

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Prospektive Analyse der Immunrestitution in Patienten nach Alemtuzumab
getriggelter T-Zelldepletion als prädiktiver Marker für das Auftreten einer aGVHD

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Saskia Hendriks
aus Heidelberg

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1. Immunsystem	3
2.1.1. Allgemeines	3
2.1.2. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	5
2.1.3. T-Lymphozyten.....	6
2.1.3.1. Zytotoxische T-Zellen (Tc-Zellen).....	6
2.1.3.2. T-Helferzellen (Th-Zellen)	7
2.1.3.3. Regulatorische T-Zellen (Treg)	7
2.2. Allogene Stammzelltransplantation	9
2.2.1. Definition	9
2.2.2. Indikationen	9
2.2.3. Ziel.....	10
2.2.4. Patienten und Spenderauswahl	10
2.2.5. Konditionierung	11
2.2.6. Immunrekonstitution nach allogener HSZT	11
2.2.7. Komplikationen.....	13
2.3. Graft-Versus-Host-Disease (GVHD).....	15
2.3.1. Definition	15
2.3.2. Akute Graft-Versus-Host-Disease (aGVHD)	15
2.3.3. Chronische Graft-Versus-Host-Disease (cGVHD)	20
2.3.4. Treg und aGVHD.....	22
2.3.5. T-Zelldepletion mit Alemtuzumab.....	23
2.4. Marker	25
2.4.1. CD52	26
2.4.2. CD25	26
2.4.3. Foxp3	26

2.4.4. ILT3	27
2.4.6. TIGIT	28
2.4.7. NKp30	29
2.5. Zytokine	30
2.5.1. Interleukin-2 (IL-2).....	30
2.5.2. Interleukin-5 (IL-5).....	30
2.5.3. Interleukin-4 (IL-4).....	31
2.5.4. Interleukin-6 (IL-6).....	31
2.5.5. Tumornekrosefaktor alpha (TNF α).....	31
2.5.6. Interleukin-9 (IL-9).....	31
2.5.7. Interleukin-13 (IL-13).....	32
2.5.8. Interleukin-17 (IL-17).....	32
2.5.9. Interleukin-21 (IL-21).....	32
2.5.10. Interferon Gamma (IFN γ)	32
2.5.11. Antiinflammatorische Zytokine Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-22 (IL-22).....	33
2.6. Vorarbeiten	33
3. Material und Methoden	36
3.1. Liste der verwendeten Materialien.....	36
3.1.1. Puffer Lösungen und Medien	36
3.1.2. Chemikalien und Reagenzien	36
3.1.3. Geräte	37
3.1.4. Plastikwaren	38
3.1.5. Glaswaren	39
3.1.6. Kits	39
3.1.7. Beads	39
3.1.8. Antikörper	39
3.1.9. Software	41
3.2. Patientenblut.....	41
3.3. Buffy-Coat (BC)	42
3.4. Patientenliste des Projekt 1 - Bestimmung prädiktiver Marker für aGVHD	42
3.5. Patientenliste des Projekt 2 - Analyse der Zytokinlevel nach HSZT.....	44
3.6. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	44

3.6.1. Definition und Prinzip	44
3.6.2. Gerät	46
3.7. Materialgewinnung und - Aufarbeitung.....	46
3.7.1. Projekt 1	46
3.7.1.1. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Definition	46
3.7.1.2. PBMC Gewinnung und Aufbewahrung.....	47
3.7.1.3. PMC Färbung	48
3.7.1.4. Verwendetes Antikörperpanel	49
3.7.2. Projekt 2	50
3.7.2.1. Serum Definition.....	50
3.7.2.2. Serum Gewinnung und Lagerung	51
3.7.2.3. Serumproben Färbung	51
3.7.2.4. Verwendetes Zytokinpanel	52
3.7.3. Computergestützte Auswertung der ermittelten Daten	53
4. Ergebnisse	55
4.1. Projekt 1	55
4.1.1. CD52 Expression einzelner T-Zellsubtypen	55
4.1.2. CD52-Negativität als Prädiktor für die Entstehung aGVHD	56
4.1.3. Zeitlicher Verlauf der CD52 Negativität.....	57
4.1.4. Hauptfragestellung: Cut off CD52 ⁻ Treg an Tag 50 als früher aGVHD Marker	59
4.1.5. Verhältnis CD8 ⁺ CD52 ⁺ Lymphozyten zu CD52 ⁻ Treg.....	60
4.1.6. Die T-Zellmarker GARP, ILT3, TIGIT und aGVHD.....	61
4.1.7. Verlauf der GARP Expression auf Treg	62
4.1.8. Die T-Zellmarker GARP, ILT3, TIGIT und CD52.....	64
4.1.9. NK-Zellrekonstitution: Tag 50 und Tag 100 im Vergleich.....	66
4.1.10. Verlauf der NK-Zellrekonstitution	67
4.1.10.1. NK-Zellsubpopulationen und TIGIT.....	68
4.1.10.2. Verlauf der TIGIT Expression auf CD56 ^{dim} NK-Zellen	69
4.2. Projekt 2	73
4.2.1. Interleukin-2.....	73
4.2.2. Betrachtung weiterer Zytokine.....	76
5. Diskussion.....	78

5.1. Projekt 1	78
5.1.1. Prospektive Analyse und daraus resultierende Fehlerquellen	78
5.1.2. Methodische Problematik der Messungen von Treg	79
5.1.3. Weitere Einflussgrößen der Treg Funktion.....	81
5.1.4. Die Rolle der T-Zelldepletion mittels Alemtuzumab	81
5.1.5. Cut off CD52 ⁻ Treg als Prädiktor für aGVHD	83
5.1.6. Das Gleichgewicht CD8 ⁺ Lymhozyten und Treg im Prozess aGVHD	85
5.1.7. Protektiver Effekt der funktionellen Marker GARP und ILT3 auf Treg.....	87
5.1.8. NK-Zellrekonstitution im Zusammenhang mit aGVHD	90
5.1.9. NK-Zellsubpopulationen CD56dim	91
5.1.10. Die Rolle von TIGIT auf CD56dim NK-Zellen im Hinblick auf aGVHD	91
5.2. Projekt 2	93
5.2.1. Methodische Probleme des Zytokinpanels.....	93
5.2.2. IL-2 als Induktor der Treg Aktivierung und damit antiinflammatorisches Signal	94
5.2.3. HHV-6 und das Zytokinprofil nach allogener HSZT	96
5.2.4. TNF-alpha (TNF α) und die Prädiktion aGVHD.....	97
5.2.5. Soluble STimulation-2 s (sST2) als erfolgsversprechender Biomarker	97
5.2.6. Einflussfaktoren auf das Zytokinmuster	97
5.3. Klinische Relevanz und Ausblick.....	99
6. Zusammenfassung	103
7. Literaturverzeichnis.....	105
8. Anhang.....	117
Protokolle.....	117
9. Danksagung.....	127
10. Tabellarischer Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: T-Zellselektion im Thymus modifiziert nach Patkin (Parkin und Cohen 2001).....	5
Abbildung 2: Treg Differenzierung und regulatorische Wirkung modifiziert nach Ogonek (Ogonek et al., 2016).....	8
Abbildung 3: Immunzellrekonstitution nach allogener HSZT unterteilt in angeborenes und erworbenes Immunsystem modifiziert nach Ogonek (Ogonek et al., 2016).....	13
Abbildung 4: Komplikationen nach allogener HSZT im zeitlichen Zusammenhang modifiziert nach Ogonek (Ogonek et al., 2016)	14
Abbildung 5: Einteilung der GVHD nach zeitlichem Auftreten nach allogener HSZT	16
Abbildung 6: Ausgeprägter Lichen planus und Poikilodermie im Rahmen von cGVHD (Lee, 2017)	22
Abbildung 7: Aufbau eines monoklonalen Antikörpers am Beispiel von Alemtuzumab / Campath-H1 modifiziert nach Kripp (Kripp, 2013)	23
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Immunzellrekonstitution mit - und ohne T-Zelldepletion modifiziert nach Baumeister (Baumeister et al., 2020)	24
Abbildung 9: Foxp3 und die Beeinflussung der Treg-Funktion modifiziert nach Braza (Braza et al., 2015)	27
Abbildung 10: TIGIT in der Rolle eines Immuncheckpoint-Inhibitors modifiziert nach Stojanovic (Stojanovic al., 2018).....	29
Abbildung 11: CD52 Level und aGHVD (Woelfinger et al., 2020b)	34
Abbildung 12: CD52 positive Treg zeitlicher Verlauf (Woelfinger et al., 2020b	34
Abbildung 13: Schematischer Projektaufbau der Hauptuntersuchungen (Projekt 1)	41
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Zellseparation mittels Durchflusszytometrie https://www.imbb.forth.gr/imbb-people/en/facs-sorting-facility-home (29.04.2020).....	46

Abbildung 15: Schematische Darstellung der Ficollseparation (modifiziert nach https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/human-pbmc-isolation-and-counting-using-scepter-cell-counter.html)	48
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Funktionsweise des LEGENDplex Zytokinpanel (https://www.biolegend.com/legendplex , 29.04.2020).....	53
Abbildung 17: Veranschaulichung der Gating Methode mit Hilfe des Programms FlowJo.....	54
Abbildung 18: Schematische Darstellung der erstellten Kurven einzelner Zytokinmessungen.....	54
Abbildung 19: CD52 Expression der einzelnen T-Zelltypen über alle untersuchten Zeitpunkte gemittelt.....	56
Abbildung 20: Anteil CD52 ⁻ Treg bei Patienten mit aGVHD und ohne GVHD.....	56
Abbildung 21: Anteil CD52 ⁻ Treg bei Patienten mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 50 nach allogener HSZT	57
Abbildung 22: Anteil an CD52 ⁻ Treg im zeitlichen Verlauf nach allogener HSZT. 22-1 bei Patienten mit GVHD; 22-2 bei Patienten ohne aGVHD	58
Abbildung 23: Anteil CD52 ⁻ Treg im zeitlichen Verlauf nach allogener HSZT	59
Abbildung 24: ROC-Kurve für CD52 ⁻ Treg an d50 nach allogener HSZT	60
Abbildung 25: Verhältnis CD8 ⁺ CD52 ⁺ Lymphozyten zu CD52 ⁻ Treg an Tag 100 nach allogener HSZT	61
Abbildung 26: GARP Expression auf Treg 26-1: Patienten mit aGVHD und ohne GVHD 26-2: Patienten mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 50 nach allogener HSZT 26-3: Patienten mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 100 nach allogener HSZT	62
Abbildung 27: GARP Expression auf Treg nach zeitlichem Verlauf 27-1: Bei Patienten mit aGVHD 27-2: Bei Patienten ohne aGVHD 27-3: Bei Patienten mit aGVHD (rot) gegenüber ohne GVHD (grün).....	63
Abbildung 28: GARP Expression auf CD52 ⁺ vs. CD52 ⁻ Treg	65
Abbildung 29: ILT-3 Expression auf CD52 ⁺ vs. CD52 ⁻ T-Zellsubtypen.....	65

Abbildung 30: NK-Zellrekonstitution bei Patienten mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 50 nach allogener HSZT.....	66
Abbildung 31: NK-Zellrekonstitution bei Patienten mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 100 nach allogener HSZT.....	66
Abbildung 32: Abbildung: NK-Zellrekonstitution im zeitlichen Verlauf 32-1: Bei Patienten mit aGVHD 32-2: Bei Patienten ohne aGVHD 32-3: Bei Patienten mit aGVHD und ohne aGVHD	67
Abbildung 33: Anteil CD56dim NK-Zellen bei Patienten mit aGVHD und ohne über alle Zeitpunkte gemittelt	68
Abbildung 34: TIGIT auf NK Zellen bei Patienten ohne aGVHD und mit aGVHD über alle Zeitpunkte gemittelt 34-1: TIGIT CD56 ^{bright} , 34-2: TIGIT CD56 ^{dim}	69
Abbildung 35: TIGIT auf CD56dim NK-Zellen CD56 35-1: Patienten mit aGVHD; 35-2: Patienten ohne aGVHD	70
Abbildung 36: TIGIT Expression auf CD56dim NK-Zellen im zeitlichen Verlauf bei Patienten mit aGVHD und ohne GVHD im Vergleich	71
Abbildung 37: Kumulative IL-2 Level bei Patienten 37-1: Mit aGVHD und ohne GVHD (jeweils 10 Proben) 37-2: Mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 50 nach Transplantation (jeweils 4 Proben)	74
Abbildung 38: Zeitlicher Verlauf der IL-2 Level bei einem Patienten ohne aGHVD und einem mit aGVHD	75
Abbildung 39: Exemplarische Darstellung der angewendeten Gatingmethode mittels Flow Jo.....	80
Abbildung 40: Treg im Fokus der Immunhomöostase	87
Abbildung 41: GARP und dessen Einfluss auf Treg modifiziert nach Shevach (Shevach, 2017).....	88
Abbildung 42: TIGIT und dessen Einfluss auf Treg modifiziert nach Anderson (Anderson et al., 2016)	92
Abbildung 43: IL-2 und die Beeinflussung der Treg Funktion modifiziert nach Matsuoka (Matsuoka, 2018)	95

Abbildung 44: Immunzellbasierte Therapien als GVHD Prophylaxe modifiziert nach Chabannon (Christian Chabannon, 2018) 102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gesamtschweregrad der GVHD nach Glucksberg (Glucksberg et al., 1974).....	17
Tabelle 2: Organstadien der akuten GVHD nach Harris (Harris et al., 2016)	18
Tabelle 3: Verwendete Antikörper mit Spezies, Fluorochrom, Klon und Hersteller ..	40
Tabelle 4: Interne Nummer der verwendeten Buff Coats.....	42
Tabelle 5: Patientenliste Projekt 1 mit Nummer, Alter, Grunderkrankung, GVHD Status.....	43
Tabelle 6: Patientenliste Projekt 2 mit Nummer, Alter, Grunderkrankung, Anzahl der Proben und jeweiliger Zeitpunkt, GVHD Status	44
Tabelle 7: Verwendeten Antikörper Panel für die Färbung der wöchentlichen PBMCs	50
Tabelle 8: Abbildungsübersicht inklusive statistischer Datenanalyse	72
Tabelle 9: Name des gemessenen Zytokins, Mittelwert, Median, Standardabweichung, 95% Konfidenzintervall und aGVHD Status	77

Abkürzungsverzeichnis

aGVHD	akute Graft-Versus-Host Disease
allogene HSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
AK	Antikörper
AML	akut myeloische Leukämie
ALL	akut lymphatische Leukämie
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
ATRA	All-trans-retinoid-Säure
BC	Buffy-Coat
CAR-Treg	Chimärer Antigenrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CK-2	Kreatinkinase 2
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CMML	Chronisch myelomonozytäre Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
cGVHD	chronische Graft-Versus-Host-Disease
CSA	Cyclosporin A
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DLI	Donor Lymphozyten Infusion
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Essentielle Thrombozythämie
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GVL	Graft-Versus-Leukemia-Effect
GVHD	Graft-versus-Host-Disease
HIV	Human Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen

IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-9	Interleukin-9
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin-13
IL-17	Interleukin-17
IL-21	Interleukin-21
IL-22	Interleukin-22
ILT3	Immunoglobulin-like transcript 3
IFN γ	Interferon gamma
KDa	Kilo Dalton
KM	Knochenmark
LPS	Lipopolysacchariden
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MHC	Minor Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom
NHL	Non-Hodking-Lymphom
NIH	National Institutes of Health, USA
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat Buffer Saline
PCT	Procalcitonin
PDL-1	Programmed death ligand 1
PTX3	Pentraxin-related protein3
Pg	Picogramm
ROR γ	Retinoid-related orphan receptor gamma
ROR α	Retinoid-related orphan receptor alpha
Teff	T-Effektorzelle
Tc	zytotoxische T-Zelle
TGF β	Transforming growth factor beta

Th	T-Helferzellen
TIGIT	T-Zellrezeptor mit IgG und ITIM Domäne
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allogene HSZT) stellt für viele Patienten, die unter schweren hämatologischen Erkrankungen wie beispielsweise der akuten myeloischen Leukämie (AML) oder dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) leiden, weiterhin die einzige kurative Therapieoption dar (Bose et al., 2017). Die erste Stammzelltransplantation am Menschen wurde 1957 durchgeführt. Allerdings gab es noch zahlreiche Komplikationen, die den Therapieerfolg stark einschränkten. Erst in den 1970er Jahren, als Methoden zur HLA-Typisierung angewandt wurden, verbesserten sich die Erfolgsraten langsam. HLA steht für Humanes Leukozyten-Antigen. Unter dem HLA-System versteht man bestimmte Erbmerkmale, die auf Chromosom 6 lokalisiert sind und als wichtiges Instrument zur Erfassung von Transplantationspartnern dienen (Rood, 1977).

Auch die supportiven Therapien nach Transplantation entwickelten sich in den nächsten Jahrzehnten immer weiter, sodass die Zahl der durchgeführten Transplantationen nun kontinuierlich stieg (Thomas, 2000). Im Jahr 2014 wurden europaweit mehr als 15.000 allogene HSZT durchgeführt und die Zahlen wachsen zum aktuellen Zeitpunkt noch weiter (Passweg et al., 2016).

Dennoch ist die Stammzelltransplantation bis heute ein risikoreiches Therapieverfahren. Eine Hauptkomplikation nach allogener HSZT ist das Auftreten der sogenannten Graft-Versus-Host-Disease (GVHD), bei der sich Zellen des Spenders gegen gesundes Empfängergerewebe richten und dort eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Bei ca. 50 % aller Patienten nach allogener HSZT kommt es zum Ausbruch einer akuten GVHD (aGVHD), wenn auch in verschiedenen Ausprägungsgraden (Pasic et al., 2020).

Hauptverantwortlich für die Entstehung einer aGVHD macht man die verzögerte Immunrekonstitution in betroffenen Patienten. Insbesondere den regulatorischen T-Zellen (Treg), eine Untergruppe der CD4 positiven T-Zellen, wird hierbei eine Schlüsselfunktion zugeschrieben. Sie sind Teil des erworbenen, spezifischen Immunsystems und spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase, indem sie die T-Effektorzellaktivität hemmen und so überschießende Entzündungsprozesse unterdrücken (Ogonek et al., 2016).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analyse der Immunrekonstitution bei Patienten nach allogener HSZT. Bereits publizierte Arbeiten, unter anderem die von Pascal Wölfinger, in der die Immunrekonstitution nach allogener HSZT mit T-Zell-depletierten Konditionierungsregimen retrospektiv analysiert wurde, lassen vermuten, dass Treg von Patienten mit aGVHD funktionelle Defizite aufweisen. Außerdem gibt es aus bisherigen Daten Hinweise darauf, dass der relative Anteil CD52-Treg mit dem Auftreten aGVHD korreliert (Woelfinger et al., 2020). Nicht zuletzt deshalb liegt der Fokus meiner Untersuchungen auf der Subpopulation der Treg.

Ziel meiner prospektiven Arbeit war, prädiktive Marker zu identifizieren, die besonders prägnant sind und das Auftreten aGVHD vorhersehbar machen. Darüber hinaus sollte der optimale Zeitpunkt für deren Bestimmung festgelegt werden. Idealerweise soll so beispielsweise im Rahmen von Immunmonitoring Konzepten die Entstehung von aGVHD verhindert oder wenigstens vermindert werden (Dehghani et al., 2020). Dieses Forschungsvorhaben soll durch die gewonnenen Erkenntnisse der Treg Funktion einen Beitrag leisten, neue therapeutische bzw. prophylaktische Ansatzpunkte im klinischen Alltag in Bezug auf die aGVHD Behandlung zu erzielen.

2. Literaturdiskussion

Die erfolgreiche Übertragung von Blutstammzellen eines Spenders an einen Empfänger ist ein Verfahren, das einem langen Entwicklungsprozess unterlag und noch heute mit Hindernissen wie dem Auftreten aGVHD verbunden ist. Um die immunologischen Abläufe dieses Therapiekonzeptes und die komplexen Prozesse in der Pathogenese aGVHD nachvollziehen zu können, sind im Folgenden erst einmal die Grundlagen unseres Immunsystems dargelegt.

2.1. Immunsystem

2.1.1. Allgemeines

Die primäre Aufgabe unseres Immunsystems ist es uns vor Mikroorganismen und Noxen zu schützen, denen wir im Alltag ständig ausgesetzt sind. Wir wissen heute, dass unser Immunsystem ein komplexes Netzwerk ist, das sich aus verschiedenen Organen, Zellen und Botenstoffen wie Zytokinen zusammensetzt, die in ständigem Austausch mit einander stehen. Dysfunktionen immunologischer Prozesse sind nicht nur im Rahmen der Stammzelltransplantation und der GVHD Entstehung von zentraler Bedeutung. Fehlgeleiteten immunologischen Mechanismen spricht man auch in der Pathogenese von Immundefizienzsyndromen, Autoimmunerkrankungen und Krebserkrankungen eine zentrale Bedeutung zu.

Man unterteilt unser Immunsystem grob in zwei Teile, die durch Geschwindigkeit einerseits und Spezifität andererseits geprägt sind. Die Geschwindigkeit wird durch unser angeborenes, unspezifisches Immunsystem charakterisiert, während der erworbene Anteil unseres Immunsystems die Spezifität verkörpert. Besonders hervor zu heben ist die Rolle der Haut, als Teil der angeborenen Immunität. Sie ist das größte menschliche Organ und nimmt eine wichtige Barrierefunktion zwischen äußerem und innerem Milieu ein. Damit ist keine rein physikalische Barriere gemeint. Vielmehr ist die Haut ein immunologisch hochaktives Organ, das zahlreiche antimikrobielle Peptide produziert und unseren Körper so vor fremden Eindringlingen schützt. (Marie-Charlotte Brüggem, 2020).

Im Zentrum der angeborenen Immunabwehr stehen phagozytierende Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen. Über Radikalbildung und toxische, enzymatische Prozesse zerstören sie die Erreger. Dieses primäre Abwehrprinzip weist allerdings Lücken auf. Unwirksam ist es beispielsweise in der Abwehr bekapselter Erreger wie Pneumokokken und Haemophilus influenzae. Sie können nicht phagozytiert werden und müssen erst mittels Antikörpern opsoniert, d.h. markiert werden. Hier kommt unser erworbenes Immunsystem ins Spiel (Braff and Gallo, 2006), (Parkin and Cohen, 2001).

Unsere erworbene Immunität ist durch Antigen spezifische Reaktionen gekennzeichnet. Außerdem besitzt dieser Teil unseres Immunsystems im Unterschied zum angeborenen Anteil die Fähigkeit Gedächtniszellen auszubilden und schützt so vor Reinfektionen mit dem gleichen Erreger. Dieses Prinzip macht man sich seit Jahrzehnten im Rahmen von Impfungen zu Nutze. Zentraler Bestandteil der hier stattfindenden Immunprozesse sind T- und B-Lymphozyten. Beide Zellgruppen entwickeln sich aus Progenitorzellen des Knochenmarks. Die B-Zellen verbleiben bis zum Ende ihres Reifungsprozesses im Knochenmark, während die T-Zellen noch im unreifen Status in den Thymus wandern. Hier findet die sogenannte Positiv- und Negativselektion statt. Die einzelnen Schritte veranschaulicht Abbildung eins. Die Positivselektion findet in der Rindenzone des Thymus statt. Zunächst werden T-Zellen, die über den Major Histocompatibility Complex (MHC) präsentierte Antigene erkennen, selektiert. Anschließend wandern sie weiter in die Rinden-Mark-Grenzzone, wo der zweite Selektionsschritt, die Negativselektion stattfindet. Dabei werden die T-Zellen eliminiert, die eigene Moleküle als Fremd erkennen. Dies ist ein Schlüsselprozess in der Induktion von Selbsttoleranz. Nur diejenigen T-Zellen, die beide Selektionsschritte erfolgreich durchlaufen haben, können nun über die Markzone des Thymus in die sekundär Lymphatischen Organe gelangen und dort ihrer Immunfunktion nachkommen (Braff and Gallo, 2006), (Parkin and Cohen, 2001).

Es soll an dieser Stelle betont werden, dass es sich keinesfalls um zwei strikt voneinander getrennte Systeme handelt. Beide Anteile unseres Immunsystems stehen in ständigem Austausch miteinander und beeinflussen sich wechselseitig (Braff and Gallo, 2006), (Parkin and Cohen, 2001).

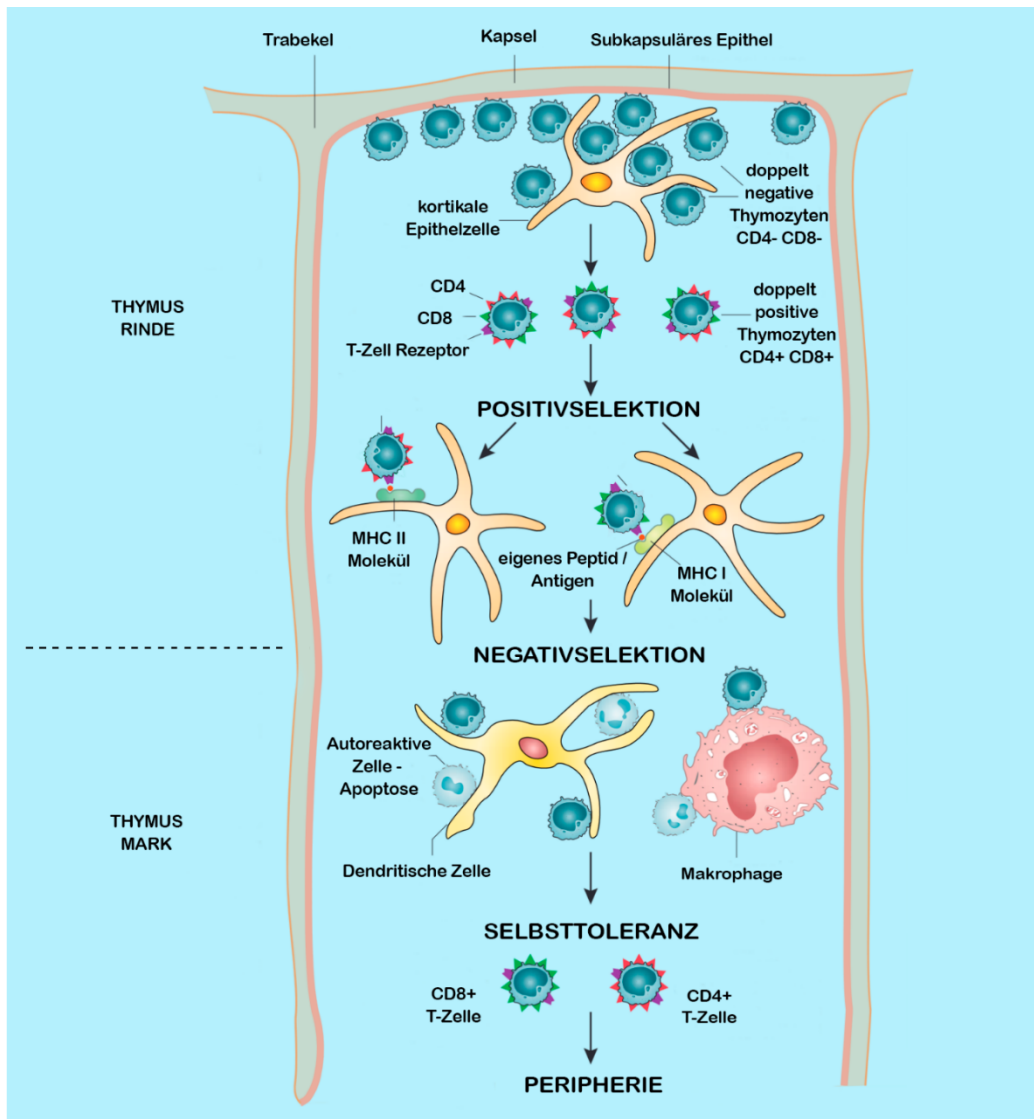


Abbildung 1: T-Zellselektion im Thymus modifiziert nach Patkin (Parkin und Cohen 2001)

2.1.2. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, sind die NK-Zellen Teil des angeborenen Immunsystems. Sie sind die ersten Lymphozyten, die nach allogener HSZT rekonstituieren. Insgesamt machen NK-Zellen beim Gesunden knapp 10 % aller zirkulierenden Lymphozyten aus. Auf Ihrer Oberfläche exprimieren sie CD16, ein Immunglobulinrezeptor (Ig), der eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion einnimmt. Ein weiteres Oberflächenmerkmal ist CD56. Dessen Expressionshöhe wird genutzt um die NK-Zellen in zwei Subpopulationen zu unterteilen: Die CD56dim NK-Zellen mit einem niedrigen Anteil CD56 und die CD56bright NK-Zellen, auf deren

Oberfläche ein hoher Anteil CD56 zu finden ist (Zaghi et al., 2019).

Sie leisten einen wichtigen Beitrag zur Immunüberwachung, indem sie vor viralen Infektionen und der Krebsentstehung schützen. Dies geschieht im Gegensatz zur spezifischen Immunabwehr alles ohne vorherige antigenspezifische Sensibilisierung. NK-Zellen besitzen eine Reihe aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren. Sie besitzen außerdem die Fähigkeit eigene HLA-1 Moleküle, die sich auf allen kernhaltigen Zellen finden, von fremden HLA-1 Molekülen zu unterscheiden. Solche fremden bzw. veränderten HLA-Moleküle finden sich beispielsweise auf tumortransformierten oder virusbefallenen Zellen. Erkennt eine NK-Zelle ein solches Molekül, werden inhibitorische NK-Zellrezeptoren weniger aktiviert und das Gleichgewicht wird zu anti-viralen/pro-inflammatorischen Zytokinen hin verschoben. Letztendlich kommt es zur Ausschüttung toxischer Proteine wie Granzyme und Perforin, die den apoptotischen Abbau der betroffenen Zelle induzieren (Zaghi et al., 2019).

2.1.3. T-Lymphozyten

T-Lymphozyten gehören wie der Name andeutet zur Untergruppe der Lymphozyten und exprimieren demnach CD3 auf ihrer Oberfläche. Zusätzlich besitzen sie einen T-Zellrezeptor (TZR). Dabei handelt es sich um ein heterodimeres Transmembranmolekül, das sich aus einer konstanten und einer variablen Domäne zusammensetzt. Die variable Domäne kann sich von T-Lymphozyt zu T-Lymphozyt unterscheiden. Rekombinationsmechanismen wie das Splicing führen zu einer enormen Vielfalt der Antigenrezeptoren und ermöglichen so eine spezifische Abwehr gegenüber diversen Erregern. Zusammen mit CD3 bildet der jeweilige TZR einen Komplex, der der Antigenerkennung dient. Kommt es zur Bindung zwischen dem TZR und an MHC präsentierten Molekülen werden intrazelluläre Signalwege induziert und die T-Zelle aktiviert (Delves, 2000a).

2.1.3.1. Zytotoxische T-Zellen (Tc-Zellen)

Zytotoxische T-Zellen werden auch als CD8-positive T-Zellen bezeichnet, da sie den CD8-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. Sie erkennen auf MHC Klasse I präsentierte Peptide virusbefallener Zellen und können diese auf zwei verschiedene Wege eliminieren. Entweder über den Perforin-Granzym-Weg oder über den FAS-Weg. Bei ersterem werden Perforine in die Membran der Zielzelle geben, sodass

diese durchlässig wird und mit Granzym gefüllte Vesikel eingeschleust werden können, das zur DNA-Fragmentierung und folglich Apoptose führt. Bei der zweiten Variante binden Tc-Zellen über ihren FAS Liganden das FAS Molekül der befallenen Zelle. Dies induziert über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose der Zielzelle (Delves, 2000b).

2.1.3.2. T-Helferzellen (Th-Zellen)

T-Helferzellen werden auch als CD4-positive Zellen bezeichnet, da sie CD4 auf ihrer Oberfläche tragen. Sie erkennen auf MHC Klasse II präsentierte Moleküle. Im Unterschied zu den Tc-Zellen besitzen sie keine zytotoxische, sondern immunmodulatorische Funktion. Es handelt sich bei Th-Zellen hauptsächlich um Zytokin sezernierende Helferzellen (Germain, 2002)

Dabei unterscheidet man je nach Zytokinexpressionsmuster zwischen Th-Zellen 1, Th-Zellen 2 und den Th-17 Zellen. Th-1 Zellen sezernieren überwiegend IL-2 und Interferon gamma, während bei den Th-2 Zellen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 führend sind. Interleukine sind Botenstoffe, die der Kommunikation der Zellen unter einander dienen. Sie modulieren Immunantworten und besitzen die Fähigkeit allergische Reaktionen und autoimmune Prozesse zu unterdrücken bzw. zu reduzieren. Vereinfacht kann man sagen, dass die produzierten Zytokine der Th-1 vor allem zellvermittelte Abwehrmechanismen verbessern. Sie aktivieren beispielsweise Makrophagen und Tc-Zellen. Die Th-2 vermittelten Signale hingegen unterstützen vordergründig die B-Zellen. Th17-Zellen werden als eigenständige Th-Zell-Linie angesehen und an Hand der Expression der Zytokine IL-17a und IL-17F und der Transkriptionsfaktoren ROR γ und ROR α definiert. Sie besitzen die Fähigkeit unter bestimmten Umständen Entzündungen zu induzieren oder aufrechtzuerhalten (Chang et al., 2011).

2.1.3.3. Regulatorische T-Zellen (Treg)

Die regulatorische T-Zellen (Treg) stellen eine Untergruppe der Th-Zellen dar. Sie machen ca. 10 % der Th-Zellen aus. Sie sind daher wie Th-Zellen CD3 und CD4 positiv. Zusätzlich exprimieren sie CD25 und den Transkriptionsfaktor Foxp3 (Barbi et al., 2014).

Man unterscheidet natürliche Treg (nTreg), die direkt von Th-Zellen aus dem Thymus abgeleitet sind, von induzierten Treg (iTreg), die in peripheren lymphatischen Organen in Anwesenheit von TGF β und IL-2 generiert wurden (Ogonek et al., 2016).

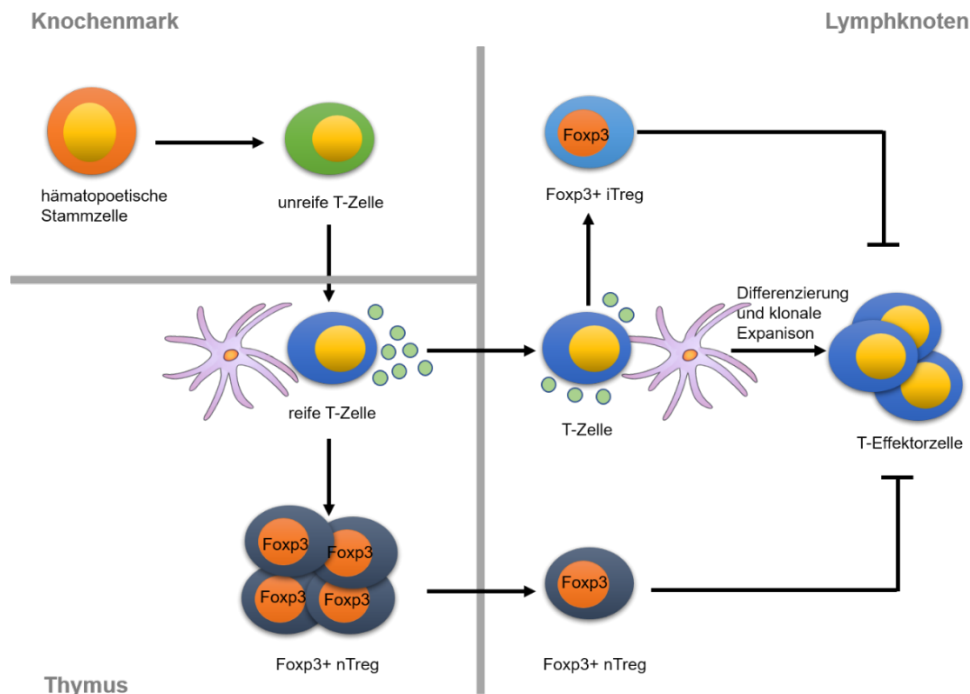


Abbildung 2: Treg Differenzierung und regulatorische Wirkung modifiziert nach Ogonek (Ogonek et al., 2016)

Treg sind essentiell zum Aufrechterhalten von Selbsttoleranz. Sie unterdrücken überschießende Immunreaktionen und limitieren dadurch chronische Entzündungsprozesse. Auch das Auftreten autoimmuner Prozesse im Körper wird durch die suppressive Eigenschaft der Treg verhindert (Vignali et al., 2008).

Sie scheinen aber keineswegs nur bei autoimmunen Prozessen eine Rolle zu spielen. In den letzten Jahren erweckten sie auch im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen immer wieder Aufmerksamkeit. Eine an Lymphom Patienten (47 mit klassischem Hodgkin Lymphom und 48 mit diffusem großzelligem B-Zelllymphom) durchgeführte Studie zeigte, dass hohe Treg-Level im peripheren Blut mit besserem Outcome assoziiert sind. Man beobachtete bei Patienten mit hoher Treg-Frequenz ein besseres Ansprechen auf Chemotherapie und weniger Rückfälle (Dehghani et al., 2020).

Andere Daten zeigten, dass hohe Treg-Level mit schlechterem Überleben bei malignen Erkrankungen assoziiert sind. Eine Studie, bei der Ovarialkarzinomgewebe isoliert wurde, ergab, dass hohe Foxp3 Level im Tumorgewebe mit kürzerem Überleben vergesellschaftet waren. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die immunsuppressive Wirkung der Treg sein, die möglicherweise die Tumorabwehr negativ beeinflusst (Wolf et al., 2005).

2.2. Allogene Stammzelltransplantation

2.2.1. Definition

Unter allogener Stammzelltransplantation versteht man die Übertragung von Stammzellen von einem Individuum auf ein zweites, genetisch nicht identisches Individuum. Streng davon abzugrenzen ist der Prozess der autologen Stammzelltransplantation, bei der die Stammzellen nach hochdosierter Chemotherapie wieder auf das gleiche Individuum übertragen werden. Der Begriff Knochenmarktransplantation gilt mittlerweile als veraltet und wurde von der Bezeichnung hämatopoetische Stammzelltransplantation abgelöst. Die transfundierten Stammzellen können direkt aus dem Knochenmark entstammen, müssen es aber nicht. Sie können auch aus peripherem Blut oder Nabelschnurblut gewonnen werden.

Unabhängig von der Quelle der gewonnenen Stammzellen ist das Ziel durch die Übertragung der Stammzellen, welche auf Grund ihrer Plastizität die einzigartige Fähigkeit besitzen sich in verschiedenste Zellpopulationen auszudifferenzieren, eine Erholung der Hämatopoese des Empfängers zu erreichen (Giralt and Bishop, 2009). Mit diesem Hintergrund lassen sich die Indikationen der Stammzelltransplantation leicht ableiten.

2.2.2. Indikationen

Die Indikationen einer allogene HSZT Stammzelltransplantation sind vielfältig. Angewendet wird sie heute nicht nur zur Behandlung maligner Erkrankungen, worauf in meiner Arbeit der Fokus liegt, sondern auch zur Therapie schwerer Stoffwechselstörungen, Immundefizienz Syndromen und verschiedensten Formen der Störung der Hämatopoese wie der Fanconi-Anämie oder Thalassämie (Giralt and Bishop, 2009). Insgesamt stellt die AML mit einem Anteil von 36 % an allen in

Europa durchgeführten allogene HSZT bei Erwachsenen die Hauptindikation dar (Sweeney and Vyas, 2019).

2.2.3. Ziel

In Bezug auf maligne, hämatologische Erkrankungen macht man sich den Graft-Versus-Leukemia (GVL) Effekt zu Nutze, der durch die Transfusion der Spenderstammzellen entsteht. Hierbei richten sich Spenderzellen gegen die nach Hochdosis-Chemotherapie im Empfänger verbliebene maligne Leukämiezellen. Es gibt eine ganz Gruppe von Immunzellen, die mit dem GVL Effekt in Verbindung gebracht werden. Nach aktuellem Forschungsstand geht man aber davon aus, dass die zentrale Rolle der Eliminierung verbliebener Leukämiezellen im Empfänger bei den T-Zellen liegt. Sie erkennen über Ihren T-Zellrezeptor spezifische Oberflächenantigene der Leukämiezellen, die wiederum über den MHC Komplex präsentiert werden (Sweeney and Vyas, 2019). Diese Erfolge sind allerdings nur möglich, wenn das richtige Transplantat gefunden wird. Welche Bedingungen hier erfüllt werden sollten, ist daher im nächsten Abschnitt genauer beleuchtet.

2.2.4. Patienten und Spenderauswahl

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gelang mit der Möglichkeit der HLA-Typisierung ein entscheidender Fortschritt in der Therapie mit allogene HSZT. Grund hierfür ist, dass die Übereinstimmung der HLA Merkmale zwischen Spender und Empfänger eine der wichtigsten Voraussetzungen für den klinischen Erfolg allogener HSZT ist. Insbesondere die HLA A, B, DRB1 beeinflussen den Ausgang maßgeblich (Tiercy, 2016). Goldstandard für die Stammzellspende sind daher HLA genotypisch identische Geschwisterspender. Jedoch gibt es solche passenden Spender nur in 30 % der Fälle, während für die restlichen 70 % HLA identische Fremdspender gefunden werden müssen, was in Deutschland mit einer Erfolgsquote von 80 % gelingt (Tiercy et al., 2007). Hinzu kommen weitere Faktoren, die bei der Spenderauswahl berücksichtigt werden sollten. Hierzu gehören beispielsweise Alter, Geschlecht, Verwandtschaftsgrad und der CMV Serostatus (Schmidt-Hieber et al., 2013). Zur leichteren Beurteilung der Chancen und Risiken einer Transplantation für den jeweiligen Patienten hat die European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) einen Risikoscore mit verschiedenen Komponenten

entwickelt, der eine prädiktive Aussage bezüglich des Outcomes nach allogener HSZT erlaubt (Gratwohl, 2012).

Neben der Suche eines passenden Spenders muss der Patient zunächst für eine mögliche Stammzellspende evaluiert werden, denn es handelt sich nach wie vor um einen risikobehafteten Eingriff, für den nicht jeder Patient geeignet ist. Berücksichtigt werden neben Diagnose, Alter und Komorbiditäten noch weitere Komponenten wie zum Beispiel der Allgemeinzustand des Patienten, der per Karnofsky-Index erfasst wird, sowie die soziale Integrität des potentiellen Empfängers (Hamadani et al., 2010). Diese empfängerbezogenen Faktoren sind es auch, die die Auswahl des passenden Konditionierungsregimes maßgeblich beeinflussen. Als Konditionierung bezeichnet man die der eigentlichen Stammzelltransplantation vorgeschalteten Behandlung (Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger, 2016).

2.2.5. Konditionierung

Man unterscheidet myeloablative auch als „konventionell“ bezeichnete Konditionierungsregime von dosisreduzierten Konditionierungsregimen. Letztere ermöglichen durch die geringere Toxizität auch die Transplantation älterer, komorbider Patienten, die den Hauptteil des Patientenkollektivs darstellen. Beide Vorgehensweisen verfolgen das Ziel mittels Hochdosis-Chemotherapie und/oder Bestrahlung das körpereigene Knochenmark des Patienten inklusive der entarteten Zellen zu eliminieren um anschließend ein Heranwachsen der Spenderstammzellen zu ermöglichen. Es werden heutzutage überwiegende dosisreduzierte Konditionierungsregime eingesetzt. Dieses beinhaltet den Einsatz von Fludarabin, einem Purinanalogon, in Kombination mit ein oder zwei weiteren Chemotherapeutika und eine Ganzkörperbestrahlung mit 2-4 Gray (T.E. Buffart, 2005).

Trotz aller in den letzten 40 Jahre erzielten Fortschritte, bleibt das Auftreten aGVHD eine der Hauptgründe für transplantationsassoziierte Morbidität und Mortalität. Um das Risiko zu minimieren, können beide Konditionierungsregime mit T-Zelldepletierenden Medikamenten kombiniert werden (Soiffer, 2001).

2.2.6. Immunrekonstitution nach allogener HSZT

Um eine Stammzelltransplantation erfolgreich durchführen zu können, wird das körpereigene Immunsystem des Patienten erst vollständig zerstört. Dies gelingt wie

im vorrangegangenen Absatz beschrieben mittels unterschiedlichster Konditionierungsregime. Daraus ergibt sich eine sogenannte „aplastische“ Phase, die durch schwerste Neutropenie gekennzeichnet ist. Sie hält solange an bis das Spenderknochenmark heranwächst und die Zahlen neutrophiler Granulozyten wieder auf ein adäquates Niveau gestiegen sind. Folglich muss sich das gesamte Immunsystem wie bei einem Kind quasi neu generieren. Dieser Prozess der Immunrekonstitution nach allogene HSZT läuft nicht immer exakt gleich ab. Insgesamt betrachtet ist es aber so, dass die Zellen des angeborenen Immunsystems die Monozyten, Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen deutlich schneller rekonstituieren als diejenigen der erworbenen Immunität (B- und T-Lymphozyten).

Die ersten Zellen sind die neutrophilen Granulozyten, danach folgen die NK-Zellen und erst ab Tag 100 nach Transplantation die T-Lymphozyten. Die vollständige B-Zellrekonstitution kann bis zu zwei Jahre in Anspruch nehmen. Kenntnisse über die nach allogene HSZT ablaufender Immunrekonstitutionsprozesse sind von entscheidender Bedeutung, da eine verzögerte Immunrekonstitution, insbesondere der T-Zellen, mit vermehrten viralen und mykotischen Infektionen, höheren GVHD und Rezidivraten sowie kürzerem Langzeitüberleben assoziiert ist (Ogonek et al., 2016).

Abbildung 3 veranschaulicht detailliert die Rekonstitution der einzelnen Zellsubpopulationen. Man unterscheidet zwischen myeloischer- und lymphatischer Progenitorzelle. Beide entstehen aus einer hämatopoetischen, pluripotenten Stammzelle, die wie alle Stammzellen die Eigenschaft zur Selbsterneuerung und Differenzierung besitzt. Aus der myeloischen Progenitorzelle gehen die Zellen der angeborenen Immunität hervor. Einzige Ausnahme stellen die natürlichen Killerzellen dar, die wie die B- und T-Lymphozyten als Teil des erworbenen Immunsystems die lymphoiden Progenitorzellen als Vorläuferzelle besitzen (Ogonek et al., 2016).

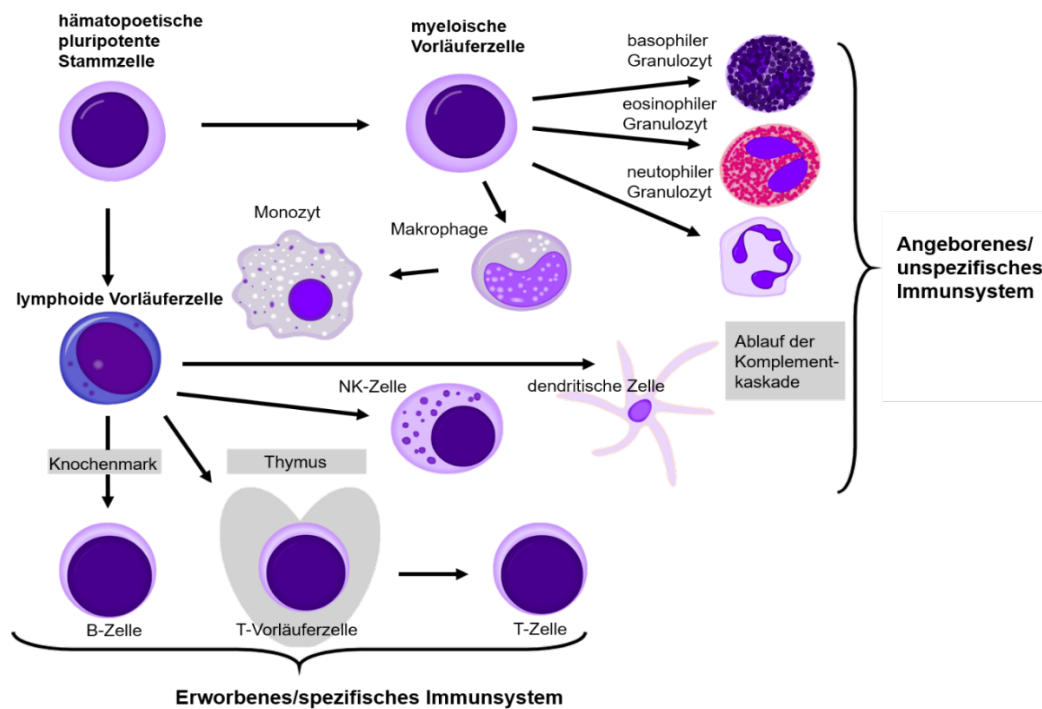


Abbildung 3: Immunzellrekonstitution nach allogener HSZT unterteilt in angeborenes und erworbenes Immunsystem modifiziert nach Ogonek (Ogonek et al., 2016)

2.2.7. Komplikationen

Die allogene HSZT ist bis heute ein risikoreiches Therapieverfahren, das mit einer Reihe potentieller Komplikationen behaftet ist. Verläuft die Immunrekonstitution nicht wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, kann es nach allogener Stammzelltransplantation zu einem sogenannten graft failure kommen. Hierbei wird das primäre graft failure von einem sekundären Transplantversagen unterschieden. Das primäre graft failure ist durch einen fehlenden Anstieg der Spenderzellen innerhalb der ersten vier Wochen nach allogener HSZT gekennzeichnet, während das sekundäre graft failure durch einen Verlust der Spenderzellen im Verlauf charakterisiert ist. Hier hat folglich initial ein Engraftment - ein Anwachsen - des Transplantats stattgefunden (Ozdemir and Civriz Bozdog, 2018). Eine weitere Herausforderung stellt das Auftreten eines hämatologischen Rezidivs nach erfolgreicher Stammzelltransplantation dar. Mit knapp 35 % stellt es die Haupttodesursache nach Stammzelltransplantation dar, wobei das Risiko bei T-Zelldepletierten Konditionierungsregimen besonders hoch ist. Eine Retransplantation

ist zwar möglich, jedoch mit geringerem krankheitsfreiem Überleben assoziiert (Mielcarek et al., 2007).

An nächster Stelle steht das Auftreten von Infektionskrankheiten, das die Morbidität und Mortalität nach Transplantation ebenfalls entscheidend beeinflusst. In der Anfangsphase nach Transplantation stehen vor allem bakterielle und mykotische Infektionen wie invasive Aspergillosen im Zentrum, die häufig nur unspezifische Symptome bieten, aber mit hoher Letalität assoziiert sind (Neofytos et al., 2009). Im weiteren Verlauf erholt sich zuerst das angeborene, unspezifische Immunsystem, während die spezifische, erworbene Immunabwehr weiterhin nicht ausreichend funktionsfähig ist.

Dies äußert sich, wie Abbildung 4 schematisch veranschaulicht, insbesondere zu Beginn bis Tag 30 nach allogener HSZT während der neutropenen Phase in Form von bakteriellen und mykotischen Infektionen. Mit dem Heranwachsen des neuen Knochenmarks (Tag 30-100) stehen mykotische Infektionen wie beispielsweise der Befall mit dem Schlauchpilz *Pneumocystis carinii* im Vordergrund. Später ab Tag 100 nach Transplantation stehen Defizite der T-Zell-Antwort im Zentrum, die sich in Form von CMV, VZV Infektionen und Infektionen mit bekapselten Bakterien manifestieren (W. Herr, 2015).

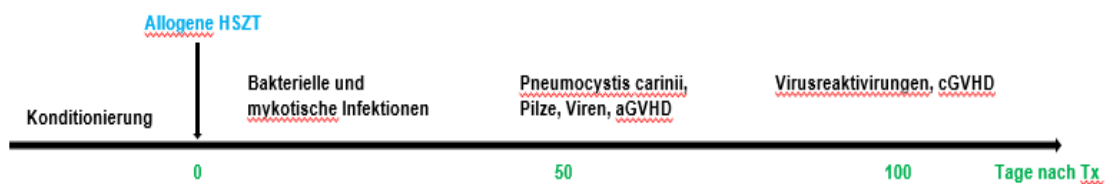


Abbildung 4: Komplikationen nach allogener HSZT im zeitlichen Zusammenhang modifiziert nach Ogonek (Ogonek et al., 2016)

Ein weiterer prognostisch relevanter Faktor ist das Auftreten einer sogenannten „Graft-Versus Host-Disease“ kurz GVHD. Diese ist eine der Hauptkomplikationen nach allogener HSZT, deren Auftreten im Fokus meiner Untersuchungen stand.

Um die oben beschriebenen Komplikationen frühzeitig erkennen und behandeln zu können, sind regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen von zentraler Bedeutung für den Therapieerfolg allogener HSZT. Dabei sollte der Fokus nicht nur auf den eben genannten körperlichen Auffälligkeiten liegen, sondern auch psychische und soziale Aspekte wie beispielsweise das familiäre und berufliche Umfeld mit einbeziehen (Majhail et al., 2012).

2.3. Graft-Versus-Host-Disease (GVHD)

2.3.1. Definition

Der gewünschte Effekt einer allogenen HSZT ist, dass sich die Spenderzellen gegen verbliebene, maligne Zellen des Empfängers richten und so die Grunderkrankung langfristig besiegen. Von Graft-Versus-Host-Disease (GVHD) spricht man dann, wenn sich T-Zellen des Spenders nicht wie beabsichtigt gegen die malignen Zellen richten, sondern gegen gesundes Empfängergewebe, da sie es als fremd erkennen. Diese überschießende T-Zellaktivierung führt zu einer Entzündungsreaktion im Empfänger, die sich an verschiedenen Organsystemen manifestieren kann. Dabei muss das Auftreten akuter GVHD von der chronischen GVHD abgegrenzt werden (Nassereddine et al., 2017).

2.3.2. Akute Graft-Versus-Host-Disease (aGVHD)

Definitionsgemäß spricht man dann von klassischer aGVHD, wenn entsprechende Symptome innerhalb von 100 Tagen nach allogener HSZT auftreten. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass seit 2014 neue NIH (National Institutes of Health) Kriterien zur Einteilung von GVHD gelten, die nicht mehr ausschließlich nach dem zeitlichen Auftreten klassifizieren, sondern die klinische Erscheinung in den Fokus rücken. Eine strikte Trennung aGVHD von cGVHD ist nicht immer möglich. Treten beide Formen zusammen auf, so spricht man unabhängig vom Zeitpunkt des Auftretens von „Overlap GVHD“ (Lee, 2017).

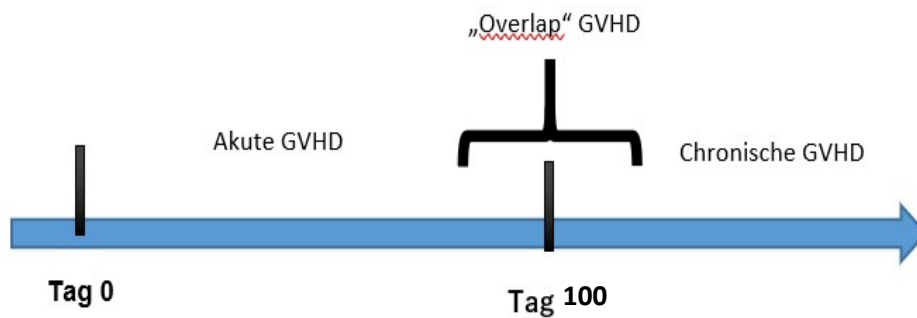


Abbildung 5: Einteilung der GVHD nach zeitlichem Auftreten nach allogener HSZT

Klassischerweise wird die aGVHD in drei Phasen unterteilt, die jeweils durch unterschiedliche pathophysiologische Vorgänge gekennzeichnet sind. In der ersten Phase kommt es zur Aktivierung Antigen präsentierender Zellen (APC) des Empfängers. In der zweiten Phase werden diese dann von CD8 positiven, zytotoxischen T-Zellen des Spenders erkannt. Dies führt über die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege zur Entzündungsreaktion beim Empfänger. Daran beteiligt sind in der dritten der sogenannten Effektorphase neben T-Zellen auch NK-Zellen und Makrophagen, die massive Entzündungsreaktionen hervorrufen und den apoptotischen Zelltod von Empfängergewebe induzieren. Folglich stehen insgesamt die T-Zellen im Fokus des Entstehungsprozesses aGVHD, aber es sind auch eine Reihe anderer Immunzellen in den Prozess involviert (Nassereddine et al., 2017).

Klinisch teilt man die aGVHD in vier Schweregrade ein. Hierzu beurteilt man die Hauptmanifestationsorte Leber, Haut und Gastrointestinaltrakt (GIT) und vergibt entsprechend des Befalls der einzelnen Organsysteme jeweils minimal 0 bis maximal 4 Punkte, sodass sich ein „Overall clinical grade“ von I bis IV aus der Summe der einzelnen Organmanifestationen errechnen lässt (Nassereddine et al., 2017).

Tabelle 1: Gesamtschweregrad der GVHD nach Glucksberg (Glucksberg et al., 1974)

Grad	Haut	Leber	Darm	Karnofsky (%)
0	0	0	0	100
I (leicht)	1 - 2	0	0	80
	0	0 - 1	0 - 1	
II* (moderat)	0	0 - 1	1	70
	1 - 3	1	0 - 1	
	3	0	0	
III (Schmidt-Hieber et al.)	2 - 3	2 - 3	2 - 3	60
IV (lebensbedrohlich)	2 - 4	2 - 4	2 - 4	40 - 50

Hautmanifestationen umfassen auch Entzündungen im Bereich der Schleimhäute wie beispielsweise Mukositiden und Konjunktividen. Der Ausprägungsgrad des Befalls reicht von leichten Exanthenen und Juckreiz bis hin zu generalisierter Erythrodermie. Auch großflächige Hautablösungen sind möglich. Insgesamt ist die Haut häufig das als erstes betroffene Organ.

Tabelle 2: Organstadien der akuten GVHD nach Harris (Harris et al., 2016)

	Haut	Darm	Leber
Schweregrad	Klinisches Bild	Diarrhoen ml/Tag	Bilirubin mg/dl
0	Kein Erythem/Exanthem	Diarrhoe <500 ml/Tag	Bilirubin <2 mg/dl
1	Makulopapulöses Exanthem <25 % der Körperoberfläche ¹	Diarrhoe 500-1000 ml/Tag ² oder 3 - 6 Stühle/Tag oder Übelkeit ³	Bilirubin 2 - 3 mg/dl
2	Makulopapulöses Exanthem	Diarrhoe 1000-1500 ml/Tag oder > 6 Stühle/Tag ³	Bilirubin 3 - 6 mg/dl
3	25 - 50 % der Körperoberfläche Generalisiertes Exanthem	Diarrhoe >1500 ml/Tag	Bilirubin 6 - 15 mg/dl
4	Generalisiertes Exanthem mit Blasenbildung und Desquamation > 5 % KO	„akuter Bauch“ mit oder ohne paralytischen Ileus blutige Diarrhoe	Bilirubin >15 mg

Die Leber ist das Organ, das bei aGVHD am häufigsten betroffen ist. Dabei dient, wie in Tabelle 2 veranschaulicht, der Bilirubinwert zur Einteilung des Schweregrades, da sich die Entzündungsreaktion meist in Form einer Cholestase und oft in Kombination mit einer Hepatitis äußert. Der Goldstandard zum Nachweis eines Entzündungsgeschehens im Sinne einer aGVHD ist nach wie vor die Biopsie von Lebergewebe. Gleiches gilt auch für die anderen möglichen Organmanifestationen, wobei eine reine Diagnosestellung an Hand von organspezifischen Biomarkern an Stelle der Gewebshistologie in Zukunft durchaus denkbar wäre. Hinzu kommt, dass so die früherer Diagnosestellung möglich wäre, bevor sich histologische Veränderungen zeigen (Malard et al., 2016).

Bei der Beurteilung des Befalls des GIT wird zwischen dem oberen und unteren Anteil unterschieden. Nach aktuellem Forschungsstand ist der untere GIT das Zielorgan, dessen Befall am besten mit der nicht Rückfall assoziierten Mortalität korreliert. Die Symptome sind auch hier vielfältig und umfassen Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen, Durchfälle teilweise auch blutig (Harris et al., 2016).

Risikofaktoren für das Auftreten aGVHD sind neben der fehlenden HLA Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger, hohes Alter von Empfänger und Spender, Geschlechtsungleichheit beider, Grunderkrankung sowie Begleiterkrankungen des Empfängers und ineffektive GVHD Prophylaxe. In mehreren Studien wurden Hochdosis Konditionierungsregime mit höheren GVHD Raten im Vergleich zu nicht myeloablativen Regimen beobachtet (Nassereddine et al., 2017).

Bis heute bleibt die GVHD eine der lebensbedrohlichsten Komplikationen nach allogener HSZT (Ruggeri et al., 2018). Daher ist eine adäquate aGVHD Prophylaxe unerlässlich.

Dies beginnt schon vor der Transplantation mit Auswahl des Therapieregimes. Bei T-Zelldepletierten Verfahren wird das Stammzellkonzentrat manipuliert, indem die T-Zellen des Spenders in-vivo entfernt werden. Es wird entweder Alemtuzumab, ein monoklonaler CD52 Antikörper oder ATG (Antithymozyten-Globulin) eingesetzt. Hierbei werden geringere GVHD Raten beobachtet als bei konventionellen Konditionierungsregimen. Allerdings sind T-Zelldepletierte Verfahren mit einer verzögerten Immunrekonstitution und höheren Rezidivraten assoziiert (Ruutu et al., 2017).

Eine weitere bzw. zusätzliche Möglichkeit ist die Anwendung immunsuppressiver Medikamente nach HSZT. Dies sollte bei jedem Patienten zwingend erfolgen, da das GVHD Risiko ansonsten extrem hoch ist. Goldstandard hierbei ist der Einsatz von Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil in Kombination mit einem Calcineurininhibitor (Zeiser and Blazar, 2017).

Neuere Methoden umfassen eine Hochdosis Cyclophosphamidgabe an Tag drei und vier nach Transplantation. Am Mausmodell konnten hiermit sowohl die GVHD Raten

als auch das Auftreten von Transplantatversagen reduziert werden (Luznik et al., 2010).

Trotz adäquater prophylaktischer Therapie sind die aGVHD Raten sehr hoch. Die Prävalenz aGVHD schwankt in der Literatur zwischen 35 % - 80 % und zählt damit definitiv zu einer der Hauptkomplikationen nach allogene HSZT (Tan et al., 2017).

Anerkannter Standard zur Therapie aGVHD ist die Gabe von Glucocorticoiden. Beispielsweise mit einer initialen Dosierung von 2,0 mg/kg/Tag Methylprednisolon, das im Verlauf langsam ausgeschlichen und niedriger dosiert wird. Diesen Prozess bezeichnet man auch als „Tapern“. In neueren Studien wurde zusätzlich zu Prednisolon noch ein weiteres Agens gegeben. Hierzu gehören Antikörper gegen den IL-2 Rezeptor, das Fusionsprotein Entanercept und der monoklonale Antikörper Infliximab (Martin et al., 2012).

Alternative Therapiemöglichkeiten mittels Ruxolitinib, einem selektiven Janus Kinase 1 und 2 (JAK 1 und 2) Inhibitor, zeigten im Rahmen einer Phase 2 Studie vielversprechende Ergebnisse. Besonders im Hinblick auf die Herausforderung Glucocorticoid refraktärer aGVHD Verläufe sollte man dieser Möglichkeit Beachtung schenken. Erste Ergebnisse sind vielversprechend. Das Gesamtüberleben scheint besser zu sein als in der Kontrollgruppe, allerdings wurden unter Ruxolitinibgabe gehäuft schwere Thrombozytopenien beobachtet (Zeiser et al., 2020). Mittlerweile gibt es bereits randomisierte, kontrollierte Phase 3 Studien. Hier bestätigte sich das gute Ansprechen steroidrefraktärer aGVHD auf die Therapie mit JAK Inhibitoren. Außerdem konnten in dem Patientenkollektiv unter JAK-Inhibitortherapie im Gegensatz zur Kontrollgruppe ein längeres rückfallfreies Überleben, sowie die seltenere Notwendigkeit systemischer aGVHD Therapie verzeichnet werden (Zeiser R, 2020).

2.3.3. Chronische Graft-Versus-Host-Disease (cGVHD)

Die cGVHD ist die Hauptursache später Morbidität und nicht Rückfall assoziierter Mortalität nach allogene HSZT. Die meisten cGVHD Fälle treten innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation auf (>90 %). Knapp 30 % davon entstehen de novo, also ohne vorherige aGVHD (Lee, 2017).

Die pathophysiologischen Prozesse der cGVHD sind bisher noch unzureichend verstanden. Fest steht jedoch, dass sie sich von denen der aGVHD unterscheiden. Während bei der aGVHD alloreaktive T-Zellen des Spenders zu Entzündungsprozessen führen, ist bei der cGVHD das Versagen zentraler und peripherer Toleranzmechanismen führend. Hierbei spielen sowohl die T- als auch die B-Zellen eine entscheidende Rolle (Ferrara et al., 2009).

Die Diagnose cGVHD ist primär klinisch zu stellen. Dabei differenziert man je nach Schweregrad der Organdysfunktion zwischen mild, moderat und schwer befallen. Der Gesamtschweregrad ergibt sich folglich aus Summation der Anzahl der betroffenen Organe unter Berücksichtigung des jeweiligen Ausprägungsgrades der Dysfunktion (Jagasia et al., 2015).

Frühzeichen von cGVHD sind Haut- und Schleimhautentzündungen, sowie Transaminasen Erhöhungen und eine ausgeprägte Eosinophilie, die mittels Glucocorticoiden in der Regel gut therapierbar sind. Ganz im Gegensatz zu den später auftretenden Symptomen. Sie umfassen ausgeprägte Haut- und Schleimhaut, Augen, Gelenk, Lungen, Leber, GIT Beteiligungen, Genitalien sowie das Immunsystem und sind häufig nur schwer zu therapieren. Nicht selten persistieren die Organbeteiligung und führen zu einer massiven Einschränkung der Lebensqualität des betroffenen Patienten (Lee, 2017).



Abbildung 6: Ausgeprägter Lichen planus und Poikilodermie im Rahmen von cGVHD (Lee, 2017)

Die größten Risikofaktoren für das Auftreten cGVHD sind hohes Alter bei Transplantation, sowie vorangegangene aGVHD (Ferrara et al., 2009). Die Behandlung cGVHD reicht von lokalen Glucocorticoidbehandlungen bei mildem Hautbefall bis hin zu generalisierten immunsuppressiven Therapien. Eine frühe, systemische Therapie kann den Progress in schwere cGVHD verhindern. Der Zeitpunkt und die Dosierung der immunsuppressiven Therapie sollte individuell festgelegt werden und erfordert ausreichende klinische Erfahrung. So sollten Komorbiditäten und Allgemeinzustand des Patienten in den Entscheidungsprozess mit einfließen. Ferner sei die damit einhergehende, iatrogene Infektanfälligkeit zu erwähnen, die eine Infektionsprophylaxe zwingend erforderlich macht (Jagasia et al., 2015).

2.3.4. Treg und aGVHD

Auch dem Entstehungsprozess aGVHD und cGVHD liegen pathophysiologisch Entzündungsreaktionen zu Grunde. Daher ist es wenig verwunderlich, dass Treg auch in der Pathogenese der GVHD eine Schlüsselfunktion einnehmen.

Hohe Tregzahlen im Transplantat werden mit geringeren aGVHD Raten und besserem Gesamtüberleben in Verbindung gebracht (Baumeister et al., 2020).

Umgekehrt gibt es aus anderen Studien auch Hinweise dafür, dass niedrige absolute

Treglevel nach allogene HSZT mit dem Auftreten sowie dem Schweregrad aGVHD und cGVHD korrelieren. Insbesondere Patienten mit aGVHD Grad II-IV wiesen signifikant niedrigere Tregfrequenzen auf als Patienten ohne GVHD. Mittels ex-vivo expandierter Treg konnte das Auftreten von aGVHD nach muriner HSZT effektiv verhindert werden (Li et al., 2010, Riegel et al., 2020).

Diese Erkenntnisse lassen hoffen, dass Treg auch bald im klinischen Alltag Anwendung finden. Studien mit Treg basierten Therapien laufen bereits und zeigten auch beim Menschen protektive Effekte auf die Entstehung aGVHD. Neue Strategien sind noch in Erprobung und beinhalten chimärer Antigenrezeptor (CAR)-Treg, die ex-vivo mittels IL-2 und NF-alpha inkubiert werden um die suppressive Wirkung noch weiter zu verstärken (Mancusi et al., 2019).

2.3.5. T-Zelldepletion mit Alemtuzumab

Alemtuzumab (Campath-1H) ist der erste humanisierte monoklonale Antikörper. Er richtet sich gegen CD52, ein Oberflächenmolekül, das sich auf allen reifen Lymphozyten befindet, nicht aber auf hämatopoetischen Stammzellen. Sein molekularer Aufbau ist in Abbildung 7 dargestellt.

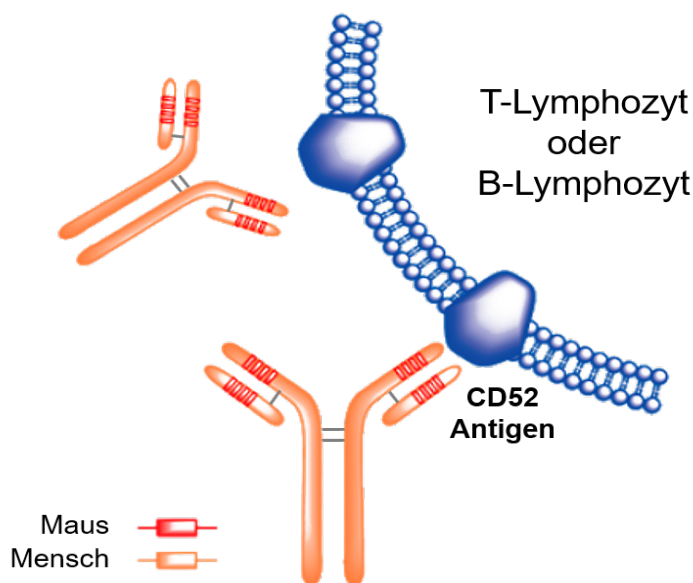


Abbildung 7: Aufbau eines monoklonalen Antikörpers am Beispiel von Alemtuzumab / Campath-H1 modifiziert nach Kripp (Kripp, 2013)

Bereits 1983 berichtete eine britische Arbeitsgruppe von einem Antikörper, der über eine T-Zelldepletion Abstoßungsreaktionen vermindert (G Hale, 1983).

Der Antikörper wurde nach dem Ort und Institut seiner Entwicklung (Cambridge Pathology) CAMPATH 1 benannt. Nach Reduktion der Fremdeiweiß-Anteile (Ratte) wurde der Antikörper CAMPATH 1H (H=humanisiert) genannt. 2001 erfolgte seine Marktzulassung zur Therapie der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zeitgleich in Europa und den USA.

Weit verbreitet war die Anwendung des CD52 Antikörpers außerdem zur in-vivo T-Zelldepletion bei allogener HSZT, dargestellt in Abbildung acht. Man geht davon aus, dass die T-Zellen des Spenders Hauptverantwortlich für die Entwicklung von GVHD sind. Erwartungsgemäß führt die T-Zelldepletion durch den Einsatz von Alemtuzumab zu geringeren GVHD Raten. Dies gilt insbesondere für aGVHD Grad III-IV. (P. D. Kottaridis, 2000). Auch in Bezug auf cGVHD soll der Einsatz von Alemtuzumab protektiv wirken (Marsh et al., 2011). Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass T-Zelldepletierende Konditionierungsregime mit einem höheren Rezidivrisiko, sowie vermehrte opportunistische Infektionen, bedingt durch eine langsamere Immunrekonstitution, assoziiert sind. Dies verdeutlicht der linke Teil der Abbildung 8 (Baumeister et al., 2020). Interessanterweise korrelieren GVHD und Rezidiv invers mit einander (Sweeney and Vyas, 2019). Es gilt also die richtige Balance zu finden, weshalb die Waage im Zentrum der Abbildung steht.

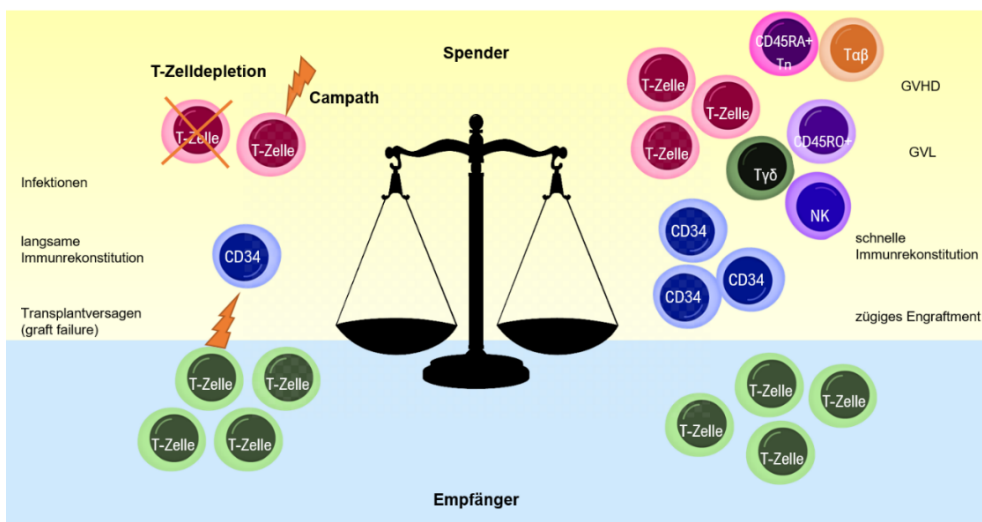


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Immunzellrekonstitution mit - und ohne T-Zelldepletion modifiziert nach Baumeister (Baumeister et al., 2020)

2012 wurde die Marktzulassung des Medikaments MabCampath durch den Hersteller an die EMA zurückgegeben. Dies lag nicht in einer fehlenden Wirksamkeit oder unerwünschten Nebenwirkung, sondern hatte finanzielle Hintergründe, da mittlerweile klinische Studien Erfolge im Einsatz des Antikörpers in der MS Therapie zeigten. Hier konnten für niedrigere Dosierungen höhere Preise verlangt werden. Die EMA hat Alemtuzumab für MS-Patienten am 25. September 2013 unter dem Handelsnamen Lemtrada zugelassen (Prof. Dr. med. B. Wörmann, 2017). Heutzutage wird Alemtuzumab daher in der MS Therapie eingesetzt (Baker et al., 2020). Auch nach der Rücknahme der Zulassung wird Alemtuzumab noch in der Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) sowie bei T-Zell-Leukämien und T-Zell-Lymphomen eingesetzt (Binder et al., 2013), allerdings im Rahmen von Compassionate-Use-Programmen, die mit größerem bürokratischem Aufwand für Ärzte/innen und Patienten/innen verbunden sind. Ziel dieser Verfahren ist es unter bestimmten Umständen für eine gewisse Indikation Patienten/innen Zugang zu nicht zugelassenen Medikamenten zu verschaffen, und so die Heilungschancen und den Behandlungserfolg zu verbessern. Besonders häufig angewandt wird dieses Verfahren in der Pädiatrie (S. Moerdler, 2018).

2.4. Marker

Wie in Abschnitt 2.3.4. beschrieben, sind Treg als spezifische Untergruppe der T-Lymphozyten definiert als CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, CD127⁺ und Foxp3⁺ Zellen. Neben diesen „Hauptmarkern“ gibt es zahlreiche weitere, die zusätzlich Aussagen über die Treg Aktivität und Funktion erlauben. Hierzu gehören beispielsweise Glycoprotein A repetitions predominant (GARP) und Immunoglobulin-like transcript 3 (ILT3) (Santegoets et al., 2015). Da Treg und deren Rolle in der Pathogenese aGVHD im Zentrum meiner Untersuchungen standen, sind im Folgenden die wichtigsten „Marker“ und ihre Bedeutung erwähnt.

Die zweite große Gruppe immunkompetenter Zellen, die nach aktuellem Stand der Forschung in der Lage zu sein scheinen GVHD zu kontrollieren sind die NK-Zellen. Daher habe ich in meiner Arbeit auch diese Zellgruppe näher betrachtet. Für die Gruppe der NK-Zellen sind ebenfalls spezifische „Marker“ von besonderem Interesse (Negrin, 2019). Auch deren Bedeutung wird im nächsten Abschnitt genauer beleuchtet.

2.4.1. CD52

CD steht für Cluster of Differentiation. Beim Menschen gibt es mittlerweile insgesamt 419 definierte humane Proteine, die sich als cluster of differentiation (CD) etabliert haben und es ermöglichen Zellen an Hand dieser Oberflächenmoleküle zu charakterisieren (Dawson and Lunney, 2018). CD52 wird auch als Campath-1H Antigen bezeichnet (W. Roman, 1998). Bei CD52 handelt es sich um ein kleines Glykoprotein, bestehend aus zwölf Aminosäuren, mit einer molekularen Masse von 21-28 KDa. Es wird durch das CD52 Gen auf Chromosom 1 codiert. CD52 gehört zu den Glycophosphatidylinositol (GPI) verankerten Proteinen (Hale, 2001). Die molekularen Mechanismen der CD52 Expression sind noch nicht vollständig geklärt. Li et al zeigte, dass All-trans-retinoid-Säure (ATRA) die CD52 Expression induzieren kann (Li et al., 2003).

CD52 wird von B- und T-Lymphozyten hoch exprimiert und findet sich auch auf eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Niedrige Level findet man auch auf NK-Zellen (Hu et al., 2009).

2.4.2. CD25

CD25 besteht aus der alpha-Kette des Interleukin-2 Rezeptors. Es ist auf der Oberfläche CD4⁺ aktivierten T-Lymphozyten zu finden und folglich nicht spezifisch für Treg. Schon im Jahr 1995 konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von CD4⁺, CD25⁺ Zellen in Mäusen zum vermehrten Auftreten von Autoimmunerkrankungen und organspezifischen auto-immunen Reaktionen geführt hat. Dies unterstreicht die Wichtigkeit des Markers CD25 im Zusammenhang mit Treg und deren Funktion, dem Erhalt von Selbsttoleranz (Sakaguchi, 1995).

2.4.3. Foxp3

Foxp3 ist die Abkürzung für forkhead box P3, ein Transkriptionsfaktor, von dem man heute weiß, dass er maßgeblich für die Treg Entwicklung und deren suppressive Funktion ist.

1959 beschrieb die amerikanische Forschungsgruppe um Russell et al. eine Mutation, die zur sogenannte „scurfy/schürfige“ Maus führte. Die Ursache für dieses Erscheinungsbild blieb lange unklar. Erst im Jahr 2001 identifizierte man das Foxp3 Gen als das verantwortliche, mutierte Gen für die „scurfy“ Maus. Zwischen 2003 und

2010 wurden fortlaufend neue Erkenntnisse gewonnen, die sich auf die Schlüsselrolle von Foxp3 in Bezug auf die Treg Differenzierung und Aktivierung bezogen. Außerdem wurde TGF β als wichtiger Foxp3 Promotor bekannt (Ramsdell and Ziegler, 2014).

Der positive Effekt hoher Foxp3 Level auf Treg lässt sich darauf zurückführen, dass die Expression dieses Transkriptionsfaktors zur Aktivierung von Genen führt, die für die suppressive Funktion der Treg essentielle sind (Barbi et al., 2014). Dies veranschaulicht auch Abbildung 9, die eine Foxp3 positive Treg-Zelle zeigt, die sowohl auf eine T-Effektorzelle als auch Th-2 Zelle inhibitorisch wirkt.

Die Foxp3 Expression seinerseits wird über komplexe epigenetische Mechanismen reguliert. Diese umfassen Phosphorylierungs, Deacetylierungs - und Methylierungsschritte (Lu et al., 2017).

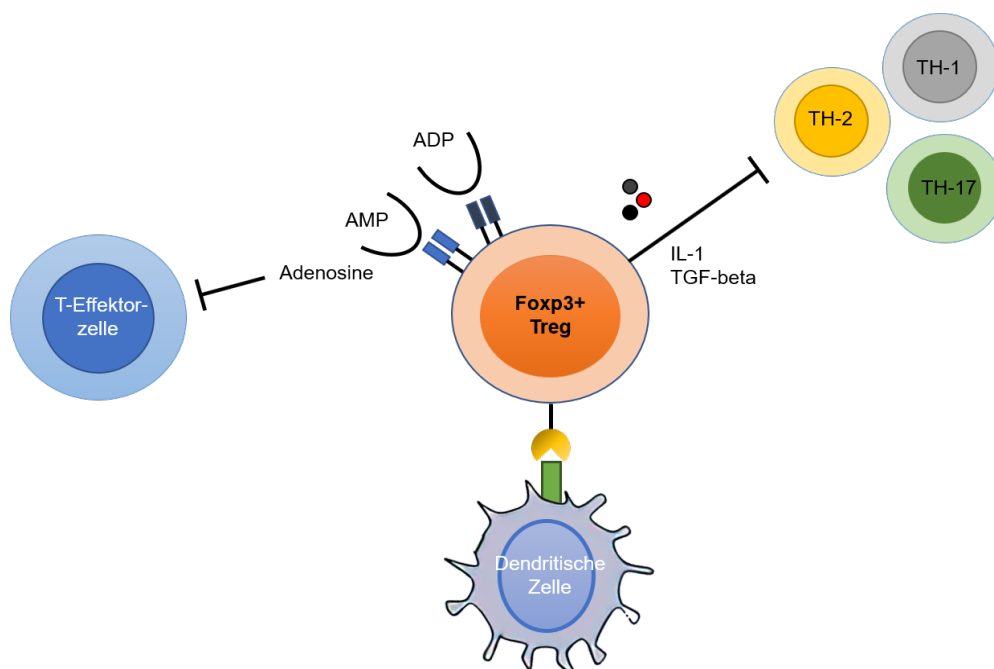


Abbildung 9: Foxp3 und die Beeinflussung der Treg-Funktion modifiziert nach Braza (Braza et al., 2015)

2.4.4. ILT3

Immunglobulin-like transcript 3 oder kurz ILT3 ist wie der Name vermuten lässt ein Zelloberflächenmolekül, das zur großen Gruppe der Immunglobulin Familie gehört. Es wird selektiv von Antigen präsentierenden Zelle wie beispielsweise Monozyten,

Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Es handelt sich um einen inhibitorischen Rezeptor, da die Fähigkeit zur Antigenpräsentation verringert wird.

Die 2015 im Nature Magazin veröffentlichten Daten eines murinen Modells legen nahe, dass die ILT3 Expression Kreatinkinase 2 (CK-2) abhängig erfolgt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ILT3⁺ Treg mit CK-2-Treg korrelieren und umgekehrt. Hohe Zahlen ILT3⁺ Treg waren mit einer Unterdrückung Th-2 vermittelter proinflammatorischer Signale assoziiert. Insgesamt wirkt sich ILT3 also positiv auf die suppressive Funktion der Treg im Rahmen auto-immuner Geschehen aus, obwohl es wie oben beschrieben insgesamt als inhibitorischer Rezeptor angesehen wird (Ulges et al., 2015).

Auch andere Quellen sprechen ILT3 eine entscheidende Rolle an der Aufrechterhaltung unserer Immunhomöostase zu, da es über die Regulation der Sekretion proinflammatorischer Zytokine in der Lage ist Entzündungsprozesse zu limitieren und deren Progression zu auto-immunen Prozessen zu verhindern (Vlad et al., 2009).

2.4.6. TIGIT

TIGIT (T-cell immunreceptor mit immunoglobulin and immunreceptor tyrosin-based inhibitory motif domains) in Abbildung 10 gelb dargestellt kann ähnlich wie CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein) oder PD-1 (Programmed cell death protein) als Checkpoint Inhibitor angesehen werden. Zhang et al. demonstrierte in präklinischen Mausmodellen, dass die Blockade von TIGIT auf NK-Zellen zu besserer antitumoröser Aktivität führte und folglich das Tumorstadium eindämmen konnte.

Interessanterweise gilt diese hemmende Funktion von TIGIT nur für NK-Zellen (blau dargestellt) und T-Effektorzellen (in grün gezeichnet) und nicht für Treg (orange), hier fördern hohe TIGIT-Level deren suppressive Funktion. Der positive Effekt von TIGIT auf die Treg Funktion ist noch nicht vollständig geklärt.

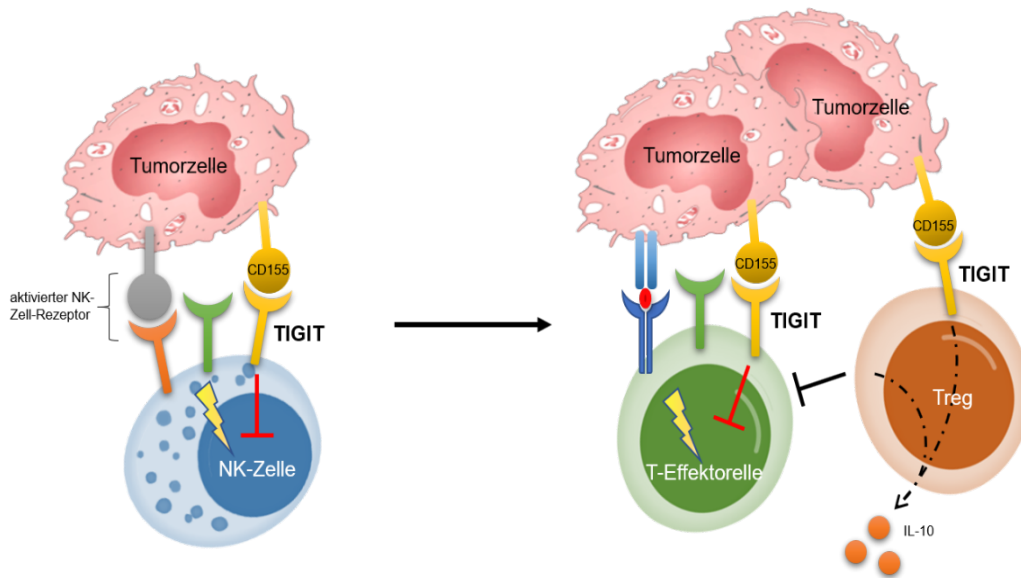


Abbildung 10: TIGIT in der Rolle eines Immuncheckpoint-Inhibitors modifiziert nach Stojanovic (Stojanovic al., 2018)

Man vermutet, dass die Treg Aktivierung über TIGIT unter anderem IL-10 vermittelt induziert wird (Stojanovic al., 2018).

2.4.7. NKp30

NKp30 ist ein aktivierender Rezeptor, der auf allen reifen NK-Zellen zu finden ist. Im Gegensatz zu vielen anderen NK-Zellrezeptoren, die sowohl inhibitorische als auch aktivierende Signale vermitteln können, besitzt NKp30 ebenso wie NKp44 und NKp46 rein aktivierende Funktion. Es handelt sich um ein Transmembranprotein, das wie der Treg Marker ILT3 zur Familie der Immunglobuline gehört. Über die Rekrutierung einer Tyrosinkinase werden die NK-Zellen schließlich aktiviert. Es gibt bisher drei verschiedene, bekannte NKp30 Splicevarianten, die es ermöglichen die NK-Zellen unterschiedlich zu modulieren/stimulieren (Bjornsen et al., 2019).

Es gibt Hinweise darauf, dass NKp30 auch als prognostischer Marker geeignet ist. In einer klinischen Studie an AML Patienten konnte gezeigt werden, dass hohe NKp30 Level mit einem besseren Gesamtüberleben inklusive geringerer Rezidivraten assoziiert sind (Chretien et al., 2017).

2.5. Zytokine

Zytokine sind Proteine, die fortlaufend sezerniert werden und vielfältige Funktionen besitzen. Sie sind an fast jeder Art von Immun- und Entzündungsreaktion beteiligt, inklusive der Ausreifung unseres Immunsystems und Zelldifferenzierung aus dem Knochenmark. Sie können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkung entfalten. Welche Funktion überwiegt ist von den vorhandenen Immunzellen und deren Ansprechen auf die unterschiedlichen Zytokine abhängig (Borish and Steinke, 2003).

Im zweiten Teil dieser Promotionsarbeit (Projekt 2) habe ich mich mit Serumzytokinleveln bei Patienten mit aGVHD und ohne aGVHD beschäftigt. Daher sind im Folgenden die in diesem Projekt untersuchten Zytokine kurz vorgestellt.

2.5.1. Interleukin-2 (IL-2)

Ein weiterer „Marker“, dem prädiktive Funktion zugeschrieben wird ist IL-2, das älteste bekannte Zytokin. Es ist das erste entdeckte menschliche Zytokin. Es wird hauptsächlich von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten produziert. In den 1980igern ging man davon aus, dass IL-2 für die T-Zell abhängige Immunantwort nötig ist. Daher war es verwunderlich, dass IL-2 Gen knock-out-Mäuse keine Immundefizienz aufwiesen, sondern stattdessen durch lymphoproliferative Ereignisse und Autoimmunerkrankungen auffielen (Malek, 2008).

Heute geht man davon aus, dass IL-2 maßgeblich am Erhalt der Immunhomöostase beteiligt ist, indem es die Treg Funktion beeinflusst. In murinen Modellen konnte gezeigt werden, dass low-dose IL-2 genutzt werden kann um Treg selektiv zu stimulieren (Matsuoka, 2018).

2.5.2. Interleukin-5 (IL-5)

IL-5 wird hauptsächlich von Th-2 und von Mastzellen gebildet. Jeweils nach deren Aktivierung mittels Antigenkontakt. Die Bindung von IL-5 an den IL-5 Rezeptor führt zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege wie zum Beispiel des JAK1/JAK2 und STAT1/STAT5 Weges. Insgesamt führt IL-5 zu einer Aktivierung von B-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten im Rahmen allergischer Prozesse. Monoklonale AK gegen IL-5 werden daher bereits zur Therapie des allergischen Asthma bronchiale eingesetzt (Kusano et al., 2012).

2.5.3. Interleukin-4 (IL-4)

Dieses Interleukin wirkt aktivierend auf B-Zellen, T-Zellen und Mastzellen. Es fungiert als Mediator im Rahmen allergischer Prozesse (Hauber et al., 2004).

2.5.4. Interleukin-6 (IL-6)

Auch IL-6 gehört zur Gruppe der pro-inflammatorische Zytokine und wird ebenfalls hauptsächlich von Monozyten produziert (Borish and Steinke, 2003). Ähnlich wie TNF α wird IL-6 eine Mediatorfunktion bei septischen Prozessen zugeschrieben.

IL-6 findet als „Sepsismarker“ bereits klinisch Anwendung. Song et al. konnten in einer prospektiven, kontrollierten Studie zeigen, dass IL-6 im Sepsismonitoring sowohl diagnostische, als auch prognostische Aussagekraft besitzt und anderen Marker wie PTX3 und Procalcitonin (PCT) sogar überlegen ist (Song et al., 2019). Auch im Hinblick auf das Auftreten schwerer aGVHD kann IL-6 als prädiktiver Biomarker angesehen werden. Greco et al. zeigten in 2019 veröffentlichten Daten, dass hohe IL-6 Werte möglicherweise mit dem Auftreten einer aGVHD korrelieren ebenso wie mit der Transplant assoziierten Mortalität (Greco et al., 2019).

2.5.5. Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)

TNF α gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine. TNF α wird hauptsächlich von Monozyten produziert, die über ihre Toll-like-Rezeptoren (TLR) mit körperfremden Lipopolysacchariden (LPS) in Kontakt kommen. Es entfaltet seine Wirkung vor allem über die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Induktion von Chemotaxis. TNF α wird eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Sepsis zu geschrieben (Borish and Steinke, 2003).

2.5.6. Interleukin-9 (IL-9)

IL-9 ist ein weiteres proinflammatorisches Zytokin. Es fungiert als T-Zellwachstumsfaktor und führt zu Antigen unabhängigem Wachstum von T-Helferzellkolonien. Außerdem induziert es die Immunglobulin Synthese über B-Zellaktivierung. Auch im Rahmen allergischer Prozesse scheint es über die Aktivierung von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten eine aktivierende Funktion zu haben (Hauber et al., 2004).

2.5.7. Interleukin-13 (IL-13)

IL-13 ist ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, das große Ähnlichkeiten mit IL-4 aufweist. Es ist ebenfalls im Rahmen allergischer Prozesse zu finden. IL-13 überexprimierende Mäuse zeigen eosinophile Entzündungsprozesse, Mukosypersekretion bis hin zur Atemwegsfibrose (Borish and Steinke, 2003).

2.5.8. Interleukin-17 (IL-17)

Zu IL-17 zählt eine ganze Gruppe von Zytokinen, die von aktivierten T-Zellen, insbesondere den Th-17 und eosinophilen Granulozyten gebildet werden. Es besitzt über die Aktivierung von Makrophagen, Fibroblasten und Stromazellen proinflammatorische Effekte (Schroder et al., 2004). Diesem Interleukin wird eine entscheidende Rolle an der Pathogenese chronisch-entzündlicher Prozesse zugeschrieben (Chang et al., 2011). Auch im Entstehungsprozess aGVHD scheint IL-17 relevant zu sein. So entwickeln IL-17 defiziente Mäuse schwere aGVHD, während bei Mäusen mit IL-17 Überexpression weniger aGVHD auftrat. Dabei sind die protektiven Effekte hoher proinflammatorischer IL-17 Level auf die Aktivierung protektiver Treg zurück zu führen (Gong et al., 2018).

2.5.9. Interleukin-21 (IL-21)

IL-21 induziert die Aktivierung von B- und T-Zellen, sowie NK Zellen. Es gehört daher ebenfalls zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine (Schroder et al., 2004). Auf aGVHD wirkt sich IL-21 indirekt positiv aus, indem es zur Aktivierung von NK-Zellen führt. Hohe NK-Zell Level früh nach der Transplantation sind mit weniger aGVHD, niedrigen Rückfallraten und einem verbessertem Gesamtüberleben assoziiert wie im Mausmodell gezeigt werden konnte (O.Ciurea, 2017).

2.5.10. Interferon Gamma (IFN γ)

Dieses Zytokin entfaltet antiinflammatorische Wirkung, indem es Einfluss auf die T- und B-Zellfunktion nimmt und NK-Zellen aktiviert. Es liegt nahe, dass es insbesondere für die frühe Erregerabwehr im Rahmen der unspezifischen, angeborenen Abwehrreaktion von Bedeutung ist. Der Name Interferon ergibt sich aus der Fähigkeit von Interferonen mit viraler DNA zu interferieren und so deren Wachstum zu stören (Schroder et al., 2004).

2.5.11. Antiinflammatorische Zytokine Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-22 (IL-22)

Die Interleukin 10 Familie beinhaltet neun Subtypen: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 und IL-26, IL-28A, IL-28B und IL-29. Sie alle wirken antiinflammatorisch. Davon ist IL-10 das Wichtigste. Sie sind wichtiger Bestandteil der Immunhomöostase, indem sie überschießende Immunreaktionen verhindern. Außerdem induzieren Sie Gewebereperaturmechanismen und eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Rahmen früher Erregerabwehr (Ouyang and O'Garra, 2019).

2.6. Vorarbeiten

Innerhalb der letzten Jahrzehnte sind Treg als Zellpopulation im Zusammenhang mit aGVHD nach allogene HSZT mehr und mehr in den Fokus gerückt, da man sie nach aktuellem Forschungsstand als „Hauptplayer“ in der Entstehung aGVHD ansieht (Michael et al., 2013).

Pascal Wölfinger konnte in seiner retrospektiven Analyse von PBMCs von Patienten nach allogene HSZT bereits zeigen, dass die Rekonstitution CD52⁻ Treg mit dem Auftreten aGVHD korreliert. Abbildung 11 zeigt, dass Patienten mit aGVHD deutlich niedrigere Level CD52⁺ Treg aufweisen, als Patienten ohne GVHD. Zwischen Patienten mit cGVHD und Patienten ohne GVHD konnten hingegen keine Unterschiede in der CD52 Expression festgestellt werden (Woelfinger et al., 2020b).

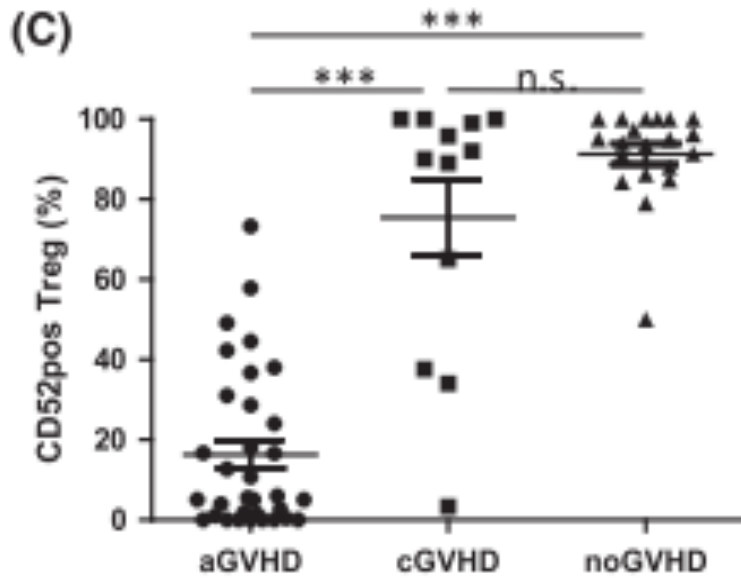


Abbildung 11: CD52 Level und aGVHD (Woelfinger et al., 2020b)

Die zeitliche Betrachtung der Immunrekonstitution CD52⁺Treg lässt vermuten, dass die Unterschiede zwischen Gruppen mit aGVHD und ohne aGVHD zu Beginn nach allogener HSZT besonders entscheidend für die Prädiktion einer aGVHD ist.

Abbildung 12 (Woelfinger et al., 2020b).

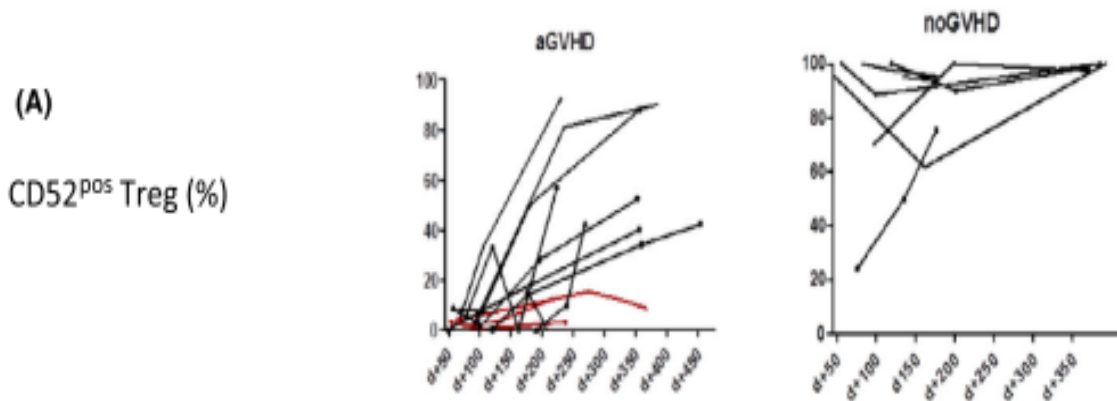


Abbildung 12: CD52 positive Treg zeitlicher Verlauf (Woelfinger et al., 2020b)

Das Ziel meiner Arbeit war, im Rahmen einer prospektiven Untersuchung, die von Wölfinger et al. in einer retrospektiven Studie erzielten Ergebnisse zu bestätigen. So war bei dem von mir untersuchten Kollektiv vorher nicht klar, wer aGVHD entwickeln wird und wer nicht. Dies zeigte sich erst im Verlauf.

Mit diesem prospektiven Design, lag der Fokus zudem auf der Identifizierung prädiktiver Marker, die das Auftreten aGVHD vor den ersten Symptomen vorhersagen können. Außerdem ging es um die Bestimmung eines geeigneten Zeitpunktes zur Erfassung solcher frühen aGVHD Marker, sodass in Zukunft der Einsatz prophylaktischer Therapien denkbar ist.

3. Material und Methoden

3.1. Liste der verwendeten Materialien

3.1.1. Puffer Lösungen und Medien

FACS-Puffer	PBS	1000 ml
	BSA 0,1 %	5 ml
	EDTA 2 mM	2 ml
FACS-Fix	PBS	242 ml
	1 % Formaldehyd	6,8 ml
	EDTA 2 mM	1 ml
Trypanblau (Stammlösung)	Trypanblau	2,0 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
Trypanblau (Gebrauchslösung)	Trypanblau Stammlösung	75 ml 25 ml
	150 mM NaCl	

3.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi
EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)	SigmaAldrich (Taufkirchen)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure 96 %	Merck (Darmstadt)
NaCl	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Serva (Heidelberg)
PBS (Phosphate-buffered saline)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Rat Serum (1993590)	Invitrogen

3.1.3. Geräte

Durchflusszytometer für durchflusszytometrische Analysen	FACS Canto/AriaTM mit Software FACS DivaTM, BD Biosciences (Heidelberg)
Durchflusszytometer für FACS-Sort	Aria IIu von BD mit Software FACS Diva 6.13, BD Biosciences (Heidelberg)
Gefrierschrank -80 °C	Hera freeze, Heraeus/Kendro
Kühl- / Gefrierkombinationen 4 °C, - 20 °C	Liebherr (Kirchdorf)
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss (Jena)
Mikroliterpipetten Transferpipette 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Brand (Wertheim)
Pipettiergerät	PipetBoy, IBS Integra Biosciences, VWR (Darmstadt)
Pipette 1-10 µl	Eppendorf (Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger)
Sterile Werkbank	HERAsafe Typ HS 18, Kendro (Hanau)
Stickstoff-Kryo-Bank XLC 1370, Air liquide Espace 331	MVE Europe (Solingen) Tec Lab (Königstein)
Stickstoff-Tank	Taylor-Wharton XL-180, Tec Lab
Tiefkühlschrank, -80°C Hera freeze	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Tiefkühlschrank, -30° C	Kirsch (Offenburg)
Tiefkühlschrank, -20° C	Liebherr
Vortex MS2	Minishaker IKA®, IKA (Staufen)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen	Hettich (Tuttlingen) Kendro-Heraeus
Schüttler	IKA-Werke Modell KS501 digital

3.1.4. Plastikwaren

Einfrierboxen	Nalge Nunc (Wiesbaden)
Einfrier-Röhrchen	Cryotube, 1,8 ml, Nunc (Wiesbaden)
Einfrier-Röhrchenständer	Roth
Einmalpipetten, steril 1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml	Greiner (Nürtingen)
FACS-Röhrchen	BD Falcon, BD Biosciences (Erembodegem, B)
Handschuhe	Semperid (Österreich)
Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl	Starlab (Ahrensburg)
Reaktionsgefäße (Eppis) 500, 1500 und 2000 µl	Eppendorf AG
Sterilfilter FP30/0,2 CA-S, FP30/0,45 CA-S, FP30/1,2 CA-S	Schleicher & Schuell (Dassel) SteritopTM, Merck-Millipore (Darmstadt)
96 Well V-Boden PP	Greiner
PCR/Mikrozentrifugen 0,5 ml Tube autoklavierbar	Starlab

3.1.5. Glaswaren

Bechergläser 200, 500, 1000, 2000 ml	Schott (Mainz)
Deckgläser, 24x32 mm	Menzel (Braunschweig)
Deckgläser, 24x50 mm	Menzel (Braunschweig)
Objektträger, geputzt, 25x75 mm	Diagonal (Münster)
Zählkammern	Fuchs-Rosenthal Schreck (Hofheim)

3.1.6. Kits

Foxp3 / Transcription Factor Staining Set	ThermoFisher
LEGENDplex- Human Th Cytokine Panel (13-plex)3G8 with V-Bottom Plate	BioLegend

3.1.7. Beads

Setup Beads (LEGENDplex Zytokinpanel)	BioLegend
---------------------------------------	-----------

3.1.8. Antikörper

Detection Antibodies	BioLegend
SA PE Antibody	BioLegend

Tabelle 3: Verwendete Antikörper mit Spezies, Fluorochrom, Klon und Hersteller

Antikörper	Spezies	Fluorochrom	Klon	Firma
IgG	mouse	PE	SK7	BD
IgG	mouse	FITC	679.1 Mc	Beckmann Coulter
IgG	mouse	APC	679.1 Mc 7	Beckmann Coulter
IgG	mouse	V450	MOPC-21	BD
IgG	mouse	APC-H7	MOPC-21	BD
IgG	mouse	PE-Cy7	MOPC-21	BD
CD3	mouse	FITC	UCHT 1	Beckmann Coulter
CD3	mouse	PE	UCHT 1	Beckmann Coulter
CD3	mouse	APC	UCHT 1	Beckmann Coulter
CD3	mouse	APC-H7	SK7	BD
CD3	mouse	PE-Cy7	SK7	BD
Foxp3	mouse	FITC	PCH 101	eBioscience
CD52	mouse	PE	YTH 34.5	Serotec
CD52	mouse	FITC	MCA1642F	Bio-RAD
CD56	mouse	V450	B159	BD
CD8	mouse	APC	B 9.11	Beckmann Coulter
GARP	mouse	APC	G14 D9	eBioscience
ILT3	mouse	APC	ZM4.1	Invitrogen
TIGIT	mouse	APC	MBSA43	Invitrogen
NKp30	mouse	APC	P30-15	BioLegend
CD25	mouse	V450	M-A251	BD
CD4	mouse	APC-H7	RPA-T 4	BD
CD16	mouse	PE-Cy7	3G8	BioLegend

3.1.9. Software

FlowJo 7.6.4. für durchflusszytometrische Analysen	FlowJo
SPSS Version 23	IBM

3.2. Patientenblut

Die Ergebnisse dieser Promotionsschrift stammen alle aus Untersuchungen menschlichen Vollbluts. Dazu wurde von insgesamt 16 Patienten nach allogener HSZT in wöchentlichen Abständen Blut abgenommen. Dabei war entscheidend, dass alle Patienten das gleiche Konditionierungsregime zur T-Zelldepletion erhielten: Melphalan, Fludarabin und Campath/Alemtuzumab. Der Beobachtungszeitraum begann an Tag 30 nach allogener HSZT und dauerte bis Tag 200 nach allogener HSZT beziehungsweise bis zum Auftreten einer aGVHD. Der Projektaufbau dieser Hauptuntersuchungen bzw. **Projekt 1** ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt. Für **Projekt 2** dieser Arbeit wurden Blutproben zu einzelnen Zeitpunkten nach allogener HSZT repräsentativ ausgewählt und die jeweiligen Zytokinlevel bestimmt.

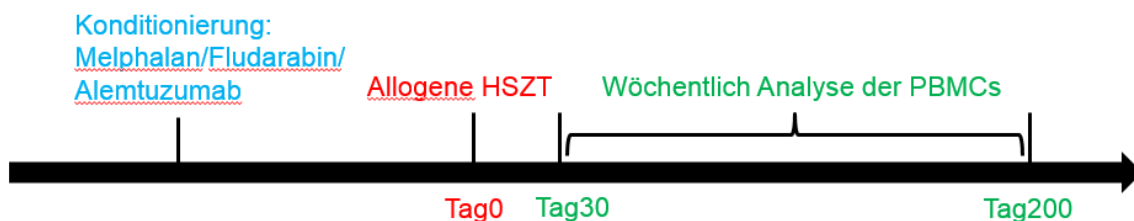


Abbildung 13: Schematischer Projektaufbau der Hauptuntersuchungen (Projekt 1)

Teils konnte das Blut schon im Rahmen des stationären Aufenthaltes der 3. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz gewonnen werden, andere Proben wurden bei Routinelaborkontrollen in der KMT-Ambulanz der 3. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz abgenommen. Die Blutentnahmen erfolgten entweder aus liegenden zentralen Venenkathetern oder

durch die Punktion peripherer Venen. Vor Blutentnahme wurden alle Patienten durch Ärzte des KMT Teams aufgeklärt und haben zugestimmt, dass ihre Blutproben zu Forschungszwecken im Rahmen der wissenschaftlichen Studie „Untersuchung der Rekonstitution des Immunsystems in Patienten nach Stammzelltransplantation“ (#808; Antrag Prof. Dr. Huber, Prof. Dr. Wölfel, Dr. R.G. Meyer) verwendet werden dürfen und Sie mit der Entnahme einverstanden sind.

3.3. Buffy-Coat (BC)

Die deutsche Bezeichnung für Buffy-Coat (BC) ist der Leukozytenfilm. Das impliziert, dass ein BC hauptsächlich aus weißen Blutkörperchen besteht. Es macht nur ca. 1% der Gesamtblutprobe aus und stellt die Grenzschicht zwischen roten Blutkörperchen und Blutplasma dar, welches zum Beispiel bei der Zentrifugation von Vollblut entsteht und bei der Gewinnung von Erythrozyten Konzentrat und Fresh Frozen Plasma als Nebenprodukt anfällt (Dr. rer. nat. Garnet Suck, 2019).

Nachstehend sind die sechs für diese Arbeit verwendete Buffy-Coats aufgelistet. Sie stammen alle von gesunden Spendern und wurden von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin zur Verfügung gestellt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 4: Interne Nummer der verwendeten Buff Coats

BC 1411761
BC 1501194
BC 1530828
BC 140805
BC 147704
BC 1417036

3.4. Patientenliste des Projekt 1 - Bestimmung prädiktiver Marker für aGVHD

Alle verwendeten Proben stammen von Patienten, die das gleiche Konditionierungsregime mit Fludarabin/Melphalan/Campath erhalten haben. Die Gesamtcampathdosis betrug 100 mg. Außerdem haben alle Patienten eine GVHD

Prophylaxe mittels Ciclosporin A von Tag 0 bis Tag 60 nach allogener GVHD erhalten. In Tabelle 4 ist jedem Patienten, dessen Daten in dieser Promotionsschrift verwendet wurden eine Nummer zu geordnet, sowie das Alter, die Grunderkrankung und ob ein Patient im Verlauf aGVHD entwickelt oder nicht.

Tabelle 5: Patientenliste Projekt 1 mit Nummer, Alter, Grunderkrankung, GVHD Status

Patient	Alter	Grunderkrankung	aGVHD
1	66	CML	graft failure
2	71	AML	aGVHD
3	71	AML (aus MDS)	aGVHD
4	60	MDS	aGVHD
5	58	MM	keine
6	69	T-NHL	aGVHD
7	58	T-NHL	aGVHD
8	69	AML	aGVHD
9	68	AML	aGVHD
10	56	B-NHL	aGVHD
11	66	sek. Myelofibrose	aGVHD
12	64	MPN (aus ET)	keine
13	47	MM	keine
14	53	Prim. Myelofibrose	keine
15	55	AML aus MDS	keine
16	27	M. Hodgkin	keine

3.5. Patientenliste des Projekt 2 - Analyse der Zytokinlevel nach HSZT

Tabelle 6: Patientenliste Projekt 2 mit Nummer, Alter, Grunderkrankung, Anzahl der Proben und jeweiliger Zeitpunkt, GVHD Status

Patient	Alter	Grund- erkrankung	Anzahl Proben	Tag	aGVHD
1	64	MPN (aus ET)	3	50,80, 230	keine
2	63	MPN	2	50, 230	keine
3	72	AML	1	80	keine
4	64	MM	3	50, 80, 140	keine
5	71	AML (aus MDS)	2	50, 80	aGVHD
6	58	MM	1	50	keine
7	69	AML	2	50, 140	aGVHD
8	68	AML	3	50, 80, 140	aGVHD
9	66	Sek. Myelofibrose	3	50, 80, 140	aGVHD

3.6. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

3.6.1. Definition und Prinzip

FACS steht für "Fluorescence Activated Cell Sorting" und ist eine immunologische Zelldifferenzierungsmethode. Alle Daten dieser Forschungsarbeit wurden FACS basiert generiert. Daher möchte ich zunächst auf die grundlegenden Prinzipien dieser Methode eingehen. Im Unterschied zu elektronischen Zellzählgeräten, die auf dem Prinzip der Impedanzmessung dem sogenannten „Coulter Prinzip“ beruhen, basiert das FACS auf der Antigen-Antikörperreaktion (Dörner, 2013).

Mit der Entwicklung monoklonaler Antikörper hat die Methode des FACS großen Aufwind erfahren und wird seit dem sowohl zur Forschung als auch Diagnostik flächendeckend eingesetzt (Galbraith, 2012). Die Zellen können nicht nur an Hand

ihres Phänotyps (Größe, Struktur) quantifiziert werden, sondern das FACS ist bis heute auch das einzige Verfahren, das es ermöglicht Zellen auf Basis unterschiedlicher intrazellulärer Proteinexpression zu detektieren. Hierzu werden monoklonale Antikörper eingesetzt, die entweder intra- oder extrazytoplasmatische Strukturen sichtbar machen, die dann quantifiziert werden können (Basu et al., 2010).

Jeder AK wird durch den Laser einer bestimmten Wellenlänge angeregt, sodass über die Emissionsspektren sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die Antigenexpression der einzelnen Zellen getroffen werden können. Hierzu werden die Zellen während sie an dem entsprechenden Laser vorbei geleitet werden durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenschnur aufgereiht. Wird der entsprechende Farbstoff durch den monochromatischen Laser entsprechend angeregt, so werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben und fallen anschließend durch Abgabe von Photonen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau ab. Diese Energie kann mit Hilfe eines Photonendetektors gemessen werden und das erfasste Signal anschließend digitalisiert werden. Da die Photonenemission proportional zur gebundenen Antikörpermenge ist, können so quantitative Aussagen über die Antigenexpression getroffen werden. Jeder Farbstoff hat charakteristische Emissionsspektren, sodass gleichzeitig mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden können, auch wenn sie bei der gleichen Wellenlänge angeregt werden. Über unterschiedliche Lichtstreuung können außerdem Aussagen über Zellgröße und Granularität getroffen werden (Roederer, 1015). Mit der FACS Methode lassen sich daher relative große Zellzahlen in kurzer Zeit, bis zu 30.000 Zellen/sec, analysieren (Schmitt, 2020).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE, APC, APC-H7, PE-Cy7 und V450 verwendet.

Die meisten Geräte ermöglichen vier Farbanalysen, wobei neuere bis zu acht Farbanalysen erlauben. Im klinischen Alltag findet die Methode des FACS vor allem im Bereich der Lymphozyten - und HIV Differenzierung sowie der Subtypisierung von Lymphomen und Leukämien Anwendung (Dörner, 2013).

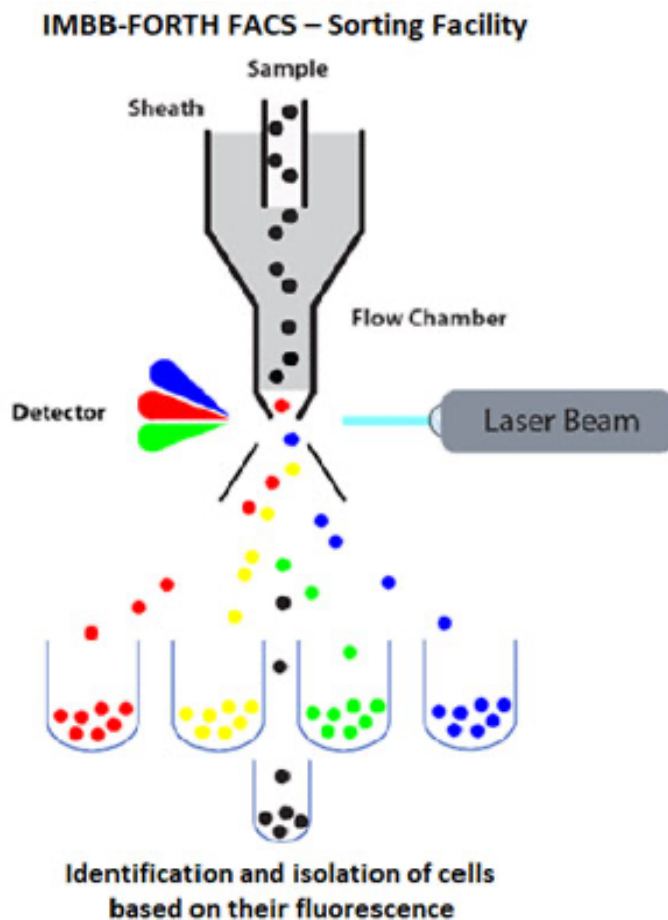


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Zellseparation mittels Durchflusszytometrie
<https://www.imbb.forth.gr/imbb-people/en/facs-sorting-facility-home> (29.04.2020)

3.6.2. Gerät

Die durchflusszytometrischen Messungen dieser Arbeit wurden an einem FACS Canto II der Firma BD durchgeführt und mit der Software FACS Diva von BD Biosciences ausgewertet.

3.7. Materialgewinnung und - Aufarbeitung

3.7.1. Projekt 1

3.7.1.1. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Definition

Bei den verwendeten Blutproben handelt es sich um sogenannte PBMCs, die aus menschlichem Vollblut gewonnen wurden. PBMC steht für Peripheral blood Mononuclear Cell. Die Blutproben enthalten folglich einkernige Zellen also

vorwiegend Monozyten und Lymphozyten. Beide Zellgruppen spielen eine wichtige Rolle im menschlichen Immunsystem (Corkum et al., 2015).

3.7.1.2. PBMC Gewinnung und Aufbewahrung

Die für die Promotionsarbeit verwendeten PBMCs der 16 Patienten wurden bereits vorab in wöchentlichen Abständen aus Vollblut durch Ficoll-Separation (Protokoll siehe Anhang) gewonnen und gesammelt (Cutts, 1967). Dazu wurden die gewaschenen PBMCs (bis zu 50 Mio. pro 2 ml Nunc) mit Einfriermedium und 10 % Dimethylsulfoxid resuspendiert und für 3 Tage bei - 80 °C eingefroren, bevor sie in den -196 °C Stickstofftank überführt wurden (Protokoll siehe Anhang). Über diesen hatte ich Zugang zu den Proben der im Abschnitt 3.4 und 3.5 aufgelisteten Patienten. Um aus dem entnommenen Vollblut bzw. den Buffy-Coats PBMCs zu gewinnen, wird das hydrophile Kolloid Ficoll, ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer verwendet. Dabei wird zu 25 ml Vollblut ca. 15 ml Ficollmedium gegeben und mit PBS Puffer (Phosphat Buffer Saline) aufgefüllt. Anschließend wird das Gemisch bei 1000 g für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, sodass die einzelnen Zellschichten voneinander getrennt werden. Die PBMCs befinden sich nun oberhalb des Ficollmediums und unterhalb des Plasmas (Abbildung 15). Nach Absaugen des Plasmarings können die PBMCs vorsichtig abpipetiert werden (Protokoll siehe Anhang).

Anschließend werden die Proben in einzelnen Portionen mit bis zu 50 Mio Zellen in 1 ml Einfriermedium (60 % X-vivo, 40 % ml HSA, 2500 U Heparin) +10 % Dimethylsulfoximid resuspendiert und in 2 ml Nunc Gefäßen erst für 3 Tage bei - 80° C und anschließend bei -196 °C in den Stickstofftank überführt (Protokoll siehe Anhang).

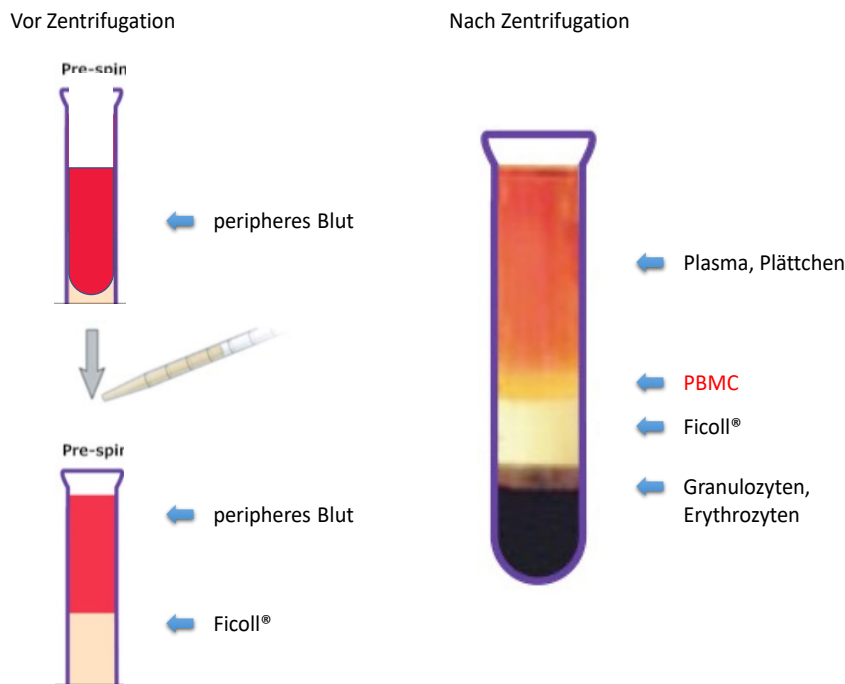


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Ficollseparation

(modifiziert nach <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/human-pbmc-isolation-and-counting-using-scepter-cell-counter.html>)

3.7.1.3. PMC Färbung

Um die eingefrorenen PBMCs verwenden zu können, werden sie möglichst schnell im 37 °C Wasserbad aufgetaut und in 10 ml EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) vorsichtig resuspendiert. Dabei darf das Volumen nur langsam erhöht werden, damit die Zellen nicht platzen. Daran schließt sich eine fünfminütige Zentrifugation bei 15000 upm an (Protokoll siehe Anhang). Im nächsten Schritt wird der Überstand dekantiert und 10 ml Medium zugegeben, sodass die Zellen nun in einer Fuchs-Rosenthal Kammer gezählt werden können (Protokoll siehe Anhang). Nach der Auszählung werden entsprechende Zellmengen (mindestens 50.000 Zellen) auf einzelnen Tubes verteilt und anschließend die FACS-Antikörper dazu gegeben. Dabei ist es wichtig die AK vorher kurz zu vortexen und bis auf den Boden der Tubes zu pipettieren. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei - 4 °C für die Oberflächenfärbung, bzw. für die intrazelluläre Färbung mittels dem AK Foxp3 nach zweistündiger Inkubation im Dunklen und bei Raumtemperatur schließt sich eine erneute, fünfminütige Zentrifugation bei 1500 upm (Umdrehungen pro Minute) an.

Es folgt ein weiterer Waschschrift bevor die Proben mittels 500 ul FACS-FIX fixiert werden können (Protokolle siehe Anhang). Im fixierten Zustand sind die Proben für maximal eine Woche bei 4 °C haltbar. Dies gilt nicht für die Tubes mit intrazellulärer Foxp3 Färbung. Sie sind maximal für 24 Stunden bei 4 °C stabil.

3.7.1.4. Verwendetes Antikörperpanel

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, wurden sowohl Oberflächen-Antikörper, als auch der Treg spezifische intrazelluläre Antikörper Foxp3 verwendet. Bei den in diesem Forschungsprojekt eingesetzten Oberflächen Antikörpern handelt es sich um Oberflächen Antikörper für IgG, CD3, CD4, CD8, CD25, CD52, CD56, GARP, ILT3, TIGIT und NKp30. Der Einsatz der verschiedenen monoklonalen Antikörper ist erforderlich für die Untersuchung einzelner Zellsubpopulationen und deren Markerexpressionen, sowie für die Identifikation und Quantifizierung der Treg.

In der folgenden Tabelle 7 ist das verwendete Antikörper Panel im Detail angegeben.

Tabelle 7: Verwendeten Antikörper Panel für die Färbung der wöchentlichen PBMCs

Tube/Fluorochrom	FITC	PE	APC	V450	APC-H7	PE-Cy7
IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
Kompensation CD3 FITC	CD3					
Kompensation CD3 PE		CD3				
Kompensation CD3 APC			CD3			
Kompensation CD3 APC-H7					CD3	
Kompensation CD3 PE-Cy7						CD3
PBMC: T-Zellen	CD3	CD52	CD8		CD4	
PBMC: NK-Zellen	CD52	TIGIT	NKp30	CD56	CD3	CD16
Treg: TIGIT (2wö)	Foxp3	CD52	TIGIT	CD25	CD4	CD3
Treg: GARP (2wö)	Foxp3	CD52	GARP	CD25	CD4	CD3
Treg: ILT3	Foxp3	CD52	ILT3	CD25	CD4	CD3

3.7.2. Projekt 2

3.7.2.1. Serum Definition

Unser Blut besteht zu 55 % aus flüssigem Blutplasma und zu 45 % aus zellulären Bestandteilen, wobei hier die Erythrozyten mit 99 % den weitaus größten Anteil ausmachen. Den Hauptanteil des Blutplasmas macht mit 90 % Wasser aus. Die restlichen 10% sind gelöste Stoffe, deren größten Anteil Proteine ausmachen, insbesondere Albumin, gefolgt von niedermolekularen Stoffen und Proteinen. Blutserum bezeichnet die flüssigen Bestandteile des Blutes, die durch die Zentrifugation einer geronnenen Blutprobe gewonnen werden. Im Unterschied zum

Blutplasma enthält das Serum zwar alle im flüssigen Blut gelösten Bestandteile, jedoch kein Fibrinogen und keine Gerinnungsfaktoren (Johann Schwegler, 2011).

3.7.2.2. Serum Gewinnung und Lagerung

Ähnlich wie im ersten Projekt die PBMCs, waren auch für dieses zweite Projekt, bei dem die Zytokinausschüttung von Immunzellen im Vordergrund stand, die in meiner Promotionsarbeit verwendeten Proben bereits eingefroren vorhanden. Daher wird hier der Vollständigkeit halber lediglich der Prozess der Gewinnung und Einfrierung von Serumproben erwähnt.

Um Serum aus einer Blutprobe gewinnen zu können, wird das Vollblut in ein spezielles Serumröhrchen mit brauner Farbkodierung abgenommen. Dieses enthält Serumgel, einen Gerinnungsaktivator, sodass das Blutserum nach Durchgerinnung der Blutprobe durch Zentrifugation bei 3500 rpm für 10 Minuten bei 20 °C abgetrennt werden kann. Es stellt den Überstand dar, der abpipettiert und anschließend weiterverarbeitet oder auch eingefroren werden kann. (Protokoll siehe Anhang). Möchte man das Blutserum nicht direkt weiterverarbeiten, sondern haltbar machen, wird es bei - 80 °C eingefroren. Dazu werden einzelne Portionen von 1-2 ml in je 2 ml-Nunc Gefäße verteilt und beschriftet (Protokoll siehe Anhang).

3.7.2.3. Serumproben Färbung

Um die Serumproben verwenden zu können, müssen sie durchgeronnen und bei Raumtemperatur aufgetaut sein. Anschließend werden Sie bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Auch alle anderen eingesetzten Komponenten des Legendplex Zytokinpanels, das bei 4 °C aufbewahrt wird, sollten rechtzeitig bei Raumtemperatur aufgetaut werden.

Sobald dies der Fall ist kann die 96 Wellplatte mit den Standardwells (bestehend aus 12,5 ul Matrix B und 12,5 ul Standard), den Probenwells und den Beads beladen werden. Zu beachten ist, dass die Platte und Tubes aus Polypropylen bestehen, da die Beads sonst an das Material binden.

Die fertig beladene Platte wird mittels Folie verschlossen, in Alufolie eingepackt und über Nacht bei 4 °C und 220 rpm auf den Schüttler gestellt werden.

Am nächsten Tag erfolgen zuerst zwei Waschschriffe, bevor die jeweils 12,5 ul der Detection Antiboldys zu gegeben werden.

Anschließend folgt die Zugabe der Detection Antibodys, sowie mehrere Waschschritte bevor die Platte am FACS gemessen werden kann. Die Platte kommt noch 2 weitere Male auf den Schüttler, dieses Mal bei Raumtemperatur. Außerdem werden noch die SA-PE Beads pipettiert und drei weitere Waschungen durchgeführt bevor der FACS-Puffer zugegeben wird. Jetzt soll die Platte möglichst schnell am FACS gemessen werden. Die Proben sind für 24 Stunden bei 4 °C stabil (Färbungs- und Messprotokoll siehe Anhang).

3.7.2.4. Verwendetes Zytokinpanel

Die quantitative Zytokinexpression der Serumproben erfolgt per FACS. Dazu wurde das LEGENDplex Zytokinpanel der Firma BioLegend bestehend aus Beads, Detection Antibodys und SA-PE (Streptavidin-phycoerythrin) verwendet. Es handelt sich um ein Bead-basiertes Sandwich-Immunoassayverfahren ähnlich dem Prinzip eines ELISA, das in Abbildung 16 veranschaulicht ist. Jeder der enthaltenen Beads ist mit einem spezifischen Antikörper gekoppelt, sodass nur das Analysat bindet, das exakt an diesen spezifischen Antikörper passt. Außerdem liegen die Beads in zwei verschiedenen Größen, sowie unterschiedliche APC-Fluoreszenzlevel vor, was deren eindeutige Trennung ermöglicht.

Im zweiten Schritt werden zunächst die Detection Antibodys zugegeben, die an das spezifische Analysat binden. Um die Detection Antibodys nun auch sichtbar zu machen, wird das SA-PE benötigt. Dessen Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur gebundenen Menge an Analysat. Die Intensität wird anhand der emittierten PE-Fluoreszenz im FACS bestimmt und anhand einer bekannten Standardkurve quantifiziert (Protokoll siehe Anhang).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

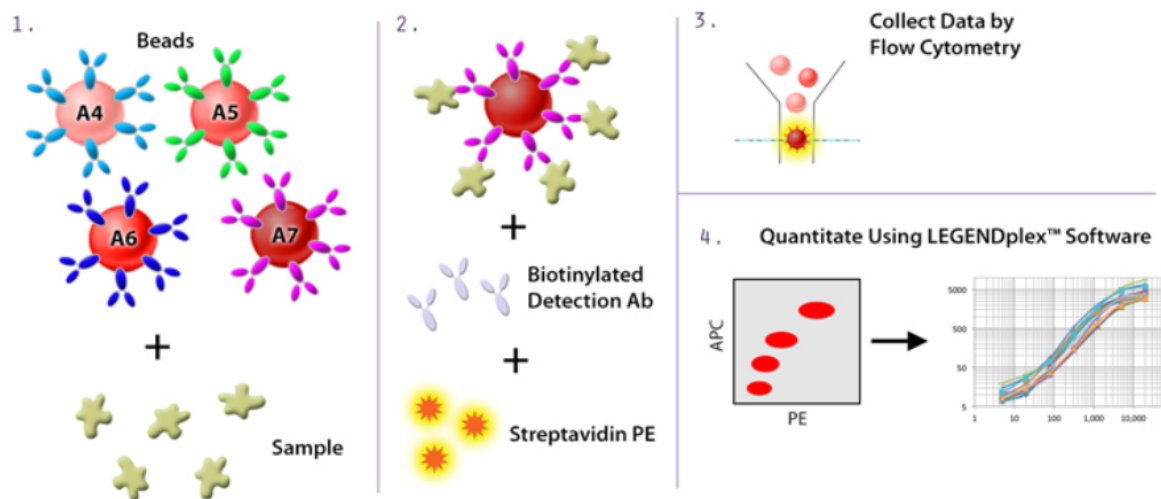


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Funktionsweise des LEGENDplex Zytokinpanel (<https://www.biolegend.com/legendplex>, 29.04.2020)

3.7.3. Computergestützte Auswertung der ermittelten Daten

Um die per FACS ermittelten und digitalisierten Signale auswerten zu können, habe ich entsprechend geeignete Programme verwendet.

Zur Analyse der Rohdaten der PBMCs aus **Projekt 1** habe ich das Programm FlowJo (Version 7.6.4, Firma FlowJo) genutzt. Die dabei angewandte Gatingstrategie ist in Abbildung 17 dargestellt: Es wurde zunächst ein Lymphozytengate gesetzt, hieraus wurden anschließend die CD3⁺ CD4⁺ PBMC dargestellt und deren APC-Cy7/PE-1 Fluoreszenzstärke gemessen.

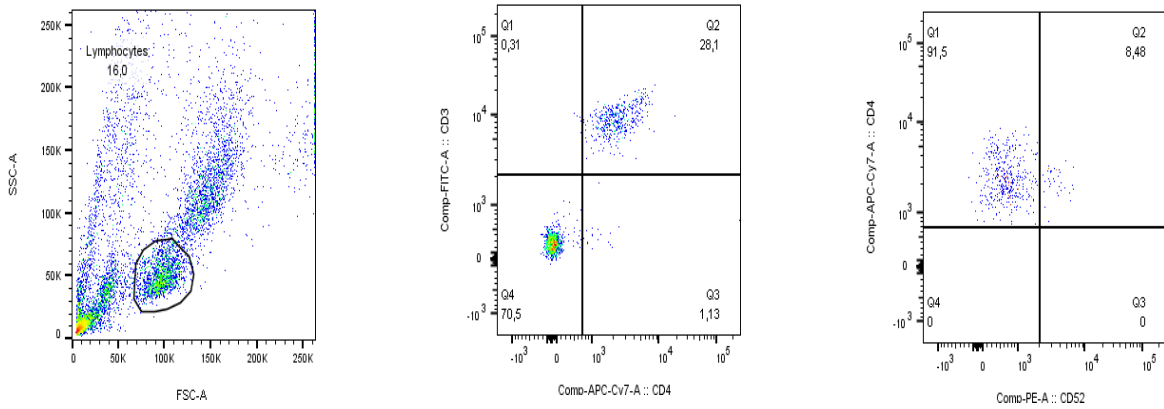


Abbildung 17: Veranschaulichung der Gating Methode mit Hilfe des Programms FlowJo

Für die Auswertung der per FACS erhobenen Signale in **Projekt 2** wurde die zum LEGENDplex Zytokinpanel zugehörige Computersoftware der Firma Biolegend verwendet (siehe Abbildung 18).

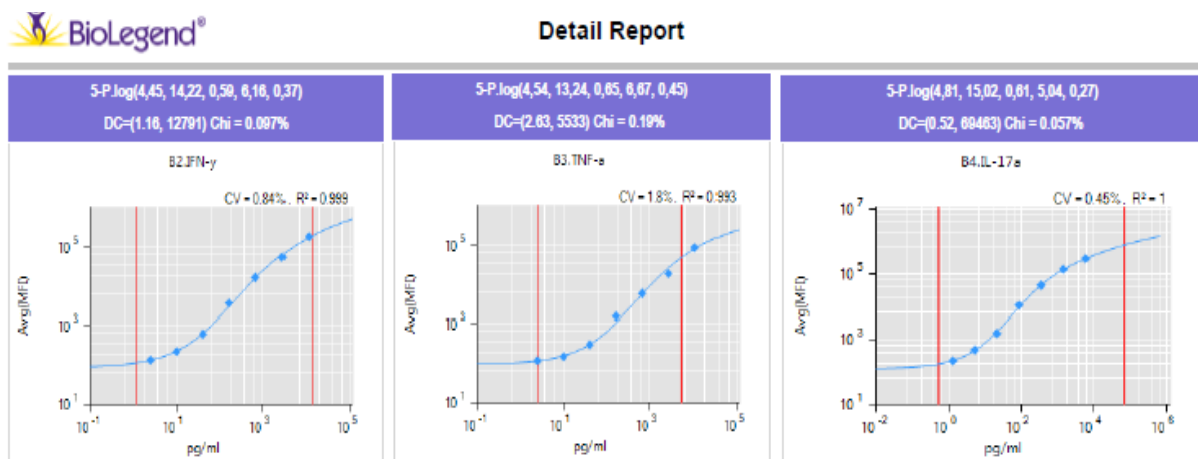


Abbildung 18: Schematische Darstellung der erstellten Kurven einzelner Zytokinmessungen

Die graphische Darstellung der einzelnen Ergebnisse und die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Statistics 23 V5.

4. Ergebnisse

4.1. Projekt 1

Diese Arbeit umfasst insgesamt 16 Patienten. Davon blieben sechs aGVHD frei. Ein Patient erlitt ein graft failure. Bei neun Patienten trat im Verlauf der Betrachtung eine aGVHD auf. In sieben Fällen wurde die aGVHD mit overall Grad zwei eingestuft, in einem Fall mit drei und in einem weiteren Fall mit vier. Die Therapie erfolgte mit systemischen Glucocorticoiden. Im weiteren Verlauf entwickelten vier Patienten eine cGVHD und ein Patient eine Overlap GVHD.

Zum aktuellen Zeitpunkt 06/2021 leben noch 5 Patienten, während 11 Patienten im Verlauf verstorben sind.

4.1.1. CD52 Expression einzelner T-Zellsubtypen

Betrachtet man die einzelnen T-Zelltypen CD4⁺, CD8⁺ und Treg im Vergleich, so fällt auf, dass sich die CD52 Expression innerhalb der einzelnen T-Zelltypen unterscheidet (p-Wert einfaktorieller ANOVA Analyse: **0,011**) (siehe Abbildung 19). Hierbei wurde die CD52 Expression der einzelnen Zellsubpopulationen über den gesamten Beobachtungszeitraum betrachtet und gemittelt. Die Treg finden in dieser Analyse der CD4⁺ Lymphozyten keine Beachtung, sondern wurden als eigene Gruppe untersucht.

Am höchsten ist die Frequenz von CD52⁺ auf der Gruppe der Treg. Im Vergleich zu den Lymphozyten ist CD52 auf den Treg statistisch auffällig höher exprimiert (p-Wert Post-Hoc-Test korrigiert nach Bonferroni: **0,018**).

Auch CD8⁺ Lymphozyten besitzen mit knapp 50 % einen verhältnismäßig größeren Anteil CD52⁺ Zellen als die CD4⁺ Lymphozyten (p-Wert Post-Hoc-Test korrigiert nach Bonferroni: **0,030**).

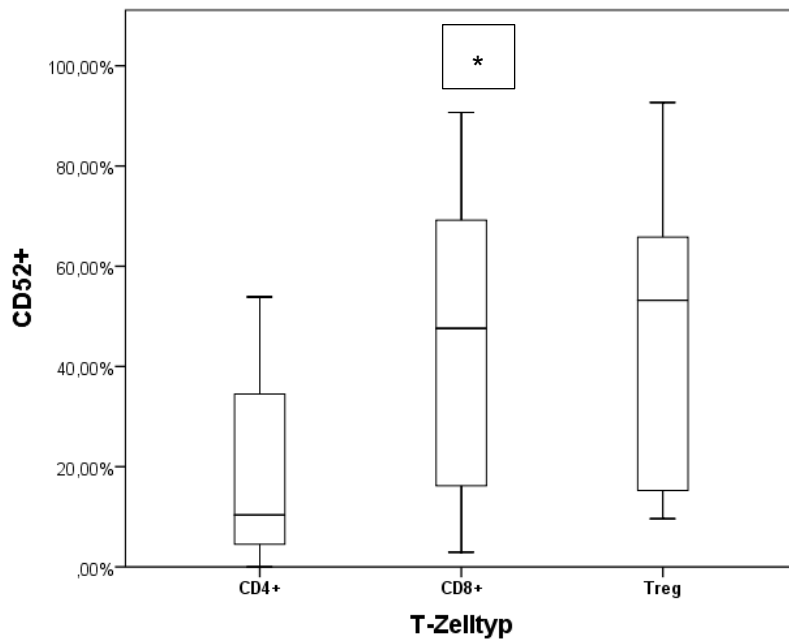


Abbildung 19: CD52 Expression der einzelnen T-Zelltypen über alle untersuchten Zeitpunkte gemittelt

4.1.2. CD52-Negativität als Prädiktor für die Entstehung aGVHD

Abbildung 20 zeigt, dass bei Patienten mit aGVHD der Anteil CD52⁻ Treg an den Gesamt Treg deutlich höher ist als bei Patienten ohne GVHD (p-Wert: **0,006**). Dies bezieht sich auf alle Proben kumulativ.

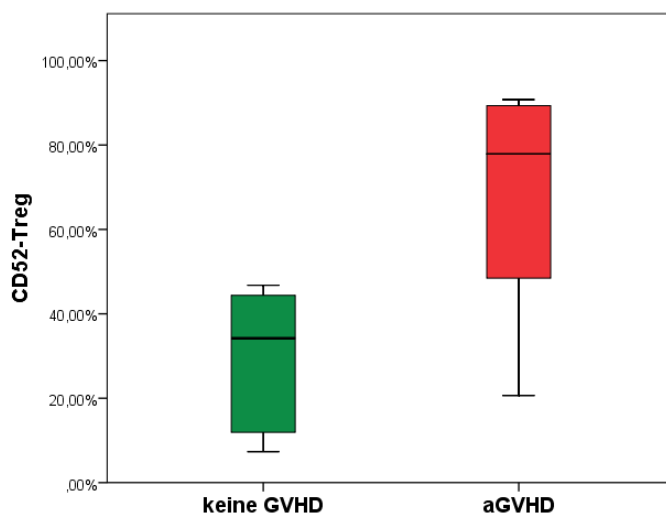


Abbildung 20: Anteil CD52⁻ Treg bei Patienten mit aGVHD und ohne GVHD

Der hohe Anteil CD52⁻ Treg bei den Patienten, die im Verlauf aGVHD entwickeln oder bereits haben, im Vergleich zu der Gruppe ohne GVHD ist an Tag 50 nach Transplantation (p-Wert: **0,004**) besonders deutlich (siehe Abbildung 21).

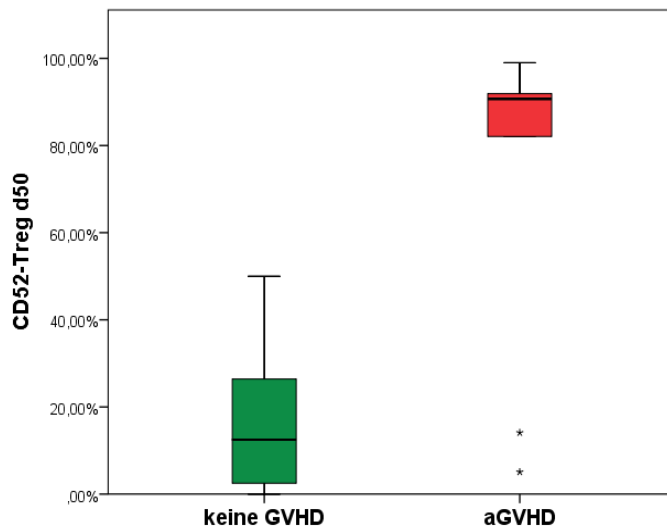


Abbildung 21: Anteil CD52⁻ Treg bei Patienten mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 50 nach allogener HSZT

An Tag 100 nach der Transplantation kann kein statistisch auffälliges Ergebnis mehr nachgewiesen werden. Daher eignet sich Tag 50 nach allogene HSZT besonders gut als Vorhersagewert.

4.1.3. Zeitlicher Verlauf der CD52 Negativität

Vergleicht man den Verlauf der CD52⁻ Treg bei beiden untersuchten Patientengruppen über die Zeit, fällt auf, dass der Anteil CD52⁻ Treg bei Patienten mit aGVHD an Tag 50 nach allogener HSZT größer ist als bei den Patienten ohne GVHD (vgl. Abschnitt CD52 Negativität als Prädiktor für die Entstehung von aGVHD).

Fünf Patienten aus der Gruppe mit aGVHD besitzen bereits an Tag 50 nach allogener HSZT über 80 % CD52⁻ Treg am Gesamtanteil der Treg (vgl. Abb.4). Während in dem Kollektiv der Patienten ohne GVHD fünf der sechs untersuchten Patienten Werte von unter 30 % CD52⁻ Treg aufweisen (vgl. Abb. 5). Bemerkenswert ist außerdem, dass bei den Patienten mit aGVHD der relative Anteil CD52⁻ Treg im Verlauf weiter ansteigt. Besonders gut zu erkennen ist dies in

Abbildung 22-1, an Patient 1 und Patient 9.

In der Gruppe der Patienten ohne GVHD verhält es sich genau umgekehrt. Hier fällt die relative Zahl der CD52⁻ Treg bei vier der sechs Patienten im Untersuchungsverlauf auf niedrigere Werte ab. Dieses Ergebnis ist besonders deutlich bei Patient 16 oder Patient 13 in Abb. 22-2.

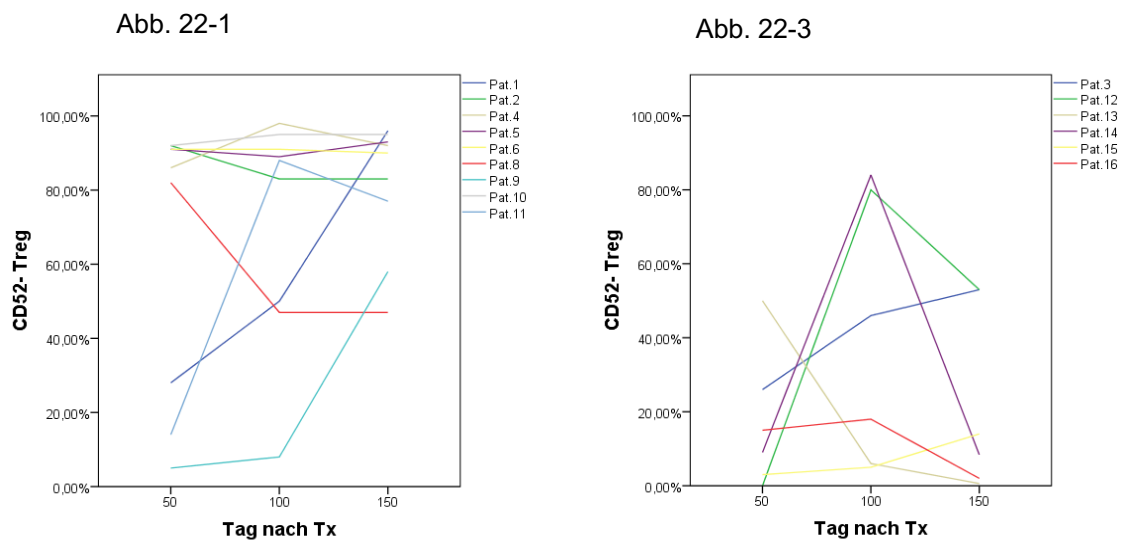


Abbildung 22: Anteil an CD52⁻Treg im zeitlichen Verlauf nach allogener HSZT.

22-1 bei Patienten mit GVHD; 22-2 bei Patienten ohne aGVHD

Noch eindrücklicher wird das oben beschriebene Ergebnis, wenn man nur Patient 5 (aus der Gruppe der Patienten mit aGVHD) und Patient 16 (aus der Gruppe der Patienten ohne GVHD) vergleicht (siehe Abbildung 23).

Der Patient ohne GVHD hat deutlich niedrigere CD52⁻ Treg Level, als der Patient mit aGVHD.

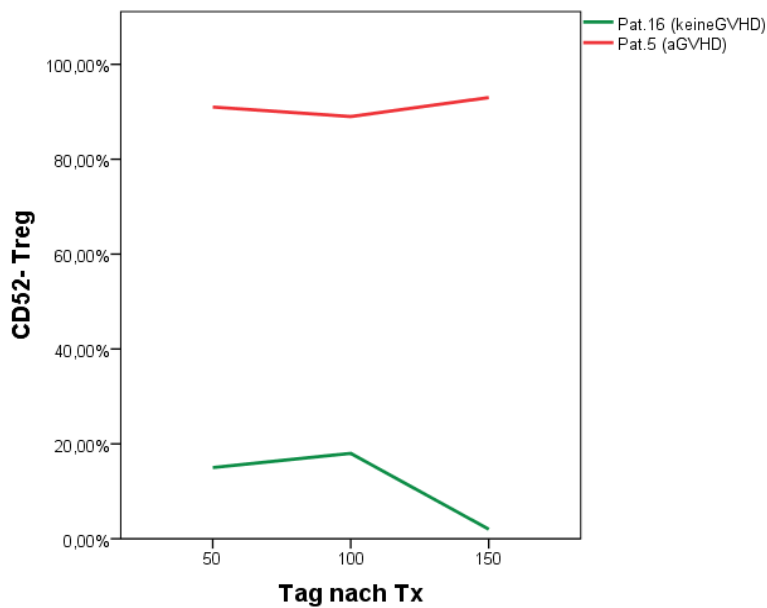


Abbildung 23: Anteil CD52⁻ Treg im zeitlichen Verlauf nach allogener HSZT

4.1.4. Hauptfragestellung: Cut off CD52⁻ Treg an Tag 50 als früher aGVHD Marker

Die Hauptfragestellung dieser Promotionsarbeit war einen Cut off CD52⁻ Treg bei Patienten/innen nach allogener HSZT als prädiktiven Marker für die Entwicklung einer aGVHD zu bestimmen.

Dazu wurde die CD52 Negativität der Treg der Patienten mit und ohne GVHD an Tag 50 nach Transplantation gewählt, da sich dieser frühe Zeitpunkt nach Transplantation als besonders geeignet erwies.

Der Wert mit dem höchsten Youden-Index (J): Sensitivität: 0,889 und 1-Spezifität: 0,167 liegt bei 26,95. Die Fläche unter der Kurve beträgt dabei 0,898 (Standartfehler 0,084) (vgl. Abbildung 24). Übertragen bedeutet dies, dass ab einem Cut off von gerundet **27 % CD52⁻ Treg an Tag 50** nach allogene HSZT, der Patient mit hoher Wahrscheinlichkeit eine aGVHD entwickeln wird.

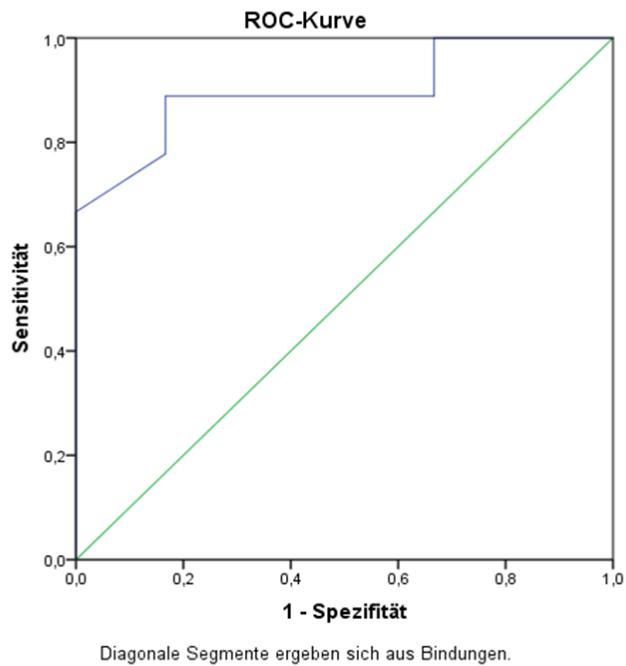


Abbildung 24: ROC-Kurve für CD52⁻ Treg an d50 nach allogener HSZT

4.1.5. Verhältnis CD8⁺ CD52⁺ Lymphozyten zu CD52⁻ Treg

Interessanterweise scheint nicht nur die absolute Zahl der CD52⁻ Treg eine Rolle zu spielen ob jemand im Verlauf eine aGVHD entwickeln wird, sondern auch das Verhältnis CD8⁺ CD52⁺ Lymphozyten zu CD52⁻ Treg.

Zwar schwanken die Werte innerhalb der Gruppe der Patienten ohne GVHD stark, trotzdem ist ein klarer Trend zu verzeichnen. Es fällt auf, dass Patienten ohne GVHD an Tag 100 nach Transplantation ein höheres Verhältnis CD8⁺ CD52⁺ Lymphozyten zu CD52⁻ Treg aufweisen, als Patienten mit aGVHD (p-Wert: **0,04**) (siehe Abbildung 25).

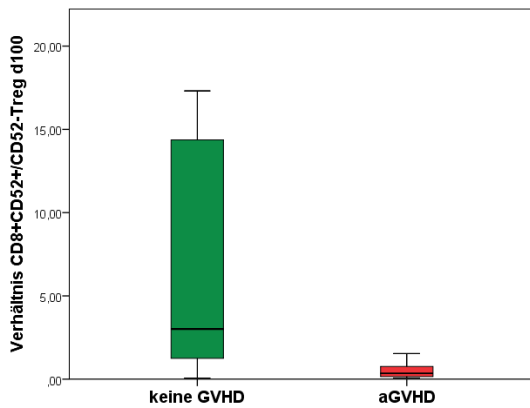


Abbildung 25: Verhältnis $CD8^+CD52^+$ Lymphozyten zu $CD52^-$ Treg an Tag 100 nach allogener HSZT

4.1.6. Die T-Zellmarker GARP, ILT3, TIGIT und aGVHD

Für keinen der drei Marker GARP, ILT3, TIGIT konnten statistisch signifikante Unterschiede der Expression zwischen Treg von Patienten mit und ohne GVHD nachgewiesen werden. Allerdings ist bei dem funktionellen Marker GARP eine klare Tendenz zu verzeichnen. Wie in Abbildung 26-1 dargestellt, wird GARP deutlich höher von Treg der Patienten ohne GVHD exprimiert als von Patienten mit aGVHD (**p-Wert: 0,118**). Schon an Tag 50 nach allogene HSZT ist der relative Anteil an GARP exprimierender Treg bei Patienten ohne GVHD höher als bei Patienten mit aGVHD (siehe Abbildung 26-2). Dieser Unterschied in der GARP Expression der Treg von Patienten mit und ohne GVHD wird noch deutlicher, wenn man isoliert Tag 100 nach allogene HSZT betrachtet (p-Wert:**0,005**) (siehe Abbildung 26-3).

Abb. 26-1

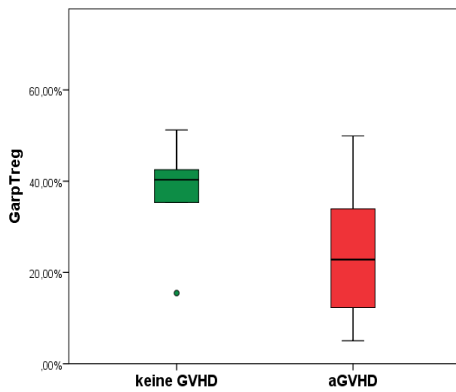


Abb. 26-2

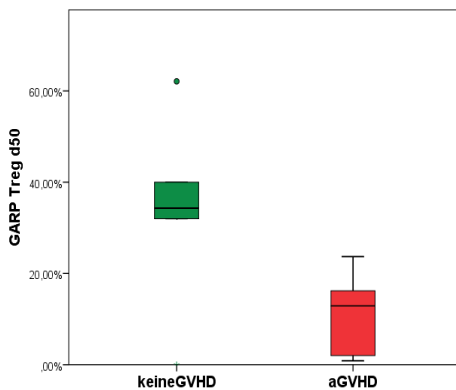


Abb. 26-3

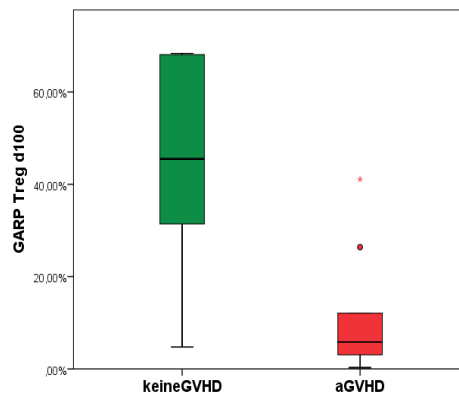


Abbildung 26: GARP Expression auf Treg

26-1: Patienten mit aGVHD und ohne GVHD

26-2: Patienten mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 50 nach allogener HSZT

26-3: Patienten mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 100 nach allogener HSZT

4.1.7. Verlauf der GARP Expression auf Treg

Bei der weiteren Analyse des T-Zellmarkers GARP auf Treg über die Zeit sind insbesondere die Unterschiede in der Expression vor Tag 100 interessant.

Bei Patienten mit aGVHD beträgt der Anteil der Treg, die GARP exprimieren, bei sieben der neun untersuchten Patienten weniger als 20 % (siehe Abbildung 27-1). In der Gruppe der Patienten ohne GVHD ist der Anteil an GARP exprimierenden Treg hingegen deutlich höher. An Tag 100 nach allogene HSZT weisen fünf der sechs Patienten einen relativen Anteil von mehr als 30 % GARP exprimierender Treg auf (siehe Abbildung 27-2).

Abb. 27-1

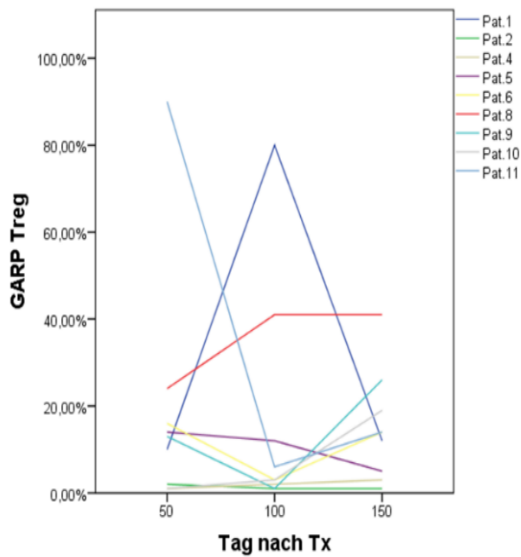


Abb. 27-2

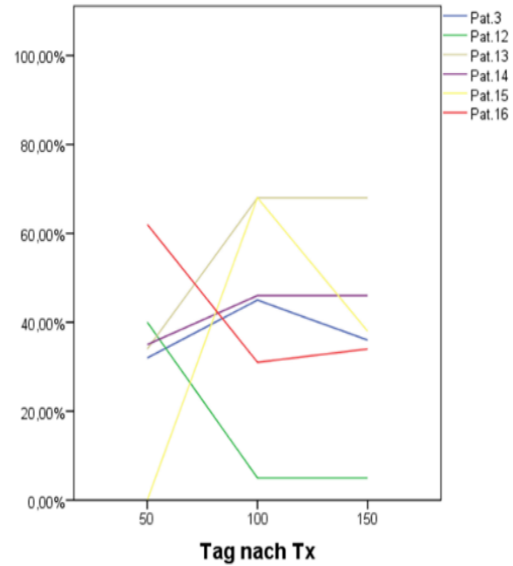


Abb. 27-3

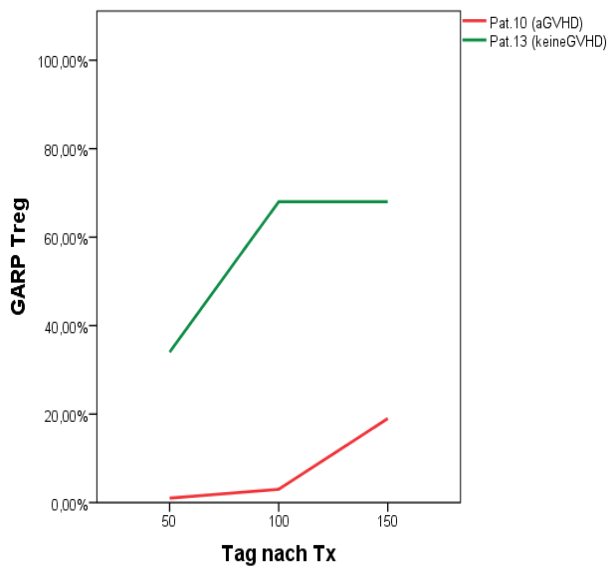


Abbildung 27: GARP Expression auf Treg nach zeitlichem Verlauf

27-1: Bei Patienten mit aGVHD

27-2: Bei Patienten ohne aGVHD

27-3: Bei Patienten mit aGVHD (rot) gegenüber ohne GVHD (grün)

Auch hier nochmal die Betrachtung eines einzelnen Patienten jeder Gruppe zur besseren Veranschaulichung der Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 27-3). In diesem Fall Patient 10 als Beispiel eines Patienten mit aGVHD und Patient 13 zur Repräsentation des Patientenkollektivs ohne GVHD. Es ist deutlich, dass die Treg des Patienten 13 von Beginn an höhere GARP Werte aufweisen, als diejenigen des Patienten 10. Hinzukommt, dass die GARP-Expression

bei dem Patienten ohne GVHD im Verlauf stärker ansteigt. Während Patient 10 an Tag 100 nach allogene HSZT relative Werte GARP positiver Treg unter 10 % aufweist, sind es bei Patient 13 schon knapp 70 % der Treg, die GARP exprimieren.

4.1.8. Die T-Zellmarker GARP, ILT3, TIGIT und CD52

CD4⁺ CD52⁺ Lymphozyten zeigen eine statistisch auffällig höhere ILT3 Expression im Vergleich zu CD4⁺ CD52⁻ Lymphozyten (**p-Wert: 0,004**) (siehe Abbildung 29). Auch CD52⁺ Treg weisen größere Anteile des funktionellen Markers ILT3 auf als CD52⁻ Treg (p-Wert:**0,001**) (siehe Abbildung 29).

Der Marker GARP findet sich ebenfalls in deutlich stärkerer Ausprägung auf CD52⁺Treg als auf CD52⁻ Treg vertreten (p-Wert **0,003**) (siehe Abbildung 28).

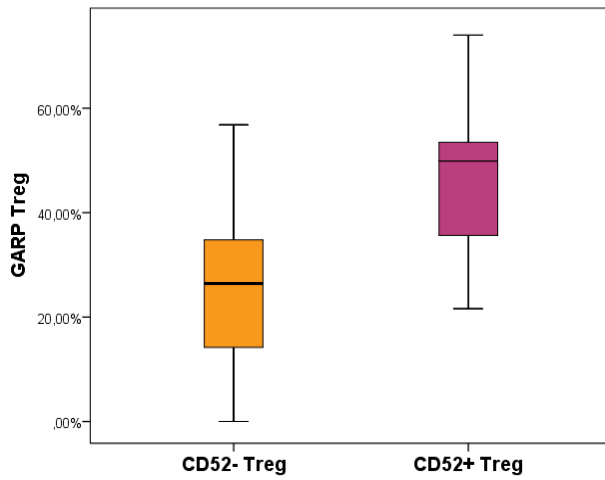


Abbildung 28: GARP Expression auf CD52⁺ vs. CD52⁻ Treg

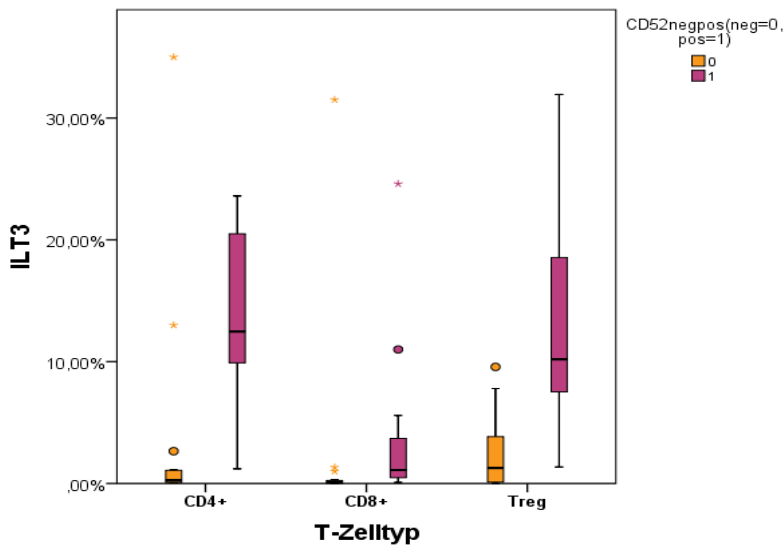


Abbildung 29: ILT-3 Expression auf CD52⁺ vs. CD52⁻ T-Zellsubtypen

Für den Marker TIGIT konnte kein Unterschied bei dessen Frequenz zwischen CD52⁺ und CD52⁻ Zellen gezeigt werden. Dies gilt für alle drei untersuchten T-Zellpopulationen, die CD4⁺ Lymphozyten, CD8⁺ Lymphozyten und Treg.

4.1.9. NK-Zellrekonstitution: Tag 50 und Tag 100 im Vergleich

Bei Patienten mit aGVHD verläuft die NK-Zellrekonstitution schneller. Schon an Tag 50 nach allogene HSZT haben die Patienten mit aGVHD mehr NK-Zellen (Mittelwert: 59%) als die Gruppe ohne GVHD (Mittelwert: 40%) siehe Abbildung 30. Dabei handelt es sich um den relativen Anteil von NK-Zellen aus allen Lymphozyten.

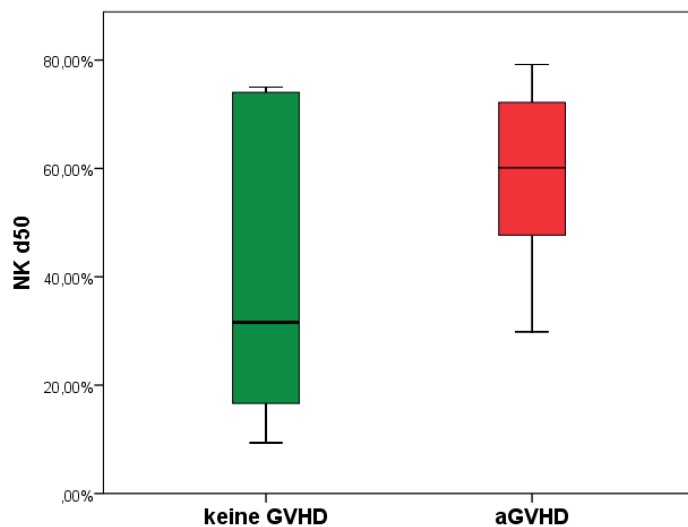


Abbildung 30: NK-Zellrekonstitution bei Patienten mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 50 nach allogener HSZT.

Noch deutlicher ist der Effekt noch an Tag 100 nach Transplantation (p-Wert: **0,004**) (Abb. 31).

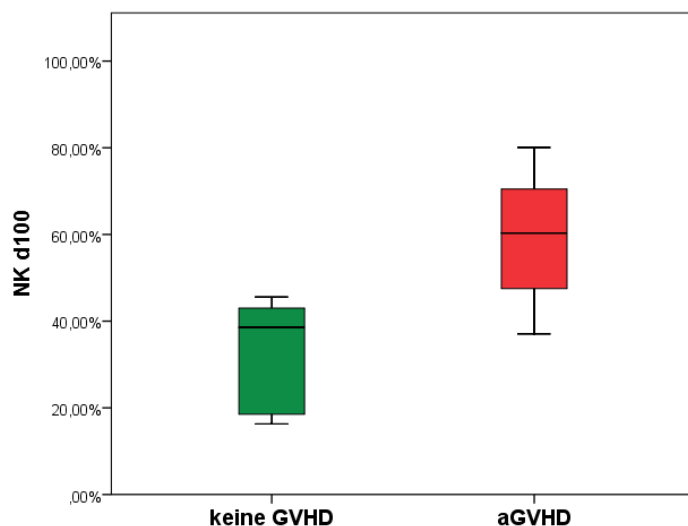


Abbildung 31: NK-Zellrekonstitution bei Patienten mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 100 nach allogener HSZT

4.1.10. Verlauf der NK-Zellrekonstitution

Betrachtet man die beiden Gruppen im Vergleich so fällt auf, dass der relative Anteil der NK-Zellen der Patienten mit aGVHD an Tag 50 nach allogene HSZT bei sieben der neun Patienten schon über 40 % am Gesamtanteil der Lymphozyten beträgt (siehe Abbildung 32-1), während bei der Gruppe der Patienten ohne aGVHD nur bei zwei der fünf Patienten schon vergleichbar hohe relative NK-Zelllevel zu finden sind (Pat. 12 und Pat.14) und auch bei diesen sinkt der Anteil der NK-Zellen bis Tag 100 wieder erheblich (siehe Abbildung 32-2). Weiterhin zeigt Abbildung 32-2, dass der

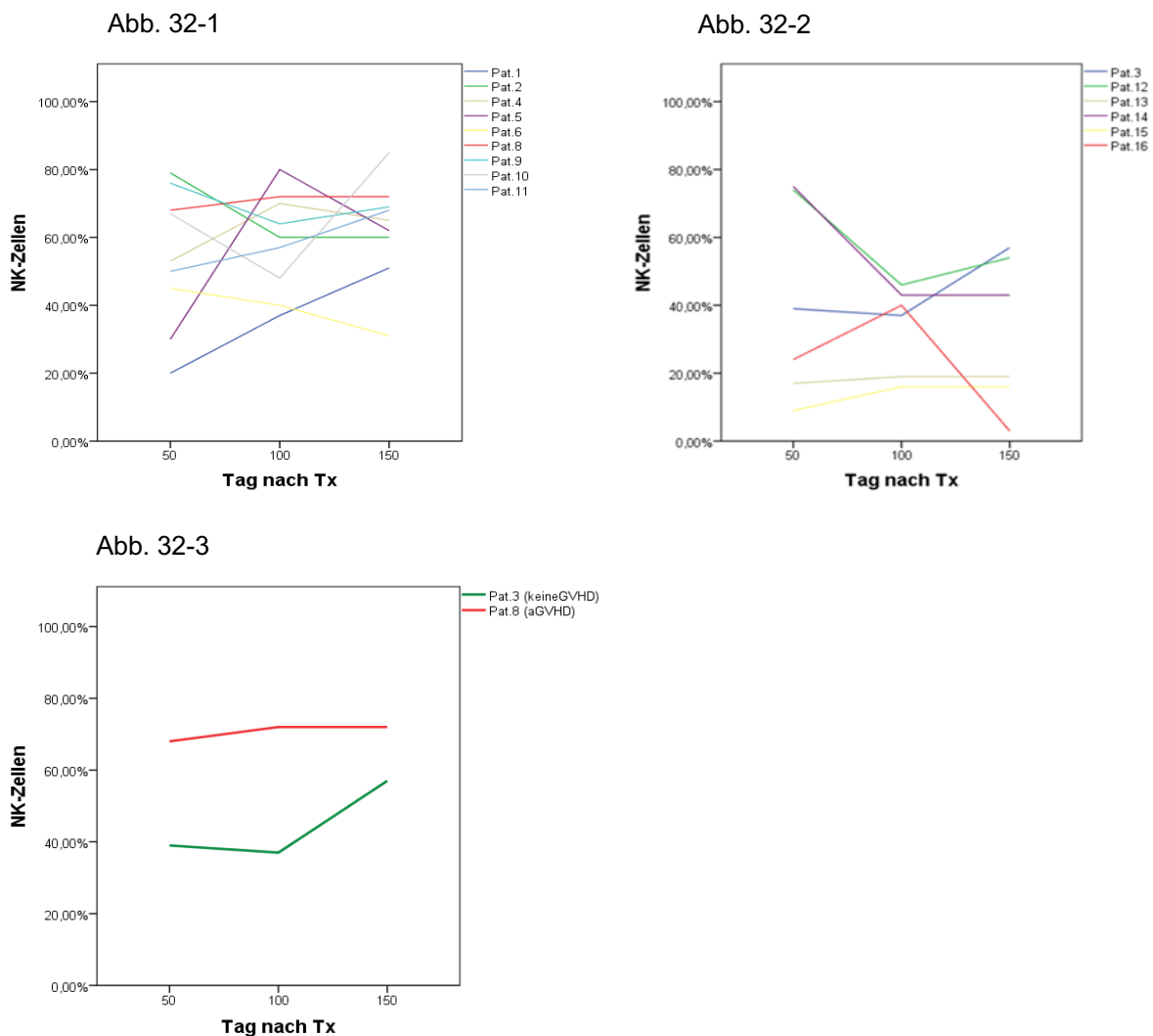


Abbildung 32: Abbildung: NK-Zellrekonstitution im zeitlichen Verlauf

32-1: Bei Patienten mit aGVHD

32-2: Bei Patienten ohne aGVHD

32-3: Bei Patienten mit aGVHD und ohne aGVHD

Anstieg der NK-Zellen bei dem Patientenkollektiv ohne GVHD bei vier der sechs Patienten erst an Tag 50 beginnt und zudem deutlich langsamer verläuft als bei den Patienten mit aGVHD, sodass an Tag 150 nach allogene HSZT Maximalwerte von 60 % NK-Zellen erreicht werden (siehe Pat. 3 Abbildung 32-2). Im Vergleich dazu sind es bei der Gruppe der Patienten mit aGVHD schon relative NK-Zelllevel von über 80 % (siehe Pat. 10 Abbildung 32-1).

Abbildung 32-3 verdeutlicht die genannten Unterschiede der NK-Zellrekonstitution beider Gruppen nochmals. Patient 3 ohne GVHD beginnt an Tag 50 mit niedrigerer NK-Zellzahl, die erst ab Tag 100 ansteigt. Patient 8 hingegen, der im Verlauf eine aGVHD entwickeln wird, weist von Beginn an einen wesentlich höheren NK-Zellanteil auf, der schon ab Tag 50 zu steigen beginnt.

4.1.10.1. NK-Zellsubpopulationen und TIGIT

NK-Zellen exprimieren unterschiedlich hoch CD56. Dieses Unterscheidungsmerkmal habe ich mir hier zu Nutze gemacht um die NK-Zellen in zwei Subpopulationen aufzuteilen. Solche die CD56 hoch positiv sind (CD56^{bright}) und solche, die CD56 niedrig positiv sind (CD56^{dim}). Auch hier wurden alle Messungen des gesamten Beobachtungszeitraumes berücksichtigt.

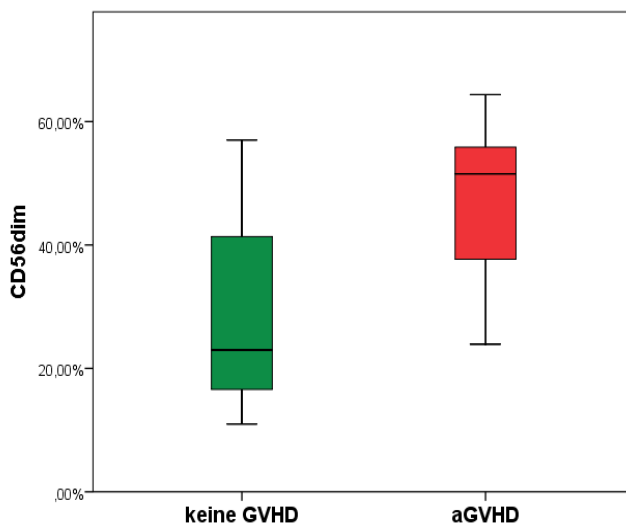


Abbildung 33: Anteil CD56dim NK-Zellen bei Patienten mit aGVHD und ohne über alle Zeitpunkte gemittelt

Auffällig ist, dass Patienten mit aGVHD mehr CD56^{dim} Zellen am Gesamtanteil der NK-Zellen besitzen als diejenigen ohne GVHD (p-Wert: **0,037**) (siehe Abbildung 33).

Abbildung 34-1 und 34-2 veranschaulichen, dass der Marker TIGIT von NK-Zellen der Patienten ohne GVHD höher exprimiert wird als von NK-Zellen der Patienten mit aGVHD. Das gilt sowohl für die Gruppe der CD56^{bright} (siehe Abbildung 34-1) als auch für die Gruppe der CD56^{dim} (siehe Abbildung 34-2), wobei in letzterer der Unterschied zwischen beiden Gruppen deutlicher ist.

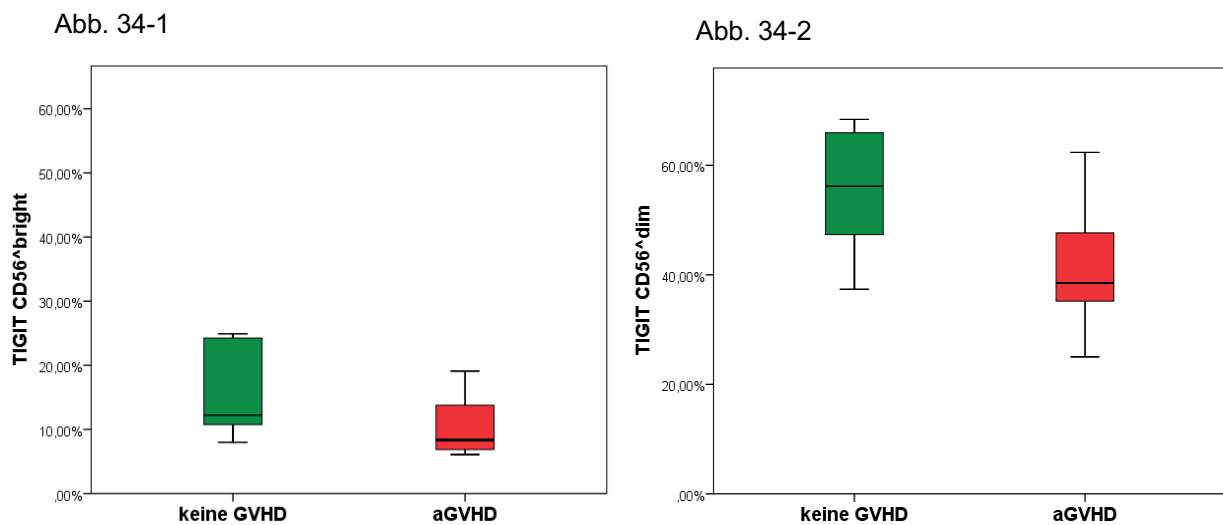


Abbildung 34: TIGIT auf NK Zellen bei Patienten ohne aGVHD und mit aGVHD über alle Zeitpunkte gemittelt

34-1: TIGIT CD56^{bright}, 34-2: TIGIT CD56^{dim}.

Für den zweiten in dieser Arbeit untersuchten Marker NKp30 konnte kein statistisch auffälliger Unterschied festgestellt werden. Weder zwischen Patienten ohne GVHD im Vergleich zu Patienten mit aGVHD noch zwischen den beiden NK-Zellsubpopulationen CD56^{bright} und CD56^{dim}. (nicht dargestellt).

4.1.10.2. Verlauf der TIGIT Expression auf CD56^{dim} NK-Zellen

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, betreffen Unterschiede der TIGIT Expression besonders die niedrig positiven NK-Zellen (CD56^{dim}). Daher ist in den folgenden Abbildungen der Verlauf des Markers TIGIT auch nur für diese NK-Zellsubpopulation gezeigt.

Neben der insgesamt höheren TIGIT Frequenz der CD56dim NK-Zellen der Patienten ohne GVHD gegenüber denjenigen mit aGVHD, fällt außerdem auf, dass der relative Anteil TIGIT positiver CD56dim NK-Zellen bei vier der sechs Patienten des Kollektivs ohne GVHD zwischen Tag 50 und Tag 100 nach allogene HSZT weiter zunimmt (siehe Abbildung 35-2 Patient 3,13,14,15).

In der Gruppe der Patienten mit aGVHD verhält es sich interessanterweise bei fünf der neun untersuchten Patienten genau umgekehrt. Hier fällt der relative Anteil TIGIT positiver CD56dim NK-Zellen von Tag 50 bis Tag 100 nach allogene HSZT ab (siehe Abbildung 35-1 Pat. 4,5,8,9,11). Bei den übrigen vier Patienten dieser Gruppe steigt die relative TIGIT Expression zwar an, jedoch wesentlich weniger stark als bei den Patienten ohne aGVHD. Eine Ausnahme stellt Patienten 2 dar, bei dem der relative Anteil CD56dim NK-Zellen, die TIGIT exprimieren zwischen Tag 50 und Tag 100 von knapp 5 % auf 40 % ansteigt (vgl. Abbildung 35-1).

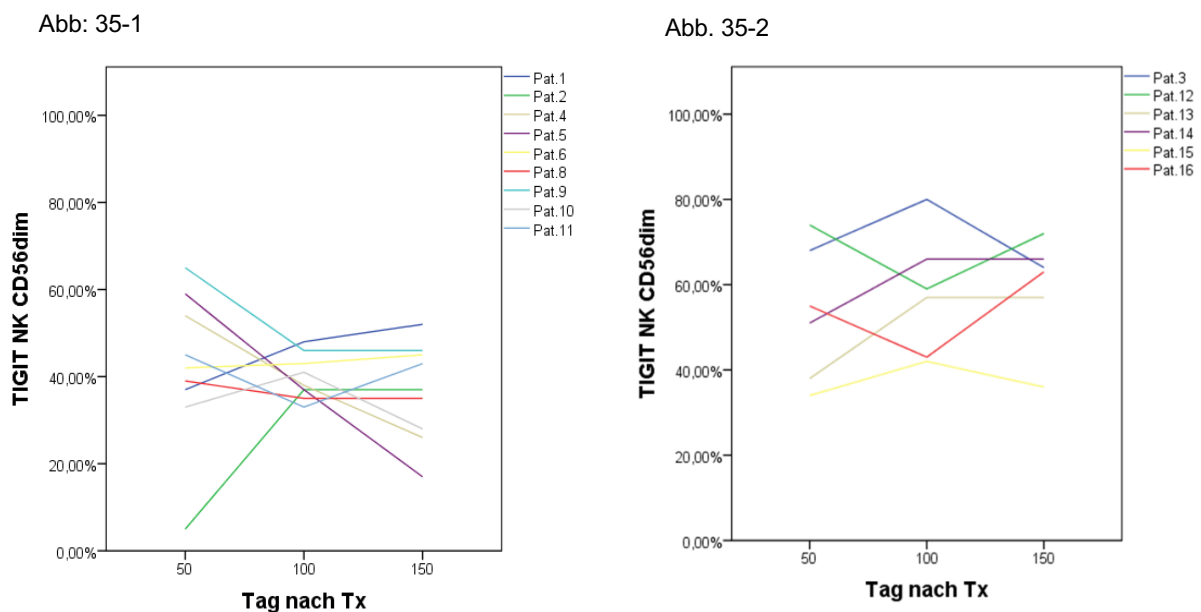


Abbildung 35: TIGIT auf CD56dim NK-Zellen CD56
35-1: Patienten mit aGVHD; 35-2: Patienten ohne aGVHD

Die deutliche, teils gegenläufig verlaufende Dynamik der TIGIT Expression auf CD56dim NK-Zellen unterstreicht Abbildung 36, die beispielhaft Patient 3 ohne GVHD und Patient 11 mit aGVHD gegenüberstellt.

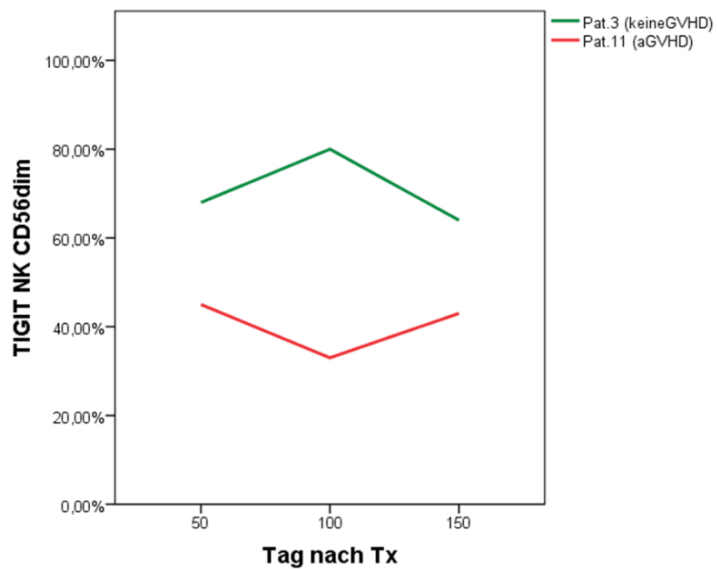


Abbildung 36: TIGIT Expression auf CD56dim NK-Zellen im zeitlichen Verlauf bei Patienten mit aGVHD und ohne GVHD im Vergleich

Tabelle 8: Abbildungsübersicht inklusive statistischer Datenanalyse

Abb. Nr.	p-Wert	Mittelwert CD4+	KI CD4 +	Mittelwert CD8+	STD CD8+	KI CD8+	Mittelwert Treg	STD Treg	KI Treg
19	0,011	18,6 %	17,8 %	U: 8,8 % O: 28,4 %	44,6 %	30,7 %	U: 27,6 % O: 61,5 %	46,6 %	29,9 %

Tabelle 8: Abbildungsübersicht inklusive statistischer Datenanalyse

Abb. Nr.	p-Wert	Mittelwert keine GVHD	STD keine GVHD	KI keine GVHD	Mittelwert aGVHD	STD aGVHD	KI aGVHD
20	0,006	25,6 %	28,4 %	U: 9,3% O: 42,0%	73,8 %	30,7 %	U: 55,3 % O: 92,4 %
21	0,004	15,5 %	20,2 %	U: -9,5% O: 40,6%	69,2 %	37,0 %	U: 38,2 % O: 100,0 %
25	0,04	6,5	7,4	U: -1,3 O: 14,3	0,5	0,5	U: 0,1 O: 0,9
26.1	0,118	37,5 %	12,0 %	U: 24,9 % O: 50,1 %	24,7 %	16,0 %	U: 12,3 % O: 40,0 %
26.2	0,288	33,8 %	19,9 %	U: 12,9 % O: 54,7 %	19,1 %	28,0 %	U: -2,4 % O: 40,6%
26.3	0,005	43,9 %	24,0 %	U: 18,8 % O: 69,1 %	11,3 %	13,7 %	U: 0,7 % O: 21,9 %
30	0,147	39,7 %	28,7 %	U: 9,5 % O: 69,9 %	58,6 %	16,9 %	U: 44,5 % O: 72,8 %
31	0,004	33,4 %	12,7 %	U: 20,1 % O: 46,8 %	56,3 %	15,9 %	O: 41,6 % U: 71,1 %
33	0,037	28,7 %	17,4 %	U: 10,3 % O: 50,0 %	47,2 %	13,6 %	U: 36,8 % O: 57,7 %
34.1	0,122	15,4 %	7,3 %	U: 7,7 % O: 23,1 %	10,3 %	4,7 %	U: 6,7 % O: 13,9 %
34.2	0,069	55,2 %	11,7 %	U: 43,0 % O: 67,5 %	42,9 %	11,9 %	U: 33,7 % O: 52,0 %
37.1	0,001	1,07 pg/ml	0,33 pg/ml	U: 0,83 pg/ml O: 1,31 pg/ml	0,55 pg/ml	0,26 pg/ml	U:0,36 pg/ml O:0,74 pg/ml
37.2	0,025	1,17 pg/ml	0,47 pg/ml	U: 0,42 pg/ml O: 1,92 pg/ml	0,47 pg/ml	0,05 pg/ml	U:0,40 pg/ml O:0,54 pg/ml

Tabelle 8: Fortsetzung: Abbildungsübersicht inklusive statistischer Datenanalyse

Abb. Nr	p-Wert	Mittelwert CD52 ⁻	STD CD52 ⁻	KI CD52 ⁻	Mittelwert CD52 ⁺	STD CD52 ⁺	KI CD52 ⁺
28 (CD4 ⁺)	0,004	3,7 %	9,3%	U: -1,46 %	16,3 %	12,6 %	U: 9,4 % O: 23,3 %
28 (Treg)	0,001	2,4 %	3,0%	U: 0,7 % O: 4,1 %	14,8 %	12,1 %	U: 8,1 % O: 21,5 %
29	0,003	26,2 %	18,1%	U: 16,2 % O: 36,2 %	49,1 %	20,4 %	U: 37,8 % O: 60,4 %

4.2. Projekt 2

4.2.1. Interleukin-2

Statistisch auffällige Unterschiede in der Zytokinausschüttung von Immunzellen zwischen Patienten ohne und mit aGVHD konnten nur für das Interleukin-2 nachgewiesen werden. Hierbei wurden die Werte aller gemessenen Proben beider Gruppen verglichen.

Abbildung 37-1 zeigt, dass in den Serumproben der Patienten ohne GVHD höhere Interleukin-2 Level gemessen wurden als bei Patienten mit aGVHD (**p-Wert: 0,001**).

Abb. 37-1

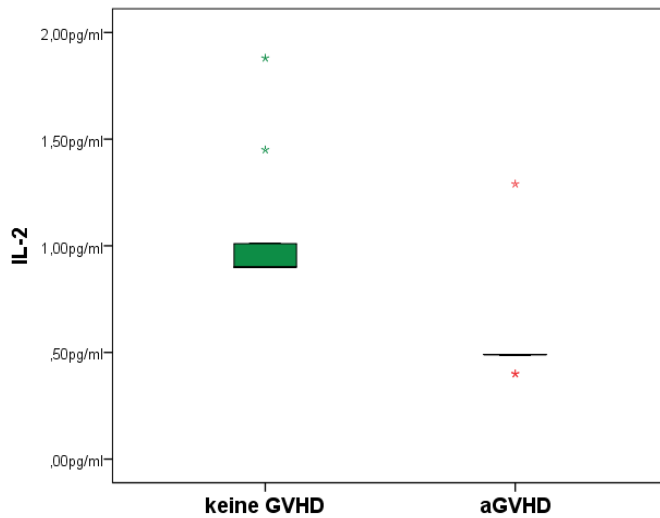


Abb. 37-2

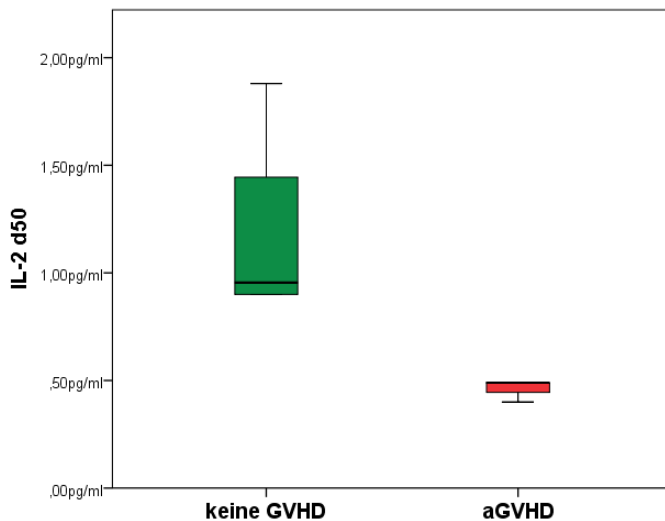


Abbildung 37: Kumulative IL-2 Level bei Patienten

37-1: Mit aGVHD und ohne GVHD (jeweils 10 Proben)

37-2: Mit aGVHD und ohne GVHD an Tag 50 nach Transplantation (jeweils 4 Proben)

Angesichts des Ziels prädiktive Marker zu finden, die möglichst früh im Krankheitsverlauf aussagekräftig bezüglich der späteren Entwicklung aGVHD sind, habe ich in diesem Versuchsansatz erneut isoliert Proben von Tag 50 nach allogener HSZT analysiert.

Auch hier konnte eine statistisch auffällige, gesteigerte Interleukin-2 Ausschüttung bei Patienten ohne GVHD im Vergleich zu denen, die aGVHD entwickeln werden gezeigt werden (**p-Wert: 0,025**) (siehe Abbildung 37-2).

Abbildung 38 veranschaulicht beispielhaft den Verlauf der Interleukin-2 Level über die Zeit im Vergleich eines Patienten ohne GVHD (Pat. 1) und eines Patienten mit aGVHD (Pat. 8) (siehe Abbildung 38). Bei letzterem sind die Interleukin-2 Werte mit unter 0,5 pg/ml konstant niedrig bzw. unterhalb der Nachweisgrenze. Pat. 1 hingegen besitzt schon an Tag 50 Interleukin-2 Level von fast 2 pg/ml, die zwar bis Tag 80 nach allogene HSZT wieder abfallen, aber immer noch über dem Wert des Patienten mit aGVHD bleiben und bis Tag 140 wieder ansteigen.

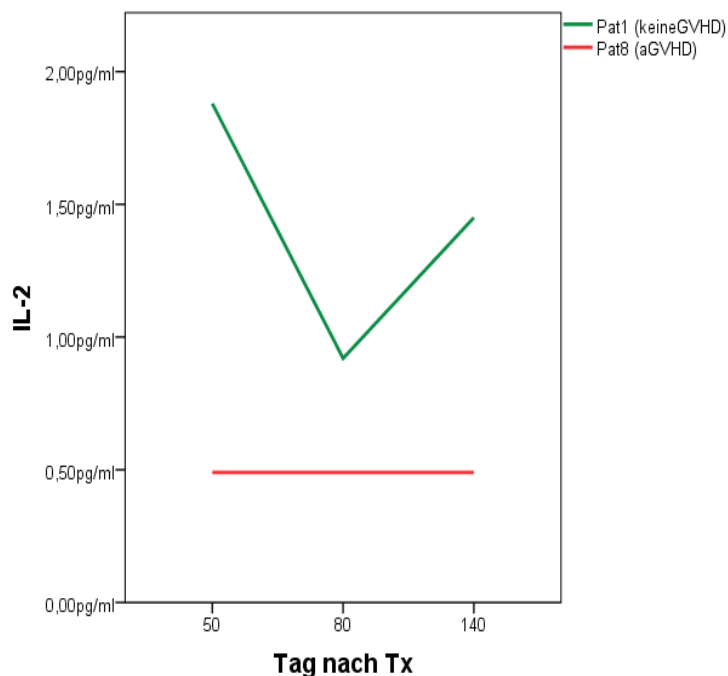


Abbildung 38: Zeitlicher Verlauf der IL-2 Level bei einem Patienten ohne aGHVD und einem mit aGVHD

4.2.2. Betrachtung weiterer Zytokine

Insgesamt wurden neben dem bereits erwähnten IL-2 zwölf weitere Zytokine untersucht. Für keines konnte ein relevanter Unterschied der Zytokinlevel zwischen den beiden Gruppen aGVHD und keine GVHD festgestellt werden. Trotzdem sind sie hier zur Vollständigkeit erwähnt und tabellarisch aufgelistet. Die mit * markierten Felder bedeuten, dass die gemessenen Werte unter der Nachweisgrenze lagen und somit nicht auswertbar sind.

Tabelle 9: Name des gemessenen Zytokins, Mittelwert, Median, Standardabweichung, 95% Konfidenzintervall und aGVHD Status

Zytokin	Mittelwert (pg/ml)	Median (pg/ml)	Standardabweichung (pg/ml)	95 % Konfidenzintervall	aGVHD Status
IL-5	12	4,8	22,6	U: -4,0 O: 28,0	nein
IL-5	22,8	3,2	49,39	U: 12,33 O: 58,13	ja
IL-13	1,3	0,44	1,85	U:-0,2 O:2,63	nein
IL-13	0,45	0,38	0,22	U: 0,29 O: 0,61	ja
IL-6	1,46	0,44	1,8	U:0,17 O: 2,74	nein
IL-6	0,57	0,49	0,25	U: 0,39 O: 0,75	ja
IL-9	11,79	3,57	16,78	U: -0,22 O: 23,80	nein
IL-9	11,18	1,87	18,27	U: -1,89 O: 24,25	ja
IL-10	11,31	8,65	6,73	U: 6,49 O: 16,12	nein
IL-10	16,65	712	24,16	U: - 0,64 O: 33,93	ja
INF- γ	18,1	11,38	19,21	U:4,35 O: 31,84	nein
INF- γ	6,69	1,24	9,9	U: - 0,40 O: 13,77	ja
TNF- α	12,51	3,13	17,24	U: 0,18 O: 24,84	nein
TNF- α	1,98	1,02	3,02	U: -0,19 O:4,14	ja
IL-17a	2,25	1,2	3,05	U: 0,06 O: 4,43	nein
IL-17a	*	*	*	*	ja
IL-17f	1,16	1,17	0,27	U:1,0 O: 1,32	nein
IL-17f	*	*	*	*	ja
IL-4	4,25	2,24	4,32	U:1,16 O: 7,34	nein
IL-4	2,35	1,15	3,8	U: - 0,37 O: 5,07	ja
IL-21	3,2	0,44	3,9	U: 0,041 O: 5,99	nein
IL-21	0,43	0,17	0,83	U: 0,16 O:01,02	ja
IL-22	66,85	21,53	124,24	U: - 22,03 O: 155,72	nein
IL-22	85,86	21,53	206,69	U: - 64,14 O: 235,87	ja

5. Diskussion

Alle Patienten des untersuchten Kollektivs haben das Gleiche, T-Zelldepletierende Konditionierungsregime erhalten. Dieses ist mit niedrigeren GVHD Raten assoziiert als nicht T-Zelldepletierende Regime. Trotzdem stellt auch hier die aGVHD eine der Hauptkomplikationen nach allogener HSZT dar (P. D. Kottaridis, 2000). In der hier untersuchten Kohorte haben neun der sechzehn beobachteten Patienten eine aGVHD entwickelt. Das verdeutlicht, wie präsent die Thematik aGVHD nach wie vor ist, und betont die Relevanz prädiktive Marker zu finden. Erkenntnisse hierüber sind der Schlüssel um effektivere Prophylaxe und Therapie der aGVHD im klinischen Alltag anwenden zu können, und so das Outcome der Patienten zu verbessern.

Um die Ergebnisse der Arbeit diskutieren zu können, sollen zuerst die methodischen Schwierigkeiten dieses Projektes betrachtet werden.

5.1. Projekt 1

5.1.1. Prospektive Analyse und daraus resultierende Fehlerquellen

Da es sich bei dieser Arbeit um eine prospektive Analyse handelt, kann vor Beginn nicht festgelegt werden wie viele Patienten im Verlauf eine aGVHD entwickeln werden und wie viele nicht. Demnach sind die Gruppen zwischen Patienten mit aGVHD (neun) und ohne GVHD (sechs) nicht gleich groß.

Erwähnenswert ist zusätzlich, dass insgesamt von „nur“ sechzehn Patienten die Immunrekonstitution nach allogener HSZT betrachtet wurde. Zur Bestätigung der erzielten Ergebnisse müssen daher gegebenenfalls noch weitere Untersuchungen folgen. Die wöchentliche, prospektive Analyse der PBMC über einen Zeitraum von 200 Tagen ist sehr zeitintensiv, weshalb die Rekrutierung größerer Patientenkollektive durchaus möglich, aber extrem aufwendig ist.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die PBMC bis zum Auftreten aGVHD oder alternativ wie bereits erwähnt bis maximal Tag 200 nach allogene HSZT untersucht wurden. Daher gibt es von manchen Patienten mehr Messungen, als von anderen. Die gemessenen Daten dieser Patienten fließen, wenn man die Mittelwerte bestimmter Marker, Zellsubpopulationen etc. betrachtet folglich verhältnismäßig stärker in die Auswertung hinein. Unter anderem deshalb wurden für auffällige

Ergebnisse exemplarisch einzelne Tage (Tag 50 und Tag 100) nach allogene HSZT isoliert untersucht.

Die Blutentnahmen fanden durchschnittlich in einwöchentlichen Abständen statt. Aus diesem Grund gibt es nicht für jeden Patienten exakt an Tag 50 oder Tag 100 einen Wert. Das erschwert die Vergleichbarkeit der einzelnen, gemessenen Werte.

Waren keine Blutproben des entsprechenden Tags vorhanden, wurde die zeitlich am Nächsten liegende analysierte Probe zur Auswertung verwendet.

5.1.2. Methodische Problematik der Messungen von Treg

Bei Treg handelt es sich wie in Abschnitt 2.1.3.3 der Literaturrecherche beschrieben um eine Untergruppe CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen. Sie wurden, wie im Material und Methodenteil ausführlich beschrieben, mittels FACS durchflusszytometrisch erfasst. Problematisch hierbei ist die Tatsache, dass es sich bei Treg um eine verhältnismäßig kleine Zellpopulation handelt. Die betrachteten Patienten, deren erste Phase nach allogene HSZT ohnehin durch eine schwere Neutropenie gekennzeichnet ist, weisen besonderes niedrige Treg Level auf. Den Patienten größere Mengen Blut zu entnehmen wäre daher ethisch nicht vertretbar und unter Umständen sogar gefährlich geworden. Zum Schutz der Patienten wurde deswegen eine Obergrenze von 100 ml Blut pro Entnahme gesetzt. Daher muss eine sehr hohe Zellzahl pro FACS Tube gemessen werden um überhaupt adäquate Mengen an Treg analysieren zu können.

Auch bei der Auswertung mit Hilfe der speziellen Computer Software FlowJO, bereitet die geringe Zahl an Treg methodische Schwierigkeiten. Sie sind definiert als CD3⁺, CD4⁺, CD52⁺, Foxp3⁺ und CD25 hoch positive Zellpopulation (siehe Abbildung 39).

In diesem konkreten Fall heißt das von den 46,6 % Lymphozyten der analysierten Probe sind 10,1 % CD3⁺ CD4⁺ Lymphozyten. Von den CD4⁺ Lymphozyten wiederum sind lediglich 0,54 % Foxp3⁺ und CD25 hoch⁺ also Treg. Durch die teils sehr geringe Zahl gewonnener Treg, ist daher auch die mittels FlowJO zu analysierende Gruppe an Treg extrem klein. Diese Tatsache muss bei der Interpretation einzelner Ergebnisse der Tregpopulationen beachtet werden. In

diesem Fall sind 26,7 % der Treg als CD52⁺ und 73,3 % der Treg als CD52⁻ definiert.

Generell ist anzumerken, dass die Auswertung der durchflusszytometrisch gemessenen Daten mittels FlowJo einer gewissen Subjektivität unterliegt. Dies liegt darin begründet, dass beim Gating auf gewisse Merkmale (hier CD3⁺, CD4⁺ CD52⁺ Foxp3 hoch positiv) keine exakt definierten Schemata vorliegen. Selbst wenn man also davon ausgeht, dass die eigenen definierten Grenzen gleich angewandt wurden, können sich die Ergebnisse bei erneuter Auswertung der exakt gleichen Probe geringfügig unterscheiden.

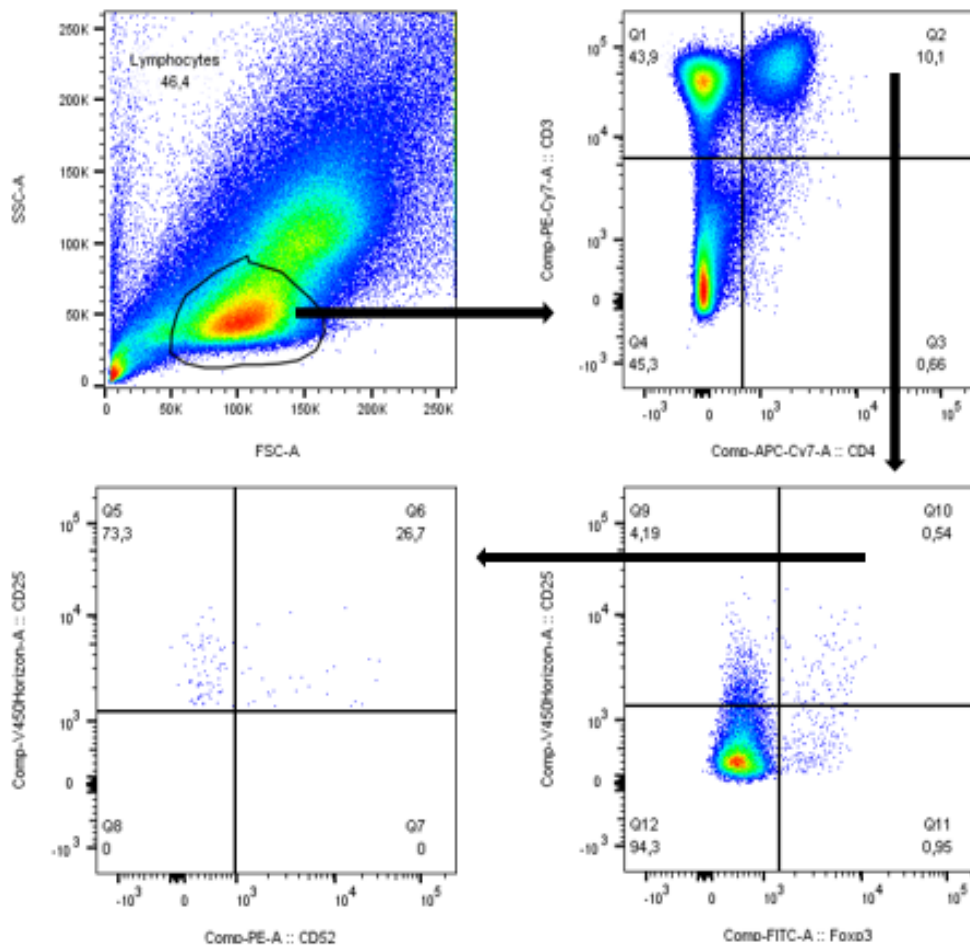


Abbildung 39: Exemplarische Darstellung der angewendeten Gatingmethode mittels Flow Jo

Insgesamt lässt sich aus den oben angeführten Argumenten folgern, dass es methodisch schwierig sein kann ausreichende Mengen an Treg zu untersuchen.

5.1.3. Weitere Einflussgrößen der Treg Funktion

Es sollte auch betrachtet werden, dass Treg als Teil unseres Immunsystems, extrem empfindlich auf äußere Faktoren reagieren. Das Spektrum dieser Einflüsse ist extrem breit. Es kann sich um direkte Komplikationen der allogene HSZT selbst handeln. Beispielsweise das Auftreten eines graft failures oder aGVHD. Ein weitere sehr häufig auftretende Komplikation nach allogene HSZT, sind bakterielle, mykotische oder virale Infektionen. Letztere meist während der späteren Phase nach Transplantation (ab Tag 100), die ersten beiden Genannten vor allem innerhalb der anfänglichen, neutropenen Phase nach allogene HSZT. Zudem müssen auch iatrogen verursachte Auswirkungen berücksichtigt werden. Dabei kann es sich sowohl um standardmäßig eingesetzte, prophylaktische Maßnahmen im Rahmen des Infektionsschutzes nach allogene HSZT handeln, als auch um therapieassoziierte Folgen wie beispielsweise hochdosierte Glucocorticoidgaben beim Auftreten aGVHD oder DLI-Gaben auf Grund gemischter T-Zellchimärismen (Rahman et al., 2019).

Zwar beschreiben einige Quellen, darunter Scotta et al., dass Glucocorticoide keinen Einfluss auf die Treg Funktion haben, trotz allem sollten alle oben genannten Faktoren bei der Beurteilung der Rolle von Treg im Zusammenhang mit allogene HSZT stets bedacht werden (Scotta et al., 2016).

5.1.4. Die Rolle der T-Zelldepletion mittels Alemtuzumab

Alle sechzehn Patienten dieser Promotionsarbeit haben das Gleiche, dosisreduzierte Konditionierungsregime bestehend aus Fludarabin, Melphalan und dem monoklonalen CD52 Antikörper Alemtuzumab (Campath) erhalten. Ziel ist es, wie im Teil 2.3.5 beschrieben, durch die T-Zelldepletion die GVHD Raten zu senken. Allerdings müssen hierfür auch Nachteile in Kauf genommen werden. Neben dem höheren Rückfall -und Infektionsrisiko wurden auch verlängerte Phasen der Immunzellrekonstitution beobachtet (Novitzky et al., 2008, Park et al., 2020). Andere Quellen bestreiten das. Loeff et al. zeigte in 2019 veröffentlichten Daten, dass die zirkulierenden Alemtuzumab Plasmalevel nicht mit der gemessenen T-Zellzahl korrelieren (Loeff et al., 2019). Inwieweit die Treg-Funktion durch den Einsatz von Alemtuzumab wirklich beeinflusst wird ist noch nicht vollständig geklärt, sollte im Hinblick T-Zellepletierter Konditionierungsregime aber immer als möglicher Störfaktor in Betracht gezogen werden.

Marsh et al. zeigten an einem Kollektiv von Patienten mit HLH, die alle allogene Stammzelltransplantiert wurden und das Gleiche, dosisreduzierte Konditionierungsregime bestehend aus Alemtuzumab, Fludarabin und Melphalan erhalten haben, dass der Zeitpunkt der Alemtuzumabgabe das Auftreten aGVHD beeinflusst. Sie beobachteten, dass bei Alemtuzumabgabe an Tag vierzehn bis Tag zehn vor allogener HSZT ein geringeres aGVHD Risiko besteht, weniger gemischte Chimärismen auftreten und seltener die Notwendigkeit von DLI Gaben oder erneuter Stammzelltransplantation besteht, verglichen zu Patienten mit früherer oder späterer Alemtuzumabgabe (Marsh et al., 2013).

Darüber hinaus gibt es mehrere klinische Studien, die eine Wirksamkeit von Alemtuzumab auch in der Therapie steroid-refraktärer aGVHD nachwies (Gomez-Almaguer et al., 2008). Dies spricht für die positive immunmodulatorische Wirkung des Antikörpers in Bezug auf aGVHD.

Mindestens genauso relevant ist die Diskussion des Einsatzes von Campath in Bezug auf das Auftreten CD52 negativer Zellen.

CD52 ist auf fast allen menschlichen Zellen vorhanden. Über 95 % der humanen Lymphozyten und Monozyten exprimieren CD52 (A.Östenbeorg, 19997). Auf hämatopoetischen Stammzellen hingegen ist es nicht zu finden. Diese Verteilung ermöglicht es überhaupt erst wie zu Beginn erklärt, den CD52 Antikörper Campath-1H zur T-Zelldepletion einzusetzen (Garland et al., 2005). Hierunter hat man beobachtet, dass CD52 negative Zellpopulationen auftreten. Diese sind beim Gesunden oder Patienten mit Campath-1H freien Konditionierungsregimen nur in einer Frequenz von kleiner 1 % der Gesamtlymphozyten zu finden (Garland et al., 2005).

Schon 1997 wurden von Östenborg et al CD52 negative T-Zellpopulationen bei CLL Patienten, die zuvor mit Alemtuzumab behandelt wurden beschrieben. Diese persistierten für mehrere Monate nach der Behandlung. Die B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten dieser Patienten hingegen wiesen keine CD52 negativen Subpopulationen auf. Die Ursache hierfür ist bis dato unklar (A.Östenbeorg, 19997). Es folgten weitere Studien, die Ähnliches beobachteten. Birhiray et al. beschrieben einen Fall, bei dem Campath zur Therapie chemotherapierefraktärer T-Zell Prolymphozytenleukämie (T-PLL) eingesetzt wurde. Hierrunter kam es bei einer Patientin sechs Wochen nach Therapiebeginn zu einem Rückfall. Es ließen sich

wieder maligne Zellen nachweisen. Besonders auffällig war dabei jedoch, dass diese nun CD52 negativ waren und zu diesem Zeitpunkt mehr als 98 % der T-Zellen CD52 negativ waren. Vor Therapiebeginn waren keine CD52 negativen Zellen gemessen worden. Das Auftreten CD52 negativer Zellsubpopulationen inklusive der malignen Leukämiezellen unter Therapie spricht dafür, dass es sich hierbei um einen Resistenzmechanismus gegenüber Campath handelt (RE Birhiray, 2002).

Eine weitere Studie, die PBMCs von 21 Patienten mit T-PLL nach Alemtuzumab getriggertem Konditionierungsregime und allogener HSZT analysiert hat, ergab, dass der Verlust der CD52 Expression mit einem Verlust des Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker einherging. Dies wiederum ließ sich auf eine bzw. mehrere Mutationen im Phosphatidyl-Inositol-Glykan-A (PIGA) Gen zurückführen. Die Daten lassen vermuten, dass die Mutationen im PIGA Gen unter Alemtuzumabtherapie erworben wurden (RE Birhiray, 2002).

Man weiß außerdem, dass Alemtuzumab nach Hochdosisgabe (100 mg) - wie in dem von mir untersuchten Kollektiv - noch bis zu 56 Tage nach allogener HSZT im Serum der Patienten nachweisbar ist und die Immunrestitution der CD4 positiven T-Zellen langsamer verläuft im Vergleich zu Patienten mit in-vitro T-Zelldepletion mit einer Dosis von 20 mg Alemtuzumab (Morris et al., 2003).

Es gilt daher in weiteren Untersuchungen die beste Dosis und den richtigen Zeitpunkt der Campath-1H Applikation in Bezug auf das Auftreten aGVHD, Rezidivraten und Komplikationen weiter zu untersuchen.

5.1.5. Cut off CD52⁻ Treg als Prädiktor für aGVHD

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, ist das Auftreten CD52 negativer Zellpopulationen ein einzigartiges Phänomen, das man unter Alemtuzumab beinhaltenden Konditionierungsregimen sieht. Woelfinger et al. zeigten, bereits, dass hohe Level CD52 negativer Zellen mit erhöhtem aGVHD Risiko einhergehen.

In meiner Promotionsarbeit konnte ich zeigen, dass speziell die Zahl CD52⁻ Treg mit dem Auftreten aGVHD korreliert.

Ich konnte hier zusätzlich zeigen, dass insbesondere die Höhe CD52⁻ Treg an Tag 50 nach Transplantation ein entscheidender Prädiktor für den weiteren klinischen Verlauf ist, da hier die Unterschiede der CD52⁻ Treg zwischen der Gruppe ohne GVHD und der Gruppe mit aGVHD besonders groß sind. Auf Grund dessen wurde

dieser Wert zur Erfassung eines Cut-offs herangezogen. Tag 50 eignet sich jedoch nicht nur wegen der statistisch besonders auffälligen Unterschiede der CD52⁻ Treg Frequenz beider Gruppen an diesem Tag, sondern insbesondere auch, da Tag 50 ein früher Zeitpunkt nach Transplantation ist. Dies ist im Rahmen des prospektiven Settings als Vorhersagewert aGVHD von herausragender Bedeutung, da so ein rechtzeitiges Eingreifen zur Verhinderung oder mindestens Linderung aGVHD gut vorstellbar ist.

Man geht davon aus, dass CD52⁻ Treg im Vergleich zu CD52⁺ Treg in ihrer Funktion eingeschränkt sind, was das vermehrte Auftreten von aGVHD in dem Patientenkollektiv mit hoher Frequenz CD52⁻ Treg erklären würde. Konkret zeigte sich, dass acht der neun Patienten mit aGVHD den Cut off von 27 % CD52⁻ Treg an Tag 50 nach allogener HSZT überschritten. Von den sechs Patienten ohne aGVHD waren es nur zwei. Beide Patienten weisen gleichzeitig niedrige T-Effektorzelllevel auf, was daraufhin deutet, dass nicht nur die absolute Zahl CD52⁻ Treg relevant ist, sondern deren relativer Anteil zu CD8⁺ Effektorzellen.

Mir ist es außerdem gelungen zu zeigen, dass der relative Anteil CD52⁻ Treg bei dem Kollektiv mit aGVHD im Verlauf bei fast allen Patienten steigt, während der Anteil CD52⁻ Treg im Kollektiv ohne GVHD bei fast allen Patienten deutlich fällt. Ein Grund hierfür könnte sein, dass CD52 als costimulatorisches Signal für Treg dient. Es unterstützt deren Suppressorfunktion und nimmt damit indirekt Einfluss auf die Entstehung von GVHD (Watanabe et al., 2006).

In Bezug auf die T-Zellfunktion nach Organtransplantation gibt es ähnliche Daten. ZhaoYetal et al. verdeutlichen in ihren Untersuchungen, dass CD52 die T-Zellfunktion modulieren kann. Und zwar über intrazelluläre Signalwege und über die Interaktion mit löslichem CD52. Die regulatorische Rolle von CD52 auf Immunzellen ist noch nicht vollständig geklärt (Zhao et al., 2017).

Insgesamt spricht die aktuelle Datenlage sehr dafür, dass CD52⁻ Treg funktionelle Defizite aufweisen und entscheidend an der Entstehung aGVHD beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde exakt diese Zellpopulation im Sinne der Prädiktion aGVHD in meiner Promotionsarbeit in den Fokus gerückt (Woelfinger et al., 2020a).

Allerdings gibt es auch einzelne Veröffentlichungen, die diese Auffassung in Frage

stellen und den Treg keinen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf aGVHD nach allogene HSZT zuschreiben (Noel et al., 2008, Loeff et al., 2019).

Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Aspekt, ist der Zusammenhang fehlender GPI Anker und CD52 Negativität. Bereits 2010 beschrieben Wagner et al., dass nach Alemtuzumab getriggertem Konditionierungsregime, T-Zellpopulationen ohne jegliche CD52 Expression rekonstituieren. Der Mechanismus der Abwesenheit dieses Membranproteins und dessen Auswirkung auf die T-Zellfunktion waren bisher noch unklar (Loeff et al., 2018). 2018 gelang es Loeff et al. an einer Kohorte von 89 Patienten, die alle auf Grund einer AML eine T-Zelldepletierte Konditionierung und anschließender allogenen HSZT erhielten, zu zeigen, dass das Fehlen von CD52 auf der Oberfläche der CD4 und CD8 positiven T-Zellen nicht auf einen Verlust der Expression des CD52 Gens zurück zu führen war, sondern auf die fehlende Expression des GPI Ankers. Dies wiederum führten sie auf multiple Mutationen im PIGA Gen zurück, das wesentlich für die GPI Anker Synthese ist (Loeff et al., 2018). Dies wirft die Frage auf, ob tatsächlich die CD52 Negativität die Funktionseinschränkung bedingt, oder ob es der fehlende GPI-Anker sein könnte. Um einer Antwort näher zu kommen, wäre es daher denkbar in weiteren Untersuchungen GPI-Anker basierte Tests durch zu führen. Hierbei sollte auch bedacht werden, dass weitere Moleküle GPI Anker gebunden sind (Ikezawa, 2002). Inwieweit GARP und ILT-3 GPI verankert sind, ist bisher unklar. Die Ergebnisse von Woelfinger et al. legen nahe, dass auch diese Moleküle GPI-Anker gebunden sind. Er zeigte, dass beide Marker fast ausschließlich auf CD52 positiven bzw. GPI-Anker positiven Zellen exprimiert werden (Woelfinger et al., 2020a).

Auch in meiner Arbeit ist die Frequenz beider Marker auf den CD52 positiven Zellen deutlich höher als den CD52 negativen.

5.1.6. Das Gleichgewicht CD8⁺ Lymphozyten und Treg im Prozess aGVHD

Die schnelle Rekonstitution CD8⁺ T-Zellen nach Transplantation ist zwar mit geringen Rezidivraten, aber mit einer hohen Zahl GVHD assoziiert (Ranti et al., 2018). CD3⁺ CD8⁺ -Zellen wird die Induktionsfähigkeit aGVHD zugeschrieben (Matte-Martone et al., 2008).

Eine Untersuchung von Khandelwal et al. an 47 pädiatrisch allogenen HSZT Patienten, deren Blut 100 Tage nach Tx regelmäßig analysiert wurde, ergab, dass die CD8⁺ T-

Zelllevel schon neun Tage vor den ersten aGVHD Symptomen deutlich erhöht waren. Diese Daten postulieren, dass die Absolutzahl CD8⁺ T-Zelllevel zur Prädiktion aGVHD heran gezogen werden könnte (Khandelwal et al., 2015). Besonders gefährlich werden hohe CD8 T-Zelllevel, wenn gleichzeitig der relative Anteil CD52⁻ Treg groß ist. Nach aktuellem Wissensstand ist eine hohe Frequenz CD52⁻ Treg besonders dann relevant, wenn gleichzeitig eine große Zahl CD8⁺ CD52⁺ T-Effektorzellen vorhanden sind. Also insbesondere dann, wenn das Gleichgewicht zwischen aggressiver Komponente, nämlich den CD8⁺ CD52⁺ Lymphozyten und protektiver Komponente durch die suppressiven CD52⁺ Treg außer Balance gerät (Hippen et al., 2020).

Eine Untersuchung von aGVHD der Leber am Mausmodell bekräftigt diese Annahme. Hier fiel bei Untersuchung des Zentralvenenblutes während aGVHD ein stark fallender T-Helferzell zu T-Effektorzellquotient auf. Vor aGVHD waren die Werte stets über eins, im Rahmen der aGVHD sank der Quotient auf unter eins (D.Leszczynski, 1985).

Hohe Zahlen CD52⁻ Treg müssen folglich nicht zwangsweise mit aGVHD korrelieren. Es gibt auch Hinweise darauf, dass hohe Treg zu T-Effektorzelllevel mit geringeren GVHD Raten korrelieren (Hippen et al., 2020, J.Heinrichs, 2016).

Dies konnte ich auch in meiner Promotionsarbeit aufzeigen. So hatten zwei der Patienten, die im Verlauf keine aGVHD entwickelt haben, zwar den Cut off von 27 % CD52⁻ Treg überschritten, aber dennoch keine aGVHD entwickelt. Auffälligerweise wiesen diese Patienten verhältnismäßig niedrige CD8⁺ CD52⁺ T-Zelllevel auf. Es lässt sich daher vermuten, dass nicht eine einzige Zellpopulation oder Dysfunktion ursächlich für die Entstehung aGVHD ist, sondern viel mehr ein Zusammenspiel verschiedenster Faktoren, das die Immunhomöostase aus dem Gleichgewicht bringt und so den komplexen Prozess der aGVHD gewähren lässt.

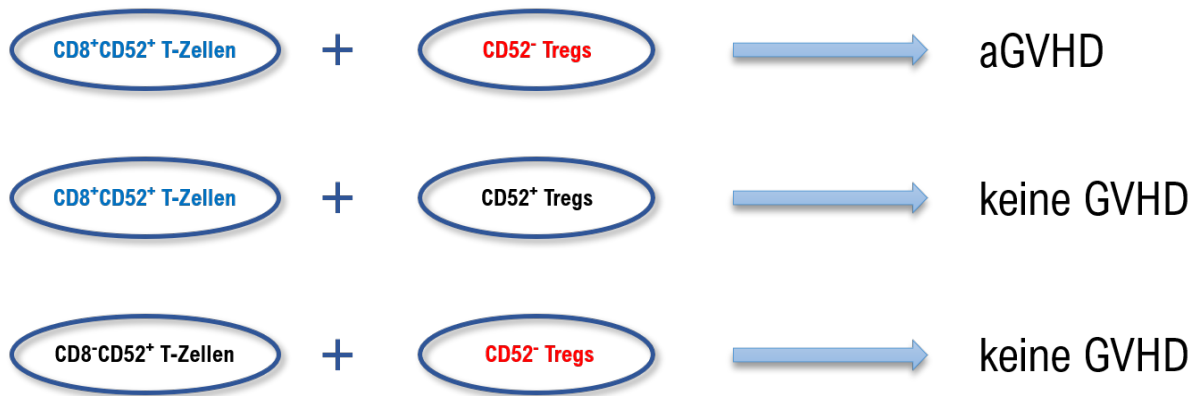


Abbildung 40: Treg im Fokus der Immunhomöostase

5.1.7. Protektiver Effekt der funktionellen Marker GARP und ILT3 auf Treg

Der T-Zellmarker GARP ist auf Treg von Patienten ohne aGVHD in größerer Zahl zu finden als bei Patienten mit aGVHD. Das konnten schon Wölfinger et al. in seiner Promotionsschrift zeigen und wurde hier bestätigt (Woelfinger et al., 2020a).

Außerdem konnte ich zeigen, dass die GARP Frequenz auf CD52⁺ Treg höher ist als auf CD52⁻ Treg. Diese Beobachtung deckt sich mit der Annahme, dass CD52⁻ Treg funktionelle Defizite aufweisen und mit der Entstehung aGVHD korrelieren (vgl. Abschnitt 5.1.5).

GARP ist die Abkürzung für Glykoprotein A repetitions predominant, ein Transmembranrezeptor, dessen extrazelluläre Domäne aus zahlreichen Leucin Repeats besteht. Er gehört zur großen Gruppe der Toll-like receptor (TLR) (Shevach, 2017). Interessanterweise ist GARP fast ausschließlich auf aktivierten Treg zu finden (Battaglia and Roncarolo, 2009).

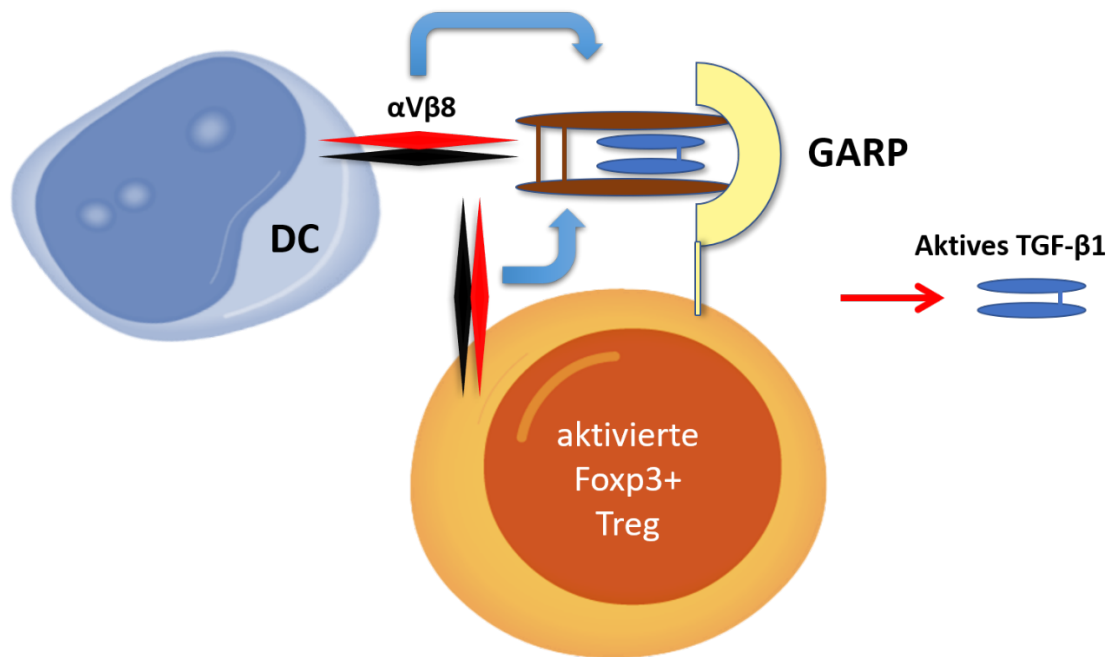


Abbildung 41: GARP und dessen Einfluss auf Treg modifiziert nach Shevach (Shevach, 2017)

Insgesamt wird GARP ein unterstützender Effekt auf die Treg Supressor Funktion zugeschrieben (Edwards et al., 2013).

Die protektiven Effekte von GARP im Hinblick auf aGVHD könnten darin begründet liegen, dass GARP latentes TGF-beta bindet und in seine aktive Form umwandelt (Wang et al., 2012). TGF-beta wiederum induziert die Foxp3 Expression in humanen T-Zellen und gilt daher als wichtiger Tregaktivator. Die wichtigsten Schritte sind in Abbildung 41 dargestellt. Die GARP Expression korreliert positiv mit den Foxp3 Leveln der Treg. Deshalb ist nahe liegend, dass Foxp3 die GARP Expression reguliert. Es gibt Quellen, die zeigen, dass der Verlust von Foxp3 auch zum Verlust der GARP Expression führt (Wang, 2009). Andere Quellen betonen das genau sei nicht der Fall. Sie widerlegen, dass das knock-out von Foxp3 auch die GARP Expression verringert (Shevach, 2017). Inwieweit GRAP also wirklich mit Foxp3 und Treg korreliert ist noch kontrovers.

ILT3 steht für Immunglobuline-like transcript 3. Wie der Name vermuten lässt, handelt es sich um einen Membranrezeptor, der zur Gruppe der Immunglobuline gehört. Er wird selektiv auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und vermittelt mit seiner zytoplasmatischen Tyrosinkomponente inhibitorische Signale (Cella et al.,

1997). ILT-3 ist ein Proteinkinase 2 kontrolliertes Protein, das auf die Treg Funktion Einfluss nehmen kann (Ulges et al., 2015). Dem Protein wird eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz zu geschrieben, indem es autoreaktive Prozesse unterbindet. Der ursächliche Mechanismus hierfür ist noch nicht abschließend geklärt. Einerseits konnten direkte, inhibitorische Prozesse des Rezeptors selbst festgestellt werden. Beispielsweise korreliert die Höhe der ILT3 Expression mit dem zirkulierenden Level inhibitorischer Zytokine. Andererseits existieren Daten, die belegen, dass rekombinantes ILT3 die Fähigkeit besitzt CD8⁺ T-Zellen in Foxp3⁺ Treg um zu wandeln (Vlad et al., 2009)

Auch im Mausmodell konnte für ILT3 eine wichtige Rolle an der Aufrechterhaltung von Immuntoleranz gezeigt werden, indem es die Ausdifferenzierung von T-Helferzellen zu Treg induziert. Ähnlich wie bei GARP korreliert auch die ILT3 Frequenz der Treg positiv mit der Foxp3 Expression (A. Moravej, 2016).

Interessanterweise zeigten Untersuchungen nach Nierentransplantation, dass Patienten deren dendritischen Zellen hohe ILT3 Level aufweisen auch gleichzeitig hohe Zahlen CD4⁺CD25⁺ Treg besitzen (Benito et al., 2008). Dies bekräftigt die Annahme, dass ILT3 in der Lage ist die T-Zelldifferenzierung zu beeinflussen. Dieser Aspekt ist angesichts der sich hieraus eventuell ergebenden therapeutischen Möglichkeiten von besonders großem Interesse (Ulges et al., 2015).

Eine weitere Gemeinsamkeit mit GARP besteht in der höheren ILT3 Frequenz auf CD52⁺ Treg als auf CD52⁻Treg. Gleiches gilt für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Auch hier wird ILT3 jeweils stärker von der CD52⁺ Subpopulation exprimiert.

Signifikante Unterschiede der ILT3 Expression innerhalb der beiden Gruppen aGVHD und keine GVHD konnten im Gegensatz zu GARP in meinem Patientenkollektiv nicht beobachtet werden.

Trotz der insgesamt inhibitorischen Komponente werden in der Literatur hohe ILT3 Level mit höheren GVHD Raten assoziiert (Ulges et al., 2015).

Ähnliche Zusammenhänge wurden bei der Untersuchung von Patienten mit Allergien festgestellt. Hier fand man im Blut derjenigen mit Allergien höhere Level ILT3⁺ Treg als bei denjenigen ohne. Dies führen die Autoren auf eine Unfähigkeit der Unterdrückung Th2 Zell getriggelter Immunantwort zurück, wenn gleichzeitig hohe ILT3⁺ Treg Level vorliegen (Ulges et al., 2015). Ein vergleichbares Phänomen wäre

auch bei der Entstehung aGVHD vorstellbar und könnte möglicherweise die höhere Frequenz ILT3⁺ Treg bei Patienten mit aGVHD erklären.

5.1.8. NK-Zellrekonstitution im Zusammenhang mit aGVHD

Vor der Diskussion der Ergebnisse der NK-Zellanalysen im Zusammenhang mit aGVHD sollte erwähnt werden, dass es sich zwar auf den ersten Blick bei NK-Zellen und Treg um zwei vollkommen verschiedene Zellsubpopulationen handelt, man heute aber weiß, dass sich auch diese beiden Zellpopulationen wechselseitig beeinflussen. So besitzen NK-Zellen beispielsweise einen spezifischen Zellrezeptor, über den sie mit Treg interagieren können (Negrin, 2019).

Wie im Ergebnisteil gezeigt, rekonstituieren die NK-Zellen von Patienten mit aGVHD interessanterweise schneller als von Patienten ohne GVHD. Daraus lässt sich die vermuten, dass die NK-Zellen von Patienten mit aGVHD zwar schneller heranwachsen, allerdings funktionelle Defizite aufweisen. Es ist also nicht nur die Schnelligkeit der Rekonstitution und die absolute Zellzahl, sondern auch deren Funktionalität von entscheidender Bedeutung (Zaghi et al., 2019).

Einschränkungen in der NK-Zellrekonstitution bei Patienten mit GVHD konnten auch schon Hill et al. nachweisen, allerdings war hier auch die Gesamtzahl der NK-Zellen bei Patienten mit GVHD vermindert (Bunting et al., 2017). Der relative Anteil an NK-Zellen war bei meinem Patientenkollektiv mit aGVHD sogar höher als bei denjenigen ohne GVHD. Eine Erklärung hierfür könnte eventuell das T-Zelldepletierte Konditionierungsregime sein (Zaghi et al., 2019). Zusätzlich sei erwähnt, dass einige Autoren die Meinung vertreten, NK-Zellen beeinflussen lediglich den GVL Effekt und besitzen keinen Einfluss auf GVHD (Ullrich et al., 2016, Baumeister et al., 2020).

5.1.9. NK-Zellsubpopulationen CD56dim

Betrachtet man die beiden NK-Zellsubpopulationen CD56dim und CD56bright isoliert, so fällt besonders der hohe relative Anteil CD56dim NK-Zellen bei Patienten mit aGVHD im Vergleich zu den Patienten ohne GVHD auf. In der Literatur war bisher vor allem beschrieben, dass niedrige Zahlen CD56bright NK-Zellen innerhalb der ersten zwei Monate nach allogene HSZT mit aGVHD assoziiert sind. Hierbei korreliert der relative Anteil CD56bright NK-Zellen sogar direkt mit der Schwere aGVHD (Zaghi et al., 2019, Ullrich et al., 2016).

5.1.10. Die Rolle von TIGIT auf CD56dim NK-Zellen im Hinblick auf aGVHD

T-Zell Immunglobulin und ITIM Domäne (TIGIT) ist ein Marker, der sich auch auf anderen Zellpopulationen außer NK-Zellen befindet. Er wird heute als Immuncheckpointinhibitor ähnlich CTLA-4 und PD-1 angesehen.

Es gibt Hinweise darauf, dass TIGIT auf NK-Zellen und T-Effektorzellen hemmende Effekte besitzt, während Treg aktiviert werden (Stojanovic al., 2018). Die inhibitorische Wirkung von TIGIT entsteht über dessen Bindung mit seinem Liganden, dem CD155 Molekül auf dendritischen Zellen. Hierdurch kommt es zu einer Induktion der IL-10 Ausschüttung und eine Hemmung der IL-12 Produktion, sodass Th1 vermittelte Signale unterdrückt werden (Joller et al., 2014).

Auch konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die TIGIT-Blockade das Tumorwachstum hemmt, was in Zukunft einen neuen therapeutischen Ansatz im Rahmen von Tumorbekämpfung darstellen könnte. Besonders erfolgsversprechend scheint dabei die kombinierte Blockade von TIGIT und anderen Immuncheckpointinhibitoren zu sein, da hier synergistische Effekte erzielt werden konnten (Stojanovic al., 2018).

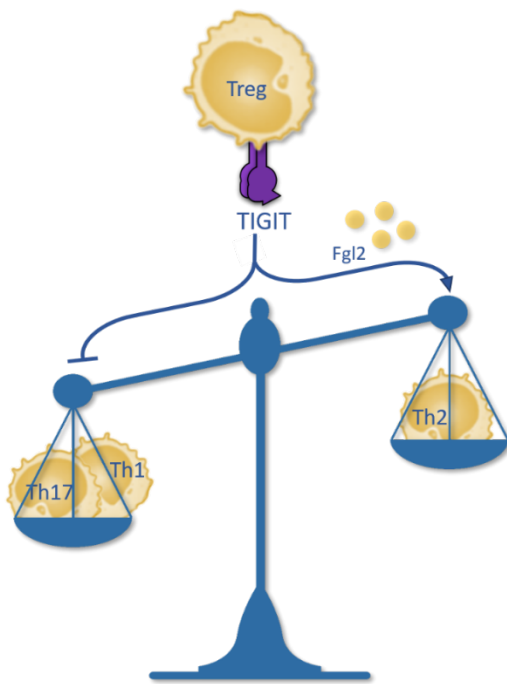


Abbildung 42: TIGIT und dessen Einfluss auf Treg modifiziert nach Anderson (Anderson et al., 2016)

Allgemein wird den Immuncheckpoint Inhibitoren wie TIGIT eine wichtige Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben, indem deren Aktivierung zur Hemmung autoreaktiver T-Zellen führt und so Immuntoleranz fördert. TIGIT defiziente Mäuse zeigen höhere Level proinflammatorischer Zytokine und spontane autoimmun Enzephalomyelitis.

In Bezug auf das Auftreten von GVHD konnten für TIGIT protektive Effekte nachgewiesen werden. TIGIT ist ein direktes Zielgen von Foxp3. TIGIT+ Treg weisen nicht nur besonders gute Suppressorfunktion in Bezug auf T-Effektorzellen auf, sondern führen auch zu einem Schift deren T-Helferzellantwort von Th1 und Th17 hin zu einer Th2 ähnlichen, IL-10 dominierten, wodurch proinflammatorische Signale wie in der Pathogenese der aGVHD unterdrückt werden (Anderson et al., 2016) (Joller et al., 2014).

Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen meiner Promotionsarbeit. So konnte ich zeigen, dass TIGIT sich insbesondere auf CD56dim NK-Zellen befindet und zwar in höherer Frequenz auf den NK-Zellen der Patienten ohne GVHD als bei den Patienten mit aGVHD. Das spricht für den insgesamt protektiven Einfluss hoher TIGIT Expression in Bezug auf aGVHD.

Für die TIGIT Expression auf CD4 positiven und CD8 positiven Lymphozyten insgesamt und Treg konnte ich keinen Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne aGVHD feststellen. Gleiches gilt für die Betrachtung der TIGIT Expression CD52 positiver und CD52 negativer Zellen. Dies gilt es in Zukunft an einem größeren Patientenkollektiv zu untersuchen.

Insgesamt deuten die erzielten Ergebnisse darauf hin, dass der relative Anteil an CD52 negativen Treg für die Prädiktion aGVHD geeignet ist. Sie decken sich mit dem aktuellen Kenntnisstand der Forschung, wonach Treg eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese aGVHD einnehmen, jedoch wird ebenso deutlich, dass es ein komplexer Prozess ist, an dem weitere Immunzellen wie Tc-Zellen, NK-Zellen und regulatorische Mechanismen beteiligt sind. Hinzu kommt, dass Treg Dysfunktionen kein pathognomisches Phänomen aGVHD sind, sondern in verschiedensten hyperinflammatorischen Prozessen wie beispielsweise allergischen Reaktionen und Viruserkrankungen wie Covid-19 beobachtet werden (Zheng et al., 2020, Boonpiyathad et al., 2020).

Nicht zu Letzt deshalb habe ich mich in meinem zweiten Teil der Arbeit mit Inflammationsmarkern wie TNF α und verschiedensten Interleukinen als Prädiktoren aGVHD beschäftigt.

5.2. Projekt 2

5.2.1. Methodische Probleme des Zytokinpanels

Vorab ein paar Worte zur Entstehung dieses Projektes. Es gibt aktuelle Daten, die Zytokinanalysen von Patienten nach allogene HSZT eine vielversprechende Möglichkeit zur Vorhersage der Schwere und Therapie assoziierter Mortalität aGVHD zuschreiben (Leotta et al., 2019). Es gibt bereits Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass sich bestimmte Zytokinlevel von Patienten nach allogener HSZT unterscheiden, je nachdem ob sie im Verlauf eine aGVHD entwickeln oder nicht (C. Zhang, 2017). Seguy et al. zeigten an einem Patientenkollektiv in Helsinki, dass hohe IL-10 Level nach allogener HSZT einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten aGVHD darstellen (Hueso et al., 2017).

Da der Fokus meiner Fragestellung auf der Erfassung prädiktiver Marker in Bezug auf aGVHD liegt, habe auch ich mich mit der Untersuchung verschiedenster Zytokine in Serumproben von Patienten nach allogene HSZT beschäftigt.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnten außer für IL-2 bei diesem Projekt keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden. Daher vorab ein paar Worte zu möglichen Defiziten dieses Versuchs. Es lag ein großer Teil der Messergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze, obwohl die Standardkurven gelungen sind. Auf Grund der teils sehr niedrigen Messergebnisse, ist es kaum möglich zu definieren ab wann ein Wert wirklich als positiv zu deuten ist, und wenn ja, ab wann dies tatsächlich von klinischer Relevanz ist.

Außerdem ist auch in diesem Projekt die Zahl der untersuchten Patienten mit insgesamt neun, von denen fünf keine GVHD haben und vier im Verlauf eine aGVHD entwickeln, klein. Insofern sind auch hier zur Bestätigung der erzielten Ergebnisse weitere Tests an einem größeren Kollektiv nötig.

Trotz dieser methodischen Schwierigkeiten gelang es mir für die IL-2 Level einen relevanten Unterschied zwischen der Gruppe mit aGVHD und ohne GVHD fest zu stellen.

5.2.2. IL-2 als Induktor der Treg Aktivierung und damit antiinflammatorisches Signal

In dieser Promotionsschrift konnte ich an einer kleinen Stichprobe zeigen, dass IL-2 bei Patienten ohne GVHD in größeren Mengen vorhanden ist als bei Patienten mit aGVHD. Dies spricht dafür, dass IL-2 auch im Rahmen der Entstehung von aGVHD einen protektiven Einfluss hat. Zu diesem Effekt trägt ähnlich den Prozessen, die bei Autoimmunität eine Rolle spielen, wahrscheinlich die Aktivierung und Proliferation schützender Treg bei (Ogonek et al., 2016).

In Studien konnte gezeigt werden, dass Treg, die vorab mit IL-2 stimuliert wurden, eine bessere Suppressorfunktion aufweisen. Es ist bekannt, dass IL-2 über die Interaktion mit dem IL-2 Rezeptor der Treg deren Proliferation anregt und so eine wichtige Funktion in der Unterdrückung autoimmuner Prozesse einnimmt (Copsel et al., 2018) (Matsuoka, 2018). Im Rahmen klinischer Studien macht man sich diese Erkenntnisse zu Nutze. Sowohl zur Prophylaxe von GVHD als auch zur Therapie

steroidrefraktärer cGVHD wird hier IL-2 subkutan eingesetzt. Erste Ergebnisse sind vielversprechend. Nicht nur die zirkulierenden Treglevel steigen nach IL-2 Gabe, sondern auch die Raten cGVHD sind in der IL-2 behandelten Gruppe signifikant niedriger.

Abbildung 43 verdeutlicht die positiven Effekte der IL-2 Gabe in den unterschiedlichen Phasen der Immunrestitution auf Treg, jeweils in blau gekennzeichnet.

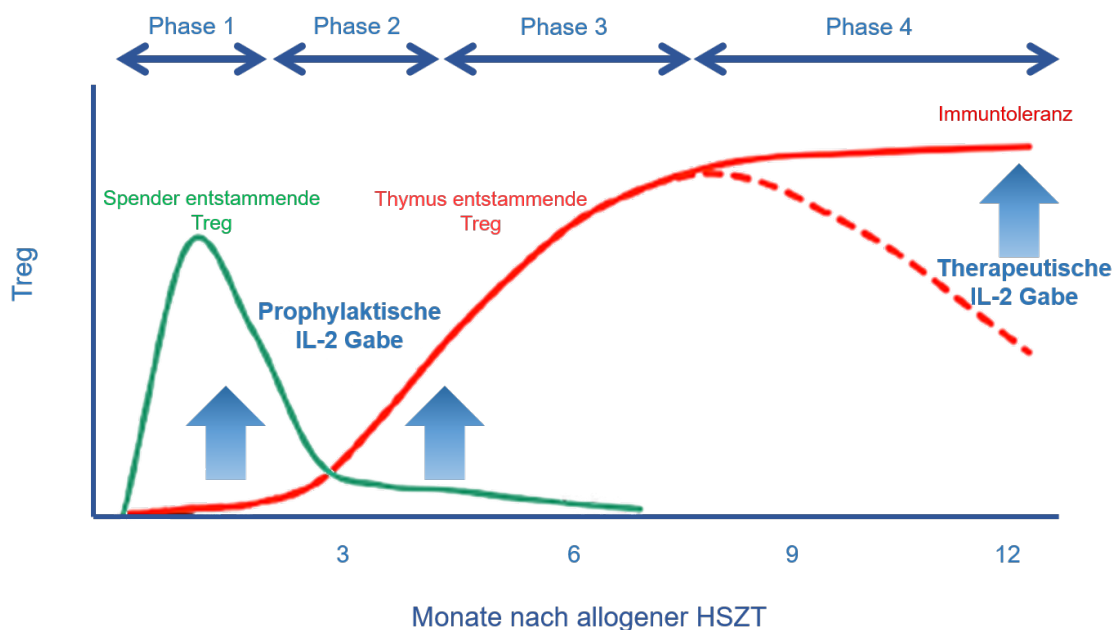


Abbildung 43: IL-2 und die Beeinflussung der Treg Funktion modifiziert nach Matsuoka (Matsuoka, 2018)

Insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeit prophylaktischer IL-2 Gabe in Form von unkomplizierter, subkutan Applikation scheinen die Ergebnisse der bisherigen klinischen Studien erfolgsversprechend. Nichts desto trotz sind auch hier mögliche negative Effekte zu bedenken. So wurde beispielsweise in einer Studie ein Anstieg minimal residueller Krankheit (MRD) bei Patienten nach prophylaktischer IL-2 Gabe verzeichnet (Matsuoka, 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zytokinanalyse allen voran IL-2, durchaus Potential für die Prädiktion aGVHD mit sich bringt. Allerdings wird es in

Zukunft nötig sein weitere Tests durchzuführen um IL-2 im klinischen Setting erfolgreich anwenden zu können. Beispielsweise bleibt bisher unklar, wann, wie häufig und in welcher Dosis die IL-2 Gabe nach allogene HSZT erfolgen soll. Zudem weißt die Immunrestitution große interindividuelle Unterschiede auf, sodass es gegebenenfalls gar nicht möglich sein wird ein einheitliches Konzept zu entwickeln, sondern viel mehr für jeden Patienten ein individualisiertes Schema erstellt werden muss.

5.2.3. HHV-6 und das Zytokinprofil nach allogener HSZT

Interessant ist der Zusammenhang zwischen Anwesenheit von iciHHV-6 (inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6) und dem Zytokinprofil bei Patienten nach allogener HSZT. Hill et al. zeigten, dass die Patienten mit iciHHV-6 häufiger schwere Formen aGVHD entwickeln als Patienten ohne iciHHV-6. HHV-6 Reaktivierung ist ein häufiges Phänomen. Es wird in 30-50 % der Fälle nach allogener HSZT beobachtet und ist ein Risikofaktor für das Auftreten aGVHD, Zytopenien, CMV-Reaktivierung und mit einer höheren Mortalität nach allogener HSZT assoziiert. Patienten mit iciHHV-6 weisen deutlich höhere Zytokinlevel auf als diejenigen ohne. Das Auftreten aGVHD wiederum ist als hochinflammatorischer Prozess mit höheren Zytokinleveln assoziiert. Dies liegt darin begründet, dass es sich hierbei um einen Entzündungsprozess handelt, der mit der Aktivierung verschiedenster Zellen einhergeht. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass die erhöhten Zytokinlevel bei Patienten mit iciHHV6 zum Auftreten aGVHD beitragen (Weschke et al., 2020).

Untersuchungen wie diese zeigen, warum Zytokine, die als Entzündungsmediatoren in der Pathogenese aGVHD fungieren, auch als Biomarker aGVHD verstärkt in den Fokus rücken.

Zytokine sind jedoch nicht nur im Sinne prädiktiver Marker für die Diagnostik aGVHD relevant, sondern auch Angriffspunkt in der Therapie. So konnten mittels Tocilizumab, einem Antikörper gegen IL-6 in Phase 1 und 2 Studien, vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung aGVHD gezeigt werden (G. R. Hill, 2020) .

5.2.4. TNF-alpha (TNF α) und die Prädiktion aGVHD

Zwar konnte ich in meinem Kollektiv keine Unterschiede der TNF α Level zwischen Patienten mit und ohne aGVHD feststellen, jedoch gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass TNF α ein Zytokin, das sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form existiert, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese aGVHD spielt. Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Sekretion löslichen TNF α mit niedrigeren aGVHD Raten bei erhaltenem Graft-versus-Tumor Effekt korreliert (Borsotti et al., 2007).

Interessant sind auch Daten einer klinischen Studie, die im Serum allogentstammzelltransplantierte Patienten die vier Zytokine IL-2, TNF α , IL-10 und IL-8 in Bezug auf aGVHD untersuchte. Hier zeigten sich für IL-2 und TNF α signifikant höhere Level bei den Patienten mit aGVHD als ohne aGVHD. Auch korrelieren die gemessenen Serumwerte dieser beiden Zytokine mit der Schwere aGVHD (Wang et al., 2006). Diese Erkenntnisse könnten zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze der aGVHD Behandlung beitragen.

5.2.5. Soluble STimulation-2 s (sST2) als erfolgsversprechender Biomarker

sST2 ist der nach aktuellem Forschungsstand der am besten validierte Biomarker im Zusammenhang mit aGVHD. Sein bisher einziger bekannter Ligand ist IL-33. sST2 existiert als membranständige (mST2) und lösliche Form (sST2). Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Blockade des sST2 Rezeptors mittels monoklonalem IgG Antikörper an Tag -1 bis +9 nach allogener HSZT zu geringeren aGVHD Raten und besserem Gesamtüberleben führte. Die messbaren IFN γ , IL-17 und IL-23 Level im Plasma waren gesunken, während die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 erhöht war. Zudem zeigte sich, dass die Th17 Zellen, denen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese aGVHD zugeschrieben wird, zu den Hauptproduzenten des sST2 gehören. Folglich wäre die gezielte sST2 Blockade ein neuer Ansatz in der aGVHD Prophylaxe (Zhang et al., 2015).

5.2.6. Einflussfaktoren auf das Zytokinmuster

Warum es in meinem Forschungsprojekt lediglich für eines der analysierten Zytokine gelang einen wesentlichen Unterschied zwischen beiden Gruppen darzustellen, kann

an weiteren Störfaktoren liegen, die neben den bereits oben genannten Punkten ebenfalls Zytokine direkt beeinflussen. Darunter fallen beispielsweise Glucocorticoide (GC), die zur Therapie inflammatorischer Prozesse wie der aGVHD eingesetzt werden. In Studien konnte gezeigt werden, dass GC zur Aktivierung antiinflammatorischer Gene, wie dem Glucocorticoid induced leucine zipper (GILZ) Gen führen. Dies führt zu einer Hemmung der Th1 vermittelten proinflammatorischen Prozesse und stattdessen zu einer Induktion Th2 und Treg vermittelter Signalwege. Auf Grund dessen finden GC Präparate breiten klinischen Einsatz in der Therapie entzündlicher Prozesse wie beispielsweise der Psoriasis, M. Crohn, Asthma bronchiale aber auch der aGVHD (Sevilla and Perez, 2019). Einige der analysierten Proben stammen von Patienten, die im Rahmen ihrer aGVHD mit systemischen GC behandelt wurden. In Bezug auf das durchgeführte Projekt 2 kann dies zu einem durch die immunsuppressive Wirkung der GC manipuliertem Abbild der Zytokinmuster aGVHD Patienten beigetragen haben.

An dieser Stelle sollte außerdem erwähnt werden, dass pro- und antiinflammatorische Zytokine als Mediatoren vieler Immunprozesse auch bei gesunden Probanden dynamischen Schwankungen unterliegen. Hinzu kommt, dass allein das „Transplantatanwachsen“/ Engraftment zur Veränderung des Zytokinmusters beitragen kann, unabhängig vom Auftreten aGVHD. Auch ist es schwierig den richtigen Zeitpunkt der Messung des jeweiligen Zytokins zu erfassen, da sie möglicherweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Pathogenese aGVHD ihr Maximum erreichen. Es ist durchaus denkbar, dass dieses bei einigen Patienten vor dem klinischen Ausbruch der aGVHD liegt, während es bei anderen mit dem klinischen Maximum aGVHD korreliert (Khandelwal et al., 2016).

Insgesamt reagieren Zytokine sehr empfindlich auf verschiedenste Einflüsse, weshalb die Zytokinlevel starken Schwankungen unterliegen (C. Zhang, 2017). Dies wird maßgeblich dazu beigetragen haben, dass es für den Großteil der untersuchten Zytokine nicht gelungen ist, einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf zu zeigen. Auf Grund der insgesamt niedrigen Messwerte ist es für IL-2 im Gegensatz zu den CD52 negativen Tregs nicht sinnvoll einen spezifischen cut-off zu bestimmen, der das Auftreten aGVHD vorhersagt.

Aus diesen Erkenntnissen und den bisherigen Daten zu Zytokinen in Zusammenhang mit aGVHD, lässt sich schließen, dass sie zur Prädiktion aGVHD

weniger geeignet sind. Es wird daher in Zukunft nötig sein weitere Kandidaten zu testen, die der Vorhersage aGVHD dienen können. Es gibt daher auch Ansätze die weg von messbaren, serologischen Biomarkern wie Zytokinen hin zu klinischen Parametern als Prädiktoren aGVHD gehen. Tang et al zeigten an einer Studie der Universität Michigan, dass das engmaschige Monitoring der Vitalparameter und deren Verlaufsbeobachtung es ermöglicht Risikopatienten aGVHD vor Symptombeginn zu

5.3. Klinische Relevanz und Ausblick

In meiner Promotionsarbeit konnte ich zeigen, dass die Level CD52⁻ Treg bei Patienten mit T-Zelldepletiertem Konditionierungsregim mit dem Auftreten aGVHD korrelieren und zwar schon früh nach allogener HSZT. Genauer gesagt ergab sich bei der Analyse des relativen Anteils CD52⁻ Treg an Tag 50 nach Transplantation ein Cut off von 27 % CD52⁻ Treg, ab dem die Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit eine aGVHD entwickeln werden. In dem untersuchten Patientenkollektiv überschritten acht der neun Patienten, die im Verlauf eine aGVHD entwickelt haben, und zwei der sechs Patienten ohne aGVHD diesen Wert.

Daher ist es klinisch durchaus relevant die Frequenz CD52⁻ Treg von Patienten nach allogene HSZT möglichst früh und in regelmäßigen Abständen zu bestimmen. Ziel ist es durch das frühzeitige Erfassen prädiktiver Marker -wie den CD52⁻ Treg- schon vor Entstehung des Prozesses eingreifen zu können und damit das Auftreten aGVHD optimalerweise sogar zu verhindern.

Denkbar wäre dies im Rahmen eines Immunmonitoring Konzeptes, das die Patienten nach allogene HSZT in regelmäßigen Zeiträumen überwacht und bei steigenden Leveln an CD52⁻ Treg die Möglichkeit bietet, entsprechende therapeutische Maßnahmen einzuleiten. Im Rahmen von zunehmend personalisierter Medizin - als Beispiel sei hier die genetische Analyse von Tumorgewebe genannt - sind solche individualisierten Therapiekonzepte in Zukunft durchaus denkbar.

Welche Therapiemöglichkeiten sich daraus ergeben, ist sicherlich in weiteren Projekten zu untersuchen.

Ein Ansatz könnte die längere Einnahme bzw. Dosissteigerung der immunsuppressiven Therapie sein, die bei einem komplikationslosen Verlauf zwischen Tag 60 und 100 nach allogene HSZT langsam ausgeschlichen wird.

Besonders erwähnenswert ist hier der Einsatz der Calcineurininhibitoren Cyclosporin und Tacrolimus, da sie spezifisch die T-Zellaktivierung hemmen und sowohl oral als auch parenteral zur GVHD Prophylaxe eingesetzt werden können (Carnevale-Schianca et al., 2009).

Auch denkbar wäre die prophylaktische Applikation von Donor Lymphozyten Infusionen (DLI). DLI finden im aktuellen klinischen Alltag bereits Verwendung, allerdings hauptsächlich therapeutisch bei gemischten T-Zellchimerismen, was auf eine drohende Transplantatabstoßung hinweist (Sterling and Webster, 2020) und weniger prophylaktisch im Rahmen aGVHD Prävention. Ein Hauptproblem der DLI-Gaben im klinischen Alltag stellt nämlich das nach Verabreichung von DLI erhöhte GVHD Risiko dar (Sterling and Webster, 2020). Demgegenüber stehen Erkenntnisse, die vermuten lassen, dass DLI die bestehende Imbalance der Immunhomöostase im Rahmen aGVHD Prozesse wieder ins Gleichgewicht bringen (Meyer et al., 2010). Erste Studien zur prophylaktischen DLI-Gabe nach Alemtuzumab basiertem Konditionierungsregime gab es schon 2009. Hier konnte gezeigt werden, dass CD8 depletierte DLI Präparate zu weniger GVHD führen als unmanipulierte Präparate bei erhaltenem GVL Effekt (Meyer et al., 2010). Daher wäre beispielsweise der Einsatz solcher gezielt manipulierten Präparate denkbar. Zur entsprechenden Risikoabwägung sind zusätzliche klinische Studien nötig, die weitere Bedingungen wie Dosis und Zeitpunkt der Applikation erproben.

Eine andere Option stellt der gezielte Transfer funktionsfähiger Treg dar. Zum Beispiel nach vorheriger Kultivierung mittels Treg stimulierender Faktoren wie GM – CSF oder Ähnlichen, die die Treg Proliferation induzieren. Aktuelle Daten hierzu wurden 2020 von Edinger et al. publiziert. Der Forschungsgruppe ist es gelungen murine aGVHD mittels in-vitro kultivierter Treg zu behandeln (Riegel et al., 2020). Ähnliche Ansätze mit dem Einsatz induzierbarer Treg in präklinischen Tests inklusive der daraus entstehenden Herausforderungen beschrieb Heinrichs schon 2016. Ein zukünftiger Ansatzpunkt zur Überwindung der Kultivierungsprobleme könnten genetisch veränderte Treg sein, die hohe Proliferationsraten aufweisen (J.Heinrichs, 2016).

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es mehr als 10 klinische Studien, die Treg im klinischen Alltag anwenden. Sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch. Erprobt werden muss noch die Dosis, sowie der genaue Zeitpunkt der Treg Infusion. So ist bisher

noch unklar ob Treg besser geeignet sind GVHD zu verhindern, oder ob sie erst zur Behandlung von GVHD eingesetzt werden sollen (Zahid et al., 2020).

Für andere untersuchte Marker wie GARP konnte ich zeigen, dass sie die Treg Funktion unterstützen. Es wäre daher durchaus eine Herangehensweise CD52⁺ Treg mit hoher GARP Expression zu kultivieren und zu transferieren. Ähnlich der DLI, aber als Infusion besonders funktionsfähiger Treg. Inwieweit solche Verfahren in naher Zukunft möglich sind, ist zum jetzigen Zeitpunkt fraglich, da diese Vorgehensweise im Vergleich zu den oben beschriebenen Ansätzen, der Immunsuppression und DLI oder Treg Gabe, größere methodische Schwierigkeiten birgt und breite klinische Erfahrung in der Transfusion von Treg bisher fehlt.

Abschließend sollte noch der Einsatz der Januskinaseinhibitoren Ruxolitinib und Basiliximab erwähnt werden.

Bei Ruxolitinib handelt es sich um einen selektiven Inhibitor der Januskinase 1 und 2, der in der Therapie Glucocorticoid refraktärer aGVHD Anwendung findet. Die Patienten, die Ruxolitinib erhalten haben, zeigten bessere Failure free survival und weniger Verlust der Therapieantwort im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings sind bei der Ruxolitinib behandelte Gruppe vermehrt Komplikationen, insbesondere Zytopenien aufgetreten (Zeiser et al., 2020). Denkbar wäre hier in weiteren klinischen Studien ein prophylaktischer Einsatz und die Beobachtung der Auswirkungen auf aGVHD.

Der zweite monoklonale Antikörper, dessen Einsatz nach soliden Organtransplantationen erprobt ist, heißt Basiliximab. Hierbei wird er kombiniert mit Cyclosporin eingesetzt. Seine immunsuppressive Wirkung entfaltet er über die Inhibition des Interleukin-2 Rezeptors. Aktuelle Daten belegen die Wirksamkeit von Basiliximab zur Therapie schwerer, Glucocorticoid refraktärer GVHD, wenn die Substanz kombiniert mit Entanercept eingesetzt wird (Tan et al., 2017).

Zum Prophylaktischen Einsatz von Basiliximab ist die Datenlage noch recht dünn. In einer Phase 2 Studie konnte an einem kleinen Patientenkollektiv gezeigt werden, dass Basiliximab auch zur Prophylaxe aGVHD geeignet ist. Dies ist aber auf den Einsatz nach myeloablativen Konditionierungsregime beschränkt. Um eindeutige Aussagen über die Wirksamkeit in Bezug auf die Prophylaxe aGVHD treffen zu können, müssen weitere Studien an größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden (Podichetty et al., 2020).

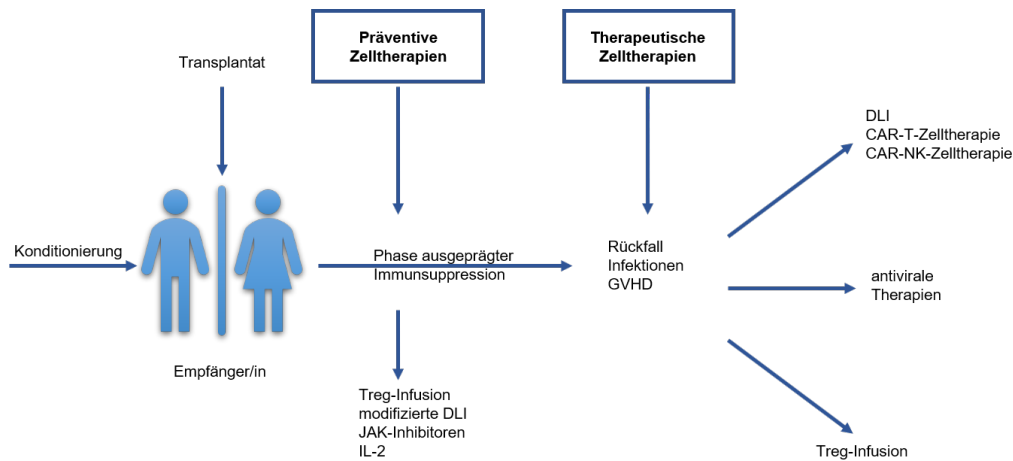


Abbildung 44: Immunzellbasierte Therapien als GVHD Prophylaxe modifiziert nach Chabannon (Christian Chabannon, 2018)

Ähnliches gilt für den klinischen Einsatz von IL-2. Am Nagetier konnte hier eine Reduktion aGVHD Raten sowie die Förderung der T-Zellfunktion gezeigt werden. Aktuell laufen auch erste klinische Studien, die den Einsatz von IL-2 im klinischen Alltag testen. So gelang es in einer Phase 2 Studie an zwanzig Patienten nach allogene HSZT zu zeigen, dass durch den prophylaktischen Einsatz von IL-2, hier in Kombination mit Sirolimus und Tacrolimus, die Zahl regulatorischer T-Zellen an Tag 30 nach Transplantation im Vergleich zu den Patienten ohne IL-2 Gabe deutlich höher ist. Zwar zeigte sich eine Tendenz der IL-2 behandelten Patienten zu weniger aGVHD Raten Overall Grad II-IV, jedoch konnte insgesamt keine Reduktion der GVHD Raten erzielt werden (Betts et al., 2017). Folglich sind auch hier weitere Studien nötig bis die prophylaktische IL-2 Gabe im klinischen Alltag erfolgreich angewendet werden kann.

Abbildung 44 veranschaulicht den klinischen Einsatz präventiver und therapeutischer Zelltherapien im zeitlichen Zusammenhang nach allogener HSZT.

6. Zusammenfassung

Diese Promotionsarbeit beschäftigt sich mit Treg und deren Rolle in der Entstehung aGVHD bei Patienten nach Alemtuzumab basierter Konditionierung.

Wie im Einleitungsteil beschrieben, konnte schon Pascal Wölfinger in seiner Doktorarbeit zeigen, dass das Auftreten aGVHD mit dem relativen Anteil CD52⁻ Treg korreliert. Mir ist es gelungen für den Tag 50 nach allogene HSZT einen spezifischen Cut off von 27 % CD52⁻ Treg zu bestimmen, der im Rahmen eines prädiktiven Wertes an Tag 50 nach allogene HSZT von klinischer Relevanz ist.

Zusätzlich konnte ich durch das prospektive Studiendesign mit wöchentlichen Probenentnahmen nicht nur punktuelle Unterschiede der CD52⁻ Expression und anderer Treg Marker beider Gruppen darstellen, sondern den gesamten Verlauf nach allogene HSZT analysieren.

Neben den bekannten Unterschieden der CD52 Negativität und der Expression der funktionellen Treg Marker GARP und ILT3, die ich in meiner Arbeit bestätigen und spezifisch für einzelne Zeitpunkte bzw. im Verlauf über die Zeit betrachten konnte, ergaben sich vor allem Auffälligkeiten in der NK-Zellrekonstitution.

Es konnte gezeigt werden, dass die Rekonstitution der NK-Zellen bei Patienten mit aGVHD interessanterweise schneller verläuft als bei Patienten ohne GVHD. Ein weiterer statistisch erkennbarer Unterschied in der NK-Zellrekonstitution beider Gruppen ist der relative Anteil CD56dim NK-Zellen, der bei dem Patientenkollektiv mit aGVHD größer ist als bei den Patienten ohne GVHD.

Für das Projekt 2, bei dem die Zytokinlevel einzelner Serumproben von Patienten mit aGVHD und ohne GVHD untersucht wurden, konnte ich Unterschiede in der IL-2 Ausschüttung zwischen den beiden verglichenen Gruppen zeigen. Dennoch ist die Erfassung quantitativer Interleukinlevel wegen der im Diskussionsteil ausführlich beschriebenen Problematik als prädiktiver Marker eher ungeeignet. Nichtsdestotrotz unterstützt die hier beobachtete höhere Interleukin-2 Menge der Serumproben von Patienten ohne GVHD die Annahme, dass Treg, deren Suppressorfunktion durch IL-2 verbessert wird, eine entscheidende Rolle in der Entstehung aGVHD einnehmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass längst noch nicht alle Einflussgrößen gefunden wurden, die am komplexen Prozess aGVHD beteiligt sind. Hinzu kommt, dass auch für die schon erkannten Faktoren der jeweilige Einfluss am Auftreten aGVHD noch weitgehend unklar bleibt.

Insgesamt lässt sich aus den hier gewonnen Ergebnissen schließen, dass die CD52⁻ Treg in ihrer Funktion im Vergleich zu CD52⁺ Treg stark eingeschränkt sind und dadurch einen wesentlichen Anteil an der Entstehung aGVHD haben. Nicht zu letzt weil die ohnehin schon in der Funktion eingeschränkten CD52⁻ Treg auch niedrigere Frequenzen des protektiven GVHD Marker GARP aufweisen als CD52⁺ Treg.

Mit dem Hintergrund dieses Wissens, das uns die komplexe Funktionsweise der Zellpopulation der Treg im Zusammenhang mit aGVHD ein wenig näherbringt, ist es hier gelungen CD52⁻ Treg als relevanten und frühen prädiktiven Marker zu identifizieren.

Wünschenswert wäre es nun, wenn die gewonnen Erkenntnisse in naher Zukunft im klinischen Alltag Anwendung finden würden. Wie im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, gibt es bereits zahlreiche Ansätze im Rahmen klinischer Studien. Diese gilt es in Zukunft weiter zu verfolgen.

Ziel ist es, aus diesem besseren Verständnis der Treg Funktion einen Beitrag zu leisten, das Auftreten aGVHD zu verhindern oder wenigstens zu lindern. Gelingt es zukünftig im Rahmen individualisierter Therapieregime das Auftreten aGVHD als Hauptkomplikation nach allogene HSZT zu mildern, wäre das ein großer Fortschritt für die bis heute immer noch äußerst risikoreiche Therapie der allogenen HSZT. Das könnte für betroffene Patienten ein großer Zugewinn an Lebensqualität bedeuten.

7. Literaturverzeichnis

- A. MORAVEJ, M. K., B. GERAMIZADEH, M. H. AGHDAIE, O. KOHI-HOSEINABADI, S. EBRAHIMNEZHAD 2016. Effect of Mesenchymal Stem Cells on ILT3 Expression in the Splenocytes of Skin Graft Recipient Mice. *Immunology*, 13.
- A. ÖSTENBEORG, A. W., E. HALAPI, J. LUNDIN, U. HARMENBERG, H. WIGZELL, H. MELLSTEDT 1997. Clonal CD8+ and CD52- T cells are induced in responding B cell lymphoma patients treated with Campath-1H (anti-CD52). *European Journal of Haematology*.
- AL., C. E. 1997. A Novel Inhibitory Receptor (ILT3) Expressed on MOnocytes, Macrophages, and Dendritic Cells Involved in Antigen Processing.
- AL., S. E. 2018. Checkpoint inhibition: NK cells enter the scene. *Nat Immunol*, 19, 648-650.
- ANDERSON, A. C., JOLLER, N. & KUCHROO, V. K. 2016. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, 44, 989-1004.
- BASU, S., CAMPBELL, H. M., DITTEL, B. N. & RAY, A. 2010. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *J Vis Exp*.
- BATTAGLIA, M. & RONCAROLO, M. G. 2009. The Tregs' world according to GARP. *Eur J Immunol*, 39, 3296-300.
- BAUMEISTER, S. H. C., RAMBALDI, B., SHAPIRO, R. M. & ROMEE, R. 2020. Key Aspects of the Immunobiology of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol*, 11, 191.
- BENITO, M. J., LOPEZ-HOYOS, M., FERNANDEZ-FRESNEDO, G., RUIZ, J. C., BENITO, A., SAN SEGUNDO, D., GOMEZ-ALAMILLO, C. & ARIAS, M. 2008. Changes in the expression of the immunoglobulin-like transcript 3 (ILT3) and ILT4 receptors in renal allograft recipients: effect of donor and recipient aging. *Transplant Proc*, 40, 2894-6.
- BETTS, B. C., BASTIAN, D., IAMSAWAT, S., NGUYEN, H., HEINRICHS, J. L., WU, Y., DAENTHANASANMAK, A., VEERAPATHRAN, A., O'MAHONY, A., WALTON, K., REFF, J., HORNA, P., SAGATYS, E. M., LEE, M. C., SINGER, J., CHANG, Y. J., LIU, C., PIDALA, J., ANASETTI, C. & YU, X. Z. 2018. Targeting JAK2 reduces GVHD and xenograft rejection through regulation of T cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 1582-1587.
- BETTS, B. C., PIDALA, J., KIM, J., MISHRA, A., NISHIHORI, T., PEREZ, L., OCHOA-BAYONA, J. L., KHIMANI, F., WALTON, K., BOOKOUT, R., NIEDER, M., KHAIRA, D. K., DAVILA, M., ALSINA, M., FIELD, T., AYALA, E., LOCKE, F. L., RICHES, M., KHARFAN-DABAHA, M., FERNANDEZ, H. & ANASETTI, C. 2017. IL-2 promotes early Treg reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Haematologica*, 102, 948-957.
- BINDER, C., ZIEPERT, M., PFREUNDSCHUH, M., DUHRSEN, U., EIMERMACHER, H., ALDAOUD, A., ROSENWALD, A., LOEFFLER, M., SCHMITZ, N., TRUEMPER, L. & GERMAN HIGH GRADE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA STUDY, G. 2013. CHO(E)P-14 followed by alemtuzumab consolidation in untreated peripheral T cell lymphomas: final analysis of a prospective phase II trial. *Ann Hematol*, 92, 1521-8.
- BOONPIYATHAD, T., SOZENER, Z. C., AKDIS, M. & AKDIS, C. A. 2020. The role of Treg cell subsets in allergic disease. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 38, 139-149.
- BORISH, L. C. & STEINKE, J. W. 2003. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, 111, S460-75.
- BORSOTTI, C., FRANKLIN, A. R., LU, S. X., KIM, T. D., SMITH, O. M., SUH, D., KING, C. G., CHOW, A., LIU, C., ALPDOGAN, O. & VAN DEN BRINK, M. R. 2007. Absence of donor T-cell-derived soluble

- TNF decreases graft-versus-host disease without impairing graft-versus-tumor activity. *Blood*, 110, 783-6.
- BUNTING, M. D., VARELIAS, A., SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F., SCHUSTER, I. S., LINEBURG, K. E., KUNS, R. D., FLEMING, P., LOCKE, K. R., HUNTINGTON, N. D., BLAZAR, B. R., LANE, S. W., TEY, S. K., MACDONALD, K. P., SMYTH, M. J., DEGLI-ESPOSTI, M. A. & HILL, G. R. 2017. GVHD prevents NK-cell-dependent leukemia and virus-specific innate immunity. *Blood*, 129, 630-642.
- C. ZHANG, W. H., P. ZHANG, Q. ZHANG, G. GUO, F. GU, H. YANG, Y. WANG, X. HUANG, Q. JIA, Y. TIAN 2017. Dynamic changes in serum cytokine levels and their clinical significance in predicting acute GVHD. *Oncotarget*, 8.
- CARNEVALE-SCHIANCA, F., LEISENRING, W., MARTIN, P. J., FURLONG, T., SCHOCH, G., ANASETTI, C., APPELBAUM, F. R., CARPENTER, P. A., DEEG, H. J., KIEM, H. P., STORB, R., MCDONALD, G. B. & NASH, R. A. 2009. Longitudinal assessment of morbidity and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation: retrospective analysis of a multicenter phase III study. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15, 749-56.
- CELLA, M., DÖHRING, C., SAMARIDIS, J., DESSING, M., BROCKHAUS, M. & LANZAVECCHIA, A. 1997. A Novel Inhibitory Receptor (ILT3) Expressed on Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells Involved in Antigen Processing.
- CHANG, H. D., KAMRADT, T. & SCHULZE-KOOPS, H. 2011. [Th1, Th17 and Th1+17 cells]. *Z Rheumatol*, 70, 862-5.
- CHRISTIAN CHABANNON, J. K., ATTILLIO BONDANZA, FRANCESCO DAZZI, PAOLO PEDRAZZOLI, ANTOINE TOUBERT, ANNALISA RUGGERL, KATHARINA FLELSCHHAUER, CHIARA BONINI 2018. Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies. *Science Translational Medicine*.
- COPSEL, S., WOLF, D., KALE, B., BARRERAS, H., LIGHTBOURN, C. O., BADER, C. S., ALPERSTEIN, W., ALTMAN, N. H., KOMANDURI, K. V. & LEVY, R. B. 2018. Very Low Numbers of CD4(+) FoxP3(+) Tregs Expanded in Donors via TL1A-Ig and Low-Dose IL-2 Exhibit a Distinct Activation/Functional Profile and Suppress GVHD in a Preclinical Model. *Biol Blood Marrow Transplant*, 24, 1788-1794.
- CORKUM, C. P., INGS, D. P., BURGESS, C., KARWOWSKA, S., KROLL, W. & MICHALAK, T. I. 2015. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT) and standard density gradient. *BMC Immunol*, 16, 48.
- CUTTS, P. B. N. A. J. H. 1967. Separation of Blood Leukocytes by FICOLL Gradient. *The Veterinary Bulletin*, 37.
- D.LESZCZYNSKI, R. R., P.HÄYRY 1985. Bone Marrow Transplantation in the Rat. *Am J Pathol*, 120.
- DÖRNER, K. 2013. Taschenrechner Klinische Chemie und Hämatologie.
- DR. RER. NAT. GARNET SUCK, D. M. V. B., DR. MED. MARKUS . MÜLLER, PD DR. MED. THOMAS ZEILER 2019. Herstellung von Blutkomponenten aus Vollblutspenden aus der Perspektive großer Blutspendedienste. *DRK Hämotherapie*
- EDWARDS, J. P., FUJII, H., ZHOU, A. X., CREEMERS, J., UNUTMAZ, D. & SHEVACH, E. M. 2013. Regulation of the expression of GARP/latent TGF-beta1 complexes on mouse T cells and their role in regulatory T cell and Th17 differentiation. *J Immunol*, 190, 5506-15.
- G HALE, S. B., G CHUMBLEY, T HOANG 1983. Removal of T cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement. *Blood*.

- G. R. HILL, M. K. 2020. Cytokines and costimulation in acute graft-versus-host disease. *Blood*, 136.
- GALBRAITH, D. 2012. Flow cytometry and cell sorting: the next generation. *Methods*, 57, 249-50.
- GARLAND, R. J., GROVES, S. J., DIAMANTI, P., WEST, S. E., WINSHIP, K. L., VIRGO, P. F., ROBINSON, S. P., OAKHILL, A., CORNISH, J. M., PAMPHILON, D. H., MARKS, D. I., GOULDEN, N. J. & STEWARD, C. G. 2005. Early emergence of PNH-like T cells after allogeneic stem cell transplants utilising CAMPATH-1H for T cell depletion. *Bone Marrow Transplant*, 36, 237-44.
- GERMAIN, R. N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*, 2, 309-22.
- GOMEZ-ALMAGUER, D., RUIZ-ARGUELLES, G. J., DEL CARMEN TARIN-ARZAGA, L., GONZALEZ-LLANO, O., GUTIERREZ-AGUIRRE, H., CANTU-RODRIGUEZ, O., JAIME-PEREZ, J., CARRASCO-YALAN, A. & GIRALT, S. 2008. Alemtuzumab for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14, 10-5.
- GONG, H., MA, S., LIU, S., LIU, Y., JIN, Z., ZHU, Y., SONG, Y., LEI, L., HU, B., MEI, Y., LIU, H., LIU, Y., WU, Y., DONG, C., XU, Y., WU, D. & LIU, H. 2018. IL-17C Mitigates Murine Acute Graft-vs.-Host Disease by Promoting Intestinal Barrier Functions and Treg Differentiation. *Front Immunol*, 9, 2724.
- GRATWOHL, A. 2012. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transplant*, 47, 749-56.
- GRECO, R., LORENTINO, F., NITTI, R., LUPO STANGHELLINI, M. T., GIGLIO, F., CLERICI, D., XUE, E., LAZZARI, L., PIEMONTESE, S., MASTAGLIO, S., ASSANELLI, A., MARKTEL, S., CORTI, C., BERNARDI, M., CICERI, F. & PECCATORI, J. 2019. Interleukin-6 as Biomarker for Acute GvHD and Survival After Allogeneic Transplant With Post-transplant Cyclophosphamide. *Front Immunol*, 10, 2319.
- HALE, G. 2001. The CD52 antigen and development of the CAMPATH antibodies. *Cytotherapy*, 3, 137-143.
- HAUBER, H. P., BERGERON, C. & HAMID, Q. 2004. IL-9 in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*, 134, 79-87.
- HIPPEN, K. L., AGUILAR, E. G., RHEE, S. Y., BOLIVAR-WAGERS, S. & BLAZAR, B. R. 2020. Distinct Regulatory and Effector T Cell Metabolic Demands during Graft-Versus-Host Disease. *Trends Immunol*, 41, 77-91.
- HU, Y., TURNER, M. J., SHIELDS, J., GALE, M. S., HUTTO, E., ROBERTS, B. L., SIDERS, W. M. & KAPLAN, J. M. 2009. Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. *Immunology*, 128, 260-70.
- HUESO, T., COITEUX, V., JONCQUEL CHEVALIER CURT, M., LABREUCHE, J., JOUAULT, T., YAKOUB-AGHA, I. & SEGUY, D. 2017. Citrulline and Monocyte-Derived Macrophage Reactivity before Conditioning Predict Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 23, 913-921.
- IKEZAWA, H. 2002. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins. *Biol. Pharm. Bull.* 25.
- J.HEINRICHS, D. B., A.VEERAPATHRAN,C.ANASETTI,B.BETTS,X.YU 2016. Regulatory T-Cell Therapy for Graft-versus-host Disease. *Immunology*.
- JOHANN SCHWEGLER, R. L. 2011. Der Mensch-Anatomie und Physiologie. *Thieme*, 5. Auflage.
- JOLLER, N., LOZANO, E., BURKETT, P. R., PATEL, B., XIAO, S., ZHU, C., XIA, J., TAN, T. G., SEFIK, E., YAJNIK, V., SHARPE, A. H., QUINTANA, F. J., MATHIS, D., BENOIST, C., HAFNER, D. A. & KUCHROO, V. K. 2014. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity*, 40, 569-81.

- KHANDELWAL, P., LANE, A., CHATURVEDI, V., OWSLEY, E., DAVIES, S. M., MARMER, D., FILIPOVICH, A. H., JORDAN, M. B. & MARSH, R. A. 2015. Peripheral Blood CD38 Bright CD8+ Effector Memory T Cells Predict Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21, 1215-22.
- KHANDELWAL, P., MELLOR-HEINEKE, S., REHMAN, N., LANE, A., SMILEY, K., VILLANUEVA, J., MARSH, R. A., GRIMLEY, M. S., DAVIES, S. M. & FILIPOVICH, A. H. 2016. Cytokine Profile of Engraftment Syndrome in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 22, 690-697.
- KRIPP, D. M. 2013. Monoklonaler Antikörper im Kampf gegen Krebs. *Continuing Medical Education Springer Verlag*.
- KUSANO, S., KUKIMOTO-NIINO, M., HINO, N., OHSAWA, N., IKUTANI, M., TAKAKI, S., SAKAMOTO, K., HARA-YOKOYAMA, M., SHIROUZU, M., TAKATSU, K. & YOKOYAMA, S. 2012. Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its alpha receptor. *Protein Sci*, 21, 850-64.
- LEE, S. J. 2017. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 129, 30-37.
- LEOTTA, S., SAPIENZA, G., CAMUGLIA, M. G., AVOLA, G., MARCO, A. D., MOSCHETTI, G., CURTO PELLE, A., MARKOVIC, U., MILONE, G. A., CUPRI, A., BIANCO, O., FRONTINI, V., SPADARO, A., MARCHESI, A. E., CROCCHIOLO, R. & MILONE, G. 2019. Preliminary Results of a Combined Score Based on sIL2-Ralpha and TIM-3 Levels Assayed Early After Hematopoietic Transplantation. *Front Immunol*, 10, 3158.
- LI, S. W., TANG, D., AHRENS, K. P., SHE, J. X., BRAYLAN, R. C. & YANG, L. 2003. All-trans-retinoic acid induces CD52 expression in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 101, 1977-80.
- LOEFF, F. C., FALKENBURG, J. H. F., HAGEMAN, L., HUISMAN, W., VELD, S. A. J., VAN EGMOND, H. M. E., VAN DE MEENT, M., VON DEM BORNE, P. A., VEELKEN, H., HALKES, C. J. M. & JEDEMA, I. 2018. High Mutation Frequency of the PIGA Gene in T Cells Results in Reconstitution of GPI Anchor(-)/CD52(-) T Cells That Can Give Early Immune Protection after Alemtuzumab-Based T Cell-Depleted Allogeneic Stem Cell Transplantation. *J Immunol*, 200, 2199-2208.
- LOEFF, F. C., VAN EGMOND, E. H. M., MOES, D., WIJNANDS, C., VON DEM BORNE, P. A., VEELKEN, H., FALKENBURG, J. H. F., JEDEMA, I. & HALKES, C. J. M. 2019. Impact of alemtuzumab pharmacokinetics on T-cell dynamics, graft-versus-host disease and viral reactivation in patients receiving allogeneic stem cell transplantation with an alemtuzumab-based T-cell-depleted graft. *Transpl Immunol*, 57, 101209.
- MALEK, T. R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*, 26, 453-79.
- MARIE-CHARLOTTE BRÜGGEN, G. S. 2020. DAs subkutane weiße Fettgewebe: die unterste Etage der immunologischen Hautbarriere. *Journal of the German Society of Dermatology*, 18.
- MARSH, J. C., GUPTA, V., LIM, Z., HO, A. Y., IRELAND, R. M., HAYDEN, J., POTTER, V., KOH, M. B., ISLAM, M. S., RUSSELL, N., MARKS, D. I., MUFTI, G. J. & PAGLIUCA, A. 2011. Alemtuzumab with fludarabine and cyclophosphamide reduces chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation for acquired aplastic anemia. *Blood*, 118, 2351-7.
- MARSH, R. A., KIM, M. O., LIU, C., BELLMAN, D., HART, L., GRIMLEY, M., KUMAR, A., JODELE, S., MYERS, K. C., CHANDRA, S., LEEMHUIS, T., MEHTA, P. A., BLEESING, J. J., DAVIES, S. M., JORDAN, M. B. & FILIPOVICH, A. H. 2013. An intermediate alemtuzumab schedule reduces the incidence of mixed chimerism following reduced-intensity conditioning hematopoietic cell transplantation for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Biol Blood Marrow Transplant*, 19, 1625-31.
- MATSUOKA, K. I. 2018. Low-dose interleukin-2 as a modulator of Treg homeostasis after HSCT: current understanding and future perspectives. *Int J Hematol*, 107, 130-137.

- MATTE-MARTONE, C., LIU, J., JAIN, D., MCNIFF, J. & SHLOMCHIK, W. D. 2008. CD8+ but not CD4+ T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across only minor H antigens, whereas both CD4+ and CD8+ T cells require direct leukemic contact to mediate GVL. *Blood*, 111, 3884-92.
- MEYER, R. G., WAGNER, E. M., KONUR, A., BENDER, K., SCHMITT, T., HEMMERLING, J., WEHLER, D., HARTWIG, U. F., ROOSNEK, E., HUBER, C., KOLBE, K. & HERR, W. 2010. Donor CD4 T cells convert mixed to full donor T-cell chimerism and replenish the CD52-positive T-cell pool after alemtuzumab-based T-cell-depleted allo-transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 45, 668-74.
- MICHAEL, M., SHIMONI, A. & NAGLER, A. 2013. Regulatory T cells in allogeneic stem cell transplantation. *Clin Dev Immunol*, 2013, 608951.
- MORRIS, E. C., REBELLO, P., THOMSON, K. J., PEGGS, K. S., KYRIAKOU, C., GOLDSTONE, A. H., MACKINNON, S. & HALE, G. 2003. Pharmacokinetics of alemtuzumab used for in vivo and in vitro T-cell depletion in allogeneic transplantations: relevance for early adoptive immunotherapy and infectious complications. *Blood*, 102, 404-6.
- NEGRIN, R. S. 2019. Immune regulation in hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 54, 765-768.
- NOEL, G., BRUNIQUEL, D., BIREBENT, B., DEGUIBERT, S., GROSSET, J. M., BERNARD, M., DAURIAC, C., CHEVALLIER, P., LAMY-DE-LA-CHAPELLE, T., SEMANA, G. & BRINSTER, C. 2008. Patients suffering from acute graft-versus-host disease after bone-marrow transplantation have functional CD4+CD25hiFoxp3+ regulatory T cells. *Clin Immunol*, 129, 241-8.
- NOVITZKY, N., THOMAS, V., DU TOIT, C. & MCDONALD, A. 2008. In stem cell transplantation, by limiting the morbidity of graft-versus-host disease tolerance to myeloablative conditioning is improved. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14, 709-18.
- O.CIUREA, S. R., BASSETT, R., DENMAN, J., CAO, K., WILLIS D., 2017. Phase 1 clinical trial using mblL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood*, 130.
- OGONEK, J., KRALJ JURIC, M., GHIMIRE, S., VARANASI, P. R., HOLLER, E., GREINIX, H. & WEISSINGER, E. 2016. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*, 7, 507.
- OUYANG, W. & O'GARRA, A. 2019. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50, 871-891.
- P. D. KOTTARIDIS, D. W. M., R. CHOPRA, R. K. CHAKRAVERTY, S. CHAKRABARTI, S. ROBINSON, K. PEGGS, S. VERFUERTH, R. PETTENGELL, J. C. MARSH, S. SCHEY, P. MAHENDR, G. J. MORGAN, G. HALE, H. WALDMANN, M. C. DE ELVIRA, C. D. WILLIAMS, S. DEVEREUX, D. C. LINCH, A. H. GOLDSTONE, S. MACKINNON 2000. In vivo Campath-1H prevents graft-versus-host disease following nonyeloablative stem cell transplantation. *Blood*.
- PARK, J., LIM, S. H., KIM, S. H., YUN, J., KIM, C. K., LEE, S. C., WON, J. H., HONG, D. S. & PARK, S. K. 2020. Is immunological recovery clinically relevant at 100 days after allogeneic transplantation? *Korean J Intern Med*.
- PODICHETTY, J. T., BRINDA, B. J., NELSON, R. P., KARR, A. H., PRASAD, N. K., QUINNEY, S., FOXWORTHY SCOTT, S. & KIEL, P. J. 2020. Pharmacokinetics of Basiliximab for the Prevention of Graft-versus-Host Disease in Patients Undergoing Hematopoietic Cell Transplantation with Minimal-Intensity Cyclophosphamide and Fludarabine. *Pharmacotherapy*, 40, 26-32.
- PROF. DR. MED. B. WÖRMANN, P. D. M. D. L. 2017. Arzneimittelengpässe am Beispiel der Hämatologie und Onkologie. *DGHO*, 9.

- PROF. DR. MED. NICOLAUS KRÖGER, H. P. D. M. A. B., MARBURG; PROF. DR. MED. DR. H. C. DIETGER NIEDERWIESER, LEIPZIG; PROF. DR. MED. CHRISTOPH SCHMID, AUGSBURG; PROF. DR. MED. GERALD WULF, GÖTTINGEN. 2016. Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark -und Blutstammzelltransplantation (DAG-KBT). *Leitlinien DAG KBT Version 1 Stand Juni 2016*.
- RAHMAN, S., RYBICKI, L., KY HAMILTON, B., POHLMAN, B., JAGADEESH, D., COBER, E., KALAYCIO, M., DEAN, R., SOBECKS, R., MOSSAD, S. B. & MAJHAIL, N. S. 2019. Early infectious complications after autologous hematopoietic cell transplantation for multiple myeloma. *Transpl Infect Dis*, 21, e13114.
- RANTI, J., KURKI, S., SALMENNIEMI, U., PUTKONEN, M., SALOMAKI, S. & ITALA-REMES, M. 2018. Early CD8+-recovery independently predicts low probability of disease relapse but also associates with severe GVHD after allogeneic HSCT. *PLoS One*, 13, e0204136.
- RE BIRHIRAY, G. S., S.GULDAN,D.RUDOLF,D.DELMASTRO,P.SANTABARBARA,L.BRETTMAN 2002. Phenotypic transformation of CD52pos to CD52neg leukemic T cells as a mechanism for resistance to CAMPATH-1H. *Leukemia*.
- RIEGEL, C., BOELD, T. J., DOSER, K., HUBER, E., HOFFMANN, P. & EDINGER, M. 2020. Efficient treatment of murine acute GvHD by in vitro expanded donor regulatory T cells. *Leukemia*, 34, 895-908.
- ROEDERER, J. P. R. A. M. 1015. Flow cytometry strikes gold. *Science*, 350.
- ROOD, J. J. V. 1977. Immunologische HLA-Typisierung. Ein Werkzeug zur Erfassung von Transplantationspartnern und Krankheitsdispositionen. *klinische Wochenschrift Springerverlag*, 55.
- S. MOERDLER, L. Z., E. GERASIMOV, C. ZHU 2018. Physician perspectives on compassionate use in pediatric oncology. *Pediatric Blood & Cancer*, 66.
- S. TANG, B., G. T. CHAPPELL, BS, A. MAZZOLI, BA, M. TEWARI, MD, PHD, S. WON CHOI, MD, J. WIENS, PHD 2020. Predicting Acute Graft-Versus-Host Disease Using Machine Learning and Longitudinal Vital Sign Data From Electronic Health Records. *American Society of Clinical Oncology*.
- SAKAGUCHI, S. S., N. 1995. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T cells Expressing IL-2 Receptor alpha-Chains (CD25). *The Journal of Immunology*.
- SCHMIDT-HIEBER, M., LABOPIN, M., BEELEN, D., VOLIN, L., EHNINGER, G., FINKE, J., SOCIE, G., SCHWERDTFEGER, R., KROGER, N., GANSER, A., NIEDERWIESER, D., POLGE, E., BLAU, I. W. & MOHTY, M. 2013. CMV serostatus still has an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report from the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Blood*, 122, 3359-64.
- SCHMITT, D. S. 2020. Durchflusszytometrie (FACS). *Website Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helholtz-Gemeinschaft*.
- SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T. & HUME, D. A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75, 163-89.
- SCOTTA, C., FANELLI, G., HOONG, S. J., ROMANO, M., LAMPERTI, E. N., SUKTHANKAR, M., GUGGINO, G., FAZEKASOVA, H., RATNASOTHY, K., BECKER, P. D., AFZALI, B., LECHLER, R. I. & LOMBARDI, G. 2016. Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells. *Haematologica*, 101, 91-100.
- SEVILLA, L. M. & PEREZ, P. 2019. Glucocorticoids and Glucocorticoid-Induced-Leucine-Zipper (GILZ) in Psoriasis. *Front Immunol*, 10, 2220.

- SHEVACH, E. M. 2017. Garp as a therapeutic target for modulation of T regulatory cell function. *Expert Opin Ther Targets*, 21, 191-200.
- SOIFFER, V. T. H. A. R. J. 2001. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BLOOD*, 98.
- SONG, J., PARK, D. W., MOON, S., CHO, H. J., PARK, J. H., SEOK, H. & CHOI, W. S. 2019. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. *BMC Infect Dis*, 19, 968.
- STERLING, C. & WEBSTER, J. 2020. Harnessing the immune system after allogeneic stem cell transplant in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*, 95, 529-547.
- T.E. BUFFART, J. J. W. M. J., P.C. HUIJGENS 2005. Reduced-intensity conditioning regimens in malignant haematological diseases. *The Netherlands Journal of Medicine*, 63.
- TAN, Y., XIAO, H., WU, D., LUO, Y., LAN, J., LIU, Q., YU, K., SHI, J., HE, J., ZHENG, W., LAI, X., ZHU, Y., DU, K., YE, Y., ZHAO, Y., ZHENG, G., HU, Y., HAN, X., ZHENG, Y., WEI, G., CAI, Z. & HUANG, H. 2017. Combining therapeutic antibodies using basiliximab and etanercept for severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: A multi-center prospective study. *Oncoimmunology*, 6, e1277307.
- THOMAS, E. D. 2000. Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation. *World J Surg*.
- TIERCY, J. M. 2016. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica*, 101, 680-7.
- ULGES, A., KLEIN, M., REUTER, S., GERLITZKI, B., HOFFMANN, M., GREBE, N., STAUDT, V., STERGIU, N., BOHN, T., BRUHL, T. J., MUTH, S., YURUGI, H., RAJALINGAM, K., BELLINGHAUSEN, I., TUETTENBERG, A., HAHN, S., REISSIG, S., HABEN, I., ZIPP, F., WAISMAN, A., PROBST, H. C., BEILHACK, A., BUCHOU, T., FILHOL-COCHET, O., BOLDYREFF, B., BRELOER, M., JONULEIT, H., SCHILD, H., SCHMITT, E. & BOPP, T. 2015. Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive TH2 responses in vivo. *Nat Immunol*, 16, 267-75.
- ULLRICH, E., SALZMANN-MANRIQUE, E., BAKHTIAR, S., BREMM, M., GERSTNER, S., HERRMANN, E., BADER, P., HOFFMANN, P., HOLLER, E., EDINGER, M. & WOLFF, D. 2016. Relation between Acute GVHD and NK Cell Subset Reconstitution Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*, 7, 595.
- VLAD, G., CHANG, C. C., COLOVAL, A. I., BERLOCO, P., CORTESINI, R. & SUCIU-FOCA, N. 2009. Immunoglobulin-like transcript 3: A crucial regulator of dendritic cell function. *Hum Immunol*, 70, 340-4.
- W.HERR, M. T., G.EHNINGER,H.EINSELE,R.G.MEYER 2015. Hämatopoetische Stammzellen. *Deutscher Ärzte-Verlag Köln*.
- W.ROMAN, J. T., P.TOPLEY,S.J.BRETT 1998. Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) mediates growth inhibition in human B-and T-lymphoma cell lines, and subsequent emergence of CD52-deficient cells. *Blackwell Science Ltd Immunology*, 95.
- WANG, R. 2009. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells.
- WANG, R., ZHU, J., DONG, X., SHI, M., LU, C. & SPRINGER, T. A. 2012. GARP regulates the bioavailability and activation of TGFbeta. *Mol Biol Cell*, 23, 1129-39.
- WANG, S. H., DA, W. M., JIN, H. J., JING, Y. & YAN, G. T. 2006. [Changes of IL-2, IL-8, IL-10 and TNF-alpha levels in sera of patients with acute graft-versus-host disease]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 14, 755-8.

- WATANABE, T., MASUYAMA, J., SOHMA, Y., INAZAWA, H., HORIE, K., KOJIMA, K., UEMURA, Y., AOKI, Y., KAGA, S., MINOTA, S., TANAKA, T., YAMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, T. & SERIZAWA, I. 2006. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells. *Clin Immunol*, 120, 247-59.
- WESCHKE, D. P., LEISENRING, W. M., LAWLER, R. L., STEVENS-AYERS, T., HUANG, M. L., JEROME, K. R., ZERR, D. M., HANSEN, J. A., BOECKH, M. & HILL, J. A. 2020. Inflammatory Cytokine Profile in Individuals with Inherited Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6. *Biol Blood Marrow Transplant*, 26, 254-261.
- WOELFINGER, P., EPP, K., SCHAEFER, L., KRIEGE, D., THEOBALD, M., BOPP, T. & WAGNER-DROUET, E. M. 2020a. CD52-negative T cells predict acute graft-versus-host disease after an alemtuzumab-based conditioning regimen. *Br J Haematol*, 191, 253-262.
- WOELFINGER, P., EPP, K., SCHAEFER, L., KRIEGE, D., THEOBALD, M., BOPP, T. & WAGNER-DROUET, E. M. 2020b. CD52-negative T cells predict acute graft-versus-host disease after an alemtuzumab-based conditioning regimen. *Br J Haematol*.
- ZAGHI, E., CALVI, M., DI VITO, C. & MAVILIO, D. 2019. Innate Immune Responses in the Outcome of Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation to Cure Hematologic Malignancies. *Front Immunol*, 10, 2794.
- ZAHID, M. F., LAZARUS, H. M., RINGDEN, O., BARRETT, J. A., GALE, R. P. & HASHMI, S. K. 2020. Can we prevent or treat graft-versus-host disease with cellular-therapy? *Blood Rev*, 100669.
- ZEISER R, V. B. N., BUTLER J 2020. Ruxolitinib for Acute Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*, 383, 498-500.
- ZEISER, R., VON BUBNOFF, N., BUTLER, J., MOHTY, M., NIEDERWIESER, D., OR, R., SZER, J., WAGNER, E. M., ZUCKERMAN, T., MAHUZIER, B., XU, J., WILKE, C., GANDHI, K. K., SOCIE, G. & GROUP, R. T. 2020. Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*, 382, 1800-1810.
- ZHANG, J., RAMADAN, A. M., GRIESENAUER, B., LI, W., TURNER, M. J., LIU, C., KAPUR, R., HANENBERG, H., BLAZAR, B. R., TAWARA, I. & PACZESNY, S. 2015. ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*, 7, 308ra160.
- ZHAO, Y., SU, H., SHEN, X., DU, J., ZHANG, X. & ZHAO, Y. 2017. The immunological function of CD52 and its targeting in organ transplantation. *Inflamm Res*, 66, 571-578.
- ZHENG, C., KAR, I., CHEN, C. K., SAU, C., WOODSON, S., SERRA, A. & ABOUD, H. 2020. Multiple Sclerosis Disease-Modifying Therapy and the COVID-19 Pandemic: Implications on the Risk of Infection and Future Vaccination. *CNS Drugs*, 34, 879-896.
- BARBI, J., PARDOLL, D. & PAN, F. 2014. Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment. *Immunol Rev*, 259, 115-39.
- BOSE, P., VACHHANI, P. & CORTES, J. E. 2017. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol*, 18, 17.
- BRAFF, M. H. & GALLO, R. L. 2006. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr Top Microbiol Immunol*, 306, 91-110.
- CHANG, H. D., KAMRADT, T. & SCHULZE-KOOPS, H. 2011. [Th1, Th17 and Th1+17 cells]. *Z Rheumatol*, 70, 862-5.
- DEGHANI, M., KALANI, M., GOLMOGHADDAM, H., RAMZI, M. & ARANDI, N. 2020. Aberrant peripheral blood CD4(+) CD25(+) FOXP3(+) regulatory T cells/T helper-17 number is associated with the outcome of patients with lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*.

- DELVES, P. J. 2000a. The Immune System First of Two Parts. *The New England Journal of Medicine*
- DELVES, P. J. 2000b. The Immune System Second of Two parts. *The New England Journal of Medicine*.
- GERMAIN, R. N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*, 2, 309-22.
- GIRALT, S. & BISHOP, M. R. 2009. Principles and overview of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Treat Res*, 144, 1-21.
- GRATWOHL, A. 2012. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transplant*, 47, 749-56.
- HAMADANI, M., CRAIG, M., AWAN, F. T. & DEVINE, S. M. 2010. How we approach patient evaluation for hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 45, 1259-68.
- OGONEK, J., KRALJ JURIC, M., GHIMIRE, S., VARANASI, P. R., HOLLER, E., GREINIX, H. & WEISSINGER, E. 2016. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*, 7, 507.
- PARKIN, J. & COHEN, B. 2001. An overview of the immune system. *The Lancet*, 357, 1777-1789.
- PASIC, I., LIPTON, J. H., KIM, D. D., VISWABANDYA, A., KUMAR, R., LAM, W., LAW, A. D., MATTSSON, J. & MICHELIS, F. V. 2020. Post-transplant cyclophosphamide combined with anti-thymocyte globulin for graft-vs-host disease prophylaxis improves survival and lowers non-relapse mortality in older patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Ann Hematol*, 99, 1377-1387.
- PASSWEG, J. R., BALDOMERO, H., BADER, P., BONINI, C., CESARO, S., DREGER, P., DUARTE, R. F., DUFOUR, C., KUBALL, J., FARGE-BANCEL, D., GENNERY, A., KROGER, N., LANZA, F., NAGLER, A., SUREDA, A. & MOHTY, M. 2016. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant*, 51, 786-92.
- PROF. DR. MED. NICOLAUS KRÖGER, H. P. D. M. A. B., MARBURG; PROF. DR. MED. DR. H. C. DIETGER NIEDERWIESER, LEIPZIG; PROF. DR. MED. CHRISTOPH SCHMID, AUGSBURG; PROF. DR. MED. GERALD WULF, GÖTTINGEN. 2016. Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark -und Blutstammzelltransplantation (DAG-KBT). *Leitlinien DAG KBT Version 1 Stand Juni 2016*.
- SOIFFER, V. T. H. A. R. J. 2001. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BLOOD*, 98.
- SWEENEY, C. & VYAS, P. 2019. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol*, 9, 1217.
- T.E. BUFFART, J. J. W. M. J., P.C. HUIJGENS 2005. Reduced-intensity conditioning regimens in malignant haematological diseases. *The Netherlands Journal of Medicine*, 63.
- THOMAS, E. D. 2000. Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation. *World J Surg*.
- VIGNALI, D. A., COLLISON, L. W. & WORKMAN, C. J. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8, 523-32.
- WOELFINGER, P., EPP, K., SCHAEFER, L., KRIEGE, D., THEOBALD, M., BOPP, T. & WAGNER-DROUET, E. M. 2020. CD52-negative T cells predict acute graft-versus-host disease after an alemtuzumab-based conditioning regimen. *Br J Haematol*, 191, 253-262.
- WOLF, D., WOLF, A. M., RUMPOLD, H., FIEGL, H., ZEIMET, A. G., MULLER-HOLZNER, E., DEIBL, M., GASTL, G., GUNSILIUS, E. & MARTH, C. 2005. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 11, 8326-31.

- ZAGHI, E., CALVI, M., DI VITO, C. & MAVILIO, D. 2019. Innate Immune Responses in the Outcome of Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation to Cure Hematologic Malignancies. *Front Immunol*, 10, 2794.
- BAKER, D., ALI, L., SAXENA, G., PRYCE, G., JONES, M., SCHMIERER, K., GIOVANNONI, G., GNANAPAVAN, S., MUNGER, K. C., SAMKOFF, L., GOODMAN, A. & KANG, A. S. 2020. The Irony of Humanization: Alemtuzumab, the First, But One of the Most Immunogenic, Humanized Monoclonal Antibodies. *Front Immunol*, 11, 124.
- BAUMEISTER, S. H. C., RAMBALDI, B., SHAPIRO, R. M. & ROMEE, R. 2020. Key Aspects of the Immunobiology of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol*, 11, 191.
- FERRARA, J. L. M., LEVINE, J. E., REDDY, P. & HOLLER, E. 2009. Graft-versus-host disease. *The Lancet*, 373, 1550-1561.
- GLUCKSBERG, H., STORB, R., FEFER, A., BUCKNER, C. D., NEIMAN, P. E., CLIFT, R. A., LERNER, K. G. & THOMAS, E. D. 1974. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*, 18, 295-304.
- HARRIS, A. C., YOUNG, R., DEVINE, S., HOGAN, W. J., AYUK, F., BUNWORASATE, U., CHANSWANGPHUWANA, C., EFEBERA, Y. A., HOLLER, E., LITZOW, M., ORDEMANN, R., QAYED, M., RENTERIA, A. S., RESHEF, R., WOLFL, M., CHEN, Y. B., GOLDSTEIN, S., JAGASIA, M., LOCATELLI, F., MIELKE, S., PORTER, D., SCHECHTER, T., SHEKHOVTSOVA, Z., FERRARA, J. L. & LEVINE, J. E. 2016. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant*, 22, 4-10.
- JAGASIA, M. H., GREINIX, H. T., ARORA, M., WILLIAMS, K. M., WOLFF, D., COWEN, E. W., PALMER, J., WEISDORF, D., TREISTER, N. S., CHENG, G. S., KERR, H., STRATTON, P., DUARTE, R. F., MCDONALD, G. B., INAMOTO, Y., VIGORITO, A., ARAI, S., DATILES, M. B., JACOBSON, D., HELLER, T., KITKO, C. L., MITCHELL, S. A., MARTIN, P. J., SHULMAN, H., WU, R. S., CUTLER, C. S., VOGELANG, G. B., LEE, S. J., PAVLETIC, S. Z. & FLOWERS, M. E. 2015. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21, 389-401 e1.
- LEE, S. J. 2017. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 129, 30-37.
- LI, Q., ZHAI, Z., XU, X., SHEN, Y., ZHANG, A., SUN, Z., LIU, H., GENG, L. & WANG, Y. 2010. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res*, 34, 1158-68.
- LUZNIK, L., JONES, R. J. & FUCHS, E. J. 2010. High-dose cyclophosphamide for graft-versus-host disease prevention. *Curr Opin Hematol*, 17, 493-9.
- MAJHAIL, N. S., RIZZO, J. D., LEE, S. J., ALJURF, M., ATSUTA, Y., BONFIM, C., BURNS, L. J., CHAUDHRI, N., DAVIES, S., OKAMOTO, S., SEBER, A., SOCIE, G., SZER, J., VAN LINT, M. T., WINGARD, J. R., TICHELLI, A., CENTER FOR INTERNATIONAL, B., MARROW TRANSPLANT, R., AMERICAN SOCIETY FOR, B., MARROW, T., EUROPEAN GROUP FOR, B., MARROW, T., ASIA-PACIFIC, B., MARROW TRANSPLANTATION, G., BONE MARROW TRANSPLANT SOCIETY OF, A., NEW, Z., EAST MEDITERRANEAN, B., MARROW TRANSPLANTATION, G. & SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE MEDULA, O. 2012. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18, 348-71.

- MALARD, F., GAUGLER, B., LAMARTHEE, B. & MOHTY, M. 2016. Translational opportunities for targeting the Th17 axis in acute graft-vs.-host disease. *Mucosal Immunol*, 9, 299-308.
- MANCUSI, A., PICCINELLI, S., VELARDI, A. & PIERINI, A. 2019. CD4(+)FOXP3(+) Regulatory T Cell Therapies in HLA Haploidentical Hematopoietic Transplantation. *Front Immunol*, 10, 2901.
- MARTIN, P. J., RIZZO, J. D., WINGARD, J. R., BALLEEN, K., CURTIN, P. T., CUTLER, C., LITZOW, M. R., NIETO, Y., SAVANI, B. N., SCHRIBER, J. R., SHAUGHNESSY, P. J., WALL, D. A. & CARPENTER, P. A. 2012. 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*, 18, 1150-63.
- MIELCAREK, M., STORER, B. E., FLOWERS, M. E., STORB, R., SANDMAIER, B. M. & MARTIN, P. J. 2007. Outcomes among patients with recurrent high-risk hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13, 1160-8.
- NASSEREDDINE, S., RAFEI, H., ELBAHESH, E. & TABBARA, I. 2017. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res*, 37, 1547-1555.
- NEOFYTOS, D., HORN, D., ANAISSIE, E., STEINBACH, W., OLYAEI, A., FISHMAN, J., PFALLER, M., CHANG, C., WEBSTER, K. & MARR, K. 2009. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (Betts et al.) Alliance registry. *Clin Infect Dis*, 48, 265-73.
- OGONEK, J., KRALJ JURIC, M., GHIMIRE, S., VARANASI, P. R., HOLLER, E., GREINIX, H. & WEISSINGER, E. 2016. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*, 7, 507.
- OZDEMIR, Z. N. & CIVRIZ BOZDAG, S. 2018. Graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci*, 57, 163-167.
- RIEGEL, C., BOELD, T. J., DOSER, K., HUBER, E., HOFFMANN, P. & EDINGER, M. 2020. Efficient treatment of murine acute GvHD by in vitro expanded donor regulatory T cells. *Leukemia*, 34, 895-908.
- RUGGERI, A., LABOPIN, M., BACIGALUPO, A., AFANASYEV, B., CORNELISSEN, J. J., ELMAAGACLI, A., ITALA-REMES, M., BLAISE, D., MEIJER, E., KOC, Y., MILPIED, N., SCHOUTEN, H. C., KROEGER, N., MOHTY, M. & NAGLER, A. 2018. Post-transplant cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis in HLA matched sibling or matched unrelated donor transplant for patients with acute leukemia, on behalf of ALWP-EBMT. *J Hematol Oncol*, 11, 40.
- RUUTU, T., GRATWOHL, A., NIEDERWIESER, D., DE WITTE, T., VAN DER WERF, S., VAN BIEZEN, A., MOHTY, M., KROGER, N., RAMBALDI, A., MCGRATH, E., SUREDA, A., BASAK, G., GREINIX, H. & DUARTE, R. F. 2017. The EBMT-ELN working group recommendations on the prophylaxis and treatment of GvHD: a change-control analysis. *Bone Marrow Transplant*, 52, 357-362.
- SCHMIDT-HIEBER, M., LABOPIN, M., BEELEN, D., VOLIN, L., EHNINGER, G., FINKE, J., SOCIE, G., SCHWERDTFEGER, R., KROGER, N., GANSER, A., NIEDERWIESER, D., POLGE, E., BLAU, I. W. & MOHTY, M. 2013. CMV serostatus still has an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report from the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Blood*, 122, 3359-64.
- TAN, Y., XIAO, H., WU, D., LUO, Y., LAN, J., LIU, Q., YU, K., SHI, J., HE, J., ZHENG, W., LAI, X., ZHU, Y., DU, K., YE, Y., ZHAO, Y., ZHENG, G., HU, Y., HAN, X., ZHENG, Y., WEI, G., CAI, Z. & HUANG, H. 2017. Combining therapeutic antibodies using basiliximab and etanercept for severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: A multi-center prospective study. *Oncoimmunology*, 6, e1277307.

- TIERCY, J. M. 2016. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica*, 101, 680-7.
- TIERCY, J. M., NICOLOSO, G., PASSWEG, J., SCHANZ, U., SEGER, R., CHALANDON, Y., HEIM, D., GUNGOR, T., SCHNEIDER, P., SCHWABE, R. & GRATWOHL, A. 2007. The probability of identifying a 10/10 HLA allele-matched unrelated donor is highly predictable. *Bone Marrow Transplant*, 40, 515-22.
- W.HERR, M. T., G.EHNINGER, H.EINSELE, R.G.MEYER 2015. Hämatopoetische Stammzellen. *Deutscher Ärzte-Verlag Köln*.
- ZEISER, R. & BLAZAR, B. R. 2017. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*, 377, 2167-2179.
- ZEISER, R., VON BUBNOFF, N., BUTLER, J., MOHTY, M., NIEDERWIESER, D., OR, R., SZER, J., WAGNER, E. M., ZUCKERMAN, T., MAHUZIER, B., XU, J., WILKE, C., GANDHI, K. K., SOCIE, G. & GROUP, R. T. 2020. Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*, 382, 1800-1810.

8. Anhang

Protokolle

FICOLL-Separationen

Buffy-Coat (BC)

Durchführung:

- 4 x 50 ml Rörchen mit je 15 ml Ficoll-Medium befüllen
- BC steril in eine ZK-Flasche überführen
- Volumen auf 140 ml mit PBS/ 2 mM EDTA auffüllen
- Jedes Rörchen mit 35 ml der Zellsuspension langsam überschichten
- Aufwirbelungen vermeiden, beeinflusst die Auftrennung der Zellen
- zentrifugieren 20 min, 2300 rpm, **ohne** Bremse, **ohne** Beschleunigung
- gleiche Anzahl an leeren 50 ml Rörchen vorbereiten
- vorsichtig PBMC-Bande (weißer Ring zwischen Plasma und Ficoll) abnehmen, → will man eine Thrombozyten-Kontamination vermeiden sollte man vorher den Plasmaring absaugen
- in 50 ml Rörchen überführen
- mit PBS/ 2 mM EDTA auf 50 ml auffüllen
- zentrifugieren 8 min, 1800 rpm
- **Achtung:** Pellet noch sehr weich, deshalb unter Sicht abkippen
- Überstand abkippen und auf 50 ml mit PBS/ 2 mM EDTA auffüllen
- Zentrifugieren 5 min, 1500 rpm
- Zellpellets poolen und mit PBS/ 2 mM EDTA auf 50 ml auffüllen
- Zentrifugieren 5 min, 1500 rpm
- Überstand abkippen
- Zellpellets gut resuspendieren und mit PBS/ 2 mM EDTA auf 50 ml auffüllen
- Zellen zählen
- Zellen können eingefroren oder direkt weiterverwendet werden

Bei starker Thrombozyten-Kontamination:

→ zentrifugieren 10 min, 1000 rpm, danach 15 min, 800 rpm

Bei Klumpen-Bildung:

→ Zellen über Cell Strainer (70 µm) geben

Patienten-Vollblut

Meist bekommt man pro Patient 2 Spritzen à 20-25 ml Vollblut.

- Pro Spritze: ein 50 ml Röhrchen mit je 15 ml Ficollmedium befüllen
- Das Blut aus beiden Spritzen in ein neues 50 ml Röhrchen geben
- Das restl. Volumen mit PBS/ 2 mM EDTA auf 50 ml auffüllen
- Jedes Ficoll-Röhrchen mit ca. 25 ml des Blutgemisches langsam überschichten
- Aufwirbelungen vermeiden, beeinflusst die Auftrennung der Zellen
- zentrifugieren 20 min, 2300 rpm, **ohne** Bremse, **ohne** Beschleunigung
- beide Ficollringe in ein neues 50 ml Röhrchen überführen und direkt poolen
- weiter wie im Standardprotokoll „ Ficoll für BC “

Einfrieren von Zellen

Ansetzten des Mediums:

- Pro Nunc werden 1 ml Medium benötigt
→ Gesamtmenge berechnen, mit Überschuss
- Komponenten:
 - Einfriermedium (angesetzt im Kühlschrank, siehe Rezept)
 - 10 % DMSO (zelltoxisch) hinzugeben
→ beide Komponenten müssen kurz vor Gebrauch gemischt werden
→ DMSO gefriert schon bei 4 °C und fällt aus, deshalb gut mischen
- Bsp.: 3 Nunc´s benötigen 3 ml, mit Überschuss 4 ml, davon sind 10 % 400 µl
→ 3,6 ml Einfriermedium + 400 µl DMSO

Durchführung:

- Die Zellen werden abzentrifugiert und dekantiert
- Das Pellet wird mit der jeweiligen Menge an frisch angesetztem Medium resuspendiert
- Die Nunc´s mit je 1 ml Zellsuspension füllen

- Ohne Verzögerung die Nunc´s in Isopropyl-Becher sog. „Frosties“ (im Kühlschrank vorkühlen) stellen. Diese sorgen dafür, dass die Temperatur konstant pro Minute um 1 °C sinkt. Dadurch bleibt die Kristallbildung sehr gering, und somit werden weniger Zellen zerstört.

Wichtig:

- Max. 50 mio PBMC´s in 1 ml wegfrieren
- Bei höheren Zellzahlen, kann im Notfall die Menge erhöht werden, dennoch ist es besser viele kleine Portionen wegzufrieren.

Auftauen von Zellen

Medium:

- PBMC und unempfindliche Zellen: PBS/ 2 mM EDTA
- Empfindliche/besondere Zellen: Nährmedien, RPMI etc.

Vorbereitung:

- Wasserbad (37 °C) einschalten
- ein 50 ml Tube vorbereiten und beschriften
- Tube mit 10 ml Medium füllen

Durchführung:

- Nunc in das warme Wasserbad stellen
- nur einen kleinen Teil auftauen lassen, optische Kontrolle!
- Ab hier: **schnelles Arbeiten wg DMSO !**
- Pipette mit ca. 2 ml Medium aufziehen
- Medium in die angetaute Zellsuspension geben und durch kontrolliertes Resuspendieren die Zellen mischen
- Volumen langsam vergrößern sonst platzen die Zellen
- Kontrolliert die komplette Suspension ins Tube geben
- Nunc evtl. nochmal spülen
- Zellen abzentrifugieren bei 1500 upm für 5 min
- Überstand dekantieren
- Pellet in 10 ml Medium aufnehmen und Zellen zählen
- Zellen abzentrifugieren bei 1500 upm für 5 min
- Zellpellet nun in dem Medium aufnehmen in dem weitergearbeitet wird

- Empfindliche Zellen sollten mehrfach gewaschen werden
 - Wäscht zelltoxisches DMSO aus
 - Wichtig:
- schnelles Arbeiten ohne Unterbrechung

Zellen Zählen

Kammer: Fuchs-Rosenthal-Kammer

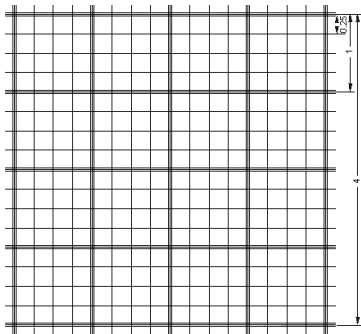
Vorbereitung:

- Deckglas mittels Wasser auf Kammer befestigen,
- Newton'schen Ringe müssen zu sehen sein
- Zellmaterial in unsterile Zählplatte geben

Durchführung:

Außerhalb der Flow:

- Zellen mit Trypanblau (toxisch) im Verhältnis 1:2 mischen
- Keine Inkubation der Farbe nötig
- Probe in Kammer füllen, kurz Zellen setzen lassen
- In der X-er Vergrößerung folgendes Netz benutzen:



- Eines der 16 Quadrate (16 Kleinstquadrate) auszählen
- Blaue Zellen: Tot.
- Runde leuchtende Zellen: vital
- Gezählte Zahl $\times 10^4 =$ Zellzahl / ml (100 gezählte Zellen entspricht 1 mio/ml)
- Sind die Zellen in mehr als 1 ml suspendiert muss dieser Volumenfaktor multipliziert werden
- Bei hohen Zellzahlen kann zu der 1:2 Verdünnung noch mehr verdünnt werden. Den Faktor muss man aber später bei der Formel berücksichtigen

Gewinnung von Serum

- Abnahme von 10 ml Serum in Serummonovette
- Zentrifugieren 3500 rpm für 10 Minuten
- In beschriftete 2 ml Nuncs überführen und einfrieren oder direkt weiterverarbeiten.

Hitzeinaktivierung von Serum

- Eingefrorene Serum Nuncs oder frische Seren bei 56 °C für 30 Minuten im Wasserbad erhitzen und anschließend weiterverarbeiten.

Einfrieren von Serum

- Vollblut wird in Serumröhrchen abgenommen, abzentrifugiert (3500 rpm für 10 min bei 20 °C) zentrifugiert und in beschriftete 2 ml Nuncs überführt.
- Die Serum-Nuncs werden dann in

Auftauen von Serum

Vorbereitung:

- Wasserbad (37 °C) einschalten

Durchführung:

- Die 2 ml-Nuncs mit gefrorenem Serum werden bis sie aufgetaut sind im Wasserbad inkubiert und können dann weiterverarbeitet werden.

FACS-Färbung

Zellzahl:

- Mind. 50.000 Zellen, optimal sind 100.000 – 200.000 Zellen pro Tube
- Kann je nach Zell-Art variieren
- **max. 2 mio/ml**

Durchführung:

- Probe in FACS-Puffer aufnehmen
- Mit entsprechender Zellzahl auf FACS-Tubes verteilen
- 5 min bei 1500 upm abzentrifugieren
- Dekantieren und Pellet aufratschen
- FACS - AK hinzugeben, hierbei Verdünnungen und Volumen beachten
- 15 min inkubieren
 - Normal wir bei 4 °C inkubiert
 - Vereinzelt gibt es AK die RT benötigen, dies bitte beachten
- 1 ml FACS-Puffer pro Tube
- 5 min bei 1500 upm zentrifugieren
- dekantieren und Tubes ausklopfen, Tube dabei nicht zurück drehen !!!
- Pellet aufratschen
- 500 µl FACS-Fix pro Tube (Fix steht gebrauchsfertig im Kühlschrank)
- Bei geringen Zellzahlen reichen auch 200 µl FACS-Fix
- Probe vortexen
- Die Zellen sind nun max. 1 Woche stabil

Anmerkung:

- Die FACS –AK sind steril zu behandeln

Foxp3/ HELIOS-FACS-Färbung

Vorbereitung:

- ca. 0,5 - 1 mio Zellen pro Tube
- Waschpuffer: Permeabilization Buffer (10-fach) eBioscience
 - 1:10 verdünnen mit Aqua dest.
 - benötigte Menge berechnen und ansetzen
 - eine Woche haltbar bei 4 °C
- Perm/Fix: Fixation Permeabilization Concentrate eBioscience
 - 1:4 verdünnen mit Fixation/Permeabilization Diluent
 - benötigte Menge berechnen und ansetzen
 - direkt verbrauchen, nicht haltbar
- Serum: Normal Rat Serum eBioscience
- Die FACS-AK sind steril zu behandeln

Durchführung:

- normale FACS-Färbung durchführen
 - entsprechende Proben nicht fixieren
- Pellet in 1 ml Perm/Fix resuspendieren
- 30 min bei RT inkubieren
- 2x mit Waschpuffer waschen:
 - Mit 1 ml Waschpuffer auffüllen
 - 5 min bei 1500 upm zentrifugieren
 - Dekantieren und aufratschen
- in das Pellet 2 µl Serum geben und resuspendieren
- 15 min bei RT inkubieren
- ohne waschen 5 µl Foxp3-AK dazu geben
- 30 min bei RT inkubieren
- 2x mit Waschpuffer waschen
 - Mit 1 ml Waschpuffer auffüllen
 - 5 min bei 1500 upm zentrifugieren
 - Dekantieren und aufratschen
- 500 - 1000 µl FACS-Fix pro Tube
- Zellen schnellstmöglich messen (max. 24h)
- Probe gut vortexen

LEGENDplex – human Th-Cytokine Panel (13-Plex) V-bottom-Plate (pp)

- Wichtig: Platte und Tubes müssen aus **Polypropylene** sein!
- Frische Serumproben mind. 30 min durchgerinnen lassen
- Gefrorene Serumproben komplett auftauen lassen, mischen und dann abzentrifugieren (5min, 1500 rpm), nicht dekantieren
- FITC und PE Beads werden nicht benötigt
- Doppelwerte werden empfohlen
- Beim pipettieren **Luftblasen vermeiden**

Neues Kit:

- **Matrix B:** Serumersatz für den Standard
 - mit 5 ml Assay Puffer die Matrix B lösen, mind. 15 min. vortexen
 - 1 ml Aliquot bei -80 °C lagern
- **Standard lösen:**
 - Mit 250 µl Assay Puffer den Th-Panel Standard lösen
 - Pro Test werden 37,5 µl benötigt (Doppelwerte)
 - 50 µl Aliquots bei -80 °C lagern

Vorbereitung:

- Alle Kit - Komponenten auf RT aufwärmen lassen
- 1 Aliquot Matrix B auftauen
- 1 Aliquot Standard auftauen
- **Standard ansetzen:** Verdünnungsreihe
 - 7x 0,5 ml PCR-Tubes (PP) vorbereiten und mit C0-C7 beschriften
 - In C0 –C6 jeweils 37,5 µl Assay Puffer vorlegen
 - C7 = purer Standard 12,5 µl
 - C6 = 37,5 µl Assay Puffer + 12,5 µl aus C7
 - C5 = 37,5 µl Assay Puffer + 12,5 µl aus C6 (so mit allen Tubes verfahren)
 - C0 = **nur** Assay Puffer
 - Bei jedem Schritt die Spitze wechseln!
- **Proben-Verdünnung:**
 - Probenverwendung frisch oder gefroren s.o.
 - Serumproben müssen 1:2 verdünnt werden

- 50 µl Serum + 50 µl Assay Puffer
- **Wasch-Puffer:**
 - 20 x Wasch Puffer mit A. dest verdünnen (1:20)
 - Benötigte Menge berechnen und ansetzen
 - Puffer bei 4 °C bis zu einem Monat haltbar

Durchführung:

- Platte beladen
 - ➔ Standardwells: 12,5 µl Matrix B + 12,5 µl Standard (C7-C0)
 - ➔ Probenwells: 25 µl verdünnte Probe
- Beads mind. 30 sec. vortexen
- 12,5 µl Beads pro Well hinzugeben (**dabei Beads immer wieder mischen**)
- Platte mittels Folie verschließen und in Alufolie einpacken
- Platte auf dem Schüttler stellen, 220 rpm
 - ➔ **Ü.N. bei 4 °C** (besser bei Serum)
 - ➔ 2 h bei RT
- 150 µl Wasch Puffer pro Well
- bei 800 x g 5 min zentrifugieren
- Platte dekantieren und an einem Tuch abtupfen (nur kurz auflegen)
- blaues Pellet kontrollieren und durch seitlichem Klopfen lösen
- 200 µl Wasch Puffer pro Well
- bei 800 x g 5 min zentrifugieren
- Platte dekantieren und an einem Tuch abtupfen (nur kurz auflegen)
- blaues Pellet kontrollieren und durch seitlichem Klopfen lösen
- 12,5 µl Detection Antikörper pro Well
- Platte mittels Folie verschließen und in Alufolie einpacken
- 1 h bei RT auf den Schüttler stellen (220 rpm)
- Platte **nicht waschen!**
- 12,5 µl SA-PE pro Well
- Platte mittels Folie verschließen und in Alufolie einpacken
- 30 min bei RT auf den Schüttler stellen (220 rpm)
- 150 µl Wasch Puffer pro Well
- bei 800 x g 5 min zentrifugieren

- Platte dekantieren und an einem Tuch abtupfen
- blaues Pellet kontrollieren und mittels seitlichem Klopfen lösen
- 200 µl Wasch Puffer pro Well
- bei 800 x g 5 min zentrifugieren
- Platte dekantieren und an einem Tuch abtupfen (nur kurz auflegen)
- blaues Pellet kontrollieren und mittels seitlichem Klopfen lösen
- 150 µl Wasch Puffer pro Well
- jedes Well gut resuspendieren
 - Platte direkt am FACS messen
 - Probe aus dem Well in ein FACS-Tube überführen, **gut mischen!**
 - 24 h bei 4 °C haltbar
 - oder fixieren

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Allen danken, die mir den Weg zur Promotion während meines Studiums ermöglicht haben. Die Thematik der Stammzelltransplantation begleitet mich schon seit meiner Schulzeit. Darin promovieren zu können empfand ich daher als große Bereicherung.

Ich danke [REDACTED] dafür, in Ihrer Arbeitsgruppe meine Promotion anfertigen zu können und für die Möglichkeit mit Posterpräsentationen erste Erfahrungen auf Kongressen sammeln zu dürfen. Weiterhin gilt mein Dank [REDACTED] [REDACTED], dessen Vorarbeiten maßgeblich zur Entstehung meines Forschungsvorhabens beigetragen haben, und der mir immer mit Rat zur Seite stand.

Außerdem danke ich [REDACTED] für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei den Experimenten im Labor besonders für die Einweisung in FACS.

Ein weiterer Dank geht an [REDACTED] für seine kritischen und hilfreichen Anregungen zur medizinischen Statistik.

Ich danke meine Freundinnen [REDACTED] [REDACTED], die mir jederzeit mit offenem Ohr zur Seite standen und mich immer bestärkt haben.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht und mich dabei stets unterstützt haben.