

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie)

**Molekulare und funktionelle Charakterisierung
alloreaktiver, GVHD-mediierender T-Zellen in
CD45RA/CD276-depletierten Zellgrafts**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kasteleiner, Patrick Hubert

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Bethge

Tag der Disputation: 09.10.2023

Widmung

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)	1
1.1.1 Allogene und autologe HSCT	1
1.1.2 Indikation HSCT	1
1.1.3 HLA-Matching	2
1.1.4 Ablauf der HSCT	3
1.1.4.1 Gewinnung der Stammzellen	3
1.1.4.2 Konditionierung vor HSCT	3
1.1.4.3 Komplikationen der allogenen HSCT	4
1.1.5 Graft-versus-Leukemia bzw. Graft-versus-Tumor-Effekt.....	5
1.2 Graft-Versus-Host Disease.....	5
1.2.1 Akute GVHD (aGVHD) und chronische GVHD (cGVHD).....	6
1.2.2 Klinik und Diagnostik der aGVHD.....	7
1.2.3 Therapie der aGVHD	10
1.2.3.1 Systemische Therapie.....	10
1.2.3.2 Prophylaxe.....	11
1.2.3.3 Graft Engineering	11
1.3 Das adaptive Immunsystem	14
1.4 T-Lymphozyten.....	15
1.4.1 T-Helferzellen	16
1.4.1.1 Th1-Zellen.....	17
1.4.1.2 Th2-Zellen.....	17
1.4.1.3 Th17-Zellen.....	18
1.4.2 Regulatorische T-Zellen	19
1.4.3 Zytotoxische T-Zellen	21
1.4.4 Transkriptionsfaktoren	23
1.4.5 Aktivierungsmarker.....	23
1.4.6 T-Zell Rezeptor	25

1.4.6.1 Aufbau TCR.....	26
1.4.6.2 Rekombinante Generierung bzw. somatische Rekombination.....	27
1.4.6.3 T-Zell Rezeptor Repertoire bzw. T-Zell Repertoire.....	28
1.5 Zytokine	28
1.5.1 Interleukine.....	29
1.5.2 Interferon Gamma und Tumornekrosefaktor Alpha.....	31
1.6 B7 Homolog 3 (B7-H3, Syn. CD276).....	33
1.7 Fragestellung	34
2 Material und Methoden	36
2.1 Material	36
2.1.1 Laborzubehör	36
2.1.2 Geräte	37
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien.....	39
2.1.4 Molekularbiologische Kits	43
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Transplantation humaner CD4 ⁺ T-Zellen in NSG-Ab ⁰ DR4 Mausmodell.....	44
2.2.2 Histologische Untersuchung der murinen Organgewebe	44
2.2.3 Disruption und Homogenisierung der Mausgewebe	45
2.2.4 RNA-Isolation	46
2.2.5 cDNA-Synthese.....	47
2.2.6 Quantitative Real-time PCR (real-time qPCR)	47
2.2.7 V α Spectratype des TCR-Repertoires	48
2.2.8 Testung repetitiver Depletion CD276 ⁺ Zellen in der Mixed Lymphocyte Culture	51
2.2.9 Präparation und Wechsel des RPMI-Mediums	53
2.2.10 PBMC-Isolation	53
2.2.11 Kryokonservierung der PBMCs	55
2.2.12 Vorbereitung der Stimulatorzellen	55
2.2.13 Magnetische Zellseparation.....	56
2.2.13.1 Depletion CD45RA ⁺ Zellen	57
2.2.13.2 Depletion CD276 ⁺ Zellen.....	57
2.2.13.3 Aufbewahren der CD276 ⁺ und CD276 ^{neg} Fraktion	58
2.2.14 Durchflusszytometrie (FACS).....	58
2.2.14.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen	59
2.2.14.2 Prüfung des Depletionserfolges (Purity Check Panel)	60

2.2.14.3 Untersuchung der proinflammatorischen Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker (Full Cytokine Panel)	61
2.2.14.4 Untersuchung des Interleukinprofils (Interleukin Panel)	62
2.2.14.5 Untersuchung verbleibender antiviraler Aktivität (Antiviral Peptide Assay) ...	63
2.2.14.6 Untersuchung verbleibender anti-Tumor Aktivität (Anti-Third Party Assay) ..	65
2.2.15 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer	65
2.2.16 Technische und statistische Auswertung	65
3 Ergebnisse	67
3.1 Ergebnisse Mausmodell	67
3.1.1 Transplantation CD276-depletierter Memory T-Zellgrafts verbessert phänotypische Parameter im Mausmodell	67
3.1.2 Transplantation CD276 ^{neg} Memory T-Zellgrafts reduziert CD3 ⁺ Gewebeeinfiltration	68
3.1.2.1 Gewebeeinfiltration anhand histologischer Färbungen	68
3.1.2.2 Reduktion der Organinfiltration CD3 ⁺ Zellen nach Transplantation CD45RA ^{neg} und CD45RA ^{neg} CD276 ^{neg} Zellgrafts	78
3.1.3 Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomes, GATA-3, ROR γ t, FoxP3 im Mausmodell	79
3.1.3.1. Verhalten der Expression der Transkriptionsfaktoren pro Organ und Transplantationskohorte	79
3.1.3.2 Erhöhung der GATA-3/RORC-Ratio im kutanen Gewebe	83
3.1.4 Verhalten von Diversität und Komplexität der TCR-Repertoires in den infiltrierenden Kompartments von Leber, Lunge, Kolon, Haut in HLA DR4-Mismatch und -Match	84
3.1.4.1 Abnahme von Diversität der TCR-Repertoires von CD4 ⁺ CD45RA ^{neg} CD276 ^{neg} Transplantatrezipienten im kompletten DR4-Mismatch	85
3.1.4.2 Geringe Abnahme der Diversität der TCR-Repertoires von CD4 ⁺ CD45RA ^{neg} CD276 ^{neg} Transplantatrezipienten im DR4-Match	91
3.1.4.3 Complexity Scores in DR4-Mismatch und DR4-Match	97
3.2 Ergebnisse Mixed Lymphocyte Culture	98
3.2.1 Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomes, GATA-3, ROR γ t, FoxP3 in vitro	98
3.2.1.1 Bestimmung der GATA-3/RORC-Ratio CD276 ⁺ und CD276 ^{neg} Zellfraktionen der MLC	101
3.2.2 Metronomische Depletion CD276 ⁺ Zellen reduziert den Anteil CD276 ⁺ Zellen bei erhaltener CD276-Reexpression in der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktion	102
3.2.3 Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker in der CD4 ⁺ Zellfraktion der MLC	104
3.2.4 Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker in der CD8 ⁺ Zellfraktion der MLC	107

3.2.5 Expression von IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und IL-17A in der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktion der MLC nach metronomischer Depletion CD276 ⁺ Zellen.....	110
3.2.6 Erhalt der anti-viralen Aktivität CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen nach Depletion CD45RA ⁺ CD276 ⁺ Zellen in vitro.....	113
3.2.7 Erhalt der anti-Tumor Aktivität nach Depletion CD45RA ⁺ CD276 ⁺ Zellen in vitro	115
4 Diskussion	117
5 Zusammenfassung	125
6 Literaturverzeichnis	128
7 Erklärung zum Eigenanteil	140
8 Veröffentlichungen	140
9 Danksagung	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierung naiver T-Zellen auf Zytokinstimuli und Überblick essenzieller Effektorzytokine bzw. Zytotoxine	16
Abbildung 2: Kreuzregulation der CD4 ⁺ T-Zellen über sezernierte Zytokine	21
Abbildung 3: Aufbau des T-Zell-Rezeptors und somatische Rekombination der CDR3-Region der α -Kette.....	27
Abbildung 4: Schematische Darstellung Mixed Lymphocyte Culture.....	52
Abbildung 5: Ablauf PBMC-Isolation	55
Abbildung 6: Antikörpermarkierung der Oberflächenmarker durch MACS	56
Abbildung 7: Schematische Darstellung Durchflusszytometrie (FACS).....	59
Abbildung 8: Phänotyp der Versuchstiere	68
Abbildung 9: Leber HE-Färbung	70
Abbildung 10: Leber CD3-Färbung	71
Abbildung 11: Lunge HE-Färbung	73
Abbildung 12: Lunge CD3-Färbung	74
Abbildung 13: Kolon HE-Färbung.....	76
Abbildung 14: Kolon CD3-Färbung	77
Abbildung 15: Infiltration CD3 ⁺ Zellen im Vergleich der Transplantationskohorten	78
Abbildung 16: Expression der Transkriptionsfaktoren pro Gewebe und Kohorte.....	82
Abbildung 17: Verhältnis der Genexpression von GATA-3 zu RORC (GATA-3/RORC-Ratio) im Mausmodell.....	84
Abbildung 18: Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Kolon, DR4-Mismatch.....	87
Abbildung 19: Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Leber, DR4-Mismatch.....	88
Abbildung 20: Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Lunge, DR4-Mismatch.....	89
Abbildung 21: Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Haut, DR4-Mismatch.....	90
Abbildung 22: Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Kolon, DR4-Match.....	93
Abbildung 23: Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Leber, DR4-Match.....	94
Abbildung 24: Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Lunge, DR4-Match.....	95
Abbildung 25: Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Haut, DR4-Match.....	96

Abbildung 26: Complexity Scores gezeigt für Bulk-, Memory- und CD276 ^{neg} Memory-Kohorte, DR4-Mismatch und DR4-Match.....	98
Abbildung 27: Genexpression der Transkriptionsfaktoren in CD276 ⁺ und CD276 ^{neg} Zellfraktion der MLC.....	101
Abbildung 28: Verhältnis der Genexpression von GATA-3 zu RORC (GATA-3/RORC-Ratio) in vitro.....	102
Abbildung 29: Anteil CD276 ⁺ Zellen nach metronomischen CD276-Depletionen gezeigt für CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktion.....	104
Abbildung 30: Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker in der CD4 ⁺ Zellfraktion.....	107
Abbildung 31: Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker in der CD8 ⁺ Zellfraktion.....	110
Abbildung 32: Anteil verbleibender Interleukin-produzierender Zellen in der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktion der MLC nach Depletion von CD276 ⁺ Zellen.....	112
Abbildung 33: Anti-virale Aktivität in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktion der MLC.....	114
Abbildung 34: Aktivität gegenüber Neo-/Fremdantigenen in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktion nach repetitiver CD276-Depletion.....	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung Richtlinien der Graduierung der Organmanifestation der aGVHD	8
Tabelle 2: Gegenüberstellung Graduierung aGVHD gesamt.....	9
Tabelle 3: Ablauf der Phasen des Thermozyklers zur Durchführung der PCR.....	49
Tabelle 4: Charakterisierung der Forward-Primer	49
Tabelle 5: Charakterisierung der Reverse-Primer	50
Tabelle 6: Zusammensetzung der Primerkombinationen.....	50
Tabelle 7: Zentrifugationsprogramme.....	52
Tabelle 8: Präparation des Zellkulturmediums	53
Tabelle 9: Mastermix extrazelluläres Staining Purity Check Panel	60
Tabelle 10: Mastermix extra- und intrazelluläres Staining Full Cytokine Panel	62
Tabelle 11: Mastermix extra- und intrazelluläres Staining Interleukin Panel	63
Tabelle 12: Mastermix extra- und intrazelluläres Staining Antiviral Activity Assay	64
Tabelle 13: Auszählung der gefärbten CD3 ⁺ T-Lymphozyten.....	79
Tabelle 14: Mittelwerte Genexpression im Mausmodell, normalisiert auf GAPDH und Bulk-Kohorte.....	82
Tabelle 15: Mittelwerte GATA-3/RORC-Ratio pro Gewebe und Kohorte	84
Tabelle 16: Anzahl detektierter V α -Segmente im kompletten DR4-Mismatch	86
Tabelle 17: Anzahl detektierter V α -Segmente im DR4-Match.....	91
Tabelle 18: Anzahl der Peaks pro Organgewebe und Kohorte	98
Tabelle 19: Mittelwerte Genexpression in vitro, normalisiert auf GAPDH und 1x CD276-depletiert.....	100
Tabelle 20: Mittelwerte GATA-3/RORC-Ratio pro CD276-Depletion.....	101
Tabelle 21: Prozentualer Anteil CD276 ⁺ Zellen vor und nach CD276-Depletionen, gezeigt für CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktion.....	103
Tabelle 22: Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarkern in der CD4 ⁺ Zellfraktion	106
Tabelle 23: Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarkern in der CD8 ⁺ Zellfraktion	108
Tabelle 24: Anteil [%] Interleukin-produzierender Zellen in der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktion in der MLC	111
Tabelle 25: Anti-virale Aktivität der MLC in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktion	113
Tabelle 26: Aktivität gegenüber Neo-/Fremdantigenen in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktion.....	115

Abkürzungsverzeichnis

aGVHD	Acute graft-versus-host disease (dt. akute Graft-versus-Host-Erkrankung)
APC	Antigen-presenting cell (dt. antigenpräsentierende Zelle)
BCR	B-cell receptor (dt. B-Zell-Rezeptor)
BFA	Brefeldin A
cDNA	Complementary DNA (dt. komplementäre DNS)
cGVHD	Chronic graft-versus-host disease (dt. chronische Graft-versus-Host-Erkrankung)
CMV	Cytomegalievirus
CTL	Cytotoxic T lymphocytes (dt. zytotoxische T-Lymphozyten)
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Dendritic cells (dt. dendritische Zellen)
DFS	Disease-free survival (dt. krankheitsfreies Überleben)
dsDNA	Double-stranded DNA (dt. doppelsträngige DNS)
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
FSC	Forward scatter (dt. Vorwärtsstreuung)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GRFS	Graft-versus-host disease-free, and relapse-free survival
GVHD	Graft-versus-host disease (dt. Graft-versus-Host-Erkrankung)
GVT	Graft-versus-tumor
HLA	Human leukocyte antigen (dt. humanes Leukozytenantigen)
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation (dt. hämatopoetische Stammzelltransplantation)
IBMTR	International Bone Marrow Transplantation Registry
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

iTreg	induzierte regulatorische T-Zellen
KO	Knockout
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MAGIC	Mount Sinai Acute GvHD International Consortium
MALT	Mucosa-associated lymphatic tissue (dt. Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
MHC	Major histocompatibility complex (dt. Haupthistokompatibilitätskomplex)
miHA	Minor histocompatibility antigens
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MMUD	Mismatched unrelated donor
MSC	Mesenchymal stem cells (dt. mesenchymale Stammzellen)
MTX	Methotrexat
MUD	Matched unrelated donor
MW	Mittelwert
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBPC	Peripheral blood progenitor cells
PBSC	Peripheral blood stem cells
PCR	Polymerase chain reaction (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
PMA	Phorbol Myristate Acetate
qPCR	quantitative PCR (Syn. Real-Time PCR)
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SD	Standard deviation (dt. Standardabweichung)
SSC	Side scatter (dt. Seitwärtsstreuung)
TCD	T-cell depletion (dt. T-Zell-Depletion)
TCR	T-cell receptor (dt. T-Zell-Rezeptor)
TF	Transkriptionsfaktor/-en
Trm	Resident memory T-cells

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) stellt die potenziell einzige kurative Therapieoption bei malignen sowie benignen hämatologischen Erkrankungen dar. Insbesondere maligne hämatologische Neoplasien sind schwerwiegende Erkrankungen, die mit einer hohen Letalität einhergehen. Dabei betreffen sie Patienten in jedem Lebensalter, so bereits im Kindesalter, wie die Akute Lymphatische Leukämie (ALL) zeigt.

1.1.1 Allogene und autologe HSCT

Man unterscheidet zwischen allogener und autologer HSCT. Bei der allogenen HSCT (allo-HSCT) werden die Stammzellen einer anderen Person gesammelt und einem Empfänger transfundiert. Der Stammzellspender kann matched unrelated (MUD), haploident oder matched related sein. Dieser Therapieansatz dient der kurativen Behandlung von hämato-onkologischen, immunologischen (z.B. Multiple Sklerose, Systemische Sklerose) oder hereditären Erkrankungen (z.B. Thalassämie, Sichelzellanämie). Im Rahmen der autologen HSCT (auto-HSCT) werden Stammzellen vom Empfänger (bzw. Patienten) gesammelt und diesem zu einem späteren Zeitpunkt transfundiert. Hier ermöglicht die autologe HSCT die Applikation von myelotoxischen bzw. myeloablativen Therapieschemata und wirkt einer dauerhaften Myelosuppression mit damit einhergehenden teilweise lebensbedrohlichen Komplikationen entgegen.¹

1.1.2 Indikation HSCT

Laut Annual Report 2020 der European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) wurden im Jahr 2020 in Europa insgesamt 36.863 HSCT durchgeführt, davon 16.105 (43,7%) allogene HSCT und 20.758 (56,3%) autologe HSCT. Hierbei stellten für die Allografts die akute myeloische Leukämie (AML) und damit einhergehende Neoplasien der Vorläuferzellen (36,1%, absolut 5.820), myelodysplastische Syndrome (MDS) und/oder myeloproliferative Neoplasien (20,4%, absolut 3.297), Neoplasien lymphoider Vorläuferzellen (15%, absolut 2.421) sowie Non-Hodgkin Lymphome (6,9%, absolut 1.111) die häufigsten Indikationen dar. Die häufigste Indikation für autologe HSCT stellt weiterhin das Multiple Myelom (55,1%, absolut 11.439) dar, gefolgt von Non-Hodgkin

Lymphomen (24,6%, absolut 5.097), soliden Tumoren (7,8%, absolut 1.615) und Hodgkin Lymphomen (7,1%, absolut 1.479).²

1.1.3 HLA-Matching

Bei gestellter Indikation für eine allogene HSCT erfolgt die Suche nach einem passenden Spender zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion. Hierbei ist das Matching der Human Leukocyte Antigene (HLA) eine der wesentlichen Determinanten für den Erfolg der allogenen HSCT. Die HLA sind Moleküle an den Zelloberflächen jeder Körperzelle, sie dienen der Antigenpräsentation und werden vom Major Histocompatibility Complex (MHC) kodiert. Im Rahmen des Matchings werden Loci der HLA Klassen I (HLA-A, -B, -C) und II (HLA-DRB1, -DQB1) zwischen Spender und Empfänger abgeglichen. Bei der Auswahl möglicher Spender stellt die HLA-Übereinstimmung mit Blutsverwandten (HLA-identischer Zwilling oder HLA-matched related donor) die erste Wahl dar, welche jedoch nur in ca. 30% der Fälle vorhanden ist. Die zweite Wahl ist die HLA-Übereinstimmung mit einem fremden Spender (HLA-matched unrelated donor).³ In der Regel werden insgesamt 8 HLA-Marker abgeglichen, manche Transplantationszentren erweitern diese jedoch auf insgesamt 10 Marker.⁴ Ein passender Matched Unrelated Donor (MUD) ist durch eine Übereinstimmung von 10/10 oder 8/8 HLA-Markern definiert. Ein sog. Mismatched Unrelated Donor (MMUD) entspricht einer fehlenden Übereinstimmung in mindestens einem der HLA-Marker HLA-A, -B, -C oder -DR.¹ Für eine mögliche Transplantation im MUD-Setting sollte ein Minimum von 7/8 bzw. 9/10 Übereinstimmungen vorliegen.⁴

Eine besonders praktikable Alternative zur kompletten HLA-Übereinstimmung stellt die Transplantation im sog. haploidenten Setting dar. Die Spender sind hier sofort verfügbar, hochmotiviert und können, falls notwendig, erneut zur Spende angefragt werden. In diesem Setting liegt eine Übereinstimmung der Hälfte der untersuchten HLA-Marker und die Hälfte sog. Minorantigene (miHAgs) vor. Diese Konstellation findet sich in der Regel bei den leiblichen Eltern oder Kindern des Empfängers.⁵ Die Inzidenz schwerer Graft-Versus-Host Disease (GVHD) und auch Abstoßung des Grafts nach HSCT sind inzwischen durch hochmoderne Konditionierungsverfahren beherrschbar. Über Anpassung der myeloablativen Konditionierung mit Modulation des Grafts durch Depletion der T-Zellen, konnte eine Reduktion der GVHD-Inzidenz und ähnlich gute Resultate wie bei einer MUD HSCT erreicht werden.¹

Neben dem HLA-Matching können weitere Risikofaktoren das Outcome der allo-HSCT beeinflussen. Dazu zählen das Alter des Patienten, die Spender-Empfänger-Geschlechtskombination (insbesondere weiblicher Spender für männlichen Empfänger) sowie das Spender-Empfänger-CMV-Matching.⁶ Weitere untergeordnete Risikofaktoren können zudem bestimmte Vorerkrankungen und der Karnovsky-Index des Patienten, d.h. die körperliche und soziale Aktivitätseinschränkung onkologischer Patienten, darstellen.⁷

1.1.4 Ablauf der HSCT

Die HSCT setzt sich grundlegend aus bereits oben genannter Spendersuche mit HLA-Matching, der darauffolgenden Gewinnung der Stammzellen, der Konditionierung des Patienten vor Transplantation der hämatopoetischen Stammzellen und schließlich der Transplantation zusammen.

1.1.4.1 Gewinnung der Stammzellen

Für die Gewinnung der Stammzellen können verschiedene Quellen in Erwägung gezogen werden. Die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) können aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut und seltener aus Nabelschnurblut gewonnen werden.¹ Darunter stellt die Gewinnung der HSC aus Knochenmark die erste etablierte Methode dar. Hier erfolgt in der Regel die Punktion des Knochenmarks der Spina iliaca posterior. Seit den 1990er Jahren steht das Verfahren der Gewinnung der HSC aus peripherem Blut zur Verfügung. Zur Durchführung dieser Methode bei geplanter allogener HSCT wird die Stammzellreifung durch Stimulation mit Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) 5-6 Tage vor der geplanten Entnahme beim Spender angeregt und durch Leukaphese die Stammzellen gewonnen. Im Anschluss werden die Zellen meist frisch transplantiert.⁸

1.1.4.2 Konditionierung vor HSCT

Eine erste große Hürde der allogenen HSCT stellt die Annahme des Transplantates (sog. Engraftment) durch den Empfänger dar, d.h. das gewollte Ausbleiben einer Abstoßungsreaktion durch dessen Organismus bzw. Immunsystem (Host-versus-Graft Reaktion). Von Thomas et al. wurde 1975 postuliert, dass für ein erfolgreiches Engraftment das Immunsystem des Empfängers ausgelöscht bzw. supprimiert werden muss.⁹ Heutzutage wird diese Vorbereitung des Immunsystems des Empfängers als Konditionierung bezeichnet, deren Aufgabe in der Myelodepletion der Stammzellen und Lymphodepletion des lymphoiden Systems des Empfängers besteht.¹⁰ Eine grobe Unterteilung der

Konditionierungsregime kann in drei Kategorien vorgenommen werden. Diese orientieren sich an Dauer und Ausmaß der Zytopenie und dem Bedarf an Stammzellen. Man unterscheidet hierbei myeloablative (sog. high-intensity), nicht-myeloablative (sog. low-intensity) und eine sog. intermediate-intensity Konditionierung mit reduzierter Intensität (Syn. reduced intensity conditioning, RIC). Die unterschiedlichen Konditionierungsprotokolle können ionisierende Bestrahlung (Ganzkörperbestrahlung, engl. total body irradiation), Chemotherapie (u.a. Cyclophosphamid, Busulfan, Fludarabin, Thiotepa), Serotherapie (bspw. Anti-Thymozyten Globulin, Alemtuzumab), monoklonale Antikörper und zielgerichtete Therapieverfahren, abhängig von der Grunderkrankung, des Transplantationssettings und des Alters des Patienten, beinhalten.¹⁰ Durch die high-intensity-Konditionierung wird eine höhere Kontrolle der zugrundeliegenden Erkrankung sowie die Verringerung des Rezidivrisikos erreicht. Aufgrund der ausgeprägten Myelosuppression geht dieses Verfahren mit einer höheren Toxizität einher.¹¹ Für die Patienten stellen Infektionen mit Mikroorganismen ein großes, potenziell letales Risiko dar. Weiterhin kann es bei ausbleibendem Engraftment und damit Etablierung einer neuen, gesunden Hämatopoese zu einer irreversiblen Panzytopenie kommen.¹² Aufgrund der möglichen Risiken der high-intensity-Konditionierung ist das in Frage kommende Patientenkollektiv jünger als 55 Jahre und ohne signifikante Komorbiditäten.^{13,14} Die intermediate- und low-intensity-Konditionierung ermöglicht die Durchführung einer allogenen HSCT auch bei älteren Patienten und solchen mit relevanten Komorbiditäten. Weiterhin wird grundsätzlich eine höhere Intensität der Konditionierung in unrelated, mismatched und Haplo-Setting zur Gewährleistung des Engraftments gewählt. Insbesondere die RIC-Therapieregime werden in den letzten Jahren vermehrt angewendet. In Vergleichsstudien mit high-intensity-Protokollen wird insgesamt von einer niedrigeren therapiebedingten Mortalität (non-relapse mortality, NRM), jedoch erhöhter Rezidivrate ohne signifikante Beeinflussung des langfristigen Outcomes hinsichtlich des Überlebens gesamt (overall survival, OS) und progressionsfreien Überlebens (PFS), berichtet.¹

1.1.4.3 Komplikationen der allogenen HSCT

Die Durchführung der allogenen HSCT geht mit signifikanter Transplantat-abhängiger Morbidität, Mortalität und Langzeitfolgen einher.¹⁵ Hierbei wird von Juric et al. von einer Mortalität von >30% ein Jahr nach Transplantation berichtet.^{6,15} Weiterhin kommen Organdysfunktionen, Infertilität und Krebs sekundärer Genese gehäuft unter Patienten nach

allogener HSCT verglichen mit der Gesamtbevölkerung vor.¹⁶ Neben den bereits erwähnten Risiken einer Host-versus-Graft Reaktion und den möglichen Komplikationen im Rahmen der Konditionierung, besteht auch das Risiko der Abstoßung des Organismus durch das Transplantat (sog. Graft-versus-Host-Reaktion). Aufgrund letzterer ist zudem häufig eine langfristige immunsuppressive Therapie notwendig, welche wiederum das Risiko für insbesondere opportunistische Infektionen erhöht.

1.1.5 Graft-versus-Leukemia bzw. Graft-versus-Tumor-Effekt

Die HSCT dient neben der Implementierung eines neuen hämatopoetischen Systems nach myeloablativer Konditionierung ebenfalls der Zerstörung vorhandener residueller maligner Zellen. Diese Reaktion wird als Graft-versus-Leukemia- oder Graft-versus-Tumor-Effekt (GVT) beschrieben. Hierbei werden Fremdantigene maligner Zellen des Empfängers von Effektorzellen des Spenders als fremd erkannt und zerstört. Zu diesem Effekt tragen T-Zellen (CD8⁺ und CD4⁺) und NK-Zellen des Empfängers bei.¹⁷ Bei komplettem MHC-Match werden sog. minor histocompatibility Antigene (miHAs) von alloreaktiven Spender T-Zellen erkannt.^{18,19} Folglich werden maligne Zellen, welche nicht durch die myeloablativ Konditionierung zerstört wurden, durch die allo-HSCT nachhaltig zerstört.²⁰ Problematisch ist auch hier jedoch, dass die Spenderzellen trotz MHC-Matching weiterhin unspezifisch Empfängerzellen abtöten können, demnach sowohl maligne als auch benigne gesunde Zellen und Gewebe zerstören können. Es besteht daher die Gefahr vom Übergang der gewollten GVT-Aktivität in ein Überwiegen der potenziell letalen Graft-Versus-Host Disease.

1.2 Graft-Versus-Host Disease

Die Graft-Versus-Host Disease umschreibt die Abstoßungsreaktion im Rahmen der allo-genen HSCT ausgehend vom Transplantat des Spenders und gerichtet gegen den Organismus des Empfängers. Die GVHD wird in eine akute (aGVHD) und eine chronische Verlaufsform (cGVHD) eingeteilt. Die aGVHD stellt die wichtigste spezifische Komplikation der allogenen HSCT dar, welche für deren hohe krankheitsspezifische Mortalität verantwortlich ist. Die Prävalenz der aGVHD bei Transplantation im kompletten MHC-Match im Rahmen einer Geschwisterspende beträgt 35-45%, im nicht-verwandten MHC-Mismatch sogar 60-80%.¹⁹ Die cGVHD führt zu einer dauerhaften Morbidität der Patienten mit einer Reduktion der Lebensqualität (QOL).¹⁹ Im Folgenden liegt der Fokus auf die aGVHD legen.

1.2.1 Akute GVHD (aGVHD) und chronische GVHD (cGVHD)

Eine Unterscheidung zwischen aGVHD und cGVHD wurde früher strikt anhand des Zeitpunkts des Auftretens der GVHD getroffen. Hierbei trat die aGVHD innerhalb der ersten 100 Tage nach allogener HSCT mit akuter Symptomatik auf, während sich die cGVHD erst nach 100 Tagen präsentierte. Mittlerweile wird die aGVHD insbesondere durch deren Manifestationen an Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber definiert. Folglich kann auch bei auftretender Symptomatik nach Tag 100 von einer Late-onset aGVHD gesprochen werden.^{21,22}

Die Pathophysiologie der akuten Graft-Versus-Host Disease wurde von Ferrara et al. in drei Phasen unterteilt.¹⁹

Die erste Phase umfasst die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) des Empfängers durch sog. Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) und Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs). Die Freisetzung von DAMPs erfolgt hier häufig im Rahmen der Grunderkrankung und durch die Konditionierungsregime vor Transplantation. PAMPs können durch bestehende Infektionen wie bspw. durch das Cytomegalievirus (CMV) auftreten. Auf die Antigenpräsentation durch die APCs folgt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (bspw. TNF α , IL-1 und IL-6), Chemokinen sowie die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen, MHC-Komplexen und co-stimulatorischen Molekülen.^{19,23,24}

Die zweite Phase ist geprägt von der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von T-Lymphozyten (T-Zellen) des Spenders nach o.g. Vorgängen als Reaktion auf die Antigenpräsentation in Phase 1. In dieser Phase werden insbesondere Zytokine der sog. Th1-Subpopulation (s. 1.4.3) wie Interferon Gamma (IFN- γ), TNF α und Interleukin 2 (IL-2) in großer Menge ausgeschüttet.¹⁹

Die dritte Phase geht mit der Zerstörung des Zielgewebes der Haut, des Gastrointestinaltraktes und der Leber einher. Die Schädigung und Zerstörung des Gewebes wird von zellulären Mediatoren und löslichen proinflammatorischen Agenzien vermittelt. Als Effektorzellen agieren hier insbesondere zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTL) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die CTL vermitteln ihre Wirkung am hepatischen Gewebe über den Fas/Fas-Ligand Pathway und an Haut und Gastrointestinaltrakt über Perforin- und Granzyme-Pathways.¹⁹ Die in dieser Phase aktiven löslichen Agenzien sind TNF α , IFN- γ sowie Interleukin 1 (IL-1) und Stickstoffmonoxid (NO). Speziell auf den

Gastrointestinaltrakt kann durch TNF α eine schädigende Wirkung in Form einer Gewebenekrose ausgeübt werden.²³

1.2.2 Klinik und Diagnostik der aGVHD

Die kutane Manifestation der aGVHD findet sich bei 81% der Patienten und ist meist als erstes Organ betroffen. Klinisch präsentiert sich ein juckendes makulo-papulöses Exanthem, welches das ganze Integument umfassen kann und im exazerbierten Verlauf zur subepidermalen Blasenbildung führt. Histologisch lassen sich hier Apoptosen der basalen Epidermiszellen, lymphozytäre Infiltrate und bei zunehmendem Schweregrad subepidermale Spaltbildungen sichten.

Eine Affektion des Gastrointestinaltraktes tritt bei 54% der Patienten auf und geht meistens mit ausgeprägter Diarrhö und folglich Gewichtsverlust einher. Weiterhin können Übelkeit und Erbrechen, Abdominalschmerz, gastrointestinale Blutung und/oder Ileus-Symptomatik auftreten. Blutungen treten als Folge mukosaler Ulzerationen auf und sind ein prognostisch schlechtes Zeichen. Histologisch bilden sich aus apoptotischen Zellen der Kryptenepithelien Lakunen aus. Hier flachen die Krypten mit zunehmendem Schweregrad ab und es kommt zur Ulzeration.

Die in 50% aller Patienten auftretenden hepatischen Manifestationen der aGVHD zeigen sich klinisch als Ikterus und laborchemisch mit einer cholestatischen Hyperbilirubinämie ($\geq 2\text{mg/dL}$ gem. MAGIC-Kriterien, vgl. Tabelle 1). Diese korrelieren histologisch mit lymphozytären Infiltraten der Portalfelder, Pericholangitis und damit einhergehender Zerstörung und zunehmendem Verlust der Gallengänge.^{19,25}

Die klinische Beurteilung der Ausprägung der aGVHD spielt zur Einschätzung des weiteren Verlaufs eine wichtige Rolle. Dafür erfolgt die Einteilung der aGVHD in Schweregrade von 1 bis 4 anhand der Beurteilung der Affektion der o.g. Organe (vgl. Tabellen 1 und 2). Hierfür existieren verschiedene Richtlinien wie Glucksberg Criteria, Keystone Criteria, International Bone Marrow Transplantation Registry (IBMTR) Kriterien und Mount Sinai Acute GvHD International Consortium (MAGIC) Criteria. Die Glucksberg Kriterien wurden als erste Klassifikation um 1970 vorgeschlagen. Zuletzt wurden die MAGIC Kriterien eingeführt, welche laut Schoemans et al. im Sinne der EBMT-NIH-CIBMTR Task Force aufgrund ihrer derzeitigen internationalen Verbreitung in Diagnostik und Forschung hinsichtlich der aGVHD sowie der detaillierten und klaren Kriterien aktuell Verwendung finden sollten.²¹

Tabelle 1. Gegenüberstellung Richtlinien der Graduierung des Organmanifestation der aGVHD.

Schweregrad Organ	Original Glucksberg criteria	„Keystone“ criteria and IBMTR criteria	MAGIC criteria
Haut			
0	Kein Exanthem	Kein Exanthem	Kein Exanthem
1	Exanthem <25% KOF	Exanthem <25% KOF	Exanthem <25% KOF
2	Exanthem 25% bis 50% KOF	Exanthem 25% bis 50% KOF	Exanthem 25% bis 50% KOF
3	Exanthem >50% KOF	Exanthem >50% KOF	Exanthem >50% KOF
4	Erythrodermie mit Blasenbildung	Erythrodermie mit Blasenbildung	Erythrodermie (>50% KOF) mit Blasenbildung und Hautablösung/Ulzerationen >5% KOF
Leber			
0	Gesamt Serum Bilirubin <34µmol/l (<2mg/dL) oder AST/GOT 150-750 IU	Gesamt Serum Bilirubin <34µmol/l (<2mg/dL)	Gesamt Serum Bilirubin <34µmol/l (<2mg/dL)
1	Gesamt Serum Bilirubin 34-50µmol/l (2 bis 3mg/dL)	Gesamt Serum Bilirubin 34-50µmol/l (2 bis 3mg/dL)	Gesamt Serum Bilirubin 34-50µmol/l (2 bis 3mg/dL)
2	Gesamt Serum Bilirubin 51-102µmol/l (3.1 bis 6mg/dL)	Gesamt Serum Bilirubin 51-102µmol/l (3.1 bis 6mg/dL)	Gesamt Serum Bilirubin 51-102µmol/l (3.1 bis 6mg/dL)
3	Gesamt Serum Bilirubin 103-255µmol/l (6.1 bis 15mg/dL)	Gesamt Serum Bilirubin 103-255µmol/l (6.1 bis 15mg/dL)	Gesamt Serum Bilirubin 103-255µmol/l (6.1 bis 15mg/dL)
4	Gesamt Serum Bilirubin >255µmol/l (>15mg/dL)	Gesamt Serum Bilirubin >255µmol/l (>15mg/dL)	Gesamt Serum Bilirubin >255µmol/l (>15mg/dL)
Oberer GIT			
0	N/A	Keine andauernde Übelkeit und kein histologischer Nachweis einer GVHD von Gaster und Duodenum	Keine oder intermittierende Appetitlosigkeit mit Gewichtsverlust oder Übelkeit oder Erbrechen
1	N/A	Persistierende Übelkeit mit histologischen Veränderungen	Persistierende Appetitlosigkeit mit Gewichtsverlust oder

		der GVHD in Gaster und Duodenum	Übelkeit oder Erbrechen
Unterer GIT			
0	Diarrhö <500mL/Tag	Diarrhö <500mL/Tag	Diarrhö <500mL/Tag oder <3 Episoden/Tag (Erw.)
1	Diarrhö >500mL/Tag	Diarrhö >500mL/Tag	Diarrhö 500- 999mL/Tag oder 3-4 Episoden/Tag (Erw.)
2	Diarrhö >1000mL/Tag	Diarrhö >1000mL/Tag	Diarrhö 1000- 1500mL/Tag oder 5-7 Episoden/Tag (Erw.)
3	Diarrhö >1500mL/Tag	Diarrhö > 1500 mL/Tag	Diarrhö >1500 mL/Tag oder >7 Epi- soden/Tag (Erw.)
4	Diarrhö >2000mL/Tag	Schwerer Abdomi- nalschmerz mit oder ohne Ileus	Schwerer Abdomi- nalschmerz mit oder ohne Ileus oder viel Blut im Stuhl
Karnofsky Index			
	> 30%	N/A	N/A
	< 30%	N/A	N/A

Anmerkung: KOF (Körperoberfläche); AST (Aspartat-Aminotransferase), GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase); GIT (Gastrointestinaltrakt); IU (International Units); Erw. (Erwachsene, hier liegen für Kinder abweichende Werte vor). Die Tabelle wurde eigenhändig erstellt analog zu Schoemans HM, Lee SJ, Ferrara JL, et al. EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment. Bone Marrow Transplant 2018;53:1401–15. Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>.

Tabelle 2. Gegenüberstellung Graduierung aGVHD gesamt.

Glucksberg/MAGIC Grad gesamt	Original Glucksberg criteria	„Keystone“ criteria	MAGIC criteria	IBMTR criteria	IBMTR Grad gesamt
0	Keine Organbeteiligung (entspricht Abwesenheit aGVHD)				0
I	Haut: 1 oder 2, <u>ohne</u> Leber/GIT oder Abgeschlagenheit/Fieber	Haut: 1 oder 2, <u>ohne</u> Leber/GIT		Haut: 1, <u>ohne</u> Leber/GIT	A
II	Haut: 1 oder 2 <u>und</u> Leber und/oder GIT: 1 oder 2 <u>und</u> Leichte Abgeschlagenheit	Haut: 3 <u>und/oder</u> Leber: 1 <u>und/oder</u> GIT: 1		Haut: 2 <u>und/oder</u> Leber: 1 oder 2 <u>und/oder</u> GIT: 1 oder 3	B

III	Haut <u>und/oder</u> Leber <u>und/oder</u> GIT: 2, 3 oder 4 Starke Abgeschlagenheit	Leber: 2 oder 3 <u>und/oder</u> GIT: 2, 3 oder 4	Leber: 2 oder 3 <u>und/oder</u> GIT: 2 oder 3	Haut: 3 <u>und/oder</u> Leber: 3 <u>und/oder</u> GIT: 3	C
IV	Haut <u>und/oder</u> Leber <u>und/oder</u> GIT: 2, 3 oder 4 <u>Und</u> Karnofsky <30%	Haut: 4 <u>und</u> <u>oder</u> Leber: 4	Haut: 4 <u>und/oder</u> Leber: 4 <u>und/oder</u> GIT: 4		D

Anmerkung: Die Tabelle wurde eigenhändig erstellt analog zu aus Schoemans HM, Lee SJ, Ferrara JL, et al. EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment. Bone Marrow Transplant 2018;53:1401–15. Lizenz: vgl. Tabelle 1.

Im Mausmodell ist die aGVHD durch fortschreitenden Gewichtsverlust, gekrümmte Körperhaltung (engl. hunched posture), zusammengekniffene Augen, einer Reduktion der körperlichen Aktivität (engl. lethargy), schütteres Fell (engl. ruffled fur) und Diarrhö gekennzeichnet.^{26,27}

1.2.3 Therapie der aGVHD

Die besondere Relevanz der aGVHD als wichtigste spezifische Komplikation der allogenen HSCT und hoher Mortalität geben dem therapeutischen Vorgehen eine essenzielle Bedeutung. Neben der Therapie einer aktiven aGVHD spielt hier auch die Verhinderung des Auftretens der Erkrankung eine wichtige Rolle. Letzteres kann potenziell sowohl durch die medikamentöse Prophylaxe als auch durch Modifizierung des Transplantates (sog. Graft Engineering) erreicht werden.

1.2.3.1 Systemische Therapie

Die Standardtherapie der aktiven aGVHD ist die Applikation von systemischen Glukokortikoiden. Glukokortikoide bewirken über die Hemmung der Transkription von Genen die proinflammatorische Zyto- und Chemokine kodieren eine Reduktion derselben. Initial wird eine Dosierung von 1-2 mg/kg/Tag Prednisolonäquivalent angewendet, welche jedoch bei schweren Verläufen auf ≥ 2 mg/kg/Tag eskaliert werden kann.^{22,28,29} Die systemische Therapie ist ab Grad II im Sinne der MAGIC Klassifikation indiziert, von einer Applikation ab Grad I wird aufgrund des fehlenden Überlebensvorteils im Vergleich mit einer Watch-and-Wait-Strategie abgesehen.³⁰ Ein großes Problem des Therapieansatzes stellen steroidrefraktäre oder gar -resistente Verlaufsformen der aGVHD dar. Dabei sind etwa 50% der aGVHD steroidrefraktär.³¹ Die steroidresistente Verlaufsform hat für den

Patienten eine sehr schlechte Prognose mit einer Überlebensrate von nur 5-30%.³² Daneben muss ebenfalls die vermehrte Toxizität von systemischen Glukokortikoiden bedacht werden. Darunter kann es zu arterieller Hypertonie und Hyperglykämie kommen, außerdem werden Infektionen mit fakultativ-pathogenen Mikroorganismen (Pilze, Viren – insbesondere CMV, Bakterien) begünstigt.

Die Zweitlinientherapie umfasst Immunsuppressiva wie Mycophenolat-Mofetil (MMF), Pentostatin und Cyclophosphamid, sowie monoklonale Antikörper. Die Indikationen zur systemischen Zweitlinientherapie sind jedoch nicht einheitlich definiert.³¹

Ein ebenfalls teilweise zur Anwendung kommender Ansatz zur Behandlung der therapieresistenten, schweren aGVHD stellt die In-vivo-Applikation Mesenchymaler Stammzellen (MSC) dar. Diese wirken immunsuppressiv und inhibieren die Proliferation alloreaktiver T-Zellen. Aufgrund ihrer nicht immunogenen Eigenschaften entgehen sie alloreaktiven T- bzw. NK-Zellen. Die Gruppen um Le Blanc et al. und Kordelas et al. zeigen, dass aus Knochenmark gewonnene MSC bzw. MSC-Exosomen zu einer schnellen klinischen Besserung therapieresistenter intestinaler, kutaner und mukosaler aGVHD Grad II bis IV führen können.^{33,34} Trotz dieser Ergebnisse stellt jedoch die fehlende Induktion einer Long-term-Toleranz eine Limitierung des Therapieerfolges dar.³⁵

1.2.3.2 Prophylaxe

Die gängige medikamentöse Prophylaxe der aGVHD umfasst die Therapie mit Calcineurin-Inhibitoren wie Tacrolimus oder die indirekte Inhibition über Ciclosporin A in Kombination mit dem Folsäure-Antagonist Methotrexat (MTX) oder seltener Mycophenolat Mofetil (MMF).^{22,36,37} Während Calcineurin-Inhibitoren, über die Hemmung der Dephosphorylierung von Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT), die durch T-Zell Rezeptor-Aktivierung ablaufende Signalkaskade schwächen und dadurch die Sezernierung von IL-2 durch CD4⁺ T-Zellen reduzieren^{32,38}, hemmen MTX und MMF die Proliferation von T-Zellen. Weitere, jedoch nicht hauptsächlich verwendete, prophylaktische Agenzien umfassen Cyclophosphamid und Rapamycin (Sirolimus).

1.2.3.3 Graft Engineering

Neben zahlreichen neuen Therapieansätzen stellt die bereits seit mehreren Jahrzehnten bekannte Methode der Modulation des Spendertransplantates bzw. das Graft Engineering einen sehr aussichtsreichen Ansatz zur Prävention der Entwicklung einer akuten Graft-

Versus-Host Disease dar. Eine Modulation des Grafts erfolgt ex vivo in vitro. Methodisch wird bei der prophylaktischen Ex-vivo-Depletion von T-Lymphozyten zwischen einer negativen Selektion und einer positiven Selektion unterschieden. Bei der negativen Selektion werden T-Zellen über monoklonale Antikörper, Counter Flow Elutriation oder Immunotoxine aus dem Graft entfernt. Die mittlerweile bevorzugt verwendete Methode der positiven Selektion nutzt immunomagnetische Systeme wie CliniMACS (Miltenyi Biotech, Gladbach, Deutschland). Die ersten Versuche der Modulation des Grafts über T-Zell-Depletion (TCD) wurden im Sinne einer Entfernung der gesamten T-Zellen, sog. Pan-TCD, durchgeführt und auch in der klinischen Praxis angewendet. Hierauf zeigte sich eine niedrigere Inzidenz schwerer aGVHD der Grade III bis IV, jedoch im Vergleich mit der Prophylaxe aus Ciclosporin A/MTX eine ähnliche 3-Jahres Überlebensrate (engl. disease free survival, DFS) und eine höhere Rezidivrate, insbesondere bei Patienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie. Weitere gravierende Probleme der Pan-TCD umfassen die erhöhte Inzidenz vom sog. Graft Failure und insbesondere die sehr langsame Immunrekonstitution. Letztere bedingt vermehrte Komplikationen durch Infektionen, insbesondere viraler Genese häufig durch CMV und EBV.³⁹ Mit wachsenden wissenschaftlichen Erkenntnissen über die T-Zellfraktionen und deren Aufgaben, werden mittlerweile selektive Verfahren zur TCD angewendet oder untersucht. Erste Versuche der selektiven TCD mit Depletion von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen in den 1990er Jahren reduzierten zwar das Auftreten von aGVHD, jedoch auf Kosten einer hohen Rezidivrate. Als einer der Gründe für Graft Failure und Mortalität nach Transplantation wird der Verlust bzw. die quantitative Reduktion CD34⁺ Zellen angesehen. Die positive Selektion CD34⁺ Zellen führt zu einer passiven Depletion von T-Lymphozyten aus dem Graft. Der Transplantationsansatz von Urbano-Ispizua et al. umfasst die Transplantation aus G-CSF mobilisierten Peripheral Blood Progenitor Cells (PBPC) im HLA identischen Zwillings-Setting, mit intensiver post-Transplantat-Immunsuppression (Ciclosporin A plus Prednison). Hierunter zeigte sich ein schnelles Engraftment ohne Entwicklung einer aGVHD Grad II bis IV.⁴⁰ Aufgrund der protektiven Funktion der T-Lymphozyten sowie der durch diese vermittelte GVT-Aktivität werden auch T-Zell-erhaltende, selektive Depletionen weiter untersucht.

Im Rahmen der sog. $\alpha\beta$ /CD19-Depletion werden anstatt der gesamten T-Zellfraktion, nur der Anteil der konventionellen T-Zellen depletiert. Die $\gamma\delta$ T-Zellen, die der angeborenen

Immunität angehören und keine Alloreaktivität aufweisen werden im Graft belassen, wodurch Engraftment und zellvermittelte Immunität gegenüber Pathogenen (insbesondere Viren) sowie Rezidiven bewahrt werden konnte.^{41,42}

Ausgehend von der Beobachtung, dass naive T-Zellen (CD45RA⁺) im Mausmodell eine schwerere aGVHD auslösen als T-Gedächtniszellen (Memory T-Zellen), haben Bleakley et al. erstmals CD45RA⁺ T-Zellen des Grafts depletiert. Der Oberflächenmarker CD45RA wird von naiven T-Zellen bis zur Aktivierung exprimiert. Die nach Transplantation der Memory T-Zellen auftretende aGVHD zeigte im HLA-matched-Setting einen milderen Verlauf, keine Erhöhung der Rezidivrate und weiterhin Ansprechen auf Kortikosteroide.⁴³ Zudem zeigte sich eine schnelle Immunrekonstitution mit über die T-Gedächtniszellen transferierte virus-spezifische Immunität. Trotz dieser positiven Aspekte konnte jedoch weiterhin keine Reduktion der Inzidenz erreicht werden.⁴⁴

Auch die Depletion von $\alpha\beta$ T-Lymphozyten stellt einen Ansatz zur Ex-vivo-Graftmodulation dar. Den im Graft verbleibenden $\gamma\delta$ T-Lymphozyten wird eine schnelle Zytokinfreisetzung und damit einhergehend die Zerstörung maligner und viral infizierter Zellen zugeschrieben.⁴⁵ So wird das GVHD bzw. rezidivfreie Überleben (GRFS) nach $\gamma\delta$ -Transplantation in einer Studie von Locatelli et al. mit 70% angegeben.⁴⁶ Weiterhin werden in einer großen Multicenter-Studie von Wagner et al. im Unrelated-Donor-Setting im Vergleich mit alleiniger Ciclosporin A/MTX Prophylaxe eine schnellere Erholung der Neutrophilen, reduzierte Inzidenz von Grad III bis IV aGVHD und weniger Toxizität, jedoch auch eine erhöhte Rate an CMV-Infektionen und signifikant höhere Rezidivraten (insb. bei Patientin mit CML) angegeben.⁴⁷

Ein anderer zellbasierter Ansatz ist die prophylaktische Transfusion von suppressiv auf $\alpha\beta$ T-Zellantworten wirkenden regulatorischen T-Zellen (sog. Tregs), die aufgrund ihres Vermögens, jede Immunantwort negativ zu regulieren, auch auf Alloantigene, die Inzidenz der aGVHD bei adäquater Immunrekonstitution senken.^{48,49} So konnten Spender-Treg-Infusionen im Mausmodell die Entwicklung einer aGVHD verhindern. Bei Transplantation ex vivo expandierter CD4⁺ FoxP3⁺ Tregs zeigte sich eine niedrigere Rezidivinzidenz, beim Transplantat in vitro generierter IL-10 anergisierter T-Zellen mit Tregs im haplo-MHC-Setting beschreiben Trenado et al. trat nur eine milde aGVHD auf.^{31,50,51} Ein komplettes Ausbleiben der Ausbildung einer aGVHD ohne Auftreten eines Rezidivs wird nach Co-Transplantation von Spender Tregs und konventionellen T-Zellen von

Martinelli et al. beschrieben. Auch die Transplantation ex vivo induzierter humaner Alloantigen-spezifischer CD8⁺ Tregs zeigt eine Reduktion der Proliferation und Sekretion inflammatorischer Zytokine durch alloreaktive T-Zellen ohne signifikante Reduktion der Immunantwort und GVT-Aktivität.⁵²

1.3 Das adaptive Immunsystem

Die aGVHD ist eine durch die überschießende Funktion des Spender-Immunsystems bedingte Erkrankung. Folglich ist die Kenntnis von hier involvierten Zellen und Zytokinen für das Verständnis der komplexen Pathophysiologie unerlässlich. Das menschliche Immunsystem wird systematisch in einen angeborenen (unspezifischen) und einen adaptiven (spezifischen) Teil gegliedert. Das angeborene Immunsystem besteht aus den zellulären Bestandteilen der myeloischen und teilweise lymphatischen Zellreihe (bspw. Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen, Mastzellen, NK-Zellen), und aus löslichen Bestandteilen wie dem Komplementsystem. Zu den löslichen Bestandteilen gehören aber auch zum Beispiel Zytokine, antimikrobiellen Enzyme und Peptide, und Akute-Phase-Proteine. Ferner wird auch die Barrierefunktion anatomischer Strukturen (bspw. Epidermis, Epithel von Darm und Lunge) dem angeborenen Immunsystem zugerechnet.^{53,54} Die angeborene zelluläre Immunantwort erfolgt als erste Reaktion nach Erkennung von Pathogenmustern (u.a. DAMP, PAMP) über sog. Pattern Recognition Receptors mittels Phagozytose und der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine.⁵⁴ Eine Limitation unseres angeborenen Immunsystems ist die genetisch festgelegte Anzahl von sezernierten Proteinen und insbesondere Rezeptoren, welche die Erkennung nur einer begrenzten Anzahl von Pathogenen erlaubt. Um die Myriaden von unterschiedlichen Antigenen zu erkennen, kommt das adaptive Immunsystem zum Einsatz. Die adaptive Immunantwort wird über T- und B-Lymphozyten vermittelt. Beide Zelltypen besitzen auf ihrer Zelloberfläche als Folge eines somatischen Gen-Rearrangements Rezeptoren, die für jede Immunzelle individuell sind. Die Diversität beträgt zwischen 1×10^{15} und 1×10^{21} im T-Zellkompartiment. Die Vorläuferzellen der T- und B-Zellen befinden sich im Knochenmark, als primärem lymphatischen Gewebe. Während die Reifung der B-Zellen ebendort abläuft, migrieren die Vorläufer T-Zellen zur Reifung als sog. Thymozyten in den Thymus. In Thymus und Knochenmark erfolgt das zufällige Gen-Rearrangement zur Kodierung des TCR und B-Zell-Rezeptors (BCR). Im Anschluss erfolgt die Verteilung und Bewegung der nun naiven Lymphozyten zwischen den sekundären lymphatischen

Gewebe (bspw. Lymphknoten, Milz, Tonsillen, Peyer-Plaques, MALT), in denen die Antigenpräsentation und damit Aktivierung durch über die Lymphflüssigkeit zirkulierende APCs stattfindet.⁵³

1.4 T-Lymphozyten

Im Folgenden soll nun auf die im Rahmen der aGVHD wichtigen T-Lymphozyten eingegangen werden. Diese übernehmen neben der bereits o.g. Immunantwort (s. 1.3) zudem die dauerhafte Kontrolle latenter viraler (bspw. CMV, EBV)^{55,56}, bakterieller (bspw. Mykobakterien) und protozoeninduzierter Infektionen (bspw. Leishmanien). Die aus den T-Vorläuferzellen hervorgegangenen naiven T-Lymphozyten, also T-Zellen die noch nicht ihr spezifisches Antigen erkannt bzw. getroffen haben, exprimieren den Oberflächenmarker CD45RA. Die Aktivierung naiver T-Zellen erfolgt ausschließlich nach Antigenerkennung auf MHC-Molekülen, die von sog. professionellen APCs wie den dendritischen Zellen (DC), Makrophagen und auch B-Zellen präsentiert werden. Diese präsentieren Antigene über Proteine des Major Histocompatibility Complex (MHC) im Kontext costimulatorischer Moleküle, die erst die Aktivierung naiver T-Zellen ermöglichen.⁵⁷ Nach Aktivierung der naiven T-Zellen sezernieren diese zum Überleben und der Förderung der Proliferation IL-2.⁵⁴ Im Verlauf erfolgt die Differenzierung zu sog. T-Effektorzellen, diese können ohne Costimulation beim Aufeinandertreffen mit ihrem Zielantigen ihre Effektorfunktion ausüben. T-Effektorzellen können sich wiederum zu T-Gedächtniszellen (Syn. Memory T-Zellen) entwickeln. Beide Zelltypen tragen den Oberflächenmarker CD45RO, jedoch exprimieren Memory T-Zellen im Gegensatz zu T-Effektorzellen vermehrt Bcl-2 und CD127. Eine weitere systematische Unterteilung dieser Zelltypen erfolgt anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in zwei Gruppen. Die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen erfolgt durch die Antigenpräsentation über auf APCs exprimierte MHC-Proteinen der Klasse I (MHC I). Sie werden aufgrund ihrer Fähigkeit zur Induktion von Apoptose bei Zielzellen über Zytolysine funktional auch als zytotoxische T-Zellen (CTL) bezeichnet. Die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen erfolgt über Antigene, die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden^{53,57} und geht mit der potenten Sekretion von Zytokinen einher, bspw. IL-2, welche die Aktivierung CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen zur Folge hat. CD4⁺ T-Zellen subtypisieren sich in T-Helferzellen (Th-Zellen) und die regulatorischen T-Zellen (Tregs). Die Th-Zellen werden derzeit in die Subpopulationen der T-Helferzellen Typ 1 (Th1), T-Helferzellen Typ 2 (Th2), T-Helferzellen Typ 17

(Th17) und folliculäre T-Helferzellen (Tfh) unterteilt. Über Rückkopplungsschleifen der sezernierten Zytokine findet eine Regulation der Subpopulationen untereinander statt.⁵⁴ Die Rolle der T-Zellfraktionen im Kontext der GVHD (Th1, Th2, Th17, Treg, CTL) wird in den folgenden Unterkapiteln behandelt.

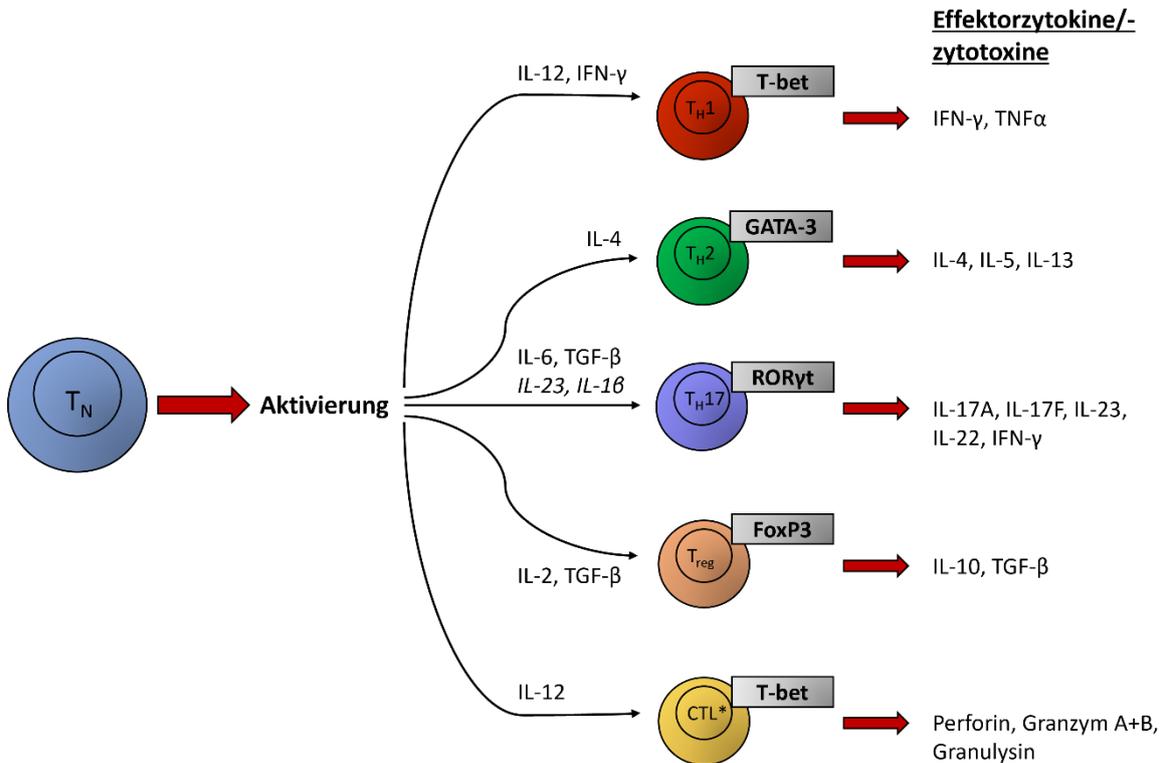


Abbildung 1. Differenzierung naiver T-Zellen auf Zytokinstimuli und Überblick essenzieller Effektorzytokine bzw. Zytotoxine. TN= naive T-Zellen, CTL entspricht Tc1-Zellen. Die Abbildung wurde angelehnt an eine Abbildung aus Jiang H et al. T Cell subsets in Graft Versus Host Disease and Graft Versus Tumor. Front Immunol. 2021; 12:761448.

1.4.1 T-Helferzellen

Laut Chen et al. wird die Induktion einer aGVHD nach Präsentation von Empfängerantigenen exklusiv von naiven T-Zellen initiiert. Die Population der im Graft verbleibenden CD4⁺ T-Gedächtniszellen ist nach dieser Auffassung nicht zur Induktion der aGVHD in der Lage.⁵⁸ Dies führte zur Rationale, dass nach Depletion aller naiven T-Zellen aus dem Transplantat keine GVHD mehr initiiert werden sollte. Diese Annahme trifft jedoch nicht zu, da die Inzidenz der GVHD gleich bleibt, der Verlauf jedoch abgemildert wird. In der Pathogenese der GVHD spielen insbesondere die von den Subpopulationen sezernierten Zytokine eine bedeutende Rolle.

1.4.1.1 Th1-Zellen

Die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen zu Th1-Zellen erfolgt durch den Einfluss der von angeborenen lymphoiden Immunzellen (ILC) sezernierten Zytokine Interleukin 12 (IL-12) und $IFN-\gamma$. Diese bewirken die Stimulation des intrazellulären Januskinase-Signal Transducers and Activators of Transcription Pathway (JAK-STAT Signalweg). $IFN-\gamma$ induziert den Transkriptionsfaktor STAT1 und IL-12 den Transkriptionsfaktor STAT4. Über STAT1 wird daraufhin die Expression des T-Box-Transkriptionsfaktors (T-bet) aktiviert, während über STAT4 eine Amplifikation dieser Expression induziert wird. T-bet gilt als sog. Master-Regulator der Differenzierung der Th1-Subpopulation und aktiviert wiederum die Gene für die Expression von $IFN-\gamma$ und $\beta 2$ -Kette des IL-12 Rezeptors. Durch diese positive Feedback-Schleife wird wiederum die Th1-Differenzierung verstärkt.^{54,59,60}

Neben der daraus resultierenden Produktion von $IFN-\gamma$, üben die Th1-Zellen u.a. über die Produktion von $TNF\alpha$ einen maßgeblichen Einfluss auf das angeborene Immunsystem über die Aktivierung phagozytotischer Prozesse sowie die Opsonierung durch das Komplementsystem aus. Sie sind die hauptsächlichen T-Effektorzellen zur Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen wie Viren, Mykobakterien und bestimmten Protozoen (s. oben, 5.).^{54,61}

Laut Henden et al. stellen die Th1-Zellen im Rahmen der akuten Graft-Versus-Host Disease die dominante Subpopulation dar. Bei vorherrschender Th1-Differenzierung geht die aGVHD mit gastrointestinaler und hepatischer Manifestation einher.^{62,63} Die Migration der Spender Th1-Zellen in Gastrointestinaltrakt und Leber erfolgt über die exprimierten Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CCR9. Die Produktion der Interleukine $IFN-\gamma$ und $TNF\alpha$ führt zur erleichterten Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CTL), welche die dortige Gewebeschädigung vermitteln.⁶⁴ Bei Abstinenz von $IFN-\gamma$ kommt es zu einem Shift hinsichtlich der Th2- und Th17-Subpopulationen und der damit einhergehenden Manifestation.

1.4.1.2 Th2-Zellen

Das Interleukin 4 (IL-4) induziert über den JAK-STAT Signalweg die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th2-Zellen. IL-4 aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT6 und dieser die Expression des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3. Durch GATA-3 werden die Gene zur Expression von IL-4 und Interleukin 13 (IL-13) aktiviert und damit

auch über eine positive Rückkopplung die Differenzierung der Th2-Subpopulation aufrechterhalten. Insbesondere wird die Produktion der Interleukine 4, 5 und 13 mit den Th2-Zellen assoziiert. Die Aktivierung von Th2-Zellen und die Produktion der assoziierten Interleukine dient grundsätzlich der Abwehr von extrazellulären Parasiten sowie der Aktivierung des angeborenen Immunsystems. So aktiviert IL-4 Mastzellen und basophile Granulozyten und IL-5 eosinophile Granulozyten während IL-13 die mukosale Barrierefunktion verstärkt.⁵⁴ Weiterhin wird ihnen im Rahmen von akuten und chronischen inflammatorischen Vorgängen eine Rolle bei Initiierung, Aufrechterhaltung und Amplifikation allergischer Reaktionen zugeschrieben.^{61,65}

Frühere Untersuchungen von Fowler et al. zur Rolle von Th2-Zellen bei aGVHD zeigten einen mildernden Effekt von Th2-angereicherten Grafts mit signifikanter Abschwächung der Pathologie im Gastrointestinaltrakt und der Leber.^{66,67} Später konnte Yi et al. im kompletten MHC-Mismatch-Mausmodell zeigen, dass sich unter Abstinenz von IFN- γ und Interleukin 17 (IL-17) eine pulmonale Inflammation im Sinne eines idiopathischen Pneumoniesyndroms (IPS) entwickelte. Hier migrieren Th2-Zellen durch Bindung der Liganden des Chemokin-Rezeptors CCR4 in das Lungengewebe und verursachen über IL-4 und IL-13 Inflammation und Remodelling des Lungenepithels, welches letztlich zur pulmonalen Fibrosierung führt.⁶⁴ Eine Manifestation in den definierenden Organsystemen der aGVHD (Gastrointestinaltrakt, Haut, Leber) zeigte sich jedoch nicht.⁶³

1.4.1.3 Th17-Zellen

Th17-Zellen produzieren die Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, IFN- γ und GM-CSF.⁵⁴ Es kann eine grobe Unterteilung in eine erste protektive IL-17 und IL-10 produzierende Gruppe und eine zweite hoch inflammatorische IL-17, IL-22, IFN- γ und GM-CSF produzierende Gruppe vorgenommen werden.⁶⁸ Sie übernehmen eine wichtige Aufgabe in der Bekämpfung von Bakterien und Pilzen. Diese üben sie durch die Fähigkeit zur Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten, direkt über IL-8 oder indirekt über die Produktion des GM-CSF und Chemokinen wie CXCL8, aus.⁶¹ Des Weiteren stärken sie insbesondere die Abwehrfunktion der mukosalen Barriere durch Stimulation der Produktion broncho-epithelialer Muzine (MUC5AC, MUC5) und der Expression von Defensinen (bspw. β -Defensin 2) und des Chemokins CCL20.^{61,69,70} Für die Differenzierung naiver T-Zellen in Th17-Zellen müssen hauptsächlich die Zytokine IL-6 und Transforming Growth Factor β (TGF- β) im Zytokinmilieu vorliegen, weiterhin ist jedoch auch

die Anwesenheit von IL-23 und IL-1 β notwendig⁶¹. IL-6 wird als proinflammatorisches Zytokin in Anwesenheit von Pathogenen durch ILCs sezerniert und aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT3, welcher im Zusammenspiel mit TGF- β die Expression des nukleären Transkriptionsfaktors RAR-Related Orphan Receptor Gamma-T (ROR γ t) induziert. Da IL-6 nicht von Th17-Zellen, sondern durch Stimulation von ILC exprimiert wird, wird dies als indirekte positive Rückkopplung bezeichnet. ROR γ t wird als Master-Regulator der Th17-Zellen bezeichnet und dient der Stabilisierung und Proliferation der Subpopulation.⁵⁴ Die genetische Kodierung von ROR γ t erfolgt über das Gen RORc. Von Ivanov et al. beschriebenes RORc Knock-Out (KO) im murinen Modell zeigte, dass die Differenzierung zu Th17-Zellen ohne das Gen ausbleibt und dadurch die Schwere autoimmuner Erkrankungen vermindert wurde.⁷¹ Die Transplantation RORc- bzw. ROR γ t-defizienter T-Zellen im murinen halpoidenten Transplantationsmodell wies ebenfalls eine Attenuierung der aGVHD in Bezug auf Ausprägung der Manifestationen und Letalität nach. Dieser positive Effekt war im kompletten MHC-Mismatch vermindert.⁷²

Teshima et al. beschreiben ein Zusammenwirken zwischen Th17-Zellen und Th1-Zellen im Rahmen der Induktion der aGVHD, schätzen deren Rolle jedoch geringer als die der Th1-Zellen ein. Die Th17-Zellen scheinen insbesondere bei kutanen und pulmonalen Manifestationen eine wichtige Rolle zu spielen und können die dortige aGVHD unter bestimmten Umständen medieren.^{73,74} In die Zielgewebe migrieren die Th17-Zellen über den Chemokin-Rezeptor CCR6. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass auf die Abwesenheit von Spender-Th17-Zellen eine verstärkte Th1-Differenzierung und IFN- γ Produktion mit Exazerbation der aGVHD folgte. Auf der anderen Seite wurde die Th1-Differenzierung durch die Anwesenheit von Spender-Th17-Zellen herunterreguliert und die aGVHD im Rahmen der allogenen HSCT abgeschwächt.^{75,76}

1.4.2 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen halten die immunologische Toleranz gegenüber Auto-Antigenen aufrecht und können damit ausufernde T-Zell-Antworten modulieren. Ihre Funktion üben Tregs entweder zellkontaktabhängig (durch nTreg) oder über die Zytokine TGF- β und IL-10 aus (durch iTreg). Die Sekretion von TGF- β kann die Proliferation der T-Zellfraktionen inhibieren. Interleukin 10 greift in mehrere Prozesse der Aktivierung naiver T-Zellen inhibierend ein, sodass die Expression von MHC-Molekülen und costimulierenden Molekülen durch APCs sowie die Produktion der Zytokine IL-12 und IL-23

eingeschränkt werden. Folglich wird auch die Differenzierung in Th1- und Th17-Zellen vermindert. Eine weitere Unterteilung der Tregs erfolgt in die bereits im Thymus differenzierten natürlichen Tregs (nTreg) und die sich nach Antigenkontakt in der Peripherie differenzierenden induzierten Tregs (iTreg). Letztere differenzieren sich aus naiven T-Zellen in Gegenwart von TGF- β und IL-2, welches durch aktivierte naive T-Zellen sezerniert wird. IL-2 aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT5, welcher wiederum den spezifischen Transkriptionsfaktor FoxP3 aktiviert. FoxP3 wird konstitutiv ausschließlich von nTregs exprimiert und stört die Transkription des IL-2 Promotor Gens, woraufhin die eigene Produktion von IL-2 weitgehend eingeschränkt wird. nTregs exprimieren CD25, die hochaffine α -Kette des IL-2 Rezeptors. Diese ermöglicht den nTregs, trotz fehlender eigener Produktion, das überlebenswichtige IL-2 der produzierenden naiven T-Zellen hochaffin zu binden. Daraus resultiert wiederum eine Hemmung des Wachstums und der Differenzierung naiver T-Zellen, welche den hochaffinen IL-2 Rezeptor nicht besitzen. Eine Supprimierung der T-Zell-Antwort erfolgt auch durch die Oberflächenexpression von CTLA-4. Dieses Molekül konkurriert mit den costimulierenden Molekülen der APCs um die Bindung von Proteinen der B7-Familie und kann damit die Aktivierung naiver T-Zellen verhindern.⁵⁴

Nach allo-HSCT sind Tregs zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz notwendig. Dabei geht eine langsame Treg Rekonstitution mit einem erhöhten Risiko einer aGVHD einher. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁺ Tregs die Proliferation CD4⁺ T-Zellen nach allogener Stimulation in vitro supprimieren und Antigen-toleranz im Spender T-Zell Transplantat ex vivo induzieren woraufhin das Risiko für aGVHD reduziert werden konnte. Hoffmann et al. konnten zudem zeigen, dass CD4⁺CD25⁺ Tregs im ausgeglichenen Verhältnis mit CD4⁺ T-Zellen, ohne vorherige Induktion von Antigen-toleranz, Alloreaktivität und Letalität unterbinden können.⁷⁷ Strategien zur in vivo Expansion regulatorischer T-Zellen mittels niedrig dosierter IL-2 Applikation oder die Transplantation ex vivo expandierter Tregs wurden klinisch getestet.⁷⁸

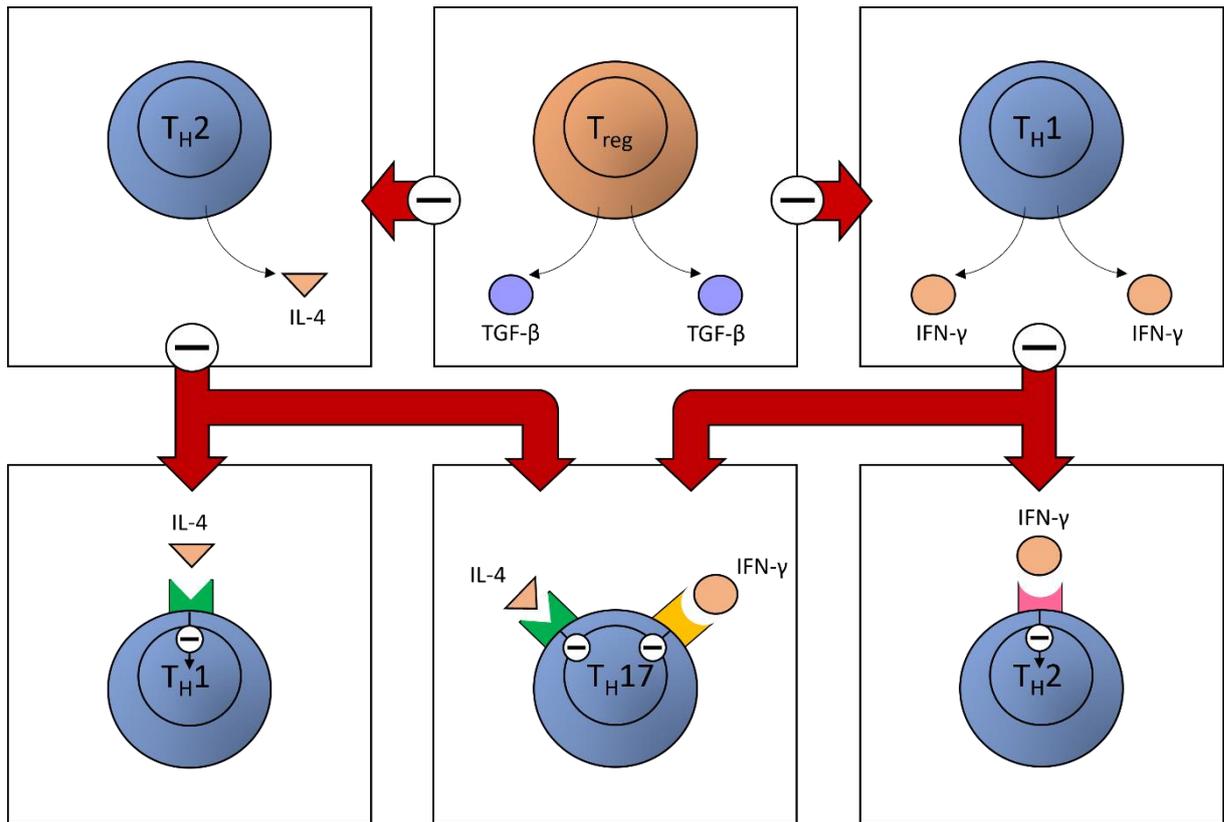


Abbildung 2. Kreuzregulation der CD4⁺ T-Zellen über sezernierte Zytokine. Das von Tregs sezernierte TGF-β unterdrückt die Differenzierung und Proliferation von Th1- und Th2-Zellen. Die Produktion von IFN-γ, in diesem Fall durch Th1-Zellen, inhibiert die Differenzierung in die Th2- und Th17-Subpopulation. Das Zytokin IL-4 der Th2-Zellen kann wiederum die Differenzierung von Th1- und Th17-Zellen hemmen. Folglich kann die Differenzierung zu Th17-Zellen durch die TGF-β Produktion gefördert werden und in diesem Fall weiterhin zu inflammatorischen Reaktionen beitragen. Die Abbildung wurde eigenhändig erstellt analog zu Murphy, K., Travers, P., Walport, M., & Janeway, C. (2018). Janeway Immunologie; S. 486.

1.4.3 Zytotoxische T-Zellen

Die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTL) spielen im Rahmen der adaptiven Immunantwort eine zentrale Rolle. Sie eliminieren infizierte Zellen und medieren die Inflammationsreaktion. Das Priming naiver CD8⁺ T-Zellen erfolgt in den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten und Milz) nach Antigenpräsentation durch APCs über MHC-I-Moleküle im Kontext mit costimulierenden Molekülen. Im Vergleich mit der Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen wird zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen eine höhere costimulatorische Aktivität benötigt. Selten kann diese höhere Aktivierungsschwelle durch die Interaktion mit dendritischen Zellen allein überwunden werden. In den meisten Fällen erfolgt die zusätzliche Bindung von CD4⁺ T-Zellen an die costimulatorischen Oberflächenmarker CD40 und B7 der APC, woraufhin die CD4⁺ T-Zelle vermehrt IL-2 sezerniert. Dieses wiederum stellt ein wichtiges Zytokin zur Differenzierung in zytotoxische

T-Effektorzellen dar⁷⁹ und erhöht in Wechselwirkung die costimulatorische Aktivität der APC. Zudem wird die Differenzierung zu CD8⁺ T-Effektorzellen durch IL-12 über die Induktion von T-bet gefördert.^{80,81} Wang et al. konnten zeigen, dass auch der Transkriptionsfaktor GATA-3 eine wichtige Rolle in Generierung, Differenzierung sowie Proliferation nach Aktivierung CD8⁺ T-Zellen spielt.⁸²

Nach erneutem Antigenkontakt kommt es zu einer massiven Proliferation der CD8⁺ T-Effektorzelle, welche zu einer Inversion des CD4:CD8 Verhältnisses führt. Badinovic et al. führen hier eine nach 19 Zellteilungen bis zu 500.000-fache Erhöhung der Anzahl CD8⁺ T-Zellen an.⁸³ Für die maximale Expansion benötigen die CD8⁺ T-Zellen Signale über TCR, costimulatorische Moleküle sowie inflammatorische Zytokine wie IL-12 und Typ 1 IFN- γ .^{84,85}

CTL üben ihre apoptotische Funktion über sog. Zytotoxine wie Perforin, Granzyme, Granzulin und den Fas-Liganden aus. Perforin, die Granzyme A und B sowie Granzulin werden nach Antigenerkennung in modifizierten Lysosomen, sog. zytotoxischen Granula, freigesetzt. Perforin schädigt die Zellmembran der Zielzelle und erzeugt damit einen Kanal zum Eindringen der Granzyme. Diese können wiederum über die Aktivierung der Caspase 3 oder direkter Schädigung der Mitochondrien mit Austritt von Cytochrom c ins Zytosol die Apoptose induzieren.⁵⁴ Die Bindung des Fas-Liganden an den Zelloberflächenrezeptor Fas und dessen Todesdomäne löst ebenfalls über Freisetzung der aktivierten Caspase 8 den programmierten Zelltod in der Zielzelle aus.⁵⁴

Neben Zytotoxinen produzieren CTLs verschiedene Zytokine. Hier sind die proinflammatorisch wirkenden Zytokine IFN- γ , TNF α und TNF β (Syn. Lymphotoxin-alpha, kurz LT- α) zu erwähnen. IFN- γ inhibiert direkt die virale Replikation, aktiviert Makrophagen, lockt diese zu den Infektionsherden und verstärkt die Expression oberflächlicher MHC-I-Moleküle auf APCs. Folglich können mehr CTLs aktiviert und damit rekrutiert werden. TNF α und TNF β wirken über den TNF Rezeptor 2 (TNFR2) ebenfalls an der Aktivierung von Makrophagen mit und können über den TNFR1 die Apoptose mit auslösen.⁵⁴ Interessanterweise kann auch das inflammationshemmende Zytokin Interleukin 10 durch CTL sezerniert werden. So wurde in mehreren Publikationen gezeigt, dass im Rahmen von viralen Infektionen auf dem Höhepunkt der inflammatorischen Reaktion eine Subpopulation der CD8⁺ T-Zellen vermehrt IL-10 produziert.⁸⁶⁻⁸⁸ Dieses wirkt wiederum

hemmend auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen und Th1-Zellen und dient der Eindämmung von Gewebeschädigung durch Th1-Zellen.

In der aGVHD können CD8⁺ T-Zellen, neben den durch proinflammatorische Zytokine aktivierten Zellen des angeborenen Immunsystems, die Schädigung der Zielgewebe (Haut, Gastrointestinaltrakt, Leber) vermitteln.

1.4.4 Transkriptionsfaktoren

Die dominanten Transkriptionsfaktoren der unterschiedlichen T-Zell-Fraktionen wurden bereits im jeweiligen Kapitel genannt. Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor im Rahmen der GVHD ist Eomes. Dieser wird von Eomesodermin kodiert und gehört wie T-bet zur Familie der T-box-Transkriptionsfaktoren. Exprimiert wird Eomes von NK-Zellen, Effektor- und Memory CD8⁺ T-Zellen sowie wenigen speziellen Tregs. Eine hohe Expression von Eomes geht mit einer höheren Zytotoxizität einher. Im Rahmen der allo-genen HSCT wird Eomes für den GVT-Effekt und die damit einhergehende dienliche Zytotoxizität gebraucht.⁸⁹

1.4.5 Aktivierungsmarker

Im Rahmen der Aktivierung von T-Zellen, exprimieren diese unterschiedliche Proteine an der Zelloberfläche. In Abhängigkeit der Dauer der aktivierenden Antwort nach Stimulation werden die Aktivierungsmarker in frühe und späte nach Stimulation auftretende Marker unterteilt.⁹⁰ Laborchemisch lassen sich die Aktivierungsmarker über durchflusszytometrische Färbungen nachweisen.

Zu den frühen Aktivierungsmarkern zählt das Oberflächenprotein CD69. Die Expression des Oberflächenmarkers CD69 auf aktivierten T-Zellen wird nach Antigenkontakt in den sekundären lymphatischen Organen durch Signale des TCR induziert. CD69 ist ein Zelladhäsionsmolekül und führt zur Aufnahme von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) in die Zelle, woraufhin die Zellmigration aktivierter T-Zellen aus dem lymphatischen Organ gehemmt wird. Dieser Mechanismus dient der Proliferation der T-Zelle. Die Expression von CD69 nimmt bereits nach mehreren Tagen ab und erlaubt die Rezirkulation der T-Lymphozyten.⁵⁴ Mit Ausnahme von sog. Resident Memory T-Cells (Trm) wird CD69 nicht von T-Gedächtniszellen exprimiert und kann somit begrenzt zu deren Unterscheidung von naiven T-Zellen herangezogen werden.^{54,91} Laut Strobl et al. ließen sich in kutanen GVHD-Läsionen CD69⁺ Empfänger-Trm nachweisen, welche proinflammatorische Zytokine und zytotoxische Granula sezernierten.⁹¹ Weiterhin

konnten Weiner et al. eine Erhöhung der CD69⁺ Trm im Rahmen einer GVHD nach intestinaler Transplantation (ITx) nachweisen. Hier wird jedoch eine Ausschwemmung der Trm aus dem Graft in den Blutkreislauf des Empfängers angenommen.⁹²

Die Oberflächenmarker CD25, CD137 und HLA-DR zählen zu den späten Aktivierungsmarkern. CD25 entspricht der α -Kette des IL-2 Rezeptors. Insgesamt setzt sich der Rezeptor aus α -, β - und γ -Kette zusammen, wobei letztere bereits ohne stattgefundenen Antigenkontakt auf der Oberfläche exprimiert werden. Nach dem Erstkontakt naiver T-Zellen mit dem spezifischen Antigen wird die Oberflächenexpression von CD25, zusammen mit der Produktion von IL-2, induziert. Durch Assoziation der o.g. Ketten entsteht ein Rezeptor mit höherer Affinität für IL-2, welches ein essenzielles Zytokin für Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen darstellt. Regulatorische T-Zellen exprimieren CD25 dauerhaft zur Stabilisierung der Subpopulation.⁵⁴ Bei ausbleibender Stimulation durch Antigene wird die Expression von CD25 in T-Effektorzellen wieder herunterreguliert.⁵⁴ Aktivierte antigenspezifische T-Effektorzellen exprimieren den Oberflächenmarker CD137 (Syn. 4-1BB).⁹³ CD137 gehört zu der Familie der TNF-Rezeptoren und wirkt als costimulierendes Molekül, das über Bindung des 4-1BB Ligan den auf der Zelloberfläche von professionellen APCs wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen die Proliferation von T-Zellen stimuliert.⁵⁴ Weiterhin verhindert die Expression von CD137 die Apoptose und erhöht damit das Überleben der T-Zellen. Bei ausgeprägter Stimulation des TCR kann die Costimulation durch 4-1BB/ 4-1BBL für die CD28-unabhängige Aktivierung naiver T-Zellen ausreichen.⁹⁴ In vitro ist eine Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch 4-1BB möglich, jedoch konnte durch agonistische CD137-Antikörper eine präferierte Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und damit einhergehender Sekretion deren Effektormoleküle (s. 1.4.3) nachgewiesen werden.^{94,95} Bei der GVHD wird eine Abhängigkeit der Letalität von CD137 Costimulation der Spender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beschrieben.⁹⁵ So induzieren agonistische CD137-Antikörper im MHC-Mismatch eine schwere GVHD mit 100% Mortalität.⁹⁴ Darauf folgend konnten Lee et al. zeigen, dass die Depletion alloreaktiver CD137⁺ T-Zellen ex vivo eine GVHD verhinderte, ohne die GVT-Aktivität zu komprimieren. Eine Limitation stellt hier jedoch die dauerhafte Expression von CD137 auf Tregs dar, welche über die o.g. Zytokine eine wichtige hemmende Funktion auf die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine ausüben.⁹³

Als Marker für reife T-Zellen werden die Oberflächenmoleküle Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1, Syn. CD279) und HLA-DR eingeordnet. PD-1 wird von aktivierten T-, B-Zellen, NK-Zellen, aktivierten Monozyten und dendritischen Zellen zur Regulation der Immunantwort exprimiert und besitzt inhibitorische Eigenschaften. Es bindet die auf APCs exprimierten, negativ inotrop stimulierenden Liganden PD-L1 (Syn. B7-H1, CD274) und PD-L2 (Syn. B7-DC, CD273), und dient damit der Aufrechterhaltung einer Immuntoleranz.^{92,96} Dies erfolgt durch Hemmung der Produktion der Zytokine IFN- γ , TNF α und IL-2 durch T-Zellen, sowie der reduzierten Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3, T-bet und Eomes. Hemmende Effekte von PD-1 auf Proliferation, Differenzierung und Überleben der T-Zellen können jedoch durch Stimulation über CD28 und/oder von CD4⁺ T-Zellen produziertem IL-2 überwunden werden. T-Zellen, die durch Knock-Out nicht zur Expression von PD-1 fähig sind, tendieren zu überschießenden Immunantworten.⁹⁷ Damit übereinstimmend beschreiben Blazar et al. eine verstärkte Letalität der GVHD bei Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion.⁹⁸ Dahingegen beschreiben Stikvoort et al. vor dem Hintergrund, dass PD-1 von bereits alloreaktiven T-Zellen exprimiert wird, eine signifikant erhöhte Inzidenz von aGVHD Grad II bis III bei hoher Frequenz PD-1⁺ T-Zellen im allogenen Transplantat – mit PD1 als potentem Aktivierungsmarker – und schlagen daher die Bestimmung von PD-1 als positivem prädiktiven Marker für die aGVHD Grad II bis III vor.⁹⁹ HLA-DR zählt ebenfalls zu den späten Aktivierungsmarkern. Das Protein besteht aus α - und β -Kette, gehört zu den antigenpräsentierenden MHC-Klasse-II-Molekülen und wird von B-Zellen, Makrophagen und späteren Stadien der T-Zell Aktivierung exprimiert. Hier wird es auf der Zelloberfläche von Th1- und Th2-Zellen exprimiert und dient u.a. der Selbst-Antigenpräsentation und Antigenpräsentation gegenüber B-Zellen. Oba et al. beschreiben eine präferierte Expression von HLA-DR auf der Zelloberfläche von Th1-Zellen und gehen davon aus, dass die vermehrte Produktion von IFN- γ die Expression verstärkt.¹⁰⁰

1.4.6 T-Zell Rezeptor

Die T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor. Über diesen erkennen und binden T-Zellen ihr spezifisches Antigen. Jeder TCR ist einzigartig und für eine T-Zelle so charakteristisch wie der Fingerabdruck für einen Menschen. Jede T-Zelle exprimiert ca. 30.000 Exemplare ihres spezifischen T-Zell-Rezeptors auf ihrer Oberfläche.⁵⁴ Die optimale Aktivierung der antigenspezifischen

naiven T-Lymphozyten erfolgt laut Bretscher im Sinne eines Two-Signal Modells.^{101,102} Das erste Signal bildet die Präsentation von Proteinen über den MHC-Komplex der APC und dessen Bindung an den TCR. Das zweite Signal wird über die Bindung von costimulatorischen Molekülen der APC, wie CD80 (Syn. B7-H1), CD86 (Syn. B7-H2) und CD40 (Syn. TNFRSF5), an Oberflächenproteine der T-Zellen wie CD28 oder CTLA-4 vermittelt. Dabei wird die Aktivierung der naiven T-Zellen durch CD28 gefördert und durch CTLA-4, im Sinne der Induktion einer T-Zell-Toleranz, supprimiert. Folglich dient die Costimulation ebenfalls dem Gleichgewicht zwischen protektiver Immunreaktion und dem Verhindern von Autoimmunität.^{102,103} Als drittes Signal leistet das umgebende Milieu⁵⁶ einen signifikanten Beitrag dazu, in welche Richtung die T-Zelle sich differenzieren und welche Effektorfunktionen sie ausüben wird. Grundsätzlich ist eine Aktivierung naiver T-Zellen nur durch sog. professionelle APCs (Dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen) möglich, da nur diese in der Lage sind sowohl MHC als auch costimulatorische Moleküle zu exprimieren. Nicht-professionelle APCs (bspw. Fibroblasten, Epithelzellen des Thymus oder vaskuläre Endothelzellen) können lediglich MHC-Komplexe exprimieren. Diese sind jedoch bereits in der Lage Memory T-Zellen zu reaktivieren.⁵⁷ Laut Sharpe et al. besteht auch durch ein sehr starkes TCR-Signal die Möglichkeit der Aktivierung naiver T-Zellen.¹⁰²

1.4.6.1 Aufbau TCR

Der T-Zell Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus zwei Ketten. So besteht dieser bei der Mehrheit der zirkulierenden T-Zellen, den sog. $\alpha\beta$ -T-Zellen, aus einer α - und einer β -Polypeptidkette. Die Ketten des $\alpha\beta$ -Heterodimer werden jeweils in eine konstante (C-) und eine variable (V-) Region unterteilt. Über die CDR3-Region der V-Region unterscheiden sich die T-Zellen untereinander, denn diese sind nicht durch die Keimbahn kodiert (engl. germline encoded), sondern entstehen durch somatisches Rearrangement der V-, D- und J-Segmente, sowie die Integration von zufällig vielen und beliebigen Nukleotiden in den Verbindungsregionen der Segmente. Die MHC-Bindung erfolgt über die zwei Schleifen der Complementary-Determining Regions (CDR1-2).⁵⁴ Die CDR3-Region stellt die essentielle Struktur zur spezifische Antigenerkennung dar.⁵⁶ Aus den jeweils vorhandenen CDR3-Regionen formiert sich die epitopbindende Region. Die Diversität der CDR3-Schleife unterscheidet sich nochmals hinsichtlich der genetischen Kodierung zwischen α - und β -Kette. CDR3 der α -Kette wird von bereits genanntem V-

Segment und sog. Joining Segment (J) des Gens der V-Region kodiert (V α J α), die Region der β -Kette wird zusätzlich noch vom Diversity Segment (D) kodiert (V β D β J β).¹⁰⁴ Jeder TCR besitzt schließlich nur eine Antigenbindungsstelle.

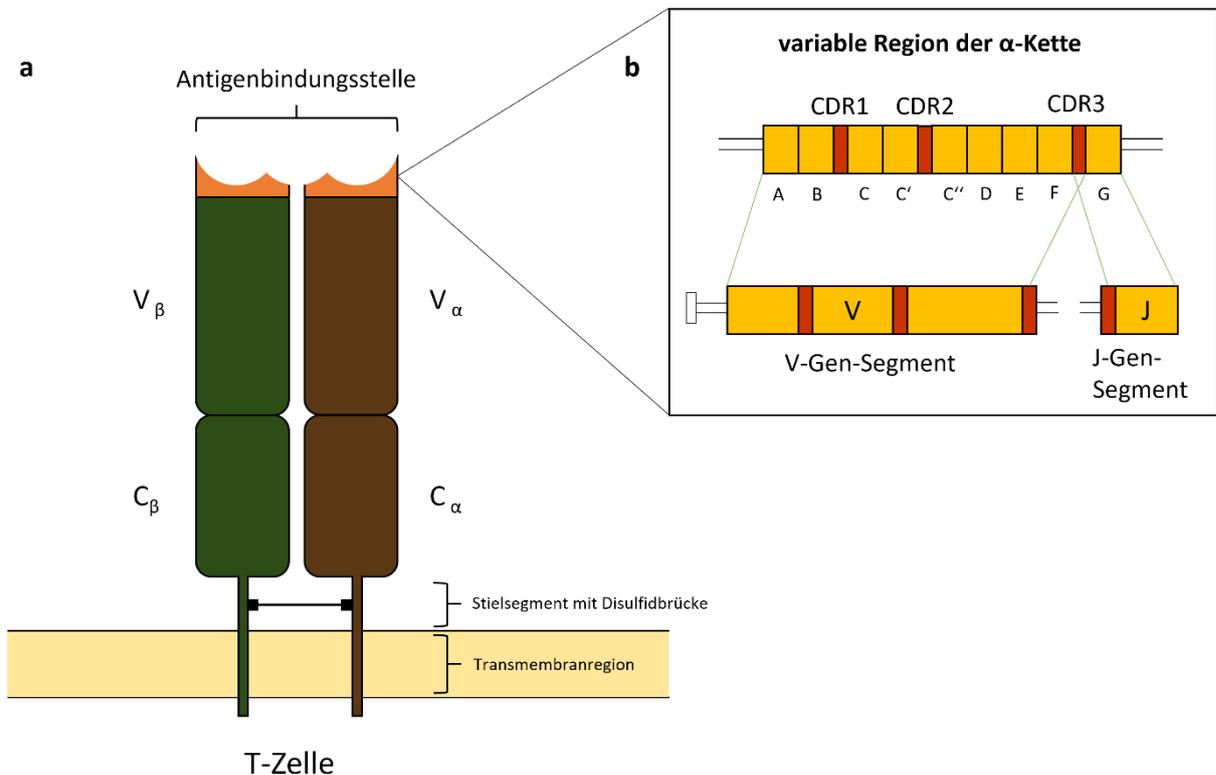


Abbildung 3. Aufbau des T-Zell-Rezeptors und somatische Rekombination der CDR3-Region der α -Kette. a Der heterodimere TCR ist aus α - und β -Kette aufgebaut. Diese werden in konstante (C) und variable (V) Region unterteilt. Die V-Region enthält die Antigenbindungsstelle. Die Ketten sind über eine Disulfidbrücke verbunden und über zyttoplasmatische Schwänze transmembran verankert. **b** Das dargestellte Exon der V-Region der α -Kette (oben) setzt sich aus CDR1, CDR2, CDR3 (rot) und Nukleotiden zusammen (gelb). Die vollständige V-Region der α -Kette (unten) wird aus dem V- und J-Gen-Segment gebildet. Hier wird dargestellt, dass CDR1 und CDR2 jeweils nur durch das V-Segment kodiert werden, während das hoch polymorphe CDR3 aus Verknüpfung von Sequenzen aus V- und J-Segment entsteht. Im Falle der β -Kette noch zusätzlich aus dem D-Gen-Segment. Anmerkung: Die Abbildung wurde eigenhändig erstellt analog zu Murphy, K., Travers, P., Walport, M., & Janeway, C. (2018). Janeway Immunologie; S. 195, 224.

1.4.6.2 Rekombinante Generierung bzw. somatische Rekombination

Die somatische Rekombination von CDR3 erfolgt bereits bei den Vorläufer-T-Zellen im Thymus. Sie dient der Diversität des gesamten T-Zell-Rezeptor-Repertoires und ermöglicht die Immunantwort auf eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene. Dabei bedient sie sich zwar verschiedener Gensequenzen, jedoch erfolgt die Kombination der Sequenzen und mögliche Insertionen bzw. Deletionen unabhängig vom menschlichen Genom. Man geht davon aus, dass sich dieser Mechanismus evolutionär entwickelt hat. Zur

Generierung der CDR3-Schleife der TCR β -Kette wird zunächst D β mit J β rekombiniert und im Anschluss D β J β mit V β rekombiniert. Durch das zusätzliche Entfernen (Deletion) und Hinzufügen (Insertion) von Nukleotiden wird eine weitaus größere junktionale Diversität erreicht. Da für die CDR3-Schleife der TCR α -Kette nur V α und J α rekombiniert werden, erreicht die TCR β -Kette eine höhere Diversität.⁵⁶ In der Theorie können durch diese Mechanismen während des gesamten Lebens etwa 10^{18} bis 10^{20} mögliche Rekombinationen bzw. Clonotypen des TCR entstehen.^{105,106} Die durchschnittliche, für eine adäquate Immunantwort ausreichende, Diversität liegt jedoch in etwa bei 10^6 bis 10^8 Rekombinationen bzw. Clonotypen.^{106,107}

1.4.6.3 T-Zell Rezeptor Repertoire bzw. T-Zell Repertoire

Die Proliferation naiver T-Zellen und T-Gedächtniszellen nach Antigenkontakt verändert das T-Zell-Rezeptor-Repertoire. Ursache dafür ist die klonale Expansion der aktivierten T-Zelle, sodass zu einer anfänglich polyklonalen Diversität mit vielen verschiedenen T-Zell-Rezeptoren eine oligo- bis monoklonale Zellexpansion hinzukommt. Diversität und Größe des TCR-Repertoires sind für die Kontrolle schwerer Infektionen wesentlich.⁵⁶ So beschreiben Britanova et al. eine Abnahme des TCR-Repertoires im Rahmen einer latenten CMV-Infektion (konsumierend), bzw. eine Abnahme der Diversität des Repertoires im Rahmen des Alterungsprozesses.¹⁰⁸

Die Entwicklung des T-Zell-Repertoires ist ein dynamischer und kontinuierlich ablaufender Vorgang. Hierbei ändert sich die klonale T-Zell-Hierarchie als Antwort auf die vorherrschenden Antigene. Nach allogener HSCT verändert sich diese klonale Hierarchie der Spender-T-Zellen im Rahmen der unbekanntenen Antigenkonfrontation. Nach Auftreten einer aGVHD zeigt sich in verschiedenen Untersuchungen eine Reduktion der Diversität und somit ein oligo- bis monoklonales T-Zell-Repertoire.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Die Reduktion der Diversität wird insbesondere für die betroffenen Gewebe beschrieben.^{112,113} Meier et al. beschreiben nach der HSCT eine Abkehr von der klonalen T-Zell-Hierarchie des Spenders, insbesondere bei Patienten die eine GVHD entwickeln.¹¹⁴

1.5 Zytokine

Als Zytokine werden kleine lösliche Proteine bezeichnet, die grundsätzlich von allen Zellen sezerniert werden können und die Eigenschaften der Zelle selbst oder umliegender Zellen beeinflussen.⁵⁴ Diese Effekte werden nach Bindung an Rezeptoren der

Zelloberfläche und anschließende intrazelluläre Signalgebung vermittelt. Darüber werden Mechanismen wie Zellaktivierung, Proliferation, Differenzierung oder auch Induktion von Apoptose gesteuert.⁵³ Auch im Rahmen der GVHD nimmt die Sekretion von Zytokinen bzw. das Zytokinmilieu eine wichtige Rolle ein, wobei das zeitliche Auftreten der Sekretion und auch der Weg der Administration des Zytokins eine bedeutende Rolle spielen können.¹¹⁵ Im Folgenden soll kurz die Untergruppe der Chemokine definiert werden und im Anschluss genauer auf die in der Arbeit untersuchten Interleukine eingegangen werden. Die Chemokine stellen eine spezialisierte Untergruppe der Zytokine dar. Sie werden strukturell in die Gruppen der α -(CXC) und β -(CC) Chemokine unterteilt. Funktionell bestehen ihre Aufgaben zum einen als sog. inflammatorische Chemokine in der Anlockung Chemokin-Rezeptor tragender Leukozyten zum Ort des Entzündungsgeschehens und zum anderen als lymphoide Chemokine in der Organisation der Zellen im lymphatischen Gewebe.^{53,54} Durch Interaktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren erfolgt die Migration der alloreaktiven Spender-T-Zellen im Rahmen der aGVHD in deren Zielorgane.¹¹⁶ Aktivierte Th1-Zellen exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR3, während Th2- und Th17-Zellen über die Chemokinrezeptoren CCR4, CCR5 und CCR9 zu den Zielorganen Haut und Lunge gelangen.

1.5.1 Interleukine

Die Untergruppe der Interleukine umfasst die zwischen Leukozyten wirkenden, bzw. von diesen sezernierten, Zytokine.⁵³ An dieser Stelle soll nochmals auf die relevanten Zytokine der genannten T-Zellfraktion eingegangen werden.

Interleukin 4 wird hauptsächlich von Th2-Zellen sezerniert, ein geringerer Teil kann jedoch auch von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowie den $\gamma\delta$ -T-Zellen produziert werden. Vorherrschend wird IL-4 eine protektive Funktion in autoimmun inflammatorischen Erkrankungen zugesprochen. Diese wird ausgeübt durch die Hemmung der Th1-Zelldifferenzierung und der damit einhergehenden Aktivierung von Makrophagen, Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, TNF α sowie reaktiven Sauerstoff- (ROS) bzw. Stickstoffspezies (RNS).¹¹⁷⁻¹¹⁹ Es wird die Unterdrückung einer CD8⁺ getriggerten aGVHD beschrieben.¹²⁰

Interleukin 5 ist ebenfalls ein Th2-sezerniertes Zytokin, dessen Funktion in Förderung von Wachstum und Differenzierung eosinophiler Granulozyten besteht. Das letzte charakteristische von Th2-Zellen produzierte Interleukin ist IL-13. Über IL-13 wird die

Produktion von Muzinen durch Becherzellen verstärkt sowie der Isotypenwechsel der B-Zellen von IgG1 zu IgE induziert.⁵⁴ IL-5 und IL-13 werden unter anderem als Marker für die akute Graft-Versus-Host Disease diskutiert. Jordan et al. zeigten eine positive Korrelation von IL-13 mit dem Auftreten einer aGVHD unabhängig von der Expression proinflammatorischer Zytokine. Weiterhin zeigten mehrere Untersuchungen eine Assoziation von IL-5 mit TNF α und IFN- γ , und die potenzielle Anwendung als Marker für den Schweregrad der aGVHD.^{121,122}

Die Produktion von Interleukin 10 wird hauptsächlich mit den Tregs assoziiert. Nichtsdestotrotz sind auch einige andere T-Zellfraktionen in der Lage IL-10 zu sezernieren, so bspw. Th2-, Th17- und zytotoxische T-Zellen. Durch die Ausschüttung von IL-10 wird die Freisetzung inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF α durch u.a. Makrophagen und Th1-Zellen sowie die Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen inhibiert.³¹ Folglich trägt IL-10 maßgeblich zum Erhalt einer allo-antigenspezifischen Toleranz bei und kann die aGVHD abschwächen.

Das Interleukin 17A wird hauptsächlich von Th17-Zellen produziert, jedoch konnte gezeigt werden, dass ebenso Makrophagen, dendritische Zellen, NK- und NKT-Zellen sowie $\gamma\delta$ T-Zellen das Zytokin sezernieren können. Der Th17 charakterisierende Transkriptionsfaktor ROR γ t induziert die Expression von IL-17A und dessen Teilhomolog IL-17F. Die Expression scheint durch IL-12 stark beeinträchtigt zu werden.⁶⁴ IL-17A übt insbesondere, jedoch nicht ausschließlich, seine Wirkung auf nicht-hämatopoetische Zellen (bspw. Epithelzellen und mesenchymale Zellen) aus. Im Rahmen der Immunantwort reguliert es die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten über die Induktion von G-CSF und Chemokine der CXC-Klasse. Weiterhin induziert es die Expression antimikrobieller Peptide wie bspw. β -Defensine zur Abwehr kutaner und mucosaler Infektionen. Im murinen KO von IL-17 und IL-17 Rezeptor zeigte sich dementsprechend eine erhöhte Anfälligkeit für Mikroorganismen wie Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren. Im Menschen zeigte sich hier klinisch vor allem die Anfälligkeit für Pilzkrankungen. Sowohl IL-17A als auch IL-17F wirken im Rahmen inflammatorischer Reaktionen kooperativ mit anderen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IFN- γ oder IL-1 β , da sie alleinig nur moderate aktivierende Signalkaskaden auslösen.⁶⁸ Im Rahmen der aGVHD wird IL-17A mit der kutanen und untergeordnet der pulmonalen Affektion assoziiert. Hier zeigte sich, dass unter Applikation von anti-IL17A-Antikörpern die Hautmanifestationen

regredient waren. Hingegen wird bei Abwesenheit von IL-17A eine verstärkte Th1-Differenzierung angenommen, welche die Mortalität der Erkrankung erhöht.^{123,124} Schließlich wird die Expression von IL-17A als wichtig für die frühe Entwicklung T-Zell-mediierter Inflammation angesehen, welche jedoch entbehrlich für die GVHD als Ganzes ist.¹²⁵

1.5.2 Interferon Gamma und Tumornekrosefaktor Alpha

Eine besondere Rolle in der Pathogenese der GVHD nehmen die Zytokine IFN- γ und TNF α ein. Das Auftreten beider Zytokine wird mit einem regulären Beginn der aGVHD und schwerwiegender Erkrankung assoziiert.⁶² IFN- γ ist ein Glycoprotein und einziger Vertreter der Gruppe der Typ 2 Interferone. Die Produktion von IFN- γ wird im Krankheitskontext stark mit der Fraktion der Th1-Zellen assoziiert, jedoch sind auch Th17-Zellen, CTL, NK-Zellen, NKT-Zellen, B-Zellen und APCs zur IFN- γ -Produktion imstande. Hinsichtlich der angeborenen Immunantwort fördert IFN- γ die Abwehr gegenüber Pathogenen, indem es Makrophagen und NK-Zellen aktiviert und diese über verstärkte Expression von Chemokinrezeptoren zu den Infektionsherden lockt. Im Rahmen der adaptiven Immunantwort fördert IFN- γ die Th1-Differenzierung und Proliferation CD8⁺ T-Zellen. Die Wirkung auf die betroffenen Zellen wird über den heterodimeren IFN- γ Rezeptor (IFN γ R) ausgeübt, woraufhin eine Aktivierung des JAK-STAT1-Signalweges die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet verstärkt. Aufgrund der möglichen apoptotischen Wirkung einer zu starken Aktivierung von STAT1 wird die Expression des Teilkette IFN γ R2 nach Zelldifferenzierung heruntergefahren.¹²⁶ In der Pathogenese der aGVHD wird IFN- γ sowohl eine verstärkende als auch protektive Wirkung zugeschrieben. Die verstärkende Wirkung wird über die Expression von Chemokinrezeptoren, MHC- und Adhäsionsmolekülen sowie Sensitivität von Makrophagen und Monozyten gegenüber PAMPs ausgeübt. Aus der vermehrten Expression von MHC-I-Molekülen, Aktivierung und Migration von Makrophagen zu den Inflammationszentren erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und der direkten Wirkung der APCs als Effektorzellen.⁵⁴ Die Affektion des Gastrointestinaltrakts mit Apoptose der Kryptenepithelien wird mit der erhöhten Produktion von IFN- γ durch aktivierte Spender-T-Zellen assoziiert. Zudem stimuliert IFN- γ in diesem Kontext die Produktion von TNF α .^{126,127} Die protektive Funktion von IFN- γ beruht auf der Induktion von Fas-mediierter Apoptose alloreaktiver CD4⁺ Spender T-Zellen. Zudem verhindert die Anwesenheit

von IFN- γ die Ausprägung pulmonaler (i.S.e. Idiopathic Pulmonary Syndrome) und kutaner aGVHD^{63,127}. Dieser Effekt kann auch auf die T-bet -vermittelte Suppression der Th2- und Th17-Zellfraktionen zurückzuführen sein. Weiterhin wird eine IFN- γ -induzierte Stimulation der Expression von PD-L1 in pulmonalem und hepatischem Gewebe beschrieben, welche die dortige aGVHD über Induktion von Apoptose abschwächen.^{97,126}

Das Typ-I-inflammatorische Zytokin TNF α gehört zur TNF-Superfamilie und wirkt über die Bindung an den Rezeptoren TNFR1 und TNFR2.¹²⁸ Es wird als Transmembranmolekül (memTNF) auf der Zelloberfläche von aktivierten Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten (insb. Th1-, Th2-, Th17-Zellen und CTL) sowie NK-Zellen exprimiert. Zudem kann es ebenfalls als lösliches Molekül (solTNF) sezerniert werden.¹²⁹ Ein besonders potenter Induktor von TNF α sind die zu den PAMPs gehörenden Lipopolysaccharide. Die inflammatorischen Funktionen von TNF α bestehen in der Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen, der Rekrutierung von Effektorzellen sowie der Induktion einer Gewebsnekrose am Zielgewebe über Produktion reaktiver Stickstoffspezies.^{54,130,131} Die Sekretion von TNF α wird als essenziell für das Auftreten von aGVHD, jedoch auch GVT-Aktivität beschrieben. Es wird angenommen, dass TNF α neben der Aktivierung von APCs die Aktivierungsschwelle für T-Zellen senkt.⁹⁹ So zeigt sich eine Reduktion der Mortalität im Rahmen der aGVHD bei Abwesenheit von TNF α , spezifisch deren intestinaler und kutaner Affektion. Im Speziellen wird die Suppression des löslichen TNF α mit einer Reduktion der Morbidität und Mortalität bei erhaltener GVT-Aktivität, welche vermutlich über memTNF vermittelt wird, beschrieben.¹²⁹ Eine Erhöhung des TNF α -Spiegels im Patientenserum korreliert mit aGVHD Grad II bis III. Schmalz et al. konnten zeigen, dass alloreaktive bzw. aktivierte CD4⁺ T-Zellen und T-Gedächtniszellen nach Coinkubation mit Fremdanigenen intrazellulär TNF α exprimieren.¹²⁸ Neuere Studien zeigen jedoch ebenfalls eine potenziell protektive bzw. regulatorische Funktion von TNF α über die Induktion von Aktivierung und Proliferation CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs in vivo.¹³² Dieses TNF α -Priming von Tregs basiert auf Stimulation oberflächlich exprimierter TNFR2.¹³³ Über diese Treg-Induktion kann wiederum eine ausufernde Immunantwort reguliert werden.

1.6 B7 Homolog 3 (B7-H3, Syn. CD276)

Das Transmembranprotein B7 Homolog 3, kurz B7-H3 (Syn. CD276), gehört zur B7 Familie, welcher unter anderem PD-L1 (B7-H1), PD-L2 (B7-DC), CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) angehören. Die B7-Moleküle gehören wiederum zur Superfamilie der Immunglobuline (Ig) und interagieren in der Regel als Liganden mit den Rezeptoren der CD28 Protein Familie. Der Rezeptor für B7-H3 wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert, ist derzeit jedoch noch unbekannt.¹³⁴ CD276 wird konstitutiv in vielen Organen von Maus und Mensch, sowie verschiedenen menschlichen Tumorzelllinien exprimiert.¹³⁵ Humanes CD276 wird zudem auf dendritischen Zellen, Monozyten und T-Zellen durch unterschiedliche Stimuli wie IFN- γ , weitere proinflammatorische Zytokine, GM-CSF, oder Phorbol Myristate Acetate (PMA)/Ionomycin (insb. für Expression auf T-Zellen) exprimiert. Anzumerken ist hier, dass die immunregulatorischen Tregs B7-H3 nicht exprimieren.¹³⁶ Strukturell zeichnet sich die Ig-Superfamilie im Aufbau mit konstanten (C) und variablen (V) Domänen bzw. Ketten aus. Die die gängigste Form der extrazellulären Domäne folgt dem vierfachen Aufbau gemäß IgV-IgC-IgV-IgC. Auch CD276 ist entsprechend aufgebaut, mit Ausnahme einer humanen Isoform mit lediglich einer V- und einer C-Domäne.¹⁰² Die Ektodomäne des murinen B7-H3 besteht nur aus einem IgV-IgC Domänenpaar.¹⁰³ In der Maus finden sich B7-H3-Transkripte in verschiedenen Gewebetypen, so bspw. in Gehirn, Lunge, Kolon, Niere und Milz.¹³⁷

Die Funktion von CD276 ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Der Ligand für CD276 ist bis heute nicht bekannt. Sharpe und Freeman fassen 2002 die Funktion neuerer B7-Moleküle als wichtig für die Regulation der Antworten nicht-naiver T-Zellen zusammen.¹⁰² Insgesamt werden B7-H3 sowohl costimulatorische als auch coinhibitorische Eigenschaften zugeschrieben. Im Rahmen der Zellaktivierung soll es die selektive Produktion von IFN- γ und die Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie spezifisch die Induktion von CTL, stimulieren.^{134,138,139} Dem stehen mehrere Studien gegenüber, die eine inhibitorische Rolle von humanem und murinem B7-H3 mit Hemmung der T-Zell Proliferation beschreiben.^{135,140-142} Veenstra et al. zeigen bei GVHD nach allogener HSCT im MHC-Mismatch eine vermehrte Expression von CD276 in den Zielorganen und eine damit einhergehende verminderte T-Zell-Proliferation und Letalität der GVHD.¹³⁶

1.7 Fragestellung

Es zeigt sich, dass die Graft-Versus-Host Disease, insbesondere die akute Verlaufsform, aufgrund ihrer Mortalität bzw. sogar Letalität weiterhin einen limitierenden Faktor für den potenziell kurativen Therapieansatz der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation darstellt. Da die Konditionierung im Rahmen der allogenen HSCT eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung einer aGVHD durch Schädigung des Empfängerorgans schafft, müssen Wege gefunden werden diese Erkrankung therapeutisch zu kontrollieren. Bei Manifestation der aGVHD wird der derzeitige Therapiestandard weiterhin durch die Applikation hochdosierter systemischer Glukokortikoide gebildet, während eine uneinheitliche Anwendung von immunsuppressiven Zweitlinientherapeutika besteht. Bei den hohen Raten an steroidrefraktären und teilweise sogar -resistenten aGVHDs und der mit systemischen Glukokortikoiden einhergehenden Toxizität, muss der Fokus auf prophylaktischen Therapieansätzen liegen. Eine effektive Prävention der Ausbildung einer aGVHD kann durch die Modulation des Transplantates erreicht werden. Ein Vorteil gegenüber einer medikamentösen Prophylaxe zeigte sich auch in der schnelleren Erholung der Neutrophilen, Reduktion schwerer aGVHD und Toxizität sowie kürzerer Krankenhausaufenthalte.⁴⁷ Insbesondere die Depletion naiver T-Zellen resultierte bereits in einem milderem Verlauf der auftretenden aGVHD ohne Erhöhung der Rezidivrate, zudem gutem Glukokortikoid-Ansprechen und schneller Immunrekonstitution. Die weiterhin unveränderte Inzidenz der aGVHD könnte auf im Graft verbleibende alloreaktive T-Gedächtniszellen (Memory T-Zellen) zurückzuführen sein. Für diese wird ein niedriger Aktivierungs-Threshold¹⁴³ sowie das Vermögen der Auslösung einer GVHD¹⁴⁴ beschrieben. Eine Untersuchung von Davis et al. konnte zeigen, dass die CD276-Expression mit einer Erhöhung der Memory T-Zellen korreliert.¹⁴⁵ Auch wird u.a. für die Expression von CD276 eine einhergehende spezifische Produktion des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ , die Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und die Induktion von CTL beschrieben. Zudem wird das Transmembranprotein auf aktivierten T-Zellen und nicht auf GVHD-regulierenden Tregs exprimiert.

Diese Arbeit will die Frage beantworten, ob durch die zusätzliche Depletion der CD276-exprimierenden Zellen aus dem CD4⁺CD45RA^{neg} PBMC-Transplantat das Auftreten der aGVHD, bei weiterhin bestehender GVT-Aktivität (hier als Third Party Reaktivität *in vitro* simuliert) und Immunität hinsichtlich latenter viraler Infektionen (als Immunantwort

gegen CMV- bzw. EBV-Peptide gezeigt), reduziert werden kann. Von besonderem Interesse sind dabei auch Änderungen des Zytokinmilieus *in vitro* und der auftretenden T-Helferzellen *in vitro* und im Mausmodell.

Unter der Hypothese, dass die zusätzliche Depletion von CD276⁺ Zellen aus dem CD4⁺CD45RA^{neg} Transplantat Inzidenz und Schwere der aGVHD reduzieren, wurden Untersuchungen im Mausmodell und im *In-vitro*-Versuchsaufbau durchgeführt. Im Mausmodell wurden drei verschiedene Transplantationsschemata (CD4⁺ Zellen = Bulk, CD4⁺CD45RA^{neg} Zellen = Memory, CD4⁺CD45RA^{neg}CD276^{neg} Zellen = Double Depleted bzw. CD276^{neg} Memory) als HLA-Mismatch und HLA-Match in der human-MHC-Klasse-II transgenen NSG-Ab⁰ DR4 Maus untersucht. *In vitro* wurden insgesamt drei Spender-Empfänger-Paarungen im kompletten HLA-Mismatch nach doppelt depletierem Transplantationsschemata in der Mixed Lymphocyte Culture (MLC) untersucht. Gegenstand meiner Arbeit sollte die funktionelle und molekulare Charakterisierung der alloreaktiven T-Zellen im antigenerfahrenen T-Zellkompartiment nach CD276-Depletion sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborzubehör

Kryo-Lagerungsfläschchen	CryoTube™/Nalgene® 1,8 ml Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Kryo-Gefrierbehälter	Mr. Frosty™/Nalgene® Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
PCR-Platten	0,2 ml 96-well, farblos, halber Rahmen Brand, Wertheim, Deutschland
PCR Platten Film	Microseal® B, adhäsiv, optisch Kat. Nr.: MSB1001 Bio-Rad, München, Deutschland
PCR Reaktionsgefäße	0,2 ml 8-Tube PCR Strips, low profile, clear 0,2 ml 8-Tube PCR Strips, low profile, white Bio-Rad, München, Deutschland
PCR Reaktionsgefäß-Caps	0,2 ml Domed PCR Tube 8-Cap Strips, clear 0,2 ml Flat PCR Tube 8-Cap Strips, optical, ultra-clear Bio-Rad, München, Deutschland
Pipettenspitzen	SurPhob SafeSeal® Low Binding, graduiert 10 µl, extra lang, steril (Art.-Nr.: VT0200) 100 µl, steril (Art.-Nr.: VT0230) Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland TipOne® UltraPoint Filterspitze, graduiert 20 µl, steril (Kat.-Nr.: S1123-1810) Starlab, Hamburg, Deutschland
Pasteurpipetten	ISO 7712, Natron-Kalk-Glas Wilhelm Ulbrich GdbR, Bamberg, Deutschland
Reagenzgläser	

Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Stripetten	Corning® Costar® Stripette® 10 ml, 25 ml Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Styroporschalen	
Trockeneis	
Untersuchungshandschuhe	Nitril texturiert, puderfrei Art. No.: 290420 Abena, Oberderdingen-FleHINGen, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	
Zellkulturplatten	Cellstar®, 96 Well, sterile, flat bottom, lid Kat.-Nr.: 655180 Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland Corning® Costar®, 48 Well, sterile, flat bottom, lid Mfr.-Nr.: 3548 Corning® Costar®, 24 Well, sterile, flat bottom, lid Mft.-Nr.: 3527 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Greiner centrifuge tubes 15 ml, 50ml Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2.1.2 Geräte	
Abzug	Herasafe™ HS 12 Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank	Heracell™ Heraeus, Hanau, Deutschland
Bestrahlungsvorrichtung	Gammacell 1000 Elite MDS Nordion, Ottawa, Kanada

Durchflusszytometer	BD FACSCanto™ 10-Color Configuration Kat. Nr.: 657338 BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland BD LSR II BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Homogenisatoren	DIAX 900 Heidolph, Schwabach, Deutschland HG-15D, HT1008 witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland
Kapillarelektrophorese-System	ABI PRISM® 3130xl Kat. Nr.: 4359571 Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Mikroskop	IX50 Olympus, Hamburg, Deutschland
Pinzetten	Pinzette spitz 18/8 Bochem, Weilburg, Deutschland
Pipetten	Pipetman P2, P10, P20, P100, P1000 Gilson, Limburg, Deutschland
Pipettierhelfer	accu-jet® pro Brand, Wertheim, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000 Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Thermozykler	GeneAMP® PCR System 9700 Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland CFX96™ real time System, C1000™ Bio-Rad, München, Deutschland
Tiefkühlschrank	Forma™ -86°C 926 Serie

	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	Wasserbad Typ 3042 Köttermann, Uetze, Deutschland Wasserbad WNB 45 Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen	Centrifuge 5424 R Eppendorf, Hamburg, Deutschland Rotanta 46 RSC (Cat. No.:4817-11) Rotixa 50 RS Typ 4910 Hettich, Tuttlingen, Deutschland Biofuge fresco Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

BFA	eBioscience™ Brefeldin A Solution (1000x) Kat. Nr.: 00-4506-51 Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
DMSO	CryoSure-DMSO Kat. Nr.: WAK-DMSO-50 WAK Chemie Medical, Steinbach/Ts., Deutschland
Ficoll	Biocoll mit 10mM HEPES Kat. Nr.: L6715 Biochrom, Berlin, Deutschland
Monensin	BD GolgiStop™ (Proteintransportinhibitor) Kat. Nr.: 554724 BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
JumpStart™Taq ReadyMix™	Kat. Nr.: P2893 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Lyse Puffer	BD Pharm Lyse™

	Kat. Nr.: 555899 Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Art. Nr.: D8537 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PMA/Ionomycin	eBioscience® Cell Stimulation Cocktail (500x) Kat. Nr.: 00-4970-03 Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640	Kat. Nr.: F 1215 Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Art. Nr.: P4333 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin	Art. Nr.: G7513 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetal Bovine Serum	Gibco™ Fetal Bovine Serum Kat./Art.-Nr.: 11533387 Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Size Standard	GeneScan™ 600 LIZ™ dye Kat. Nr.: 4366589 Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Farbstoffe	Trypan Blue solution Kat. Nr.: T8154 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland Zombie Aqua™ Live/Dead Stain Kat. Nr.: 423101 BioLegend, San Diego, USA
Antikörper	PerCP anti-human CD3 Kat. Nr.: 344814 BioLegend, San Diego, USA

Alexa Fluor® 700 anti-human CD3
Kat. Nr.: 300424
BioLegend, San Diego, USA
Brilliant Violet 785™ anti-human TNFα
Kat. Nr.: 502947
BioLegend, San Diego, USA
PE anti-human IFNγ
Kat. Nr.: 506506
BioLegend, San Diego, USA
PerCP anti-human CD4
Kat. Nr.: 344624
BioLegend, San Diego, USA
PE/Cy7 anti-human Ki-67
Kat. Nr.: 350525
BioLegend, San Diego, USA
APC anti-human CD69
Kat. Nr.: 310910
BioLegend, San Diego, USA
Alexa Fluor® 647 anti-human IL-17A
Kat. Nr.: 512309
BioLegend, San Diego, USA
APC anti-human IL-4
Kat. Nr.: 500714
BioLegend, San Diego, USA
Alexa Fluor® 647 anti-human IL-10
Kat. Nr.: 501414
BioLegend, San Diego, USA
APC anti-human IL-13
Kat. Nr.: 501907
BioLegend, San Diego, USA
PE anti-human CD276
Bestellnr.: 130-095-525

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

VioBlue anti-human CD4

Bestellnr.: 130-097-333

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

VioBright FITC anti-human CD137

Bestellnr.: 130-104-565

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

BUV737 anti-human CD279 (PD-1)

Kat. Nr.: 565299

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

BUV661 anti-human HLA-DR

Kat. Nr.: 565073

BD Biosciences, Heidelberg Deutschland

BUV395 anti-human CD25

Kat. Nr.: 564034

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

APC-H7 anti-human CD8

Kat. Nr.: 560179

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

BV421 anti-human CD276

Kat. Nr.: 565829

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

APC anti-human IL-5

Kat. Nr.: 554396

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

FITC anti-human CD3

Kat. Nr.:340542

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

PE anti-human CD45RO

Kat. Nr.: 561889

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

PE-Cy7 anti-human CD45RA

Kat. Nr.: 337186

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.1.4 Molekularbiologische Kits

Kit zur Isolierung von RNA

RNeasy Mini Kit

Kat. Nr.: 74104

Qiagen, Hilden, Deutschland

RNeasy Micro Kit

Kat. Nr.: 74004

Qiagen, Hilden, Deutschland

Kit zur Synthese von cDNA

SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix

Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

Kat Nr.: 18080400

Kit zum Fixieren und

Permeabilisieren von Zellen

FIX&PERM®

Nordic MUBio, Susteren, Niederlande

Kat. Nr.: GAS-002-1

Magnetic Assisted Cell Sorting

CliniMACS® CD45RA Reagent

Bestellnr.: 200-070-146

Anti-PE MicroBeads

Bestellnr.: 130-048-801

Anti-PE MicroBeads UltraPure

Bestellnr.: 130-105-639

LD-Columns

Bestellnr.: 130-042-901

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

2.2 Methoden

Der Versuchsaufbau umfasste Untersuchungen im Mausmodell und in vitro Untersuchungen in der Mixed Lymphocyte Culture.

2.2.1 Transplantation humaner CD4⁺ T-Zellen in NSG-Ab⁰ DR4 Mausmodell

Die Aufzucht der Mäuse, die Transplantation der T-Zellgrafts und die Präparation der Organe wurde durch Hisayoshi Hashimoto (AG Schilbach) durchgeführt. Zur Ausbildung einer humanen allogenen GVHD im Mausmodell wurden 12 bis 24 Wochen alte weibliche NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}H2-Ab1^{tm1Doi}Tg(HLA-DRB1)31Dmz/SzJ (NSG-Ab⁰ DR4)¹⁴⁶ Mäuse vom Jackson Laboratory gekauft. Die Mäuse wurden in Single-Airflow-Käfigen unter pathogenfreien Bedingungen gehalten, die Tierexperimente entsprachen den gängigen Standards der Ethik-Kommission und dem Tierschutz-Komitee der Universität Tübingen (Genehmigungs-Nummern: K01/17, K05/18, K04/19G). Den Mäusen wurde jeweils einer von drei verschiedenen Grafts injiziert (4×10^6 Zellen/Maus): HLA-DR^{negative} oder HLA-DR^{positive} (1) Bulk bzw. undepletierte CD4⁺ T-Zellen, (2) CD45RA-depletierte CD4⁺ Memory T-Zellen, (3) CD45RA/CD276-depletierte CD4⁺ T-Zellen. Zur Herstellung der T-Zellgrafts wurden zunächst CD4⁺ bzw. CD45RA^{neg} Memory CD4⁺ T-Zellen isoliert. Die isolierten CD4⁺ Memory T-Zellen wurden in vitro in der MLC mit bestrahlten (80 Gy) DR4-Maus-PBMCs stimuliert und im Anschluss (Tag 4 der MLC) CD276⁺ Zellen depletiert. Als klinische Parameter der GVHD wurden oben genannte Parameter (vgl. 1.2.2) exklusive Diarrhö herangezogen und jeweils auf einer Skala von 0 bis 2 gewertet. Ein erfolgreiches Engraftment wurde als >5% humane Zellen in gesamten PBMCs definiert. Die Mäuse wurden bei einem Einzelscore von 1.5, Gesamtscore von >4 oder ab Tag 100 eingeschläfert und direkt präpariert. Mäuse mit ausbleibendem Engraftment bis Tag 35 wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.¹⁴⁷

2.2.2 Histologische Untersuchung der murinen Organgewebe

Die murinen Gewebe (Leber, Lunge, Kolon) wurden durch Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend erfolgte die histologische Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und immunhistochemische Färbung von CD3⁺ Zellen, mit murinem anti-human CD3 Antikörper (Dako; CD3-Färbung). Die Präparate wurden von Friederike Müller (Universitätsklinikum Tübingen, Institut für Pathologie und Neuropathologie) angefertigt. Die histologischen Präparate wurden lichtmikroskopisch (Zeiss Axiovert 135) in verschiedenen Vergrößerungen (Objektiv: Zeiss Achromplan 20x/0,4 Korr Ph2, Zeiss Achromplan 10x/0,25 Korr Ph1; Linse: Zeiss Okular E-PL 10x/20) ausgewertet. Die Zuordnung und morphologische Untersuchung der Organe erfolgte anhand der HE-Präparate, die T-Zellinfiltration wurde mit den CD3-Färbungen bestimmt. Fotos wurden

mit einer Canon Eos 550 über einen Telekonverter (Kenko Teleplus MC4 DGX 1.4x C-AF) aufgenommen. Pro Transplantationskohorte (Bulk, Memory, Double Depleted bzw. CD276^{neg} Memory) wurden Organgewebe von jeweils zwei Mäusen betrachtet, die Aufnahme in Quadranten unterteilt und die CD3-markierten Zellen ausgezählt. Aus den zwei Werten pro Kohorte pro Organ wurde der Mittelwert gebildet.

2.2.3 Disruption und Homogenisierung der Mausgewebe

Die murinen Gewebeproben (Haut, Lunge, Leber, Kolon) wurden mittels eines Homogenisators (Heidolph DIAX 900; witeg HG-15D) zerrissen (Disruption) und homogenisiert. Disruption beschreibt hier den Vorgang der Zerstörung der Zellwände, Plasmamembranen und Zellorganellen zur Freisetzung von möglichst viel RNA. Die darauffolgende Homogenisierung reduziert die Viskosität und schafft dadurch ein homogenes Lysat. Aufgrund der Nutzung eines Homogenisators entspricht Disruption und Homogenisierung einem Vorgang. Mehrere Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml Volumen; Anzahl entsprechend untersuchten Gewebeproben) wurden mit jeweils 700 µl β -RLT (entspricht β -Mercaptoethanol in RLT-Puffer) präpariert. Beta-RLT ist ein hochmolarer Lysepuffer, der chaotrope Salze enthält. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol führt zur sofortigen Denaturierung der Proteine und damit zur Verhinderung der Degradation der RNA. Nach Zugabe von ca. 30 mg tiefgefrorener Gewebeprobe pro Reaktionsgefäß wurde unter den adäquaten Sicherheitsvorkehrungen (unter Abzug, Kittel, Handschuhe, Mundschutz, Schutzbrille) das Gewebe für ca. 15 s auf Stufe 2 des Homogenisators lysiert. Das Lysat wurde nach jedem Vorgang auf optisch gleichmäßige Trübung des Inhaltes geprüft, bei weiterhin flottierenden Gewebestandteilen wurde der Vorgang wiederholt. Zudem erfolgte die Reinigung der Spitze des Homogenisators in der Abfolge mit H₂O, 70% EtOH, H₂O zur Vermeidung der Verunreinigung des nächsten Reaktionsgefäßes. Lysierte Proben wurden auf Eis gelegt, die verbliebenen Gewebeproben auf Trockeneis gelagert.

Die Gewebelysate wurden für 5 min bei 500×g zur Absetzung der festen Bestandteile am Boden (Pellet) zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5424 R). Insgesamt 600 µl des Überstandes wurden abpipettiert und für die weiteren Untersuchungen tiefgekühlt bei 80°C gelagert, Pellets wurden verworfen.

Der anfangs verwendete Homogenisator DIAx 900 von Heidolph (19 Jahre im Gebrauch) musste nach Homogenisierung der ersten 7 Gewebeproben aufgrund eines nicht näher definierbaren Schadens gegen das Gerät HG-15D der Firma witeg ausgetauscht werden.

2.2.4 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde gemäß Herstellerprotokoll (RNeasy Mini Kit) durchgeführt. Zur Vermeidung von RNA-Kontamination mit RNasen wurden Mundschutz, Handschuhe und Kittel getragen sowie mit speziell ausgewiesenen Geräten zur RNA-Isolation gearbeitet.

Schritt 1: Nach Auftauen der tiefgefrorenen Gewebelysate für 2 Minuten im Wasserbad (37°C) wurde der Inhalt (600 µl) jeweils in einen QIAshredder mit Sammelgefäß (2 ml Volumen) pipettiert und für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang entfernt unlösliche Materialien, erhöht die Viskosität und damit die RNA-Ausbeute. Im Anschluss wurde der QIAshredder verworfen, jedes Sammelgefäß mit 600 µl Ethanol aufgefüllt (Volumen gesamt ca. 1200 µl) und mittels Pipette durchmischt. Ethanol verbessert die Bedingungen einer Bindung der RNA an die Membran der RNeasy Spin Column, da es die RNA fällen lässt.

Schritt 2: 600 µl dieser Probe wurden in jeweils eine RNeasy Spin Column mit Sammelgefäß pipettiert und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und Schritt 2 erneut mit dem restlichen Lysat (ca. 600 µl) wiederholt. Folgender Schritt diente der Reinigung der Membran der RNeasy Spin Column von Nicht-RNA-Bestandteilen.

Schritt 3: RNeasy Spin Columns wurden mit 700 µl RW1 Puffer für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, das Sammelgefäß durch ein neues ersetzt und der Vorgang mit 500 µl RPE-Puffer wiederholt (Zentrifuge 1 min, 10.000 rpm; Durchfluss verwerfen). Danach erneute Zentrifugation mit 500 µl RPE-Puffer für 2 min bei 10.000 rpm.

Schritt 4: Zur Eliminierung des restlichen RPE-Puffers wurde das alte Sammelgefäß samt Inhalt verworfen, durch ein neues ersetzt und die RNeasy Spin Column für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Schritt 5: Im finalen Schritt wurde die Spin Column in ein 1,5 ml Sammelgefäß platziert und 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der Spin Column pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und danach für 1 min bei 10.000 rpm zur Eluierung

der RNA zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Reinheitsbestimmung und Lagerung (-80°C). Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA wurden anhand Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm spektralphotometrisch bestimmt. Ein Wert von 2,0 des Verhältnisses der Absorptionsmaxima 260 nm:280 nm entsprach einem hohen Reinheitsgrad der Probe.

2.2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde gemäß Herstellerprotokoll (SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix) durchgeführt.

Schritt 1: Es wurden jeweils 3 µl der zuvor isolierten RNA-Proben in je ein PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml Volumen) pipettiert und auf Eis gelagert. Nicht verwendete RNA-Proben wurden sofort wieder tiefgekühlt (-80°C).

Schritt 2 Jedem Reaktionsgefäß wurden 0,5 µl Primer (50µM oligo(dT)₂₀) und 0,5 µl Annealing Buffer hinzugefügt. Wir setzten zur gleichmäßigen Konzentration bzw. Verteilung der Reagenzien einen Mastermix an, der mit 1 µl pro Reaktionsgefäß pipettiert und vermischt wurde (danach Volumen pro Reaktionsgefäß 4 µl).

Schritt 3 Nach kurzer Zentrifugation wurden die Reaktionsgefäße im vorgeheizten Thermozykler (65°C) für 5 min inkubiert und anschließend sofort 1 min auf Eis gekühlt.

Schritt 4 Es wurde ein Mastermix mit 5 µl 2X First-Strand Reaction Mix und 1 µl SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix pro Reaktionsgefäß angesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 10 µl hinzupipettiert und vermischt.

Schritt 5 Die Reaktionsgefäße wurden erneut kurz herunterzentrifugiert und im Thermozykler platziert. Dort erfolgte die cDNA-Synthese über 50 min bei 50°C, das Reaktionsende wurde durch eine Erhitzung auf 85°C für 5 min herbeigeführt. Das Produkt wurde bei -20°C gelagert.

2.2.6 Quantitative Real-time PCR (real-time qPCR)

Die real-time qPCR ermöglicht die Quantifizierung der gewonnenen DNA-Produkte über fluoreszierende Agenzien. Die Methode wurde zur Darstellung der Expression der charakteristischen Transkriptionsfaktoren (T-bet, Eomes, GATA-3, RORγt bzw. dessen kodierenden Gen RORC, FoxP3) der T-Zellsubpopulationen verwendet. Vorbereitend erfolgte die Bestimmung der cDNA-Konzentration und das Ansetzen von zwei Mastermixen. Aufgrund der Verdünnung der RNA im cDNA-Ansatz (s. oben) wurde die vorhandene cDNA-Konzentration über die Multiplikation der RNA-Konzentration mit dem

Faktor 0,3 ermittelt. Das cDNA-Sample wurde auf 10 ng/ml mit H₂O verdünnt. Inhalt von Mastermix 1 waren Forward- und Reverse-Primer der Transkriptionsfaktoren und des sog. Household-Gens GAPDH (wird in jeder Zelle zu etwa gleichen Anteilen expriert) sowie H₂O, Verhältnis 1:1:20. Davon wurden 2 µl pro Well einer Mikotiterplatte pipettiert. Mastermix 2 enthielt die verdünnte cDNA und das Agens GoTaq® SYBR Green 2x im Verhältnis 1:1. SYBR Green ist ein fluoreszierender Farbstoff im Rahmen der PCR nur in dsDNA interkaliert und damit deren detektierbare Fluoreszenz erhöht. Davon wurden 8 µl pro Well auf ein Gesamtvolumen von 10 µl pipettiert. Angesetzte PCR-Reaktionsgefäße wurden für 30 s bei 400×g zentrifugiert und folgend die real-time qPCR im CFX96™ real time System (Bio-Rad) durchgeführt.

2.2.7 V α Spectratype des TCR-Repertoires

Die Analyse der TCR-Repertoires erfolgte über Spectratyping der V-Region der α -Kette (TRAV)¹⁴⁸. Dafür wurden jeweils 10 µl eines cDNA-Gewebesamples, des Agens JumpStart™, PCR H₂O, sowie eines Reverse-Primers (vgl. Tabelle 5) und einer Forward-Primer Kombination K1-K11 (vgl. Tabellen 4, 6) in ein Reaktionsgefäß (0,2 ml Volumen) pipettiert. Zur Amplifikation mittels PCR wurden die K3-K11 enthaltenden Reaktionsgefäße im Thermozykler erwärmt (insgesamt 40 Zyklen), K1 und K2 durchliefen aufgrund einer anderen Annealing-Temperatur einen leicht abweichenden Zyklus in einem zweiten Gerät (s. Ablauf Thermozykler, Tabelle 3). Ein Aliquot der ersten PCR wurde im nächsten Schritt als Matrize für eine zweite PCR im Sinne einer nested PCR verwendet. Dieses Verfahren dient der Generierung hochspezifischer DNA durch erneute Amplifikation bereits amplifizierter Sequenzen. Das Aliquot der ersten PCR wurde mit JumpStart™, einem fluoreszierenden Reverse-Primer (sog. FAM-Labeled Reverse Primer) und einer Forward-Primer Kombination, alle zu je 10 µl, im Reaktionsgefäß (0,2 ml Volumen) angesetzt. Darauf folgte die Platzierung der Ansätze im Thermozykler für 3 Zyklen (vgl. Tabelle 3). Die endgültig amplifizierten Sequenzen für die Analyse über Kapillarelektrophorese vorbereitet. Jeweils 14 µl eines Mastermix aus High-Di™ Formamid und Size Standard 600LIZ wurden pro Well einer PCR-Platte pipettiert und mit 1 µl des zweiten PCR-Produktes auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt. Die Analyse erfolgte über das Kapillarelektrophorese-System ABI PRISM® 3130xl (Thermo Fisher Scientific).

Tabelle 3. Ablauf der Phasen des Thermozyklers zur Durchführung der PCR.

Ablauf PCR Thermozykler

Dauer	Temperatur	F-Primer Komb.	Vorgang
2 min	94°C	K1-K11	Denaturierung
30 s	94°C	K1-K11	Zyklus mit Primerhybridisierung und Amplifikation
30 s	55°C/59°C	K1, K2/K3-K11	
30 s	72°C	K1-K11	
5 min	72°C	K1-K11	Terminierung der PCR

Anmerkung: Nur der Zyklus wird mehrmals wiederholt. Der Unterschied zwischen K1, K2 und K3-11 ist fett gedruckt. F-Primer Komb. = Forward-Primer Kombination.

Tabelle 4. Charakterisierung der Forward-Primer.

Forward-Primer

V α Familie	Primer Sequenz	TRAV Segment
1A	TCTGGTATGTGCAATACCCCAACC	8-4 8-6
1B	CTGAGGAAACCCTCTGTGCA	8-1 8-3
2	GATGGAAGGTTTACAGCACAGCTC	12-1 12-2 12-3
3	CACAGTGGAAGATTAAGAGTCACGC	17
4A	AACAGAATGGCCTCTCTGGC	26-2
4B	GGATTGCGCTGAAGGAAGAG	26-1
5	TGAAGGTCACCTTTGATACCACCC	6
6	AATCCGCCAACCTTGTCATCTCCG	14DV4
7	AACTGCACGTACCAGACATC	1-1 1-2
8	ACCCTGAGTGTCCAGGAGGG	13-1 13-2
9	CACTGCTGACCTTAACAAAGGCG	16
10	TCCTGGTGACAGTAGTTACG	27
11	AGGCTCAAAGCCTTCTCAGCAGGG	2

12	TCCACCAGTTCCTTCAACTTCACC	19
13	TTCATCAAAACCCTTGGGGACAGC	22
14	CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTT	38-1 38-2DV8
15	GGATAAACATCTGTCTCTGCG	5
16	AAGGGAATCCTCTGACTGTG	3
17	GATAGCCATACGTCCAGATG	23DV6
18	TGCCACTCTTAATACCAAGGAGGG	24
19	ACACTGGCTGCAACAGCATC	41
20	TTACAAACGAAGTGGCCTCC	4
21	ACCTGCTGAAGGTCCTACATTCC	29DV5
22	CTTGGAGAAAGGCTCAGTTC	9-2
23	TGCCTCGCTGGATAAATCATCAGG	21
24	TCCCAGCTCAGCGATTCAGCCTCC	10
25	GTCCTGTCCTCTTGATAGCC	35
26	AGCCCAGCCATGCAGGCATCTACC	34
27	TTGATACCAAAGCCCGTCTC	39
28	GAACATCACAGCCACCCAGACCGG	36DV7 25
29	GCAAAGCTCCCTGTACCTTACGG	30
30	TTTCTGCACATCACAGCCCC	20
31	AGCAAAAACCTTCGGAGGCGG	40
32	AAGGAGAGGACTTCACCACG	25

Tabelle 5. Charakterisierung der Reverse-Primer.

Reverse-Primer

Name	Primer-Sequenz (FAM-gelabelt)
TCA4	GTTGCTCTTGAAGTCCATAGACC
TCRAC	5'FAM-GCAGACAGACTTGTCCTGG-3'

Tabelle 6. Zusammensetzung der Primerkombinationen.

Primerkombinationen

Kombination	V α Familien
-------------	---------------------

1	10, 15, 16, 20
2	7, 17, 22, 27
3	1A, 3, 6
4	2, 8, 29
5	4A, 19, 30
6	1B, 13, 32
7	5, 14, 28
8	23, 25, 26
9	9, 21, 24
10	11, 12, 31
11	4B, 18

2.2.8 Testung repetitiver Depletion CD276⁺ Zellen in der Mixed Lymphocyte Culture

Zu dem Versuchsaufbau im Mausmodell wurde die Reaktion der T-Lymphozyten auf repetitive Depletion CD276⁺ Zellen in vitro als Mixed Lymphocyte Culture getestet. Die MLC ermöglicht die Testung von Spender-Empfänger-Kombinationen über die Kultivierung von isolierten Lymphozyten zwei verschiedener Individuen. Durch Erkennung von Fremdantigenen bei HLA-Mismatch kommt es zur Aktivierung von Lymphozyten, Proliferation und damit einhergehender Zytokinausschüttung im Sinne einer Mixed Lymphocyte Reaction (MLR). Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde dem GVHD-Setting Rechnung getragen, indem die Empfängerzellen mit einer letalen Strahlendosis von 80 Gy funktionsunfähig gemacht wurden und ausschließlich als Fremdantigene bzw. Stimulatoren für die Spenderzellen agierten (sog. One-Way-Reaction). Als Zellgrundlage der MLC dienten isolierte Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) von 6 volljährigen, nicht-verwandten Testpersonen unterschiedlichen Alters und Geschlechts, woraus drei Spender-Empfänger-Kombinationen bzw. MLCs gebildet wurden. Die MLCs wurden über einen Zeitraum von 38-40 Tagen kultiviert (s. Abb. 4). An Tag 0 erfolgte die einmalige Depletion CD45RA positiver Zellen und ab Tag 4 bis Tag 31 alle 7 Tage die Depletion CD276⁺ Zellen. Jede MLC wurde 5-mal depletiert, dabei wurde jeweils der vorherige Zustand als Well bis zur abschließenden FACS-Analyse an Tag 38 bzw. 40 weiterhin kultiviert und stimuliert. Folglich wurden folgende Depletionsansätze (n=6, s. Abb. 4) pro MLC analysiert: nicht depletiert (Tag 0), 1-mal depletiert (Tag 4), 2-mal

depletiert (Tag 11), 3-mal depletiert (Tag 18), 4-mal depletiert (Tag 24) und 5-mal depletiert (Tag 31). Nach jeder Depletion wurden die Spenderzellen erneut mit Empfängerzellen und Interleukinen 2 (Konz. 100 U/ml) und 7 (Konz. 1 ng/ml) stimuliert und im Brutkasten inkubiert. Die verwendeten Spender- und Empfängerzellen pro Depletionsansatz wurden in jeweils 1 ml RPMI gelöst, betragen mindestens 1×10^6 Zellen/ml und wurden im Verhältnis 1:1 pro Well einer 24-Well Platte pipettiert.

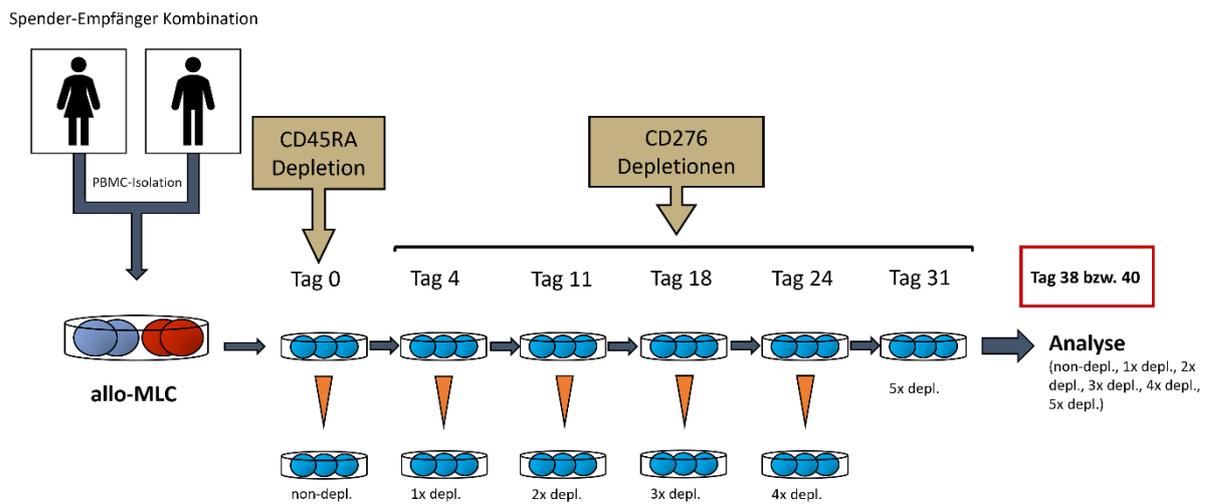


Abbildung 4. Schematische Darstellung Mixed Lymphocyte Culture. Isolierte PBMCs von Spender- und Empfänger wurden als MLC im Sinne einer mismatched unrelated HSCT gemischt. An Tag 0 erfolgte die Depletion CD45RA⁺ Zellen, an den Tagen 4, 11, 18, 24, 31 wurden CD276⁺ Zellen depletiert. Ein Well jedes Depletionsansatzes wurde unverändert bis zum Tag der Analyse (Tag 38 bzw. 40) kultiviert und somit alle Depletionsansätze (non-depl. bis 5x depletiert) gleichzeitig analysiert. Anmerkung: Spender-Empfänger Kombinationen wurden unabhängig vom Geschlecht der Spender gebildet.

Tabelle 7. Zentrifugationsprogramme.

Zentrifugationsprogramme MLC

Programm Nr.	Temperatur [°C]	1-9 min:s	0-9 min:s	RZB	Zeit [min]	Bezeichnung
1	20	9	0	800	15	Ficoll
2	20	9	9	660	2	FACS-Röhrchen
3	20	9	9	400	6	Waschen
4	37	9	9	200	10	Auftauen
5	20	9	9	150	10	nach Lyse Puffer
7	8	9	9	300	10	MACS Waschen
15	20	9	9	300	5	Intrazelluläres Staining

Anmerkung: RZB=Relative Zentrifugalbeschleunigung.

2.2.9 Präparation und Wechsel des RPMI-Mediums

Präparation und Wechsel des Mediums wurde zur Vermeidung von Kontamination unter dem Abzug durchgeführt.

Präparation: Zur Präparation des Zellkulturmediums (vgl. Tabelle 8) wurde FBS vor der Verwendung für 10 min im Wasserbad (37°C) vorgewärmt. Nach Verwendung wurden die Substanzen wieder im Gefrierschrank (-20°C) gelagert.

Wechsel: Vor dem Wechsel wurde das benötigte präparierte Medium erneut im Wasserbad vorgewärmt und anschließend mit IL-2 (Konz. 100 U/ml) und IL-7 (Konz. 1 ng/ml) versetzt. Die Hälfte des alten Mediums wurde pro Well vorsichtig abpipettiert und durch das neue Medium ersetzt. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 3-4 Tage zwischen den CD276-Depletionen.

Tabelle 8. Präparation des Zellkulturmediums.

Präparation RPMI-Medium	
Präparat	Volumen
RPMI 1640	500 ml
Fetal Bovine Serum (FBS)	50 ml
Penicillin-Streptomycin	5 ml
L-Glutamin	5 ml

2.2.10 PBMC-Isolation

PBMCs wurden mittels Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer-Protokoll (Ficoll-Paque) aus 100 ml Frischblut von nicht-verwandten Spendern (n=6), nach vorheriger schriftlicher Einwilligung, isoliert (Nummer Ethikkommission: 880/2017BO2). Die venöse Blutentnahme erfolgte per Safety-Multifly®-Kanüle (Sarstedt AG & Co.) aus der Vena mediana cubiti in mit Heparin beschichtete Einmalspritzen (50 ml Volumen). **Schritt 1:** Das Frischblut wurde mit 110 ml PBS verdünnt und jeweils 35 ml der Verdünnung in ein mit 15 ml Ficoll-Copolymer präpariertes Falcon™ Zentrifugenröhrchen (50 ml

Volumen; engl. tube) pipettiert. Das Zentrifugenröhrchen muss anfangs fast waagrecht gehalten werden und das verdünnte Blut darf nur langsam auf das dichtere Ficoll-Copolymer tropfen und sich darauf sammeln. So wird eine Vermischung vermieden.

Schritt 2: Nach genauem Austarieren (Unterschied muss 0,000 g betragen) werden die Röhrchen auf Programm 1 (vgl. Tabelle 7) zentrifugiert. Ficoll nutzt den unterschiedlichen Dichtegradienten der Blutbestandteile zu deren Auftrennung während der Zentrifugation. Es erfolgt die Trennung in vier Phasen von unten nach oben: Erythrozyten, Ficoll, PBMCs, Serum (vgl. Abb. 5a).

Schritt 3: Überstehendes Serum wurde abgesaugt, PBMCs sorgfältig abpipettiert und in neuen Falcon Tubes mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. Im Anschluss wurden die tubes auf Programm 3 (vgl. Tabelle 7) zentrifugiert. Dieser Schritt diente dem Auswaschen von verbliebenem Ficoll und Serum. Es verblieb ein Überstand aus Ficoll, Serum und PBS sowie ein Bodensatz (Pellet) aus PBMCs und wenigen Erythrozyten (vgl. Abb. 5b).

Schritt 4: Darauf folgte ein erneuter Waschvorgang. Der Überstand wurde verworfen und der Bodensatz in 5-10 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in ein neues Falcon Zentrifugenröhrchen (15 ml Volumen) pipettiert und auf Programm 7 (vgl. Tabelle 7) zentrifugiert.

Schritt 5: Zur Entfernung der verbliebenen Erythrozyten wurde eine Lösung aus Lysepuffer (BD Pharm Lyse™) und sterilem Wasser im Verhältnis 1:10 angesetzt. Der Überstand aus PBS (vgl. Abb. 5c) wurde verworfen und das Pellet in 2 ml Lysepuffer resuspendiert. Durch die hypoosmolaren Eigenschaften des Puffers erfolgt die hypotone Lyse der Erythrozyten und damit die selektive Anreicherung der PBMCs. Die Lyse wurde nach 2 min durch Hinzugabe von 20-30 ml PBS terminiert, um eine Lyse der Leukozyten zu vermeiden. Nach Zentrifugation auf Programm 6 (vgl. Tabelle 7) verblieb ein Pellet aus PBMCs sowie ein Überstand aus PBS und Lysepuffer (vgl. Abb. 5d).

Schritt 6: Der Überstand wurde verworfen und die PBMCs in 1 ml RPMI-Medium resuspendiert. Die Auszählung erfolgte mikroskopisch mit 2 µl PBMC-Lösung und 18 µl Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer (vgl. 2.2.15).

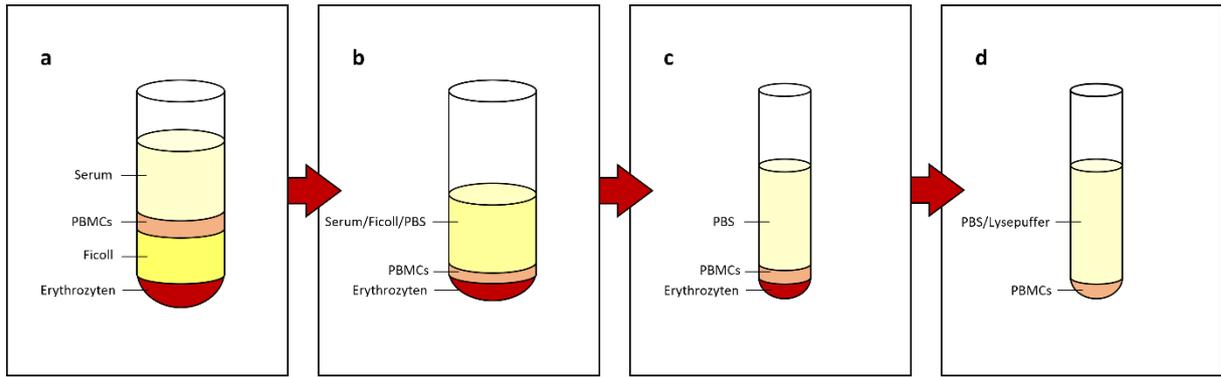


Abbildung 5. Ablauf PBMC-Isolation. **a** Auftrennung der Frischblutbestandteile nach der ersten Zentrifugation mit Ficoll-Copolymer. **b** Auftrennung der Phasen nach unvollständigem Auswaschen von Ficoll nach der zweiten Zentrifugation. **c** Nach erneuter Zentrifugation mit PBS ist Rest-Serum und Ficoll ausgewaschen, es verbleiben PBMCs und Erythrozyten als Bodensatz. **d** Die erfolgreiche Lyse der Erythrozyten hinterlässt ausschließlich die gewünschten PBMCs als Bodensatz.

2.2.11 Kryokonservierung der PBMCs

Nach PBMC-Isolation erfolgte die zufällige Aufteilung in Spender und Empfänger für die geplante Mixed Lymphocyte Culture. Nicht sofort verwendete PBMCs wurden in einer Lösung aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und Fetal Bovine Serum (FBS), im Verhältnis 1:10, kryokonserviert. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen und dient daher als Gefrierschutz, FBS schützt die Zellen aufgrund des hohen Proteingehaltes vor Scherkräften. Die PBMCs wurden in 4 ml PBS resuspendiert, auf Programm 3 (vgl. Tabelle 7) zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in der Konservierungslösung resuspendiert. Die resuspendierten PBMCs wurden in spezielle Kryo-Lagerungsfläschchen (1 ml Volumen) pipettiert und im Kryo-Gefrierbehälter (Mr. Frosty™) bei -80°C gelagert. Das Behältnis dient dem langsameren Abkühlen und Gefrieren ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) der PBMCs.

2.2.12 Vorbereitung der Stimulatorzellen

Als Stimulatorzellen dienen im GVHD-Setting der MLC die Empfängerzellen. Ein Zentrifugationsröhrchen wurde mit 13 ml präpariertem RPMI gefüllt und im Wasserbad (37°C) vorgewärmt. Die benötigte Anzahl kryokonservierter Empfängerzellen (vgl. 2.2.11) wurde durch Schwenken im Wasserbad aufgetaut und langsam in das vorgewärmte Medium pipettiert. Das Vorwärmen des Mediums und das langsame Pipettieren dienen der Schonung der Zellen und Vermeidung von abrupter Lyse. Danach wurde das Zellgemisch auf Programm 4 (vgl. Tabelle 7) zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. $500\ \mu\text{l}$ verworfen. Darauf folgte eine erneute Zentrifugation mit 10 ml RPMI-Medium

auf Programm 3 (vgl. Tabelle 7), der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml RPMI resuspendiert. Die Zellen wurden schließlich ausgezählt (vgl. 2.2.15) und einmalig mit 80 Gy bestrahlt.

2.2.13 Magnetische Zellseparation

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) ist eine Methode zur Abtrennung bestimmter Zellen eines Gemisches anhand von Oberflächenmarkern. Das Zellgemisch wird mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper, gegen den gewünschten Oberflächenmarker, inkubiert (vgl. Abb. 6a). Darauf folgt die erneute Inkubation mit einem magnetisch markierten Antikörper gegen das fluoreszierende Agens (vgl. Abb. 6b). Das Gemisch aus markierten und unmarkierten Zellen wird in eine Trennsäule pipettiert. Diese wird in einem starken Magneten platziert und enthält selbst eine Matrix aus ferromagnetischen Kugeln. Das verstärkte magnetische Feld bindet markierte Zellen und ermöglicht unmarkierten Zellen den Durchfluss in ein auffangendes Röhrchen. Um die markierten Zellen zu erhalten, wird die Säule aus dem Magnetfeld entnommen. Daraufhin können sich die Zellen aus der magnetischen Bindung lösen und mittels MACS-Puffer in ein neues Falcon Röhrchen gespült werden. Das MACS wurde nach Herstellerprotokoll (Miltenyi Biotec) durchgeführt.

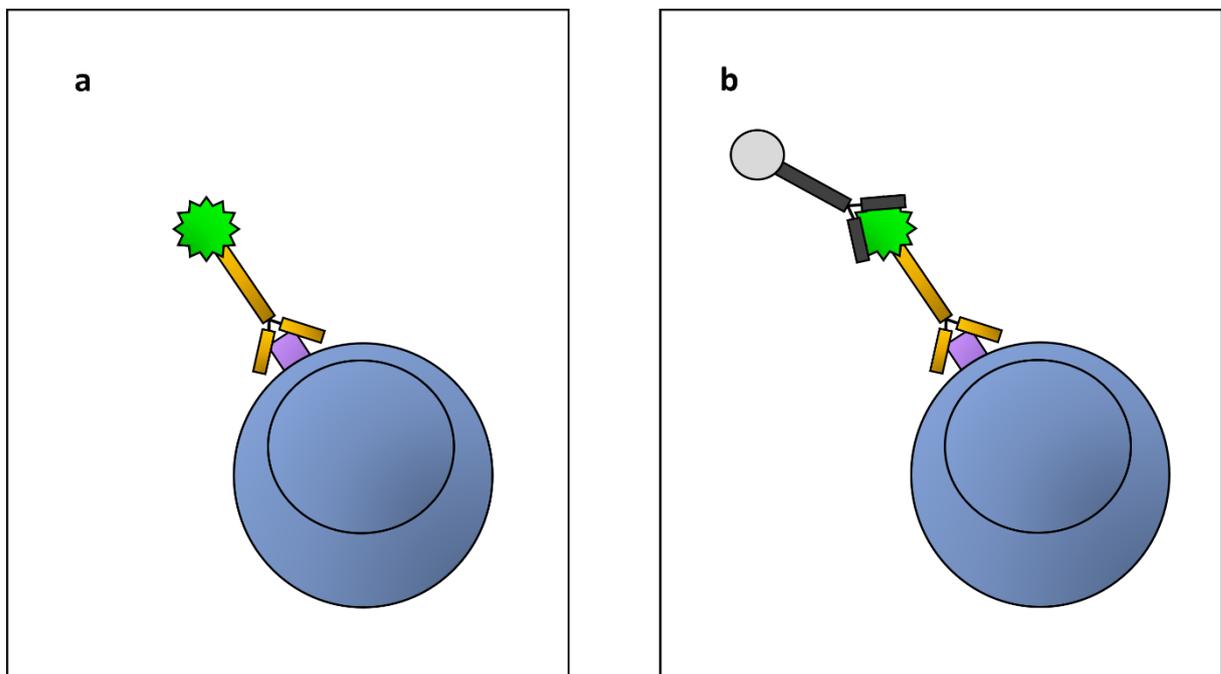


Abbildung 6. Antikörpermarkierung der Oberflächenmarker durch MACS. a Markierung einer Zelle durch Bindung des fluoreszenzmarkierten (grün) Antikörpers (gold) an den bestimmten Zelloberflächenmarker (lila) nach

der ersten Inkubation. **b** Bindung des zweiten Antikörpers (schwarz) mit magnetischem Kügelchen (grau) an das fluoreszierende Agens (bspw. PE).

2.2.13.1 Depletion CD45RA⁺ Zellen

Schritt 1: Die isolierten PBMCs wurden in jeweils 5 ml MACS Buffer gelöst und auf Programm 7 zentrifugiert (vgl. Tabelle 7).

Schritt 2: Der Überstand wurde verworfen und die abgesetzten PBMCs in 900 µl MACS Buffer und 100 µl anti-CD45RA Reagenz resuspendiert. Zur Bindung der Antikörper an naive CD45RA⁺ Zellen erfolgte die Inkubation der Zellsuspension für 10 min im Kühlschrank (4°C).

Schritt 3: Nach Inkubation wurden 10 ml MACS Buffer hinzugegeben und erneut auf Programm 7 zentrifugiert. Zeitgleich erfolgte die Spülung der LD-Säule (engl. column) mit 2 ml MACS-Buffer.

Schritt 4: Das PBMC-Pellet wurde in 500 µl MACS Buffer resuspendiert und in die LD-Column pipettiert. Nach komplettem Durchfluss erhielt man die CD45RA^{neg} Zellfraktion. Durch zweimalige Spülung der Column mit 1 ml MACS Buffer wurden verbleibende CD45RA^{neg} Zellen zur maximalen Zellausbeute gelöst. Die in der Säule verbliebenen CD45RA⁺ Zellen wurden aus der Säule gelöst, indem diese aus dem Magnet entnommen, mit 5 ml MACS Buffer nachgefüllt und anschließend mit dem Stempel der LD Column durch diese gepresst wurden.

Schritt 5: Beide Zellfraktionen wurden in separaten Zentrifugenröhrchen auf Programm 7 zentrifugiert und danach in jeweils 1 ml RPMI resuspendiert und ausgezählt.

2.2.13.2 Depletion CD276⁺ Zellen

Schritt 1: Die von CD276 zu depletierende T-Zellfraktion wurde in 3 ml MACS Buffer gelöst und auf Programm 7 zentrifugiert.

Schritt 2: Der Bodensatz wurde in 100 µl MACS Buffer und 1,5 µl Anti-CD276 PE-Antikörper resuspendiert und für 10 min im Kühlschrank inkubiert.

Schritt 3: Es wurden erneut 5 ml MACS Buffer hinzugegeben und auf Programm 7 zentrifugiert.

Schritt 4: Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 80 µl MACS Buffer und 20 µl Anti-PE Microbeads (bzw. Anti-PE Microbeads Ultra Pure) resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank inkubiert.

Schritt 5: Nach erneuter Zentrifugation mit 5 ml MACS Buffer auf Programm 7 und zeitgleicher Spülung der LD Column, wurde das Pellet anschließend in 500 µl MACS Buffer gelöst und in die Säule pipettiert. Zur maximalen Zellausbeute CD276^{neg} Zellen wurde zwei Mal mit 1 ml MACS Buffer nachgespült. CD276⁺ Zellen blieben in der Säule haften und konnten erst durch Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld und erzeugten hydrostatischen Druck (Durchpressen von 5 ml MACS Buffer) gelöst werden. Beide Zellfraktionen wurden im Anschluss ausgezählt.

2.2.13.3 Aufbewahren der CD276⁺ und CD276^{neg} Fraktion

Zur weiteren Analyse über qPCR wurden die depletierten CD276⁺ Zellen und die CD276^{neg} Zellen ($\cong 5 \times 10^5 / ml$) in 1 ml PBS gelöst. Danach für 5 min bei 650×g zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 350 µl β-RLT resuspendiert und bis zur Analyse tiefgefroren (-80°C). Die chaotropen Salze des Puffers fällen hierbei Proteine und Verhindern die Degradation der RNA.

2.2.14 Durchflusszytometrie (FACS)

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) bzw. Durchflusszytometrie ist ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung der Zellzahl mit bestimmten Charakteristika wie Oberflächenmolekülen, extra- und intrazellulären Peptiden bzw. Proteinen und DNA. Das Verfahren nutzt die Antigen-Antikörper-Reaktion zur Markierung der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Nach Bindung des Antikörpers an genannte Strukturen erfolgt die Quantifizierung der markierten Zellen mittels eines Durchflusszytometers. In diesem werden die Zellen der Messsuspension durch eine Kanüle gepresst, deren Durchmesser nur den Transport jeweils einer Zelle hinter der anderen ermöglicht. Die Zellen passieren einen fokussierten Laserstrahl, welcher durch Oberflächenmerkmale und fluoreszenzmarkierte Strukturen gestreut wird (s. Abb. 7). Diese Streuung wird durch mehrere Detektoren aufgenommen und analysiert. Die einfache Streuung des Lasers ermöglicht als Vorwärts- (engl. forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreuung (engl. side scatter, SSC) die Einordnung von Zellgröße bzw. Durchmesser und interner Komplexität. So lassen sich über eine hohe FSC Monozyten von den kleineren Lymphozyten unterscheiden und über die SSC Zellen mit viel zytoplasmatischen Granula (bspw. neutrophile Granulozyten) von Monozyten unterscheiden. Die von gebundenen Antikörpern emittierte Fluoreszenz gibt anhand der detektierten Wellenlänge Aufschluss über die gebundenen Antikörper und Anzahl der markierten Zellen. Die Markierung der Zellen mit

fluoreszenzmarkierten Antikörpern (sog. Staining) wurde in dieser Arbeit anhand verschiedener Antikörpersets durchgeführt.

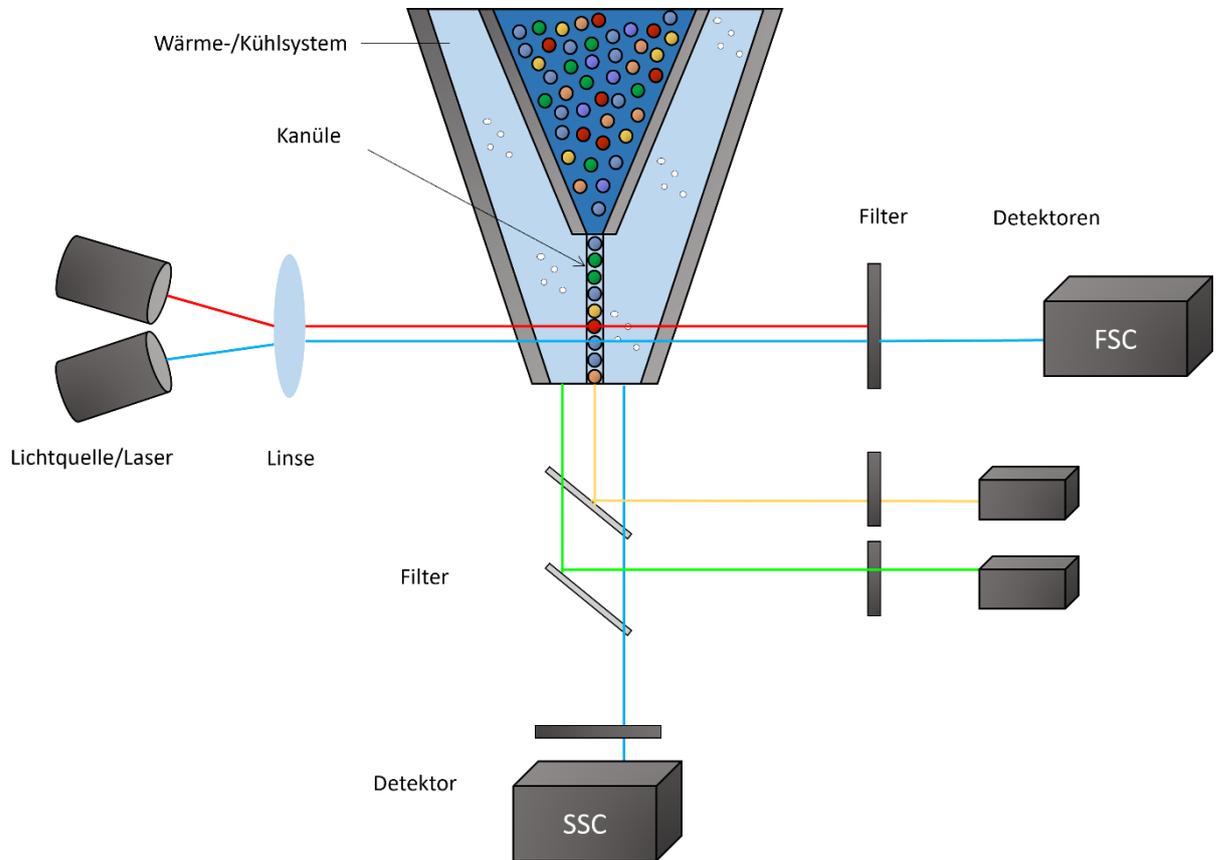


Abbildung 7. Schematische Darstellung Durchflusszytometrie (FACS). Fluoreszenz-markierte Zellen werden hintereinander durch eine Kanüle gepresst. Die Strahlen aus der Lichtquelle (Laser) werden durch eine Linse gebündelt, treffen auf die Zellen auf, werden gestreut oder emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Nach Passage durch verschiedene Filter werden FSC oder SSC sowie die Wellenlängen von bspw. PE-/ APC- oder FITC gelabelten Zellen detektiert.

2.2.14.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Die intakte Zellmembran lässt gelabelte Antikörper nicht passieren und steht damit dem intrazellulären Staining im Wege. Um eine Bindung der Antikörper an ihre intrazellulären Antigene zu erreichen, müssen die Zellen zunächst fixiert und im Anschluss durchlässig (permeabel) werden. Im Rahmen der Fixierung werden Proteine und Lipide denaturiert und damit gegen enzymatischen Abbau geschützt. Die Permeabilität der Zellmembran ermöglicht das Eindringen der Antikörper ins Zytoplasma und die Antigenbindung. Fixierung und Permeabilisierung wurden nach Herstellerprotokoll (FIX&PERM® Kit,

Nordic MUBio) durchgeführt. Das Verfahren wurde nach erfolgtem extrazellulärem Staining durchgeführt.

Schritt 1: Die Zellsuspension wird mit 3 ml PBS pro Reagenzglas auf Programm 15 (vgl. Tabelle 7) zentrifugiert. Überstände werden nach jeder Zentrifugation dekantiert.

Schritt 2: Zur Fixierung wurde das Zellpellet pro Reagenzglas in 100 µl Reagent A durch einen Vortexmischer gelöst und für 15 min bei RT inkubiert.

Schritt 3: Die Zellen wurden erneut mit 4 ml PBS pro Reagenzglas gewaschen und zentrifugiert (Programm 15).

Schritt 4: Das Zellpellet wurde zur Permeabilisierung in 100 µl Reagent B gelöst. Direkt danach wurden die gelabelten Antikörper für das intrazelluläre Staining hinzugegeben und das Gemisch für 15 min bei RT inkubiert.

Schritt 5: Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte ein letzter Waschvorgang mit 4 ml PBS und anschließender Zentrifugation (Programm 15). Das Zellpellet wurde in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und im Anschluss per FACS (BD LSR II, BD Biosciences) analysiert.

2.2.14.2 Prüfung des Depletionserfolges (Purity Check Panel)

Der Erfolg der CD276-Depletion wurde nach jedem Depletionsvorgang durchflusszytometrisch überprüft. Eine erfolgreiche Depletion wies in der CD276^{neg} Zellfraktion $\leq 5\%$ CD276⁺ Zellen auf. Dafür wurden jeweils ca. 10-50 µl der CD45RA^{neg}CD276^{neg} Zellen, und CD45RA^{neg}CD276⁺ Zellen, mit 50 µl PBS versetzt und die Antikörper für das extrazelluläre Staining hinzugefügt. Nach Inkubation für 15 min im Kühlschrank (4-6°C) wurden 3 ml PBS pro Reagenzglas hinzugefügt und diese auf Programm 2 (vgl. Tabelle 7) zentrifugiert. Der Überstand nach Zentrifugation wurde dekantiert, das Zellpellet in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer (BD FACSCanto™, BD Biosciences) analysiert. Die Antikörper für das Purity Check Panel wurden als Mastermix angesetzt, die verwendeten Volumina pro Reagenzglas werden in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9. Mastermix extrazelluläres Staining Purity Check Panel.

Laser (Wellenlänge)	Fluorophor	Antigen	Volumen [µl]*
Mastermix Purity Check Depletion CD276⁺ Zellen			
Blau (488 nm)	PerCP	CD3	1

Rot (633 nm)	APC-H7	CD8	0,5
Violett (405 nm)	V500 (Aqua™)	extra-/intrazelluläre Amine**	1
	V450 (Vioblue)	CD4	1
Mastermix Purity Check Depletion CD45RA⁺ Zellen			
Blau (488 nm)	PerCP	CD3	1
	PE	CD45RO	5
	PE-Cy	CD45RA	1
Rot (633 nm)	APC-H7	CD8	0,5
Violett (405 nm)	V500 (Aqua™)	extra-/intrazelluläre Amine**	1
	V450 (Vioblue)	CD4	1

Anmerkung: Zusammensetzung der verwendeten Antikörper für das extrazelluläre Staining zur Prüfung des Depletionserfolges nach Depletion CD45RA⁺ und CD276⁺ Zellen. Ein CD276-Staining wird nicht benötigt, da die Zellen bereits im Rahmen der Depletion mit anti-CD276-PE gelabelt wurden. * Volumen pro Reagenzglas. ** Aqua™ reagiert mit Aminen und erlaubt durch stärkere Markierung toter Zellen eine Unterscheidung, es wurde mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt.

2.2.14.3 Untersuchung der proinflammatorischen Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker (Full Cytokine Panel)

Die Auswirkungen der Depletionen CD276⁺ Zellen in der MLC auf die Expression von Aktivierungs- und Proliferationsmarkern sowie der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF α , wurden 7 Tage nach Depletion durchflusszytometrisch untersucht. Dafür erfolgte ein extra- und intrazelluläres Staining der Zellen. Vorbereitend wurde ein extra- und intrazellulärer Mastermix (vgl. Tabelle 10), sowie eine Lösung aus Brefeldin A (BFA), Phorbol Myristat Acetat (PMA) mit Ionomycin und präpariertem RPMI-Medium (vgl. 2.2.9) im Verhältnis 1:2:1000 (BPI-Lösung) angesetzt. BFA ist ein Proteintransportinhibitor, der durch Blockade intrazellulärer Transportprozesse zur Zytokinakkumulation führt und damit das Signal des intrazellulären Stainings erhöht. PMA und Ionomycin induzieren synergistisch die verstärkte Expression von Zytokinen, die Proliferation von T-Zellen und insbesondere die verstärkte Expression von CD276 auf deren Zelloberfläche.

Es wurden ca. 1×10^6 Zellen pro Well der MLC entnommen und auf Programm 3 (vgl. Tabelle 7) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 μ l der BPI-Lösung in der 96-Well Platte resuspendiert und für 1-4 Std. im Brutschrank inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellsuspensionen in jeweils ein Reagenzglas pipettiert, adhärenente Zellen im Well mit 200 μ l PBS gelöst und dieses ebenfalls in das Reagenzglas pipettiert (400 μ l

Gesamtvolumen pro Reagenzglas). Die Reagenzgläser wurden auf Programm 3 zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in jeweils 5 µl des extrazellulären Mastermix resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Zuletzt erfolgte ein Waschvorgang mit 3 ml PBS pro Reagenzglas und Zentrifugation auf Programm 15. Nach Dekantieren des Überstandes folgte das intrazelluläre Staining durch Fixierung und Permeabilisierung (s. 2.2.14.1) sowie Verwendung des intrazellulären Mastermixes.

Tabelle 10. Mastermix extra- und intrazelluläres Staining Full Cytokine Panel.

Laser (Wellenlänge)	Fluorophor	Antigen	Volumen [µl]*
Mastermix extra- und intrazellulär Full Cytokine Panel			
UV (355 nm)	BUV737	PD-1	1
	BUV661	HLA-DR	0,5
	BUV395	CD25	0,5
Blau (488 nm)	PerCP	CD4	1,5
	PE	IFN-γ	1
	PE-Cy7	Ki-67	1
	FITC	CD137	1
Rot (633 nm)	APC	CD69	1
	APC-H7	CD8	0,5
	Alexa 700	CD3	1
Violett (405 nm)	V500 (Aqua™)	extra-/intrazelluläre Amine**	1
	BV785	TNFα	1
	BV421	CD276	0,5

Anmerkung: Zusammensetzung der verwendeten Antikörper für das extra- und intrazelluläre (graue Schattierung) Staining des Full Cytokine Panel. * Volumen pro Reagenzglas. ** Aqua™ reagiert mit Aminen und erlaubt durch stärkere Markierung toter Zellen eine Unterscheidung, es wurde mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt.

2.2.14.4 Untersuchung des Interleukinprofils (Interleukin Panel)

Die Auswirkung der Depletionen CD276⁺ Zellen auf die Expression der Interleukine IL-4, -5, -10, -13 und -17A wurden durchflusszytometrisch zur Bestimmung deren Verteilung sowie Rückschluss auf vorherrschende T-Zellsubpopulationen untersucht. Das Staining erfolgt analog dem Full Cytokine Panel (s. 2.2.14.3). Im Gegensatz zu diesem wurde hier eine Stimulationslösung aus BFA, PMA/Ionomycin, Monensin (GolgiStop™) und präpariertem RPMI im Verhältnis 1:2:0,75:1000 (BPIM-Lösung) verwendet. Monensin blockiert den Proteintransport zum Golgi-Apparat und führt ebenfalls zur intrazellulären

Zytokinakkumulation und indirekt deren verbesserter FACS-Detektion. Die Zellen wurden mit der BPIM-Lösung für 4 Std. im Brutschrank inkubiert. Das extra- und intrazelluläre Staining wurde mit aufgelisteten Antikörper-Mastermixen (vgl. Tabelle 11) durchgeführt.

Tabelle 11. Mastermix extra- und intrazelluläres Staining Interleukin Panel.

Laser (Wellenlänge)	Fluorophor	Antigen	Volumen [μ l]
Mastermix extra- und intrazellulär Interleukin Panel			
Blau (488 nm)	PerCP	CD4	1
	PE	IFN- γ	1
Rot (633 nm)	APC-H7	CD8	0,5
	APC	IL-4/IL-5/IL-10/IL-13/IL-17A	jeweils 1
	Alexa 700	CD3	1
Violett (405 nm)	V500 (Aqua™)	extra-/intrazelluläre Amine**	1

Anmerkung: Zusammensetzung der verwendeten Antikörper für das extra- und intrazelluläre (graue Schattierung) Staining des Interleukin Panel. * Volumen pro Reagenzglas. ** Aqua™ reagiert mit Aminen und erlaubt durch stärkere Markierung toter Zellen eine Unterscheidung, es wurde mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt.

2.2.14.5 Untersuchung verbleibender antiviraler Aktivität (Antiviral Peptide Assay)

Zur Untersuchung der erhaltenen antiviralen Aktivität nach wiederholter CD276-Depletion, erfolgte die Stimulation der MLC mit viralen Peptiden und Messung der IFN- γ -Ausschüttung 7 Tage nach der 5. CD276-Depletion. Um eine zusätzliche Stimulation mit Fremdantigenen zu vermeiden, wurden die Zellen autolog, d.h. im GVHD-Setting mit Spenderzellen, einmal mit und einmal ohne virale Peptide inkubiert.

Vorbereitung: Die Spenderzellen wurden an Tag 7 nach 5. Depletion analog der Stimulatorzellen (vgl. 2.2.12), jedoch mit einmaliger Radiatio mit 50 Gy, vorbereitet. Virale Peptide von Cytomegalievirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und eines Adenovirus wurden im Verhältnis 1:1:1 als Mastermix gemischt (MM^{viral}). Dieser wurde mit 5 μ l pro Depletionsansatz (n=6, entspricht 0-5 Depletionen, vgl. Abb. 4) pipettiert. Demnach entsprach das Gesamtvolumen 30 μ l bzw. 10 μ l pro viraler Peptidlösung.

Schritt 1: Von den vorbereiteten Spenderzellen wurden 3×10^6 Zellen/1,5 ml auf zwei Wells einer 24-Well-Platte aufgeteilt, in eines das Gesamtvolumen des MM^{viral} pipettiert und für 1 Std. im Brutschrank inkubiert.

Schritt 2: Die Zellen jedes Depletionsansatzes bzw. MLC (n=6; nicht-depletiert, 1-5x depletiert) werden in je ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und mit 400 µl PBS pro Reaktionsgefäß für 5 min bei 20°C auf 650×g zentrifugiert.

Schritt 3: Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 180 µl präpariertem RPMI resuspendiert und ausgezählt (vgl. 2.2.15). Zellkonzentrationen wurden auf die gleiche Zellzahl pro 100 µl angepasst und 100 µl jedes Depletionsansatzes auf 2 Wells (insgesamt n=12) einer 96-Well-Platte aufgeteilt.

Schritt 4: Die Spenderzellen mit und ohne virale Peptide aus Schritt 1 wurden mit jeweils 125 µl auf je ein Well pro Depletionsansatz verteilt (mit viralen Peptiden n=6, ohne virale Peptide n=6). Die Inkubation erfolgte über Nacht im Brutschrank.

Schritt 5: Am Folgetag wurden 0,2 µl BFA pro Well hinzugegeben und für mindestens 1 Std. im Brutschrank inkubiert. Der Inhalt jedes Wells wurde mit 200 µl PBS auf Programm 15 zentrifugiert und im Anschluss für extra- und intrazelluläres (analog 2.2.14.1) Staining präpariert (vgl. Tabelle 12). Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer (BD LSR II, BD Biosciences).

Tabelle 12. Mastermix extra- und intrazelluläres Staining Antiviral Activity Assay.

Laser (Wellenlänge)	Fluorophor	Antigene	Volumen [µl]
Mastermix extra- und intrazellulär Antiviral Activity Assay			
Blau (488 nm)	PerCP	CD4	1
	PE	IFN-γ	1
Rot (633 nm)	APC-H7	CD8	0,5
	Alexa 700	CD3	1
Violett (405 nm)	V500 (Aqua™)	extra-/intrazelluläre Amine**	1
	BV421	CD276	0,5

Anmerkung: Zusammensetzung der verwendeten Antikörper für das extra- und intrazelluläre (graue Schattierung) Staining des Interleukin Panel. * Volumen pro Reagenzglas. ** Aqua™ reagiert mit Aminen und erlaubt durch stärkere Markierung toter Zellen eine Unterscheidung, es wurde mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt.

2.2.14.6 Untersuchung verbleibender anti-Tumor Aktivität (Anti-Third Party Assay)

Zur Untersuchung einer erhaltenen anti-Tumor Aktivität der CD276-depletierten MLCs, speziell anhand des Surrogatparameters IFN- γ , erfolgte die Stimulation mit neuen Fremdantigenen. Dafür wurden am Tag der 5. CD276-Depletion (vgl. Abb. 4) PBMCs einer dritten Person vorbereitet (analog 2.2.12).

Schritt 1: Es wurden jeweils 4×10^5 Zellen jedes Depletionsansatzes (n=6; nicht-depletiert, 1-5x depletiert) und der neuen Stimulatorzellen pro Well (n=6; 8×10^5 Zellen gesamt pro Well) einer 48-Well-Platte pipettiert.

Schritt 2: Die Stimulation erfolgte über 6 Tage, am 7. Tag wurden 0,2 μ l BFA pro Well hinzugegeben und für mindestens 1 Std. im Brutschrank inkubiert.

Schritt 3: Nach Inkubation wurde jedes Well mit 400 μ l PBS auf Programm 15 zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte extra- und intrazelluläres Staining gemäß Tabelle 10 sowie die durchflusszytometrische Analyse.

2.2.15 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Die Auszählung der vorliegenden Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer vorgenommen. Dazu wurden zunächst jeweils 18 μ l des anionischen Diazofarbstoffs Trypanblau in 2 Wells (0,392 ml Volumen pro Well, 96-Well Platte) pipettiert und ein Well mit 2 μ l der zu bestimmenden Zellsuspension durchmischt. Trypanblau wird ausschließlich von lebenden Zellen aufgenommen und markiert diese zur Auszählung. Dem durchgemischten Well wurden 2 μ l entnommen, in das zweite präparierte Well pipettiert und durchmischt. 5-6 μ l dieser im Verhältnis 1:100 durchgemischten Zellsuspension wurden auf die Zählkammer aufgetragen und lichtmikroskopisch ausgezählt. Über angewendete Formel 1 wird die Zellzahl pro Milliliter bestimmt.

$$\frac{\text{Summe Zellen Eckquadrate}}{4} \times 10^4 \times 10^2 = \text{Zellen/ml}$$

Formel 1. Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter der Zellsuspension. Die Anzahl der Zellen der vier großen Eckquadrate werden addiert und der Mittelwert durch Division mit 4 gebildet. Dieser Wert wird zur Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter und unter Berücksichtigung der 1:100 Verdünnung mit 10^4 und 10^2 multipliziert.

2.2.16 Technische und statistische Auswertung

Die technische Auswertung erfolgte über die Betriebssoftware FACS Diva des BD FACSCanto™ und BD LSR II. FACS Gating wurde mit FlowJo durchgeführt. Die

statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 7.0 unter Anwendung von One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Range Test oder nicht gepaartem T-Test zwischen Gruppen. Die statistische Signifikanz wurde mit $P < 0.05$ definiert.¹⁴⁷

3 Ergebnisse

Dieses Kapitel stellt die Ergebnisse der Versuche im NSG-Ab⁰ DR4 Mausmodell und der MLC vor. Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in Hashimoto et al. (2021) veröffentlicht¹⁴⁷ (Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.1 Ergebnisse Mausmodell

3.1.1 Transplantation CD276-depletierter Memory T-Zellgrafts verbessert phänotypische Parameter im Mausmodell

Die in diesem Unterkapitel gezeigten Abbildungen wurden von der AG Schilbach zur Verfügung gestellt und werden zur Anschaulichkeit vorgestellt. Die Mäuse wurden in Kohorten hinsichtlich des transplantierten Grafts eingeteilt. Zur Überwachung der definierten klinischen Parameter bzw. des GVHD-typischen murinen Phänotyps (gekrümmte Körperhaltung, Reduktion körperlicher Aktivität bzw. lethargisches Aktivitätsmuster, schütteres Fell, Gewichtsverlust) erfolgten Bildaufnahmen durch die AG Schilbach (Abb. 8). Versuchstiere der CD4⁺ Bulk-Transplantationskohorte wiesen schütteres Fell und gekrümmte Körperhaltung auf. Die CD4⁺CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte wies ebenfalls überwiegend schütteres Fell und eine gekrümmte Körperhaltung auf. Mäuse beider Kohorten zeigten Aktivitäts- und Gewichtsverlust. Im Gegensatz dazu wiesen Mäuse der CD4⁺CD45RA^{neg}CD276^{neg} Kohorte keine GVHD-typischen klinischen Parameter auf. Das Fehlen des GVHD-Phänotyps lässt auf eine deutlich supprimierte inflammatorische Reaktion der Rezipienten eines CD4⁺CD45RA^{neg}CD276^{neg} Grafts schließen.

Bulk CD4



Memory CD4



CD276-depl. memory



Abbildung 8. Phänotyp der Versuchstiere. Im Vergleich der Kohorten der unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellgrafts (Bulk, Memory, CD276-depletiert) zeigten Rezipienten der CD276-depletierten Memory T-Zellen (untere Reihe) einen weitgehend unauffälligen Phänotyp, während Versuchstiere der anderen beiden Grafts einen GVHD-typischen Phänotyp (gekrümmte Körperhaltung, Reduktion körperlicher Aktivität bzw. lethargisches Aktivitätsmuster, schütteres Fell, Gewichtsverlust) aufwiesen. Die Aufnahmen werden nach Genehmigung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach verwendet und wurden in Hashimoto et al. (2021) veröffentlicht¹⁴⁷.

3.1.2 Transplantation CD276^{neg} Memory T-Zellgrafts reduziert CD3⁺ Gewebeeinfiltration

Aufgrund der essenziellen Rolle der T-Lymphozyten als Mediatoren einer Abstoßungsreaktion war im histologischen Setting von Interesse, ob die Depletion CD45RA⁺CD276⁺ Zellen die Gewebeeinfiltration alloreaktiver CD3⁺ T-Zellen und die Gewebeschädigung reduziert. Untersucht wurden murine Organgewebepräparate aus Leber, Lunge und Kolon. Als Vergleich dienten die anderen Transplantationskohorten (Bulk, Memory). Die HE-Färbungen dienten als Standardfärbungen der Zuordnung des Gewebetyps und dem Erkennen von Zelluntergang (Apoptosen, Nekrosen) sowie lymphozytärer Infiltrate. Hämatoxylin färbt Zellkerne und raues endoplasmatisches Retikulum blauviolett, Eosin färbt Zytoplasma und Kollagenfasern (insb. Typ-1) rot.

3.1.2.1 Gewebeeinfiltration anhand histologischer Färbungen

Im Lebergewebe der Rezipienten von Bulk CD4⁺ Transplantaten (Abb. 9a) befanden sich im Bereich der Portalfelder, insbesondere perivaskulär, Infiltrate mit multiplen runden, bläulichen Zellen mit schmalem Zytoplasmasaum ohne vermehrte Apoptosen,

hinweisend auf eine lymphozytäre Infiltration der Portalfelder ohne derzeitige ausgeprägte Gewebeschädigung. Die Rezipienten von CD45RA^{neg} Memory-Transplantaten (Abb. 9b) zeigten eine Reduktion dieser Infiltration mit nur wenig perivaskulärem zellreichen Infiltrat. Bei Rezipienten von CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantaten (Abb. 9c) fand sich kein Anhalt für lymphozytäre Infiltration perivaskulär bzw. der Portalfelder und keine Gewebeschädigung. Die CD3-Färbungen des Lebergewebes der Rezipienten von Bulk CD4⁺ Transplantaten (Abb. 10a) zeigten eine vermehrte perivaskuläre, das Portalfeld betreffende, sowie eine sinusoidale Infiltration mit CD3⁺ T-Lymphozyten. Eine reduzierte perivaskuläre T-Lymphozyteninfiltration ohne Residuen in den Sinusoiden präsentierten die Rezipienten der CD45RA^{neg} Memory-Transplantate (Abb. 10b). Die CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten (Abb. 10c) wiesen kaum CD3⁺ Infiltration auf.

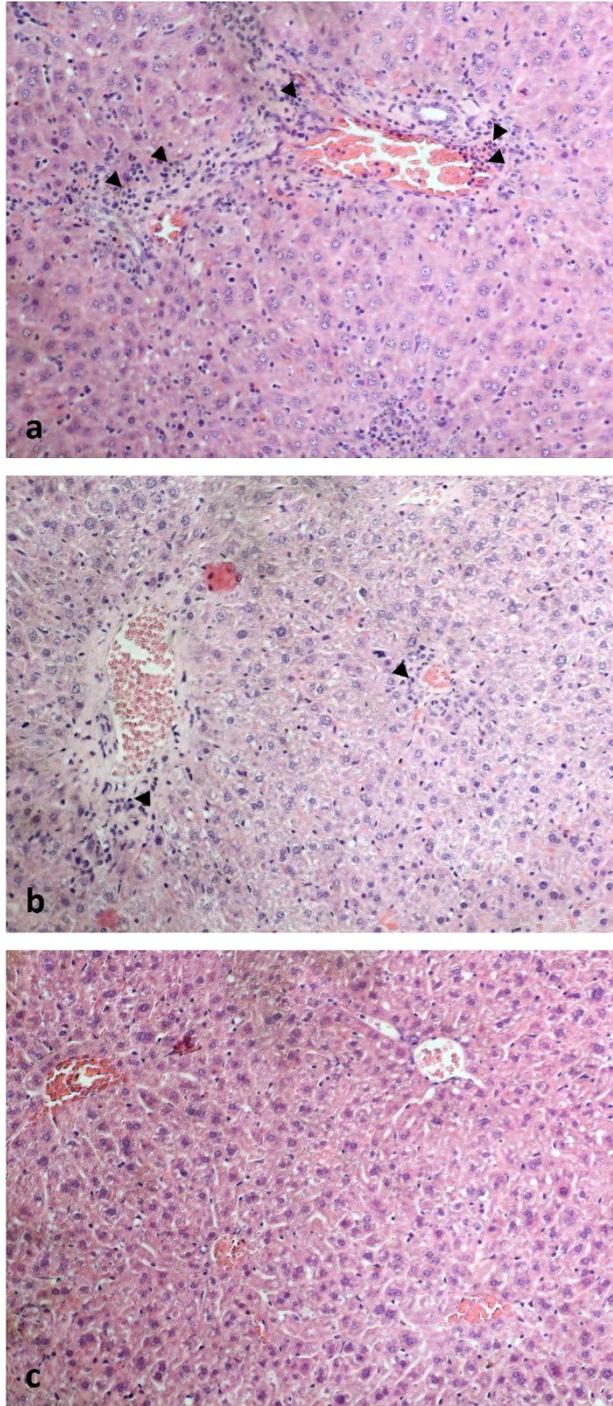


Abbildung 9. Leber HE-Färbung. Im hepatischen Gewebe der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte (a) zeigten sich vermehrt lymphozytäre Infiltrate (Pfeilköpfe) im Bereich der Portalfelder. Die CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte (b) zeigte weiterhin lymphozytäre Infiltrate in diesem Bereich, jedoch abnehmend. Die CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (c) zeigte keine auffällige Infiltration bzw. Ansammlung lymphozytärer Zellen perivaskulär oder im Bereich der Portalfelder. Abbildung exemplarisch anhand eines Versuchstiers pro Kohorte. Maßstab 200:1.

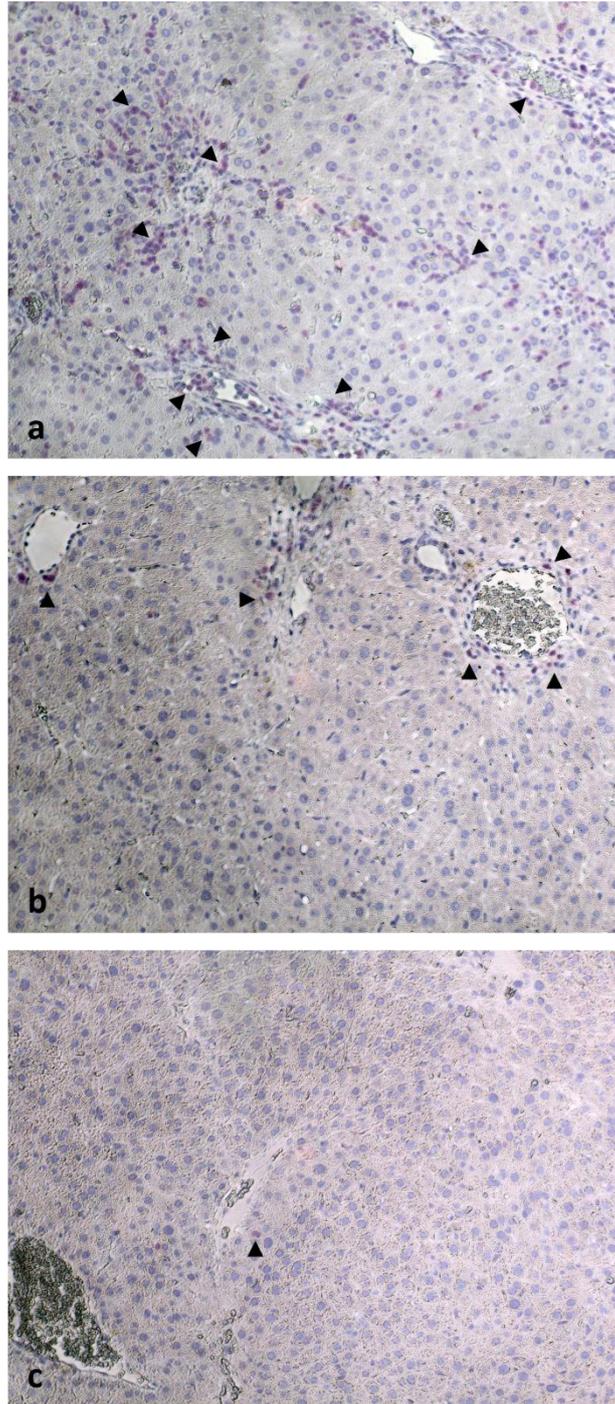


Abbildung 10. Leber CD3-Färbung. Das hepatische Gewebe der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte (a) wies eine perivaskuläre teilweise auch die Sinusoide betreffende Infiltration mit CD3⁺ Zellen (rötlich gefärbt, Pfeilköpfe exemplarisch) auf. Die CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte (b) zeigte lediglich eine verbleibende reduzierte perivaskuläre Infiltration, während die CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (c) kaum Infiltration aufwies. Abbildung exemplarisch anhand eines Versuchstiers pro Kohorte. Maßstab 200:1. Die histologischen Aufnahmen wurden in Hashimoto et al. (2021) veröffentlicht¹⁴⁷.

Die HE-Färbung des Lungengewebes der Rezipienten von Bulk CD4⁺ Transplantaten (Abb. 11a) zeigte im Bereich der Alveolen ein dichtes, insbesondere perivaskuläres,

zelluläres Infiltrat. Die Zellen legten aufgrund der bläulich rundlichen Morphologie mit schmalem Zytoplasmasaum eine lymphozytäre Infiltration nahe. Ausgeprägte Areale mit Zelluntergang lagen nicht vor. In der CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte (Abb. 11b) war diese perivaskuläre Infiltration weniger dicht, jedoch weiterhin deutlich ersichtlich. In der CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (Abb. 11c) zeigten sich kaum perivaskuläre, aber diffus verteilte bläulich-rundliche Zellen. Die CD3-Färbung des Lungengewebes der Rezipienten der Bulk CD4⁺ Transplantate (Abb. 12a) präsentierte eine ausgeprägte Anzahl perivaskulärer und in den Alveolarsepten lokalisierter CD3⁺ T-Lymphozyten. In der CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte (Abb. 12b) fanden sich weniger perivaskuläre CD3⁺ T-Zellnester. Die CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (Abb. 12c) wies keine Infiltration CD3⁺ T-Lymphozyten auf.

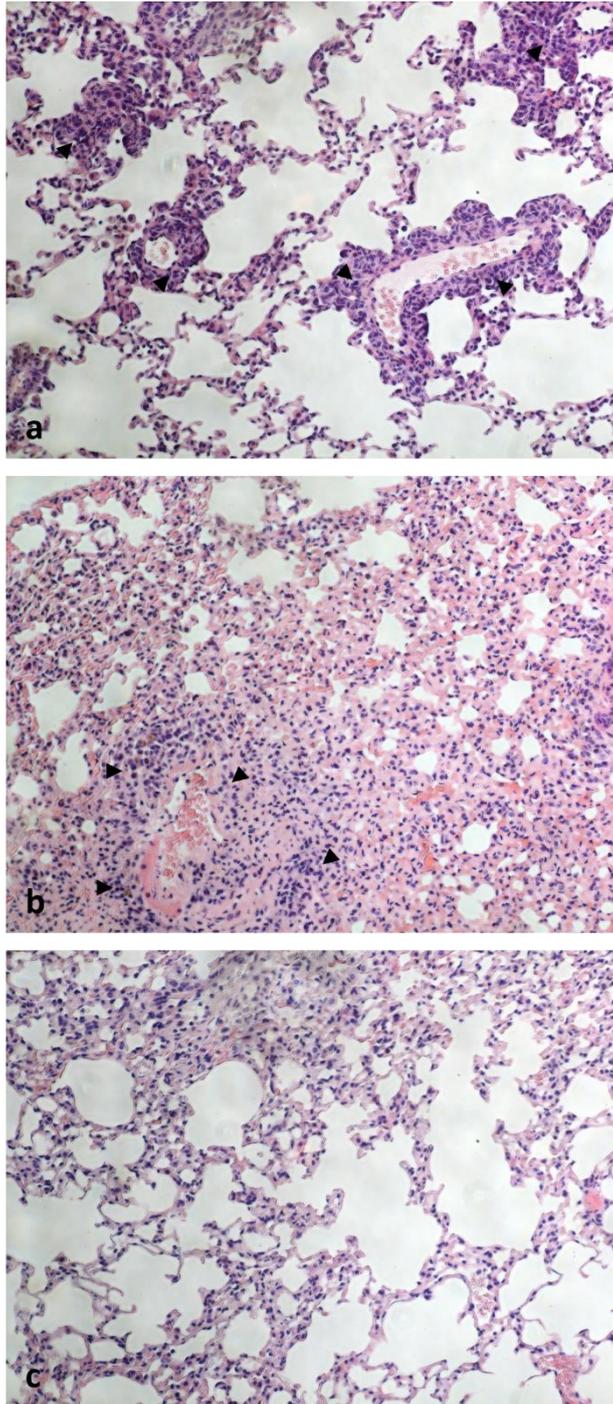


Abbildung 11. Lunge HE-Färbung. Das Lungengewebe der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte (a) zeigt dichte perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate (Pfeilköpfe) ohne ausgeprägten Zelluntergang. Gewebe der CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte (b) mit etwas weniger dichten Zellinfiltraten und die CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (c) mit weiterhin reduzierter diffuser Verteilung der bläulich gefärbten Zellen ohne Zelluntergang. Abbildung exemplarisch anhand eines Versuchstiers pro Kohorte. Maßstab 200:1.

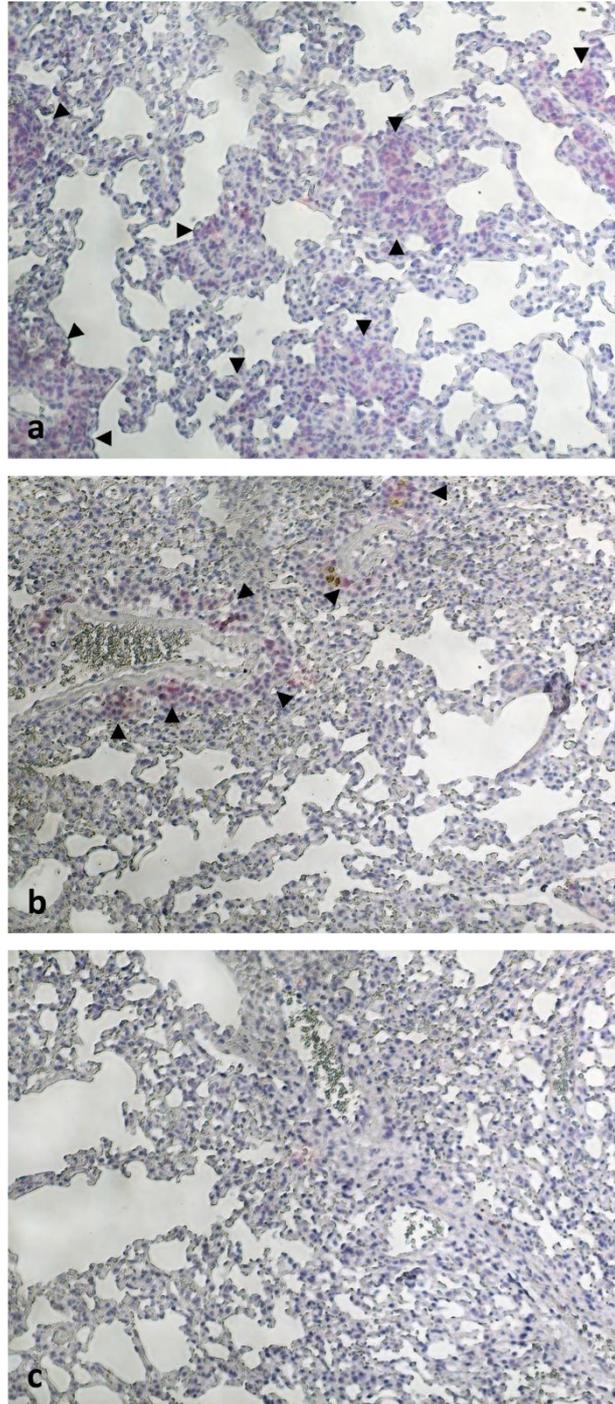


Abbildung 12. Lunge CD3-Färbung. In der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte (a) zeigten sich ausgeprägte Infiltrate mit CD3⁺ T-Lymphozyten (Pfeilköpfe) perivaskulär und in den Alveolarsepten. Die CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte (b) wies eine reduzierte T-Zellinfiltration, hauptsächlich perivaskulär, auf. Die CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (c) zeigte keine T-Zellinfiltration. Abbildung exemplarisch anhand eines Versuchstiers pro Kohorte. Maßstab 200:1. Die histologischen Aufnahmen wurden in Hashimoto et al. (2021) veröffentlicht¹⁴⁷.

Im Kolon zeigte die HE-Färbung der Rezipienten der Bulk CD4⁺ Transplantate (Abb. 13a) gruppierte rundlich-bläuliche Zellen die Krypten umgebend, vereinbar mit einem

lymphozytären Infiltrat. Ausgeprägter Zelluntergang und Bildung von Lakunen mit Zelldebris im Bereich der Krypten war nicht ersichtlich. Rezipienten von CD45RA^{neg} Memory- und CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantaten (Abb. 13b, c) wiesen nur vereinzelt lymphozytäre Infiltrate auf. In der immunhistochemischen Färbung des Kolons wurden in der bulk CD4⁺ Transplantationskohorte (Abb. 14a) multiple gruppierte CD3⁺T-Zellen im Bereich der Krypten angefärbt. Eine kontinuierliche Reduktion der infiltrierenden T-Lymphozyten zeigte sich in der CD45RA^{neg} Memory- und CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (Abb.14b, c), sodass in letzterer kaum CD3⁺ T-Zellen nachweisbar waren.

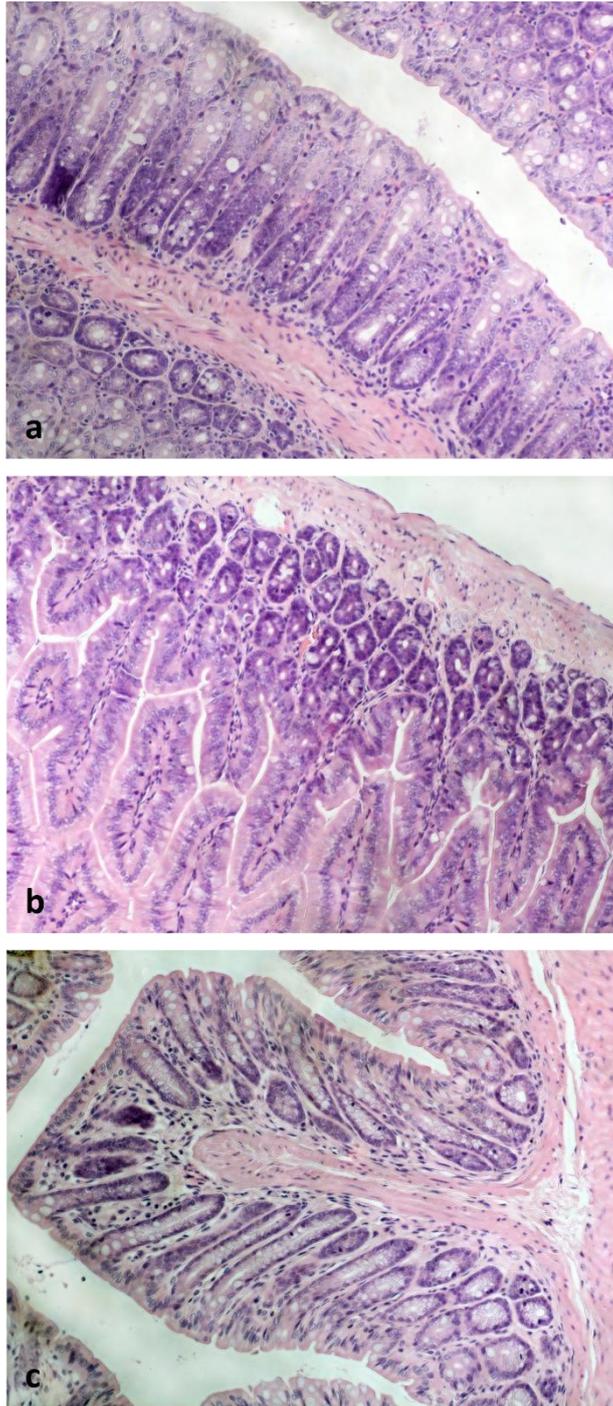


Abbildung 13. Kolon HE-Färbung. Es zeigten sich gruppierte lymphozytäre Infiltrate im Bereich der Krypten der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte (a). Keine klassischen „implodierenden Krypten“ (=Lakunen mit Zelldébris). Rezipienten von CD45RA^{neg} Memory- und CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantaten (b, c) wiesen keine ausgeprägten Zellinfiltrate auf. Abbildung exemplarisch anhand eines Versuchstiers pro Kohorte. Maßstab 200:1.

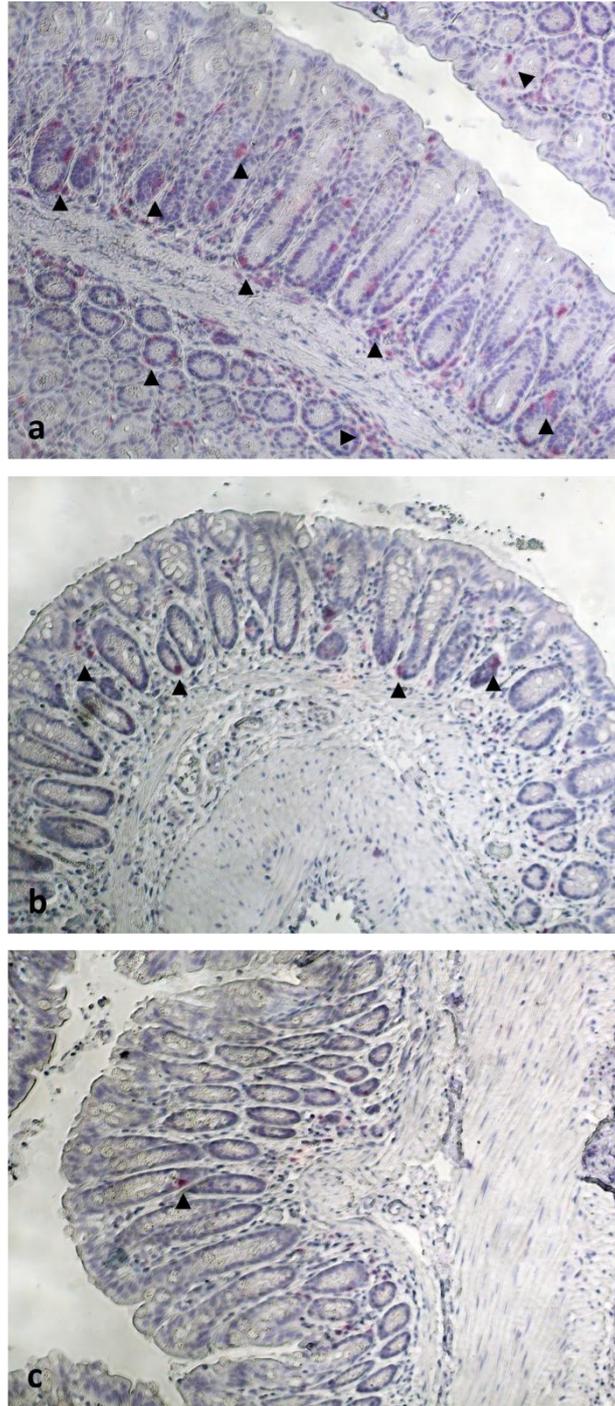


Abbildung 14. Kolon CD3-Färbung. In der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte (a) ließen sich multiple, teilweise gruppierte, CD3⁺ T-Lymphozyten im Bereich der Krypten anfärben. Die Anzahl der gefärbten Zellen verringerte sich kontinuierlich von CD45RA^{neg} Memory- zu CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (b, c). Abbildung exemplarisch anhand eines Versuchstiers pro Kohorte. Maßstab 200:1. Die histologischen Aufnahmen wurden in Hashimoto et al. (2021) veröffentlicht¹⁴⁷.

3.1.2.2 Reduktion der Organinfiltration CD3⁺ Zellen nach Transplantation CD45RA^{neg} und CD45RA^{neg}CD276^{neg} Zellgrafts

Zur genauen quantitativen Bestimmung der infiltrierenden T-Lymphozyten wurden die Organpräparate pro Maus von jeweils 2 Mäusen pro Transplantationskohorte ausgezählt. Die Anzahl infiltrierender CD3⁺ T-Lymphozyten der Rezipienten von bulk CD4⁺ Transplantaten in Leber-, Lungen- und Kolongewebe war gegenüber CD45RA^{neg} Memory- und CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten signifikant erhöht (vgl. Abb. 15). Eine statistische Signifikanz der Anzahl CD3⁺ T-Zellen zwischen CD45RA^{neg} Memory und CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten lässt sich nicht nachweisen. Insgesamt zeigten sich signifikant weniger CD3⁺ Zellen in Rezipienten von CD45RA^{neg}CD276^{neg} Zellgrafts gegenüber der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte. Abbildung 15 und Tabelle 13 fassen diese Ergebnisse zusammen.

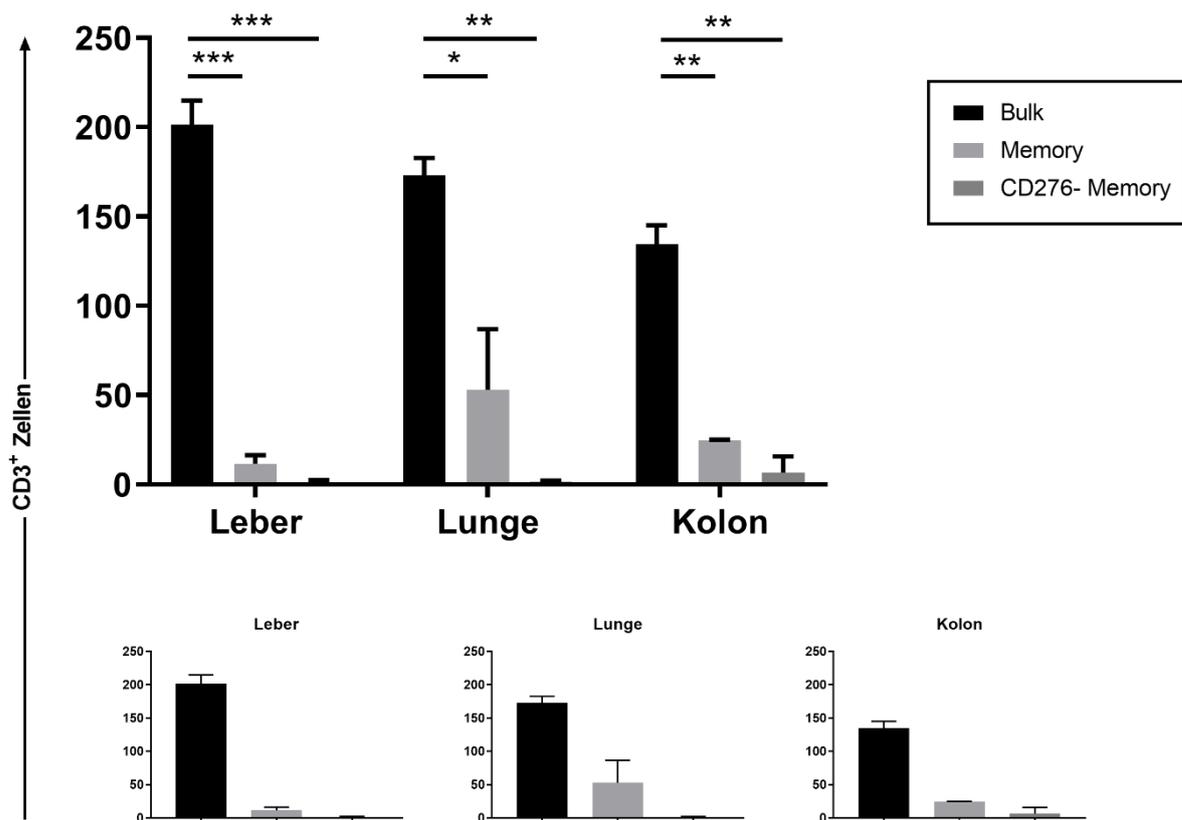


Abbildung 15. Infiltration CD3⁺ Zellen im Vergleich der Transplantationskohorten. Der Graph bildet die ausgezählten, gemittelten CD3⁺ T-Zellen pro Organ und Kohorte im Vergleich ab. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001, ****P< 0.0001. Daten wurden in Hashimoto et al. (2021) veröffentlicht¹⁴⁷.

Tabelle 13. Auszählung der gefärbten CD3⁺ T-Lymphozyten.

Präparat	Anzahl CD3 ⁺ Zellen pro Transplantationsansatz		
	Bulk	Memory	CD276 ^{neg} Memory
Leber	201 ± 9,5	11,5 ± 3,5	1 ± 1
Lunge	173 ± 7	53 ± 24	1,5 ± 0,5
Kolon	134,5 ± 7,5	24,5 ± 0,5	6,5 ± 6,5

Anmerkung: Es werden MW ± SD der ausgezählten Mäuse (n=2) pro Kohorte angegeben.

3.1.3 Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomes, GATA-3, ROR γ t, FoxP3 im Mausmodell

Die Expression der Transkriptionsfaktoren (TF) T-bet, Eomes, GATA-3, ROR γ t und FoxP3 durch T-Lymphozyten erfolgt im Rahmen der Differenzierung und Ausübung der Effektorfunktion. Demnach ermöglicht die Untersuchung der Expression auch einen Rückschluss auf die vorliegenden Subpopulationen. Die T-box-Transkriptionsfaktoren T-bet und Eomes aktivieren Gene zur Expression von IFN- γ , fördern Zytotoxizität und supprimieren die Differenzierung anderer T-Zellsubpopulationen. T-bet wird mit Th1-Zellen assoziiert, während Eomes von zytotoxischen Zellen (u.a. CTL, Th1-Zellen) exprimiert wird. Ausgeprägte Expression von GATA-3 wird in Th2-Zellen gefunden. ROR γ t ist der Master-Regulator der Th17-Zellen und FoxP3 wird von Tregs exprimiert.

3.1.3.1. Verhalten der Expression der Transkriptionsfaktoren pro Organ und Transplantationskohorte

Zur Analyse der Expression o.g. Transkriptionsfaktoren wurden die Organgewebe der verschiedenen Mauskohorten (n=5 bzw. 6 pro Kohorte) aufgeschlossen (s. Material und Methoden) und mittels qPCR auf die Expression humaner Transkriptvarianten untersucht. Die Expression der TF wurde auf die Kontrolle, das Household-Gen GAPDH, und den Mittelwert der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte normalisiert (vgl. Abb. 16 und Tabelle 14).

In allen untersuchten Geweben konnten für die Expression der einzelnen Transkriptionsfaktoren keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Kohorten gezeigt werden. Die CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten zeigten im Lebergewebe eine

leichte Reduktion der T-bet-Expression, sowie tendenziell einen Anstieg von Eomes verglichen mit Bulk CD4⁺ und CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte. Die Expression von GATA-3 im Lebergewebe blieb durch die Depletionen weitgehend unverändert. Auch der Transkriptionsfaktor RORC wurde von CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten im Vergleich zu Bulk CD4⁺-Rezipienten unverändert exprimiert, eine Erhöhung der Expression in der CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte wies eine hohe Standardabweichung auf (vgl. Tabelle 14, 2,24±2,35). FoxP3-Expression konnte im Lebergewebe ausschließlich bei Bulk CD4⁺ Rezipienten nachgewiesen werden.

Das Lungengewebe wies ähnliche Werte der T-bet-Expression für alle untersuchten Kohorten auf (vgl. Tabelle 14). Ein tendenzieller Anstieg der Eomes-Expression der CD45RA^{neg} Memory- und CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten verglichen mit den Bulk CD4⁺ Rezipienten konnte auch im pulmonalen Gewebe nachgewiesen werden. GATA-3 wurde weitgehend unverändert exprimiert. Die Expression von RORC nahm tendenziell in CD45RA^{neg} Memory- und CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory verglichen mit Bulk CD4⁺-Rezipienten ab. FoxP3-Expression konnte nur in der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte in mehreren Mäusen nachgewiesen werden, während in der CD45RA^{neg} Memory- und CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Kohorte jeweils nur ein Wert erhoben werden konnte (vgl. Tabelle 14). Folglich wurden diese Werte statistisch nicht weiter ausgewertet.

Im Kolongewebe ließ sich ein leichter Anstieg der Expression von T-bet und RORC in der CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte zeigen. Eine Abnahme der GATA-3 Expression konnte bei CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten gemessen werden. Insgesamt zeigte sich hier für alle analysierten Transkriptionsfaktoren, mit Ausnahme GATA-3, eine weitgehend unveränderte Expression bei CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory verglichen mit Bulk CD4⁺-Rezipienten. Eine Expression von FoxP3 wurde nicht detektiert.

In den kutanen Gewebeproben zeigte sich ein deutlicher Anstieg der GATA-3 Expression der CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory- verglichen mit der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte (P=0,0803). Weiterhin wurde eine Abnahme der RORC-Expression bei CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory gegenüber Bulk CD4⁺-Rezipienten detektiert. T-bet wies eine ähnliche Expression in allen Transplantationskohorten auf, Eomes eine Reduktion der Expression in der CD45RA^{neg} Memory- verglichen mit Bulk CD4⁺ und

CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte. FoxP3-Expression wurde erneut im Hautgewebe mehrerer Individuen der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte detektiert, während für die CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Kohorte nur ein Wert gemessen wurde und die CD45RA^{neg} Memory-Kohorte keine FoxP3-Expression aufwies.

Die Transplantation der CD276^{neg} Memory-Grafts zeigte in den untersuchten Geweben teilweise unterschiedliche Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren. Es ließen sich Tendenzen der Expression detektieren, wie die Abnahme der RORC-Expression in Leber, Lunge und Haut von CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory- gegenüber Bulk CD4⁺ und CD45RA^{neg} Memory-Rezipienten. Weiterhin zeigte sich eine erhöhte Expression von GATA-3 im kutanen Gewebe von CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten gegenüber Bulk CD4⁺- und CD45RA^{neg} Memory-Rezipienten. Der ebenfalls Th1-assoziierte Transkriptionsfaktor Eomes wurde erhöht in Leber- und Lungengewebe in der CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory gegenüber Bulk CD4⁺- und CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte exprimiert. T-bet wurde in pulmonalem und kutanem Gewebe in allen Kohorten ähnlich exprimiert, während im hepatischen Gewebe eine leicht reduzierte Expression in der CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory gegenüber Bulk CD4⁺ und CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte gemessen wurde.

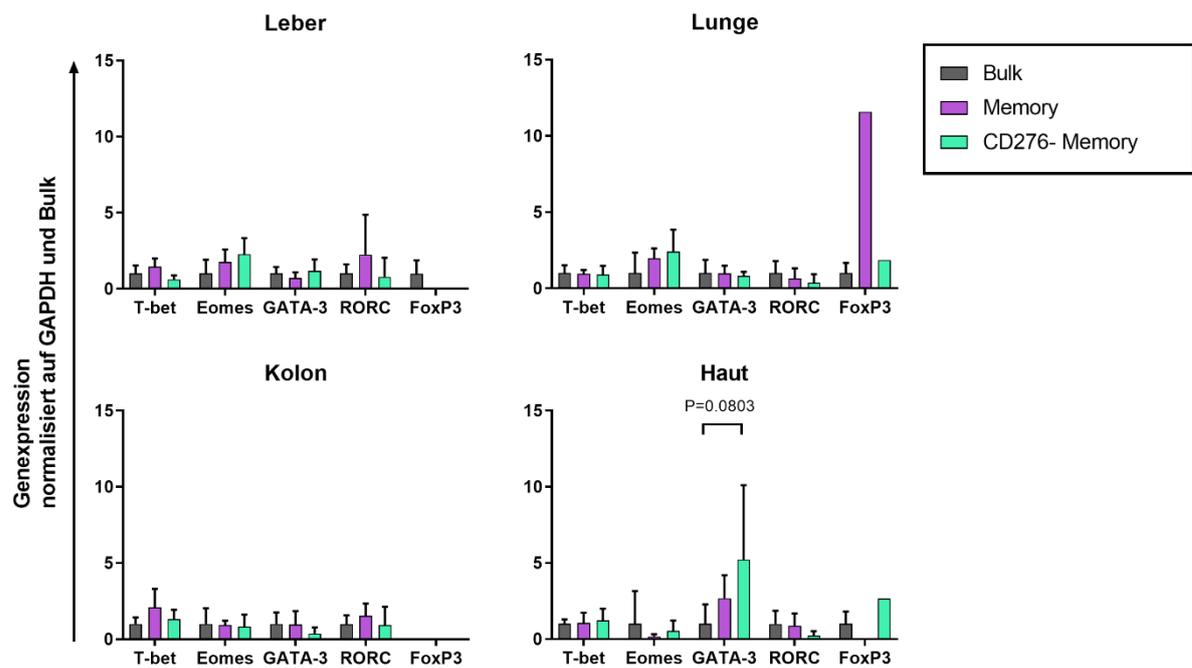


Abbildung 16. Expression der Transkriptionsfaktoren pro Gewebe und Kohorte. Die Zyklen der Genexpression (Cq) von TF wurden analog Livak Methode auf die GAPDH-Genexpression normalisiert ($\Delta Cq \triangleq Cq^{GAPDH} - Cq^{TF}$) und die Expressionsrate bestimmt ($2^{-\Delta Cq}$). Anschließend wurde $2^{-\Delta Cq}$ der Memory- und CD276^{neg} Memory-Kohorte ins Verhältnis zum Mittelwert der $2^{-\Delta Cq}$ der Bulk-Kohorte gesetzt. Damit wurde Expression der Transkriptionsfaktoren normalisiert auf GAPDH und ins Verhältnis zur Bulk-Transplantationskohorte gesetzt. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

Tabelle 14. Mittelwerte Genexpression im Mausmodell, normalisiert auf GAPDH und Bulk-Kohorte.

TF	Kohorte	Organgewebe			
		Leber	Lunge	Kolon	Haut
Tbet	Bulk	1±0,49	1±0,48	1±0,39	1±0,27
	Memory	1,45±0,47	0,95±0,23	2,09±1,05	1,07±0,59
	CD276 ^{neg} Memory	0,62±0,23	0,90±0,50	1,31±0,53	1,24±0,65
Eomes	Bulk	1±0,82	1±1,22	1±0,92	1±1,97
	Memory	1,77±0,70	1,98±0,57	0,93±0,24	0,11±0,12
	CD276 ^{neg} Memory	2,26±0,93	2,42±1,24	0,83±0,68	0,54±0,56
GATA-3	Bulk	1±0,40	1±0,79	1±0,69	1±1,17

	Memory	0,72±0,32	0,98±0,46	0,96±0,79	2,68±1,35
	CD276 ^{neg} Memory	1,19±0,61	0,81±0,25	0,37±0,35	5,21±4,23
	Bulk	1±0,56	1±0,73	1±0,51	1±0,79
RORC	Memory	2,24±2,35	0,65±0,60	1,55±0,71	0,89±0,69
	Memory CD276 ^{neg}	0,78±1,04	0,38±0,48	0,93±1,04	0,23±0,25
	Bulk	1±0,77	1±0,58	n/a (n=0)	1±0,57 (n=2)
FoxP3	Memory	n/a (n=0)	11,58 (n=1)	n/a (n=0)	n/a (n=0)
	CD276 ^{neg} Memory	n/a (n=0)	1,86 (n=1)	n/a (n=0)	2,67 (n=1)

Anmerkung: Es werden die MW mit SD der $2^{-\Delta Cq}$ Werte in Bezug auf die Bulk-Kohorte (graue Markierung) pro Transkriptionsfaktor abgebildet. TF=Transkriptionsfaktor.

3.1.3.2 Erhöhung der GATA-3/RORC-Ratio im kutanen Gewebe

Ausgehend von der erhöhten Genexpression von GATA-3 und der reduzierten Genexpression von RORC in kutanen Präparaten von CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten verglichen mit der Bulk CD4⁺ und CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte (vgl. Abb. 16), haben wir uns gefragt, ob die Transplantation dieser Grafts zu einer inversen Expression genannter TF in den untersuchten Geweben führt. Dafür wurde das Verhältnis der Genexpression von GATA-3 und RORC (GATA-3/RORC-Ratio) in den Gewebepreparaten pro Transplantationskohorte bestimmt (vgl. Abb. 17 und Tabelle 15). Im Hautgewebe zeigte sich eine stark erhöhte GATA-3/RORC-Ratio der Rezipienten von CD45RA^{neg}CD276^{neg} Transplantaten gegenüber den Rezipienten der Bulk CD4⁺ (P=0,0859) bzw. CD45RA^{neg} Memory-Transplantaten. Leber- und Lungengewebe wiesen ebenfalls eine im Vergleich mit Bulk CD4⁺ und CD45RA^{neg} Memory-Transplantationskohorte erhöhte GATA-3/RORC-Ratio auf, ebenfalls ohne statistische Signifikanz. Im Kolongewebe konnte keine ausgeprägte Erhöhung der GATA-3/RORC-Ratio nachgewiesen werden. Folglich zeigte sich im Vergleich nach Transplantation von CD45RA^{neg}CD276^{neg} Grafts eine inverse Genexpression mit erhöhter GATA-3 und reduzierter RORC Expression in Haut- und Leber-, sowie tendenziell Lungengewebe.

GATA-3/RORC Ratio

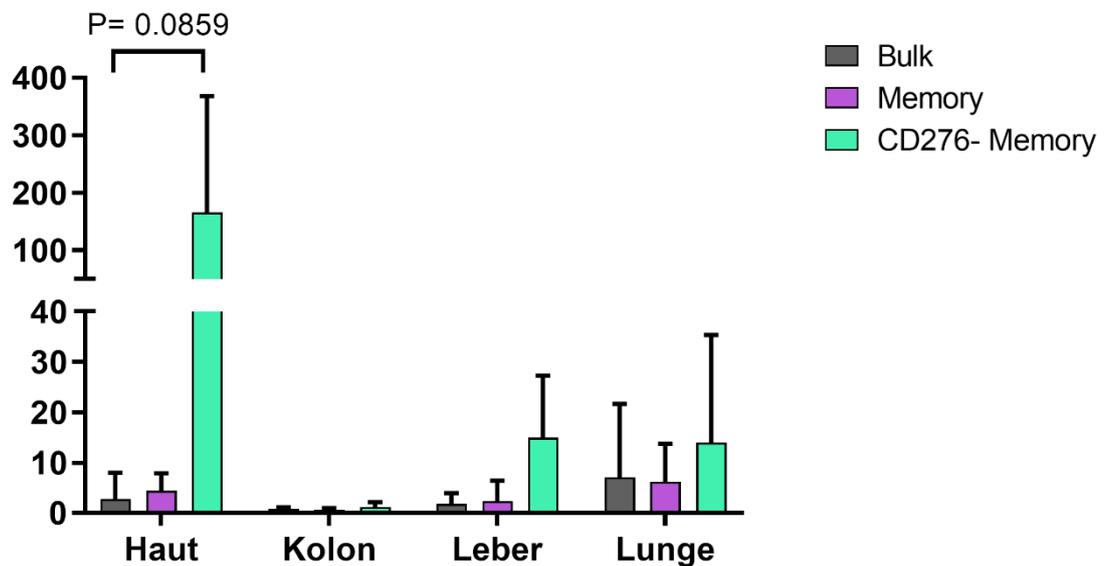


Abbildung 17. Verhältnis der Genexpression von GATA-3 zu RORC (GATA-3/RORC-Ratio) im Mausmodell. *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001, ****P< 0.0001.

Tabelle 15. Mittelwerte GATA-3/RORC-Ratio pro Gewebe und Kohorte.

Kohorte	Organgewebe			
	Leber	Lunge	Kolon	Haut
Bulk	1,86±1,89	7,07±13,33	0,83±0,26	2,79±4,72
Memory	2,34±3,62	6,18±6,77	0,63±0,33	4,46±2,95
CD276 ^{neg} Memory	14,95±10,06	13,97±18,54	1,22±0,77	165,59±175,69

Anmerkung: Es werden die MW mit SD des Verhältnisses von GATA-3 und RORC der Genexpression (vgl. Tabelle 2) dargestellt.

3.1.4 Verhalten von Diversität und Komplexität der TCR-Repertoires in den infiltrierenden Kompartments von Leber, Lunge, Kolon, Haut in HLA DR4-Mismatch und -Match

Um Diversität und Komplexität eines T-Zellkompartments bestimmen zu können, muss die Gesamtheit aller TCR erfasst werden. Der Nachweis alloreaktiver T-Zellen kann von Abweichungen des physiologisch vorhandenen Expressionsmusters einer Gauß'schen

Normalverteilung abgeleitet werden. Diese Expressionsmuster können durch die Spectratype-Analyse des $V\alpha$ -Segments dargestellt werden. Hier zeigt sich jede exprimierte variable TCR-Familie als Gauß'sche Kurve mit sog. Peaks bzw. Expressionsspitzen. Bei Transplantierten und bei Abstoßungsreaktionen, ist in betroffenen Geweben von einer Abnahme der Komplexität des TCR-Repertoires im Vergleich zum gesunden Menschen auszugehen. Hochindikativ für klonale Expansionen ist die Reduktion auf Einzelpeaks (Monoklonalität) bzw. wenige Peaks (Oligoklonalität) und stark erhöhte Peaks in ansonsten gaußverteilten Repertoires. Zur Erfassung der gesamten Komplexität des T-Zellkompartments und Detektion klonaler Expansionen wurde das TCR-Repertoire anhand 34 variabler Segmente ($V\alpha 1b - V\alpha 32$) der CDR3-Region mit 34 Primern via $V\alpha$ -Spectratyping untersucht. Analysiert wurde extrahierte cDNA der murinen Gewebe aus Leber, Lunge, Kolon und Haut nach Transplantation im DR4-Match und kompletten Mismatch.

3.1.4.1 Abnahme von Diversität der TCR-Repertoires von $CD4^+CD45RA^{neg}CD276^{neg}$ Transplantatrezipienten im kompletten DR4-Mismatch

Insgesamt zeigten sich in den untersuchten Geweben (Leber, Lunge, Kolon und Haut) hauptsächlich Abweichungen der Gauß'schen Normalverteilung mit einer Reduktion der Diversität (vgl. Abb. 18-21). Normalverteilte Peaks zeigten lediglich $V\alpha 30$ des Kolongewebes (Abb. 18a) sowie $V\alpha 22$ in Leber- und Hautgewebe (Abb. 19a, 20a). Die detektierbaren $V\alpha$ -Segmente im kompletten DR4-Mismatch (vgl. Tabelle 16) betragen für alle Organgewebe der Bulk $CD4^+$ -Rezipienten im Mittel 20,5 ($\cong 60,29\%$), für $CD45RA^{neg}$ Memory-Rezipienten 23,5 ($\cong 69,12\%$) und für $CD45RA^{neg}CD276^{neg}$ Memory-Rezipienten 11,25 ($\cong 33,09\%$). Demnach reduzierte die Transplantation von $CD4^+CD45RA^{neg}CD276^{neg}$ Grafts die Diversität des TCR-Repertoires im Vergleich zu $CD4^+$ Bulk und $CD4^+CD45RA^{neg}$ Memory-Grafts um etwa die Hälfte.

Zudem wurden in unterschiedlichen $V\alpha$ -Segmenten monoklonale Peaks, hochindikativ für klonale Expansion, detektiert. So wies $V\alpha 11$ im Kolongewebe der Bulk $CD4^+$ -Rezipienten einen stark erhöhten Einzelpeak auf (vgl. Abb 18a). $V\alpha 4A$ und $V\alpha 11$ der $CD45RA^{neg}$ Memory-Rezipienten zeigten in allen untersuchten Geweben Einzelpeaks. Die Segmente $V\alpha 8$, $V\alpha 10$, $V\alpha 27$ und $V\alpha 29$ der $CD45RA^{neg}$ Memory-Transplantationskohorte wiesen Einzelpeaks in mindestens zwei Geweben auf. Insgesamt zeigte sich bei $CD45RA^{neg}$ Memory-Rezipienten ein dominantes oligoklonales Verteilungsmuster. Die

CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte wies Einzelpeaks in den V α 22 Segmenten aller untersuchten Gewebe auf, sowie gehäuft monoklonale Peaks in V α 4B, V α 23 und V α 28. Die Rezipienten dieses Transplantates zeigten insgesamt ein mono- bzw. pauciklonales Verteilungsmuster des TCR-Repertoires.

Zusammenfassend kam es insgesamt zu einer Abnahme der Diversität der TCR-Repertoires nach Transplantation der modifizierten T-Zellgrafts. Im Vergleich der Transplantationskohorten nahm die Diversität der TCR-Repertoires in Geweben von CD4⁺CD45RA^{neg}CD276^{neg}-Rezipienten, im Vergleich mit der Bulk CD4⁺- und den CD45RA^{neg} Memory-Rezipienten, stärker ab und es traten vermehrt klonale Expansionen, also Single Peaks als sog. Fingerprint für T-Zell Rezeptoren eines Klons, auf.

Tabelle 16. Anzahl detektierter V α -Segmente im kompletten DR4-Mismatch.

Kohorte	Organgewebe				MW ^{Kohorte}
	Kolon	Leber	Lunge	Haut	
Bulk	16	14	28	24	20,5±5,72
[%] ^{Bulk}	47,06	41,18	82,35	70,59	60,29
Memory	25	27	19	23	23,5±2,96
[%] ^{Memory}	73,53	79,41	55,88	67,65	69,12
CD276 ^{neg} Memory	7	13	13	12	11,25±2,49
[%] ^{CD276neg Me- mory}	20,59	38,24	38,24	35,29	33,09

Anmerkung: Es werden die detektierbaren V α -Segmente (von insgesamt 34 möglichen V α -Segmenten) absolut und relativ (in Prozent) angegeben. Zudem wird der MW mit SD pro Kohorte angegeben.

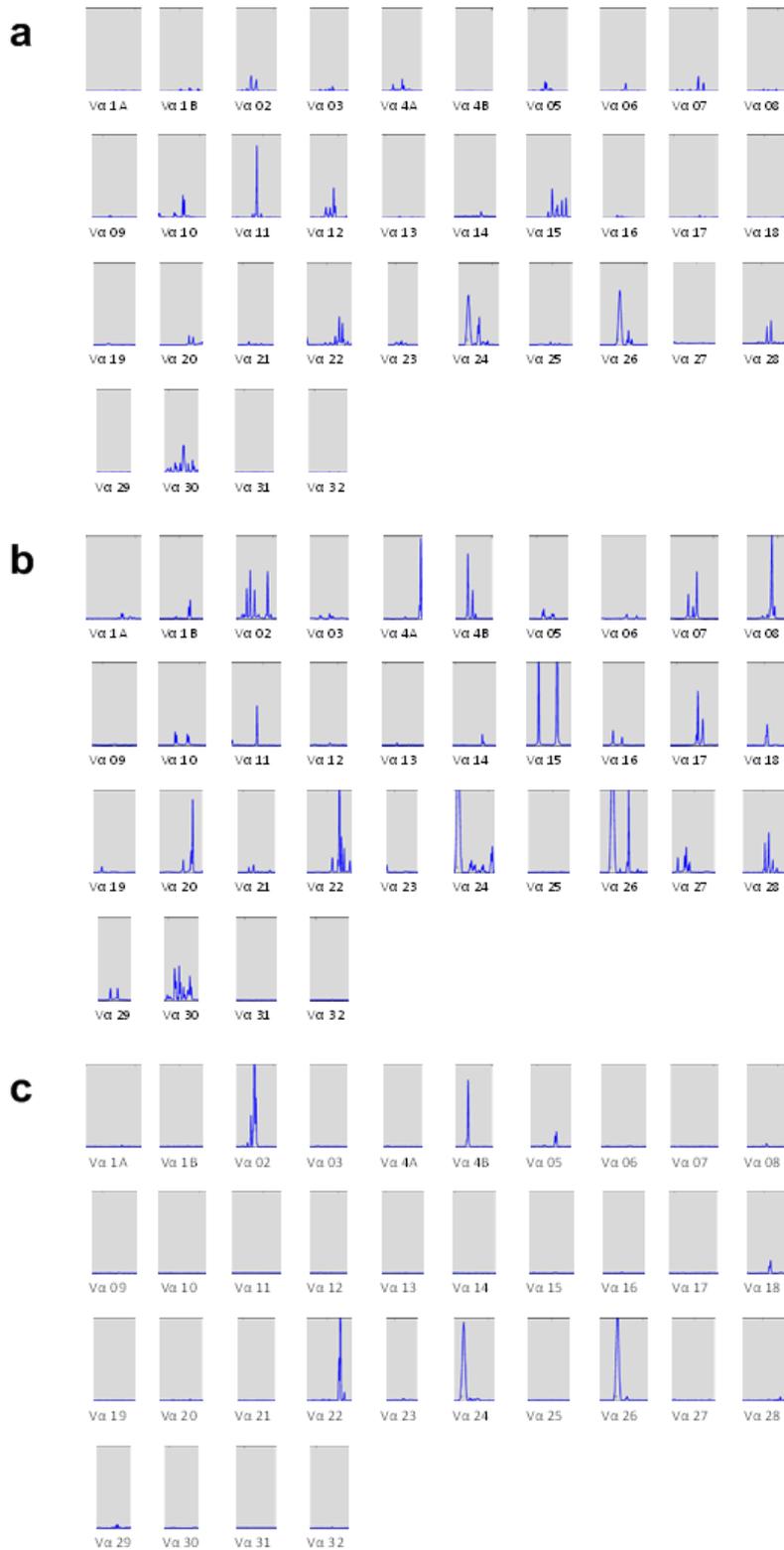


Abbildung 18. Spectratype-Analyse des TCRVα Repertoires gezeigt für Kolon, DR4-Mismatch. Abgebildet sind die Repertoires anhand der Vα-Segmente der Bulk- (a), Memory- (b) und CD276^{high} Memory-Transplantationskohorte (c).

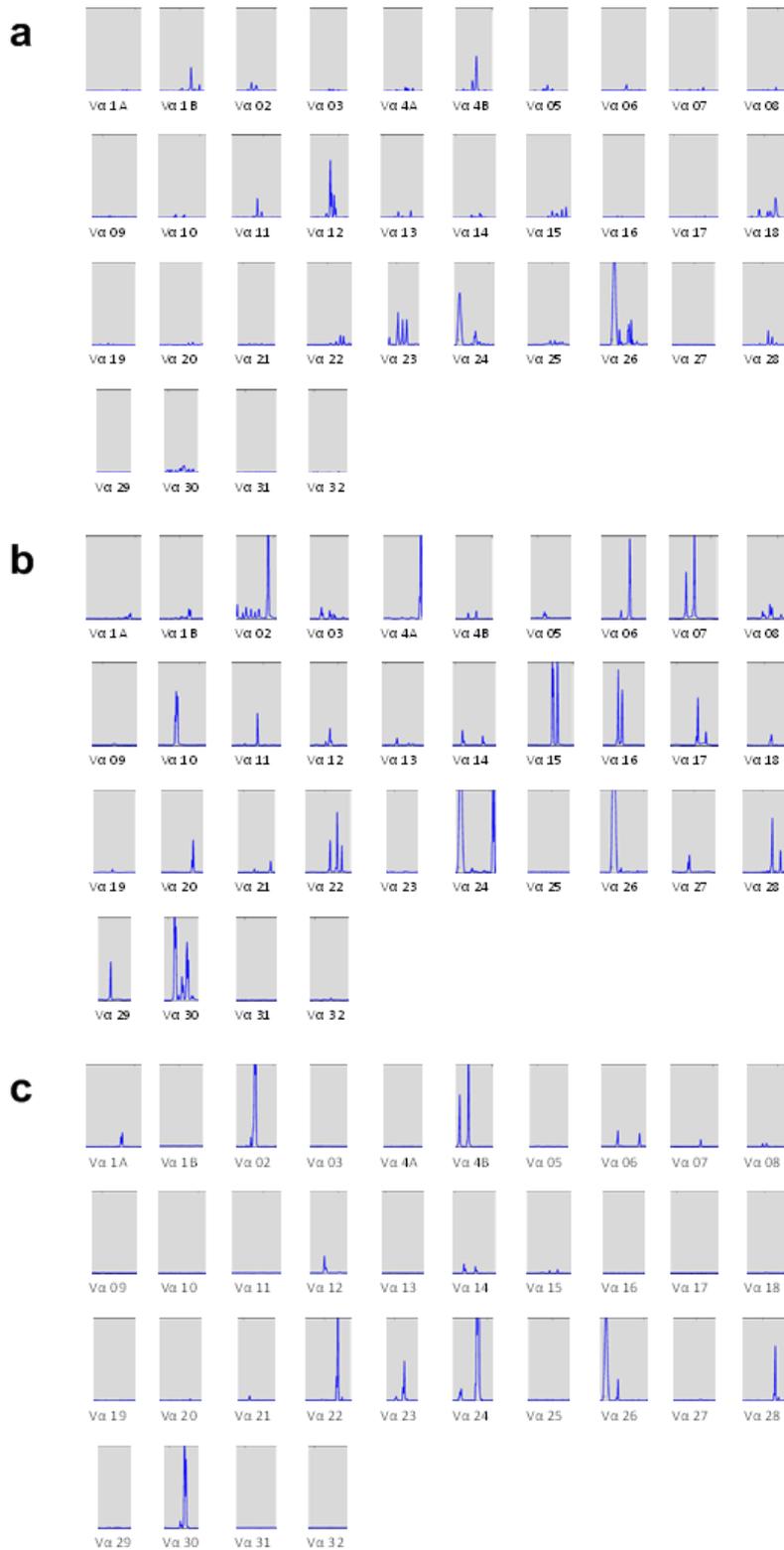


Abbildung 19. Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Leber, DR4-Mismatch. Abgebildet sind die Repertoires anhand der V α -Segmente der Bulk- (a), Memory- (b) und CD276^{high} Memory-Transplantationskohorte (c). Daten wurden in Hashimoto et al. (2021) veröffentlicht¹⁴⁷.

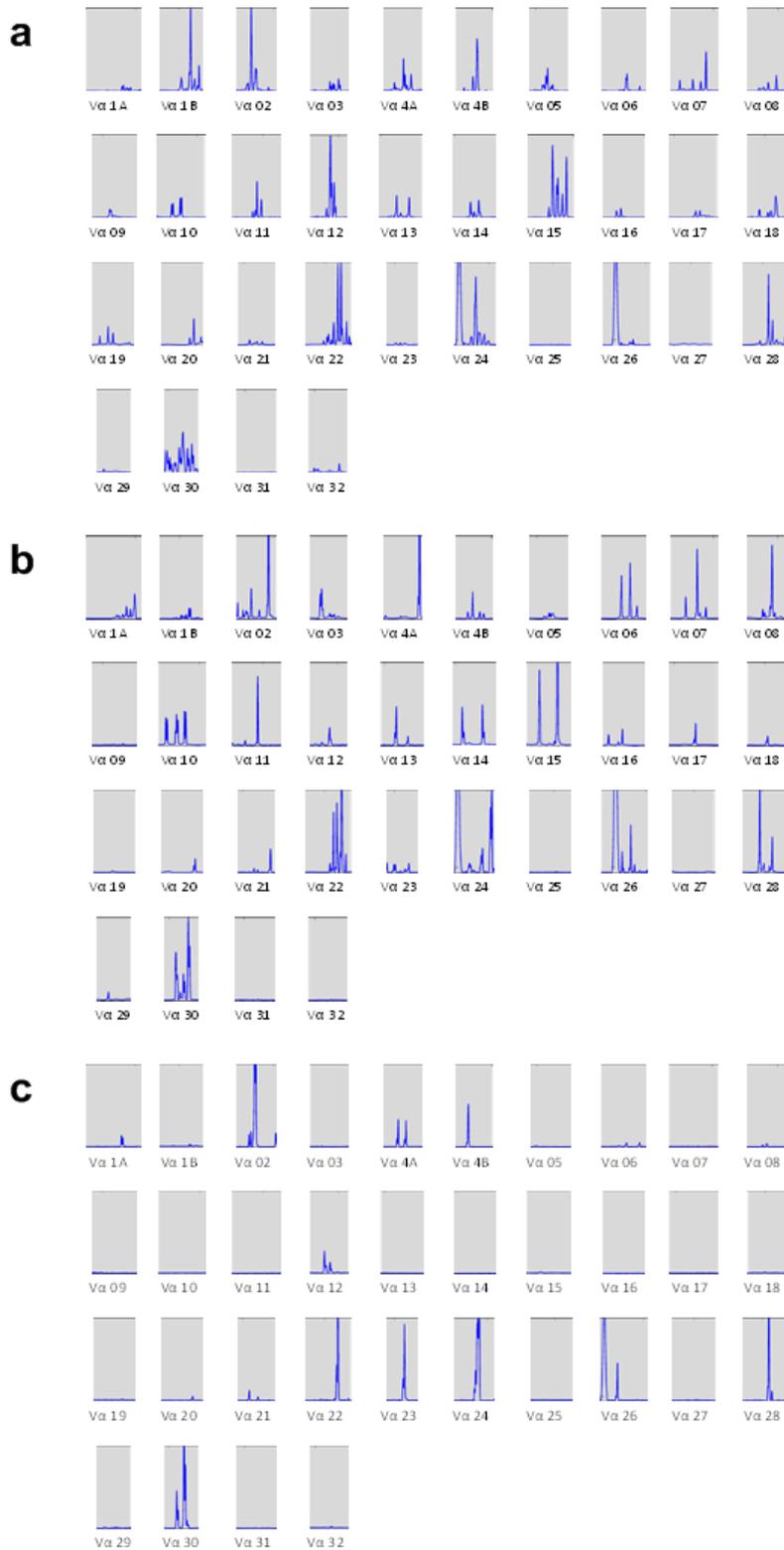


Abbildung 20. Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Lunge, DR4-Mismatch. Abgebildet sind die Repertoires anhand der V α -Segmente der Bulk- (a), Memory- (b) und CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (c).

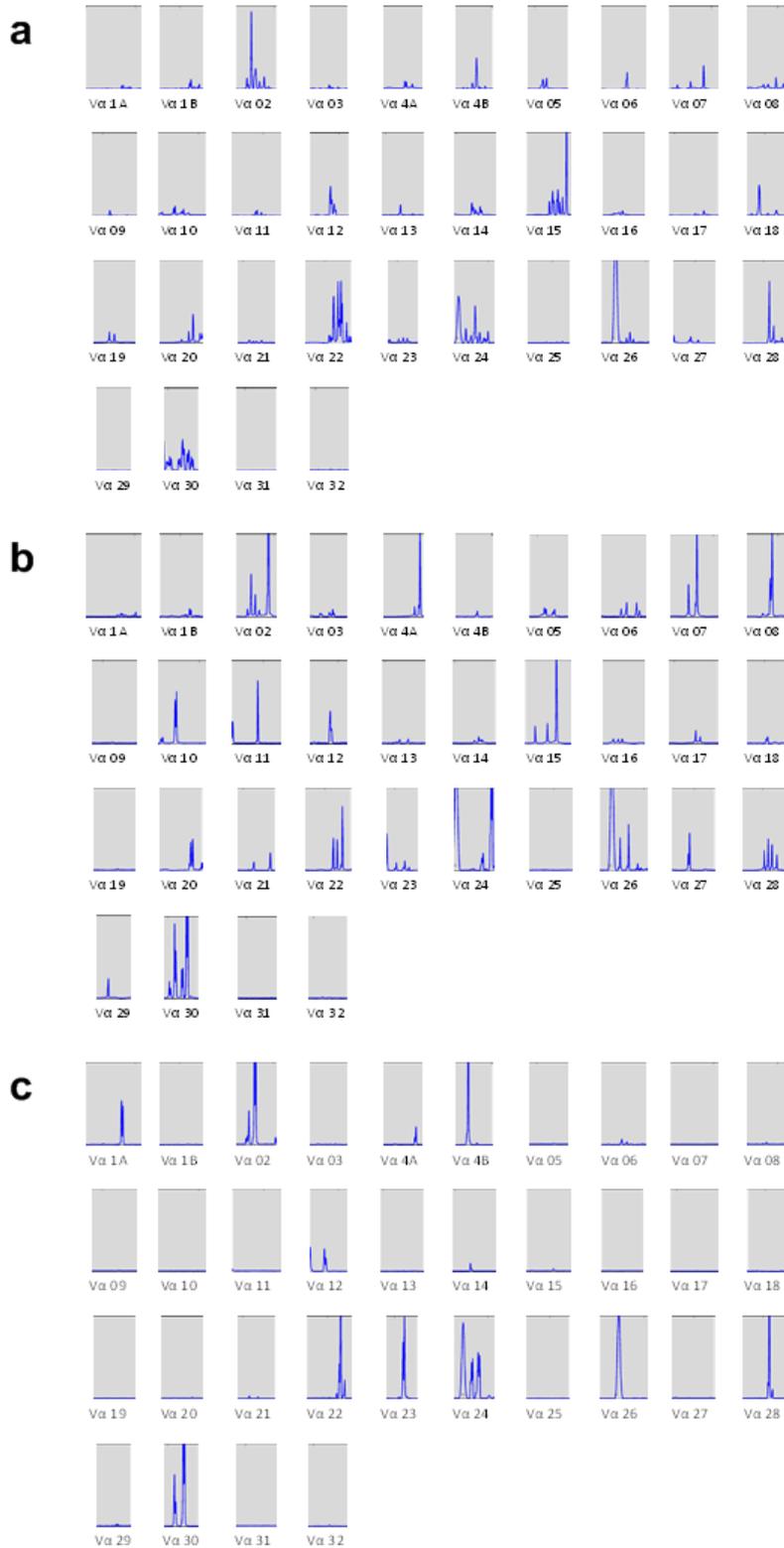


Abbildung 21. Spectratype-Analyse des TCRVα Repertoires gezeigt für Haut, DR4-Mismatch. Abgebildet sind die Repertoires anhand der Vα-Segmente der Bulk- (a), Memory- (b) und CD276^{high} Memory-Transplantationskohorte (c).

3.1.4.2 Geringe Abnahme der Diversität der TCR-Repertoires von CD4⁺CD45RA^{neg}CD276^{neg} Transplantatrezipienten im DR4-Match

Die Verteilung der Peaks innerhalb der V α -Segmente der TCR-Repertoires im DR4-Match zeigte in allen untersuchten Kohorten und Organen Abweichungen von der Gauß'schen Normalverteilung (vgl. Abb. 22-25). Die Anzahl der detektierten insgesamt 34 V α -Segmente betrug für Bulk CD4⁺-Rezipienten im Mittel 22,5 (\cong 66,18%), für CD45RA^{neg} Memory-Rezipienten 13,5 (\cong 39,71%) und für CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten 17 (\cong 50%). Demnach wies die CD45RA^{neg} Memory-Kohorte im Vergleich mit Bulk CD4⁺- und CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte die niedrigste Anzahl detektierter V α -Segmente auf.

In Lungen- und Hautgewebe der Bulk CD4⁺-Rezipienten zeigten sich für V α 16, V α 17, V α 32 monoklonale Peaks (Abb. 24a, 25a). Vereinzelt zeigten sich in dieser Kohorte weitere monoklonale Peaks, hinweisend auf eine klonale Expansion. In den Geweben der CD45RA^{neg} Memory-Kohorte wiesen besonders V α 11, V α 7, V α 22 und V α 23 vermehrt Einzelpeaks auf. Insbesondere im Hautgewebe (vgl. Abb. 25b) zeigten sich jedoch für unterschiedliche V α -Segmente, teilweise stark erhöhte, monoklonale Peaks. Für die CD45RA^{neg}CD276^{neg} Memory-Rezipienten konnten für V α 15 und V α 18 in mindestens zwei Organgeweben monoklonale Peaks nachgewiesen werden, auch hier zeigten vereinzelte V α -Segmente ebenfalls Einzelpeaks.

Im Unterschied zu den analysierten TCR-Repertoires des kompletten DR4-Mismatch (vgl. 3.1.4.1) kam es im DR4-Match zur ausgeprägtesten Abnahme der Diversität in Geweben von CD4⁺CD45RA^{neg} Memory-Rezipienten im Vergleich zu den anderen Transplantationskohorten. Die Transplantation CD4⁺CD45RA^{neg}CD276^{neg} Grafts führte zu einer geringen Abnahme der Diversität im Vergleich mit der Bulk CD4⁺ Transplantationskohorte. Die meisten monoklonalen Expansionen der T-Zell Rezeptoren zeigten sich bei CD45RA^{neg} Memory-Rezipienten.

Tabelle 17. Anzahl detektierter V α -Segmente im DR4-Match.

Kohorte	Organgewebe				MW ^{Kohorte}
	Kolon	Leber	Lunge	Haut	
Bulk	21	16	27	26	22,5 \pm 4,39

[%] ^{Bulk}	61,76	47,06	79,41	76,47	66,18
Memory	9	10	14	21	13,5±4,72
[%] ^{Memory}	26,47	29,41	41,18	61,76	39,71
CD276 ^{neg} Memory	14	17	14	23	17±3,67
[%] ^{CD276^{neg} Me- memory}	41,18	50,00	41,18	67,65	50,00

Anmerkung: Es werden die detektierbaren V α -Segmente (von insgesamt 34 möglichen V α -Segmenten) absolut und relativ (in Prozent) angegeben. Zudem wird der MW mit SD pro Kohorte angegeben.

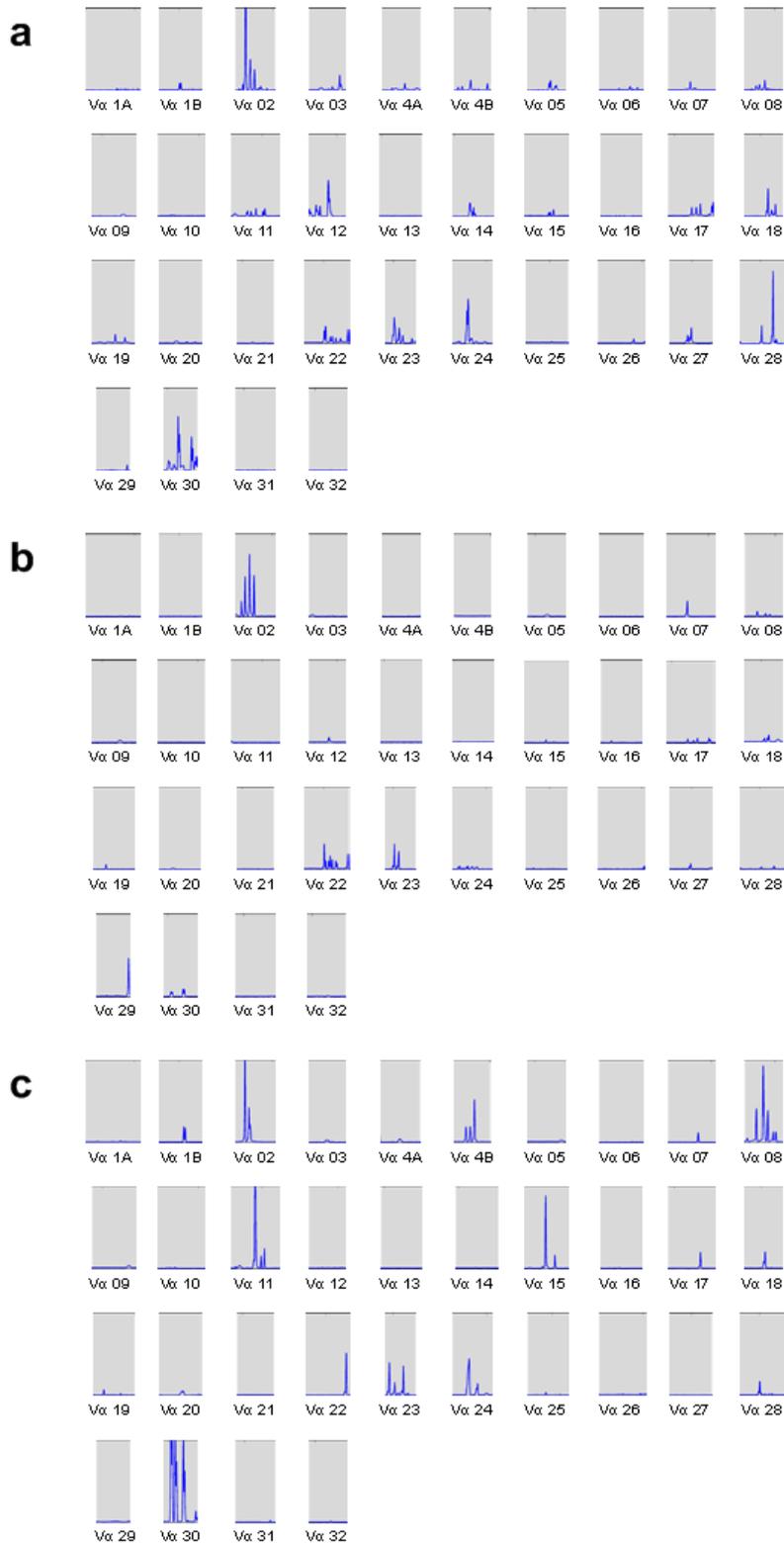


Abbildung 22. Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Kolon, DR4-Match. Abgebildet sind die Repertoires anhand der V α -Segmente der Bulk- (a), Memory- (b) und CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (c).

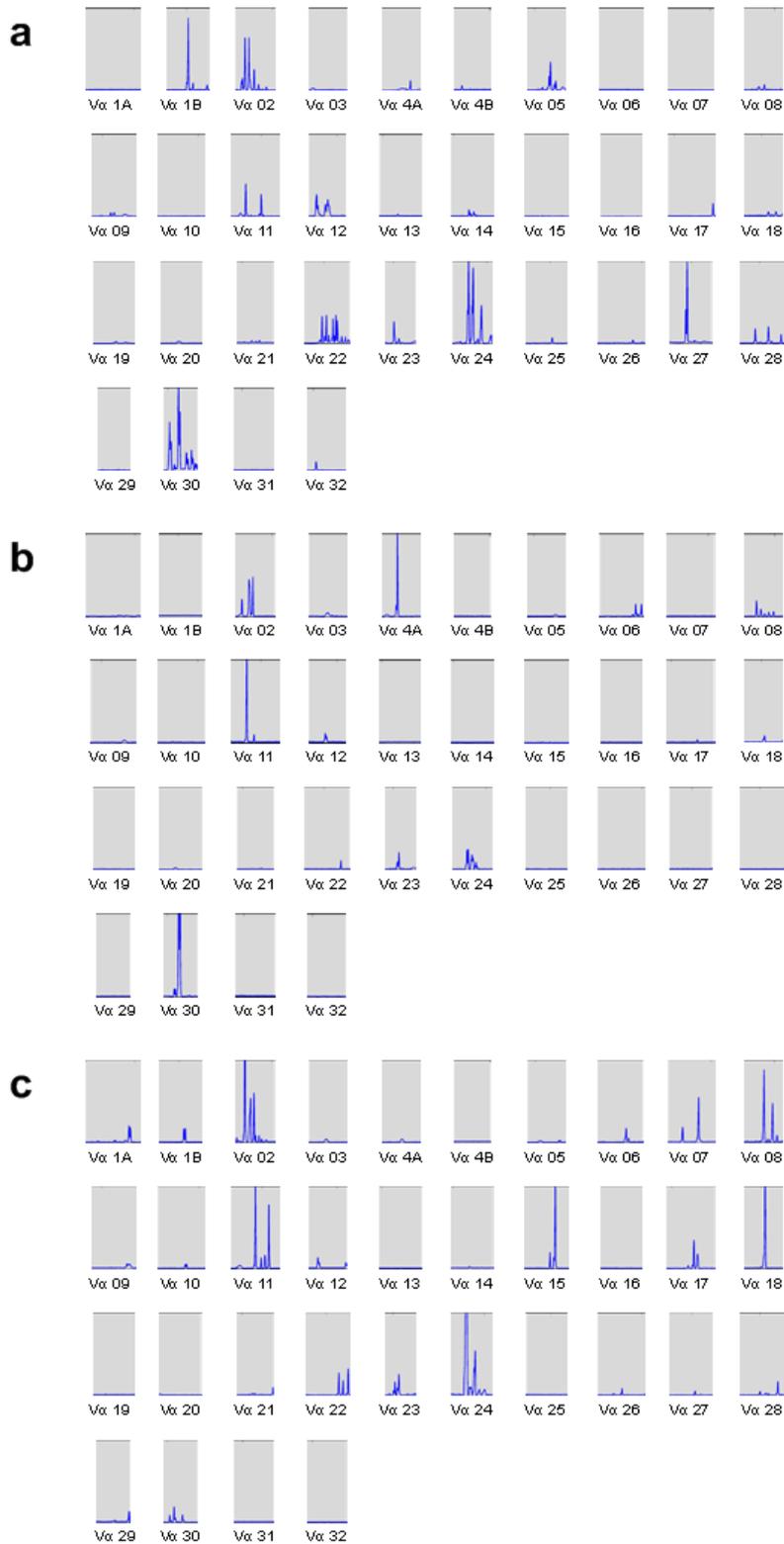


Abbildung 23. Spectratype-Analyse des TCRVα Repertoires gezeigt für Leber, DR4-Match. Abgebildet sind die Repertoires anhand der Vα-Segmente der Bulk- (a), Memory- (b) und CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (c).

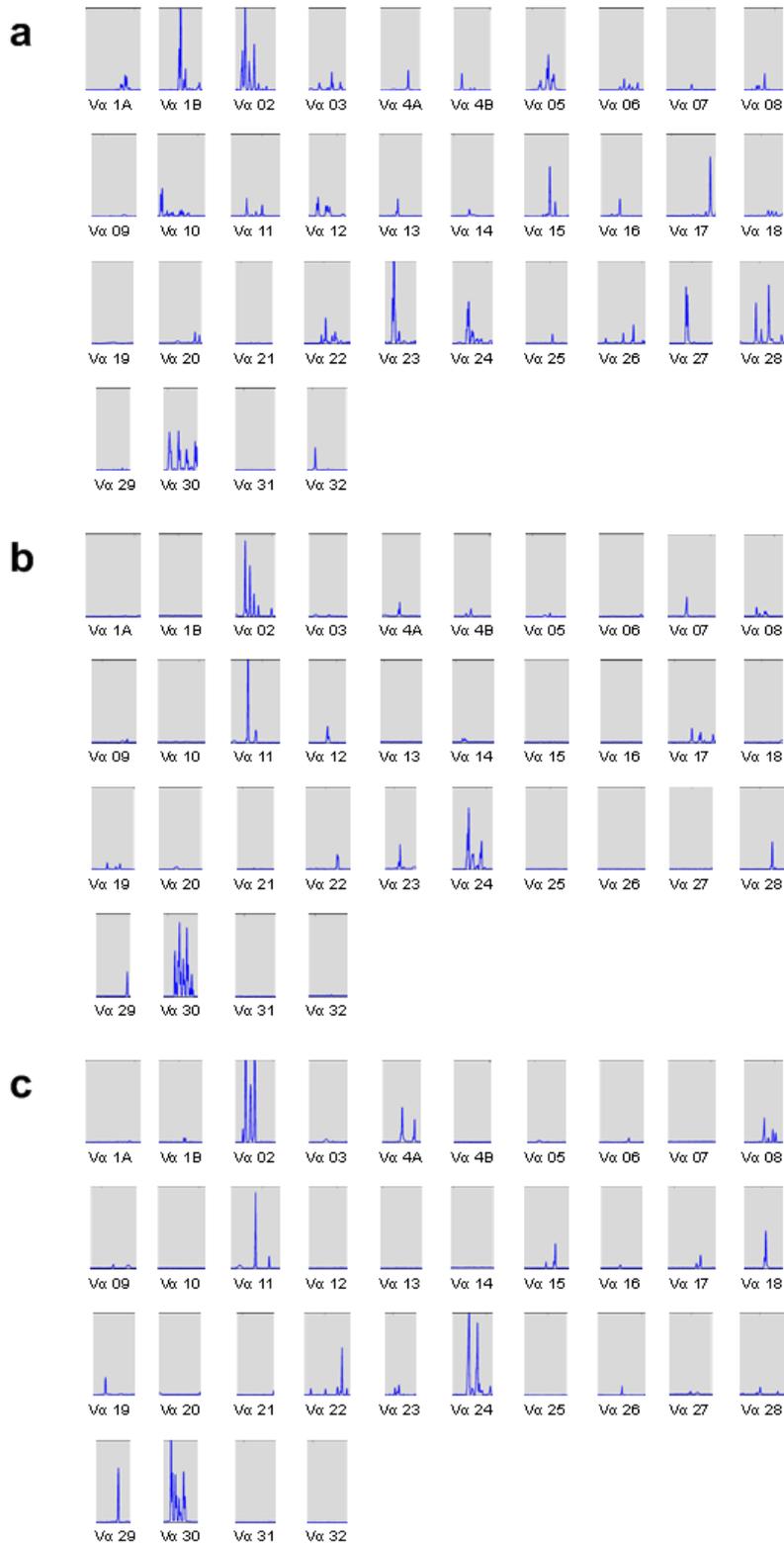


Abbildung 24. Spectratype-Analyse des TCRV α Repertoires gezeigt für Lunge, DR4-Match. Abgebildet sind die Repertoires anhand der V α -Segmente der Bulk- (a), Memory- (b) und CD276^{high} Memory-Transplantationskohorte (c).

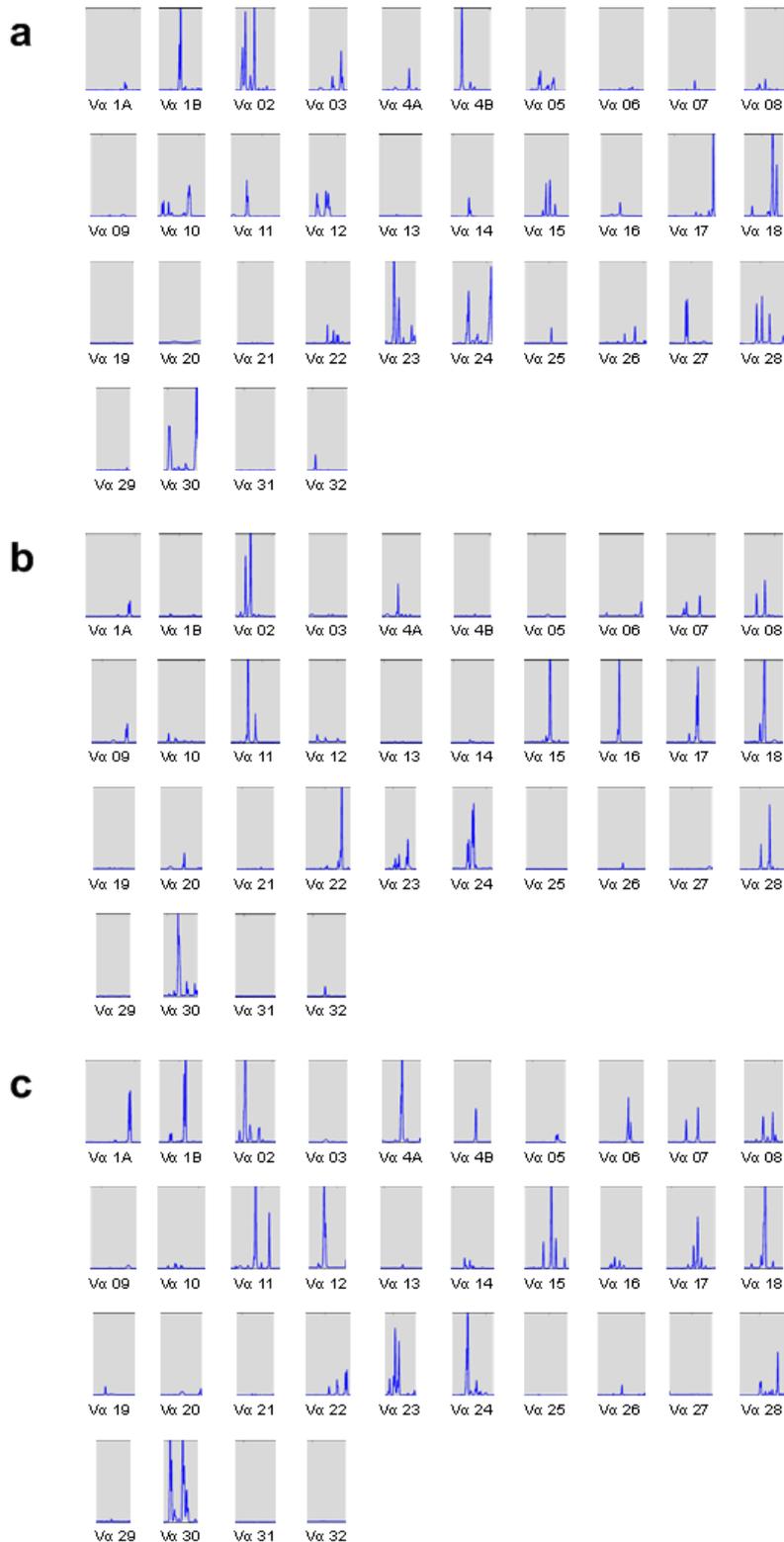


Abbildung 25. Spectratype-Analyse des TCRVα Repertoires gezeigt für Haut, DR4-Match. Abgebildet sind die Repertoires anhand der Vα-Segmente der Bulk- (a), Memory- (b) und CD276^{neg} Memory-Transplantationskohorte (c).

3.1.4.3 Complexity Scores in DR4-Mismatch und DR4-Match

Weiterhin war von Interesse, ob die Transplantation $CD4^+CD45RA^{neg}CD276^{neg}$ Grafts zur Reduktion der Komplexität im DR4-Mismatch und -Match führen würde. Die Komplexität umschreibt die Anzahl der Peaks innerhalb eines $V\alpha$ -Segments. Zur Quantifizierung der Komplexität wurden sog. Complexity Scores bestimmt (vgl. Abb. 19). Dafür wurden die Peaks der 34 $V\alpha$ -Segmente ausgezählt. Pro Segment wurde eine maximale Anzahl von 10 und folglich eine Gesamtzahl von maximal 340 Peaks angenommen.

Im DR4-Mismatch, als auch im DR4-Match, zeigte sich eine reduzierte Komplexität, da in beiden Fällen weniger als 100 Peaks pro Kohorte nachgewiesen wurden (vgl. MW Tabelle 18). Im DR4-Mismatch konnte eine signifikante Reduktion des Complexity Scores der $CD45RA^{neg}CD276^{neg}$ Memory-Rezipienten ($26,25\pm 7,53$) im Vergleich mit Bulk $CD4^+$ - und $CD45RA^{neg}$ Memory-Rezipienten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 26). Die $CD45RA^{neg}$ Memory-Transplantationskohorte zeigte eine leichte nicht-signifikante Abnahme des Complexity Scores im Vergleich mit Bulk. Diese Ergebnisse entsprachen der Abnahme der Diversität im DR4-Mismatch (vgl. 3.1.4.1). Im DR4-Match führte die Transplantation von $CD45RA^{neg}$ Memory-Grafts zu einer signifikanten Abnahme des Complexity Scores im Vergleich zur Kontrolle (Bulk $CD4^+$ Grafts). Auch zeigte sich eine signifikante Reduktion des Complexity Scores nach Transplantation $CD45RA^{neg}CD276^{neg}$ Zellgrafts im Vergleich zur Kontrolle. Zwischen $CD45RA^{neg}$ Memory- und $CD45RA^{neg}CD276^{neg}$ Memory-Rezipienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied, jedoch ein im Mittel niedriger Complexity Score für den $CD45RA^{neg}$ Memory-Graft (MW $37,5\pm 6,8$ vs. $52,75\pm 11,65$). Auch dieses Ergebnis stimmte mit der stärkeren Abnahme der TCR-Repertoire Diversität der $CD45RA^{neg}$ Memory-Kohorte im Vergleich mit der $CD45RA^{neg}CD276^{neg}$ Memory-Kohorte im DR4-Match überein (vgl. 3.1.4.2).

Zusammenfassend konnte eine Reduktion der Komplexität des TCR-Repertoires durch Transplantation $CD4^+CD45RA^{neg}CD276^{neg}$ Grafts im Vergleich mit der Bulk $CD4^+$ -Rezipienten im DR4-Mismatch und im DR4-Match nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Reduktion der Komplexität im DR4-Mismatch zwischen $CD45RA^{neg}$ Memory- und $CD45RA^{neg}CD276^{neg}$ Memory-Rezipienten.

Tabelle 18. Anzahl der Peaks pro Organgewebe und Kohorte.

Kohorte	Organgewebe				MW±SD
	Kolon	Leber	Lunge	Haut	
DR4-Mismatch					
Bulk	89	74	103	79	86,25±11,08
Memory	90	69	84	65	77±10,32
CD276 ^{neg} Memory	17	37	29	22	26,25±7,53
DR4-Match					
Bulk	86	69	87	64	76,5±10,16
Memory	39	28	36	47	37,5±6,8
CD276 ^{neg} Memory	43	52	44	72	52,75±11,65

Anmerkung: Es werden die ausgezählten Peaks pro Organgewebe und Kohorte angegeben.

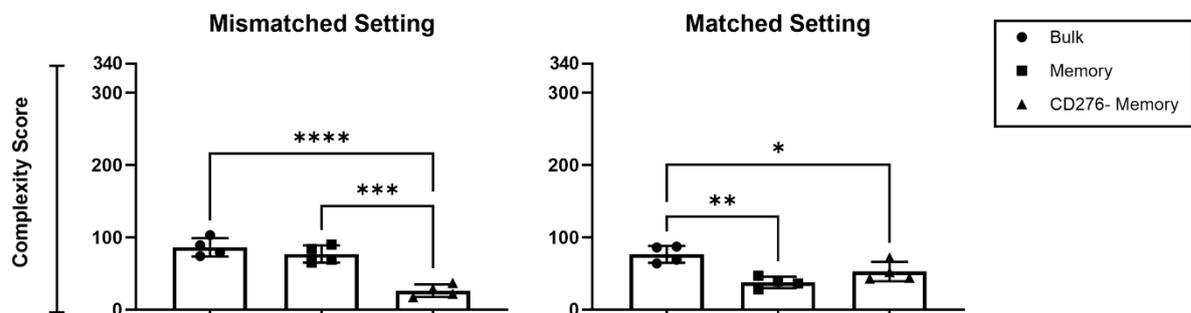


Abbildung 26. Complexity Scores gezeigt für Bulk-, Memory- und CD276^{neg} Memory-Kohorte, DR4-Mismatch und DR4-Match. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

3.2 Ergebnisse Mixed Lymphocyte Culture

3.2.1 Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomes, GATA-3, ROR γ t, FoxP3 in vitro

Zur Bestimmung von Veränderungen der Genexpression der Transkriptionsfaktoren nach CD276-Depletionen, wurden die depletierten CD276⁺ sowie ein Aliquot der

verbleibenden CD276^{neg} Zellen der MLC per qPCR analysiert (vgl. Abb. 27). Dabei wurden für jede Zellfraktion die MLC-Versuchsansätze nach 1- bis 5-maliger CD276-Depletion untersucht. Aufgrund der Rolle der Transkriptionsfaktoren im Rahmen der Differenzierung der Th-Zellsubpopulationen bzw. deren Rolle als sog. Master Regulator, ist durch die Untersuchung der Genexpression ein Rückschluss auf die vorliegenden Th-Zellen möglich. T-bet und Eomes fördern über die Aktivierung bestimmter Gene die Produktion von IFN- γ und Zytotoxizität und supprimieren die Differenzierung anderer T-Zellsubpopulationen. T-bet ist Master Regulator der Th1-Zellen, Eomes mit zytotoxischen Zellen (u.a. CTL, Th1-Zellen) assoziiert. GATA-3 ist Master Regulator der Th2-Zellen. ROR γ t, dessen Expression durch das Gen RORC gesteuert wird, ist Master Regulator der Th17-Zellen und FoxP3 dient u.a. als aktivierender Transkriptionsfaktor der Tregs.

Die Expression von T-bet zeigte ein heterogenes Bild. So wurden im Mittel ähnliche Werte in CD276⁺ und CD276^{neg} Zellfraktion nach der 1. und 4. CD276-Depletion gemessen, während die Expression nach 2. und 5. Depletion in der CD276⁺ Zellfraktion etwas niedriger und nach der 3. Depletion verglichen mit CD276^{neg} Zellfraktion erhöht war. Die Expression von Eomes zeigte im Mittel einen stetigen Anstieg in der CD276⁺ Zellfraktion mit Maximum nach der 5. Depletion (s. Tabelle 19). Die CD276^{neg} Zellfraktion wies besonders nach 1., 2. und 4. Depletion eine geringe Expression von Eomes auf, welche nach der 3. und 5. Depletion zunahm.

Die Expression von GATA-3 war in der CD276⁺ Zellfraktion nach Depletion 2-5 verglichen mit CD276^{neg} Zellen konstant erhöht. Die Genexpression von RORC zeigte nach der 2. und 3. Depletion in beiden Zellfraktionen erhöhte Werte, mit im Vergleich leicht erhöhten Werten der CD276⁺ Fraktion. Nach 4. und 5. CD276-Depletion konnte in beiden Fraktionen nur noch geringe RORC-Expression nachgewiesen werden. Die FoxP3-Expression wurde in der CD276^{neg} Zellfraktion konstant niedrig detektiert. Dagegen ließ sich in der CD276⁺ Zellfraktion ein Anstieg der FoxP3-Expression verglichen mit der CD276^{neg} Fraktion nach der 2. und 3. Depletion nachweisen. Im Anschluss nahm die nachgewiesene Expression nach 4. und 5. Depletion wieder ab. Dies zeigt nicht etwa einen höheren Anteil regulatorischer T-Zellen, sondern vielmehr eine erhöhte Aktivierung der CD276⁺ Zellen, da aktivierte T-Helferzellen transient FoxP3 exprimieren.

Zusammenfassend zeigte sich in der CD276⁺ Zellfraktion ein Anstieg der Genexpression für Eomes und GATA-3 ab der 3. Depletion. Demnach waren ab diesem Zeitpunkt vermehrt Zellen vom Th1- und Th2-Phänotyp in der Probe vorhanden. Interessanterweise wies die CD276⁺ Zellfraktion für die Genexpression von RORC zunächst nach der 2. Depletion eine Erhöhung auf, während die Expression der weiteren Transkriptionsfaktoren im Vergleich niedrig war. Daraus geht hervor, dass die isolierte CD276⁺ Zellfraktion nach der 2. Depletion viele Th17-Zellen enthielt und diese nach der 4. und 5. Depletion reduziert wurden. Die erhobenen Werte wiesen keine statistische Signifikanz auf.

Tabelle 19. Mittelwerte Genexpression in vitro, normalisiert auf GAPDH und 1x CD276-depletiert.

TF	Zellfraktion	CD276-Depletion				
		1x	2x	3x	4x	5x
T-bet	CD276 ^{neg}	1±0,36	1,7±0,38	2,08±0,89	2,01±0,51	2,82±0,61
	CD276 ⁺	1±0,4	1,15±0,6	4,3±0,42	1,73±0,46	1,63±0,38
Eomes	CD276 ^{neg}	1±0,83	0,83±0,23	4,25±3,83	2,02±1,35	9,4±3,74
	CD276 ⁺	1±0,14	1,64±1,41	5,32±4,33	20,23±11,75	60,25±43,4
GATA-3	CD276 ^{neg}	1±0,64	1,58±0,07	5,61±4,61	3±1,36	6,19±1,68
	CD276 ⁺	1±0,23	2,44±0,04	27,75±7,12	11,05±3,98	24,99±11,99
RORC	CD276 ^{neg}	1±0,72	2,34±1,07	2,33±1,08	0,96±0,2	0,68±0,55
	CD276 ⁺	1±0,24	3,5±0,69	4,02±0,54	1,87±0,03	0,28±0,28
FoxP3	CD276 ^{neg}	1±0,44	0,81±0,43	1,59±1,32	1,11±0,6	0,64±0,34
	CD276 ⁺	1±0,64	2,06±1,43	6,35±5,82	0,94±0,69	1,05±1,22

Anmerkung: Es werden die MW mit SD der 2^{-ΔCq} Werte in Bezug auf 1x CD276-depletiert (graue Markierung) pro Transkriptionsfaktor abgebildet. TF=Transkriptionsfaktor.

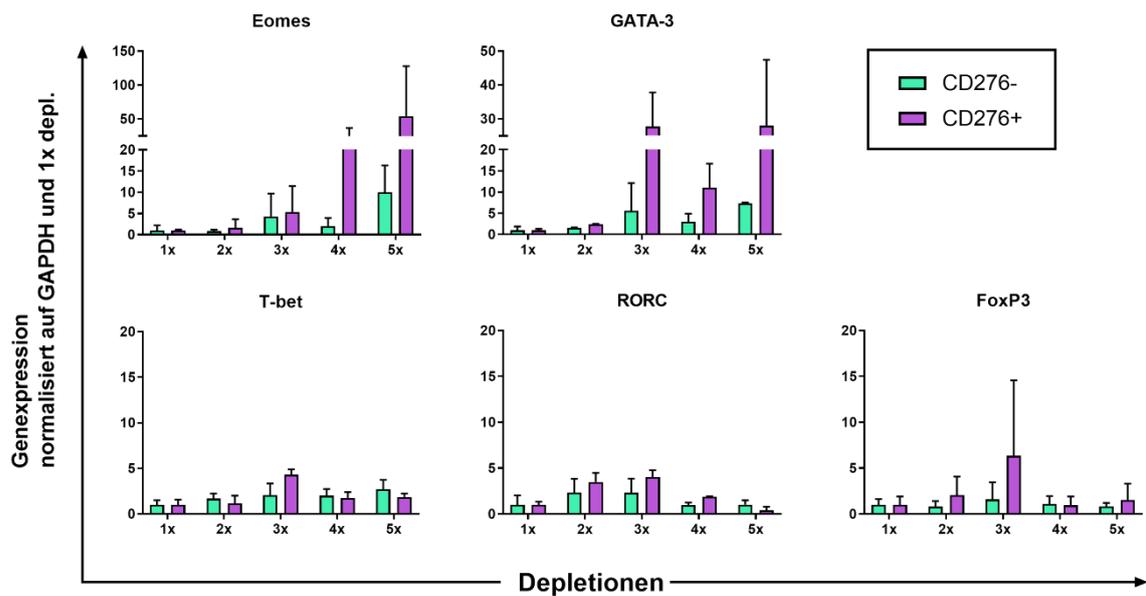


Abbildung 27. Genexpression der Transkriptionsfaktoren in CD276⁺ und CD276^{neg} Zellfraktion der MLC. Abgebildet ist die Genexpression der Transkriptionsfaktoren T-bet, Eomes, GATA-3, RORC und FoxP3 in CD276⁺ (lila) und CD276^{neg} (grün) Zellfraktion nach den CD276-Depletionen 1-5. Die Daten wurden auf den Wert nach der 1. CD276-Depletion normalisiert.

3.2.1.1 Bestimmung der GATA-3/RORC-Ratio CD276⁺ und CD276^{neg} Zellfraktionen der MLC

Weiterhin sollte geklärt werden, ob in vitro eine Abhängigkeit von GATA-3 und RORC-Expression besteht. Dafür wurde analog zu 3.1.3.2. die GATA-3/RORC-Ratio für CD276⁺ und CD276^{neg} Zellfraktion bestimmt (vgl. Abb. 28). Ein Anstieg der GATA-3/RORC-Ratio wurde in CD276⁺ und CD276^{neg} Zellfraktion ab der 3. CD276-Depletion beobachtet, wobei sich im Vergleich der Zellfraktionen erhöhte Werte für CD276⁺ Zellen zeigten. Ebenfalls kommt es in der CD276⁺ Zellfraktion zu einer stärkeren Zunahme der GATA-3/RORC-Ratio mit einem Maximum nach 5. Depletion. Dieser Wert ist verglichen mit der Ratio der CD276^{neg} Zellen nach 5. Depletion signifikant erhöht. Folglich wurden GATA-3 und RORC in beiden Zellfraktionen mit zunehmenden CD276-Depletionen gegenläufig exprimiert, nämlich vermehrt GATA-3 und weniger RORC. Insbesondere CD276⁺ Zellen wiesen eine ausgeprägte gegenläufige Expression auf.

Tabelle 20. Mittelwerte GATA-3/RORC-Ratio pro CD276-Depletion.

Zellfraktion	CD276-Depletion
--------------	-----------------

	1x	2x	3x	4x	5x
CD276 ^{neg}	1,13±0,17	0,84±0,35	1,9±1,1	3,58±2,16	8,14±2,79
CD276 ⁺	1±0,01	0,73±0,16	6,79±0,68	5,94±2,23	98,22±36,51

Anmerkung: Es werden die MW mit SD des Verhältnisses der Genexpression von GATA-3 und RORC (vgl. Tabelle 19) dargestellt.

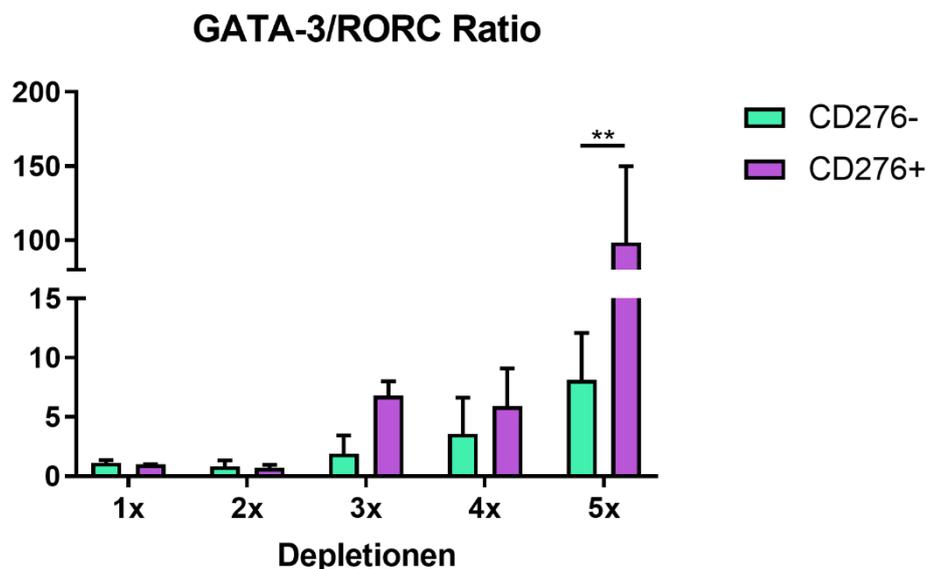


Abbildung 28. Verhältnis der Genexpression von GATA-3 zu RORC (GATA-3/RORC-Ratio) in vitro. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

3.2.2 Metronomische Depletion CD276⁺ Zellen reduziert den Anteil CD276⁺ Zellen bei erhaltener CD276-Reexpression in der CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion

Zur Prüfung der erfolgreichen Depletion und möglicher Reexpression CD276⁺ Zellen, wurden die CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktionen durchflusszytometrisch vor (vor der ersten Depletion bzw. 7 Tage nach vorangegangener Depletion) und nach in vitro CD276-Depletion (direkt im Anschluss an die Depletion) auf die Anzahl CD276⁺ Zellen untersucht (vgl. Abb. 29 und Tabelle 21). Vor der ersten Depletion betrug der prozentuale Anteil CD276⁺ Zellen im Mittel 17,5% der CD4⁺ und 18,6% der CD8⁺ Zellfraktion. Nach der ersten Depletion CD276⁺ Zellen konnte der Anteil in der CD4⁺ Zellfraktion auf 3,3% und in der CD8⁺ Zellfraktion auf 7,6% reduziert werden. Demnach wurde der größte Anteil CD276⁺ Zellen nach erstmaliger Depletion entfernt, wobei der prozentuale Anteil

nach Depletion in der CD4⁺ Zellfraktion weniger als die Hälfte des in der CD8⁺ Zellfraktion verbliebenen Anteils ausmachte.

In der CD4⁺ Zellfraktion wurde vor jeder konsekutiven Depletion ein leichter Anstieg des Anteils CD276⁺ Zellen gemessen (2x bis 5x, vgl. Abb. 29 und Tabelle 21), im Mittel vor Depletion 5,3%. Nach Depletion 2-5 wurde der Anteil CD276⁺ Zellen in der CD4⁺ Zellfraktion im Mittel auf 1,9% reduziert. Somit kam es innerhalb von 7 Tagen zu einer Reexpression von CD276⁺ Zellen in der CD4⁺ Zellfraktion, welche sich durch erneute Depletion nachhaltig reduzieren ließen. Eine komplette Entfernung CD276⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellfraktion war im beobachteten Zeitraum von 38-40 Tagen der MLC nicht möglich.

Nach erfolgter erster Depletion CD276⁺ Zellen in der CD8⁺ Fraktion wurde vor der zweiten CD276-Depletion ein reduzierter Wert von 3,6% gemessen. Der Anteil CD276⁺ Zellen betrug vor den Depletionen 2 bis 5 im Mittel 3%. Mit Ausnahme der Anzahl vor der zweiten Depletion, zeigte sich vor jeder folgenden CD276-Depletion ein leichter Anstieg des Anteils. Durch die folgenden Depletionen (2-5x) wurde der Anteil CD276⁺ Zellen auf im Mittel 1,2% reduziert. Die 5. Depletion reduzierte den Anteil CD276⁺ Zellen am geringsten. Damit ließ sich hier ebenfalls von der 2. bis zur 5. Depletion eine Reexpression CD276⁺ Zellen nachweisen.

Die angegebenen Werte vor der 6. Depletion wurden nur in 1 MLC erhoben und sind daher anekdotisch zu werten. In beiden Zellfraktionen erfolgte die stärkste Reduktion CD276⁺ Zellen im Rahmen der ersten Depletion. Beide Zellfraktionen zeigten eine Reexpression CD276⁺ Zellen, die durch erneute Depletion stetig <5 % gehalten werden konnte. In der CD8⁺ Zellfraktion konnten nach der 2. Depletion im Mittel konstant niedrigere Werte des Anteils CD276⁺ Zellen gemessen werden.

Tabelle 21. Prozentualer Anteil CD276⁺ Zellen vor und nach CD276-Depletionen, gezeigt für CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion.

CD276- Depletion	CD4		CD8	
	pre-Depletion [%]	post-Depletion [%]	pre-Depletion [%]	post-Depletion [%]
1x	17,5±1,6	3,28±1,92	18,6±0,7	7,62±4,4

2x	5,35±1,33	1,96±1,14	3,64±1,91	0,54±0,49
3x	5,85±4,49	1,78±1,29	2,98±1,0	0,82±0,66
4x	6,14±2,87	2,5±1,67	3,07±1,87	1,42±0,57
5x	3,69±0,77	1,38±0,68	2,34±0,29	2,07±1,62
2-5x	5,26±0,95	1,9±0,4	3,01±0,46	1,21±0,59

Anmerkung: Es werden die prozentualen MW ± SD von 2-3 MLC für den Anteil CD276⁺ Zellen vor und unmittelbar nach der Depletion angegeben. Die letzte Zeile gibt den MW ± SD der Werte für Depletion 2-5x an.

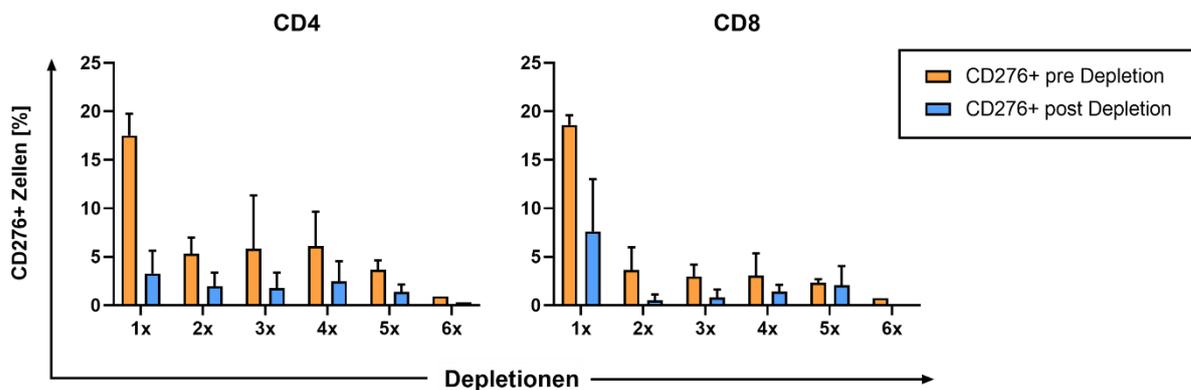


Abbildung 29. Anteil CD276⁺ Zellen nach metronomischen CD276-Depletionen gezeigt für CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion. Abgebildet ist der prozentuale Anteil CD276⁺ Zellen vor der Depletion (orangene Balken), d.h. vor der Depletion bzw. 7 Tage nach der letzten Depletion, und nach der Depletion (blaue Balken), d.h. direkt im Anschluss an den Depletionsvorgang.

3.2.3 Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker in der CD4⁺ Zellfraktion der MLC

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Depletion von naiven T-Zellen (CD45RA⁺) sowie aktivierten T-Zellen der Memory-Fraktion (CD276⁺) auf Alloreaktivität, Aktivierung und Proliferation wurde die Expression verschiedener intra- und extrazellulärer Marker durchflusszytometrisch gemessen. Die Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF α , der Aktivierungsmarker CD137, CD69, CD25, PD-1 und HLA-DR sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 wurden für die CD4⁺ Zellfraktion prozentual bestimmt

(vgl. Abb. 30). Von Interesse war, ob die Expression von IFN- γ und TNF α als Antwort auf einen Stimulus reduziert werden kann. Beide Zytokine sind charakteristisch für Th1-Zellen und über unterschiedliche Mechanismen mit inflammatorischen Prozessen assoziiert. Die Oberflächenmarker CD69, CD25, PD-1, HLA-DR und CD137 werden von aktivierten T-Zellen exprimiert. PD-1 counterreguliert die Aktivierung und dient der Aufrechterhaltung der peripheren T-Zelltoleranz. CD25 wird von aktivierten Th-Zellen, aber auch Tregs exprimiert. Ki-67 ist indikativ für die Zellproliferation. Die Werte der MLC, in der ausschließlich CD45RA-depletierte T-Zellen reagierten (\cong 0 der Abb. 30), dienten als Kontrolle.

Für die proinflammatorischen Zytokine zeigte sich ein heterogenes Bild nach den Depletionen. IFN- γ^+ Zellen konnten verglichen mit der Kontrolle (2,1%) durch die 1., 4. und 5. Depletion CD276 $^+$ Zellen prozentual leicht reduziert werden, jedoch zeigte sich nach 2. (2,2%) und 3. Depletion (2,5%) im Mittel ein leichter Anstieg. TNF α^+ Zellen wurden durch die Depletionen nicht merklich reduziert, im Gegenteil wurde ein leichter Anstieg des Zellanteils mit Maximum nach der 2. Depletion (1,9%) im Vergleich mit der Kontrolle (1,5%) beobachtet. Einen ähnlichen Verlauf zeigte der Anteil CD137 $^+$ Zellen. CD69 $^+$ Zellen stellten durchgehend einen hohen prozentualen Anteil der CD4 $^+$ Zellfraktion (im Mittel 49,9%) dar. Eine leichte Reduktion im Vergleich zur Kontrolle trat nach erfolgten CD276-Depletionen (1-5) auf. Der Anteil CD25 $^+$ zeigte, verglichen mit der Kontrolle (18,4%), nach erfolgten CD276-Depletionen ansteigende Werte bis maximal 27,3% nach 5-maliger Depletion. PD-1 $^+$ Zellen wiesen ein annähernd homogenes Bild ohne auffällige Änderungen der Expression über die Zeit auf. Ki-67 $^+$ und HLA-DR $^+$ Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle einen transienten Anstieg nach 1., 2., 3. und 4. Depletion, wobei nach der 5. Depletion eine Annäherung an den Kontrollwert erfolgte.

Zusammenfassend wurden in der CD4 $^+$ Zellfraktion IFN- γ^+ Zellen im Vergleich mit der Kontrolle nach 1., 4. und 5. Depletion leicht, jedoch nicht signifikant, reduziert. TNF α^+ Zellen wurden nicht reduziert. Weiterhin wurde kein ausgeprägter Einfluss der konsekutiven Depletionen CD276 $^+$ Zellen auf die Expression der Aktivierungsmarker CD69, PD-1 und CD137 beobachtet, welche ein weitgehend homogenes Bild aufwiesen. Eine Ausnahme stellte hier der Anstieg der HLA-DR $^+$ und CD25 $^+$ Zellen dar, welcher indikativ für die Aktivierung der Zellen im Rahmen des HLA-Mismatch sein könnte. Der Anstieg an Ki-67 $^+$ Zellen ist hinweisend für eine Steigerung der Zellproliferation im CD4 $^+$

Kompartiment nach erfolgten Depletionen. Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Expression untersuchter Marker.

Tabelle 22. Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarkern in der CD4⁺ Zellfraktion.

Parameter	CD276-Depletion					
	0	1	2	3	4	5
IFN- γ	2,07 \pm 0,7	1,48 \pm 0,37	2,17 \pm 1,07	2,48 \pm 0,96	1,27 \pm 0,2	1,63 \pm 0,95
TNF α	1,48 \pm 0,45	1,57 \pm 0,58	1,94 \pm 0,44	1,71 \pm 0,33	1,53 \pm 0,55	1,41 \pm 0,69
CD137	0,93 \pm 0,32	1,14 \pm 0,12	1,39 \pm 0,02	1,35 \pm 0,1	1,16 \pm 0,35	0,97 \pm 0,63
CD69	55,23 \pm 8,82	49,85 \pm 1,65	48,65 \pm 3,85	50,3 \pm 0,2	42,55 \pm 6,05	52,9 \pm 11,23
CD25	18,38 \pm 7,87	20,35 \pm 0,45	21,3 \pm 0,3	21,7 \pm 3,4	22,2 \pm 1,5	27,27 \pm 7,89
PD-1	66,53 \pm 3,17	68,9 \pm 2,1	67,8 \pm 5,5	65,55 \pm 2,05	66,45 \pm 0,25	62,03 \pm 1,76
HLA-DR	17,47 \pm 0,66	23,45 \pm 4,05	21,65 \pm 0,65	28 \pm 0,8	26,1 \pm 3	17,45 \pm 8,84
Ki-67	11,45 \pm 6,5	17,2 \pm 1,2	16,6 \pm 1,6	18,15 \pm 2,05	16,15 \pm 0,85	12,23 \pm 6,11

Anmerkung: Es werden die prozentualen MW \pm SD der markierten Zellen aus 2 bzw. 3 (nur für 0 und 5) MLC-Spenderkombinationen angegeben.

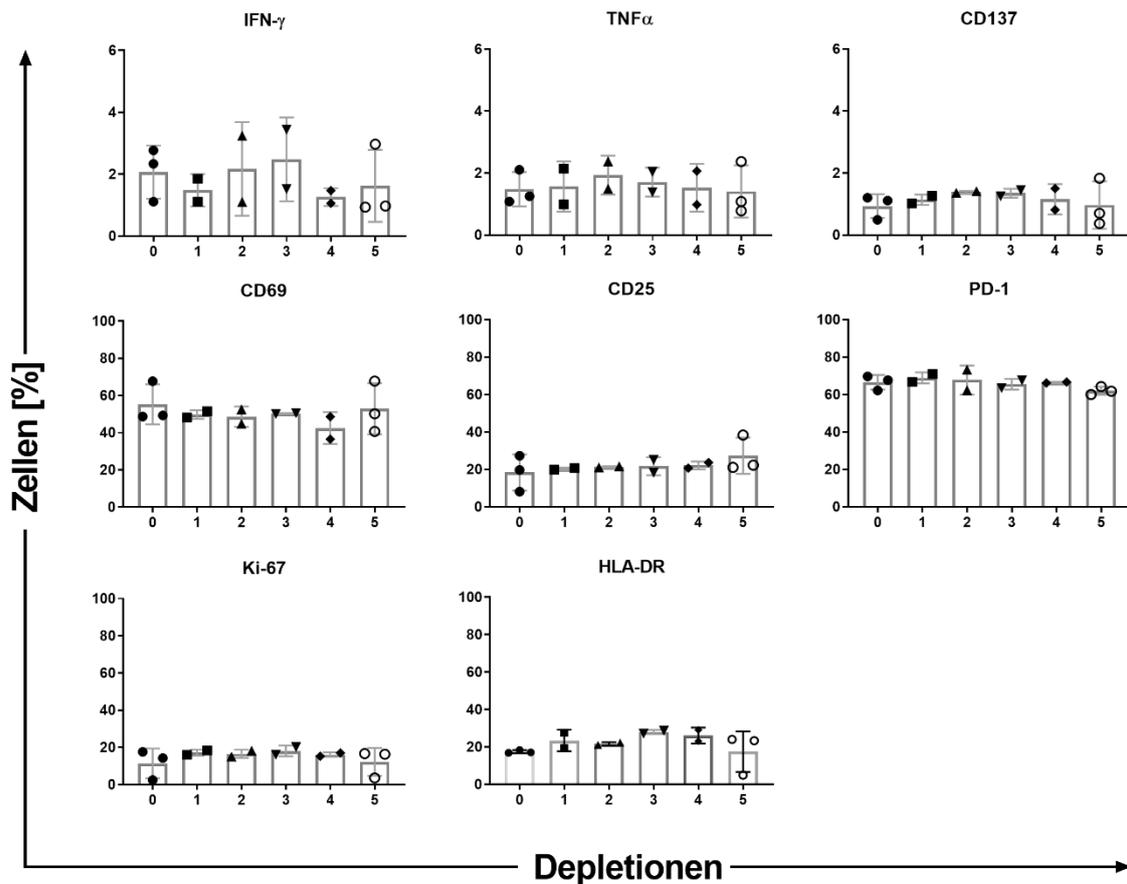


Abbildung 30. Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker in der CD4⁺ Zellfraktion. Abgebildet ist der Anteil der markierten Zellen in Prozent nach CD276-Depletionen (1-5). Die Kontrolle stellen die CD45RA-depletierten Zellen (=0) dar.

3.2.4 Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker in der CD8⁺ Zellfraktion der MLC

Die Expression von IFN- γ , TNF α , CD137, CD69, CD25, PD-1, HLA-DR und Ki-67 wurden ebenfalls in der CD8⁺ Zellfraktion der MLC untersucht (vgl. Abb. 31 und Tabelle 23). Der Anteil IFN- γ ⁺ Zellen wurde nach der 1. Depletion reduziert (1,6%). Anzumerken ist, dass sich in zwei MLC-Paarungen ähnliche Werte zeigten, jedoch in der dritten MLC ein hoher Wert gemessen wurde (vgl. Abb. 31). Ob dies ein Ausreißer war oder ein Wert, der in die Norm gehört, müssten weitere Experimente untersuchen. Sollte man diesen Ausreißer nicht in die Wertung mit einbeziehen, würde sich sogar ein leichter Anstieg der IFN- γ ⁺ Zellen nach einmaliger CD276-Depletion zeigen. Nach den folgenden Depletionen (2, 4 und 5) wurden verglichen mit der Kontrolle leichte Reduktionen der IFN- γ ⁺ Zellen beobachtet, lediglich nach der 3. Depletion zeigte sich ein geringer Anstieg. Die

Expression von $\text{TNF}\alpha^+$ Zellen wurde zunächst im Rahmen der ersten CD276-Depletion im Vergleich mit der Kontrolle minimal reduziert (1,8%), stieg jedoch im Verlauf bis auf im Mittel 2,3% nach 3. Depletion an. Würde der negative Ausreißer der dritten MLC in der Kontrolle nicht gewertet werden, läge eine durchgehende leichte Reduktion der $\text{TNF}\alpha^+$ Zellen nach Depletionen 1-5 vor. CD137^+ Zellen stiegen nach Depletion 1-4 verglichen mit der Kontrolle im T-Zellpool an, das Maximum betrug im Mittel 1,7% nach der 3. Depletion. CD69^+ Zellen zeigten ein heterogenes Bild. Dieser Zellanteil ließ sich durch CD276-Depletion 1-4 reduzieren, stieg jedoch im Mittel nach der 5. Depletion erneut in etwa auf den Kontrollwert an (68,1%). CD25^+ Zellen konnten nach Depletion 1-3 reduziert werden, zeigten jedoch einen Anstieg nach der 4. und 5. Depletion. Auffällig ist hier die unterschiedlich starke Ausprägung der Werte der untersuchten MLCs. PD-1^+ Zellen zeigten insgesamt durch die metronomischen CD276-Depletionen reduzierte Werte blieben somit durchgängig unterhalb der Kontrolle (30,7%), die stärkste Reduktion erfolgte nach der 1. Depletion auf im Mittel 13,9%. Ki-67^+ Zellen zeigten ein annähernd homogenes Bild mit leichten Schwankungen um den Kontrollwert (8,3%). Der Anteil HLA-DR^+ Zellen wurde ebenfalls nur leicht ausgelenkt, so reduzierte sich der Anteil nach der 1., 2., 3. und 5. Depletion und stieg nach der 4. Depletion auf im Mittel 34% an. Zusammenfassend zeigte sich in der CD8^+ Zellfraktion im Rahmen der CD276-Depletionen eine Reduktion der Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD25, PD-1, insbesondere nach der 1. Depletion. Sollte der Ausreißer der $\text{IFN-}\gamma^+$ Zellen nicht gewertet werden, kam es hier zu einem leichten Anstieg der exprimierenden Zellen. $\text{TNF}\alpha^+$ Zellen konnten wiederum, unter Annahme eines Ausreißers, insbesondere nach der 1. Depletion reduziert werden. Auch hier konnten insgesamt keine signifikanten Veränderungen der Expression der untersuchten Marker im Rahmen der metronomischen CD276-Depletionen beobachtet werden.

Tabelle 23. Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker in der CD8^+ Zellfraktion.

Parameter	CD276-Depletion					
	0	1	2	3	4	5
IFN- γ	2,65±1,88	1,58±0,03	2,21±0,42	2,97±0,78	1,3±0,48	2,15±1,42

TNF α	1,91 \pm 0,64	1,78 \pm 0,4	2,16 \pm 0,14	2,32 \pm 0,02	2 \pm 0,43	1,69 \pm 0,58
CD13 7	0,79 \pm 0,13	1,47 \pm 0,49	1,5 \pm 0,52	1,66 \pm 0,48	0,98 \pm 0,11	0,77 \pm 0,32
CD69 8	68,43 \pm 10,9	43,95 \pm 15,0	41,55 \pm 14,0	62,6 \pm 11,8	60,85 \pm 0,15	68,1 \pm 8,39
CD25 5	53,97 \pm 22,9	40,2 \pm 23,1	41,4 \pm 25,1	52,2 \pm 22,1	58,55 \pm 24,1	70 \pm 20,18
PD-1 2	30,73 \pm 12,8	13,94 \pm 5,57	14,49 \pm 7,11	18,1 \pm 3,9	18,35 \pm 3,35	21,93 \pm 7,3
HLA- DR	29,87 \pm 1,9	28 \pm 4,7	27,45 \pm 3,85	30,55 \pm 0,4	33,95 \pm 5,95	21,48 \pm 9,7
Ki-67	8,32 \pm 2,2	7,95 \pm 0,85	8,57 \pm 0,16	9,53 \pm 0,41	7,26 \pm 0,4	8,59 \pm 1,26

Anmerkung: Es werden die prozentualen MW \pm SD der markierten Zellen aus 2 bzw. 3 (für 0 und 5) MLC-Spenderkombinationen angegeben.

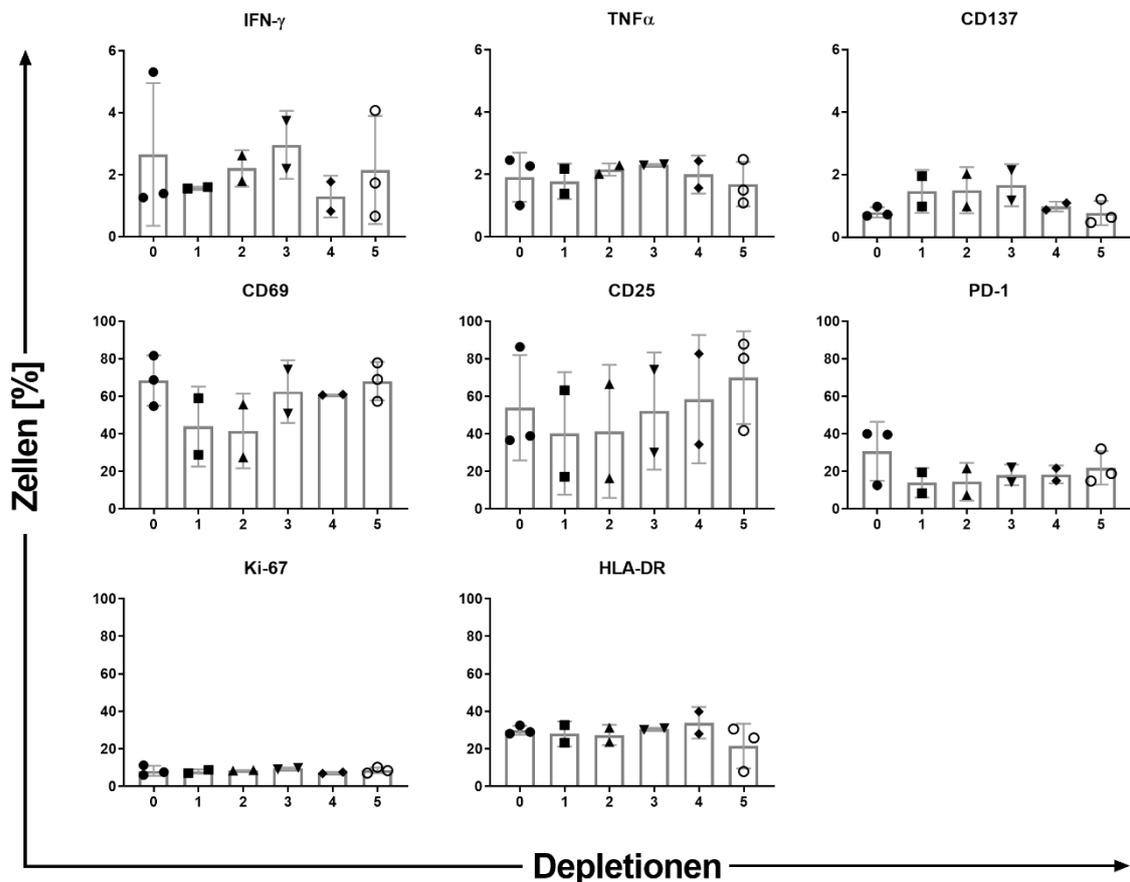


Abbildung 31. Expression proinflammatorischer Zytokine, Aktivierungs- und Proliferationsmarker in der CD8⁺ Zellfraktion. Abgebildet ist der Anteil der markierten Zellen in Prozent nach CD276-Depletionen (1-5). Die Kontrolle stellen die CD45RA-depletierten Zellen (=0) dar.

3.2.5 Expression von IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und IL-17A in der CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion der MLC nach metronomischer Depletion CD276⁺ Zellen

Hinsichtlich der Relevanz von Interleukinen bezüglich Differenzierung und Entwicklung naiver T-Zellen sowie deren Zuordnung zu bestimmten T-Zell-Subpopulationen, wurden die Zellen der MLCs durchflusszytometrisch auf die Expression der Interleukine IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und IL-17A untersucht. Von Interesse war, ob die konsekutiven Depletionen CD276⁺ Zellen zu einer Zu- bzw. Abnahme der Interleukin-produzierenden Zellen führten. Eine Unterscheidung wurde in CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion vorgenommen, untersucht wurden nicht-depletierte CD45RA^{neg} sowie zudem 1- bis 3-mal CD276-depletierte MLCs (vgl. Abb. 32 und Tabelle 24). Werte, die sich für die CD45RA^{neg} MLC ergaben, dienen als Referenzwert bzw. Kontrolle. IL-4, IL-5 und IL-13 sind charakteristische Interleukine für Th2-Zellen und werden unter Kontrolle von GATA-3 produziert.

IL-4 initiiert ebenfalls die Differenzierung zu Th2-Zellen. IL-10 wird als Effektorzytokin von Tregs der Mediation inflammatorischer Reaktionen zugeordnet. IL-17A wird von Th17-Zellen produziert und hat im Rahmen der GVHD proinflammatorische Eigenschaften.

Innerhalb der CD4⁺ Zellfraktion zeigte sich ein im Vergleich mit den anderen Interleukinen deutlich erhöhter Anteil IL-17A produzierender Zellen. Dieser lag bereits in der Kontrolle vor und war durch die konsekutiven CD276-Depletionen im Trend steigend. Der Anteil IL-4 und IL-10 produzierender Zellen nahm nach der 1. Depletion im Vergleich zur Kontrolle zu. IL-4 exprimierende Zellen nahmen nach der 2. Depletion prozentual zu und wiesen konstant erhöhte Werte verglichen mit der Kontrollgruppe auf. Für IL-5 produzierende T-Zellen wurden die niedrigsten Werte detektiert, diese wurden auch durch die Depletionen nicht verändert. IL-13 sekretierende T-Zellen wiesen prozentual konstant Werte unterhalb der Kontrolle auf.

Die CD8⁺ Zellfraktion wies einen deutlich geringeren Anteil IL-17A produzierender Zellen gegenüber der CD4⁺ Zellfraktion auf. Insgesamt zeigten sich anteilig mehr IL-13 und IL-17A sezernierende Zellen als IL-4, IL-5 und IL-10 produzierende Zellen. IL-4, IL-13 und IL-17A produzierende Zellen wurden durch die einmalige CD276-Depletion leicht reduziert und zeigten nach der 2. Depletion einen geringen Anstieg. Die IL-5 und IL-10 exprimierenden Zellen wiesen ähnliche Werte im Rahmen der Depletionen auf und wurden durch diese unwesentlich moduliert.

Insgesamt zeigte die Expression der untersuchten Interleukine nach CD276-Depletionen keine signifikanten Veränderungen. Der hohe Anteil IL-17A produzierender Zellen in der CD4⁺ Zellfraktion, indikativ für Th17-Zellen, wurde weiterhin durch CD276-Depletionen erhöht und kann daher als Trend gewertet werden. Die steigenden Werte für IL-4 und IL-10 exprimierende T-Zellen in der CD4⁺ Zellfraktion, insbesondere nach einmaliger CD276-Depletion, deuten auf eine steigende Anzahl von T-Zellen mit einem Th2- bzw. Treg-Phänotyp hin. Der Anteil Interleukin-produzierender Zellen im CD8⁺ Zellkompartiment wird im Vergleich mit der CD4⁺ Zellfraktion deutlich geringer moduliert.

Tabelle 24. Anteil [%] Interleukin-produzierender Zellen in CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion der MLC.

Interleukin	CD276-Depletionen
--------------------	--------------------------

	0	1	2	3
CD4⁺ Zellfraktion				
IL-4	3,37±1,51	5,18±1,67	5,66±2,93	4,43±2,04
IL-5	3±0,86	2,91±0,84	3,36±1,58	2,35±0,57
IL-10	5,58±0,9	7,76±2,65	5,73±0,38	5,84±1,07
IL-13	9,44±5,37	6,51±3,59	8,48±3,42	8,31±2,6
IL-17A	25,95±1,25	29,15±1,35	29,45±3,55	30,15±6,35
CD8⁺ Zellfraktion				
IL-4	3,65±2,23	3,35±0,62	4,18±1,86	2,84±1,01
IL-5	4,3±0,01	5,26±1,31	4,62±0,68	3,51±0,01
IL-10	4,84±1,44	5,19±0,01	5,98±0,51	4,8±0,19
IL-13	9,63±4,47	8,99±4,22	11,96±6,25	11,16±4,85
IL-17A	9,7±4,9	8,34±3,16	9,45±5,35	9,64±6,67

Anmerkung: Es werden die MW±SD aus 2 MLC (n=2) als prozentualer Anteil der produzierenden Zellen in CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion angegeben. Gezeigt werden die Werte ausschließlich CD45RA-depletierter Zellen (0) und nach 1-3 CD276-Depletionen (1, 2, 3).

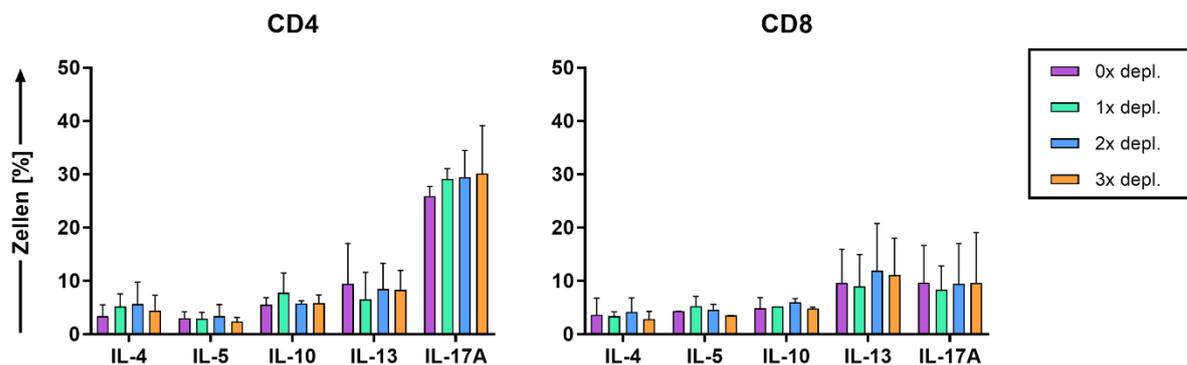


Abbildung 32. Anteil verbleibender Interleukin-produzierender Zellen in CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion der MLC nach Depletion von CD276⁺ Zellen. Abgebildet ist der prozentuale Anteil IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und IL-17A produzierender Zellen in nicht CD276-depletierter CD45RA^{neg} Kontrolle (0x depl, lila) und 1- bis 3-mal CD276-depletierter MLC (1x, türkis; 2x, blau; 3x, orange).

3.2.6 Erhalt der anti-viralen Aktivität CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nach Depletion CD45RA⁺CD276⁺ Zellen in vitro

Eine essenzielle Funktion der T-Zellen ist die Abwehr viraler Pathogene. Der Erhalt dieser Funktion, trotz Modifikation des Grafts, ist im Rahmen einer HSCT für das Überleben des Empfängers wichtig. Daher war zu klären, ob weiterhin eine anti-virale Aktivität nach Depletion CD276⁺ Zellen besteht. Dafür wurden die nicht depletierten CD45RA^{neg} ($\cong 0$) und CD276-depletierten MLCs ($\cong 1-5$) autolog mit (pep⁺) und ohne (pep^{neg}) virale Peptide stimuliert (vgl. Abb. 33). Ein Anstieg IFN- γ exprimierender Zellen wurde als erhaltene Reaktion auf die Stimulation durch virale Peptide gewertet. Abbildung 24 bildet die Ergebnisse einer MLC-Paarung exemplarisch für die CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktionen ab. Als Referenz bzw. Kontrolle diente die nicht CD276-depletierten CD45RA^{neg} Zellen der MLC.

Die Anteile IFN- γ ⁺ Zellen der CD4⁺ Zellfraktion streuten im pep^{neg} Versuchsansatz um 0,5%, im Vergleich zeigten sich die Werte im pep⁺ Versuchsansatz signifikant erhöht (1,6%). Die peptidstimulierten Werte nach 1. und 3. CD276-Depletion lagen etwas unterhalb, jedoch nach 2., 4. und 5. Depletion oberhalb der Kontrolle. Insgesamt zeigte sich jedoch im Vergleich mit nicht stimulierten Zellen in jedem Ansatz ein um das 3,49- bis 5,17-facher Anstieg der IFN- γ ⁺ Zellen.

In der CD8⁺ Zellfraktion zeigten sich in pep⁺ und pep^{neg} Versuchsansatz ähnlich gestreute Werte mit einem im Mittel leicht erhöhten Anteil IFN- γ ⁺ Zellen der Peptid-stimulierten (1,4%) gegenüber den nicht stimulierten Zellen (1%). Der Referenzwert wies hier interessanterweise für pep⁺ eine Reduktion der IFN- γ ⁺ Zellen auf. Folgende Werte nach CD276-Depletionen im pep⁺ Versuchsansatz zeigten verglichen mit den pep^{neg} Zellen konstant einen Anstieg um das 1,07- bis 2,51-fache.

Damit wurde eine ausgeprägtere Stimulation IFN- γ ⁺ Zellen durch virale Peptide in der CD4⁺ als in der CD8⁺ Zellfraktion beobachtet. Beide Zellfraktionen zeigten jedoch weiterhin einen Anstieg der IFN- γ ⁺ Zellen und folglich, trotz Depletion CD45RA⁺CD276⁺ Zellen, anti-virale Aktivität.

Tabelle 25. Anti-virale Aktivität der MLC in CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion.

Depletionen	CD4 ⁺ Zellfraktion		CD8 ⁺ Zellfraktion	
	pep ⁺	pep ^{neg}	pep ⁺	pep ^{neg}

0	1,31	0,7	0,57	0,87
1	1,15	0,25	2,26	0,9
2	2,38	0,46	2,32	1,85
3	1,25	0,3	0,98	0,69
4	1,99	0,54	1,38	0,91
5	1,57	0,45	0,62	0,58
MW±SD	1,61±0,44	0,45±0,15	1,36±0,71	0,97±0,41

Anmerkung: Angegeben ist der Anteil IFN- γ ⁺ Zellen [%] in der CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion nach autologer Stimulation mit (pep⁺) und ohne (pep^{neg}) virale Peptide, exemplarisch anhand einer MLC. Die Werte wurden für die CD45RA^{neg} Kontrolle (0) und die CD276-Depletionen 1-5 erhoben. Weiterhin ist der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) für die Werte der Depletionen 0-5 pro Versuchsansatz angegeben.

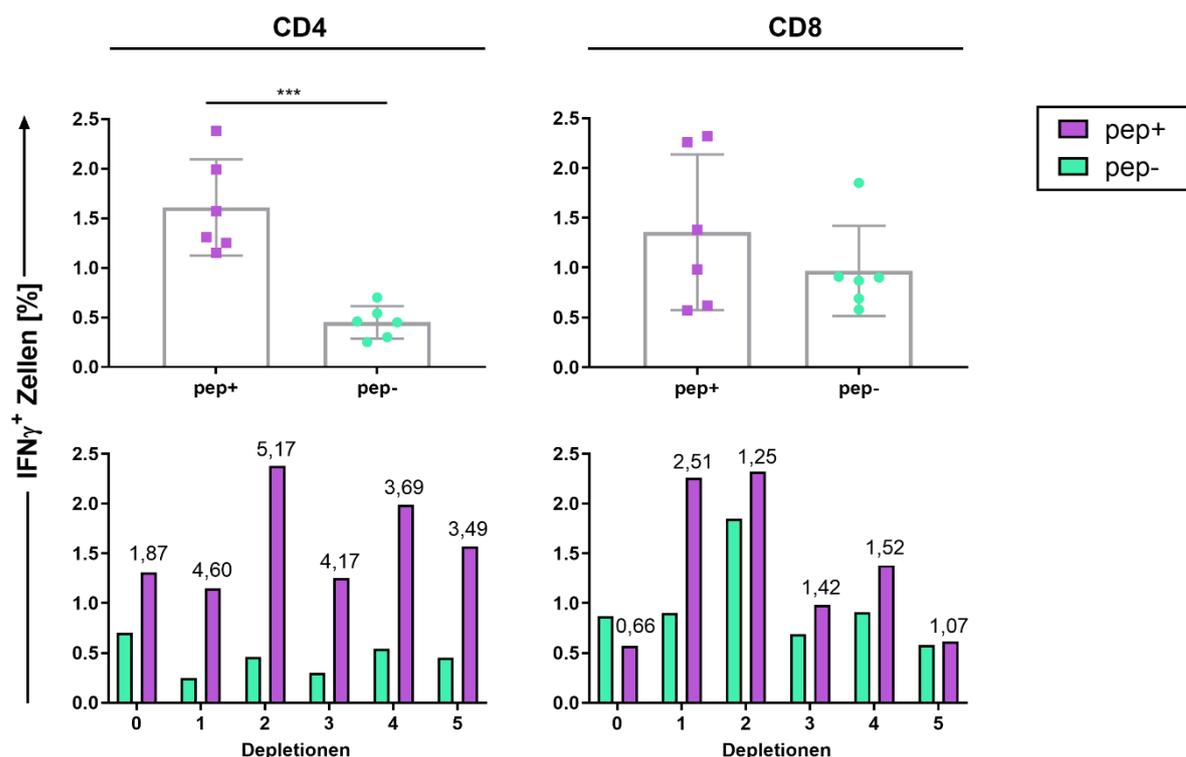


Abbildung 33. Anti-virale Aktivität in CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion der MLC. Dargestellt sind die Werte einer MLC (n=1) für IFN- γ ⁺ Zellen [%] nach autologer Stimulation mit (pep⁺, lila) und ohne (pep⁻, grün) virale Peptide. Es werden die Mittelwerte beider Versuchsansätze verglichen (Graphen oben) und die Einzelwerte pro Depletion (1-5) mit dem x-Fachen im Vergleich zu pep⁻ angegeben (oberhalb der Balken).

3.2.7 Erhalt der anti-Tumor Aktivität nach Depletion CD45RA⁺CD276⁺ Zellen in vitro

Neben dem Erhalt einer intakten Immunantwort gegenüber viralen Pathogenen, ist besonders im Rahmen der HSCT bei malignen Erkrankungen ein Erhalt der Immunantwort gegen Neo-/Fremdantigene essenziell. Diese Aktivität spielt auch in Bezug auf den kurativen Therapieansatz der HSCT eine wichtige Rolle hinsichtlich des GVT- bzw. GVL-Effektes. Demnach war von Interesse, ob weiterhin eine Antwort des CD45RA^{neg}CD276^{neg} Graft gegenüber Neo-/Fremdantigenen auslösbar ist. Dafür wurden die CD276-depletierten Zellpools mit Antigenen eines dritten Spenders inkubiert und als Reaktion auf die Stimulation der Anteil IFN- γ ⁺ Zellen in CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion durchflusszytometrisch bestimmt. Als Referenzwert bzw. Kontrolle diente der Anteil IFN- γ ⁺ Zellen der nicht CD276-depletierten CD45RA^{neg} Zellen ($\cong 0$ in Abbildung 34 und Tabelle 26). In die Auswertung wurden die Werte von zwei MLCs (n=2) einbezogen (vgl. Abb. 34).

In der CD4⁺ Zellfraktion zeigte sich im Mittel, mit Ausnahme des Zellpools nach der 1. Depletion, ein Anstieg der IFN- γ ⁺ Zellen verglichen mit der Kontrolle. Der höchste Anstieg zeigte sich nach der 5. Depletion (MW 2,8%). In der CD8⁺ Zellfraktion wurde eine Erhöhung des Anteils der IFN- γ ⁺ Zellen nach jeder CD276-Depletion (1-5) beobachtet (MW 2,3% ggü. 1% für Kontrolle). Hier kam es zum höchsten Anstieg der IFN- γ ⁺ Zellen nach der 3. Depletion (MW 2,9%).

Demnach kam es nach Stimulation durch Antigene einer dritten Person, trotz repetitiver CD276-Depletion, weiterhin zu einer Immunantwort, indikativ durch den Anstieg der IFN- γ produzierenden Zellen. Folglich kann von einem Erhalt der Immunantwort gegenüber Neo- bzw. Fremdantigenen ausgegangen werden. Da es sich dabei um Neoepitope handelt, schließt dies maßgeblich die Aktivität gegenüber Viren und Bakterien mit ein.

Tabelle 26. Aktivität gegenüber Neo-/Fremdantigenen in CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion.

Depletionen	CD4⁺ Zellfraktion	CD8⁺ Zellfraktion
0	1,27 \pm 0,46	0,9 \pm 0,4
1	1,07 \pm 0,06	1,62 \pm 0,24
2	1,76 \pm 0,25	2,52 \pm 0,62

3	2,41±0,83	2,86±1,37
4	1,41±0,18	2,14±0,98
5	2,82±0,7	2,28±0,61
MW±SD (1-5)	1,89±0,64	2,28±0,41

Anmerkung: Angegeben ist der Anteil IFN- γ + Zellen [%] in der CD4+ und CD8+ Zellfraktion nach Stimulation mit Fremdantigenen. Die Daten von zwei MLCs bzw. Spenderkombinationen (n=2) wurden ausgewertet. Die Werte wurden für die CD45RA- Kontrolle (0) und die CD276-Depletionen 1-5 erhoben. Weiterhin ist der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) für die Werte der Depletionen 1-5 pro Versuchsansatz angegeben.

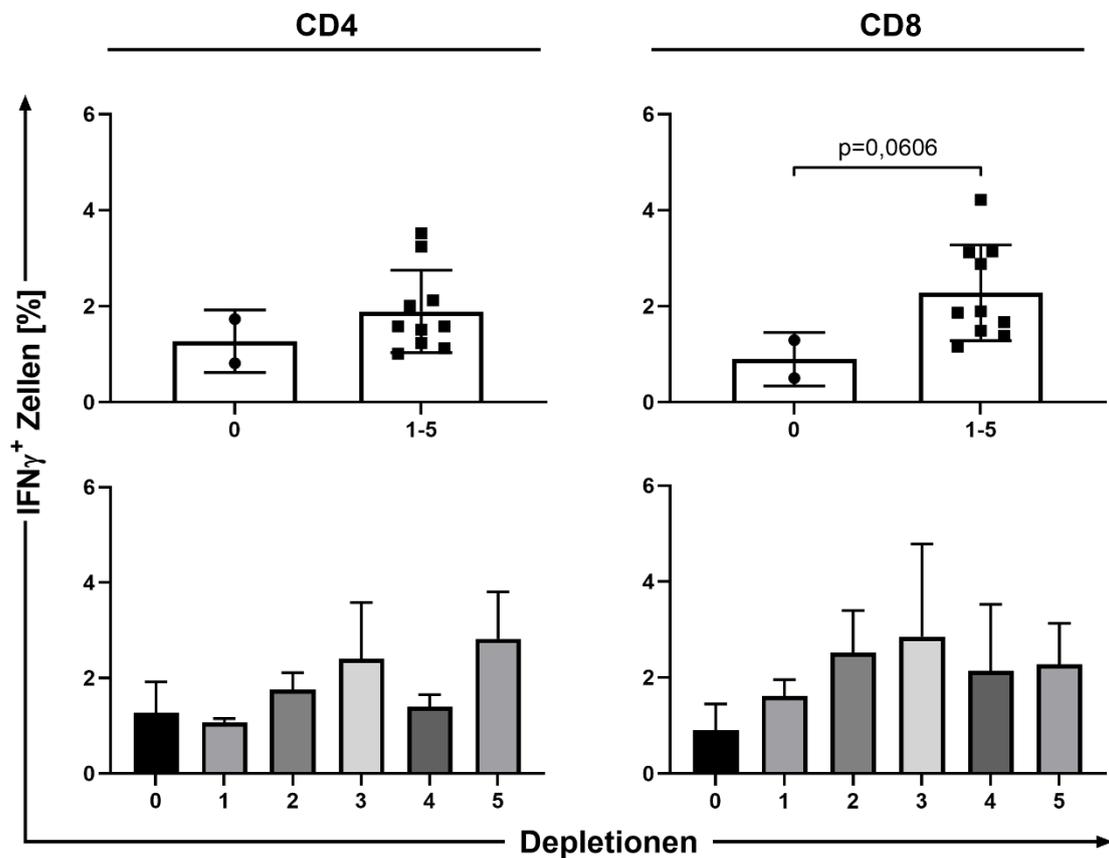


Abbildung 34. Aktivität gegenüber Neo-/Fremdantigenen in CD4+ und CD8+ Zellfraktion nach repetitiver CD276-Depletion. Dargestellt ist der Anteil IFN- γ + Zellen [%] in CD4+ und CD8+ Zellfraktion. Es werden die Werte der Depletionen 1-5 der nicht CD276-depletierten CD45RA- Kontrolle (0) gegenübergestellt (Graphen oben), und die Mittelwerte jedes Depletionsansatzes abgebildet (Graphen unten).

4 Diskussion

Die akute Graft-Versus-Host Disease ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation und potenziell lebensgefährlich für die Betroffenen. Antigene des Empfängers, die den transplantierten T-Zellen präsentiert werden, können – wenn sie als fremd erkannt werden – eine Abstoßungsreaktion auslösen. Diese geht insbesondere von der Subpopulation der Th1-Zellen aus, die eine alloreaktive gewebeschädigende Immunantwort gegen das Zielgewebe des Empfängers auslöst. Einen effektiven präventiven Therapieansatz könnte das Graft Engineering, d.h. die Modifikation des Stammzellgrafts, darstellen. Da die Depletion der gesamten, im Zellgraft vorhandenen, T-Zellen zu einer erhöhten Rezidivrate¹⁴⁹ und zu einem schweren Verlauf endogen aufflammender bzw. neu erworbener Infektionen führt, muss eine zielgerichtete Modifikation erfolgen. Da naive, CD45RA⁺ T-Zellen ein diverseres T-Zellrezeptor-Repertoire besitzen als Gedächtniszellen, die im Mausmodell eine schwerere aGVHD als T-Gedächtniszellen auslösen, wurden in einer Studie von Bleakley et al. CD45RA-depletierte Zellgrafts (PBSCs) in high-risk Leukämie Patienten transplantiert. Daraus folgte eine schnelle Erholung der T-Zellen bei Erhalt der virusspezifischen Immunität, jedoch keine Reduktion der Inzidenz der aGVHD.⁴⁴ Die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten den Oberflächenmarker CD276 (Syn. B7-H3) als Marker alloreaktiver CD4⁺ Th1-Zellen in CD45RA-depletierten Zellgrafts identifizieren.¹⁴⁷

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der verbleibenden alloreaktiven T-Zellen im antigenerfahrenen T-Zellkompartiment nach CD276-Depletion.

Dafür wurden organständige alloreaktive T-Zellen im transgenen NSG-Ab⁰ DR4 Mausmodell nach Transplantation naiver, CD45RA depletierter und CD45RA/CD276 depletierter CD4⁺ Zellgrafts untersucht bzw. verglichen. Weiterhin wurden in vitro die Auswirkungen auf das Zytokinprofil, Aktivierungsmarker, die Immunantwort gegen Viruspeptide und Fremd-/Neoantigene der metronomischen CD276-Depletion, bereits CD45RA-depletierter alloreaktiver T-Zellen, in der unmatched unrelated Mixed Lymphocyte Culture untersucht.

In dieser Arbeit konnte in einem hoch-sensitiven humanen allo-GVHD Modell gezeigt werden, dass nach in vitro Rezipienten MLC im HLA-Mismatch transplantierte CD45RA/CD276-depletierte CD4⁺ Zellgrafts die Organinfiltration und klinische Schwere der aGVHD, verglichen mit ausschließlich CD45RA-depletierten CD4⁺ bzw.

nicht depletierten CD4⁺ Zellgrafts, deutlich attenuierten. In vitro konnte der Erhalt der Immunantwort gegen Viruspeptide und Fremd- bzw. Neoantigenen gezeigt werden. In nachfolgenden Untersuchungen, welche die Anzahl n erhöhen sollten sowie die Gruppe der Bulk CD4⁺ T-Zellen einschlossen, konnte gegenüber CD45RA-depletierten Zellgrafts und Bulk CD4⁺ T-Zellen eine signifikant höhere Immunantwort gegen Viruspeptide gezeigt werden.¹⁴⁷ Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten in vitro nach repetitiver Depletion CD276⁺ Zellen keine zusätzliche Reduktion der inflammatorischen Antwort im Rahmen der Zytokinfreisetzung nachweisen. Ebenfalls zeigte sich keine signifikante Affektion der untersuchten Aktivierungsmarker.

Nachdem die von uns im murinen Modell HLA-mismatched transplantierten CD45RA/CD276-depletierten Zellgrafts eine deutliche Besserung der Klinik im Vergleich zu den anderen transplantierten Zellgrafts (CD4⁺ Bulk, CD45RA-depletiert) zeigten¹⁴⁷, erfolgte die histologische bzw. immunhistochemische Untersuchung der T-Zell Organinfiltration nach Hämatoxylin-Eosin- (HE) bzw. immunhistochemischer CD3-Färbung der Zielgewebe (Leber, Lunge, Kolon). Im Rahmen der GVHD kommt es zu einer Infiltration und Schädigung der Zielorgane durch alloreaktive T-Zellen. In dieser Arbeit konnte anhand der immunhistochemisch markierten infiltrierenden T-Zellen gezeigt werden, dass die CD45RA/CD276-Depletion im Vergleich zur Bulk CD4⁺- und CD45RA-depletierten Transplantationskohorte die infiltrierenden T-Zellen in Leber, Lunge und Kolon fast komplett entfernte. Ursächlich hierfür könnte eine Modifikation des Chemokinprofils mit Einfluss auf die Chemotaxis der T-Zellen gewesen sein. Chemotaxis spielt eine zentrale Rolle in der organspezifischen Genese der aGVHD, indem die T-Zellinfiltration durch Chemokinrezeptoren auf der T-Zelloberfläche und deren Liganden gesteuert wird. So konnte eine Studie zeigen, dass die Blockade von CCR5 die Inzidenz von Leber- und Darm-GVHD reduzierte.¹⁵⁰ Die Chemokine CCR6/CXCR6 und CCR9/ $\alpha 4\beta 7$ vermitteln die T-Zellmigration in Leber und Intestinaltrakt, während CCR3, CCR4, und CCR6 exprimierende T-Zellen Lunge und Haut infiltrieren.⁶³ Sich dieser Arbeit anschließende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten schließlich eine Reduktion der CXCR6-Expression in CD45RA/CD276-depletierten Zellen demonstrieren.¹⁴⁷

Aufgrund ihres Vermögens zur Produktion von IFN- γ , werden Th1-Zellen als dominante alloreaktive Subpopulation im Rahmen der aGVHD beschrieben.^{19,63} Während Th1-

Zellen insbesondere mit der gastrointestinalen und hepatischen Manifestation der aGVHD assoziiert werden, wird für die Subpopulation der Th17-Zellen eine medierende Rolle in der aGVHD-Affektion von Lunge und Haut sowie die Produktion proinflammatorischer Zytokine beschrieben.^{125,151} Anzumerken ist hierbei jedoch, dass Th17-Zellen sowohl als proinflammatorische, als auch protektive Regulatoren der Immunantwort agieren können. Die inflammatorische Gruppe bzw. pathogenen Th17-Zellen zeichnen sich durch die Produktion von IL-17A, IL-17F, IL-22, IFN- γ und GM-CSF aus, während die nicht-pathogene Gruppe negativ regulierende Zytokine wie IL-10 produziert.^{68,152} Zur molekularen Charakterisierung der vorliegenden Th-Subpopulationen wurde die Genexpression assoziierter Transkriptionsfaktoren analysiert. Anhand der untersuchten Transkriptionsfaktoren führte die ex vivo CD276-Depletion in den GVHD-Zielorganen weder zu einer signifikanten Reduktion der Th1-, noch einem Anstieg der Th17-Zellen. Im untersuchten Hautgewebe zeigte sich ein gegenläufiger Trend mit Anstieg der Th2-Zellen und Reduktion der Th17-Zellen nach CD276-Depletion. Dies könnte hinweisend für eine Suppression der Th17-Zellen durch GATA-3 sein. Van Hamburg et al. beschreiben für GATA-3 die partielle Hemmung der Th17-Differenzierung über IL-4 abhängige und unabhängige Prozesse.¹⁵³ Die exprimierten Transkriptionsfaktoren der in vitro MLC wiesen im Rahmen der repetitiven CD276-Depletionen ebenfalls nicht auf eine Reduktion der Th1- bzw. Anstieg der Th17-Zellen hin. CD45RA^{neg} Zellen zeigten jedoch in der CD4-Zellfraktion vermehrt IL-17A produzierende Zellen deren Anzahl durch CD276-Depletion jedoch nicht reduziert werden konnte. Im Verlauf wies die untersuchte depletierte CD276⁺ Zellfraktion eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 und Eomes auf, hinweisend für die Depletion von Th2- bzw. Th1-Zellen.

Die exakte immunologische Funktion sowie der spezifische Rezeptor von B7-H3 (CD276) ist derzeit noch Gegenstand der Forschung. Durch Stimuli wie IFN- γ , weitere proinflammatorische Zytokine oder GM-CSF wird CD276 auf T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen oder auch Monozyten exprimiert.^{134,136} Eine Studie von Chapoval et al. beschreibt in vitro die Induktion von Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion nach Bindung von B7-H3 und dessen spezifischen Rezeptor, zudem eine selektive Stimulation der IFN- γ Produktion.¹³⁴ Grundsätzlich ist eine komplexere immunologische Funktion von CD276 anzunehmen. So beschreiben Suh et al. eine inhibitorische Wirkung von B7-H3 hinsichtlich der Proliferation humaner T-Zellen sowie der negativen

Regulation Th1-induzierter Immunantworten über Inhibition der IFN- γ Sekretion.¹³⁵ Eine inhibitorische Funktion von CD276 wird auch von Veenstra et al. beschrieben. Hier wird in einem B7-H3 defizienten Mausmodell eine erhöhte GVHD-Letalität, einhergehend mit erhöhter T-Zell Proliferation, proinflammatorischen Zytokinen sowie intestinaler Permeabilität nachgewiesen.¹³⁶ Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen anhand des Anteils Ki-67 positiver Zellen der in vitro MLC sowohl für CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellfraktion eine nahezu gleichbleibende Proliferation trotz repetitiver CD276-Depletion. Eine Reduktion IFN- γ positiver Zellen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit den oben genannten Publikationen, konnte in dieser Arbeit in vitro nach repetitiver Depletion CD276⁺ Zellen in CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion weiterhin eine Immunreaktion gegenüber viralen Peptiden und Neo-/Fremdantigenen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind grundsätzlich suggestiv für eine erhaltene anti-virale immunologische Reaktion sowie einen erhaltenen GVT-Effekt. Letztere Annahme ist jedoch aufgrund des bisher nicht etablierten Assessments des GVT-Effektes im NSG-Mausmodell, in ihrer Aussagekraft eingeschränkt.

Hinsichtlich der Anwendung der CD276-Depletion im Graft Engineering, analysierten wir ebenfalls die Reexpression CD276⁺ Zellen nach repetitiver Depletion in vitro. Hier konnten wir zeigen, dass es in CD4⁺ und CD8⁺ Zellfraktion sogar nach mehrmaliger Depletion zu einer, wenn auch abgeschwächten, Reexpression von CD276 auf CD4⁺ T-Zellen kommt. Ursächlich für die Reexpression CD276⁺ Zellen könnte die Reexposition mit Fremdantigenen in einem inflammatorischen Milieu sein, das sich aus der Immunantwort bei Persistenz der Fremdantigene ergibt.

Die Analyse der T-Zell Rezeptor (TCR) Repertoires organständiger T-Zellen hinsichtlich Diversität bzw. Komplexität im Mausmodell DR4-Mismatch und -Match zeigte in allen untersuchten Kohorten (Bulk CD4⁺, CD45RA-depletiert, CD45RA/CD276-depletiert) eine Abweichung von der Gauß'schen Normalverteilung. Verfuert et al. beschreiben die T-Zellaktivierung durch Alloantigene als möglichen Faktor für die verzögerte TCR-Repertoire-Rekonstitution bzw. dessen Verzerrung (Skewing).¹⁵⁴ Das sog. Skewing des TCR-Repertoires entsteht nach Erkennung der Fremdantigene durch klonal expandierende T-Zellklone. Dadurch wird die Ausbildung einer Gauß'schen Normalverteilung der TCR Spectratypes verhindert.

Im DR4-Mismatch beruht die Alloreaktivität der T-Zellen auf der HLA-Disparität zwischen Empfänger und Spender. Die Ausprägung der TCR-Repertoire-Diversität steigt mit der Anzahl naiver T-Zellen, die transplantiert werden.¹⁵⁵ Auch steigt bei größerer Diversität der TCR Repertoires die Wahrscheinlichkeit, dass ein TCR ein Empfänger-Alloantigen erkennt und daraufhin klonal expandiert. Nach CD45RA/CD276-Depletion und anschließender Transplantation, zeigte sich die ausgeprägteste Reduktion des TCR-Repertoires. Ursächlich dafür ist, dass das systemisch vorkommende DR4 durch die in vitro MLC abgebildet werden konnte, da es ebenfalls auf PBMCs exprimiert wird. T-Zellen, die DR4 als Fremdantigen erkennen und CD276 exprimieren, konnten depletiert werden. Dadurch wurden praktisch alle Major-Mismatch-reaktiven T-Zellen eliminiert und das TCR-Repertoire stark reduziert.

Im allogenen DR4-matched Transplantationssetting stimulieren Minorantigene (miHAgs) des Empfängers die T-Zell Antwort¹⁵⁶, hier jedoch einhergehend mit der Expansion der Komplexität der TCR-Repertoires. Minorantigene werden fast ausschließlich gewebestringiert exprimiert, was durch ihre gewebstypische Funktion bedingt ist. Wir finden deshalb im Marrow Unrelated Donor Setting mit HLA-Match von 10/10 Loci, vor allem organständige Repertoires, jedoch keine systemisch vorkommenden Klone. Da organspezifische miHAgs, die funktionsbedingt nur in ihrem jeweiligen Organ transkribiert und translatiert werden, also nicht durch PBMCs exprimiert werden, konnten in unserer in vitro MLC vor Transplantation keine alloreaktiven T-Zellen für diese Minorantigene entstehen. Folglich war keine Reduktion des alloreaktiven TCR-Repertoires nach CD45RA/CD276-Depletion durch Graft Engineering im Vergleich zur alleinigen CD45RA-Depletion zu erwarten.

Interessanterweise zeigte sich in dieser Arbeit sehr klar die stärkste Reduktion der TCR-Repertoire-Komplexität im DR4-Match Setting nach ausschließlicher CD45RA-Depletion.

Im Rahmen des ex vivo Graft Engineering war eine Reduktion der Schwere der GVHD und Verbesserung des klinischen Outcomes durch CD45RA/CD276-Depletion im HLA-Mismatch unter der Gegebenheit hoher Inkompatibilität der Minorantigene zu erwarten, jedoch nicht für das Major-kompatible Setting bzw. HLA-Match. Da Situationen im Klinikalltag meist aus MUD oder einer Mischung aus Major- und Minor-Mismatch (bspw.

halpoidentes Setting) bestehen, lässt sich eine sichere und effiziente Reduktion alloreaktiver T-Zellen durch Graft Engineering eher nicht umsetzen.

Die praktische Anwendung der Modifikation des Stammzelltransplantates im HLA-Mismatch mit CD45RA/CD276-Depletion zur Prävention der GVHD würde ein schrittweises Vorgehen erfordern. Hierfür müsste zunächst, nach Spendersuche und positiver CD34 Selektion, eine Stimulation der CD45RA-depletierten Spendergrafts durch Empfänger PBMCs in vitro erfolgen. Im Anschluss müssen CD276⁺ Zellen depletiert werden und das Transplantat qualitative Testungen durchlaufen. Das Verfahren stellt die durchführende Einrichtung hinsichtlich der Praktikabilität vor große Herausforderungen, da es zum einen sehr zeitaufwändig wäre und aufgrund des schrittweisen Vorgehens die Störanfälligkeit steigt. Dieses Verfahren ist jedoch den derzeit verwendeten immunsuppressiven Agenzien (bspw. systemische Glukokortikoide und Calcineurin-Inhibitoren, Mycophenolat-Mofetil oder Cyclophosphamid) gegenüberzustellen. Die induzierte Immunsuppression der genannten Wirkstoffe erhöht das Rezidiv- und de novo Risiko maligner Grunderkrankungen und opportunistischer Infektionen mit fakultativ-pathogenen Mikroorganismen. Weiterhin ist zudem von wirkstoffvermittelter Toxizität auszugehen. Unser Therapieansatz mittels CD45RA/CD276-Depletion kann die vermehrte Anwendung der o.g. Immunsuppressiva und die damit einhergehenden Nebenwirkungen reduzieren. Ein anderer Ansatz der selektiven T-Zell-Depletion umfasst die Depletion TCR $\alpha\beta$ /CD19⁺ Zellen nach immunsuppressivem Therapieregime im haploidentischen Setting. Das Risiko der aGVHD beträgt hier weiterhin etwa 25%.⁴² Auch die alleinige Depletion TCR $\alpha\beta$ ⁺ Zellen stellt eine therapeutische Strategie zur GVHD-Prophylaxe dar. Durch Depletion der α/β TCR exprimierenden Zellen verbleibt die Minorität der γ/δ T-Zellen (2-10% aller T-Zellen) im Transplantat, welchen eine potente GVL-Aktivität zugesprochen wird bei fehlender Alloreaktivität.^{45,157} Hier wird die darauffolgende Expansion der γ/δ T-Zellen mit 11 bis 54% angegeben.⁴⁵ Einschränkend ist jedoch die nach Depletion langsamere Rekonstitution der α/β T-Zellen⁴¹ und die Depletion von spezifischen Memory T-Zellen aus dem Spender-Transplantat, welche insbesondere Infektionen mit opportunistischen viralen Erregern vermeiden können.

Eine Alternative zur o.g. aufwändigen in vitro Präparation CD45RA/CD276-depletierter Zellgrafts, könnte daher die in vivo Depletion CD276⁺ Zellen durch Applikation eines monoklonalen Antikörpers darstellen. In anschließenden Untersuchungen konnte unsere

Arbeitsgruppe ebenfalls im NSG-DR4 Mausmodell zeigen, dass die in vivo Applikation eines anti-CD276 Antikörpers die klinische Ausprägung der GVHD und das Gesamtüberleben (engl. overall survival, OS) verbessert.¹⁴⁷ Eine sich bereits in klinischen Studien befindliche antikörperbasierte Therapie der aGVHD verwendet Abatacept, einen CD80 (Syn. B7.1) und CD86 (Syn. B7.2) bindenden, und damit die Interaktion mit insbesondere CD28 blockierenden, Antikörper. Ursprünglich angewendet im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis zeigte dieser in einer Phase-II-Studie im HLA-mismatched Transplantationssetting eine Reduktion der aGVHD und verbessertes aGVHD-freies Überleben.¹⁵⁸ Die genannten costimulierenden Liganden CD80 und CD86 werden von spezialisierten APCs exprimiert und interagieren mit aktivierendem CD28 auf insbesondere zum Priming bereiten naiven T-Zellen. Das durch Abatacept blockierte zweite Signal inhibiert insbesondere die antigenabhängige Aktivierung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und damit die adaptive Immunantwort.⁵⁴ Folglich muss hier insbesondere in Langzeit-Studien die Sicherheit hinsichtlich Rezidiven und opportunistischen Infektionen untersucht werden. Da CD276, wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, einen spezifischen Marker alloreaktiver CD4⁺ T-Zellen darstellt, würde die Depletion CD276⁺ Zellen bei erhaltener Immunaktivität gegenüber viralen Erregern und Fremd- bzw. Neoantigenen einen spezifischeren und sichereren Therapieansatz darstellen.

Die Aussagekraft dieser Arbeit ist limitiert durch die Erhebung der Ergebnisse im transgenen Mausmodell, und die damit verbundene nicht uneingeschränkte Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus. Hier insbesondere dadurch, dass das Gewebe selbst nicht CD276 exprimiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transplantation CD45RA/CD276^{neg} T-Zellgrafts im HLA-Mismatch, was dem haploidenten HLA-Setting nahekommt, zu einer deutlichen Reduktion der Organinfiltration durch T-Zellen und damit einhergehend zu einer Verbesserung der klinischen Symptome führt. Gleichzeitig besteht eine gegenüber den ausschließlich CD45RA depletierten Grafts signifikant verbesserte Immunantwort gegenüber viralen Antigenen und Fremd- bzw. Neoepitopen. Das untersuchte Zytokinprofil von CD45RA^{neg} CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen zeigte in vitro nach metronomischer Depletion CD276⁺ Zellen keine signifikanten Veränderungen der Expression. So konnten interessanterweise die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF α durch metronomische CD276-Depletionen (bis 5-malig) in der MLC nicht signifikant reduziert werden.

Zudem zeigte sich auch nach metronomischer Depletion (bis 3-malig) von CD276 T-Zellen aus der MLC keine signifikante Absenkung von IL-4,-5,-10,-13 und IL-17 sezernierenden Zellen.

Im Gegensatz dazu konnten die in vivo Daten eindeutig einen signifikanten Beitrag von CD276 als Aktivierungsmarker alloreaktiver T-Zellen zeigen.¹⁴⁷ Hierbei handelt es sich insbesondere um einen CD4⁺ spezifischen alloreaktiven Marker. Dies erlaubt eine präzise Intervention gegen die Initiation und eventuell bereits bestehende inflammatorische Prozesse im Rahmen der GVHD.

Weitere Studien müssen die Rolle von CD276 im Immunsystem und Gewebe untersuchen, um eine sichere und wirksame Prävention der GVHD in der Klinik zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Die akute Graft-Versus-Host Disease (aGVHD) ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation, welche bei verschiedenen hämatologischen Krankheitsentitäten (bspw. Akute Myeloische Leukämie oder Myelodysplastische Syndrome) die einzige potenziell kurative Therapieoption darstellt. Die Prävalenz der aGVHD wird nach Transplantation im MHC-Mismatch mit bis zu 80% angegeben und tritt sogar im MHC-Match zu 35-45% auf.¹⁹ Dabei manifestiert sich die Erkrankung insbesondere an Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber und durchläuft pathophysiologisch drei Phasen.¹⁹ Hierbei kommt es unter anderem zu einer ausgeprägten Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von T-Lymphozyten des Spenders, insbesondere der Th1-Zellen und damit assoziierten proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und TNF α . Klinisch lassen sich vier Schweregrade anhand der Organschädigung bzw. betroffenen Körperoberfläche (Haut, Gastrointestinaltrakt, Leber) einteilen. Bei manifester aGVHD werden therapeutisch vor allem systemische Glukokortikoide wie bspw. Prednisolon (1-2 mg/kg/Tag) appliziert, wobei steroidrefraktäre Verläufe der aGVHD in bis zu 50% der Fälle angegeben werden.³¹ Zudem stellen unerwünschte Arzneimittelwirkungen bzw. Toxizität der Gabe hochdosierter systemischer Glukokortikoide (arterielle Hypertonie, Hyperglykämie, Immunsuppression) ein weiteres Problem dar. Die demnach wichtige Prophylaxe erfolgt aktuell medikamentös und umfasst die Applikation von Tacrolimus oder Ciclosporin A in Kombination mit Methotrexat oder Mycophenolat Mofetil. Einen weiteren prophylaktischen Therapieansatz stellt die Modifikation des Transplantates, das sog. Graft Engineering, dar. Im Mausmodell zeigte sich, dass naive CD45RA⁺ T-Lymphozyten eine schwerwiegendere aGVHD auslösen als CD45RA^{neg} T-Gedächtniszellen (sog. Memory T-Zellen). Davon ausgehend konnten Bleakley et al. nach Transplantation CD45RA^{neg} T-Zellgrafts zeigen, dass die aGVHD einen milderen Verlauf, keine Erhöhung der Rezidivrate und weiterhin Ansprechen auf Glukokortikoide aufwies.⁴³ Trotzdem konnte keine Reduktion der Inzidenz erreicht werden. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten den Oberflächenmarker CD276 (Syn. B7-H3) als Marker alloreaktiver CD4⁺ Th1-Zellen in CD45RA^{neg} Zellgrafts identifizieren.¹⁴⁷ Ziel dieser Arbeit war die funktionelle und molekulare Charakterisierung der alloreaktiven T-Zellen im CD45RA^{neg} antigenerfahrenen T-Zellkompartiment nach zusätzlicher Depletion CD276⁺ Zellen.

Dafür wurden alloreaktive T-Zellen im transgenen NSG-Ab⁰ DR4 Mausmodell nach Transplantation unterschiedlicher T-Zellgrafts (CD4⁺ T-Zellen, CD4⁺CD45RA^{neg} T-Zellen und CD4⁺CD45RA^{neg}CD276^{neg} T-Zellen), und in vitro in der unmatched unrelated Mixed Lymphocyte Culture (MLC) Transplantation nach einmaliger Depletion CD45RA⁺ und metronomischer Depletion CD276⁺ Zellen untersucht. Die Untersuchungen erfolgten histologisch (HE- und CD3-Färbung), mittels quantitativer real-time PCR (qPCR), V β -Spectratyping und Durchflusszytometrie (FACS).

In den histologisch bzw. immunhistochemisch untersuchten murinen Zielgeweben (Leber, Lunge, Kolon) der CD4⁺CD45RA^{neg}CD276^{neg} Transplantationskohorte konnte eine deutliche Reduktion bzw. fast komplette Entfernung der Organinfiltration alloreaktiver T-Zellen, verglichen mit Rezipienten CD4⁺ und ausschließlich CD4⁺CD45RA^{neg} Transplantaten, nachgewiesen werden. Die Analyse der Diversität bzw. Komplexität der TCR-Repertoires organständiger T-Zellen zeigte zunächst in allen Transplantationskohorten eine Abweichung von der Gauß'schen Normalverteilung (sog. Skewing), mit der größten Ausprägung bei CD4⁺CD45RA^{neg}CD276^{neg} Rezipienten im DR4-Mismatch Setting. Dafür kann die Depletion von T-Zellen, die DR4 als Fremdanigen erkennen und CD276 exprimieren – alloreaktiven T-Zellen, als ursächlich gesehen werden. Sowohl im murinen Hautgewebe, als auch in der MLC fiel ein Anstieg der GATA-3 und Reduktion der RORC-Genexpression nach CD276-Depletion auf. Dieser Vorgang könnte durch eine beschriebene partielle Hemmung der Th17-Differenzierung durch GATA-3¹⁵³ erklärt werden. Weiterhin konnte jedoch in vitro in der CD4⁺ Zellfraktion eine erhöhte Anzahl IL-17A produzierender Zellen nachgewiesen werden, welche durch CD276-Depletion nicht reduziert werden konnten. Die metronomische Depletion CD276⁺ Zellen führte in der MLC nicht zu einer zusätzlichen Reduktion der inflammatorischen Antwort, insbesondere der proinflammatorischen Marker IFN- γ und TNF α . Auch die untersuchten Aktivierungsmarker wiesen keine signifikant veränderte Expression auf. Nach metronomischer CD276-Depletion konnte die Anzahl CD276⁺ Zellen zwar stark reduziert werden, jedoch kam es weiterhin zu deren Reexpression. Die Immunantwort gegenüber Viruspeptiden und Neo- bzw. Fremdanigenen blieb erhalten.

Schließlich konnten wir zeigen, dass durch CD45RA/CD276-Depletion im HLA DR4-Mismatch eine Reduktion der Schwere der GVHD und Verbesserung des klinischen Outcomes erreicht werden kann. Zudem, dass die CD276-Depletion keine viralen

Infektionen, de novo Tumoren oder Rezidive der Grunderkrankung begünstigt. Die praktische Anwendung der Graft-Modifikation stellt jedoch aufgrund von Spendersuche und schrittweiser Durchführung eine klinische Herausforderung dar. Eine mögliche Alternative könnte hier die in vivo Depletion CD276⁺ Zellen durch Applikation eines monoklonalen Antikörpers darstellen. Weitere Studien müssen zudem die Rolle von CD276 im Immunsystem und Gewebe untersuchen, um eine sichere und wirksame Prävention der GVHD in der Klinik zu ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

1. Sureda A, Bader P, Cesaro S, et al. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant*. Aug 2015;50(8):1037-56. doi:10.1038/bmt.2015.6
2. Transplantation ESfBaM. The EBMT Registry 2020. EBMT. Accessed 04.03.2022, <https://www.ebmt.org/annual-report-2020/ebmt-registry-2020>
3. Gragert L, Eapen M, Williams E, et al. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N Engl J Med*. Jul 24 2014;371(4):339-48. doi:10.1056/NEJMsa1311707
4. Buck K, Wadsworth K, Setterholm M, et al. High-Resolution Match Rate of 7/8 and 9/10 or Better for the Be The Match Unrelated Donor Registry. *Biol Blood Marrow Transplant*. Apr 2016;22(4):759-763. doi:10.1016/j.bbmt.2015.12.012
5. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant*. Jun 2017;52(6):811-817. doi:10.1038/bmt.2017.34
6. Juric MK, Ghimire S, Ogonek J, et al. Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Front Immunol*. 2016;7:470. doi:10.3389/fimmu.2016.00470
7. Sorror M, Storer B, Sandmaier BM, et al. Hematopoietic cell transplantation-comorbidity index and Karnofsky performance status are independent predictors of morbidity and mortality after allogeneic nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. *Cancer*. May 1 2008;112(9):1992-2001. doi:10.1002/cncr.23375
8. Miller JP, Perry EH, Price TH, et al. Recovery and safety profiles of marrow and PBSC donors: experience of the National Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant*. Sep 2008;14(9 Suppl):29-36. doi:10.1016/j.bbmt.2008.05.018
9. Thomas E, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med*. Apr 17 1975;292(16):832-43. doi:10.1056/NEJM197504172921605
10. Nagler A, Shimoni A. Conditioning. In: th, Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kroger N, eds. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 2019:99-107.
11. Scott BL, Pasquini MC, Logan BR, et al. Myeloablative Versus Reduced-Intensity Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*. Apr 10 2017;35(11):1154-1161. doi:10.1200/JCO.2016.70.7091
12. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. Dec 2009;15(12):1628-33. doi:10.1016/j.bbmt.2009.07.004

13. Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. Oct 15 2005;106(8):2912-9. doi:10.1182/blood-2005-05-2004
14. Sorror ML. How I assess comorbidities before hematopoietic cell transplantation. *Blood*. Apr 11 2013;121(15):2854-63. doi:10.1182/blood-2012-09-455063
15. Arnaout K, Patel N, Jain M, El-Amm J, Amro F, Tabbara IA. Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Invest*. Aug 2014;32(7):349-62. doi:10.3109/07357907.2014.919301
16. Savani BN, Griffith ML, Jagasia S, Lee SJ. How I treat late effects in adults after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. Mar 17 2011;117(11):3002-9. doi:10.1182/blood-2010-10-263095
17. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*. May 2004;4(5):371-80. doi:10.1038/nrc1365
18. Zhou M, Sacirbegovic F, Zhao K, Rosenberger S, Shlomchik WD. T cell exhaustion and a failure in antigen presentation drive resistance to the graft-versus-leukemia effect. *Nat Commun*. Aug 24 2020;11(1):4227. doi:10.1038/s41467-020-17991-y
19. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. May 2 2009;373(9674):1550-61. doi:10.1016/S0140-6736(09)60237-3
20. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. Feb 1 1990;75(3):555-62.
21. Schoemans HM, Lee SJ, Ferrara JL, et al. EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment. *Bone Marrow Transplant*. Nov 2018;53(11):1401-1415. doi:10.1038/s41409-018-0204-7
22. DiMaggio E. Acute Graft-versus-Host Disease: Emerging Insights and Updates into Detection, Prevention, and Treatment. *Pharmacotherapy*. Aug 2020;40(8):788-807. doi:10.1002/phar.2436
23. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. May 1 2000;95(9):2754-9.
24. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*. Oct 15 1997;90(8):3204-13.
25. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe HH, Moch H. *Pathologie mit rund 150 Tabellen ; [Plus im Web, mediscript]*. 5., vollständig überarbeitete Auflage ed. Elsevier, Urban & Fischer; 2012:XXVI, 1064 Seiten.
26. Blaese RM, Martinez C, Good RA. Immunologic Incompetence of Immunologically Runted Animals. *J Exp Med*. Feb 1 1964;119:211-24. doi:10.1084/jem.119.2.211

27. Huang Y, Feng S, Xu Y, et al. Suppression of graft-versus-host disease and retention of graft-versus-tumour reaction by murine genetically engineered dendritic cells following bone marrow transplantation. *Mol Med Rep*. May 2015;11(5):3820-7. doi:10.3892/mmr.2014.3123
28. Mielcarek M, Furlong T, Storer BE, et al. Effectiveness and safety of lower dose prednisone for initial treatment of acute graft-versus-host disease: a randomized controlled trial. *Haematologica*. Jun 2015;100(6):842-8. doi:10.3324/haematol.2014.118471
29. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, et al. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. Aug 2012;18(8):1150-63. doi:10.1016/j.bbmt.2012.04.005
30. Bacigalupo A, Milone G, Cupri A, et al. Steroid treatment of acute graft-versus-host disease grade I: a randomized trial. *Haematologica*. Dec 2017;102(12):2125-2133. doi:10.3324/haematol.2017.171157
31. Zhang L, Yu J, Wei W. Advance in Targeted Immunotherapy for Graft-Versus-Host Disease. *Front Immunol*. 2018;9:1087. doi:10.3389/fimmu.2018.01087
32. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*. Nov 30 2017;377(22):2167-2179. doi:10.1056/NEJMr1609337
33. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. May 1 2004;363(9419):1439-41. doi:10.1016/S0140-6736(04)16104-7
34. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*. Apr 2014;28(4):970-3. doi:10.1038/leu.2014.41
35. Baron F, Storb R. Mesenchymal stromal cells: a new tool against graft-versus-host disease? *Biol Blood Marrow Transplant*. Jun 2012;18(6):822-40. doi:10.1016/j.bbmt.2011.09.003
36. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorcka D, et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. Oct 1 1998;92(7):2303-14.
37. Nash RA, Antin JH, Karanes C, et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*. Sep 15 2000;96(6):2062-8.
38. Meyer EH. Using the binary language of IL-2 to prevent GVHD. *Blood*. Apr 22 2021;137(16):2136-2137. doi:10.1182/blood.2021010836
39. Small TN, Avigan D, Dupont B, et al. Immune reconstitution following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant*. Jun 1997;3(2):65-75.

40. Urbano-Ispizua A, Rozman C, Martinez C, et al. Rapid engraftment without significant graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. *Blood*. Jun 1 1997;89(11):3967-73.
41. Keever-Taylor CA, Wagner JE, Kernan NA, et al. Comparison of immune recovery in recipients of unmanipulated vs T-cell-depleted grafts from unrelated donors in a multicenter randomized phase II-III trial (T-cell depletion trial). *Bone Marrow Transplant*. Mar 2010;45(3):587-9. doi:10.1038/bmt.2009.170
42. Dovydenko MV, Parovichnikova EN, Kuzmina LA, et al. Haploidentical Stem Cell Transplantation with TCR Alpha/Beta and CD19 Depletion in Adult Patients with Hematological Malignancies. *Blood*. 2019/11/13/ 2019;134:5648. doi:https://doi.org/10.1182/blood-2019-131316
43. Bleakley M. Naive T-cell depletion in stem cell transplantation. *Blood Adv*. Oct 13 2020;4(19):4980. doi:10.1182/bloodadvances.2020001888
44. Bleakley M, Heimfeld S, Loeb KR, et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts. *J Clin Invest*. Jul 1 2015;125(7):2677-89. doi:10.1172/JCI81229
45. Daniele N, Scerpa MC, Caniglia M, et al. Transplantation in the onco-hematology field: focus on the manipulation of alphabeta and gammadelta T cells. *Pathol Res Pract*. Feb 15 2012;208(2):67-73. doi:10.1016/j.prp.2011.10.006
46. Locatelli F, Merli P, Pagliara D, et al. Outcome of children with acute leukemia given HLA-haploidentical HSCT after alphabeta T-cell and B-cell depletion. *Blood*. Aug 3 2017;130(5):677-685. doi:10.1182/blood-2017-04-779769
47. Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA, Unrelated Donor Marrow Transplantation T. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet*. Aug 27-Sep 2 2005;366(9487):733-41. doi:10.1016/S0140-6736(05)66996-6
48. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood*. Jul 24 2014;124(4):638-44. doi:10.1182/blood-2014-03-564401
49. Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH, et al. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood*. Feb 25 2016;127(8):1044-51. doi:10.1182/blood-2015-06-653667
50. Trenado A, Sudres M, Tang Q, et al. Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *J Immunol*. Jan 15 2006;176(2):1266-73. doi:10.4049/jimmunol.176.2.1266
51. Gregori S, Passerini L, Roncarolo MG. Clinical Outlook for Type-1 and FOXP3(+) T Regulatory Cell-Based Therapy. *Front Immunol*. 2015;6:593. doi:10.3389/fimmu.2015.00593

52. Zheng J, Liu Y, Liu Y, et al. Human CD8⁺ regulatory T cells inhibit GVHD and preserve general immunity in humanized mice. *Sci Transl Med*. Jan 16 2013;5(168):168ra9. doi:10.1126/scitranslmed.3004943
53. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. Jun 2 2001;357(9270):1777-89. doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7
54. Murphy KM, Weaver C, Mowat A, et al. *Janeway Immunologie*. 9. Auflage ed. Lehrbuch. Springer Spektrum; 2018:XL, 1205 Seiten.
55. Schober K, Buchholz VR, Busch DH. TCR repertoire evolution during maintenance of CMV-specific T-cell populations. *Immunol Rev*. May 2018;283(1):113-128. doi:10.1111/imr.12654
56. Babel N, Stervbo U, Reinke P, Volk HD. The Identity Card of T Cells-Clinical Utility of T-cell Receptor Repertoire Analysis in Transplantation. *Transplantation*. Aug 2019;103(8):1544-1555. doi:10.1097/TP.0000000000002776
57. McComb S, Thiriout A, Akache B, Krishnan L, Stark F. Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol*. 2019;2024:1-24. doi:10.1007/978-1-4939-9597-4_1
58. Chen BJ, Deoliveira D, Cui X, et al. Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse. *Blood*. Apr 1 2007;109(7):3115-23. doi:10.1182/blood-2006-04-016410
59. Yamane H, Paul WE. Memory CD4⁺ T cells: fate determination, positive feedback and plasticity. *Cell Mol Life Sci*. May 2012;69(10):1577-83. doi:10.1007/s00018-012-0966-9
60. Bradley LM, Dalton DK, Croft M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol*. Aug 15 1996;157(4):1350-8.
61. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*. Jan 2014;85(1):36-42. doi:10.1002/cyto.a.22348
62. Henden AS, Hill GR. Cytokines in Graft-versus-Host Disease. *J Immunol*. May 15 2015;194(10):4604-12. doi:10.4049/jimmunol.1500117
63. Yi T, Chen Y, Wang L, et al. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood*. Oct 1 2009;114(14):3101-12. doi:10.1182/blood-2009-05-219402
64. Coghill JM, Sarantopoulos S, Moran TP, Murphy WJ, Blazar BR, Serody JS. Effector CD4⁺ T cells, the cytokines they generate, and GVHD: something old and something new. *Blood*. Mar 24 2011;117(12):3268-76. doi:10.1182/blood-2010-12-290403
65. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. Aug 2011;66(8):989-98. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02576.x
66. Fowler DH, Kurasawa K, Husebeek A, Cohen PA, Gress RE. Cells of Th2 cytokine phenotype prevent LPS-induced lethality during murine graft-versus-host

- reaction. Regulation of cytokines and CD8+ lymphoid engraftment. *J Immunol.* Feb 1 1994;152(3):1004-13.
67. Fowler DH, Kurasawa K, Smith R, Eckhaus MA, Gress RE. Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood.* Nov 15 1994;84(10):3540-9.
68. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.* Sep 2014;14(9):585-600. doi:10.1038/nri3707
69. Kao CY, Chen Y, Thai P, et al. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol.* Sep 1 2004;173(5):3482-91. doi:10.4049/jimmunol.173.5.3482
70. Kao CY, Huang F, Chen Y, et al. Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway. *J Immunol.* Nov 15 2005;175(10):6676-85. doi:10.4049/jimmunol.175.10.6676
71. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* Sep 22 2006;126(6):1121-33. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
72. Fulton LM, Carlson MJ, Coghill JM, et al. Attenuation of acute graft-versus-host disease in the absence of the transcription factor RORgammat. *J Immunol.* Aug 15 2012;189(4):1765-72. doi:10.4049/jimmunol.1200858
73. Teshima T. Th1 and Th17 join forces for acute GVHD. *Blood.* Nov 3 2011;118(18):4765-7. doi:10.1182/blood-2011-09-377325
74. Iclozan C, Yu Y, Liu C, et al. T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* Feb 2010;16(2):170-8. doi:10.1016/j.bbmt.2009.09.023
75. Yi T, Zhao D, Lin CL, et al. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood.* Sep 1 2008;112(5):2101-10. doi:10.1182/blood-2007-12-126987
76. O'Connor W, Jr., Kamanaka M, Booth CJ, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol.* Jun 2009;10(6):603-9. doi:10.1038/ni.1736
77. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* Aug 5 2002;196(3):389-99. doi:10.1084/jem.20020399
78. Whangbo JS, Antin JH, Koreth J. The role of regulatory T cells in graft-versus-host disease management. *Expert Rev Hematol.* Feb 2020;13(2):141-154. doi:10.1080/17474086.2020.1709436
79. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* Aug 26 2011;35(2):161-8. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.010

80. Joshi NS, Cui W, Chandele A, et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity*. Aug 2007;27(2):281-95. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.010
81. Takemoto N, Intlekofer AM, Northrup JT, Wherry EJ, Reiner SL. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J Immunol*. Dec 1 2006;177(11):7515-9. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7515
82. Wang Y, Misumi I, Gu AD, et al. GATA-3 controls the maintenance and proliferation of T cells downstream of TCR and cytokine signaling. *Nat Immunol*. Jul 2013;14(7):714-22. doi:10.1038/ni.2623
83. Badovinac VP, Haring JS, Harty JT. Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection. *Immunity*. Jun 2007;26(6):827-41. doi:10.1016/j.immuni.2007.04.013
84. Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, et al. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev*. Jun 2006;211:81-92. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x
85. Parish IA, Kaech SM. Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. Jun 2009;21(3):291-7. doi:10.1016/j.coi.2009.05.008
86. Palmer EM, Holbrook BC, Arimilli S, Parks GD, Alexander-Miller MA. IFN γ -producing, virus-specific CD8+ effector cells acquire the ability to produce IL-10 as a result of entry into the infected lung environment. *Virology*. Sep 1 2010;404(2):225-30. doi:10.1016/j.virol.2010.05.004
87. Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med*. Mar 2009;15(3):277-84. doi:10.1038/nm.1929
88. Trandem K, Zhao J, Fleming E, Perlman S. Highly activated cytotoxic CD8 T cells express protective IL-10 at the peak of coronavirus-induced encephalitis. *J Immunol*. Mar 15 2011;186(6):3642-52. doi:10.4049/jimmunol.1003292
89. Mammadli M, Huang W, Harris R, et al. Targeting Interleukin-2-Inducible T-Cell Kinase (ITK) Differentiates GVL and GVHD in Allo-HSCT. *Front Immunol*. 2020;11:593863. doi:10.3389/fimmu.2020.593863
90. Starska K, Glowacka E, Kulig A, Lewy-Trenda I, Brys M, Lewkowicz P. The role of tumor cells in the modification of T lymphocytes activity--the expression of the early CD69+, CD71+ and the late CD25+, CD26+, HLA/DR+ activation markers on T CD4+ and CD8+ cells in squamous cell laryngeal carcinoma. Part I. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011;49(4):579-92.
91. Strobl J, Pandey RV, Krausgruber T, et al. Long-term skin-resident memory T cells proliferate in situ and are involved in human graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. Nov 18 2020;12(570)doi:10.1126/scitranslmed.abb7028
92. Weiner J, Svetlicky N, Kang J, et al. CD69+ resident memory T cells are associated with graft-versus-host disease in intestinal transplantation. *Am J Transplant*. May 2021;21(5):1878-1892. doi:10.1111/ajt.16405

93. Lee SC, Seo KW, Kim HJ, et al. Depletion of Alloreactive T-Cells by Anti-CD137-Saporin Immunotoxin. *Cell Transplant*. 2015;24(6):1167-81. doi:10.3727/096368914X679327
94. Briones J, Novelli S, Sierra J. T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus host disease: therapeutic implications. *Bone Marrow Res*. 2011;2011:976793. doi:10.1155/2011/976793
95. Blazar BR, Kwon BS, Panoskaltsis-Mortari A, Kwak KB, Peschon JJ, Taylor PA. Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Immunol*. Mar 1 2001;166(5):3174-83. doi:10.4049/jimmunol.166.5.3174
96. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*. Nov 3 2016;375(18):1767-1778. doi:10.1056/NEJMra1514296
97. Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant*. Oct 2012;12(10):2575-87. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x
98. Blazar BR, Carreno BM, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol*. Aug 1 2003;171(3):1272-7. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1272
99. Stikvoort A, Gaballa A, Solders M, et al. Risk Factors for Severe Acute Graft-versus-Host Disease in Donor Graft Composition. *Biol Blood Marrow Transplant*. Mar 2018;24(3):467-477. doi:10.1016/j.bbmt.2017.11.026
100. Oba R, Isomura M, Igarashi A, Nagata K. Circulating CD3(+)HLA-DR(+) Extracellular Vesicles as a Marker for Th1/Tc1-Type Immune Responses. *J Immunol Res*. 2019;2019:6720819. doi:10.1155/2019/6720819
101. Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 5 1999;96(1):185-90. doi:10.1073/pnas.96.1.185
102. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. Feb 2002;2(2):116-26. doi:10.1038/nri727
103. Vigdorovich V, Ramagopal UA, Lazar-Molnar E, et al. Structure and T cell inhibition properties of B7 family member, B7-H3. *Structure*. May 7 2013;21(5):707-17. doi:10.1016/j.str.2013.03.003
104. Hughes MM, Yassai M, Sedy JR, et al. T cell receptor CDR3 loop length repertoire is determined primarily by features of the V(D)J recombination reaction. *Eur J Immunol*. Jun 2003;33(6):1568-75. doi:10.1002/eji.200323961
105. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. Aug 4 1988;334(6181):395-402. doi:10.1038/334395a0
106. Zarnitsyna VI, Evavold BD, Schoettle LN, Blattman JN, Antia R. Estimating the diversity, completeness, and cross-reactivity of the T cell repertoire. *Front Immunol*. Dec 26 2013;4:485. doi:10.3389/fimmu.2013.00485

107. Nielsen SCA, Boyd SD. Human adaptive immune receptor repertoire analysis-Past, present, and future. *Immunol Rev.* Jul 2018;284(1):9-23. doi:10.1111/imr.12667
108. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol.* Mar 15 2014;192(6):2689-98. doi:10.4049/jimmunol.1302064
109. Yew PY, Alachkar H, Yamaguchi R, et al. Quantitative characterization of T-cell repertoire in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* Sep 2015;50(9):1227-34. doi:10.1038/bmt.2015.133
110. Alachkar H, Nakamura Y. Deep-sequencing of the T-cell receptor repertoire in patients with haplo-cord and matched-donor transplants. *Chimerism.* Jul 3 2015;6(3):47-9. doi:10.1080/19381956.2015.1128624
111. Liu C, He M, Rooney B, Kepler TB, Chao NJ. Longitudinal analysis of T-cell receptor variable beta chain repertoire in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* Mar 2006;12(3):335-45. doi:10.1016/j.bbmt.2005.09.019
112. Koyama D, Murata M, Hanajiri R, et al. Quantitative Assessment of TCR Repertoire and Allo-Reactivity of Human Acute Gvhd Tissue-Infiltrating T Cells. *Blood.* 2017/12/08/ 2017;130:1982. doi:https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.1982.1982
113. Meyer EH, Hsu AR, Liliental J, et al. A distinct evolution of the T-cell repertoire categorizes treatment refractory gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Blood.* Jun 13 2013;121(24):4955-62. doi:10.1182/blood-2013-03-489757
114. Meier JA, Haque M, Fawaz M, et al. T Cell Repertoire Evolution after Allogeneic Bone Marrow Transplantation: An Organizational Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* May 2019;25(5):868-882. doi:10.1016/j.bbmt.2019.01.021
115. Nikolic B, Lee S, Bronson RT, Grusby MJ, Sykes M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest.* May 2000;105(9):1289-98. doi:10.1172/JCI7894
116. Wysocki CA, Panoskaltzis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood.* Jun 1 2005;105(11):4191-9. doi:10.1182/blood-2004-12-4726
117. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine.* Jul 2015;74(1):5-17. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.011
118. Rocken M, Racke M, Shevach EM. IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. *Immunol Today.* May 1996;17(5):225-31. doi:10.1016/0167-5699(96)80556-1
119. O'Garra A, Steinman L, Gijbels K. CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* Dec 1997;9(6):872-83. doi:10.1016/s0952-7915(97)80192-6
120. Via CS, Soloviova K, Puliaiev M, et al. In vivo IL-4 prevents allo-antigen driven CD8(+) CTL development. *Clin Immunol.* Jul 2017;180:11-24. doi:10.1016/j.clim.2017.03.008

121. Jordan WJ, Brookes PA, Szydlo RM, Goldman JM, Lechler RI, Ritter MA. IL-13 production by donor T cells is prognostic of acute graft-versus-host disease following unrelated donor stem cell transplantation. *Blood*. Jan 15 2004;103(2):717-24. doi:10.1182/blood-2003-01-0192
122. Imoto S, Oomoto Y, Murata K, et al. Kinetics of serum cytokines after allogeneic bone marrow transplantation: interleukin-5 as a potential marker of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. Jul 2000;72(1):92-7.
123. Wu Y, Yu XZ. IL-17A not equal Th17 in GvHD. *Cell Mol Immunol*. Mar 2018;15(3):282-283. doi:10.1038/cmi.2016.54
124. Cai Y, Ma S, Liu Y, et al. Adoptively transferred donor IL-17-producing CD4(+) T cells augment, but IL-17 alleviates, acute graft-versus-host disease. *Cell Mol Immunol*. Mar 2018;15(3):233-245. doi:10.1038/cmi.2016.37
125. Kappel LW, Goldberg GL, King CG, et al. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood*. Jan 22 2009;113(4):945-52. doi:10.1182/blood-2008-08-172155
126. Wang H, Yang YG. The complex and central role of interferon-gamma in graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity. *Immunol Rev*. Mar 2014;258(1):30-44. doi:10.1111/imr.12151
127. Burman AC, Banovic T, Kuns RD, et al. IFN-gamma differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. *Blood*. Aug 1 2007;110(3):1064-72. doi:10.1182/blood-2006-12-063982
128. Schmaltz C, Alpdogan O, Muriglian SJ, et al. Donor T cell-derived TNF is required for graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity after bone marrow transplantation. *Blood*. Mar 15 2003;101(6):2440-5. doi:10.1182/blood-2002-07-2109
129. Borsotti C, Franklin AR, Lu SX, et al. Absence of donor T-cell-derived soluble TNF decreases graft-versus-host disease without impairing graft-versus-tumor activity. *Blood*. Jul 15 2007;110(2):783-6. doi:10.1182/blood-2006-10-054510
130. Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J Exp Med*. Nov 1 1987;166(5):1280-9. doi:10.1084/jem.166.5.1280
131. Hill GR, Teshima T, Rebel VI, et al. The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J Immunol*. Jan 15 2000;164(2):656-63. doi:10.4049/jimmunol.164.2.656
132. Pierini A, Strober W, Moffett C, et al. TNF-alpha priming enhances CD4+FoxP3+ regulatory T-cell suppressive function in murine GVHD prevention and treatment. *Blood*. Aug 11 2016;128(6):866-71. doi:10.1182/blood-2016-04-711275
133. Okubo Y, Mera T, Wang L, Faustman DL. Homogeneous expansion of human T-regulatory cells via tumor necrosis factor receptor 2. *Sci Rep*. Nov 6 2013;3:3153. doi:10.1038/srep03153
134. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol*. Mar 2001;2(3):269-74. doi:10.1038/85339

135. Suh WK, Gajewska BU, Okada H, et al. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol.* Sep 2003;4(9):899-906. doi:10.1038/ni967
136. Veenstra RG, Flynn R, Kreymborg K, et al. B7-H3 expression in donor T cells and host cells negatively regulates acute graft-versus-host disease lethality. *Blood.* May 21 2015;125(21):3335-46. doi:10.1182/blood-2014-09-603357
137. Sun M, Richards S, Prasad DV, Mai XM, Rudensky A, Dong C. Characterization of mouse and human B7-H3 genes. *J Immunol.* Jun 15 2002;168(12):6294-7. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6294
138. Hashiguchi M, Kobori H, Ritprajak P, Kamimura Y, Kozono H, Azuma M. Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 29 2008;105(30):10495-500. doi:10.1073/pnas.0802423105
139. Kobori H, Hashiguchi M, Piao J, Kato M, Ritprajak P, Azuma M. Enhancement of effector CD8+ T-cell function by tumour-associated B7-H3 and modulation of its counter-receptor triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 at tumour sites. *Immunology.* Jul 2010;130(3):363-73. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03236.x
140. Prasad DV, Nguyen T, Li Z, et al. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J Immunol.* Aug 15 2004;173(4):2500-6. doi:10.4049/jimmunol.173.4.2500
141. Leitner J, Klauser C, Pickl WF, et al. B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREML2 interaction. *Eur J Immunol.* Jul 2009;39(7):1754-64. doi:10.1002/eji.200839028
142. Chen W, Hou Z, Li C, Xiong S, Liu H. Cloning and characterization of porcine 4Ig-B7-H3: a potent inhibitor of porcine T-cell activation. *PLoS One.* 2011;6(6):e21341. doi:10.1371/journal.pone.0021341
143. Benichou G, Gonzalez B, Marino J, Ayasoufi K, Valujskikh A. Role of Memory T Cells in Allograft Rejection and Tolerance. *Front Immunol.* 2017;8:170. doi:10.3389/fimmu.2017.00170
144. Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG. Alloreactive memory T cells are responsible for the persistence of graft-versus-host disease. *J Immunol.* Mar 1 2005;174(5):3051-8. doi:10.4049/jimmunol.174.5.3051
145. Davis M, Conlon K, Bohac GC, et al. Effect of pemetrexed on innate immune killer cells and adaptive immune T cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *J Immunother.* Oct 2012;35(8):629-40. doi:10.1097/CJI.0b013e31826c8a4f
146. Covassin L, Laning J, Abdi R, et al. Human peripheral blood CD4 T cell-engrafted non-obese diabetic-scid IL2rgamma(null) H2-Ab1 (tm1Gru) Tg (human leucocyte antigen D-related 4) mice: a mouse model of human allogeneic graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol.* Nov 2011;166(2):269-80. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04462.x
147. Hashimoto H, Kasteleiner P, Kressin J, et al. Removal of CD276(+) cells from haploidentical memory T-cell grafts significantly lowers the risk of GVHD. *Bone Marrow Transplant.* Oct 2021;56(10):2336-2354. doi:10.1038/s41409-021-01307-9

148. Han M, Harrison L, Kehn P, Stevenson K, Currier J, Robinson MA. Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative (CD3+CD4-CD8-) and CD8+ T cells. *J Immunol*. Jul 1 1999;163(1):301-11.
149. Vallera DA, Blazar BR. T cell depletion for graft-versus-host-disease prophylaxis. A perspective on engraftment in mice and humans. *Transplantation*. May 1989;47(5):751-60. doi:10.1097/00007890-198905000-00001
150. Reshef R, Luger SM, Hexner EO, et al. Blockade of lymphocyte chemotaxis in visceral graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. Jul 12 2012;367(2):135-45. doi:10.1056/NEJMoa1201248
151. Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood*. Feb 5 2009;113(6):1365-74. doi:10.1182/blood-2008-06-162420
152. Wu X, Tian J, Wang S. Insight Into Non-Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:1112. doi:10.3389/fimmu.2018.01112
153. van Hamburg JP, de Bruijn MJ, Ribeiro de Almeida C, et al. Enforced expression of GATA3 allows differentiation of IL-17-producing cells, but constrains Th17-mediated pathology. *Eur J Immunol*. Sep 2008;38(9):2573-86. doi:10.1002/eji.200737840
154. Verfuert S, Peggs K, Vyas P, Barnett L, O'Reilly RJ, Mackinnon S. Longitudinal monitoring of immune reconstitution by CDR3 size spectratyping after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplant and the effect of donor lymphocyte infusions on T-cell repertoire. *Blood*. Jun 15 2000;95(12):3990-5.
155. Li Y, Xu L. Evaluation of TCR repertoire diversity in patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Investig*. 2015;2:17. doi:10.3978/j.issn.2306-9759.2015.09.01
156. Summers C, Sheth VS, Bleakley M. Minor Histocompatibility Antigen-Specific T Cells. *Front Pediatr*. 2020;8:284. doi:10.3389/fped.2020.00284
157. Handgretinger R, Schilbach K. The potential role of gammadelta T cells after allogeneic HCT for leukemia. *Blood*. Mar 8 2018;131(10):1063-1072. doi:10.1182/blood-2017-08-752162
158. Watkins B, Qayed M, McCracken C, et al. Phase II Trial of Costimulation Blockade With Abatacept for Prevention of Acute GVHD. *J Clin Oncol*. Jun 10 2021;39(17):1865-1877. doi:10.1200/JCO.20.01086

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Uniklinikums Tübingen in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit von Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach, Leiterin der Arbeitsgruppe, und Herrn Hisayoshi Hashimoto, MD, PhD, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Schilbach.

Sämtliche nicht speziell ausgewiesene Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Dr. Hashimoto von mir eigenständig durchgeführt. Explizit herauszustellen ist, dass die Transplantation der unterschiedlichen T-Zellgrafts im Mausmodell, die Pflege der Mäuse und Präparation der murinen Organe durch Herrn Dr. Hashimoto erfolgte. Die histologischen Schnittpräparate wurden durch Frau Friederike Müller angefertigt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Herrn Hisayoshi Hashimoto durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 11.01.2023

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Hashimoto H, Kasteleiner P, Kressin J, Müller F, Bühring HJ, Handgretinger R, Schilbach K. Removal of CD276⁺ cells from haploidentical memory T-cell grafts significantly lowers the risk of GVHD. Bone Marrow Transplant. 2021 Oct;56(10):2336-2354.

9 Danksagung

Mit der Fertigstellung dieser Arbeit schließt sich ein sehr interessantes, lehrreiches und arbeitsintensives Kapitel meiner universitären Laufbahn.

Der Abschluss einer umfangreichen wissenschaftlichen Arbeit wird von vielen Komponenten beeinflusst, so spielen der fachliche Austausch, die wissenschaftliche Betreuung und der Rückhalt von Familie und Freunden ebenfalls eine wichtige Rolle.

Im Folgenden möchte ich den Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Karin Schilbach, für die Überlassung des interessanten Themas sowie der hervorragenden fachlichen und menschlichen Betreuung über den kompletten Bearbeitungszeitraum.

Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. Hisayoshi Hashimoto für die verlässliche und allzeit hilfreiche Betreuung im Rahmen der Versuchsdurchführung und Datenauswertung/-analyse bedanken.

Dem interdisziplinären Promotionskolleg Medizin (IZFK) der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen bin ich ebenfalls sehr dankbar hinsichtlich der finanziellen Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums.

Ohne die PBMC-Spender wären die durchgeführten Versuche nicht möglich gewesen, auch hier möchte ich mich herzlich bedanken.

Zudem möchte ich Selina Bernarding meinen Dank aussprechen, die mich auf meinem Weg mit Anregungen und produktiven Gesprächen begleitet hat.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern für die Ermutigung, Zusprüche und den unerschütterlichen Glauben an mich danken. Ohne sie hätte ich diesen Weg nicht zurückgelegt.