3).

III.) Ein unerwartet großer Teil der Tiere überlebt komplett ohne IL-7 und zeigt eine signifikante T-Zellrekonstitution von unkonventionellen DN T-Zellen. Ein Korrelat zu dieser Population existiert möglicherweise beim Menschen ^(55; 56; 97), eine entsprechende Expansion bei Patienten nach KMT wird aber normalerweise nicht beobachtet. Es bleibt zu prüfen, ob es beim Menschen ähnliche Populationen im Rahmen der Immunrekonstitution nach KMT gibt, und ob eine gezielte Expansion solcher Populationen (z.B. durch den Einsatz von Zytokinen) KMT-Patienten vor Infektionen schützen kann.

IV.) Mit wenigen Ausnahmen ist IL-7 bisher das Einzige Zytokin, welches systematisch in Tiermodellen zur Förderung der Immunrekonstitution eingesetzt wird. IL-7 wird als wesentliches Zytokin für die Rekonstitution angesehen, allerdings kann eine Induktion von GvHD in einer allogenen Situation nicht ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass 5/11 der Tiere komplett ohne IL-7 überleben, deutet möglicherweise auf eine wichtige Rolle anderer Zytokine/Chemokine für die Immunrekonstitution hin. Diese Zytokine könnten in Kombination mit IL-7, oder als Alternative zu IL-7 zur Förderung der Immunrekonstitution nach KMT eingesetzt werden.

V.) Die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Zusammensetzung des Transplantats für das Überleben nach KMT von Bedeutung ist. Empfänger von IL-7^{-/-} KM zeigen ein schlechteres Überleben als der Goldstandard. Bisher bezieht sich die Beschreibung des Transplantats hauptsächlich auf die Anzahl der Stammzellen nach T-Zelldepletion. In dem hier eingesetzten Modell unterscheidet sich das IL-7^{+/+} KM-Transplantat und das IL-7^{-/-} KM-Transplantat hauptsächlich in Bezug auf die Qualität

der Stromazellen und damit auf die Fähigkeit zur Produktion von IL-7. Daher mag eine Modulation der Stromazellfunktion im Transplantat eine weitere, neue Möglichkeit des „graft engineering“ darstellen.

VI.) Schließlich erlaubt die lange Beobachtungszeit in den Untersuchungen dieser Arbeit Aussagen zur langfristigen Immunrestitution. Bei Stammzell-Transplantation ohne Konditionierung oder nonmyeloablativer Konditionierung ist bei einigen Patienten nachgewiesen worden, dass es auf Stammzellebene nicht zu einem Engraftment gekommen ist ⁽⁶⁶⁾. Es stellt sich die Frage, wie lange bei solchen Patienten das Transplantat vorhält. Sarzotti *et al.* untersuchten 2003 nach nonmyeloablativer, allogener KMT die T-Zellrezeptorentwicklung von transplantierten T-Zellen in SCID-Patienten ⁽⁷⁴⁾. Sie erkennen eine anfängliche, thymusabhängige Reifung von polyklonalen naiven Spender T-Zellen (CD8⁺/CD45RA⁺) über 10 Jahre nach KMT, die dann jedoch schnell von oligoklonalen Gedächtnis T-Zellen (CD8⁺/CD45RO⁺) verdrängt werden. Dies entspricht zwar dem normalen Verlauf im Rahmen der Thymusdegradation mit zunehmenden Alter, vollzieht sich hier nach Transplantation jedoch wesentlich schneller als dem Alter entsprechend erwartet. Eine Langzeitrestitution bezüglich der naiven CD8⁺/CD45RA⁺-Zellen konnte in diesem Transplantationssystem somit nicht gezeigt werden. Rechnet man die Lebenserwartungen um, so entsprechen 10 Jahre post KMT beim Menschen der Spätphase nach KMT (≥ 140 Tage) im murinen Modell. Auch in der Literatur, die sich mit murinen KMT-Modellen auseinandersetzt, werden Daten beschrieben, die sich fast ausschließlich auf die frühe Posttransplantationsphase unmittelbar im Anschluß an eine KMT unter exogener IL-7 Gabe beziehen (≤ 100 Tage). Ist die frühe Posttransplantationsphase überstanden, können im Rahmen dieser Arbeit jedoch gute Langzeit-Überlebensdaten ≥ 140 Tage nach KMT dokumentiert werden, auch wenn weniger Sca-1⁺ Stammzellen transplantiert werden (IL-7^{-/-} KM), oder IL-7 produzierende Zellen im Empfänger fehlen.

VI. Zusammenfassung

Interleukin 7 (IL-7) wird in nicht-hämatopoetischen Stromazellen produziert und ist wichtig für die Lymphopoese, wie die deutliche Reduktion von B- und T-Zellen in der IL-7^{-/-} Maus zeigt (von Freedon-Jeffry et al., 1995; ⁽⁹²⁾). Gaben von IL-7 *nach* KMT wirken sich vorteilhaft auf die Immunrekonstitution aus (Bolotin et al., 1996; ⁽⁹⁾). Unklar ist, ob die IL-7 Produktion durch die Zellen des Empfängers oder des Transplantats für die hämatopoetische Rekonstitution von Bedeutung ist. Zur Klärung haben wir Knochenmarkstransplantationen bei IL-7^{-/-} Mäusen durchgeführt. Für das Transplantationsmodell wurden C57BL/6 Mäuse auf den IL-7^{-/-} Hintergrund zurückgekreuzt. Die Mäuse wurden letal mit 900cGy bestrahlt und haben eine syngene KMT erhalten: Knochenmark (KM; 1×10^7 mononukleäre Zellen) von männlichen IL-7^{+/+} oder IL-7^{-/-} Mäusen ist in weibliche IL-7^{+/+} oder IL-7^{-/-} Empfänger transplantiert worden. Die Transplantations-Konstellation IL-7^{+/+}-KM in IL-7^{+/+} dient als Goldstandard, während bei der Konstellation IL-7^{-/-}-KM in IL-7^{-/-} aufgrund der nicht-redundanten Rolle von IL-7 für die Lymphopoese nicht mit einem Überleben gerechnet wird. Der Spender-Chimärismus ist durch FISH-Analyse der Geschlechtschromosomen an Tag+35 nach KMT belegt. Nach KMT sind die Leukozyten des peripheren Blutes mikroskopisch gezählt und Lymphozyten-Subpopulationen (TCR $\alpha\beta$ ⁻, CD4⁻, CD8⁻, DN T-, B-, NK- und NKT-Zellen) über 140 Tage nach KMT durchflußzytometrisch bestimmt worden. Als Rekonstitution ist der Zeitpunkt definiert, an dem der Messwert einer Subpopulation den Wert vor KMT erreicht. Der größte Teil der Tiere hat überlebt (23/40), der andere Teil der Tiere ist vorwiegend an Infektionen verstorben (17/40). In allen Konstellationen, in denen IL-7 limitiert vorliegt, kommt es gegenüber dem Goldstandard (85,7%) zu einem schlechteren Überleben: Fehlen von IL-7 im Empfänger 50,0%; Fehlen von IL-7 im Transplantat 60,0%, und bei kompletten Fehlen von IL-7 im Transplantat und im Empfänger 45,5%. Die Granulozyten- und Monozytenrekonstitution ist in allen Konstellationen gleich (Tag+14), und damit IL-7 unabhängig. Bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Empfänger rekonstituieren die reifen CD4⁻, CD8⁻ und B-Zellen bis Tag \geq 140 nur unvollständig. Bei Fehlen von IL-7 produzierenden Zellen im Transplantat ist die Rekonstitution der DN T-, B- und der NK-Zellen zwar zeitlich verzögert, jedoch weitgehend vollständig. Die Zusammensetzung des Transplantates (mit oder ohne IL-7 produzierenden Stromazellen) hat also unabhängig vom Empfänger einen Einfluß auf die hämatopoetische Rekonstitution und das Überleben. Überraschenderweise ist bei kompletten Fehlen von IL-7 im Transplantat und im Empfänger ein Überleben trotz unvollständiger Rekonstitution von CD4⁻, CD8⁻, B- und NK-Zellen auch langfristig möglich. In allen Konstellationen zeigen die DN T-Zellen (TCR $\alpha\beta$ ^{low}/CD4/CD8⁻) eine starke Expansion, ihre Rolle für das unerwartete Überleben dieser Tiere bleibt unklar. Diese Arbeit zeigt, dass endogen produziertes IL-7 aus Zellen sowohl des Transplantates, als auch des Empfängers einen wesentlichen Faktor für das Überleben nach KMT darstellt. Die Daten zeigen aber auch, dass auch bei vollständigem Fehlen von IL-7 ein Überleben letal bestrahlter Mäuse nach KMT möglich ist.

VII. Abkürzungsverzeichnis

³² P	radioaktives Phosphorisotop	m	männlich
Abb.	Abbildung	MFI	Hauptfluoreszenzintensität
AK	Antikörper	min	Minute
bp	Basenpaare	MNC	Mononukleäre Zellen
bzw.	beziehungsweise	N ₂	Stickstoff
ca.	circa	NK	Natürliche Killerzelle
CD	Cluster of Differentiation	NKT	Natürliche Killer T-Zelle
cGy	centi Gray	nm	Nanometer
d	Tag	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
d.e.	das entspricht	PB	Peripheres Blut
d.h.	das heißt	PCR	Polymerasekettenreaktion
Dia.	Diagramm	RT	Raumtemperatur
DN	Doppelnegativ	s.	siehe
DNA	Desoxyribonukleinsäure	s.o.	siehe oben
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	s.u.	siehe unten
EtBr	Ethidiumbromid	sek	Sekunde
FACS	Durchflußzytometer	Tab.	Tabelle
FKS	fötales Kälberserum	TCR	T-Zellrezeptor
g	Erdbeschleunigung	u.A.	unter Anderem
Ig	Immunglobulin	vgl.	vergleiche
IL-	Interleukin-	vs.	versus
Kap.	Kapitel	w.	weiblich
KM	Knochenmark	WBC	weiße Blutzellen
KMT	Knochenmarktransplantation	IL-7 ^{+/+}	IL-7 ^{+/+}
ko	knockout	z.B.	zum Beispiel

VIII. Literaturverzeichnis

1. Abdul-Hai, A., Or, R., Slavin, S., Friedman, G., Weiss, L., Matsa, D., and Ben-Yehuda, A. (1996). Stimulation of immune reconstitution by interleukin-7 after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Exp Hematol* **24**(12), 1416-22.
2. Alpdogan, O., Muriglan, S. J., Eng, J. M., Willis, L. M., Greenberg, A. S., Kappel, B. J., and van den Brink, M. R. (2003). IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* **112**(7), 1095-107.
3. Alpdogan, O., Schmaltz, C., Muriglan, S. J., Kappel, B. J., Perales, M. A., Rotolo, J. A., Halm, J. A., Rich, B. E., and van den Brink, M. R. (2001). Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood* **98**(7), 2256-65.
4. Armitage, R. J., Ziegler, S. F., Beckmann, M. P., Idzerda, R. L., Park, L. S., and Fanslow, W. C. (1991). Expression of receptors for interleukin 4 and interleukin 7 on human T cells. *Adv Exp Med Biol* **292**, 121-30.
5. Benjamin, D., Sharma, V., Knobloch, T. J., Armitage, R. J., Dayton, M. A., and Goodwin, R. G. (1994). B cell IL-7. Human B cell lines constitutively secrete IL-7 and express IL-7 receptors. *J Immunol* **152**(10), 4749-57.
6. Blagburn, B. L., Sundermann, C. A., Lindsay, D. S., Hall, J. E., and Tidwell, R. R. (1991). Inhibition of *Cryptosporidium parvum* in neonatal Hsd:(ICR)BR Swiss mice by polyether ionophores and aromatic amidines. *Antimicrob Agents Chemother* **35**(7), 1520-3.
7. Boerman, O. C., Gregorio, T. A., Grzegorzewski, K. J., Faltynek, C. R., Kenny, J. J., Wilttrout, R. H., and Komschlies, K. L. (1995). Recombinant human IL-7 administration in mice affects colony-forming units-spleen and lymphoid precursor cell localization and accelerates engraftment of bone marrow transplants. *J Leukoc Biol* **58**(2), 151-8.
8. Boise, L. H., Minn, A. J., June, C. H., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (1995). Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12), 5491-5.
9. Bolotin, E., Smogorzewska, M., Smith, S., Widmer, M., and Weinberg, K. (1996). Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. *Blood* **88**(5), 1887-94.
10. Buckley, R. H., Schiff, R. I., Schiff, S. E., Markert, M. L., Williams, L. W., Harville, T. O., Roberts, J. L., and Puck, J. M. (1997). Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr* **130**(3), 378-87.
11. Carvalho, T. L., Mota-Santos, T., Cumano, A., Demengeot, J., and Vieira, P. (2001). Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7(-/-) mice. *J Exp Med* **194**(8), 1141-50.
12. Chung, B., Barbara-Burnham, L., Barsky, L., and Weinberg, K. (2001). Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. *Blood* **98**(5), 1601-6.
13. Conlon, P. J., Morrissey, P. J., Nordan, R. P., Grabstein, K. H., Prickett, K. S., Reed, S. G., Goodwin, R., Cosman, D., and Namen, A. E. (1989). Murine thymocytes proliferate in direct response to interleukin-7. *Blood* **74**(4), 1368-73.
14. de Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, C., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Ait-Yahia, S., Banchereau, J., Liu, Y. J., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* **160**(4), 1666-76.
15. Erard, F., Wild, M. T., Garcia-Sanz, J. A., and Le Gros, G. (1993). Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* **260**(5115), 1802-5.

16. Ernst, D. N., Weigle, W. O., Noonan, D. J., McQuitty, D. N., and Hobbs, M. V. (1993). The age-associated increase in IFN-gamma synthesis by mouse CD8⁺ T cells correlates with shifts in the frequencies of cell subsets defined by membrane CD44, CD45RB, 3G11, and MEL-14 expression. *J Immunol* **151**(2), 575-87.
17. Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**(1), 6-13.
18. Friend, S. L., Hosier, S., Nelson, A., Foxworthe, D., Williams, D. E., and Farr, A. (1994). A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM⁺ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol* **22**(3), 321-8.
19. Fritsch, M., Andersson, A., Petersson, K., and Ivars, F. (1998). A TCR alpha chain transgene induces maturation of CD4⁻ CD8⁻ alpha beta⁺ T cells from gamma delta T cell precursors. *Eur J Immunol* **28**(3), 828-37.
20. Fry, T. J., Christensen, B. L., Komschlies, K. L., Gress, R. E., and Mackall, C. L. (2001). Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. *Blood* **97**(6), 1525-33.
21. Fry, T. J., Connick, E., Falloon, J., Lederman, M. M., Liewehr, D. J., Spritzler, J., Steinberg, S. M., Wood, L. V., Yarchoan, R., Zuckerman, J., Landay, A., and Mackall, C. L. (2001). A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* **97**(10), 2983-90.
22. Fry, T. J., and Mackall, C. L. (2001). Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol* **22**(10), 564-71.
23. Golden-Mason, L., Kelly, A. M., Traynor, O., McEntee, G., Kelly, J., Hegarty, J. E., and O'Farrelly, C. (2001). Expression of interleukin 7 (IL-7) mRNA and protein in the normal adult human liver: implications for extrathymic T cell development. *Cytokine* **14**(3), 143-51.
24. Goodwin, R. G., Lupton, S., Schmierer, A., Hjerrild, K. J., Jerzy, R., Clevenger, W., Gillis, S., Cosman, D., and Namen, A. E. (1989). Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(1), 302-6.
25. Gutierrez-Ramos, J. C., Olsson, C., and Palacios, R. (1992). Interleukin (IL1 to IL7) gene expression in fetal liver and bone marrow stromal clones: cytokine-mediated positive and negative regulation. *Exp Hematol* **20**(8), 986-90.
26. Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* **173**(5), 1213-25.
27. Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Sudo, T., Kodama, H., Suda, T., and Nishikawa, S. (1990). Stepwise progression of B lineage differentiation supported by interleukin 7 and other stromal cell molecules. *J Exp Med* **171**(5), 1683-95.
28. He, Y. W., and Malek, T. R. (1996). Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med* **184**(1), 289-93.
29. Hejzlar, M., Vymola, F., Paroubek, M., Bdinkova, H., Majorova, J., Hajkova, L., and Janovska, D. (1967). Cephaloridine. II. The effect of cephaloridine on experimental model infections. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **11**(4), 459-68.
30. Heufler, C., Topar, G., Grasseger, A., Stanzl, U., Koch, F., Romani, N., Namen, A. E., and Schuler, G. (1993). Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med* **178**(3), 1109-14.
31. Jourdan, P., Vendrell, J. P., Huguet, M. F., Segondy, M., Bousquet, J., Pene, J., and Yssel, H. (2000). Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4⁺ CCR7⁺ human memory T cells. *J Immunol* **165**(2), 716-24.
32. Kim, K., Lee, C. K., Sayers, T. J., Muegge, K., and Durum, S. K. (1998). The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, and -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J Immunol* **160**(12), 5735-41.

33. Kondo, M., Takeshita, T., Higuchi, M., Nakamura, M., Sudo, T., Nishikawa, S., and Sugamura, K. (1994). Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes. *Science* **263**(5152), 1453-4.
34. Kondrack, R. M., Harbertson, J., Tan, J. T., McBreen, M. E., Surh, C. D., and Bradley, L. M. (2003). Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* **198**(12), 1797-806.
35. Kroncke, R., Loppnow, H., Flad, H. D., and Gerdes, J. (1996). Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *Eur J Immunol* **26**(10), 2541-4.
36. Laky, K., Lefrancois, L., Lingenheld, E. G., Ishikawa, H., Lewis, J. M., Olson, S., Suzuki, K., Tigelaar, R. E., and Puddington, L. (2000). Enterocyte expression of interleukin 7 induces development of gammadelta T cells and Peyer's patches. *J Exp Med* **191**(9), 1569-80.
37. Lee, W. T., Yin, X. M., and Vitetta, E. S. (1990). Functional and ontogenetic analysis of murine CD45Rhi and CD45Rlo CD4+ T cells. *J Immunol* **144**(9), 3288-95.
38. Lefrancois, L., and Puddington, L. (1995). Extrathymic intestinal T-cell development: virtual reality? *Immunol Today* **16**(1), 16-21.
39. Lupton, S. D., Gimpel, S., Jerzy, R., Brunton, L. L., Hjerrild, K. A., Cosman, D., and Goodwin, R. G. (1990). Characterization of the human and murine IL-7 genes. *J Immunol* **144**(9), 3592-601.
40. Lynch, D. H., and Miller, R. E. (1994). Interleukin 7 promotes long-term in vitro growth of antitumor cytotoxic T lymphocytes with immunotherapeutic efficacy in vivo. *J Exp Med* **179**(1), 31-42.
41. Lyons, A. B. (2000). Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* **243**(1-2), 147-54.
42. Mackall, C. L., Fry, T. J., Bare, C., Morgan, P., Galbraith, A., and Gress, R. E. (2001). IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* **97**(5), 1491-7.
43. Mackall, C. L., and Gress, R. E. (1997). Thymic aging and T-cell regeneration. *Immunol Rev* **160**, 91-102.
44. Madrigal-Estebas, L., McManus, R., Byrne, B., Lynch, S., Doherty, D. G., Kelleher, D., O'Donoghue, D. P., Feighery, C., and O'Farrelly, C. (1997). Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA Transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Hum Immunol* **58**(2), 83-90.
45. Maki, K., Sunaga, S., Komagata, Y., Kodaira, Y., Mabuchi, A., Karasuyama, H., Yokomuro, K., Miyazaki, J. I., and Ikuta, K. (1996). Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14), 7172-7.
46. McKenna, H. J., and Morrissey, P. J. (1998). Flt3 ligand plus IL-7 supports the expansion of murine thymic B cell progenitors that can mature intrathymically. *J Immunol* **160**(10), 4801-9.
47. McNiece, I. K., Langley, K. E., and Zsebo, K. M. (1991). The role of recombinant stem cell factor in early B cell development. Synergistic interaction with IL-7. *J Immunol* **146**(11), 3785-90.
48. Migishima, F., Oikawa, A., Kondo, S., Ema, H., Morita, Y., Nakauchi, H., Yokoyama, M., Song, S. Y., Nishijima, M., Okabe, M., and Shinohara, N. (2003). Full reconstitution of hematopoietic system by murine umbilical cord blood. *Transplantation* **75**(11), 1820-6.
49. Moore, T. A., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R., and Zlotnik, A. (1996). Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7 -/- mice. *J Immunol* **157**(6), 2366-73.
50. Morrissey, P. J., Conlon, P., Braddy, S., Williams, D. E., Namen, A. E., and Mochizuki, D. Y. (1991). Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J Immunol* **146**(5), 1547-52.

51. Namen, A. E., Lupton, S., Hjerrild, K., Wignall, J., Mochizuki, D. Y., Schmierer, A., Mosley, B., March, C. J., Urdal, D., and Gillis, S. (1988). Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* **333**(6173), 571-3.
52. Namen, A. E., Schmierer, A. E., March, C. J., Overell, R. W., Park, L. S., Urdal, D. L., and Mochizuki, D. Y. (1988). B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J Exp Med* **167**(3), 988-1002.
53. Namikawa, R., Muench, M. O., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1996). The FLK2/FLT3 ligand synergizes with interleukin-7 in promoting stromal-cell-independent expansion and differentiation of human fetal pro-B cells in vitro. *Blood* **87**(5), 1881-90.
54. Napolitano, L. A., Grant, R. M., Deeks, S. G., Schmidt, D., De Rosa, S. C., Herzenberg, L. A., Herndier, B. G., Andersson, J., and McCune, J. M. (2001). Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* **7**(1), 73-9.
55. Niehues, T., Eichelbauer, D., and Schneider, E. M. (1999). Functional characteristics of human peripheral blood alpha/betaTCR+, CD4- and CD8- double-negative (DN) T cells. *Microbiol Immunol* **43**(2), 153-9.
56. Niehues, T., Gulwani-Akolkar, B., Akolkar, P. N., Tax, W., and Silver, J. (1994). Unique phenotype and distinct TCR V beta repertoire in human peripheral blood alpha beta TCR+, CD4-, and CD8-double negative T cells. *J Immunol* **152**(3), 1072-81.
57. Nishii, K., Katayama, N., Miwa, H., Shikami, M., Masuya, M., Shiku, H., and Kita, K. (1999). Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein. *Br J Haematol* **105**(3), 701-10.
58. Nishizawa, K., and Koyasu, S. (1997). IL-2 and IL-7 differentially induce CD4-CD8- alpha beta TCR+NK1.1+ large granular lymphocytes and IL-4-producing cells from CD4-CD8- alpha beta TCR+NK1.1- cells: implications for the regulation of Th1- and Th2-type responses. *Int Immunol* **9**(8), 1123-9.
59. Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S. M., Ziegler, S. F., Tsang, M., Cao, X., and Leonard, W. J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* **262**(5141), 1877-80.
60. Ochs, L., Shu, X. O., Miller, J., Enright, H., Wagner, J., Filipovich, A., Miller, W., and Weisdorf, D. (1995). Late infections after allogeneic bone marrow transplantations: comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients. *Blood* **86**(10), 3979-86.
61. Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S., Kunisada, T., Sudo, T., Kina, T., and Nakauchi, H. (1991). Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* **174**(1), 63-71.
62. Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Miura, Y., and Suda, T. (1992). In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* **80**(12), 3044-50.
63. Palathumpat, V., Dejbakhsh-Jones, S., Holm, B., and Strober, S. (1992). Different subsets of T cells in the adult mouse bone marrow and spleen induce or suppress acute graft-versus-host disease. *J Immunol* **149**(3), 808-17.
64. Pandey, A., Ozaki, K., Baumann, H., Levin, S. D., Puel, A., Farr, A. G., Ziegler, S. F., Leonard, W. J., and Lodish, H. F. (2000). Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat Immunol* **1**(1), 59-64.
65. Park, L. S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J. P., Muller, W., Largaespada, D. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Farr, A. G., Ziegler, S. F., Morrissey, P. J., Paxton, R., and Sims, J. E. (2000). Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med* **192**(5), 659-70.
66. Patel, D. D., Gooding, M. E., Parrott, R. E., Curtis, K. M., Haynes, B. F., and Buckley, R. H. (2000). Thymic function after hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **342**(18), 1325-32.

67. Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., and et al. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* **180**(5), 1955-60.
68. Powrie, F., Correa-Oliveira, R., Mauze, S., and Coffman, R. L. (1994). Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* **179**(2), 589-600.
69. Puel, A., Ziegler, S. F., Buckley, R. H., and Leonard, W. J. (1998). Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet* **20**(4), 394-7.
70. Ray, R. J., Furlonger, C., Williams, D. E., and Paige, C. J. (1996). Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development in vitro. *Eur J Immunol* **26**(1), 10-6.
71. Reich-Zeliger, S., Zhao, Y., Krauthgamer, R., Bachar-Lustig, E., and Reisner, Y. (2000). Anti-third party CD8⁺ CTLs as potent veto cells: coexpression of CD8 and FasL is a prerequisite. *Immunity* **13**(4), 507-15.
72. Sakata, T., Iwagami, S., Tsuruta, Y., Teraoka, H., Tatsumi, Y., Kita, Y., Nishikawa, S., Takai, Y., and Fujiwara, H. (1990). Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. *J Leukoc Biol* **48**(3), 205-12.
73. Sambrook, J., and Gething, M. J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**(6247), 224-5.
74. Sarzotti, M., Patel, D. D., Li, X., Ozaki, D. A., Cao, S., Langdon, S., Parrott, R. E., Coyne, K., and Buckley, R. H. (2003). T cell repertoire development in humans with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation. *J Immunol* **170**(5), 2711-8.
75. Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* **1**(5), 426-32.
76. Seddon, B., Tomlinson, P., and Zamoyska, R. (2003). Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* **4**(7), 680-6.
77. Seki, S., Abo, T., Ohteki, T., Sugiura, K., and Kumagai, K. (1991). Unusual alpha beta-T cells expanded in autoimmune lpr mice are probably a counterpart of normal T cells in the liver. *J Immunol* **147**(4), 1214-21.
78. Sims, J. E., Williams, D. E., Morrissey, P. J., Garka, K., Foxworthe, D., Price, V., Friend, S. L., Farr, A., Bedell, M. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Grabstein, K., and Paxton, R. J. (2000). Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J Exp Med* **192**(5), 671-80.
79. Socie, G., Stone, J. V., Wingard, J. R., Weisdorf, D., Henslee-Downey, P. J., Bredeson, C., Cahn, J. Y., Passweg, J. R., Rowlings, P. A., Schouten, H. C., Kolb, H. J., and Klein, J. P. (1999). Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *N Engl J Med* **341**(1), 14-21.
80. Sorg, R. V., McLellan, A. D., Hock, B. D., Fearnley, D. B., and Hart, D. N. (1998). Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology* **198**(5), 514-26.
81. Spangrude, G. J., Klein, J., Heimfeld, S., Aihara, Y., and Weissman, I. L. (1989). Two monoclonal antibodies identify thymic-repopulating cells in mouse bone marrow. *J Immunol* **142**(2), 425-30.
82. Strober, S., Cheng, L., Zeng, D., Palathumpat, R., Dejbakhsh-Jones, S., Huie, P., and Sibley, R. (1996). Double negative (CD4-CD8- alpha beta+) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity. *Immunol Rev* **149**, 217-30.
83. Suda, T., and Zlotnik, A. (1991). IL-7 maintains the T cell precursor potential of CD3-CD4-CD8-thymocytes. *J Immunol* **146**(9), 3068-73.

84. Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M., and Yoshida, H. (1993). Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19), 9125-9.
85. Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., and Surh, C. D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15), 8732-7.
86. Tan, J. T., Ernst, B., Kieper, W. C., LeRoy, E., Sprent, J., and Surh, C. D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med* **195**(12), 1523-32.
87. Tanaka-Douzono, M., Suzu, S., Yamada, M., Wakimoto, N., Hayasawa, H., Hatake, K., and Motoyoshi, K. (2001). Detection of murine adult bone marrow stroma-initiating cells in Lin(-)c-fms(+)-c-kit(low)VCAM-1(+) cells. *J Cell Physiol* **189**(1), 45-53.
88. Vella, A. T., Dow, S., Potter, T. A., Kappler, J., and Marrack, P. (1998). Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7), 3810-5.
89. Vellenga, E., Esselink, M. T., Straaten, J., Stulp, B. K., De Wolf, J. T., Brons, R., Giannotti, J., Smit, J. W., and Halie, M. R. (1992). The supportive effects of IL-7 on eosinophil progenitors from human bone marrow cells can be blocked by anti-IL-5. *J Immunol* **149**(9), 2992-5.
90. Vicari, A. P., Herbelin, A., Leite-de-Moraes, M. C., Von Freeden-Jeffry, U., Murray, R., and Zlotnik, A. (1996). NK1.1+ T cells from IL-7-deficient mice have a normal distribution and selection but exhibit impaired cytokine production. *Int Immunol* **8**(11), 1759-66.
91. von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M., and Murray, R. (1997). The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* **7**(1), 147-54.
92. von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L. A., McNeil, T., Burdach, S. E., and Murray, R. (1995). Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* **181**(4), 1519-26.
93. Wiles, M. V., Ruiz, P., and Imhof, B. A. (1992). Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur J Immunol* **22**(4), 1037-42.
94. Yamagiwa, S., Sugahara, S., Shimizu, T., Iwanaga, T., Yoshida, Y., Honda, S., Watanabe, H., Suzuki, K., Asakura, H., and Abo, T. (1998). The primary site of CD4- 8- B220+ alphabeta T cells in lpr mice: the appendix in normal mice. *J Immunol* **160**(6), 2665-74.
95. Yang, L., DuTemple, B., Gorczyński, R. M., Levy, G., and Zhang, L. (1999). Evidence for epitope spreading and active suppression in skin graft tolerance after donor-specific transfusion. *Transplantation* **67**(11), 1404-10.
96. Zhang, Z. X., Yang, L., Young, K. J., DuTemple, B., and Zhang, L. (2000). Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* **6**(7), 782-9.
97. Zhang, Z. X., Young, K., and Zhang, L. (2001). CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med* **79**(8), 419-27.
98. Ziegler, S. E., Morella, K. K., Anderson, D., Kumaki, N., Leonard, W. J., Cosman, D., and Baumann, H. (1995). Reconstitution of a functional interleukin (IL)-7 receptor demonstrates that the IL-2 receptor gamma chain is required for IL-7 signal transduction. *Eur J Immunol* **25**(2), 399-404.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in vorgelegter oder ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den

(Oliver Feyen)

Herzlichen Dank !

Herrn Prof. Dr. Ulrich Göbel für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit im Labor für Stammzelltransplantation und Experimentelle Hämatologie der Kinderklinik sowie für die intensiven Bemühungen um die finanzielle Förderung des Forschungsprojektes

Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn für die freundliche Bereitschaft das Korreferat zu übernehmen

Ganz besonders Herrn PD Dr. Tim Niehues für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft, für die Durchsicht des Manuskripts sowie viel Gelerntes

Frau Dr. A. Treiber für ihre großzügige Kooperationsbereitschaft und ihren Mitarbeitern, die mir den tierexperimentellen Teil wesentlich erleichtert haben

Den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern im Labor für Stammzelltransplantation und Experimentelle Hämatologie der Kinderklinik für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für das wirklich angenehme Arbeitsklima und den nötigen „Druck“

Meinen Eltern Johannes und Margit Feyen, sowie meinen Geschwistern Dominik, Angela, Jana, Sara, Maren und Jan Niklas, die mir ein ständiger Halt sind

Meinen Freunden Jörg Höckendorff, Nicole Tönnissen, Uwe Günther, Tanja Bergmann und Jochen Koenen, die immer für mich da waren

Und natürlich Nadine Flaschker, die ein ganz besonderer Mensch ist und mir viel bedeutet:

muchísimas gracias !

Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Elterninitiative Kinderkrebsklinik Düsseldorf e.V. und durch die Forschungsförderung Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf