

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik

Charakterisierung CD52-negativer, funktionell eingeschränkter regulatorischer T-Zellen nach Alemtuzumab-basierter allogener Stammzelltransplantation

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

Vorgelegt von

Katharina Epp  
aus Dresden

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung/ Ziel der Dissertation .....	1
2. Literaturdiskussion.....	2
2.1. Hämatopoetische Stammzelltransplantation .....	2
2.2 Graft-versus-Host Disease .....	4
2.3 Dosisreduzierte Konditionierungsregime .....	6
2.4 T-Zell Depletion.....	7
2.4.1 Alemtuzumab .....	7
2.4.2 Adoptive Immuntherapie.....	8
2.4.3 Mainzer Transplantationsstudie.....	9
2.5 CD52- negative Zellen.....	10
2.6 Regulatorische T-Zellen .....	10
2.6.1 Expression von Oberflächenmolekülen durch Treg .....	13
2.6.2 Regulatorische T-Zellen und GvHD.....	15
3. Material .....	16
3.1 Geräte und Software .....	16
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	17
3.3 Glaswaren .....	17
3.4 Chemikalien .....	17
3.5 Kits.....	18
3.6 Zusammensetzung von Medien, Puffern und Lösungen .....	18
3.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	19
3.8 Das Patientenkollektiv.....	20
4. Methoden.....	23
4.1 Isolation peripherer mononukleärer Zellen.....	23
4.2 Zählen von Zellen .....	24
4.3 Kryokonservierung .....	24
4.4 Auftauen der Zellen.....	24
4.5 Durchflusszytometrie .....	25
4.5.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	25
4.5.2 FACS-Färbung von Oberflächenantigenen.....	26
4.5.3 Intrazelluläre FACS-Färbung.....	27
4.5.4 FoxP3-Färbung .....	27
4.5.5 Auswertung der Daten mittels FlowJo-Software (Identifikation von Treg).....	27
4.6 Zell-Sort .....	28
4.7 Suppressionsassay.....	29
4.7.1 CFSE-Färbung .....	29

4.7.2 Kokultivierung Treg/Tresp .....	29
5. Ergebnisse.....	31
5.1 Rekonstitution von Treg .....	31
5.1.1 Treg-Rekonstitution und GvHD .....	32
5.2 CD52-Expression auf Treg.....	35
5.2.1 CD52-negative Treg im zeitlichen Verlauf.....	37
5.2.2 CD52-negative Treg und GvHD.....	38
5.2.3 Korrelation CD52-negativer Treg und GvHD im zeitlichen Verlauf .....	41
5.3 Suppressionsassay.....	47
5.4 Expression funktionell wichtiger Treg-Marker auf CD52-negativen und -positiven Treg .....	49
5.5 Treg- Marker und GvHD.....	53
6. Diskussion.....	55
6.1 Alemtuzumab und T-Zell-Depletion .....	55
6.2 Treg-Rekonstitution.....	56
6.2.1 Treg-Rekonstitution und GvHD .....	57
6.3. CD52- negative Treg .....	59
6.3.1. Ursprung CD52-negativer Treg.....	60
6.3.2. akute GvHD .....	61
6.3.3. Chronische GvHD.....	62
6.3.4. DLI.....	62
6.3.5. Absolute Zellzahlen.....	63
6.3.6. Funktion von CD52 .....	64
6.4 Funktionseinschränkung CD52-negativer Treg .....	65
6.5 GPI-Anker.....	70
7. Zusammenfassung und Ausblick.....	72
8. Literatur .....	74
9. Danksagung .....	82
10. Tabellarischer Lebenslauf.....	83

## Abkürzungsverzeichnis

aGvHD	Akute Graft-versus-Host-Disease
ADP	Adenosindiphosphat
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ATG	Anti-Thymozyten Globulin
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl-Ester
cGvHD	Chronische Graft-versus-Host-Disease
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalie Virus
CsA	Cyclosporin A
DLI	Donor-Lymphocyte-Infusions
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FLAER	Fluorescein-labeled proaerolysin
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Forward Scatter
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GPI	Glycosyl-Inositol-Phosphatidyl
GVL	Graft-versus-Leukemia
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IL2	Interleukin-2
IPEX	Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal
KOF	Körperoberfläche
MACS	Magnetic activated cell sorting
MDS	Myelodysplastisches Syndrom

MHC	Minorhistokompatibilitätsantigen
MM	Multiples Myelom
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MUD	Matched unrelated donor
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
RIC	Reduced-intensity conditioning regimen
SSC	Side scatter
Sek. AML	Sekundäre AML
TCD	T-Zell Depletion
TCR	T-Zell-Rezeptor
Teff	Effektor T-Zellen
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRM	Transplant-related mortality
Tx	Transplantation
Z.n.	Zustand nach

## **Abbildungsverzeichnis**

**Abbildung 1:** Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen (Seite 13)

**Abbildung 2:** Studienprotokoll der Mainzer Transplantationsstudie (Seite 20)

**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMC (Seite 23)

**Abbildung 4:** Darstellung verschiedener Zellpopulationen mittels FSC/SSC (Seite 25)

**Abbildung 5:** Gating-Strategien zur Identifikation von Treg (Seite 28)

**Abbildung 6:** Treg-Anteile und absolute Treg-Zahlen im zeitlichen Verlauf (Seite 32)

**Abbildung 7:** Vergleich Treg-Zahl und -Anteil in Bezug auf die klinische Ausbildung einer GvHD (Seite 33)

**Abbildung 8:** Vergleich Treg-Anteil an allen Lymphozyten in Bezug auf die klinische Ausbildung einer GvHD (Seite 34)

**Abbildung 9:** Vergleich Treg-Zahl und -Anteil in Bezug auf die klinische Ausbildung einer GvHD vor Tag +100 (Seite 35)

**Abbildung 10:** Gating-Strategie zur Beurteilung der CD52-Expression von Treg am Beispiel von Patient #34 (Seite 36)

**Abbildung 11:** Verteilung der Anteile CD52-negativer Treg an der gesamten Treg-Population in allen Patientenproben zu allen Zeitpunkten (Seite 37)

**Abbildung 12:** Prozentualer Anteil CD52-negativer Treg im zeitlichen Verlauf (Seite 37)

**Abbildung 13:** prozentualer Anteil CD52-negativer Treg im Vergleich zwischen aGvHD, cGvHD und keiner GvHD (Seite 38)

**Abbildung 14:** prozentualer Anteil CD52-negativer Treg im Vergleich zwischen aGvHD, cGvHD und keiner GvHD unter Einbeziehung von Patienten, welche eine GvHD im Anschluss an eine DLI-Gabe entwickelten (Seite 39)

**Abbildung 15:** Absolute Treg-Zahlen und Treg-Anteile im zeitlichen Verlauf (Seite 42)

**Abbildung 16:** CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #22 (Seite 43)

**Abbildung 17:** CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #26 (Seite 43)

**Abbildung 18:** CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #3 (Seite 44)

**Abbildung 19:** CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #18 (Seite 44)

**Abbildung 20:** CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #34 (Seite 44)

**Abbildung 21:** CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #5 (Seite 45)

**Abbildung 22:** CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #27 (Seite 45)

**Abbildung 23:** CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #32 (Seite 45)

**Abbildung 24:** CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #8 (Seite 46)

**Abbildung 25:** Prozentualer Anteil CD52-negativer Treg im zeitlichen Verlauf (Seite 46)

**Abbildung 26:** Gating-Strategie zur Bestimmung des Anteils proliferierter Zellen (Seite 48)

**Abbildung 27:** Ergebnisse des Proliferationsassays (Seite 49)

**Abbildung 28:** Vergleich CD52+ und CD52- Treg in Hinblick auf ihre Expression von CXCR3, CTLA4, CD45RA, HLA-DR und Granzyme A (Seite 51)

**Abbildung 29:** Expression von CCR5 (Seite 51)

**Abbildung 30:** Expression von CD39 (Seite 52)

**Abbildung 31:** Expression von CD44 und CD62L (Seite 52)

**Abbildung 32:** MFI von FoxP3 (Seite 53)

**Abbildung 33:** Vergleich der Marker-Expression durch Treg von Patienten mit aGvHD, cGvHD oder noGvHD (Seite 54)

## **Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:** Schweregrade der akuten GvHD (Seite 5)

**Tabelle 2:** Zusammensetzung von Medien, Puffern und Lösungen (Seite 18)

**Tabelle 3:** Verwendete FACS-Antikörper (Seite 19/20)

**Tabelle 4:** Charakteristika der untersuchten Patienten (Seite 21/22)

**Tabelle 5:** Anteil CD52-negativer Treg bei Patienten mit aGvHD (Seite 39)

**Tabelle 6:** Anteil CD52-negativer Treg bei Patienten mit cGvHD (Seite 40)

**Tabelle 7:** Anteil CD52-negativer Treg bei Patienten ohne GvHD (Seite 40)



## 1. Einleitung/ Ziel der Dissertation

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen wird heutzutage vielfältig zur Therapie maligner und benigner Erkrankungen eingesetzt. Das Verfahren ist häufig die einzige kurative Therapieoption für die Patienten, kann jedoch schwerwiegende, zum Teil lebensbedrohliche, Nebenwirkungen nach sich ziehen (1). Eine der wichtigsten Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation ist die Ausbildung einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD). Daher wurden im Laufe der Jahre verschiedenste Strategien erforscht, um dieser Komplikation vorzubeugen (2). Eine entsprechende Strategie stellt die T-Zell Depletion mittels Alemtuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen das GPI-verankerte Oberflächenmolekül CD52, dar. Hierbei zeigte sich allerdings im Anschluss an die Stammzelltransplantation eine verzögerte Immunrekonstitution, welche wiederum eine erhöhte Infektanfälligkeit und ein möglicherweise höheres Rezidiv-Risiko nach sich zieht (3). Um die Immunrekonstitution nach der Transplantation zu beschleunigen gibt es die Möglichkeit zusätzlich Spender-Lymphozyten zu infundieren, was jedoch nur möglich ist, wenn keine GvHD vorliegt (4). In einer an der Universitätsklinik Mainz durchgeführten Transplantationsstudie wurden Patienten, welche in der Konditionierungsphase Alemtuzumab zur T-Zell-Depletion sowie Spender-Lymphozyten-Infusionen (DLI) nach Transplantation erhalten hatten, systematisch untersucht. Hierbei fiel auf, dass rund 50% der Patienten aufgrund einer (größtenteils niedriggradig ausgeprägten) GvHD keine DLI erhalten konnten (5).

Bereits in früheren Forschungsarbeiten konnte im Anschluss an die Behandlung mit Alemtuzumab die Rekonstitution CD52- negativer T-Zellen nachgewiesen werden (6). Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde die CD52-Expression im Rahmen der Mainzer Transplantationsstudie bereits auf verschiedenen Zelltypen untersucht. Unter anderem konnte ein CD52-Verlust auf regulatorischen T-Zellen (Treg) aufgezeigt werden. Dies ist im Transplantationskontext besonders interessant, da es sich bei den Treg um eine Zellpopulation handelt, welche aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften der Entstehung einer GvHD entgegenwirken kann (7). So konnte in Vorarbeiten dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Nachweis CD52-negativer Treg mit dem Auftreten von akuter GvHD korreliert. Zudem ergaben sich erste Hinweise darauf, dass diese Treg in ihrer Funktionalität gestört sein könnten (8).

Ziel dieser Arbeit soll es daher sein die Bedeutung des Auftretens CD52-negativer Treg tiefgehend zu untersuchen. Hierfür haben wir Untersuchungen an bereits asservierten Blutproben der Patienten aus oben erwähnter Studie durchgeführt und diese mit dem klinischen Verlauf der Patienten (insbesondere hinsichtlich des Auftretens einer akuten oder chronischen GvHD) korreliert. Zudem wurden CD52-negative Treg auf ihre Funktionalität hin untersucht und die Expression von CD52 im Zusammenhang mit der Expression weiterer, für die Aktivierung und Funktion von Treg wichtiger Marker analysiert.

Daten aus der vorliegenden Arbeit wurden teilweise bereits im Mai 2020 im British Journal of Hematology publiziert: Woelfinger et al. CD52-negative T cells predict acute graft-versus-host disease after an alemtuzumab-based conditioning regimen (9).

## **2. Literaturdiskussion**

### **2.1. Hämatopoetische Stammzelltransplantation**

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (HSZT) stellt bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine wichtige Therapieoption dar, häufig sogar die einzige mit einem kurativen Ansatz. Man unterscheidet eine Transplantation von autologen Stammzellen von der Transplantation allogener Stammzellen. Bei der autologen Transplantation werden dem Patienten nach einer Vorbehandlung mittels Chemotherapie oder Bestrahlung (sogenannte Konditionierung) zuvor gesammelte eigene (autologe) Stammzellen verabreicht. Allogen hingegen bedeutet, dass die Stammzellen von einem gesunden Spender stammen, welcher nicht genetisch identisch mit dem Empfänger ist (10).

Die erste Studie zur allogenen Stammzelltransplantation im Menschen wurde bereits 1957 durch E.D. Thomas veröffentlicht (11). Seitdem haben sich sowohl die Konditionierungstherapien als auch der Vorgang der Transplantation und die Nachbehandlung bedeutend verändert. Zunächst erfolgte die Gewinnung der Stammzellen durch Aspiration von Knochenmark aus dem Beckenkamm, welche unter Vollnarkose bzw. Spinalanästhesie durchgeführt wird. Diese Prozedur ist einerseits mit einer längeren Rekonvaleszenzphase verbunden, als auch durch die Risiken der Narkose limitiert (12).

Heute werden die Stammzellen überwiegend aus dem peripheren Blut gesammelt, nachdem sie vorher durch mehrmalige Gabe von G-CSF aus dem Knochenmark mobilisiert wurden. G-CSF ist ein Wachstumsfaktor für neutrophile Granulozyten, welche Proteasen freisetzen, die wiederum die „Verankerung“ der Stammzellen im Knochenmark lösen und somit zu deren Ausschwemmung in das periphere Blut führen (1). Dieses Verfahren ist angenehmer und sicherer für den Spender und kann theoretisch in jedem Alter durchgeführt werden, wobei die einzige Limitation die Venenverhältnisse des Spenders darstellen. Ein weiterer Vorteil der Gabe peripherer Blutstammzellen besteht in einer schnelleren Rekonstitution von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten beim Empfänger nach der Transplantation (12). Wenn nicht schnell genug ein passender Spender gefunden wird, gibt es außerdem noch die Möglichkeit Stammzellen aus Nabelschnurblut zu transplantieren. Hierunter wird allerdings eine langsamere hämatologische und immunologische Rekonstitution beim Empfänger beobachtet, wodurch das Risiko insbesondere für Infektionen steigt. Zudem gibt es keine Möglichkeit zu einem späteren Zeitpunkt nach der Transplantation zusätzlich Spenderlymphozyten zu infundieren (siehe **2.4.2**).

Die ersten Transplantationen wurden ohne eine gezielte Selektion der Spender durchgeführt, was eine hohe Rate an Transplantatabstoßungen, sowie Graft-versus-Host-Reaktionen (GvHD, siehe **2.2**) zur Folge hatte (13). Die Entdeckung von Methoden zur HLA-Typisierung Mitte der 1960er Jahre brachte deshalb einen wichtigen Fortschritt, da nun Spender und Empfänger auf ihre HLA-Merkmale untersucht und die Transplantationen möglichst HLA-kompatibel durchgeführt werden konnten, was die Verträglichkeit deutlich verbesserte (14). Einer breiten Masse zugänglich wurde die Stammzelltransplantation schließlich durch die Nutzung von HLA-kompatiblen nicht-verwandten Spendern (= matched unrelated donor, MUD; zuvor kamen als Spender nur HLA-identische Geschwister in Frage) und einer somit deutlich erhöhten Chance einen passenden Spender zu finden (15).

Im Jahr 2013 wurden in Europa 16211 allogene Transplantationen durchgeführt, die zum größten Teil (12004) aus peripheren Blutstammzellen bestanden und von nicht-verwandten Spendern (8587) kamen (16). Die häufigsten Indikationen für eine allogene Transplantation waren mit rund 50% akute Leukämien, wobei neben hämatologischen und lymphatischen malignen Erkrankungen auch andere hämatologische Erkrankungen (z.B. Thalassaemia major), sowie Autoimmunerkrankungen und angeborene metabolische Störungen mit Hilfe der Transplantation therapiert werden (16, 17).

Trotz aller Fortschritte bleibt die allogene Stammzelltransplantation jedoch eine Behandlung, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden ist, wobei die beiden Hauptkomplikationen GvHD und ein Rezidiv der Grunderkrankung darstellen. Es wird deshalb intensiv daran geforscht, wie man das Verfahren verträglicher, sicherer und effektiver machen kann.

## **2.2 Graft-versus-Host Disease**

Die GvHD ist eine Reaktion des übertragenen Spenderimmunsystems gegen den Empfänger. Zunächst wurde diese Erkrankung bei Mäusen beobachtet, welche nach einer Bestrahlung mit einer tödlichen Dosis Knochenmark als Rescuetherapie transplantiert bekamen. Diese Mäuse erholten sich zwar von der Bestrahlung, entwickelten aber ein sekundäres Syndrom, welches unter anderem durch Gewichtsverlust, Diarrhoe, Hautveränderungen und Leberschäden gekennzeichnet war (18). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass für dieses Syndrom mit dem Transplantat übertragene Spender T-Zellen verantwortlich sind, die gegen fremde Antigene des Empfängers reagieren (19).

Beim Menschen sieht man die GvHD in einer akuten (aGvHD) oder chronischen (cGvHD) Form, wobei sich die chronische Form aus der akuten entwickeln oder de novo entstehen kann (18). Ursprünglich wurden diese Erkrankungen allein anhand ihres zeitlichen Auftretens nach der Transplantation voneinander getrennt; so war die akute GvHD definiert als Erkrankung, die in den ersten 100 Tagen nach Transplantation auftritt (und die chronische analog später als 100 Tage nach Transplantation) (20). Diese Definition wurde inzwischen überwunden, da man erkannt hat, dass die beiden Formen jeweils eigene Krankheitsbilder mit unterschiedlicher Pathophysiologie darstellen. Außerdem wurde beobachtet, dass eine akute GvHD (insbesondere im Kontext der dosisreduzierten Konditionierungsregime siehe **2.3**) auch später als an Tag 100 neu auftreten kann (20). Bei der akuten GvHD werden vor allem Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber befallen, was sich unter anderem in einem pruritischem, makulopapulösem Ausschlag; Übelkeit; Erbrechen und voluminösen, oft blutigen Diarrhoen äußert. Zusätzlich können weitere Manifestationen wie z.B. Thrombozytopenie auftreten (21). Die akute GvHD wird anhand der klinischen Befunde in vier Schweregrade eingeteilt, wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

Stadium	Haut	Leber (Bilirubin)	Darm (Durchfälle/Tag)
1	Makulopapulöses Exanthem <25% KOF	2-3 mg/dl	500-1000 ml oder persistierende Übelkeit
2	Makulopapulöses Exanthem 25-50% KOF	3,1-6 mg/dl	100-1500 ml
3	Makulopapulöses Exanthem >50% KOF	6,1-15 mg/dl	>1500 ml
4	generalisierte Erythrodermie	>15 mg/dl	starke Schmerzen mit oder ohne Ileus
Schweregrad			
I	Stadium 1-2	Stadium 0	Stadium 0
II	Stadium 1-3	Stadium 1	Stadium 1
III	Stadium 2-3	Stadium 2-3	Stadium 2-3
IV	Stadium 2-4	Stadium 2-4	Stadium 2-4

**Tabelle 1: Schweregrade der akuten GvHD** (Modifiziert nach (22)) KOF= Körperoberfläche

Das langfristige Überleben ist bei Patienten mit einer akuten GvHD Grad II-IV mit weniger als 50% deutlich gemindert, wobei Leberversagen, Blutungen und Infektionen die häufigsten Todesursachen sind (23).

Die chronische GvHD ist hingegen gekennzeichnet durch eine Immundefizienz und Symptome, wie sie bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen vorkommen (z.B. orale Ulzerationen, Keratokonjunktivitis sicca, Polyserositis oder Sklerodermie) (24). Mit einer Mortalitätsrate von 30-50% (bedingt vor Allem durch die Immundysregulation und damit einhergehendes Auftreten von Infektionen), ist die chronische GvHD ebenfalls eine sehr ernstzunehmende Komplikation nach einer Transplantation (2). Diese Komplikation lässt sich am effektivsten vermeiden, indem man das Entstehen einer akuten GvHD verhindert, da sich die meisten Fälle von chronischer GvHD aus einer vorangegangenen akuten GvHD entwickeln (24).

Der größte Risikofaktor für alle Formen der GvHD sind HLA-inkompatible Transplantationen, da die T-Zellen des Spenders am stärksten gegen fremde HLA-Moleküle des Empfängers reagieren. Allerdings schützt auch eine HLA-idente Geschwisterspende nicht vor der Entwicklung einer GvHD, da es zusätzlich Minorhistokompatibilitätsantigene gibt, die sich trotz HLA-Match zwischen Spender und Empfänger unterscheiden und ebenfalls durch die T-Zellen erkannt werden (25). Pathophysiologisch ist außerdem bereits das Konditionierungsregime vor der Transplantation von Bedeutung: Durch sehr hohe Dosen Bestrahlung und/ oder Chemotherapie werden beim Empfänger Gewebsschäden verursacht, die zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und zu einer konsekutiven Aktivierung und Reifung von antigenpräsentierenden

Zellen (APC) führen, welche wiederum nach der Transplantation in der Lage sind die Spender T-Zellen zu aktivieren (20).

In der klinischen Praxis wird zur Prophylaxe der GvHD eine pharmakologische Immunsuppression eingesetzt, welche meistens aus der Gabe eines Calcineurin-Inhibitors mit oder ohne Methotrexat besteht. Nichtsdestotrotz gehört sie heute immer noch zu den Hauptgründen für Transplantations-assoziierte Mortalität (TRM) (26).

### **2.3 Dosisreduzierte Konditionierungsregime**

Ursprünglich wurde die Konditionierung vor der Transplantation als eigentliche Therapie gegen die maligne Grunderkrankung angesehen. So verabreichte man ausschließlich hohe (myeloablative) Dosen Radio- und/ oder Chemotherapie, um die Erkrankung zu bekämpfen und die anschließende Stammzelltransplantation wurde als Rescuetherapie gegeben, um die zerstörte Myelopoese des Patienten zu ersetzen. Diese Regime sind mit einer hohen Toxizität und TRM verbunden, so dass nur junge, fitte Patienten bis ca. 50 Jahre so behandelt werden können (10). Außerdem wird durch die Toxizität die Entstehung einer GvHD begünstigt (wie oben erläutert).

Ein Paradigmenwechsel hat hier durch die Entdeckung des Graft-versus-Leukemia-Effekts (GvL) stattgefunden: Analog zur GvHD werden mit dem Transplantat alloreaktive zytotoxische T-Zellen übertragen, die Tumorantigene im Empfänger erkennen und die residuellen Tumorzellen beseitigen können (27). Mit diesem Wissen ist es möglich die Intensität der Konditionierung auf ein Maß zu reduzieren, welches eine ausreichende Immunsuppression bewirkt, damit das Transplantat nicht abgestoßen wird und es zu einem guten Engraftment kommt. Für die Tumoreradikation ist in diesem Fall nicht allein die Konditionierungstherapie verantwortlich, sondern es wird verstärkt auf den GvL-Effekt gesetzt. Die dosisreduzierte Konditionierung (englisch: Reduced-intensity conditioning regimen, RIC) wird durch die Patienten deutlich besser vertragen (es treten zum Beispiel weniger Organschäden und Infektionen auf) (28), so dass auch Patienten in reduziertem Allgemeinzustand und höheren Alters transplantiert werden können. Tatsächlich ist in den letzten Jahren der Anteil der über 60-Jährigen an allen allogenen transplantierten Patienten auf 17% angestiegen (26).

## 2.4 T-Zell Depletion

Auch bei der Anwendung dosisreduzierter Konditionierungsregime finden sich jedoch immer noch hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten für GvHD. Auf der Suche nach neuen Möglichkeiten die Auftretenswahrscheinlichkeit der GvHD zu senken, kam man auf die Idee, T-Zellen aus dem Transplantat zu entfernen. Bereits 1974 konnte in Mausexperimenten gezeigt werden, dass eine T-Zell Depletion (TCD) tatsächlich eine drastische Senkung der GvHD-Rate bewirkte (29). Heutzutage werden sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* Methoden eingesetzt, um die T-Zellen aus dem Graft zu entfernen. *Ex vivo* können entweder T-Zellen negativ oder CD34<sup>+</sup> Stammzellen positiv selektioniert werden. Für die *in vivo*-Depletion werden dem Empfänger gegen T-Zellen gerichtete Antikörper wie zum Beispiel das polyklonale Anti-Thymozyten Globulin (ATG) verabreicht (30). Auch im Menschen konnte so eine Minderung der Auftretenswahrscheinlichkeit für GvHD erreicht werden, zudem zeigte sich ein schnelleres Engraftment nach der Transplantation (31). Die GvHD-Reduktion durch Anwendung von TCD spiegelt sich allerdings nicht in einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit nach der Transplantation wider. Dafür gibt es mehrere Gründe: Einerseits kommt es zu einer langsameren Immunrekonstitution und damit zu einer höheren Rate an Infektionen und EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen; andererseits nimmt mit der GvHD auch gleichzeitig der gewünschte GvL-Effekt ab, was wiederum zu einer erhöhten Inzidenz von rezidierten Grunderkrankungen führt (32-34).

### 2.4.1 Alemtuzumab

Alemtuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper (IgG1-Subtyp) aus der Campath-1 Familie, der gegen das Oberflächenmolekül CD52 gerichtet ist und ebenfalls zur T-Zell Depletion eingesetzt wird (35). CD52 ist ein Oberflächenpeptid, welches mittels eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker) in der Zellmembran verankert ist. Die Funktion dieses Oberflächenpeptids ist bisher weitestgehend unklar, allerdings wird es sehr stark auf B- und T-Lymphozyten exprimiert und zu einem geringeren Anteil auch auf Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (36, 37). Unter den Lymphozyten findet man es sowohl auf gesunden als auch malignen Zellen, wobei die Expression auf T-Zellen stärker ausgeprägt ist als auf B-Zellen (38). Als günstig für den Einsatz von Alemtuzumab zur T-Zell Depletion erweist sich außerdem, dass CD52 nicht auf CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird und diese somit durch die Alemtuzumab-Gabe nicht zerstört werden (39). Der Antikörper

bewirkt bei seinen Zielzellen eine Lyse, die auf zwei verschiedene Arten stattfinden kann: komplementvermittelt oder zellulär (mithilfe von Antikörpern) (40, 41). Alemtuzumab wurde zwar ursprünglich für die T-Zell Depletion entwickelt (42), wird inzwischen aber auch in der Behandlung maligner Erkrankungen wie der CLL oder immunologischer Erkrankungen wie Multipler Sklerose eingesetzt (31, 39). Im Transplantationskontext zeigte sich eine hohe Effektivität in Bezug auf die T-Zell Depletion und einer damit verbundenen signifikant verringerten Inzidenz von akuter und chronischer GvHD. Allerdings war auch der Einsatz von Alemtuzumab mit einer langsameren Rekonstitution von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und einer damit einhergehenden höheren Infektionsrate (insbesondere CMV-assoziierte Erkrankungen) verbunden. Ein Vorteil der Nutzung von Alemtuzumab gegenüber anderen Methoden der T-Zell Depletion könnte jedoch darin bestehen, dass die gleichzeitig stattfindende Depletion von B-Lymphozyten zu einer geringeren Rate an EBV-Reaktivierungen führen kann. (43)

Ein verringerter Anti-Tumoreffekt mit einer erhöhten Rezidiv-Wahrscheinlichkeit konnte unter Alemtuzumab ebenfalls nachgewiesen werden (34, 42).

#### **2.4.2 Adoptive Immuntherapie**

Um die Immunrekonstitution nach der Transplantation zu verbessern und einen zusätzlichen GvL-Effekt zu erzeugen, kann man dem Patienten Spenderlymphozyten infundieren (englisch: Donor Lymphocyte Infusions, DLI). Diese Art der Therapie wurde erstmals erfolgreich bei rezidivierten CML-Patienten 1988 angewandt (10). In der Zwischenzeit wurden viele Studien durchgeführt, um die Effektivität und Sicherheit von DLI zu testen. Es zeigte sich durchgehend ein signifikanter GvL-Effekt, wobei dieser unter anderem von der Grunderkrankung abhängig ist (myeloische Erkrankungen zeigen ein besseres Ansprechen auf DLI als lymphatische Erkrankungen). Der GvL-Effekt kann mit der Entwicklung einer GvHD einhergehen. Das Risiko dafür scheint zumindest teilweise mit dem Zeitpunkt der DLI-Gabe zusammenzuhängen: Erhielten Patienten an Tag 30 nach der Transplantation DLI, so war die GvHD-Rate höher als bei den Patienten, denen die DLI an Tag 45 nach Transplantation gegeben wurde. Später nach der Transplantation scheint der Zeitpunkt allerdings keinen Einfluss mehr auf die Entwicklung einer GvHD zu haben (44, 45). Gegenstand aktueller Forschung ist die bestmögliche Zusammensetzung der DLI. In mehreren Studien konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Patienten, die CD8 depletierte DLI erhalten, weniger häufig an GvHD erkranken, wobei der GvL-Effekt erhalten bleibt (46-48).

### 2.4.3 Mainzer Transplantationsstudie

An der Universitätsmedizin Mainz wurde eine klinische Phase I-II Studie zur allogenen Transplantation durchgeführt. Diese Studie beinhaltete eine *in vivo* TCD durch Alemtuzumab, eine dosisreduzierte Konditionierung, sowie die Gabe CD8 depletierter DLI nach der Transplantation für eine schnellere Immunrekonstitution (für das genaue Studienprotokoll: siehe Methodenteil) (49). Die DLI-Gabe erfolgte prophylaktisch, unabhängig von Chimärismus (Anteil der Spenderzellen an den hämatopoetischen und lymphatischen Zellen des Transplantationsempfängers) und Remissionsstatus nach dem raschen Absetzen der Immunsuppression. Patienten erhielten jedoch keine DLI, wenn sie eine spontane akute GvHD stärker als Grad I entwickelten bzw. wurde die DLI-Gabe nicht fortgesetzt bei Auftreten einer DLI-assoziierten GvHD stärker als Grad I. Rund 50% der Patienten erhielten keine Spenderlymphozyten aufgrund von GvHD, die allerdings meistens nicht stärker als Grad II und auf die Haut beschränkt war. Im Anschluss an die DLI-Gabe wurden deren Toxizität, sowie die Immunrekonstitution und der linienspezifische Spenderchimärismus untersucht (5).

Bei Anwendung eines dosisreduzierten (nicht-myeloablativen) Konditionierungsregimes kommt es häufig nach der Transplantation nicht zur Ausbildung eines kompletten Spenderchimärismus. Stattdessen entsteht ein gemischter Chimärismus im Empfänger, das heißt, dass sowohl persistierende Empfänger- als auch Spenderzellen nachweisbar sind. Dabei handelt es sich um ein Stadium gegenseitiger Toleranz, was zwar einerseits mit einer geringeren Rate an GvHD verbunden ist, aber auch die Rezidivgefahr erhöhen kann (50). In der Mainzer Transplantationsstudie konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe CD8 depletierter DLI ein gemischter Chimärismus zuverlässig in einen kompletten Spenderchimärismus konvertiert wird. Wie erhofft, ließ sich im Anschluss an die DLI ein deutlicher Anstieg an zirkulierenden CD4<sup>+</sup> Zellen in den Patienten messen. Dies war auch mit einer verbesserten CMV-spezifischen T-Zellantwort verbunden. Einige Patienten entwickelten zwar eine GvHD nachdem sie Spenderlymphozyten erhalten hatten, aber das liegt zumindest teilweise in dem speziellen Studiendesign begründet: Erstens erfolgte die DLI-Gabe zu einem recht frühen Zeitpunkt nach der Transplantation und zweitens bekamen die Patienten steigende Dosen von Spenderlymphozyten infundiert, so lange bis keine Zellen mehr verfügbar waren oder die Patienten eine GvHD entwickelten.

## **2.5 CD52- negative Zellen**

Wie oben besprochen richtet sich der monoklonale Antikörper Alemtuzumab gegen das Oberflächenpeptid CD52, welches physiologischerweise auf allen Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird (51). Allerdings finden sich nach Alemtuzumab-Behandlung CD52- negative Zellen im Patientenblut. Dies wurde unter anderem von Brett et al. in Patienten beschrieben, welche Alemtuzumab zur Behandlung ihrer Rheumatoiden Arthritis erhalten hatten. Sie wiesen das Vorhandensein CD52-negativer B-Zellen bis 3 Monate nach der Behandlung und CD52-negativer T-Zellen (sowohl in der CD4- als auch in der CD8- Population) bis mindestens 20 Monate nach der Behandlung nach (6). Auch nach Alemtuzumab-basierter Stammzelltransplantation können beim Empfänger CD52-negative T-Zellen nachgewiesen werden (51). Im Rahmen der Mainzer Transplantationsstudie wurde sogar die Persistenz CD52-negativer T-Zellen bis zu 3 Jahre nach der Transplantation gezeigt, wobei diese größtenteils oder vollständig vom Spender stammen (Dies wurde mittels Chimärismusanalysen untersucht) (5),(51). Weiterführende Untersuchungen in unserem Labor führten zur Beschreibung weiterer Zellpopulationen mit CD52-Negativität nach Alemtuzumab-Behandlung, unter anderem NK-Zellen (52) und regulatorische T-Zellen (Treg): Eva-Maria Wagner (ASH 2012; Originaltitel: Functionally Altered GPI-Anchor Negative Treg Following Alemtuzumab-Based T-Cell Depletion Are Associated with Acute GVHD) und Lukas Schäfer (DGHO 2012; Originaltitel: Klinische Evidenz für Funktionell beeinträchtigte Treg nach Alemtuzumab-basierter allogener HSZT)

## **2.6 Regulatorische T-Zellen**

Bei den regulatorischen T-Zellen handelt es sich um eine Subpopulation von T-Zellen, die in der Lage ist, die angeborene und adoptive Immunität zu kontrollieren, indem sie Immunreaktionen herunterreguliert. Die Existenz dieser Zellen wurde erstmals postuliert, nachdem man bei Mäusen, die am 3. Lebenstag thymektomiert wurden, das Auftreten von Autoimmunerkrankungen beobachtete (Sie entwickelten organspezifische Erkrankungen wie Autoimmungastritis, Thyreoiditis, Diabetes und Chronisch-Entzündliche Darmerkrankungen) (53). Es wurde vermutet, dass diesen Mäusen eine bestimmte T-Zell Population fehle, welche normalerweise die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen kontinuierlich unterdrücke. Und tatsächlich fanden Sakaguchi et al. Zellen, die durch die gleichzeitige Expression von CD4 und CD25 (entspricht der  $\alpha$ -Kette des IL-

2-Rezeptors) gekennzeichnet waren und nach deren Depletion sich gleichsam organ-spezifische Autoimmunerkrankungen in Mäusen entwickelten. Umgekehrt konnte auch ein protektiver Effekt dieser Zellen bei adoptivem Transfer, welcher die Entstehung der Autoimmunerkrankungen verhinderte, gezeigt werden (54).

Eine entsprechende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Population wurde im Menschen 2001 durch Stephens et al. nachgewiesen. Sie zeigten, dass diese Zellen in der Lage sind sowohl die Proliferation als auch die Zytokinproduktion in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Responder T-Zellen zu hemmen. Außerdem beobachteten sie eine anergische Reaktion der Zellen bei Stimulation über den T-Zellrezeptor (TCR), wohingegen eine Proliferation nach der Zugabe von IL-2 einsetzte (55). Allerdings scheinen, im Gegensatz zu Mäusen, nicht alle humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen auch regulatorische Eigenschaften zu besitzen. So beschrieben Baecher-Allan et al. eine Subpopulation, die sich durch eine besonders hohe CD25-Expression (CD25<sup>high</sup>) auszeichnet. Sie wiesen nach, dass nur diese Population (welche 1-2% der zirkulierenden CD4<sup>+</sup> Zellen beim Menschen ausmacht) eine effektive Hemmung der Responder-Zell-Proliferation bewirken (56).

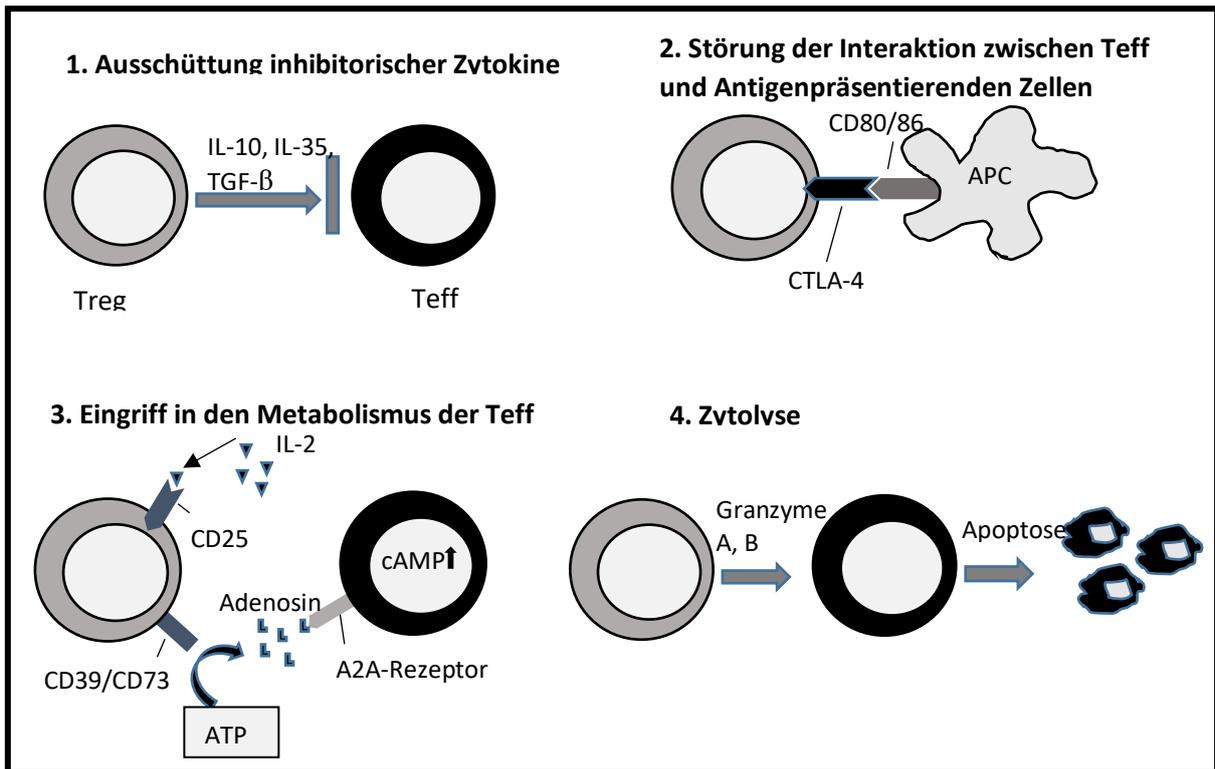
In den folgenden Jahren wurde nach Möglichkeiten gesucht, die humanen Treg weiter zu charakterisieren. Dabei fand man unter anderem eine erhöhte Expression der Oberflächenrezeptoren CTLA-4 und GITR (57). Allerdings werden diese Marker nicht exklusiv auf Treg exprimiert, sondern, wie CD25, auch auf aktivierten Effektor T-Zellen (Teff) hochreguliert und sind damit nur bedingt tauglich zur Identifizierung von Treg (58).

Auf der weiteren Suche nach der molekularen Basis für die Generation und Wirkungsmechanismen von Treg stieß man schließlich auf den Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3). Mutationen in dem dafür kodierenden Gen stellten sich als ursächlich heraus für die lymphoproliferative Erkrankung, die man in den sogenannten Scurfy-Mäusen beobachtet. Auch beim Menschen existiert ein Krankheitsbild, IPEX, welches gekennzeichnet ist durch Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie und dem ebenfalls eine FoxP3-Mutation zugrunde liegt (59). Diese Erkrankungen ähneln in ihrer Ausprägung sehr stark den Symptomen, die man in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> depletierten Mäusen fand (siehe oben), so dass die Hypothese aufkam, dass FoxP3 eine wichtige Rolle für die Treg-Entwicklung und Funktion spielen könnte. Dies bestätigte sich durch eine hohe FoxP3-Expression CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen, im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen. Auch entwickelte sich bei zuvor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen durch eine Transfektion mit FoxP3 ein regulatorischer Phänotyp (58, 60). Leider kann

auch FoxP3 in geringen Mengen von anderen aktivierten Zellen exprimiert werden, so dass es zwar bis heute der beste Treg-Marker ist, den wir zur Verfügung haben, die Suche nach geeigneten Markern aber fortgeführt werden musste und bis heute nicht abgeschlossen ist. Eine weitere Identifizierungsmöglichkeit für Treg, die im Rahmen dieser Forschungen gefunden wurde, ist die Abwesenheit des Oberflächenmoleküls CD127 (61-63).

Die regulatorischen T-Zellen des Menschen lassen sich weiter unterteilen in natürliche Treg (nTreg) und induzierte Treg. Die nTreg werden im Thymus gebildet und gelangen von dort in periphere Gewebe und Lymphknoten. Induzierte Treg können peripher *in vivo* (pTreg) bzw. *in vitro* (iTreg) aus CD4<sup>+</sup> Zellen unter dem Einfluss von IL-2 und TGF- $\beta$  entstehen (64).

Betrachtet man die Suppressionsmechanismen, die Treg nutzen, um ihre Zielzellen zu beeinflussen, lassen sich grob vier verschiedene Gruppen ausmachen: Ausschüttung inhibitorischer Zytokine; Störung der Interaktion zwischen Teff und Antigenpräsentierenden Zellen; Eingriffe in den Metabolismus der Teff; Zytolyse. Die inhibitorischen Zytokine, welche von Treg gebildet und ausgeschüttet werden, sind IL-10, IL-35 und TGF- $\beta$  (65). Eine starke Expression des Oberflächenmoleküls CTLA-4 auf Treg beeinträchtigt die Interaktion zwischen Teff und APC. CTLA-4 bindet mit hoher Affinität an CD80/86 auf APC, welches normalerweise mit CD28 auf der Teff-Oberfläche interagiert, um zusätzlich zur Aktivierung durch den T-Zell Rezeptor ein kostimulatorisches Signal zu übermitteln. Darüber hinaus bewirken Treg gleichzeitig eine verminderte Expression von CD80/86 auf der Oberfläche von APC (66). Für den Eingriff in den Metabolismus der Teff sind zwei Oberflächenmoleküle auf den Treg von besonderer Bedeutung: CD39 und CD25. CD39 ist eine Ektonukleotidase, die letztendlich zur Generation von freiem Adenosin aus ATP führt. Das extrazelluläre Adenosin kann an den A2A-Rezeptor auf der Teff-Oberfläche binden und in diesen einen intrazellulären Anstieg von cAMP auslösen. Dies wiederum führt zu verminderter Proliferation und Zytokinproduktion (67). Durch die hohe Expression von CD25 können Treg große Mengen IL-2 konsumieren, welches den Teff somit entzogen wird. Die Relevanz dieses Mechanismus ist jedoch umstritten (68). Eine Zytolyse in den Zielzellen wird durch die Ausschüttung von Granzyme A und B bewirkt, welches in den Teff Apoptose auslöst (69).



**Abbildung 1: Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen** (Modifiziert nach (69))  
 ATP= Adenosintriphosphat; cAMP= zyklisches Adenosinmonophosphat

## 2.6.1 Expression von Oberflächenmolekülen durch Treg

Neben den bereits oben erwähnten auf Treg exprimierten Oberflächenmolekülen wurde noch eine ganze Reihe weiterer „Marker“ identifiziert, welche durch Treg exprimiert werden können und eine Rolle spielen für die Treg-Funktion/ -Aktivierung oder für das Treg-Homing.

### 2.6.1.1 CD44

CD44 ist ein Adhäsionsmolekül, dessen vorrangiger Bindungspartner Hyaluronsäure darstellt. Es wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, unter anderem von Leukozyten, Fibroblasten, epithelialen/mesodermalen und neuroektodermalen Zellen. Zudem konnte eine CD44-Expression bei verschiedenen Tumorstammzellen gefunden werden (70). Eine nachgewiesene stark positive Korrelation zwischen FoxP3- und CD44-Expression legt nahe, dass sich dieser Marker auf einem großen Anteil von Treg finden lässt (71). Funktionell scheint CD44 im Zusammenhang mit der Suppressionsfähigkeit der Treg zu stehen, da eine CD44-Kostimulation auf diesen Zellen die Produktion von IL10 und die Expression von TGF-β hochreguliert (72).

### **2.6.1.2 CXCR3**

CXCR3 gehört zu der Gruppe der Chemokinrezeptoren und wird vor allem auf aktivierten Th1-Zellen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert, so dass diese mit Bindung der entsprechenden Chemokinliganden (CXCL9, CXCL10 und CXCL11) zum Ort der Inflammation migrieren können (73). Erst in jüngerer Zeit fand man heraus, dass dieser Rezeptor ebenso von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und auch hier eine wichtige Rolle für die zielgerichtete Bewegung spielt (74).

### **2.6.1.3 CD62L**

CD62L, auch bekannt als L-Selectin, ist ein Zelladhäsionsmolekül aus der Gruppe der Selektine, welches vorrangig durch T-Zellen exprimiert wird. Es vermittelt das T-Zell-Homing in sekundäre lymphatische Organe durch Interaktion mit seinen Liganden, die auf Endothelzellen des lymphatischen Gewebes exprimiert werden. Hierdurch kommt es schließlich zum Antigenkontakt der T-Zelle und zur konsekutiven Herunterregulierung der CD62L-Expression, woraus sich erklären lässt, dass naive T-Zellen und zentrale Gedächtnis-T-Zellen CD62L exprimieren, wohingegen Effektor T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen CD62L negativ sind (75).

### **2.6.1.4 CD45RA**

CD45RA ist eine Isoform der Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C. Während CD45RO auf Gedächtnis T-Zellen exprimiert wird, findet man CD45RA auf naiven Zellen. Auch für Treg konnte dieser Zusammenhang in Bezug auf den Reifegrad nachgewiesen werden (61).

### **2.6.1.5 HLA-DR**

HLA-DR, ein MHC-Klasse II-Molekül, wird vorrangig von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert und bindet an den T-Zell Rezeptor. Auch auf rund 20-30% der Treg lässt sich HLA-DR nachweisen, wobei diese Treg im Gegensatz zu den DR-negativen Zellen funktionelle Unterschiede aufweisen. So weisen sie deutlich höhere suppressive Fähigkeiten und eine signifikant höhere FoxP3-Expression auf. Die Suppression von Effektor-T-Zellen findet zudem kontakt-abhängig statt, Il-10 wird hingegen nicht produziert (76).

### **2.6.1.6 CCR5**

CCR5 ist ein Chemokinrezeptor, welcher unter Anderem auf T-Zellen, NK-Zellen, Dendritischen Zellen und Makrophagen zu finden ist. Zu seinen Liganden zählen die

Zytokine CCL3, CCL4 und CCL5, welche wiederum selber von T-Zellen gebildet werden. Interessanterweise scheinen insbesondere Treg über das CCR5-vermittelte Signal zu migrieren. So konnte bereits in mehreren Tumormodellen gezeigt werden, dass eine CCR5-Expression durch einen Tumor zu einer gesteigerten Treg-Infiltration in das Tumorgewebe und einer damit einhergehenden verminderten Anti-Tumor-Reaktion führt. Ein Knock-Out von CCR5 im Maus-Model führte hingegen zu einer Reduktion von Treg und einem erhöhten Vorkommen von Effektor-T-Zellen im Tumorgewebe (77, 78).

### **2.6.2 Regulatorische T-Zellen und GvHD**

Ihre immunsuppressive Funktion ließ vermuten, dass regulatorische T-Zellen auch im Kontext der GvHD eine wichtige Rolle spielen. Dieser Zusammenhang wurde zunächst in murinen Transplantationsmodellen getestet, wobei sich nach Depletion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen aus dem Allograft eine verstärkte GvHD zeigte. Dies äußerte sich in einem früheren Auftreten der Erkrankung und einem früheren Versterben der Mäuse. Der gegenteilige Effekt trat ein bei zusätzlicher Gabe von *ex vivo*-expandierten und aktivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen (vom Spender) auf: Es kam zu einem verzögerten Auftreten bzw. gänzlichem Fehlen von GvHD (7, 79, 80). Auf zellulärer Ebene fand sich nach diesem Transfer eine deutliche Reduktion der Teff, so dass der hier zugrundeliegende Mechanismus eine Hemmung der frühen Expansion alloreaktiver T-Zellen in lymphatischen Organen und typischen GvHD-Zielorganen (wie der Leber) zu sein scheint (81). Die positiven Effekte der Transplantation blieben dennoch erhalten. Es wurde kein verminderter GvL-Effekt beobachtet und auch die Immunrekonstitution wurde durch die Treg-Gabe nicht beeinflusst (82). Die erste Studie zur Infusion *ex vivo*-expandierter allogener Treg im Menschen wurde 2010 von Brunstein et al. veröffentlicht und zeigte ebenfalls eine Reduktion der GvHD-Inzidenz (83). Seitdem wurden mehrere Phase I/II Studien durchgeführt, die die Sicherheit und Effektivität bezüglich der Prävention und Therapie von akuter oder chronischer GvHD bei adoptivem Treg-Transfer nachweisen konnten (84, 85). Auch beim Menschen zeigte sich bei signifikanter Senkung der GvHD-Rate ein dennoch erhaltener GvL-Effekt (86).

### 3. Material

#### 3.1 Geräte und Software

Autoklav, Systec V-150	KSG Sterilisatoren, Olching Systec GmbH, Wettenberg
Brutschrank HeraCell 150	Heraeus, Langenselbold
Durchflusszytometer FACS Canto II mit FACS Diva Software (durchflusszyto- metrische Analysen)	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer Aria IIu von BD mit Software FACS Diva 6.13 (für FACS Sort)	BD Biosciences, Heidelberg
Eismaschine	Scotsman, Vernon Hills (USA)
FlowJo Version 10.1	FlowJo LLC, Ashland (USA)
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific, Waltham (USA)
GraphPad Prism Version 5	GraphPad Software Inc., San Diego (USA)
Kühl- und Gefrierkombination (4 °C/ -20 °C)	Liebherr, Bulle (Schweiz)
Kryo-Einfriergerät Qualifreeze	Qualilab, Olivet (Frankreich)
Mikroliterpipetten Transferpette 0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Brand, Wertheim
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Pipettiergerät, Pipetboy	Integra Biosciences, Biebertal
Sterile Werkbank HERASafe HS18	Kendro, Hanau
Stickstoff-Kryobank MVE 800	Chart Industries, Garfiel Heights (USA)
Stickstoff-Tank Taylor-Wharton XL-180	Tec Lab, Taunusstein
Vortexer MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen: Heraeus Multifuge 1S-R	Kendro, Langenselbold
Heraeus Megafuge 16R	Kendro, Langenselbold
VWR Ministar silverline	VWR international, Darmstadt

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Cryoröhrchen, Nunc	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalpipetten, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon-Tube 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filtersystem Steri-Cup	Merck Millipore, Billerica (USA)
Gewebekulturplatten 6-, 24-, 96-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Handschuhe	Semperit AG Holding, Wien
Leucosep-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
0,5-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl	
Reaktionsgefäße (Eppis) 500 µl/1500 µl	Eppendorf, Hamburg
Zellfilter 70 µm, 30 µm	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturflaschen 200 ml ohne Filter	Greiner Bio-One, Frickenhausen

### 3.3 Glaswaren

Bechergläser	Schott AG, Mainz
200 ml, 500 ml, 1000 ml	
Deckgläser 24x32 mm	Menzel, Braunschweig
Glasflaschen (1000 ml)	Schott AG, Mainz
Zählkammer Fuchs-Rosenthal	Marienfeld, Lauda-Königshofen

### 3.4 Chemikalien

Aqua Dest.	B. Braun, Melsungen
AIM-V Medium	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
BSA (Bovines Serum-Albumin)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Heparin	Ratiopharm (Ulm)
Human-Albumin 20%	CSL Behring, King of Prussia (USA)

Humanserum	Gepooltes Serum gesunder Spender, Blutbank Universitätsmedizin Mainz
IL-2	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Lymphozyten-Trennmedium 1077	Histopaque- Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
OKT3 (Muromab CD3)	Janssen Cilag, Neuss
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS (Phosphate-buffered saline)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Perm/Wash Puffer	BD Biosciences, Heidelberg
Trypanblau	Merck, Darmstadt
X-Vivo 15 Zell-Medium	Lonza, Verviers (Belgien)

### 3.5 Kits

Anti-Human FoxP3 Staining Set	eBioscience, San Diego (USA)
-------------------------------	------------------------------

### 3.6 Zusammensetzung von Medien, Puffern und Lösungen

(Die Lagerung erfolgte jeweils bei 4 °C)

Einfriermedium	150 ml X-Vivo-15 100 ml 20%iges Human-Albumin 2500 U Heparin (Kurz vor Verwendung wurde dem Medium zusätzlich 10% DMSO zur Kryokonservierung zugegeben)
FACS-Puffer	500 ml PBS 0,5 g BSA (sterile Filtration mittels Steri-Cup)
FACS-Fix	243 ml PBS 6,8 ml 37%iges Formaldehyd
MACS-Puffer	500 ml PBS 2,5 g BSA 2 mM EDTA (pH 8) (sterile Filtration mittels Steri-Cup)
Kulturmedium	AIM-V 10% Humanserum
PBS/EDTA	500 ml PBS 2 ml EDTA
Trypanblau (Stammlösung)	2,0 g Trypanblau 1000 ml H <sub>2</sub> O
Trypanblau (Gebrauchslösung)	75 ml Trypanblau Stammlösung 150 mM NaCl

**Tabelle 2: Zusammensetzung von Medien, Puffern und Lösungen**

### 3.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie

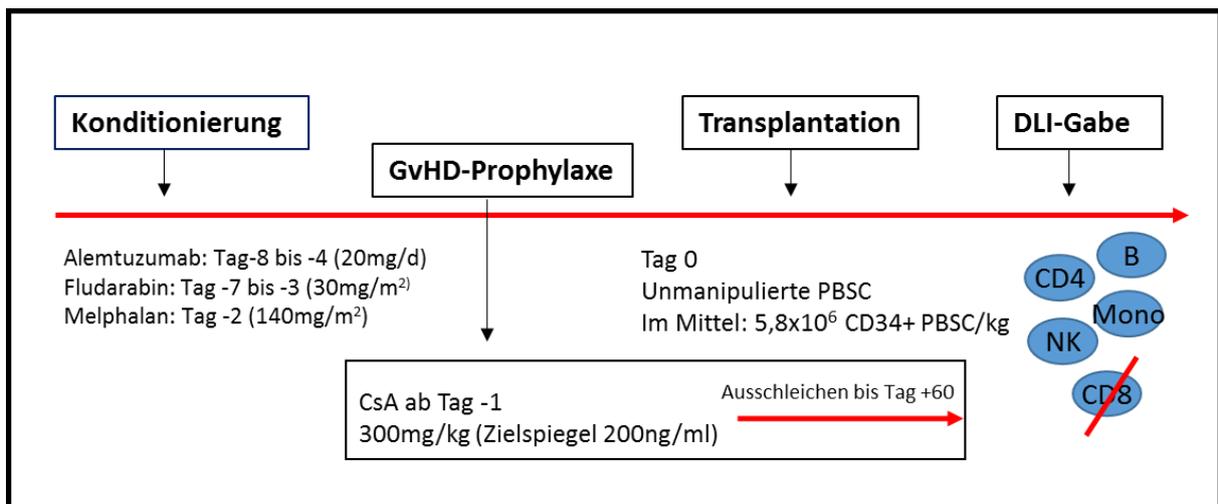
Bezeichnung	Fluorochrom	Hersteller	Eingesetzte Menge
IgG	FITC/PE	Beckman Coulter, Krefeld	2,5 µl
IgG	APC	Beckman Coulter, Krefeld	2,5 µl
IgG	APC-H7	BD Biosciences, Heidelberg	2,5 µl
IgG	V450	BD Biosciences, Heidelberg	2,5 µl
CCR5	APC	Biolegend, San Diego (USA)	20 µl
CD3	V450	BD Biosciences, Heidelberg	2 µl (1:5 verdünnt)
CD4	FITC	Beckman Coulter, Krefeld	5 µl
CD4	PE	Beckman Coulter, Krefeld	5 µl
CD4	APC	BD Biosciences, Heidelberg	5 µl
CD4	APC-H7	BD Biosciences, Heidelberg	5 µl
CD25	PE	Beckman Coulter, Krefeld	10 µl
CD25	V450	BD Biosciences, Heidelberg	2 µl
CD39	APC	BD Biosciences, Heidelberg	2,5 µl
CD44	APC	Biolegend, San Diego (USA)	2 µl (1:100 verdünnt)
CD45RA	APC	Miltenyi Biotec, Teterow	5 µl
CD52	PE	AbD Serotec, Martinsried	5 µl
CD52	Alexa Fluor 647	AbD Serotec, Martinsried	2 µl
CD62L	APC	Biolegend, San Diego (USA)	0,5 µl
CD127	FITC	eBioscience, San Diego (USA)	5 µl
CTLA-4	APC	Biolegend, San Diego (USA)	10 µl
CXCR3	APC	BD Biosciences, Heidelberg	5 µl
FoxP3	FITC	eBioscience, San Diego (USA)	10 µl
GITR	APC	Biolegend, San Diego (USA)	5 µl
Granzyme A	Alexa Fluor 647	Biolegend, San Diego (USA)	2 µl
HLA-DR	APC	BD Biosciences, Heidelberg	1 µl

CFSE	FITC	ThermoFisher	Vgl. Kapitel 4.7.1
------	------	--------------	--------------------

**Tabelle 3: Verwendete FACS-Antikörper**

### 3.8 Das Patientenkollektiv

Die Grundlage für das untersuchte Patientenkollektiv bildete die unter **2.4.3** beschriebene Mainzer Transplantationsstudie (interne Studiennummer: #177, Ethik-Nummer: 837. 175. 03 (3837)), wobei das hier dargestellte Studienprotokoll angewandt wurde:



**Abbildung 2: Studienprotokoll der Mainzer Transplantationsstudie**

Die erste DLI-Gabe erfolgte prophylaktisch nach erfolgreichem Ausschleichen der Immunsuppression und in Abwesenheit von aGvHD stärker als Grad I zwischen Tag +60 und Tag +120. Bei ausbleibender GvHD erfolgten weitere DLI-Gaben in steigender Dosierung. In die Studie eingeschlossen wurden Patienten mit hämatologischen malignen Erkrankungen, die auf vorausgegangene Standardbehandlungen nur unzureichend angesprochen hatten bzw. ein hohes Rezidivrisiko zeigten und bei denen gleichzeitig Kontraindikationen für eine myeloablative HSZT bestanden (49). Der Einschluss in die Mainzer Transplantationsstudie endete im Dezember 2011. Von mir untersuchte Patienten, die nach 2011 transplantiert wurden, erhielten jedoch ebenfalls Konditionierungstherapie, Transplantation und Immunsuppression, wie im Studienprotokoll vorgesehen (interne Studiennummer für die Blutentnahmen: #808; Ethiknummer: 832. 227. 05 (4885)). Lediglich die DLI-Gabe erfolgte außerhalb der Studie nicht mehr prophylaktisch, sondern präemptiv, das heißt die Patienten erhielten nur DLI bei

bestimmten Triggern, wie zum Beispiel fallendem Chimärismus oder Rezidiv. Außerdem bekamen sie statt CD8-depletierten DLI unmanipulierte Spenderlymphozyten infundiert.

Für die Untersuchungen wurde den Patienten mit ihrem ausdrücklichen Einverständnis zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation jeweils 50 ml venöses Blut abgenommen. Die Blutentnahmen erfolgten im Mittel alle 30 Tage, zudem wurden bei Auftreten einer GvHD zusätzliche Proben entnommen. Insgesamt wurden in dieser Arbeit die Proben von 40 Patienten untersucht.

In der nachfolgenden Tabelle werden die Charakteristika der untersuchten Patienten dargestellt:

<u>ID</u>	<u>Alter</u> <u>bei</u> <u>Tx</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Erkrankung</u>	<u>Spender</u>	<u>HLA-</u> <u>Kompatibilität</u>	<u>DLI</u>	<u>GvHD</u>
#1	68	m	MPN	unverwandt	HLA-ident	1x	nach DLI: aGvHD, cGvHD
#2	62	m	MPN	unverwandt	HLA-C different	2x	aGvHD
#3	43	w	MM	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#4	46	m	MM	unverwandt	HLA-ident	1x	nach DLI: cGvHD
#5	50	m	sek. AML	unverwandt	HLA-A/DQB1 different	keine	aGvHD, cGvHD
#6	73	m	AML	unverwandt	HLA-C different	keine	aGvHD
#7	67	m	MM	unverwandt	HLA-ident	2x	aGvHD, nach DLI: aGvHD, cGvHD
#8	68	m	AML	unverwandt	HLA-ident	1x	nach DLI: aGvHD
#9	55	w	MM	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD, cGvHD
#10	51	w	MPN	unverwandt	HLA-C different	keine	aGvHD
#11	60	m	MPN	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#12	63	w	MPN	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD, cGvHD
#13	52	w	NHL	verwandt	HLA-ident	2x	keine
#14	69	m	sek. AML	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#15	57	m	NHL	unverwandt	HLA-A different	keine	aGvHD
#16	62	w	NHL	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD

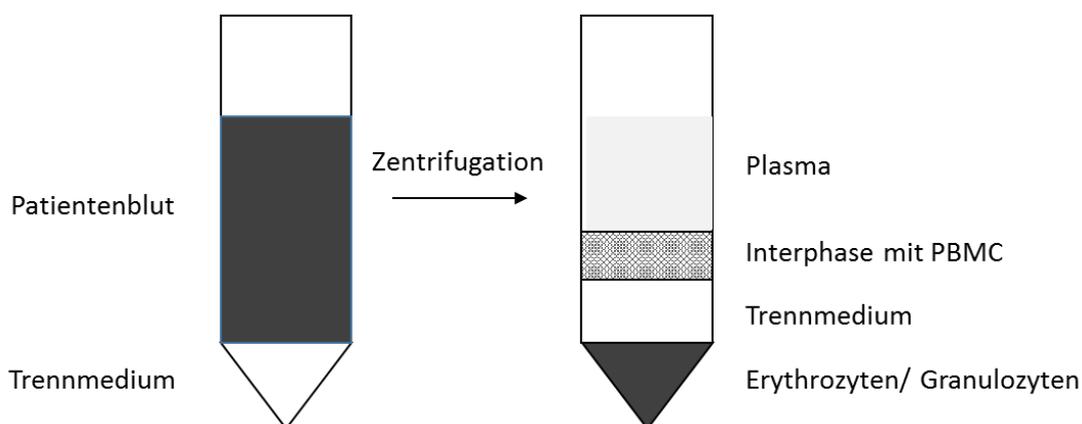
#17	59	m	AML	unverwandt	HLA-C different	keine	aGvHD
#18	55	w	NHL	unverwandt	HLA-A different	keine	aGvHD
#19	39	w	MDS	verwandt	HLA-ident	2x	keine
#20	56	w	AML	verwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#21	52	m	NHL	verwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#22	60	m	NHL	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#23	53	m	MM	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#24	51	w	MPN	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#25	53	m	NHL	verwandt	HLA-ident	keine	aGvHD, cGvHD
#26	67	m	MDS	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#27	46	m	MM	unverwandt	HLA-C different	2x	aGvHD, nach DLI: aGvHD/cGvHD (Overlap-Syndrom)
#28	27	w	Morbus Hodgkin	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#29	52	w	MM	unverwandt	HLA-ident	1x	nach DLI: aGvHD
#30	62	w	MPN	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD, aGvHD/cGvHD (Overlap-Syndrom)
#31	65	w	AML	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#32	58	m	AML	verwandt	HLA-ident	1x	nach DLI: cGvHD
#33	66	m	MPN	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#34	67	w	AML	unverwandt	HLA-C different	keine	aGvHD, cGvHD
#35	60	w	MDS	unverwandt	HLA-ident	keine	aGvHD
#36	57	w	AML	unverwandt	HLA-C different	keine	aGvHD, cGvHD
#37	75	m	AML	unverwandt	HLA-ident	1x	nach DLI: aGvHD
#38	58	m	MPN	unverwandt	HLA-ident	keine	keine
#39	58	m	MM	unverwandt	HLA-ident	1x	aGvHD, nach DLI: cGvHD
#40	66	m	MDS	unverwandt	HLA-ident	1x	nach DLI: aGvHD, cGvHD

**Tabelle 4: Charakteristika der untersuchten Patienten**

## 4. Methoden

### 4.1 Isolation peripherer mononukleärer Zellen

Um die so genannten peripheren mononukleären Blutzellen (englisch: peripheral blood mononuclear cells, PBMC) aus dem Patientenblut von den übrigen Blutbestandteilen zu trennen, bedient man sich der Methode der Dichtegradientenzentrifugation. Diese erfolgt mittels eines Trennmediums, welches mit einer Dichte von 1,077 g/ml dichter ist als Lymphozyten und Monozyten, jedoch eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten aufweist. Dadurch zeigen sich nach der Zentrifugation mehrere Schichten, wobei sich Erythrozyten und Granulozyten ganz unten ablagern und PBMC als Interphase zwischen dem Trennmedium und dem Überstand (enthält Plasma/Thrombozyten) sichtbar werden.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMC**

Wir gaben dafür zunächst 15 ml Histopaque™ in ein Leucosep™-Röhrchen und zentrifugierten kurz, so dass sich das Medium unter der im Röhrchen enthaltenen Fritte befand. Danach gaben wir das heparinisierte Patientenblut hinzu und füllten mit PBS/EDTA auf 50 ml auf. Anschließend folgte die eigentliche Dichtegradientenzentrifugation für 20 min bei 2300 rpm ohne Beschleunigung und ohne Bremse, wodurch die oben beschriebene Auftrennung der Blutbestandteile erfolgte. Die Interphase wurde vorsichtig abpipettiert, in einem frischen Röhrchen mit PBS/EDTA auf 50 ml verdünnt und erneut zentrifugiert für 8 min bei 1800 rpm. Um das Histopaque™-Medium gründlich auszuwaschen folgten zwei weitere Wasch-/Zentrifugationsschritte, wobei jeweils für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert wurde (87). Anschließend wurden die Zellen gezählt und entweder direkt weiterbearbeitet oder zur Aufbewahrung für spätere Analysen kryokonserviert.

## 4.2 Zählen von Zellen

Um die Anzahl der Zellen zu bestimmen, wurde das Zellpellet in PBS/EDTA resuspendiert und eine kleine Menge der Suspension entnommen. Diese wurde mit Trypanblau verdünnt und anschließend in eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop zählten wir anschließend mindestens 3 Quadranten aus, bestimmten daraus den Durchschnitt und berechneten die Anzahl der Zellen/ml nach folgender Formel:

$$\text{mel: } \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1000}{\text{Tiefe der Zählkammer (0,2mm)}}$$

Das Trypanblau hilft hierbei die Vitalität der Zellen zu bestimmen, da es nur Zellen anfärbt, die keine intakte Zellmembran mehr besitzen. So konnten wir sichergehen, dass nur lebende Zellen gezählt wurden.

## 4.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurde das Einfriermedium (siehe Tabelle 3.6) frisch mit 10% DMSO versetzt. Das Zellpellet wurde in jeweils 1 ml dieser Mischung aufgenommen und auf Kryoröhrchen verteilt. Aufgrund der zelltoxischen Wirkung des DMSO bei Raumtemperatur mussten diese anschließend schnell gekühlt werden. Dafür wurden sie direkt in spezielle Kryo-Einfrierboxen gestellt, welche mit Isopropanol gefüllt sind und so eine kontrollierte Abkühlung von 1 °C pro Minute gewährleisten. Die Kühlung erfolgte über 1 bis 2 Tage im -80 °C Tiefkühler. Für die dauerhafte Aufbewahrung wurden die Proben anschließend in unsere Stickstoff-Bank überführt, wo sie bei ca. -196 °C gelagert wurden.

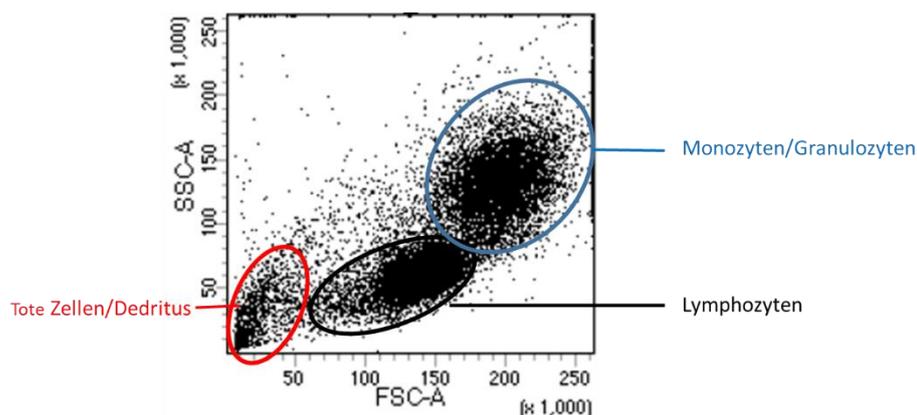
## 4.4 Auftauen der Zellen

Um die kryokonservierten Zellen analysieren zu können, wurden sie zunächst im Wasserbad bei 37 °C für ca. 2 Minuten aufgetaut. Anschließend musste zügig das toxische DMSO ausgewaschen werden. Dafür wurde die aufgetaute Zellsuspension in 10 ml PBS/EDTA aufgenommen und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und es erfolgte ein zweiter Waschschriff mit Zentrifugation. Danach konnten die Zellen gezählt und weiterbearbeitet werden.

## 4.5 Durchflusszytometrie

### 4.5.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technologie zur Analyse von Zellen, wobei diese in hoher Geschwindigkeit durch eine Messzelle fließen und von einem Laserstrahl angeregt werden. In unserem Fall wurden die Zellen zunächst mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen verschiedene Antigene gefärbt (siehe Abschnitt 4.5.2) und anschließend in dem Laser-basierten Durchflusszytometer BD FACS Canto II analysiert. Für die Untersuchung wird die Probensuspension durch eine sogenannte Hüllflüssigkeit im Gerät verdünnt und zentriert, so dass die Zellen im „Gänsemarsch“, also einzeln, an einem Messpunkt vorbeigeführt werden (88). An diesem Messpunkt treffen ein oder mehrere verschiedene Laserstrahlen auf die Zelle. Ausgewertet werden dann das Streulicht der Zelle und das Fluoreszenzsignal. Streulicht entsteht, wenn eine Zelle den Laserstrahl kreuzt. Abhängig vom Messort können darüber verschiedene Informationen über die untersuchte Zelle bestimmt werden. Das Vorwärtsstreulicht (englisch: Forward Scatter, FSC) wird in linearer Richtung des Laserstrahls detektiert und gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (Side scatter, SSC) wird im rechten Winkel zum Laserstrahl gemessen und ist abhängig von der Granularität der Zelle (89). Somit können bei der Datenauswertung über FSC und SSC die verschiedenen Zellpopulationen der Probe bereits grob unterschieden werden, wie in der nachfolgenden Abbildung gezeigt:



**Abbildung 4: Darstellung verschiedener Zellpopulationen mittels FSC/SSC**

Das Fluoreszenzsignal entsteht durch Absorption der Lichtenergie durch die Farbstoffe. Die Absorption bewirkt eine vorübergehende Anhebung des Energieniveaus von Elektronen, welche bei Zurückfallen in das Grundniveau ein Photon emittieren. Diese Emission wird als Fluoreszenz bezeichnet und ebenfalls im

rechten Winkel zum Laserstrahl detektiert, wobei jeder Farbstoff durch ein bestimmtes Emissionsspektrum gekennzeichnet ist. Die Verwendung mehrerer Antikörper, welche mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, erlaubt eine genaue Charakterisierung der untersuchten Zellen und so auch die Detektion von Zellpopulationen, die nur in sehr geringer Anzahl in der Probe vorkommen (90). In unseren Experimenten verwendeten wir monoklonale, antihumane Antikörper mit den Farbstoffen FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin), APC (Allophycocyanin), APC-H7 (Konjugat aus APC und einem Cyanin-Farbstoff), Alexa Fluor 647 und V450 (siehe Tabelle 3.7). Diese Farbstoffe werden im FACS Canto II durch drei unterschiedliche Laser angeregt: Einen blauen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm (FITC und PE), einen roten Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm (APC, APC-H7 und Alexa Fluor 647), sowie einen violetten Laser mit einer Wellenlänge von 405 nm (V450). Insbesondere bei Benutzung von zwei Farbstoffen, die durch denselben Laser angeregt werden, kommt es zu einer Überlappung ihrer Emissionsspektren. Dies führt dazu, dass Zellen, auch wenn sie nur mit einem Farbstoff markiert wurden, auch für den anderen Farbstoff als positiv detektiert werden. Um also falsch positive Ergebnisse auszuschließen, muss man die Überlappung rechnerisch korrigieren- ein Vorgang, den man Kompensation nennt (88). Dies führten wir für FITC/PE und APC/APC-H7 mit Hilfe von Kontrollproben durch, welche jeweils nur mit einem Farbstoff markiert wurden.

Die Datenauswertung erfolgte anschließend mit der Software FlowJo.

#### 4.5.2 FACS-Färbung von Oberflächenantigenen

In Vorbereitung auf die FACS-Färbung wurden die Zellen zunächst in 10 ml FACS-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in FACS-Puffer resuspendiert und so auf FACS-Tubes verteilt, dass sich in diesen jeweils zwischen  $0,1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^6$  Zellen befanden. Nach der erneuten Zentrifugation wurden die entsprechenden Antikörper direkt auf das Zellpellet pipettiert (für genaue Angaben zur Menge/Verdünnung siehe **Tabelle 3**) und die Tubes für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte noch ein Waschschriff mit 1 ml FACS-Puffer pro Tube, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Nach der Färbung wurden die Zellen entweder in FACS-Puffer resuspendiert und direkt gemessen oder mit 500 µl FACS-Fix fixiert. Durch die Fixierung waren die Zellen ungefähr eine Woche stabil, so dass sie auch zu einem späteren Zeitpunkt gemessen werden konnten.

### **4.5.3 Intrazelluläre FACS-Färbung**

Die Färbung von intrazellulären Antikörpern erfolgte im Anschluss an die Oberflächenfärbung. Die entsprechenden FACS-Tubes wurden nicht mit FACS-Fix fixiert, sondern in 500 µl 2%igem Paraformaldehyd resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Paraformaldehyd diente hierbei zur Stabilisierung der Oberflächenantikörper, so dass deren Fluoreszenz auch während der nachfolgenden Schritte erhalten blieb. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml des Waschpuffers Perm/Wash der Firma BD Biosciences gewaschen. Dieser Puffer enthält Saponin und führt dazu, dass die Zellmembran durchlässiger wird, so dass die Antikörper im nächsten Schritt in die Zelle eindringen können. Die Zugabe der Antikörper erfolgte wieder direkt auf das Zellpellet und die nachfolgende Inkubation wurde für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt. Zuletzt wurden die Zellen noch zweimal mit jeweils 1 ml FACS-Puffer gewaschen und anschließend direkt gemessen oder mit 500 µl FACS-Fix fixiert.

### **4.5.4 FoxP3-Färbung**

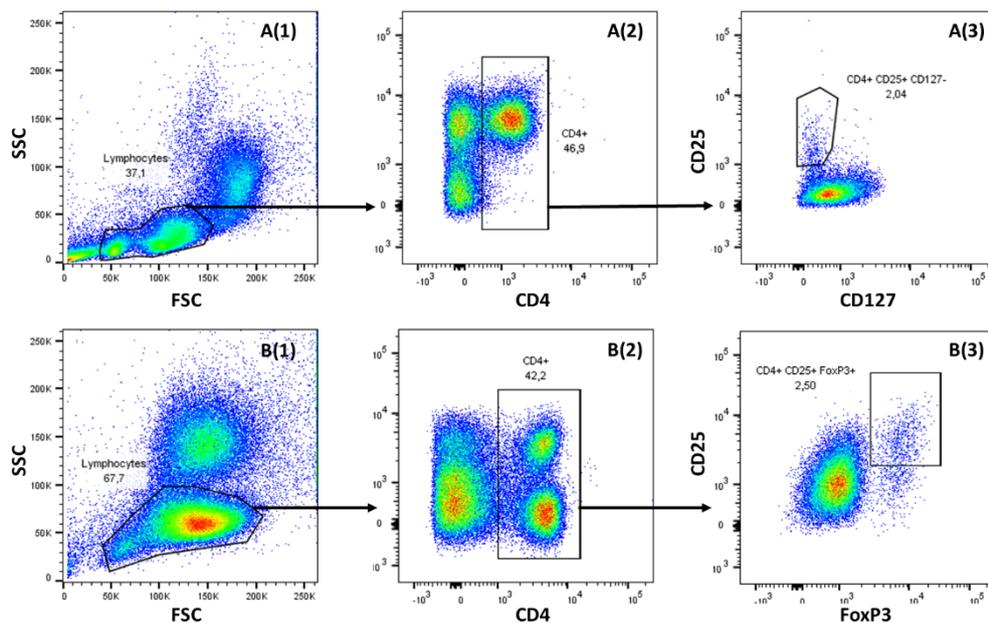
Für die Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 benutzten wir das FoxP3 Staining Set der Firma eBioscience: Im Anschluss an die Oberflächenfärbung erfolgte die Fixierung/Permeabilisierung der Zellen durch die Zugabe von jeweils 1 ml Perm/Fix-Lösung (Fixation/Permeabilization Concentrate 1:3 verdünnt mit Fixation/Permeabilization Diluent) und einstündige Inkubation der Tubes bei 4 °C im Dunkeln. Danach folgten drei Waschschrte: einmal in 1 ml FACS-Puffer und zweimal in jeweils 2 ml Permeabilization Buffer. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die Zellen anschließend mit 100 µl 2%igem Normal Rat Serum für 15 min inkubiert (bei 4 °C im Dunkeln). Schließlich folgte die Zugabe des FoxP3-Antikörpers und eine weitere Inkubation für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Zuletzt wurden die Zellen noch zweimal in jeweils 2 ml Permeabilization Buffer gewaschen und anschließend in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach diesem Protokoll gefärbte Zellen wurden nie fixiert, sondern immer direkt im Anschluss an die Färbung am FACS-Gerät analysiert.

### **4.5.5 Auswertung der Daten mittels FlowJo-Software (Identifikation von Treg)**

Wie unter **2.6** besprochen, lassen sich Treg entweder als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> charakterisieren. In den meisten Experimenten nutzten wir FoxP3

zur Identifikation von Treg, da dies der aktuell beste Marker ist. Bei der gleichzeitigen Färbung von Granzyme A und CCR5 mussten wir jedoch vom FoxP3-Protokoll abweichen, da dieses für die beiden Antikörper nur unzureichende Färbeergebnisse erzielte. Auch für den Zell-Sort auf Treg konnte FoxP3 nicht verwendet werden, da durch die notwendige Permeabilisierung die Zellen im Anschluss avital waren und nicht für weiterführende Untersuchungen genutzt werden konnten.

In der nachfolgenden Grafik sind die beiden verschiedenen Gating-Strategien zur Identifikation von Treg beispielhaft dargestellt.



**Abbildung 5: Gating-Strategien zur Identifikation von Treg über CD127 (A) bzw. FoxP3 (B)**

Zuerst wurde mittels FSC/SSC die Lymphozytenpopulation ausgewählt (Abbildungen 1). Daraus wurden alle CD4<sup>+</sup> Zellen isoliert (Abb. 2). Abb. A3 zeigt die daraus abgeleitete Eingrenzung aller Zellen, die CD25<sup>+</sup> und CD127<sup>-</sup> sind. Abb. B3 zeigt analog die Eingrenzung aller gleichzeitig CD25<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> Zellen.

#### 4.6 Zell-Sort

Die eigentliche Sortierung von Zellen ließen wir am Tumorstudienzentrum der Uniklinik Mainz (im Haus) durchführen. Bei dem hierbei eingesetzten Gerät handelte es sich um den FACS Sorter Aria IIu von BD Biosciences. Zur Vorbereitung wurden die Zellen nach folgendem Protokoll mit Oberflächenantikörpern markiert: Zunächst wurden die Zellen zweimal mit jeweils 10ml MACS-Puffer gewaschen, wobei im zweiten Waschschriff 10µl DNase zugefügt wurden um DNA-bedingte Verklumpungen (durch das Auftreten von toten Zellen) zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen

in 15ml Falcon-Röhrchen überführt und das Zellpellet 15min im Dunkeln bei 4°C mit den gewünschten Antikörpern inkubiert. Das Auswaschen überschüssiger Antikörper erfolgte mit 5ml MACS-Puffer und zuletzt wurden die Zellen in 4ml MACS-Puffer aufgenommen. Diese Zellsuspension ließen wir nun noch zweimal über einen Zellfilter laufen, um möglichst viele Einzelzellen ohne Verklumpungen zu erhalten.

#### **4.7 Suppressionsassay**

Das Prinzip des Suppressionsassays beruht auf einer Kokultivierung von Treg mit einer zweiten Zellpopulation, den sogenannten Responder- Zellen (Tresp), deren Proliferation durch die Treg gehemmt wird. Die Tresp werden zuvor einerseits aktiviert und andererseits mittels CFSE markiert (91). CFSE ist ein Farbstoff, welcher sich intrazellulär anlagert und bei der Zellteilung jeweils zu 50% an die Tochterzellen weitergegeben wird. Aufgrund dieser Eigenschaft lässt sich mittels CFSE-Färbung die Proliferation von Zellen im FACS darstellen (92).

##### **4.7.1 CFSE-Färbung**

Zunächst wurde nach Herstellerangabe (93) eine Lösung hergestellt aus einem Röhrchen CFSE und 18µl DMSO. Die zu färbenden Tresp wurden in vorgewärmtem FACS-Puffer aufgenommen (0,5ml Puffer/ Mio. Zellen) und für 10min im Brutschrank mit der CFSE-Lösung inkubiert (0,5µl CFSE-Lösung/ ml Puffer). Im Anschluss gaben wir 20ml Kulturmedium dazu und ließen die Zellen für weitere 5min bei Raumtemperatur inkubieren. Zuletzt folgten zwei Waschschrte mit jeweils 10ml Kulturmedium.

##### **4.7.2 Kokultivierung Treg/Tresp**

Die vorbereiteten Treg und Tresp wurden in Kulturmedium aufgenommen, wobei den Tresp zur Aktivierung noch IL-2 (100U/ml Kulturmedium) und OKT3 (30ng/ml Kulturmedium) zugefügt wurden. Anschließend erfolgte die Verteilung der Zellen auf eine 96 Well-Platte. Dabei befanden sich in jedem Well die gleiche Anzahl an Tresp, jedoch unterschiedliche Mengen Treg, so dass wir unterschiedliche Verhältnisse von Tresp zu Treg erhielten. Wir führten dies für ein Tresp:Treg-Verhältnis von 1:0 (nur

Tresp, als Kontrolle), 1:2; 1:1, 2:1 und 4:1 durch. Die so bestückte Platte wurde nun für 5 Tage im Brutschrank inkubiert.

## 5. Ergebnisse

Unseren Patienten wurde an verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation Blut abgenommen und auf ihre Treg hin untersucht. Dazu wurden zunächst, wie oben beschrieben, PBMC aus dem Patientenblut isoliert und anschließend Treg mittels FACS-Färbung identifiziert. Wir beurteilten diese hinsichtlich ihres Vorkommens, ihrer Expression von CD52 sowie weiterer Oberflächenmarker und korrelierten diese Resultate mit dem klinischen Verlauf, insbesondere dem Auftreten von akuter GvHD.

Für die nachfolgenden Analysen teilten wir die gemessenen Proben in verschiedene Gruppen ein, entweder anhand des Zeitpunktes nach der Transplantation, zu welchem sie entnommen wurden oder anhand des klinischen Auftretens einer GvHD zum Zeitpunkt der Probeentnahme. Für die zeitliche Aufteilung wurden die Proben 4 Gruppen zugeordnet: Gruppe 1 enthielt Proben von Tag +48 bis Tag +99 (n=22; M: +72), Gruppe 2 von Tag +104 bis Tag +199 (n=30; M: +150), Gruppe 3 von Tag +201 bis Tag +278 (n=16; M: +234) und Gruppe 4 von Tag +309 bis Tag +530 (n=16; M: +368). Für diese Analysen wurden alle gemessenen Proben verwendet, das heißt, dass von einigen Patienten (von denen Proben zu verschiedenen Zeitpunkten vorlagen) mehrere Proben in die Analysen einfließen.

Für die klinische Aufteilung ordneten wir die Proben in 3 Gruppen ein: akute GvHD, cGvHD, keine GvHD. Ausschlaggebend war hierfür der GvHD-Status zum Probenzeitpunkt. Bei den entsprechenden Analysen wurden Doppelungen von Patienten ausgeschlossen, das heißt von jedem Patienten wurde jeweils genau eine Probe untersucht. Dadurch ergaben sich folgende Kohorten: aGvHD (Grad I-IV; n=20), cGvHD (n=10) und ohne GvHD (n=8). In der cGvHD-Gruppe befanden sich 5 Patienten, bei denen die cGvHD erst im Anschluss an eine DLI-Gabe auftrat. Die Zeitpunkte variierten in der aGvHD-Gruppe von Tag +48 bis Tag +343, in der cGvHD-Gruppe von Tag +124 bis Tag +530 und bei den Patienten ohne GvHD von Tag +83 bis Tag +309.

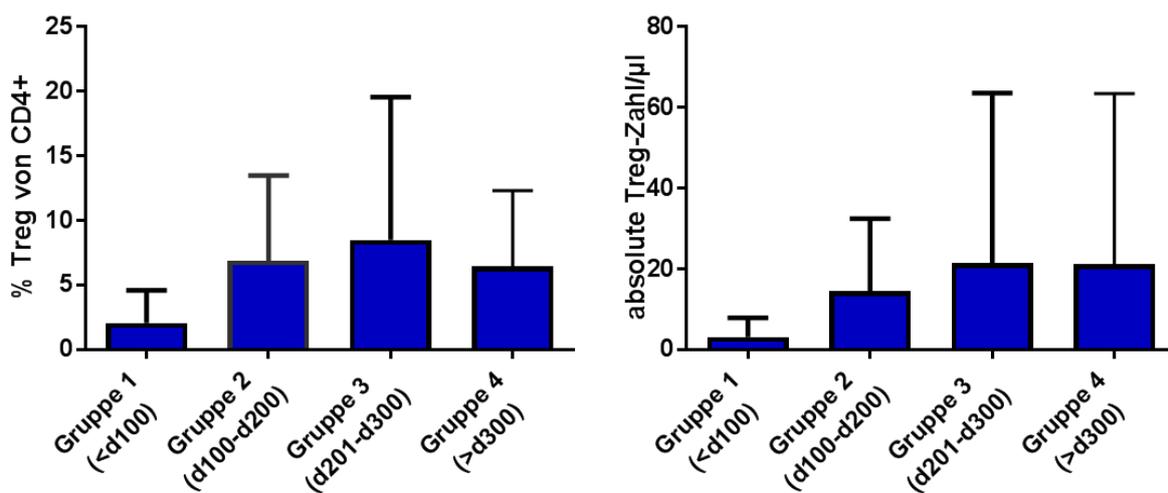
### 5.1 Rekonstitution von Treg

Um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Treg-Rekonstitution im Anschluss an die Transplantation treffen zu können, bestimmten wir zunächst die prozentualen Anteile der Treg an allen CD4<sup>+</sup> Zellen und verglichen diese zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation miteinander.

Zudem berechneten wir die absoluten Treg-Zahlen, in dem wir den durchflusszytometrisch ermittelten prozentualen Anteil der Treg an allen Lymphozyten mit dem zum selben Zeitpunkt erhobenen Lymphozytenwert aus dem Blutbild multiplizierten.

Es zeigten sich hierbei sowohl für den relativen Treg-Anteil als auch für die absoluten Treg-Zahlen deutlich niedrigere Werte in Gruppe 1 im Vergleich zu späteren Zeitpunkten. Zwischen Gruppe 2 und 3 zeigte sich für beide Werte im Mittel jeweils nur noch ein minimaler Anstieg, bei insgesamt deutlich größerer Streubreite. Nach Tag +300 schien der relative Treg-Anteil wieder etwas abzunehmen, bei in etwa gleichbleibender absoluter Treg-Zahl.

Der Treg-Anteil betrug in Gruppe 1 im Mittel 2,1% (Range: 0,021%-8,7%), in Gruppe 2 6,9% (Range: 0,5%-29,6%), in Gruppe 3 8,5% (Range: 0,4%-42,0%) und in Gruppe 4 6,4% (Range: 0,4%-18,1%). Die absolute Treg-Anzahl betrug in Gruppe 1 im Mittel 3,2/μl (Range: 0,01/μl- 17,6/μl), in Gruppe 2 14,5/μl (Range: 0,2/μl-74,4/μl), in Gruppe 3 21,4/μl (Range: 0,4/μl-146,7/μl) und in Gruppe 4 21,2/μl (Range: 0,4/μl-162,9/μl).



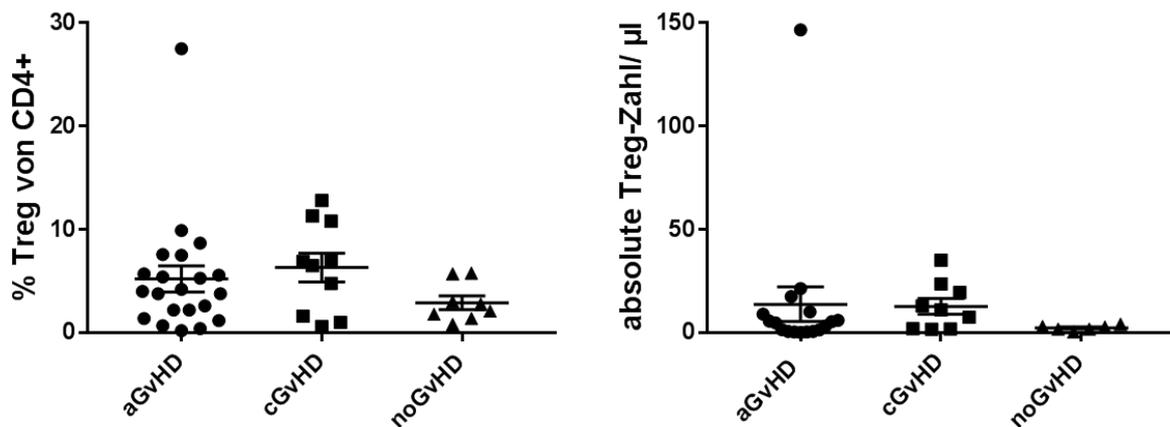
**Abbildung 6: Treg-Anteile und absolute Treg-Zahlen im zeitlichen Verlauf**

Sowohl der prozentuale Treg-Anteil an allen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten als auch die absoluten Treg-Zahlen sind vor Tag +100 deutlich niedriger als zu späteren Zeitpunkten nach Transplantation. Die oberen Boxengrenzen zeigen den Mittelwert, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

### 5.1.1 Treg-Rekonstitution und GvHD

Da Treg das Potenzial besitzen das Auftreten einer GvHD zu verhindern, interessierte uns als nächstes, ob wir bei unseren Patienten einen Zusammenhang finden zwischen dem Auftreten von Treg und der klinischen Ausbildung einer GvHD. Dazu verglichen wir Treg-Anteile (an CD4<sup>+</sup> Zellen) und absolute Treg-Zahlen zwischen Patienten mit

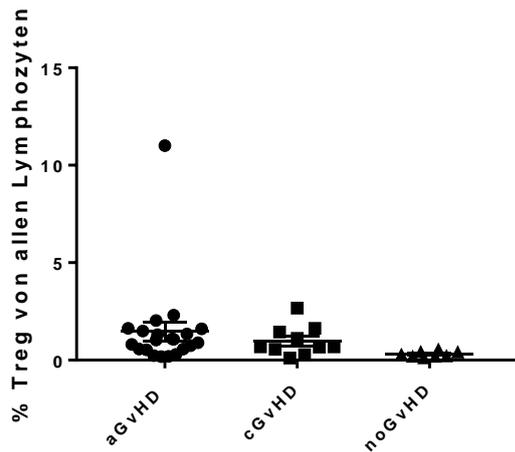
aGvHD, cGvHD und ohne GvHD unabhängig vom Zeitpunkt nach der Transplantation. Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, fanden wir hierbei im Mittel eher erhöhte Treg-Anteile bei GvHD (akute und chronische) im Vergleich zu den Patienten, die keine GvHD entwickelten. Ebenso zeigten sich die absoluten Treg-Zahlen aus den GvHD-Proben höher. Bei insgesamt großer Streubreite der gemessenen Werte, insbesondere in den GvHD-Gruppen ergab sich in der durchgeführten Varianzanalyse jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den 3 Gruppen ( $p= 0,34$  für die Treg-Anteile und  $p= 0,65$  für die absoluten Treg-Zahlen).



**Abbildung 7: Vergleich Treg-Zahl und -Anteil in Bezug auf die klinische Ausbildung einer GvHD**

Treg-Zahlen und -Anteile erscheinen bei GvHD, im Vergleich zu Patienten ohne GvHD erhöht. Angezeichnet sind Mittelwert und Standardfehler.

Zusätzlich verglichen wir die Treg-Anteile bezogen auf alle Lymphozyten, wobei sich die Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen mit einem eher erhöhten Treg-Anteil in den GvHD-Gruppen bestätigten (siehe Abbildung 8). Die Varianzanalyse ergab jedoch auch hierbei keinen signifikanten Unterschied ( $p= 0,2699$ ).

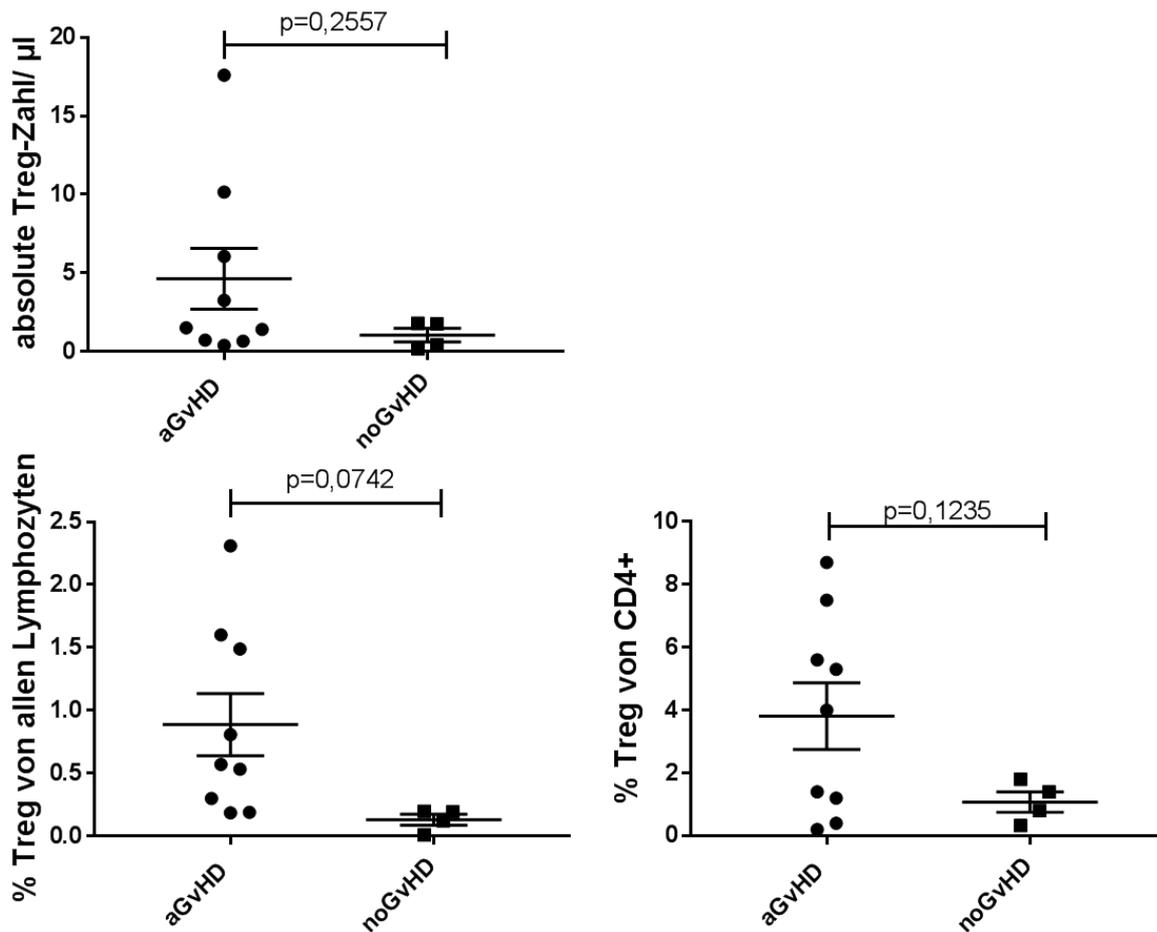


**Abbildung 8: Vergleich Treg-Anteil an allen Lymphozyten in Bezug auf die klinische Ausbildung einer GvHD.**

Der Treg-Anteil an allen Lymphozyten erscheint wiederum in den GvHD-Gruppen im Vergleich zu Patienten ohne GvHD erhöht.

Angezeichnet sind Mittelwert und Standardfehler.

Da die akute GvHD in der Regel sehr früh nach Transplantation auftritt, verglichen wir diese Werte nochmals separat für die Proben, welche vor d100 entnommen wurden. Hierbei zeigte sich, wie bereits in den vorangegangenen Untersuchungen, eine eher erhöhte Treg-Zahl in der Gruppe von Patienten mit aGvHD (n=9) im Vergleich zu den Patienten, die keine GvHD (n=4) entwickelten. Auch der prozentuale Anteil der Treg an den CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, sowie an allen Lymphozyten, schien in der aGvHD-Gruppe etwas erhöht zu sein, wobei wir hier wiederum eine große Streubreite zwischen den gemessenen Werten sahen.

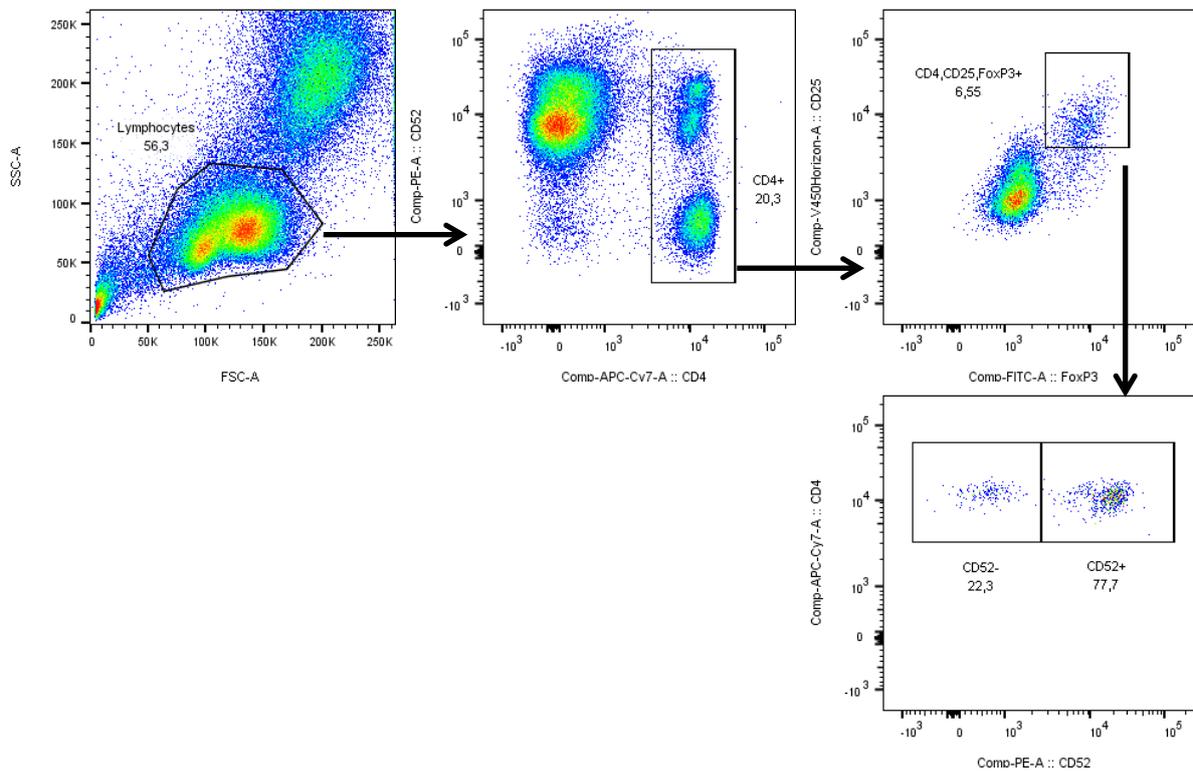


**Abbildung 9: Vergleich Treg-Zahl und -Anteil in Bezug auf die klinische Ausbildung einer GvHD vor Tag +100**

Sowohl absolute Treg-Zahlen als auch (weniger stark ausgeprägt) die prozentualen Treg-Anteile scheinen in der aGvHD-Gruppe erhöht. Angezeichnet sind Mittelwert und Standardfehler.

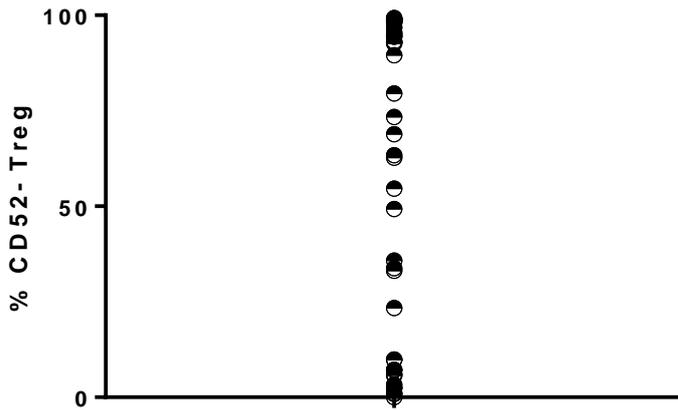
## 5.2 CD52-Expression auf Treg

Im nächsten Schritt untersuchten wir die CD52-Expression auf regulatorischen T-Zellen. Dazu färbten wir unsere Zellen mit einem Antikörper, welcher gegen das Oberflächenprotein CD52 gerichtet ist. Die anschließende Auswertung ist beispielhaft in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10: Gating-Strategie zur Beurteilung der CD52-Expression von Treg am Beispiel von Patient #34.**

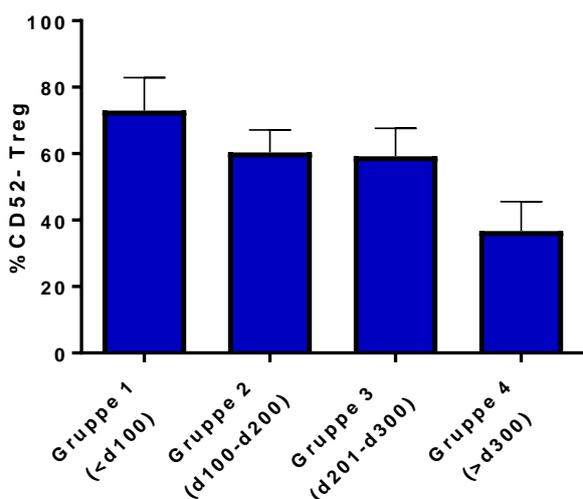
Wie in der obigen Abbildung ersichtlich wird, ließen sich CD52-negative Treg identifizieren. Diese fanden wir in fast allen unseren Proben, wobei jedoch ihr Anteil an der gesamten Treg-Population zwischen den einzelnen Patienten und Zeitpunkten stark variierte, mit einem Minimum von 1,0% bis zu einem Maximum von 99,3%. Lediglich in einer Patientenprobe (entnommen an Tag +237) konnten wir keine CD52-negative Treg nachweisen.



**Abbildung 11: Verteilung der Anteile CD52-negativer Treg an der gesamten Treg-Population in allen Patientenproben zu allen Zeitpunkten**

### 5.2.1 CD52-negative Treg im zeitlichen Verlauf

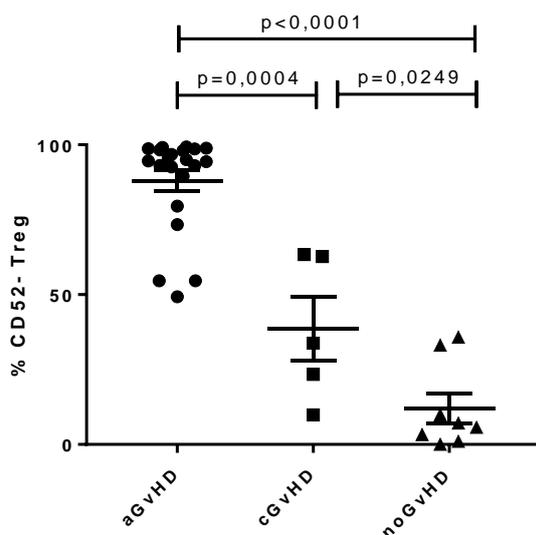
Um diese Heterogenität im Vorkommen CD52-negativer Treg in unserem Patientenkollektiv näher zu charakterisieren, korrelierten wir die gemessenen Werte zunächst mit dem Zeitpunkt nach der Transplantation. Hierzu verglichen wir die Anteile CD52-negativer Treg zwischen unseren oben eingeführten 4 Gruppen. Unsere Analysen zeigten einen kontinuierlichen Rückgang der CD52-negativen Zellen im zeitlichen Verlauf, wobei auch in Gruppe 4 im Mittel noch 36,7% der Treg kein CD52 an ihrer Oberfläche exprimierten.



**Abbildung 12: Prozentualer Anteil CD52-negativer Treg im zeitlichen Verlauf**  
 CD52-negative Treg nehmen im Verlauf deutlich ab, sind jedoch auch noch nach Tag +300 nachweisbar.

## 5.2.2 CD52-negative Treg und GvHD

Anschließend untersuchten wir einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten CD52-negativer Treg und einer GvHD. Dazu verglichen wir die CD52-Expression auf Treg zwischen Patienten mit aGvHD, cGvHD und ohne GvHD, wobei alle Patienten in unserer cGvHD-Gruppe zuvor an einer aGvHD erkrankt waren. Patienten, die ihre GvHD erst im Anschluss an eine DLI-Gabe ausbildeten, wurden in dieser Analyse nicht mit betrachtet. Wir fanden hierbei ein deutlich höheres Vorkommen CD52-negativer Treg in der Gruppe der Patienten, die eine aGvHD entwickelt hatten. Deren Treg waren im Mittel zu 88% CD52-negativ. Aber auch in der Gruppe der cGvHD-Patienten zeigten sich mehr Treg CD52-negativ (bei großer Streubreite;  $M: 38,6\%$ ), als bei den Patienten ohne GvHD ( $M: 12\%$ ). In der Varianzanalyse sahen wir einen  $p$ -Wert  $<0,0001$  und in der weiteren Untersuchung stellte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen allen 3 Gruppen dar.

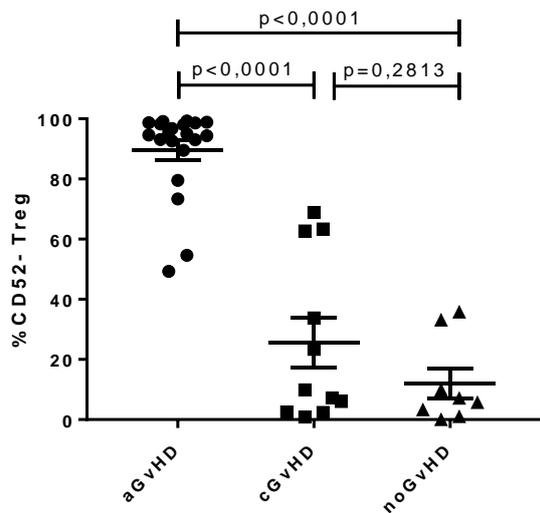


**Abbildung 13: prozentualer Anteil CD52-negativer Treg im Vergleich zwischen aGvHD, cGvHD und keiner GvHD.**

Sowohl bei aGvHD als auch bei cGvHD zeigen sich signifikant erhöhte Anteile CD52-negativer Treg an der gesamten Treg-Population.

Angezeichnet sind Mittelwert und Standardfehler.

Wenn wir in unsere Berechnungen die Patienten einschließen, die eine DLI erhalten haben und erst im Anschluss daran eine GvHD entwickelten ( $n=5$ , in allen Fällen cGvHD), ergibt sich folgendes Bild:



**Abbildung 14: prozentualer Anteil CD52-negativer Treg im Vergleich zwischen aGvHD, cGvHD und keiner GvHD unter Einbeziehung von Patienten, welche eine GvHD im Anschluss an eine DLI-Gabe entwickelten.**

Die Varianzanalyse ergibt weiterhin einen p-Wert < 0,0001, jedoch zeigt sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der cGvHD- und der noGvHD-Gruppe.

Angezeichnet sind Mittelwert und Standardfehler.

Die gemessenen Werte werden in den nachfolgenden Tabellen im Einzelnen dargestellt.

Patient	Probenzeitpunkt nach Tx	% CD52-Treg
#31	48	99,1
#18	57	94,4
#10	62	96,8
#26	69	93,1
#17	78	95,0
#11	79	92,6
#2	81	89,5
#3	99	98,6
#16	99	93,0
#15	104	98,7
#21	110	73,4
#6	119	99,3
#22	120	98,0
#20	141	79,5
#35	146	95,5
#12	173	94,6
#28	190	98,9
#9	195	98,3
#33	229	49,3
#24	343	54,6

**Tabelle 5: Anteil CD52-negativer Treg bei Patienten mit aGvHD**

Patient Nr.	Probenzeitpunkt nach Tx	% CD52-Treg
#25	124	33,8
#39*	160	6,0
#36	192	63,4
#4*	195	7,2
#30	202	62,7
#5	223	9,9
#34	235	23,4
#27*	364	2,4
#32*	377	2,5
#40*	530	0,9

**Tabelle 6: Anteil CD52-negativer Treg bei Patienten mit cGvHD, \*cGvHD nach DLI**

Patient Nr.	Probenzeitpunkt nach Tx	% CD52-Treg
#19	83	5,7
#37	83	3,3
#32	97	33,1
#8	120	35,8
#13	134	7,1
#38	175	9,9
#29*	237	0,0
#7*	309	1,0

**Tabelle 7: Anteil CD52-negativer Treg bei Patienten ohne GvHD, \*Z.n. GvHD**

In den obigen Tabellen zeigt sich, dass bei den Patienten mit aGvHD auch fast 1 Jahr nach der Transplantation teilweise weiterhin sehr hohe Anteile CD52-negativer Treg nachweisbar waren. Im Gegensatz hierzu sahen wir bei Patienten, die keine GvHD entwickelten, bereits früh nach Transplantation einen geringen Anteil CD52-negativer Treg. In der cGvHD-Gruppe zeigte sich ein heterogenes Bild mit niedrigen bis hohen Anteilen CD52-negativer Treg. Auffällig war hierbei, dass ein niedriger Anteil CD52-negativer Treg überwiegend bei den Patienten vorlag, welche ihre cGvHD im Anschluss an eine DLI-Gabe entwickelten. Entstand die cGvHD hingegen aus einer aGvHD konnten wir auch zu späteren Zeitpunkten nach Transplantation höhere Anteile CD52-negativer Treg nachweisen. Von den untersuchten Patienten aus der noGvHD-Gruppe erhielten #19, #37, #32, #8 und #13 zu einem späteren Zeitpunkt DLI. Bei den Patienten #19 und #13 entwickelte sich daraufhin keine GvHD, bei #32 kam es zur Ausbildung einer cGvHD und #37 und #8 erkrankten an einer aGvHD (III° bzw. II°).

Bei #38 stand der Spender nicht mehr zur Verfügung und #29 und #7 hatten zum Probenzeitpunkt bereits DLI erhalten und daraufhin eine GvHD entwickelt, welche zum Probenzeitpunkt abgeklungen war.

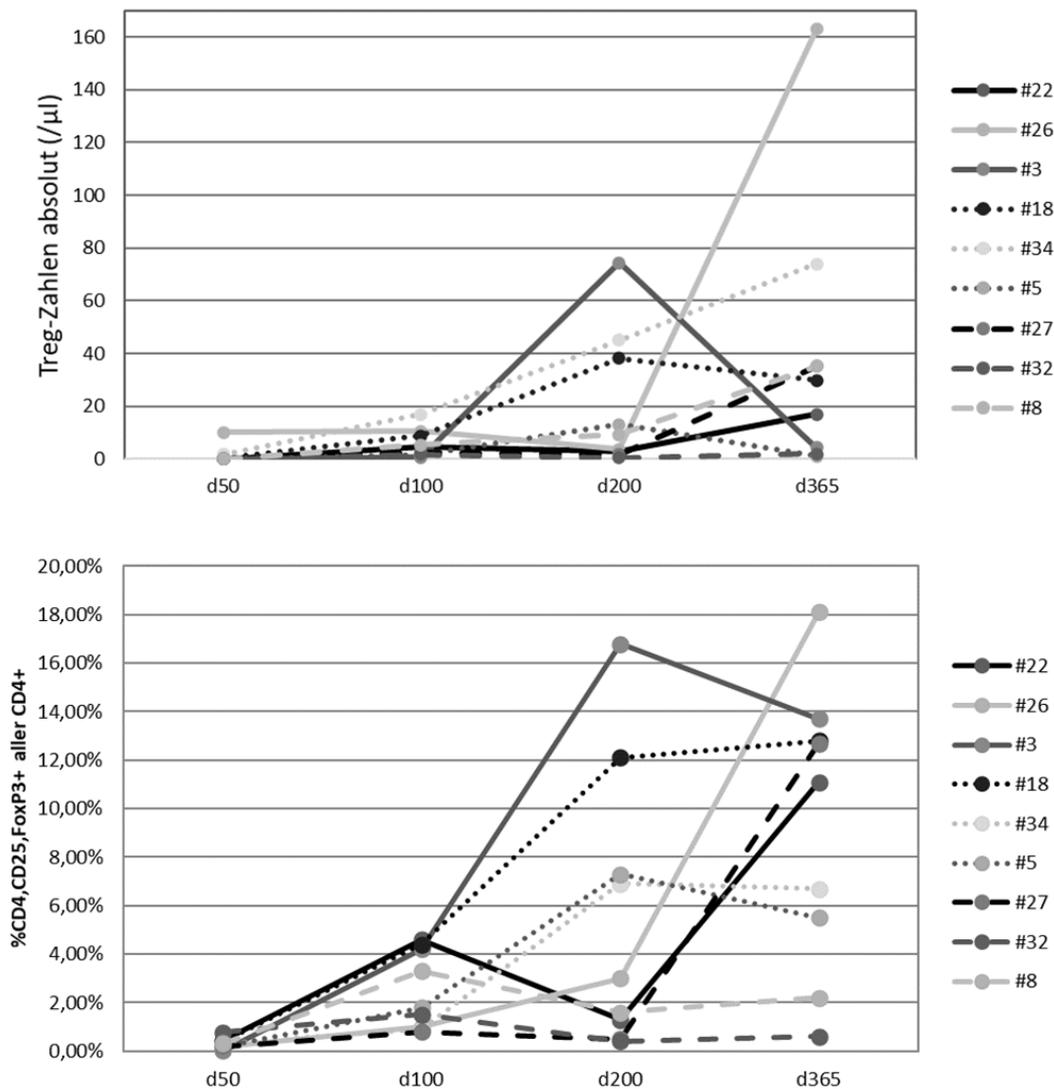
### **5.2.3 Korrelation CD52-negativer Treg und GvHD im zeitlichen Verlauf**

Im vorigen Teil der Arbeit untersuchten wir Patienten anhand ihres GvHD-Status unabhängig vom Zeitpunkt nach der Transplantation. Um ein genaueres Bild zu erhalten und mögliche Zusammenhänge zwischen GvHD-Status, Treg-Rekonstitution, CD52-Expression und Zeitpunkt nach der Transplantation aufzudecken führten wir für neun Patienten Messungen zu festgelegten Zeitpunkten innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation durch und korrelierten unsere Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf dieser Patienten. Als Zeitpunkte legten wir hierfür die Tage +50 (+50 bis +69), +100 (+82 bis +120), +200 (+180 bis +235) und +365 (+355 bis +384) fest. Die Streuung der Abnahmezeitpunkte erklärt sich durch logistische Gründe: zum Teil waren Patienten nicht am geforderten Tag verfügbar oder zu krank für die zusätzliche Blutentnahme. Bei einigen Patienten fanden wir an Tag +50 nur sehr wenige Treg, so dass wir lediglich die Treg-Anteile und -Anzahl bestimmen konnten, jedoch keine weiteren Charakterisierungen der Zellen zu diesem Zeitpunkt vornehmen konnten.

Alle untersuchten Patienten entwickelten im Verlauf eine GvHD. Drei der Patienten (#3, #22, #26) präsentierten auch noch an d365 eine anhaltende aGvHD, bzw. litten unter rezidivierenden Exazerbationen. Ein Patient (#18) litt in den ersten 200 Tagen nach Transplantation ebenfalls an einer aGvHD, welche im Verlauf jedoch vollständig ausheilte. Zwei Patienten (#5, #34) zeigten initial eine aGvHD, welche im Verlauf in eine cGvHD überging. Die übrigen drei Patienten erhielten DLI-Gaben bei initial ausbleibender GvHD, bzw. lediglich Auftreten einer niedriggradigen aGvHD. Hierauf entwickelten sie eine aGvHD (#8) bzw. eine cGvHD (#32 und #27), wobei #27 bereits vor der DLI-Gabe eine aGvHD der Haut (1°) entwickelte (welche zum Zeitpunkt der DLI-Gabe wieder abgeheilt war).

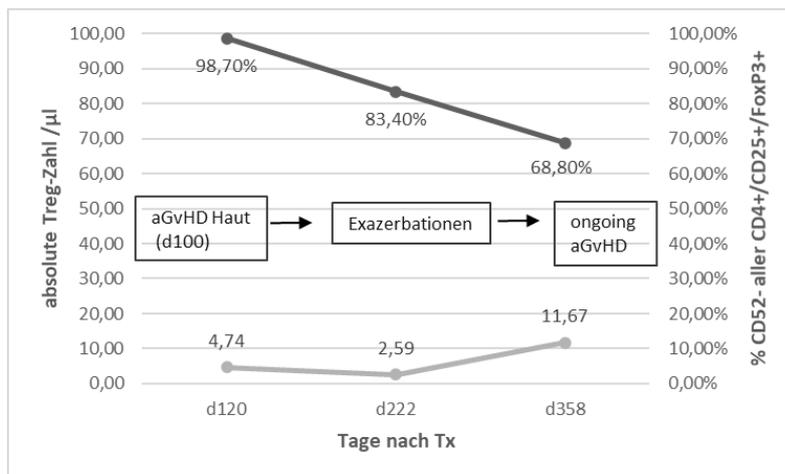
Zunächst untersuchten wir auch hier noch einmal Treg-Zahlen und -Anteile und verglichen diese anhand des zeitlichen und klinischen Verlaufs. Wir unterteilten hierfür die Patienten grob in 3 Gruppen: Patienten mit anhaltender aGvHD, Patienten mit ausgeheilte aGvHD oder Übergang in cGvHD und Patienten mit DLI. Wir fanden hierbei

inter- / und intraindividuell sehr unterschiedliche Verläufe, ohne dass sich eine eindeutige Korrelation zwischen dem GvHD-Verlauf und der Entwicklung von Treg-Zahlen oder -Anteilen feststellen ließ. Insbesondere konnte auch in der Verlaufsuntersuchung weiterhin keine vergleichsweise Erniedrigung der Treg-Zahlen oder -Anteile bei Patienten mit (anhaltender) aGvHD nachgewiesen werden.

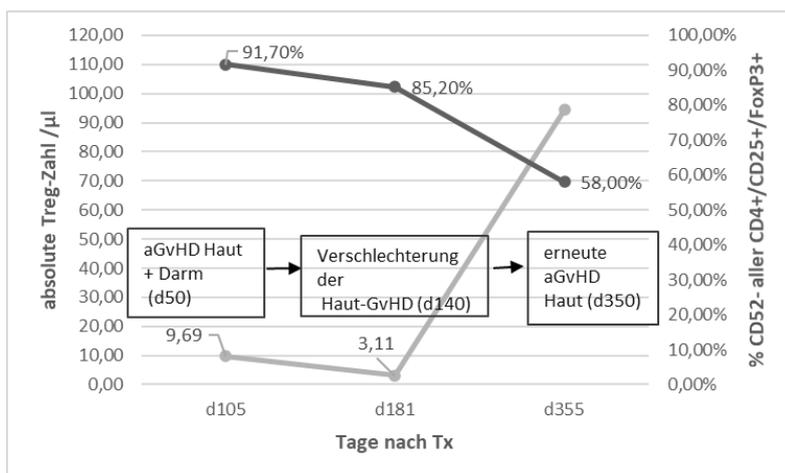


**Abbildung 15:**  
**Absolute Treg-Zahlen und Treg-Anteile im zeitlichen Verlauf**  
durchgezogene Linien: Patienten mit anhaltender aGvHD  
gepunktete Linien: Patienten mit initial aGvHD, welche im Verlauf ausgeheilt oder in eine cGvHD übergegangen ist  
gestrichelte Linien: Patienten ohne GvHD initial

Im nächsten Schritt konzentrierten wir uns auf die CD52-Expression. Die detaillierten klinischen Verläufe, die gemessenen Anteile CD52-negativer Treg (schwarze Linie; gezeigt werden die prozentualen Anteile CD52-negativer Treg an allen Treg) sowie die absoluten Zahlen CD52-negativer Treg (graue Linie) werden in den nachfolgenden Grafiken für die untersuchten Patienten einzeln dargestellt. Die Berechnung der absoluten Zahlen erfolgte bei den Patienten #34 und #8 über die laborchemisch bestimmten Leukozytenwerte statt der Lymphozyten, da von diesen Patienten keine Differentialblutbilder vorlagen.

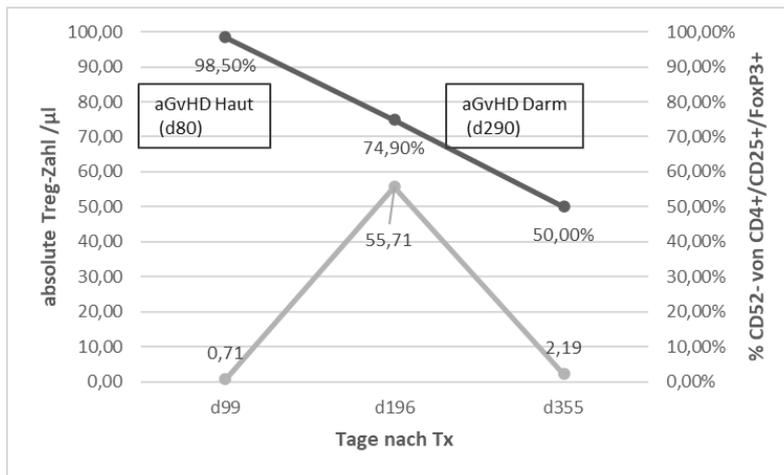


**Abbildung 16: CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #22.** An d100 nach Tx kam es zum Auftreten einer aGvHD der Haut, welche im Verlauf wiederholt exazerbierte und zum Zeitpunkt der letzten Probenentnahme weiterhin bestand.

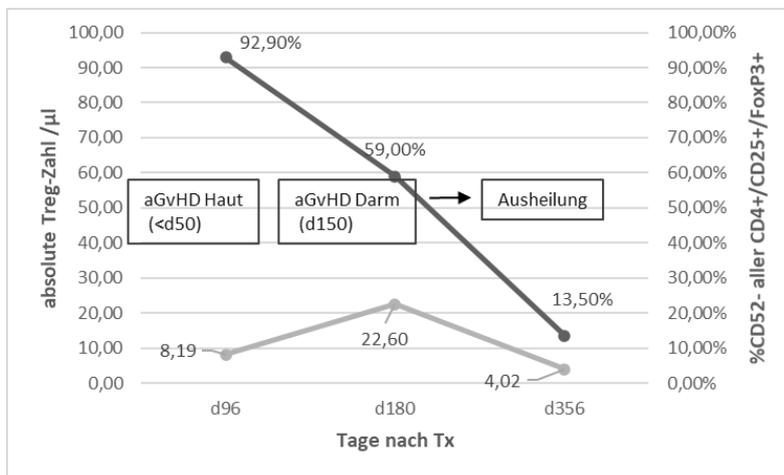


**Abbildung 17: CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #26.**

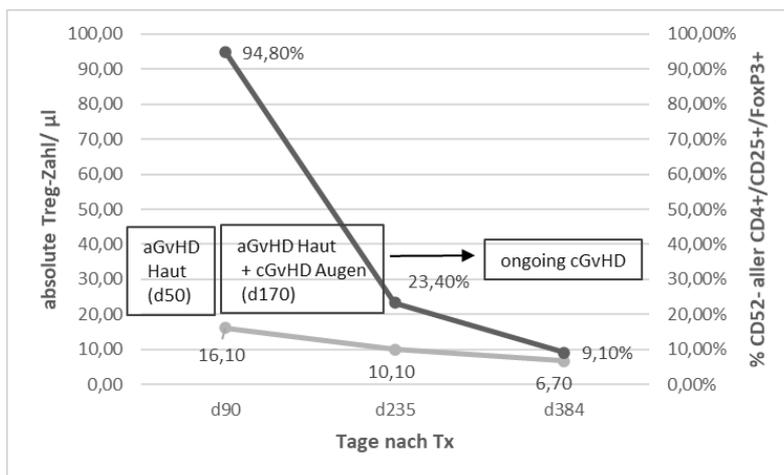
Früh nach Tx erkrankte Patient #26 an einer aGvHD der Haut und des Darms. Im weiteren Verlauf kam es zur Aggravation der Haut-GvHD, welche zunächst ausheilte, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt erneut auftrat.



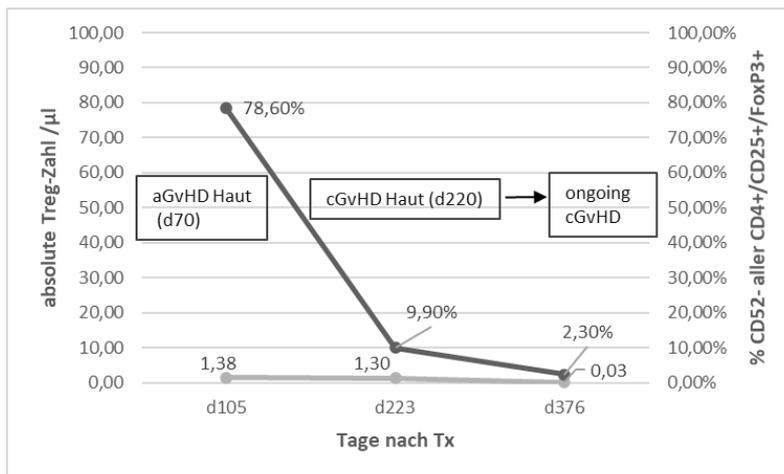
**Abbildung 18: CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #3.** An d80 nach Tx entwickelte Patient #3 eine aGvHD der Haut, welche ausheilte. Im weiteren Verlauf kam es zum Auftreten einer aGvHD des Darms, welche zum Zeitpunkt der letzten Probenentnahme in Abheilung befindlich war.



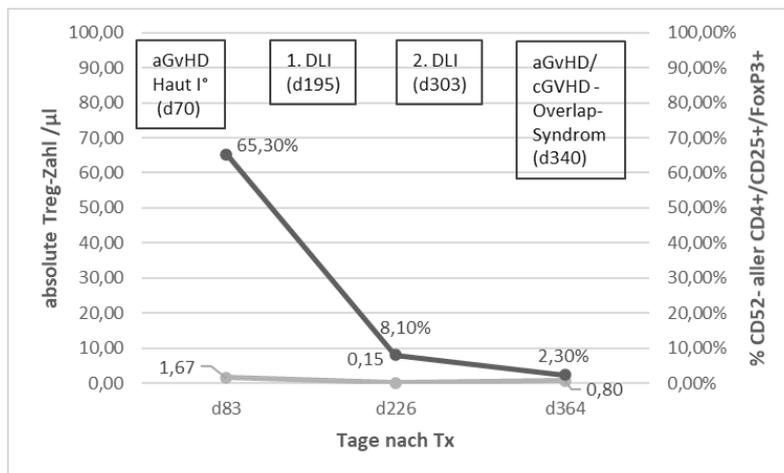
**Abbildung 19: CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #18.** Fröh nach Tx trat eine aGvHD der Haut auf. An d150 erkrankte Patient #18 an einer aGvHD des Darms, welche im Verlauf ausheilte. Später kam es zu keinem neuen Auftreten von aGvHD oder cGvHD.



**Abbildung 20: CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #34.** Es kam zunächst zum Auftreten einer aGvHD der Haut, welche im weiteren Verlauf zunächst rezidierte, anschließend jedoch ausheilte. Im Bereich der Augen bildete sich eine cGvHD aus, welche auch 1 Jahr nach Tx noch anhielt.

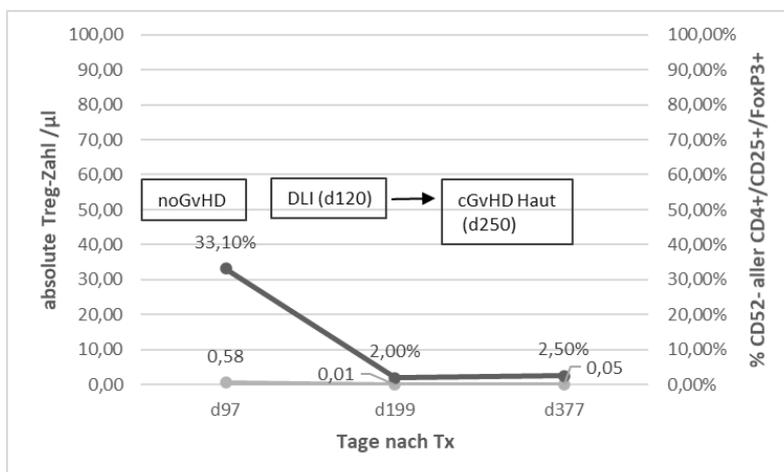


**Abbildung 21: CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #5.** Patient #5 präsentierte initial eine aGvHD der Haut, welche im Verlauf in eine cGvHD der Haut überging und zum Zeitpunkt der letzten Probenentnahme weiterhin persistierte.



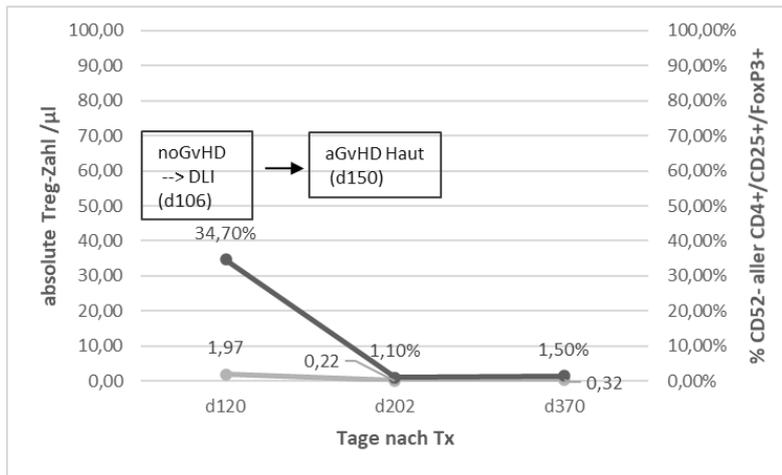
**Abbildung 22: CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #27.**

Nach der Transplantation entwickelte der Patient eine aGvHD der Haut (Grad 1), nach deren Ausheilen zweimalig DLI verabreicht wurden (bei beginnendem Rezidiv und fallendem Chimärismus). Im Anschluss kam es zum Auftreten eines Overlap-Syndroms (aGvHD/cGvHD), so dass keine weiteren DLI-Gaben erfolgten.

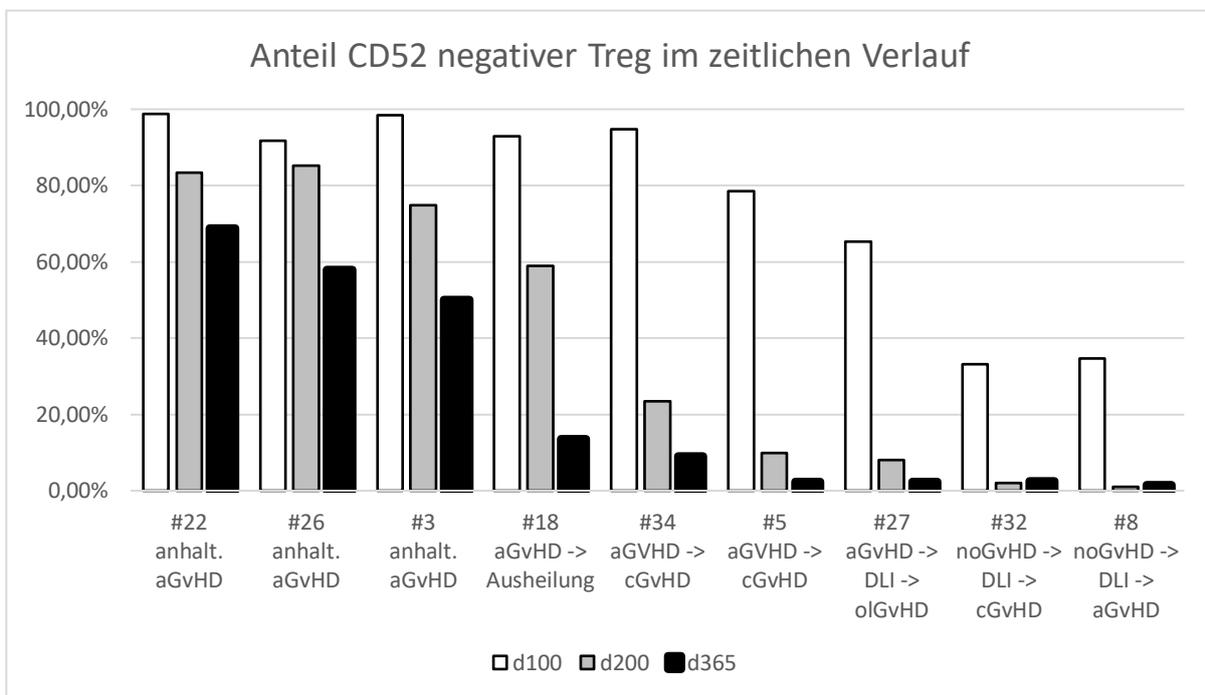


**Abbildung 23: CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #32.**

Initial blieb der Patient frei von GvHD, so dass am d120 bei fallendem Chimärismus DLI gegeben werden konnten. Hierauf bildete sich eine cGvHD der Haut aus und es wurde auf weitere DLI-Gaben verzichtet.



**Abbildung 24: CD52- und GvHD-Verlauf von Patient #8**  
 Bei fehlender GvHD wurde am d106 einmalig DLI verabreicht (präemptiv), aufgrund der sich daraufhin entwickelnden aGvHD der Haut erfolgten keine weiteren DLI-Gaben.



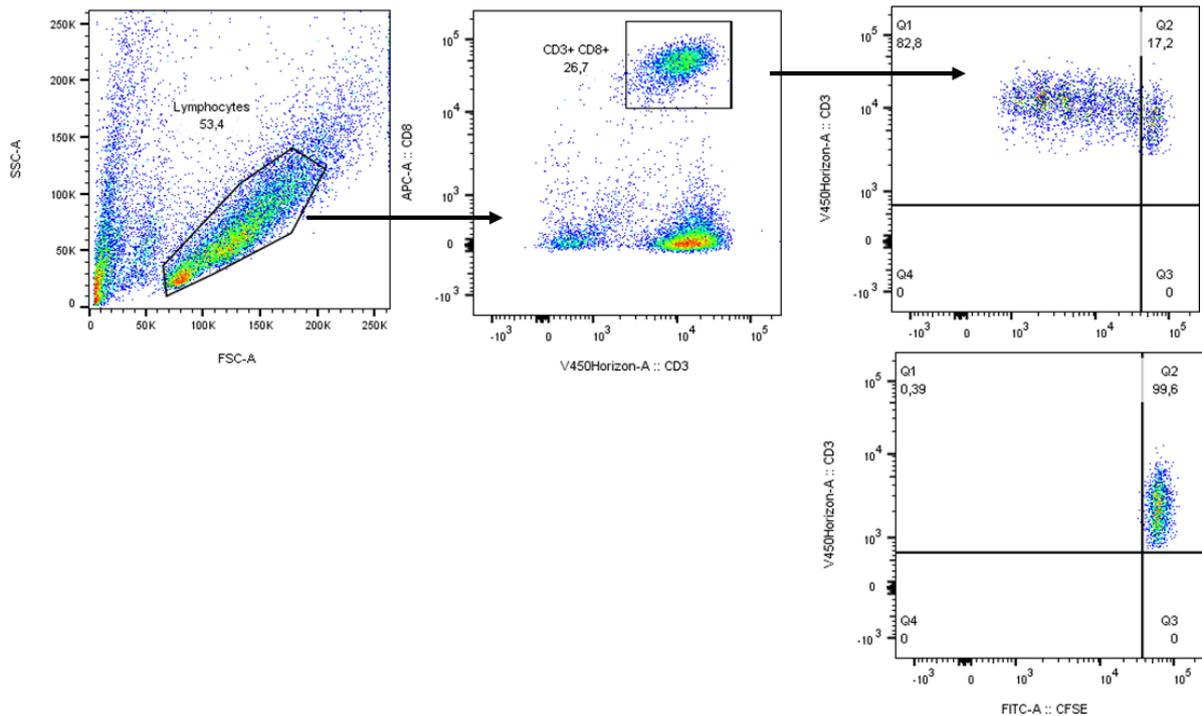
**Abbildung 25: Prozentualer Anteil CD52-negativer Treg im zeitlichen Verlauf.**  
 anhalt. aGvHD: anhaltende akute GvHD; oIGvHD: aGvHD/cGvHD-Overlap-Syndrom

In der obigen graphischen Zusammenfassung der durchgeführten Verlaufsuntersuchungen, in der die Patienten anhand ihrer GvHD-Ausprägung aufgezeichnet wurden (von links nach rechts: starke GvHD → keine GvHD), zeigt sich nochmal anschaulich die Korrelation zwischen GvHD-Verlauf und Anteil der CD52- negativer Treg: Bei allen Patienten mit anhaltender aGvHD sahen wir auch an d365 noch hohe Anteile CD52-negativer Treg, wohingegen sich nach Ausheilung einer aGvHD oder Übergang in eine cGvHD nur noch geringe Anteile CD52-negativer Treg im Verlauf nachweisen ließen. Bei den Patienten, die initial keine GvHD entwickelten, fanden wir übereinstimmend bereits an d100 deutlich niedrigere Anteile CD52-negativer Treg. Unabhängig von der

Klinik stellte sich jedoch bei allen Patienten im Verlauf eine abnehmende Tendenz der CD52-negativen Treg dar, es gab keinen Patienten, der im ersten Jahr nach der Transplantation eine anteilige Zunahme dieser Zellen bot. Im Gegensatz hierzu zeigten sich die absoluten Zahlen CD52-negativer Treg bei einigen Patienten mit anhaltender oder rezidivierender aGvHD im Verlauf teilweise zunehmend oder undulierend ohne eindeutige Tendenz. Bei Patienten mit cGvHD oder ohne GvHD zeigten sich hingegen auch die absoluten Zahlen CD52-negativer Treg durchgehend fallend.

### **5. 3 Suppressionsassay**

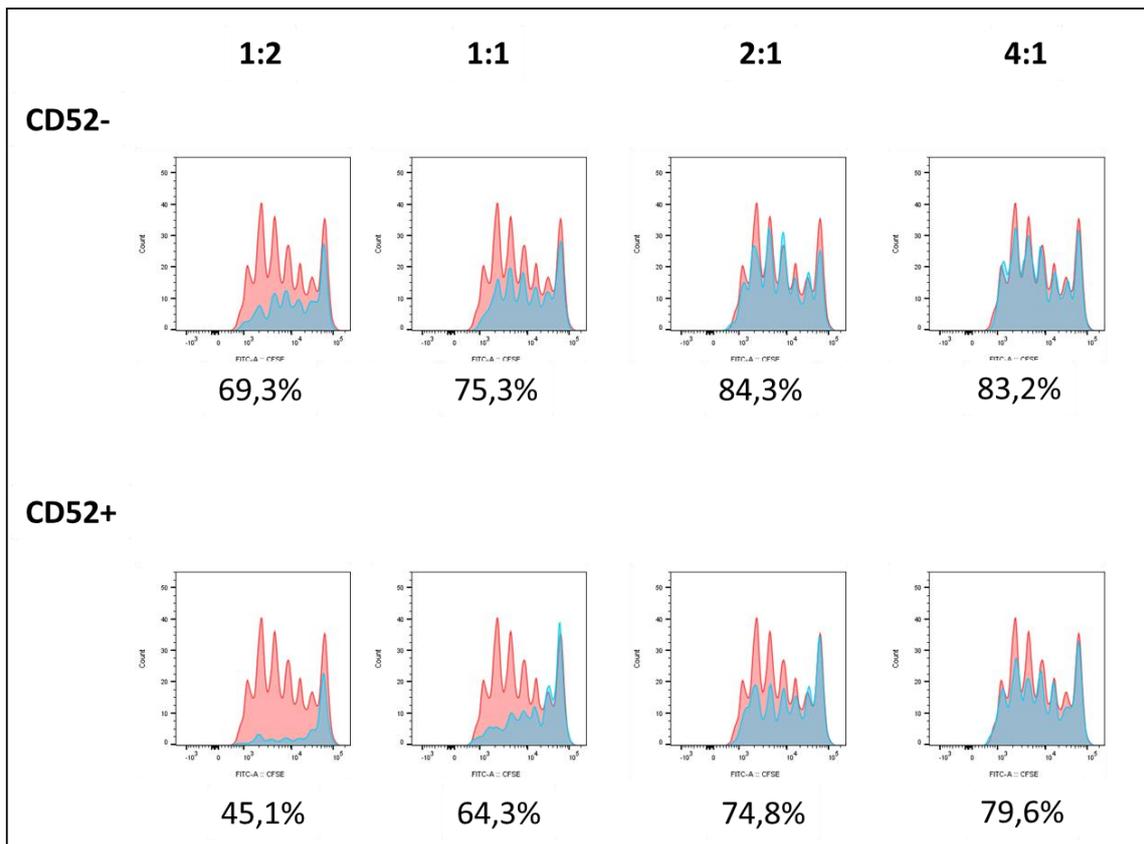
Um herauszufinden ob eine funktionelle Einschränkung bei den CD52-negativen Treg vorliegt, führten wir einen Suppressionsassay durch. Hierfür sortierten wir die Treg von Patient #17 anhand ihrer CD52-Expression und ko-kultivierten diese jeweils in verschiedenen Verhältnissen mit aktivierten und CFSE-markierten Responder-Zellen eines gesunden Spenders, wie im Methodenteil beschrieben. Als Responder-Zellen nutzten wir hierbei PBMC. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mit CD3 und CD8 gefärbt und anschließend im FACS gemessen. Für die Auswertung erfolgte zunächst die Identifikation CD8<sup>+</sup> T-Zellen über CD3 und CD8 und anschließend die Darstellung der Proliferation über das gemessene CFSE-Signal. Zum Vergleich für die Lage des Gates diente uns eine nicht- stimulierte Kontrolle, welche ebenfalls für 5 Tage kultiviert wurde.



**Abbildung 26: Gating-Strategie zur Bestimmung des Anteils proliferierter Zellen**

Zunächst wurden Lymphozyten identifiziert und anschließend daraus CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Von diesen Zellen wurde nun der Anteil der proliferierten Zellen bestimmt. In der unteren Reihe: Nicht-stimulierte Kontrolle zum Vergleich.

Dies führten wir jeweils für CD52-positive und -negative Treg in den verschiedenen Tresp: Treg-Verhältnissen durch. In der Gruppe der allein kultivierten Tresp (welche also nicht durch Treg gehemmt werden konnten) fanden wir eine Proliferationsrate von 82,8%. Diese diente uns bei den weiteren Auswertungen als Vergleichsparameter. Wir sahen bei den Tresp, welche mit CD52-negativen Treg ko-kultiviert worden waren eine deutlich stärkere Proliferation als in der Gruppe mit CD52-positiven Treg. Dieser Effekt zeigte sich auch bei niedrigeren Tresp: Treg-Verhältnissen und war bis zu einer Verdünnung von 4:1 nachweisbar, wie in nachfolgender Abbildung dargestellt.



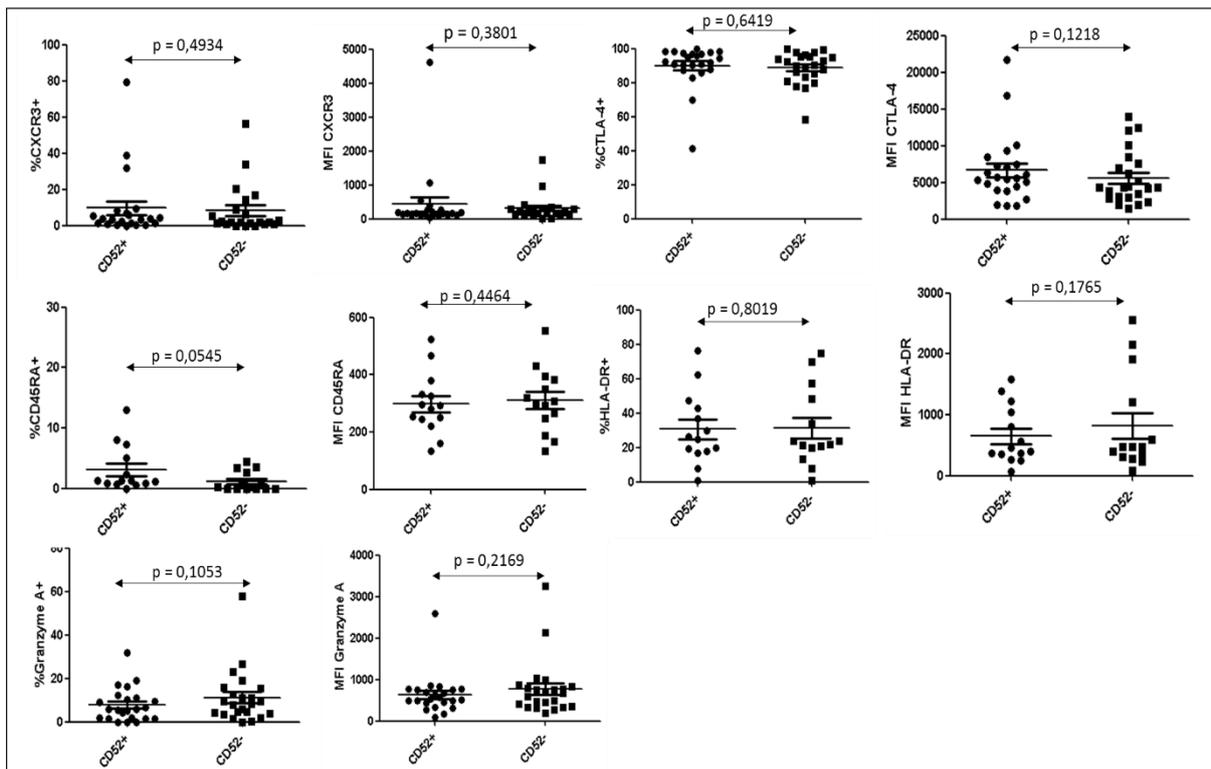
### Abbildung 27: Ergebnisse des Proliferationsassays

In der oberen Reihe ist die Proliferation der Tresp dargestellt, welche mit CD52<sup>-</sup> Treg kokulti- viert wurden. In der unteren Reihe analog die Tresp, welche mit CD52<sup>+</sup> Treg kokulti- viert wurden. Die oberen Zahlen geben das Verhältnis Tresp: Treg an. In rosa dargestellt ist die Prolife- ration ungehemmter Tresp, in grau die der gehemmten Tresp. Prozentzahlen geben die Proliferationsrate an.

## 5.4 Expression funktionell wichtiger Treg-Marker auf CD52-negativen und -po- sitiven Treg

Da sich aus den vorangegangenen Experimenten Hinweise ergaben, dass CD52-ne- gative Treg sowohl in vivo als auch in vitro funktionell eingeschränkt sein könnten, untersuchten wir die Expression weiterer extra- und intrazellulärer Marker im Vergleich zwischen CD52-positiven und -negativen Treg. Hierfür konzentrierten wir uns auf Mar- ker, welche eine wichtige Rolle in der Treg-Aktivierung oder für die Treg-Funktion spie- len: CD44, CD45RA, HLA-DR, CD39, CTLA4, CD62L, CXCR3, CCR5 und Granzyme A. Für die Untersuchung wählten wir uns Proben von Patienten zu Zeitpunkten, an denen sie sowohl CD52-positiv als auch CD52-negativ Treg aufwiesen. Die Auswahl der Proben erfolgte unabhängig von GvHD-Status und Zeitpunkt nach der Transplan- tation. Insgesamt führten wir diese Analyse an 23 Proben für CD44, CD39, CTLA-4,

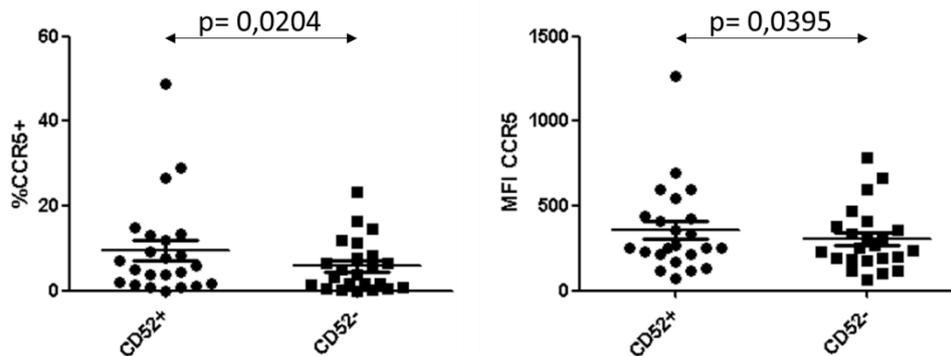
CXCR3, CCR5 und Granzyme A durch. Hiervon entstammten 13 Proben von Patienten mit aGvHD (Patienten #24, #18, #3, #22, #27, #17, #20, #26, #34, #21 und #33), 4 Proben von Patienten mit cGvHD (Patienten #34, #5, #36 und #30) und 6 Proben von Patienten, welche zum Probenzeitpunkt keine GvHD zeigten (Patienten #8, #32, #3, #18, #14 und #23). Die Probenzeitpunkte variierten von d83 bis d560 und die untersuchten Treg waren im Mittel zu 51,3% CD52-positiv (Range: 14,8% - 90,9%). Da die Marker CD62L, CD45RA und HLA-DR erst zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit ergänzt wurden, erfolgte die entsprechende Untersuchung nur an insgesamt 14 Proben; davon 8 mit aGvHD (Patienten #18, #3, #22, #27, #17, #26 und #34), 2 mit cGvHD (Patienten #34 und #5) und 4 ohne GvHD (Patienten #8, #32, #3 und #18); d83 bis d384; im Mittel 56,4% CD52-positive Treg). Die genannten Marker wurden jeweils zusammen mit CD4, CD25, FoxP3 und CD52 gefärbt. Für die Auswertung identifizierten wir zunächst, wie oben gezeigt, CD52-positive und -negative Treg und sahen uns anschließend die Expression des jeweiligen Markers (ausgedrückt durch den prozentualen Anteil beziehungsweise die Median Fluorescence Intensity, MFI) durch die beiden Subpopulationen an. Zur statistischen Untersuchung wurde anschließend ein Paired t-test durchgeführt. In der Auswertung zeigte sich für CXCR3, CTLA4, HLA-DR und Granzyme A sowohl bei den prozentualen Anteilen als auch der MFI kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Populationen. Für CD45RA fanden wir in Hinblick auf die prozentualen Anteile eine höhere Expression bei den CD52-positiven Treg, allerdings erreichte der Unterschied ebenfalls keine Signifikanz.



**Abbildung 28: Vergleich CD52<sup>+</sup> und CD52<sup>-</sup> Treg in Hinblick auf ihre Expression von CXCR3, CTLA4, CD45RA, HLA-DR und Granzyme A**

Bei allen genannten Markern findet sich kein signifikanter Unterschied der Expression. Dargestellt sind die prozentualen Anteile und die MFI des jeweiligen Markers aufgetragen für CD52<sup>+</sup> und CD52<sup>-</sup> Treg.

Für CCR5 konnten wir eine geringere Expression durch CD52-negative Treg im Vergleich zu CD52-positiven Treg nachweisen:



**Abbildung 29: Expression von CCR5**

Sowohl die prozentualen Anteile als auch die MFI von CCR5 sind bei den CD52<sup>-</sup> Treg erniedrigt.

Für CD39 zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der MFI bei den CD52-negativen Treg, die prozentualen Anteile waren im Vergleich jedoch ohne Unterschied.

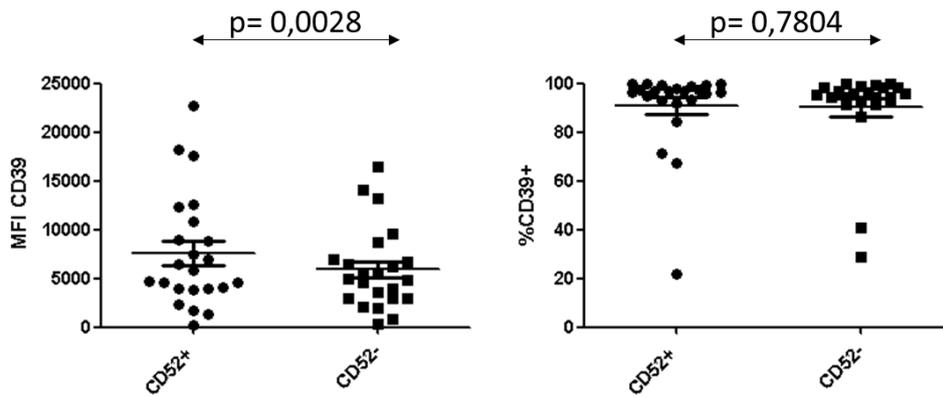


Abbildung 30: Expression von CD39

Sowohl bei CD44 als auch bei CD62L stellte sich die MFI bei den CD52-negativen Treg signifikant erhöht dar, im Vergleich zu den CD52-positiven Treg. Auch bei den Prozenten scheint sich dieser Trend bei beiden Markern abzuzeichnen, jedoch ohne, dass die Unterschiede hier statistische Signifikanz erreichen.

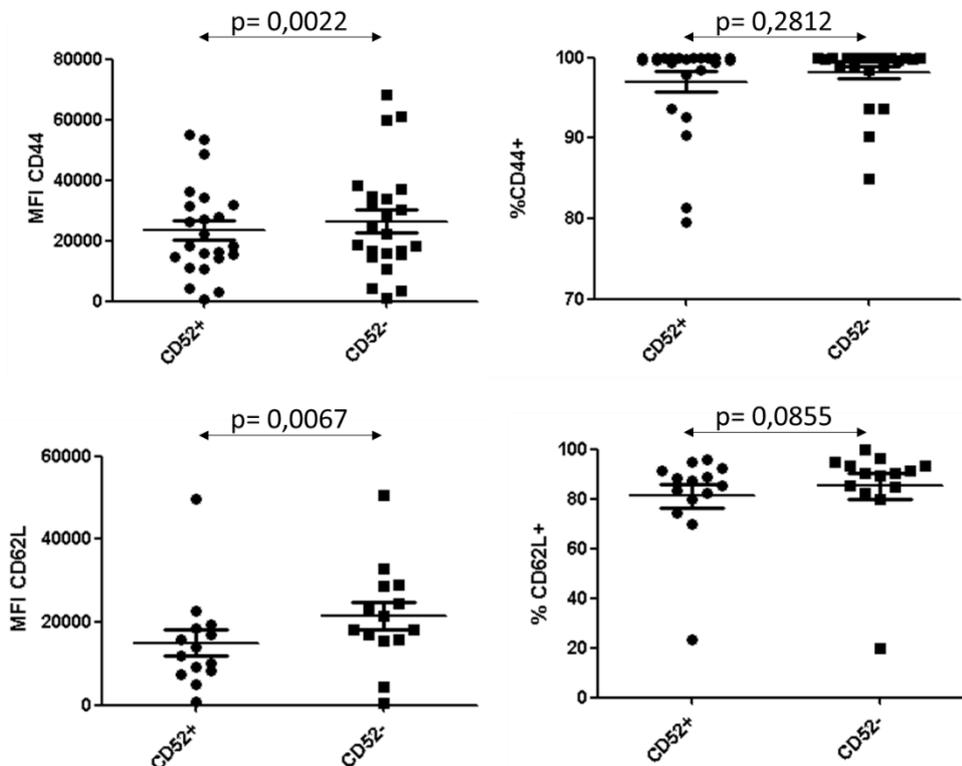


Abbildung 31: Expression von CD44 und CD62L

Um zu untersuchen, ob sich die Stärke der Expression von FoxP3 zwischen den beiden Populationen unterscheidet (wobei, gemäß dem oben aufgezeigten Vorgehen zur Identifikation von Treg, alle untersuchten Treg zu 100% FoxP3 positiv sind) verglichen

wir die MFI von FoxP3. Hierbei konnte im paired t-test eine statistisch signifikante Differenz mit einer niedrigeren MFI bei den CD52- negativen Treg nachgewiesen werden.

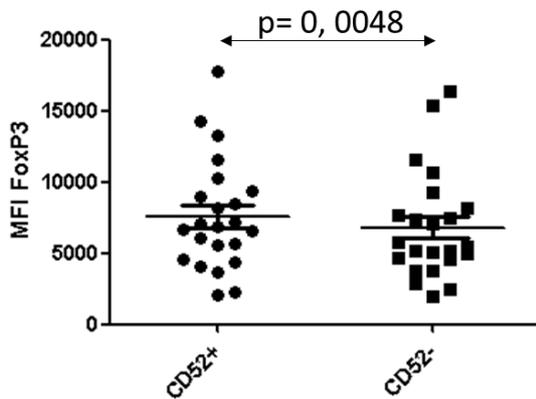


Abbildung 32: MFI von FoxP3

### 5.5 Treg- Marker und GvHD

Im letzten Schritt verglichen wir die eben besprochenen Marker zwischen den drei GvHD-Gruppen. Für diese Untersuchung standen jedoch nicht mehr von allen Patienten Proben zur Verfügung, so dass sich die Gruppen entsprechend verkleinerten: In der aGvHD-Gruppe wurden 11 Patienten untersucht ((Patienten #20, #35, #21, #33, #18, #24, #27, #3, #17, #26 und #22; die Probenzeitpunkte lagen zwischen d83 – d358 nach Tx), in der cGvHD-Gruppe 6 Patienten (Patienten #34, #5, #32, #36, #30, #40; d192-d530) und in der noGvHD-Gruppe ebenfalls 6 Patienten (Patienten #32, #13, #38, #14, #23 und #8; d97-d560). CD62L, CD45RA und HLA-DR wurden an zu wenig Patienten untersucht, so dass ein Vergleich für diese Marker nicht möglich war. Es wurden sowohl die bestimmten prozentualen Anteile der Marker auf den Treg als auch die gemessene MFI verglichen. Die entsprechenden Ergebnisse werden in Abbildung 33 dargestellt. In der durchgeführten Varianzanalyse zur Überprüfung eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen den drei Gruppen zeigte sich für keinen der Marker ein signifikantes Ergebnis. Bei CD39 sahen wir allerdings eine Tendenz zu einer niedrigeren Expression (sowohl prozentual als auch für die MFI) bei aGvHD und bei CXCR3 eine Tendenz zur höheren Expression (prozentual) bei aGvHD.

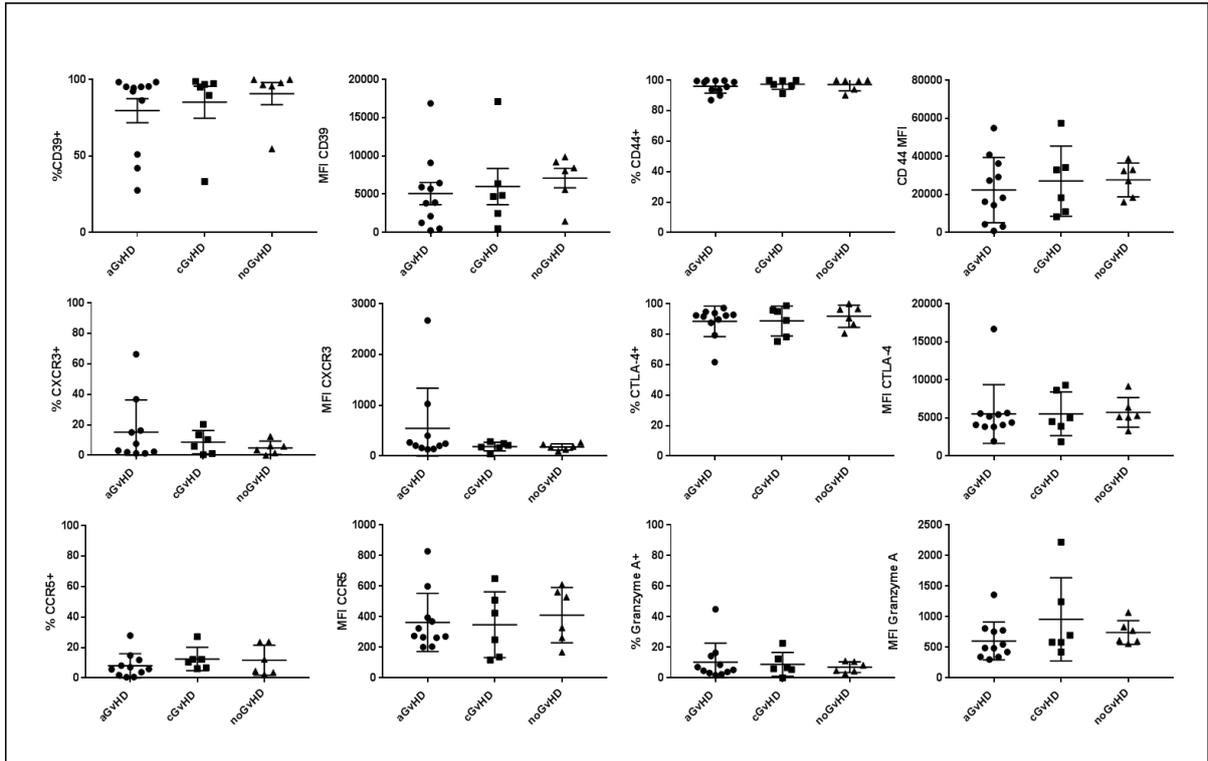


Abbildung 33: Vergleich der Marker-Expression durch Treg von Patienten mit aGvHD, cGvHD oder noGvHD

## 6. Diskussion

### 6.1 Alemtuzumab und T-Zell-Depletion

Alemtuzumab wird bereits seit 20 Jahren im Kontext der allogenen Stammzelltransplantation eingesetzt, um eine effektive TCD zur GvHD-Prophylaxe zu erreichen. Insbesondere in Verbindung mit einem dosisreduzierten Konditionierungsregime bestehend aus Fludarabin und Melphalan konnte bei Alemtuzumab-Anwendung die Rate an aGvHD signifikant gesenkt werden (94). Jedoch gibt es wie oben beschrieben auch andere Methoden zur T-Zell-Depletion, wobei vor Allem der Einsatz von ATG statt Alemtuzumab immer wieder kontrovers diskutiert wird. Aktuell ist die Entscheidung hierüber abhängig vom Transplantationszentrum, wobei es auch länderspezifische Präferenzen gibt. Bisherige Studien, welche zum Vergleich zwischen den beiden Methoden durchgeführt wurden, erbrachten gemischte Ergebnisse. Einerseits zeigten sich ein schnelleres Engraftment, weniger Infusionsbedingte Nebenwirkungen, sowie ein geringeres Risiko für das Auftreten von aGvHD und cGvHD nach Alemtuzumab im Vergleich zu ATG (95). Allerdings wurde in derselben Studie eine höhere Rezidiv-Rate nach Alemtuzumab festgestellt, welche letztlich wahrscheinlich dazu führte, dass sich die Minderung der GvHD nicht in einem erhöhten Überlebensvorteil für Alemtuzumab niederschlug. Die Ursache hierfür ist am Ehesten eine aufgrund der längeren Halbwertszeit von Alemtuzumab stärkere Verzögerung der Immunrestitution, welche in der Folge zu einem häufigeren Auftreten eines gemischten Chimärismus, sowie einem geringeren GvL-Effekt führt. Außerdem konnten in mehreren Studien ein erhöhtes Risiko für eine CMV-Reaktivierung aufgrund der eingeschränkten Immunrestitution unter Alemtuzumab nachgewiesen werden (3, 96). Andererseits konnte bisher auch keine Verlängerung des Gesamtüberlebens für ATG im Vergleich zu Alemtuzumab gezeigt werden. Daher wären sicherlich zur besseren Entscheidung Studien mit dem zusätzlichen Endpunkt der Lebensqualität aufschlussreich, da diese in den vorgenannten Untersuchungen nicht explizit abgefragt wurde. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Alemtuzumab in bestimmten Erkrankungssituationen weitere Vorteile gegenüber ATG aufweist: Robin et al. sahen in der oben bereits erwähnten Studie ein besseres Gesamtüberleben in der Alemtuzumab-Gruppe bei CMV-negativen Patienten. In einer weiteren Vergleichsstudie zur Transplantation bei Patienten mit schwerer aplastischer Anämie konnte ebenfalls eine deutlich geringere Rate an GvHD, sowie zusätzlich ein

erhöhtes Gesamtüberleben nach Transplantation von einem Nicht-verwandten Spender unter Alemtuzumab im Vergleich zu ATG festgestellt werden (97). Zuletzt entsteht zumindest ein theoretischer Vorteil von Alemtuzumab daraus, dass dieses, neben seiner Wirkung auf T-Zellen, auch eine Depletion von B- Zellen bewirkt (ATG bewirkt hingegen vorrangig eine T-Zell Depletion) und somit potenziell das Risiko für eine EBV-assoziierte Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) senkt (43).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die genaue Rolle von Alemtuzumab zwar noch zu klären bleibt, es aber definitiv auch in den nächsten Jahren weiter seinen Platz im Transplantations-Kontext haben wird, weshalb es sich lohnt sich weiterhin mit der Substanz und den Folgen ihrer Anwendung zu beschäftigen.

## **6.2 Treg-Rekonstitution**

Eine der eingangs bereits erwähnten Folgen von Alemtuzumab ist die gestörte Immun-Rekonstitution im Anschluss an die Transplantation. Weitere Untersuchungen ergaben, dass hierbei insbesondere die Rekonstitution von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gestört ist. So wiesen zum Beispiel D'Sa et al. bei fast allen Patienten noch 21 Monate nach Transplantation im Vergleich zu Gesunden deutlich erniedrigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach, wohingegen ein Großteil der Patienten bereits normale Werte für CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zeigte (4). So beschäftigten wir uns in dieser Arbeit zunächst mit der Rekonstitution von Treg (welche ebenfalls zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen gehören) nach HSZT mit dosisreduzierter Konditionierung und Alemtuzumab. In unserer Analyse von Treg-Zahlen und -Anteilen, gruppiert nach dem Zeitpunkt der Probeentnahme nach der Transplantation, fanden wir in den ersten 100 Tagen signifikant niedrigere Werte sowohl für die Anzahl als auch für den prozentualen Anteil der Treg an allen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten im Vergleich zu späteren Zeitpunkten. Zwischen Tag +200 und +300 zeigte sich nur noch ein leichter Anstieg der beiden Werte und nach Tag +300 sahen wir einen leichten Abfall des prozentualen Treg-Anteils bei gleichbleibender absoluter Treg-Anzahl. In unserer Studie haben wir weder gesunde Kontrollen untersucht, noch Patienten mit anderen Konditionierungsregimen, so dass keine eindeutige Aussage über den Einfluss von Alemtuzumab auf die Güte der Treg-Rekonstitution getroffen werden kann. In der Literatur findet man jedoch Angaben für den prozentualen Anteil der Treg an CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, welche bei gesunden Probanden zwischen 5-10% liegen (98, 99), so dass bei unseren Patienten bis Tag 200 mit 6,9% annehmbar

normale Treg-Anteile erreicht wurden. Dies deckt sich mit der Studie von Perz et al., in der ebenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation Treg-Anteile untersucht wurden. Auch wenn die dort verwendeten Zeitpunkte sich von den bei uns gewählten unterscheiden, beschreiben die Autoren relativ früh nach Transplantation (zwischen Tag +150 und +360) bereits normale Treg-Anteile an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (100). Es zeigte sich also, zumindest in unserer Studie, kein negativer Einfluss von Alemtuzumab auf die anteilige Entwicklung der Treg-Population innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Allerdings müsste man um diese Fragestellung genauer zu untersuchen einerseits Analysen zu früheren Zeitpunkten (und in kürzeren Abständen) nach Transplantation durchführen und dies mit einer Kontrollgruppe vergleichen, welche kein Alemtuzumab erhalten hat. Jedoch können wir davon ausgehen, dass bei unseren Patienten bei normalen Treg-Anteilen, die absoluten Treg-Zahlen im gleichen Maße wie die CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter denen der Normalbevölkerung liegen, da, wie oben beschrieben, die Rekonstitution von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Alemtuzumab verzögert abläuft.

### **6.2.1 Treg-Rekonstitution und GvHD**

In vielen Studien wurde bereits beschrieben, dass ein vermindertes Vorkommen von Treg mit der Ausbildung einer aGvHD assoziiert ist (101-103).

In Bezug auf die cGvHD ist die Studienlage weniger einheitlich. Während in einigen Untersuchungen erniedrigte Treg-Anteile bei cGvHD gefunden wurden (104-106), wird in anderen Studien über erhöhte Treg-Anteile bei cGvHD (sowohl nach vorangegangener aGvHD, als auch bei Patienten ohne aGvHD) berichtet (107, 108).

Bei einem Vergleich aller Proben fanden wir keine signifikant erniedrigten Treg-Anteile oder -Zahlen in der Gruppe der Patienten, welche eine aGvHD entwickelten. Auch wenn wir nur die Proben betrachten, welche in den ersten 100 Tagen nach der Transplantation entnommen wurden, zeigen sich in der aGvHD-Gruppe eher erhöhte Treg-Zahlen und auch -Anteile im Vergleich zu Patienten ohne GvHD, auch wenn diese Werte keine statistische Signifikanz erreichen. Für die cGvHD-Gruppe können wir zu diesem frühen Zeitpunkt keine Aussage treffen, da vor Tag +100 nicht genug Proben vorlagen von Patienten, die später eine cGvHD entwickelten. Die Diskrepanz unserer Ergebnisse in Bezug auf die aGvHD im Vergleich zu den zuvor erwähnten Studien könnte mehrere Gründe haben. Zum einen liegt unser frühester Probeentnahmezeitpunkt an Tag +49 und damit deutlich später als in den meisten

Studien, welche den oben genannten Zusammenhang feststellen konnten. So beziehen sich Fujioaka et al. auf Proben, die 2 Wochen nach Transplantation entnommen wurden und bei Rezvani et al. liegen Proben von Tag +30 vor. Zudem handelt es sich bei den genannten Studien um prospektive Studien, welche die gemessenen Treg-Werte mit der anschließenden Ausbildung einer aGvHD korrelierten. Es konnte hiermit also gezeigt werden, dass verminderte Treg sehr früh nach Transplantation mit einem späteren Auftreten von aGvHD zusammenhängen. In einer weiteren Arbeit, von Miura et al., wurden FoxP3 mRNA-Level 24-48h nach Beginn einer aGvHD und vor Initiierung einer Behandlung gemessen. Dabei fanden sie erniedrigte Level im Vergleich zu Kontrollen ohne GvHD (109). Im Gegensatz dazu wurden die meisten unserer Proben entnommen, nachdem die aGvHD bereits begonnen hatte und diese teilweise auch schon behandelt wurde. Es wurden durch uns lediglich 4 Proben analysiert, welche vor Auftreten einer aGvHD abgenommen wurden und es lagen uns keine zeitlich passenden Proben von Patienten ohne GvHD vor, so dass eine diesbezügliche Analyse in dieser Arbeit nicht erfolgen konnte.

Wurde bereits eine Behandlung der aGvHD begonnen, erfolgte diese durch immunsuppressive Medikation, welche in allen Fällen aus Steroiden bestand und bei einigen Patienten mittels Tacrolimus oder CsA intensiviert bzw. mit PUVA oder ECP ergänzt wurde. Diese Therapie könnte natürlich auch einen Einfluss auf die Entwicklung der Treg-Population haben, wobei ich mich in meinen Erörterungen hier allein auf die Steroide beziehen möchte, da es für die übrigen Therapien in unserer Studie jeweils nur geringe Fallzahlen gab. Ein Zusammenhang zwischen Treg und Glukokortikoiden wurde zunächst außerhalb des Transplantationskontextes von Karagiannidis et al. beschrieben. In der Arbeit wurden signifikant erhöhte FoxP3-mRNA Level gemessen bei Asthma-Patienten, die zuvor Glukokortikoide inhaliert hatten (110). Auch Suarez et al. fanden signifikant erhöhte Treg-Anteile nach Steroidtherapie (111). Da Glukokortikoide bis heute als häufigste Medikation zur Behandlung von GvHD eingesetzt werden, ist deren Einfluss auf die Treg-Entwicklung auch im Kontext der allogenen Stammzelltransplantation interessant. Dieser Fragestellung widmeten sich Schneider et al. und fanden signifikant erhöhte Treg-Anteile bei GvHD-Patienten, welche zum Probenzeitpunkt unter Steroidtherapie standen (112). In dieser Studie wurden zudem, analog zu unseren Ergebnissen, erhöhte Treg-Anteile bei Patienten mit aGvHD beschrieben.

Zuletzt bleibt noch zu erwähnen, dass in den zuvor aufgeführten Studien keine einheitliche Angabe für die Treg erfolgte. Es wurden entweder absolute Zahlen gemessen

oder Treg-Anteile bezogen auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder alle Lymphozyten. In der Literatur herrscht keine Einigung darüber, welche Angabe zu Treg deren Funktion in vivo am besten widerspiegelt. Perz et al. diskutieren in ihrer oben erwähnten Arbeit (100), dass der Anteil der Treg an allen Lymphozyten deren Verhältnis zu allen von ihnen zu regulierenden Zellen widerspiegelt und somit das beste Maß für ihre Funktionalität in vivo darstellt. In unseren Untersuchungen sahen wir jedoch keine unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die verschiedenen Treg-Angaben.

Doch selbst wenn wir nicht ausschließen können, dass eine eventuell vor Auftreten der aGvHD erniedrigte Treg-Zahl bestanden hat und dies ggf. auch ursächlich zur Entstehung der aGvHD beigetragen haben könnte, erklärt dies nicht, warum Patienten mit einem höheren Treg-Anteil oder Treg-Zahlen als Patienten ohne GvHD an einer anhaltenden aGvHD leiden, wie wir es in unseren Verlaufsuntersuchungen aufzeigen konnten. Es liegt daher der Verdacht nahe, dass die Treg dieser Patienten in ihrer Funktion eingeschränkt sind.

### **6.3. CD52- negative Treg**

Wie bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beschrieben, konnte ich erneut die Rekonstitution CD52-negativer Treg nachweisen. Das Auftreten CD52-negativer T-Zellen in Folge einer Alemtuzumab-Behandlung wurde nicht nur durch unsere Arbeitsgruppe, sondern auch bereits in verschiedenen anderen Studien beschrieben. Hierbei wurde dieser Zusammenhang sowohl im Transplantationskontext (zum Beispiel durch Loeff et al. (113)) als auch im Rahmen der Behandlung verschiedener Erkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis (Brett et al. (6)) oder der CLL (Rawstron et al. (114)), gezeigt. Regulatorische T-Zellen wurden allerdings in keiner dieser Studien explizit untersucht und auch sonst gibt es in der Literatur bisher keinen Nachweis CD52-negativer Treg. Bei Gesunden scheinen alle Treg CD52 zu exprimieren, wobei es hierzu ebenso nur wenige Daten gibt. Eine Untersuchung von Haas et al. fand bei 5 gesunden Probanden nur CD52-positive Treg, wobei die Intensität der CD52- Expression im Vergleich zu Teff auf Treg erniedrigt war (gemessen anhand der MFI) (115). In einer weiteren Studie zeigten sich, ebenfalls bei gesunden Probanden, alle CD4<sup>+</sup> T-Zellen (welche die Treg einschließen) CD52-positiv (116).

### 6.3.1. Ursprung CD52-negativer Treg

Der Mechanismus des Entstehens CD52-negativer T-Zellen nach Alemtuzumab-Behandlung ist bisher nicht vollständig verstanden. Sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in anderen Arbeiten konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass den betroffenen Zellen nicht nur CD52 auf der Oberfläche fehlt, sondern auch weitere GPI-verankerte Proteine, wie CD48, CD55 und CD59 (6),(117). Daher wurde ein zugrundeliegendes Problem bezüglich Synthese oder Transport der GPI-Anker bzw. der Kopplung der Antigene an die GPI-Anker vermutet (118).

Das Fehlen von GPI-Ankern ist pathognomonisch für die Erkrankung „Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie“ (PNH). Diese ist charakterisiert durch eine somatische Mutation in einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, welche die Abwesenheit sämtlicher GPI-verankerter Antigene auf der Zelloberfläche zur Folge hat. Zur namensgebenden Hämolyse kommt es hierbei durch die ebenfalls fehlenden komplementregulierenden Proteine CD55 und CD59 auf der Erythrozytenmembran, so dass die Zellen unzureichend geschützt und verstärkt lysiert werden (119). Die ursächliche Mutation findet sich in dem für die GPI-Anker-Synthese essenziellen Gen PIG-A (114). So lag es nahe auch bei den GPI-Anker defizienten Lymphozyten nach Alemtuzumab-Behandlung nach einer solchen Mutation zu suchen. Und tatsächlich konnten Rawstron et al. in einem Patienten eine Deletion in Exon 2 des PIG-A Gens nachweisen, welche ein nicht-funktionales Genprodukt zur Folge hat. Darüber hinaus fanden sie jene Mutation in demselben Patienten in einer sehr geringen Anzahl von Zellen bereits vor der Behandlung mit Alemtuzumab (114). Auch im Transplantationskontext wurde dieser Zusammenhang inzwischen mehrfach untersucht. Loeff et al. wiesen verschiedenste Mutationen im PIG-A Gen nach, welche sich als ursächlich für die CD52-Negativität erwiesen (113). Und auch hier wurden diese Mutationen nicht nur bei den Empfängern nach der Transplantation gefunden, sondern auch bei den Spendern, wo ebenfalls geringe Mengen CD52-negativer T-Zellen nachweisbar waren. Dies führt die Autoren zu der Hypothese, dass die CD52-negativen T-Zellen in geringem Maße natürlicherweise vorkommen und dem Empfänger transplantiert wurden. Diese Zellen entgehen der Alemtuzumab-vermittelten Lyse und erhalten einen Selektionsvorteil, so dass sie nach der Transplantation expandieren bevor sie im Verlauf durch rekonstituierende CD52-positive Stammzellen überwachsen werden.

Alemtuzumab selbst ist allerdings nur bis zu 60 Tage nach der letzten Gabe in pharmakologisch aktiven Konzentrationen im Patienten vorhanden (120). Dass CD52-negative T-Zellen auch noch Jahre nach der Transplantation in Patienten nachgewiesen werden können, liegt möglicherweise darin begründet, dass es sich hierbei um Memory T-Zellen handelt, welche eine lange Lebensdauer haben (51).

### **6.3.2. akute GvHD**

Die durch uns gefundenen CD52-negativen Treg stellten sich bei Patienten mit akuter GvHD im Vergleich zu den anderen GvHD-Gruppen signifikant erhöht dar. Erstmals wurde dieser Zusammenhang nun an mehreren Patienten auch im zeitlichen Verlauf über 1 Jahr nach stattgehabter Stammzelltransplantation untersucht. Hierbei konnten wir zunächst einmal feststellen, dass fast alle untersuchten Patienten an d100 nach der Transplantation mehr als 60% CD52-negative Treg aufwiesen. Eine Ausnahme hiervon stellten die 2 Patienten dar, welche nach Transplantation zunächst keine GvHD entwickelten. Dennoch ließen sich auch bei diesen Patienten CD52-negative Treg nachweisen (34% bzw. 33%). Im Verlauf des ersten Jahres nach der Transplantation war bei allen Patienten ein Rückgang der CD52-negativen Treg-Population zu sehen, es kam in keinem Fall zu einem erneuten prozentualen Anstieg dieser Population. Allerdings zeigte sich der Verlauf intraindividuell sehr unterschiedlich, wobei sich die Dynamik der anteiligen Proliferation CD52-negativer Treg sehr gut mit dem klinischen Verlauf korrelieren ließ. Bei den 3 Patienten mit anhaltender oder rezidivierender aGvHD konnten wir auch 1 Jahr nach der Transplantation weiterhin mindestens 50% CD52-negative Treg nachweisen. Im Gegensatz hierzu ließ sich bei einem Patienten nach ausgeheiltem aGvHD an d365 ein Rückgang der CD52-negativen Treg-Population auf 13% messen. Bei den Patienten, welche initial keine aGvHD entwickelt hatten, sahen wir 1 Jahr nach der Transplantation sogar nur noch maximal 2% CD52-negative Treg. Wir konnten somit in dieser Arbeit zeigen, dass sich auch der Verlauf der CD52-Expression auf Treg bei aGvHD deutlich von dem von Patienten mit cGvHD bzw. ohne GvHD unterscheidet. Eine weiterführende Untersuchung, welche die CD52-Expression im Hinblick auf den Schweregrad der aGvHD vergleicht, konnte in dieser Arbeit aufgrund der zu geringen Patientenzahl leider nicht durchgeführt werden, wäre aber im Rahmen zukünftiger Projekte sicherlich sinnvoll.

### **6.3.3. Chronische GvHD**

Für die chronische GvHD konnten wir in dieser Arbeit ebenfalls signifikant erhöhte Anteile CD52-negativer Treg im Vergleich zur no-GvHD-Gruppe nachweisen. Im Vergleich zur aGvHD war die CD52-Negativität weniger stark ausgeprägt. Die Aussagekraft dieser Untersuchung ist allerdings dadurch eingeschränkt, dass nur sehr wenige Patienten in der cGvHD-Gruppe untersucht wurden. In den Verlaufsuntersuchungen zeigte sich dann interessanterweise auch bei cGvHD ein Rückgang der CD52-negativen Treg, welcher einer ähnliche Dynamik aufwies wie der Verlauf bei Ausheilung der aGvHD beziehungsweise bei den Patienten ohne initiale GvHD. Auch bei anhaltender cGvHD waren nach einem Jahr nur noch maximal 9% CD52-negative Treg nachweisbar. So ist es nicht auszuschließen, dass der eingangs erwähnte Unterschied zwischen der cGvHD- und der noGvHD-Gruppe rein zufällig gemessen wurde, dadurch bedingt, dass alle cGvHD-Patienten zuvor an einer aGvHD erkrankt waren und der erhöhte Anteil CD52-negativer Treg vielleicht noch aus dieser Krankheitsphase stammte. Jedoch wurden auch in den Verlaufsuntersuchungen mit nur 2 cGvHD-Patienten keine ausreichenden Daten gemessen um eine abschließende Aussage treffen zu können. Der Zusammenhang zwischen cGvHD und CD52-Expression auf Treg konnte somit in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Diese sollte eine größere Fallzahl einschließen und Messungen zu festgelegten Zeitpunkten nach Auftreten der cGvHD enthalten um einen nachhängenden Effekt der aGvHD-Phase auszuschließen.

### **6.3.4. DLI**

Einige der in dieser Arbeit untersuchten Patienten erhielten gemäß dem Studienprotokoll DLI-Gaben (prophylaktisch oder präemptiv). Diese können wiederum die Entwicklung einer GvHD zur Folge haben, wie bereits in vielen vergangenen Studien gezeigt werden konnte (121, 122). Eine kürzlich erschienene retrospektive Untersuchung fand zudem ein deutlich verringertes Gesamtüberleben bei den Patienten, welche eine GvHD nach DLI entwickelten. Als Risikofaktoren für das Auftreten einer GvHD nach DLI wurden in der Studie ein Alter >60 Jahre, ein kurzes Zeitintervall zwischen Transplantation und DLI sowie eine vorangegangene aGvHD Grad II-IV identifiziert (123). Ein Zusammenhang zwischen CD52-Status und GvHD nach DLI wurde bisher nicht untersucht.

Von unseren Patienten entwickelten 2 eine aGvHD, bei 2 Patienten kam es zu einer cGvHD oder einem Overlap-Syndrom und bei 2 Patienten sahen wir keine GvHD. Hierbei konnten wir keinen Zusammenhang aufzeigen zwischen dem CD52-Status vor der DLI-Gabe und dem anschließenden Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD. Besonders deutlich wird dies an den Patienten #19 und #37, welche beide am Tag +83 untersucht wurden. Bei beiden Patienten fanden wir bereits zu diesem frühen Zeitpunkt nach der Transplantation nur geringe Anteile CD52-negativer Treg (5,7% bzw. 3,3%). Sie erhielten zudem fast am gleichen Tag post-Transplantation die DLI-Gabe, wobei Patient #19 keine GvHD entwickelte (und sogar zu einem späteren Zeitpunkt eine zweite DLI-Gabe erhielt, ebenfalls ohne eine GvHD zu entwickeln), wohingegen bei Patient #37 eine aGvHD III° auftrat. Insgesamt wurden in dieser Arbeit sicher zu wenige Patienten vor/nach DLI-Gabe untersucht um diesbezüglich eine sichere Aussage treffen zu können, jedoch fanden wir hier zumindest keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen CD52-Status und Entwicklung einer GvHD nach DLI-Gabe. Im weiteren Verlauf nach DLI-Gabe stellte sich der prozentuale Anteil CD52-negativer Treg ebenso rückläufig dar wie bei den Patienten ohne DLI.

### **6.3.5. Absolute Zellzahlen**

Neben den prozentualen Anteilen CD52-negativer Treg untersuchten wir in dieser Arbeit auch die absoluten Zahlen im Verlauf. Hier zeigte sich interessanterweise in einigen Fällen trotz der prozentualen Abnahme ein Anstieg der absoluten Zahl CD52-negativer Treg. Dies sahen wir bei Patienten mit anhaltender oder rezidivierender aGvHD, wobei zum gleichen Zeitpunkt jeweils auch ein Anstieg der relativen und absoluten Zellzahl für die gesamte Treg-Population zu verzeichnen war. Wir konnten einen solchen Verlauf nicht bei allen aGvHD-Patienten nachweisen, jedoch zeigte im Vergleich keiner der Patienten mit cGvHD oder ohne GvHD einen Anstieg der absoluten Zahlen CD52-negativer Treg.

Die Zunahme absoluter Zellzahlen CD52-negativer Treg konnten wir bei einigen Patienten auch noch 1 Jahr nach Transplantation nachweisen. Da Alemtuzumab zu diesem Zeitpunkt längst ausgeschieden ist, scheint sich hier also um Zellen zu handeln, die auch ohne den Selektionsdruck durch Alemtuzumab weiter proliferieren können.

### 6.3.6. Funktion von CD52

Die Funktion des GPI-verankerten Oberflächenmoleküls CD52 ist aktuell Gegenstand weiterer Forschungen. In der Vergangenheit wurde vermutet, dass CD52 in der Induktion von Treg sowie bei der Aktivierung von T-Effektorzellen eine Rolle spielen könnte (124, 125). In einer neueren Untersuchung von Bandala-Sanchez et al. wurde Siglec-10 als Bindungspartner für lösliches CD52 identifiziert (126). Hierbei handelt es sich um einen Rezeptor auf T-Zellen, dessen Aktivierung eine verringerte Phosphorylierung T-Zell-Rezeptor-assoziiierter Tyrosinkinasen zur Folge hat und damit letztendlich zu einer Suppression der T-Zell-Funktion führt. Über diesen Mechanismus käme CD52 also eine regulierende Rolle in der Immunantwort zu. Allerdings beschrieben Bandala-Sanchez et al. diesen Zusammenhang für eine spezielle Population innerhalb der CD4+ T-Zellen, deren Zellen CD52 in hohem Maße exprimieren und suppressive Eigenschaften aufweisen, sich jedoch deutlich von den Treg unterscheiden. Ob regulatorische T-Zellen ebenfalls mit Hilfe von Phospholipasen lösliches CD52 produzieren und den beschriebenen Mechanismus nutzen, wurde in der genannten Arbeit nicht untersucht. Auch gibt es bisher keine Daten zur Wirkung von löslichem CD52 auf die Aktivierung oder Funktion dieser Zellen.

Eine weitere immunomodulatorische Wirkung von CD52 konnte in Bezug auf die humorale Immunität gezeigt werden. So fanden Rashidi et al. eine CD52-vermittelte Suppression des NF- $\kappa$ B-Signalwegs, welcher als Reaktion auf die Aktivierung von Toll-like-receptors ausgelöst wird (127).

Wie bereits in Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, ist das Fehlen von CD52 nach Alemtuzumab-basierter Stammzelltransplantation nicht auf Treg beschränkt, sondern betrifft alle CD4+ (und auch CD8+) T-Zellen. Unter dem Aspekt der immunregulatorischen Funktion von CD52 wäre es also auch denkbar, dass das Fehlen von diesem Oberflächenmolekül allgemein eine verstärkte Immunantwort und damit auch eine erhöhte Rate an aGvHD verursacht. Um zu untersuchen, ob speziell CD52-negative Treg in ihrer Funktion eingeschränkt sind, führten wir daher ein Suppressionsassay durch und fanden tatsächlich eine verminderte Suppressionsfähigkeit im direkten Vergleich zu CD52-positiven Treg. In der Folge interessierte uns, ob das Fehlen von CD52 auch mit anderen messbaren Veränderungen der Treg einhergeht.

## 6.4 Funktionseinschränkung CD52-negativer Treg

Unser eben erwähnter Funktionstest überprüft die Suppressionsfähigkeit von Treg in direktem Kontakt mit Effektor T-Zellen. Eine Ursache des vermehrten Auftretens von akuter GvHD bei gleichzeitig hohen Anteilen CD52-negativer Treg könnte also darin liegen, dass diese Zellen im direkten Zellkontakt eine verminderte Suppressionsfähigkeit aufweisen. Ein Suppressionsmechanismus regulatorischer T-Zellen läuft wie eingangs beschrieben über den CD39/CD73-Mechanismus. Hierbei wird extrazelluläres ATP durch CD39 zunächst in ADP und schließlich in AMP aufgespalten. AMP wiederum bindet an CD73 und wird durch dieses zu freiem Adenosin dephosphoryliert. Die Interaktion von Adenosin mit dem A<sub>2</sub>A-Rezeptor auf Effektor-T-Zellen führt zu einer Reduktion der inflammatorischen Reaktion, wahrscheinlich über eine Hemmung des NF-κB-Signalwegs. Zudem konnte auch eine Expansion von Treg nach Adenosin-Bindung an A<sub>2</sub>A auf diesen Zellen und damit eine weitere Steigerung der antiinflammatorischen Reaktion nachgewiesen werden (128). CD39 wird durch verschiedene hämatopoetische Zellen exprimiert, für regulatorische T-Zellen ist jedoch eine besonders hohe Fraktion CD39-positiver Zellen beschrieben. Bei CD73 stellt sich die Datenlage uneinheitlich dar: Während für murine Treg eine hohe membrangebundene Expression von CD73 beschrieben wurde, konnte diese auf humanen Treg bisher nicht bestätigt werden. Stattdessen fand man eine höhere intrazelluläre Expression von CD73 auf Treg im Vergleich zu konventionellen T-Zellen (129). Erschwert wird die Untersuchung von CD73 zudem dadurch, dass die Antikörperbindung an membrangebundenem CD73 möglicherweise eine Loslösung der Verankerung verursacht (130). Aus diesen Gründen untersuchten wir in dieser Arbeit CD39 und nicht CD73, obwohl CD73 im Gegensatz zu CD39 ein GPI-verankertes Protein ist (130). Wir fanden hierbei im Einklang mit den zuvor genannten Arbeiten durchgängig eine hohe prozentuale Expression von CD39 auf Treg. Im Vergleich zwischen CD52-positiven und CD52-negativen Treg fiel jedoch eine signifikant niedrigere MFI von CD39 auf CD52-negativen Treg auf. Zwischen den GvHD-Gruppen fanden wir hingegen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der CD39-Expression, wobei sich eine Tendenz zu einer niedrigeren CD39-Expression bei aGvHD abzuzeichnen scheint. Es könnte sich hier also lohnen eine weitere Studie mit einer größeren Patientenzahl anzuschließen, die diese Korrelation nochmals überprüft. In der Literatur findet man bisher keine Studien, die den Zusammenhang einer CD39-Expression und GvHD untersuchen. Zudem bleibt offen, inwiefern CD39- und CD73-Expression aneinandergelockt sind und ob eine

möglicherweise durch fehlende GPI-Anker bedingte Abwesenheit von CD73 an der Zelloberfläche zu einer Herunterregulierung von CD39 führt, wie sie unsere Ergebnisse vermuten lassen.

Ein weiterer kontaktabhängiger Suppressionsmechanismus von Treg läuft über CTLA-4, welches letztendlich eine verminderte Kostimulation von Effektor-T-Zellen durch APC bewirkt. In der Literatur sind übereinstimmend durchgängig hohe Expressionen von CTLA-4 auf Treg beschrieben, dies konnten wir in dieser Arbeit auch für unsere Patienten nachweisen: Im Mittel fanden wir rund 90% CTLA-4-positive Treg. Im GvHD-Kontext wurde CTLA-4 unter anderem durch Miura et al. untersucht (109), welche eine verminderte CTLA-4-Expression (auf mRNA-Ebene) bei Patienten mit GvHD zeigen konnten. Hierbei wurde allerdings die CTLA-4-Expression auf allen PBMC der Patienten bestimmt und nicht explizit auf Treg. Da CTLA-4 auch von anderen T-Zellen exprimiert wird, lässt sich hier nicht sicher auf eine Treg-vermittelte Wirkung schließen. In unseren Untersuchungen konnten wir keinen Unterschied hinsichtlich der CTLA-4-Expression auf Treg zwischen den einzelnen GvHD-Gruppen nachweisen. Auch fanden wir keine signifikant erniedrigte CTLA-4-Expression auf CD52-negativen Treg. Im Gegensatz zu unserer Arbeit wurden in der vorgenannten Untersuchung von Miura et al. die Messungen jedoch zum Zeitpunkt des GvHD-Auftretens durchgeführt. Wir können daher also nicht ausschließen, dass es also auch bei unseren Patienten zu früheren Zeitpunkten nach der Transplantation Unterschiede in der CTLA-4-Expression auf Treg geben könnte.

Auch das MHC-Klasse II-Molekül HLA-DR scheint, wie eingangs erläutert, im Zusammenhang mit der Kontakt-abhängigen Suppression von Treg in Verbindung zu stehen. In der Literatur gibt es bisher jedoch keine Arbeiten, die den Zusammenhang zwischen der Expression auf Treg und dem Auftreten einer GvHD behandeln. Im Vergleich zwischen CD52-positiven und -negativen Treg zeigte sich in unseren Untersuchungen kein signifikanter Unterschied, ein Vergleich zwischen den einzelnen GvHD-Gruppen war allerdings aufgrund der zu geringen Anzahl gemessener Proben nicht sinnvoll möglich.

Neben den Oberflächenmolekülen gibt es auch intrazelluläre Strukturen, die an der regulatorischen Wirkung von Treg beteiligt sind. Insbesondere spielen hierbei die

Granzyme eine Rolle, welche in den Zielzellen eine Apoptose auslösen können. Während iTreg überwiegend Granzyme B bilden, konnte bei nTreg nach Aktivierung die Expression von Granzyme A nachgewiesen werden (131). Bei dieser Protease scheint es sich ebenfalls um einen wichtigen Player im Hinblick auf das Verhindern einer aGvHD zu handeln. In einer prospektiven Studie von Ukena et al., in welcher Treg-Transkriptome von Patienten mit und ohne GvHD verglichen wurden, zeigte sich eine verringerte Gen-Expression für Granzyme A bei Patienten, welche im Verlauf eine GvHD entwickelten (132). Auch auf Proteinebene konnten diese Ergebnisse mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden. Allerdings fand sich hierbei ein signifikanter Unterschied nur vor d100, zu späteren Zeitpunkten nach der Transplantation war die Granzyme A-Expression auf mRNA-Ebene bei den GvHD-Patienten zwar weiterhin leicht erniedrigt, auf Proteinebene zeigte sie sich jedoch eher erhöht im Vergleich zu der immuntoleranten Gruppe. In einer neueren Arbeit von Velaga et al. ergaben sich im Mausmodell Hinweise darauf, dass Granzyme A insbesondere für die Prävention einer gastrointestinalen GvHD wichtig sein könnte (133). In unserer Arbeit konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der Granzyme A-Expression zwischen den GvHD-Gruppen nachweisen. Dies könnte einerseits wieder am Probenzeitpunkt liegen, andererseits erkrankten nur wenige unsere Patienten an einer GvHD des Gastrointestinaltraktes, der Großteil unseres Kollektivs wies eine aGvHD der Haut auf. Auch zwischen den CD52-positiven und -negativen Treg fanden wir jedoch keine Differenz hinsichtlich der Granzyme A-Expression.

Bei unserem Suppressionstest handelt es sich natürlich um einen reinen *in vitro*-Versuch. *In vivo* spielt jedoch nicht nur die kontakt-abhängige Suppressionsfähigkeit der Treg eine wichtige Rolle für ihre Funktion, sondern auch die Fähigkeit überhaupt mit den Effektor T-Zellen in Kontakt zu treten, also zu dem Ort zu migrieren, an welchem sich diese Zellen befinden. Hierbei lassen sich nach der Stammzelltransplantation grob 2 Phasen unterscheiden: Früh nach der Transplantation wandern die Effektor T-Zellen zunächst in sekundäre lymphatische Organe aus, wo sie expandieren. Für das Homing von Treg in diese Organe ist das Molekül CD62L essenziell. So konnten unter anderem Ermann et al. zeigen, dass eine hohe CD62L-Expression auf Treg früh nach Transplantation im Mausmodell einerseits mit einer verstärkten Hemmung der Effektor-T-Zell-Expansion in sekundären lymphatischen Organen und andererseits auch mit einer verringerten Rate an GvHD vergesellschaftet war (75). Zu späteren Zeitpunkten nach der Transplantation erwartet man eine Akkumulation von Effektor-T-Zellen eher

im parenchymatösem Gewebe, insbesondere der klassischen GvHD-Zielorgane wie Haut, Leber oder Gastrointestinaltrakt. Für die Migration der Treg in diese Gewebe sind unter anderem die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 wichtig. Wysocki et al. wiesen hierzu passend im Mausmodell einen Zusammenhang zwischen CCR5-negativen Treg und verstärktem Auftreten von GvHD nach, wobei es ihnen ebenfalls gelang eine verringerte Infiltration der GvHD-Zielorgane durch CCR5-negative Treg im Vergleich zu CCR5-positiven Treg aufzuzeigen (134). Auch beim Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen CCR5-Expression auf Treg und GvHD nachgewiesen werden. In der bereits oben erwähnten Transkriptom-Studie von Ukena et al. fand sich eine signifikant höhere CCR5-Expression von Treg sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bei immunkompetenten Patienten im Vergleich zu denen mit akuter oder chronischer GvHD (132). Dies korrelierte ebenso mit einer verminderten Akkumulation von Treg in der gastrointestinalen Mukosa bei Patienten mit akuter GvHD. Einen Zusammenhang zwischen verminderter CCR5-Expression durch Treg und vermehrtem Vorkommen von aGvHD konnten wir im Rahmen dieser Arbeit nicht belegen. Dies könnte allerdings auch darin begründet liegen, dass unsere Proben im Gegensatz zu den Untersuchungen von Ukena et al. überwiegend von Zeitpunkten nach d100 stammen. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch in der oben genannten Arbeit kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den GvHD-Gruppen mehr nachgewiesen werden. Erstmals konnten wir im Rahmen dieser Arbeit jedoch eine statistisch signifikant verminderte CCR5-Expression auf CD52-negativen Treg im Vergleich zu CD52-positiven Treg aufzeigen, so dass wir eine weitere Funktionseinschränkung dieser Zellen in einer verminderten Migrationsfähigkeit vermuten.

Auch für CXCR3 wiesen Ukena et al. eine signifikant erniedrigte Expression bei aGvHD nach. Auf DNA-Ebene ließ sich diese vor und nach d100 aufzeigen, auf Proteinebene war nach d100 kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar. Für diesen Marker fanden wir in dieser Arbeit ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den GvHD-Gruppen, wobei sich eine leichte Tendenz zu einer höheren CXCR3-Expression auf Treg von aGvHD-Patienten zeigte. Diese Diskrepanz könnte wieder in den unterschiedlichen Probenzeitpunkten begründet liegen. Für ein eindeutigeres Ergebnis müssten allerdings noch einmal mehr Patienten untersucht werden. Auch im Vergleich zwischen CD52-positiven und -negativen Treg ergab sich für CXCR3 jedoch keine Differenz.

Bezüglich CD62L fanden wir hingegen sogar eine signifikant höhere Expression auf CD52-negativen Treg. Eine Herunterregulierung dieses Oberflächenmoleküls scheint

also keine Rolle für die Funktionseinschränkung der Zellen zu spielen. Allerdings kommt dem Zeitpunkt nach der Transplantation hierbei wie oben beschrieben mutmaßlich eine entscheidende Bedeutung zu. So stammen unsere Untersuchungen möglicherweise von einem zu späten Zeitpunkt nach der Transplantation und wir würden eventuell andere Ergebnisse erhalten, wenn wir zu früheren Zeitpunkten schauen, an denen das Homing in sekundäre lymphatische Organe eine größere Rolle spielt. Zudem handelt es sich bei CD62L auch um einen Marker für den Aktivierungsstatus der Zellen, da Antigen-Kontakt mit dem T-Zell-Rezeptor eine Herunterregulierung von CD62L nach sich zieht (135). Es scheint also, als ob die CD52-negativen Treg in unseren Untersuchungen einen geringeren Aktivierungsgrad aufweisen. Hierfür gäbe es zwei denkbare Ursachen: Einerseits könnte das Homing der Treg in sekundäre lymphatische Organe durch Fehlen oder Herunterregulierung anderer für das Homing wichtiger Rezeptoren (z.B. CCR7), die wir hier nicht untersucht haben, gestört sein. Andererseits wäre auch eine gestörte Aktivierung der CD52-negativen Treg über andere nicht funktionierende Mechanismen denkbar.

Der Reifegrad von T-Zellen lässt sich mit Hilfe von CD45RA weiter differenzieren. In Zusammenschau der beiden Marker lassen sich die Zellen in 4 Gruppen einteilen: Naive T-Zellen (CD45RA+ CD62L+), Effektor-T-Zellen (CD45RA+CD62L-), zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA- CD62L+) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA-CD62L-) (136). Ob sich dieses Konzept ebenso auf Treg übertragen lässt, ist bisher nicht geklärt (137), aber zumindest lassen sich mithilfe der CD45RA-Expression anscheinend ebenfalls ruhende (CD45RA positive) von terminal differenzierten (CD45RA negative) Treg unterscheiden (61). Im GvHD-Kontext konnte (in einer Untersuchung zur haploidenten Transplantation) aufgezeigt werden, dass die frühe Rekonstitution CD45RA+ Treg mit einem geringeren Vorkommen an höhergradiger aGvHD vergesellschaftet ist (138). In unserer Arbeit sahen wir eine höhere Expression von CD45RA auf CD52-positiven Treg im Vergleich zu CD52-negativen Treg. Auch wenn dieser Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte, könnte es ein Hinweis darauf sein, dass sich innerhalb der CD52-positiven Treg mehr naive Treg finden, welche möglicherweise besser vor einer aGvHD schützen. Leider wurde die CD45RA-Expression im Rahmen dieser Studie an zu wenigen Patienten untersucht, als dass ein Vergleich zwischen den GvHD-Gruppen möglich gewesen wäre.

Ein weiteres Oberflächenmolekül, welches mit der Funktionalität von Treg in Verbindung steht, ist CD44. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Ko-Stimulation dieses Rezeptors auf Treg die Expression und Persistenz von FoxP3 fördert

(72) und dass CD44-positive Treg eine stärkere Suppression von Effektor-Zellen bewirken als CD44-negative Treg (71). Ukena et al. untersuchten auch diesen Marker im Zusammenhang mit dem Auftreten von GvHD. Sie fanden eine signifikant verringerte Genexpression von CD44 bei GvHD, sowohl vor als auch nach d100. Diese Ergebnisse ließen sich auf Proteinebene allerdings nicht bestätigen: So exprimierten die Treg von Patienten mit und ohne GvHD gleichermaßen fast zu 100% CD44, die Intensität der Expression (ausgedrückt durch die MFI) unterschied sich zwischen den beiden Gruppen jedoch nicht. Diese Beobachtung konnten wir in unserer Arbeit bestätigen: auch wir fanden durchgängig hohe Anteile CD44-positiver Treg, einen Unterschied zwischen den GvHD-Gruppen sahen wir weder in Bezug auf die prozentualen Anteile noch auf die MFI. Interessanterweise zeigte sich im Vergleich zwischen CD52-positiven und -negativen Treg hingegen sogar eine signifikant höhere MFI für CD44 auf den CD52-negativen Treg, so dass ein Fehlen dieses Markers also nicht ursächlich für deren Funktionseinschränkung zu sein scheint.

Wir überprüften zudem die Stärke der FoxP3-Expression im Vergleich der beiden Zellpopulationen und sahen hierbei eine signifikant niedrigere MFI bei den CD52-negativen Treg (obwohl diese weniger CD44 exprimierten).

Insgesamt konnten wir in unseren Untersuchungen also Hinweise darauf finden, dass die Funktionalität CD52-negativer Treg auf mehreren Ebenen gestört sein könnte: Einerseits in Hinblick auf ihre Suppressionsfähigkeit bei direktem Zellkontakt andererseits aber auch in ihrer Fähigkeit in der Migration zum Inflammationsort. Zudem scheinen die CD52-negativen Treg weniger aktiviert zu sein und exprimieren den Treg-Marker FoxP3 weniger stark als die CD52-positiven Treg.

## **6.5 GPI-Anker**

Wie bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe sowie in anderen Studien gezeigt werden konnte, kommt es nach Alemtuzumab-Behandlung auch zur verminderten Expression weiterer GPI-verankerter Oberflächenmoleküle. Mit Hilfe von FLAER-Färbungen (wodurch GPI-Anker direkt angefärbt werden) wurde bewiesen, dass das Fehlen dieser Oberflächenmoleküle mit der Abwesenheit der GPI-Anker selbst einhergeht. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass die Funktionseinschränkung CD52-negativer Zellen nach Alemtuzumab-Behandlung womöglich nicht allein durch das

Fehlen von CD52 verursacht wird, sondern auch andere fehlende GPI-verankerte Moleküle und/oder die fehlenden GPI-Anker selbst Einfluss auf die Funktionalität der Zellen nehmen.

Bei den im vorigen Abschnitt besprochenen untersuchten Markern handelt es sich um Transmembran- bzw. intrazelluläre (Granzyme A) Proteine. Eine GPI-Verankerung ist hingegen für keinen dieser Marker beschrieben. Auch eine direkte Verbindung zu anderen GPI-verankerten Molekülen lässt sich nur bei CD39 finden (siehe oben). Es bleibt daher die Vermutung, dass die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede zwischen CD52-positiven und -negativen Treg in der Abwesenheit der GPI-Anker selbst begründet sein könnten.

GPI-Anker befestigen verschiedenste Proteine in der Zellmembran, indem der Phosphatidylinositol-Anteil in der Außenschicht der Lipiddoppelmembran verbaut wird. GPI-verankerte Oberflächenmoleküle kommen in allen eukaryoten Zellen vor, wirken zum Beispiel als Hydrolasen, Rezeptoren oder Toxinbindner und reichern sich vorwiegend in den sogenannten Lipid-raft-Abschnitten der Zellmembran an (139). Funktionell kommt GPI-verankerten Molekülen unter anderem eine Rolle in der Embryogenese, Neurogenese oder Fertilisation zu (140).

Auch auf T-Zellen lassen sich GPI-verankerte Proteine finden, zum Beispiel CD48, CD59 oder CD90 (Thy-1). Für Thy-1 wurde als erstes eine T-Zell aktivierende Funktion vermutet, da man feststellte, dass die Vernetzung dieses Oberflächenmoleküls einen gesteigerten Calcium-Influx in die Zelle sowie eine erhöhte IL-2 Produktion, verstärkte IL2-Rezeptor-Expression und damit einhergehend eine vermehrte Proliferation zur Folge hat (141). Später konnte dieser Zusammenhang auch bei anderen GPI-verankerten Molekülen auf T-Zellen aufgezeigt werden. Als Mechanismus der Signaltransduktion fand sich eine Assoziation von GPI-Ankern mit Tyrosinkinaseaktivität, hier konnte speziell die Kinase p56<sup>lck</sup> als Akteur identifiziert werden (142). Ob sich dieser beschriebene Zusammenhang zwischen GPI-verankerten Molekülen und Zell-Aktivierung auch auf regulatorischen T-Zellen wiederfindet wurde bisher nicht im Einzelnen untersucht. Die Ergebnisse unserer Arbeit liefern hier erstmals Hinweise darauf, dass eine solche Korrelation ebenfalls bestehen könnte. Allerdings handelt es sich bei unseren Ergebnissen um eine rein phänotypische Charakterisierung, hier wären in der Folge weitere funktionelle Untersuchungen notwendig, um zum Beispiel den Aktivierungsgrad der Treg zu testen.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle von Treg in Bezug auf die Ausbildung einer GvHD im Kontext der Alemtuzumab-basierten allogenen Stammzelltransplantation. Wie bereits in Vorarbeiten beschrieben, konnte hier erneut die Rekonstitution CD52-negativer Treg nachgewiesen werden, welche mit dem Auftreten einer aGvHD korrelierte. Im Hinblick auf die cGvHD bleiben die Daten letztendlich uneindeutig, der punktuell gesehene Unterschied zwischen cGvHD und noGvHD löste sich im weiteren zeitlichen Verlauf auf, so dass sich hier eher ein nachhängender Effekt der vorausgegangenen aGvHD zeigte. Erstmals erfolgte in dieser Arbeit die longitudinale Untersuchung von 9 Patienten über 1 Jahr nach der Transplantation, wobei sich ein sehr guter Zusammenhang zwischen Krankheitsverlauf und CD52-Expression der Treg nachweisen ließ. Zwar zeigte sich bei allen Patienten eine prozentuale Zunahme CD52-positiver Treg über die Zeit, diese schritt bei Patienten mit anhaltender oder wiederkehrender aGvHD jedoch deutlich langsamer voran. Nach Ausheilung einer aGvHD näherten sich die Werte CD52-positiver Treg denen von Patienten ohne GvHD an. Die gute Korrelation zwischen CD52-Expression und aGvHD sowohl bei Erstdiagnose als auch im weiteren zeitlichen Verlauf macht CD52 möglicherweise zu einem guten Marker, um sowohl die Entstehung einer aGvHD vorauszusagen als auch den weiteren Verlauf abzuschätzen und so die immunsuppressive Therapie individuell steuern zu können. Vor einem Einsatz in der Praxis wären hierfür natürlich noch genauere systematische Untersuchungen (auch zu früheren Zeitpunkten nach der Transplantation) notwendig, um beispielsweise einen Cut-off-Wert festzulegen, der mit einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer aGvHD einhergeht. Eine GvHD nach DLI trat hingegen wahrscheinlich unabhängig vom CD52-Status vor der DLI-Gabe auf, wobei für eine sicherere Aussage diesbezüglich eine größere Anzahl Patienten untersucht werden sollte.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die weitere phänotypische Charakterisierung CD52-negativer Treg. Hierfür wurden Treg-charakterisierende bzw. funktionell wichtige Marker durchflusszytometrisch im Vergleich zwischen CD52-positiven und -negativen Treg untersucht. Wir fanden auf CD52-negativen Treg eine prozentual verminderte Expression des Chemokinrezeptors CCR5, sowie eine in ihrer Intensität verminderte Expression (ausgedrückt durch die MFI) von CD39 und des Treg-Markers FoxP3

selbst. Gleichzeitig stellte sich die MFI von CD44 und CD62L statistisch signifikant erhöht auf CD52-negativen Treg dar.

Insgesamt zeigten sich die CD52-negativen Treg also phänotypisch weniger aktiviert und wir fanden Hinweise darauf, dass sie auf verschiedenen Ebenen in ihrer Funktion eingeschränkt sein könnten: Einerseits in ihrer Fähigkeit zum Inflammationsort zu migrieren, andererseits darin Effektor-Zellen im direkten Zell-Kontakt zu supprimieren, wie es sich auch in unserem Suppressionsassay bestätigte. Dies wären mögliche Ursachen dafür, dass CD52-negative Treg nicht in der Lage sind eine aGvHD zu verhindern. Um den Zusammenhang zwischen den durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnissen und dem Auftreten von GvHD genauer zu untersuchen wären in der Zukunft sicher auch Analysen von Treg aus bioptisch gewonnenem Material lymphatischen Gewebes und GvHD-betroffener Organe sinnvoll. Zudem lässt sich nicht außer Acht lassen, dass nach Alemtuzumab-Behandlung natürlich auch Effektor-T-Zellen CD52-negativ rekonstituieren und die GvHD-Entstehung nicht nur isoliert in Bezug auf die Treg betrachtet werden kann. Dieser Aspekt wird in weiteren Projekten unserer Arbeitsgruppe untersucht.

## 8. Literatur

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1813-26.
2. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(6):443-58.
3. Ali R, Ramdial J, Algaze S, Beitinjaneh A. The Role of Anti-Thymocyte Globulin or Alemtuzumab-Based Serotherapy in the Prophylaxis and Management of Graft-Versus-Host Disease. *Biomedicines*. 2017;5(4).
4. D'Sa S, Peggs K, Pizzey A, Verfuether S, Thuraisundaram D, Watts M, et al. T- and B-cell immune reconstitution and clinical outcome in patients with multiple myeloma receiving T-cell-depleted, reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation with an alemtuzumab-containing conditioning regimen followed by escalated donor lymphocyte infusions. *Br J Haematol*. 2003;123(2):309-22.
5. Meyer RG, Wagner EM, Konur A, Bender K, Schmitt T, Hemmerling J, et al. 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*. 2010;45(4):668-74.
6. Brett SJ, Baxter G, Cooper H, Rowan W, Regan T, Tite J, et al. Emergence of CD52-, glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient lymphocytes in rheumatoid arthritis patients following Campath-1H treatment. *Int Immunol*. 1996;8(3):325-34.
7. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4+CD25+Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;196(3):389-99.
8. Schäfer LA. Bedeutung GPI-Anker negativer regulatorischer T-Zellen in Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation mit Alemtuzumab [Dissertation]. Mainz: Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität; 2021.
9. Woelfinger P, Epp K, Schaefer L, Kriege D, Theobald M, Bopp T, et al. CD52-negative T cells predict acute graft-versus-host disease after an alemtuzumab-based conditioning regimen. *Br J Haematol*. 2020;191(2):253-62.
10. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(4):e0028.
11. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957;257(11):491-6.
12. Korbling M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood*. 2001;98(10):2900-8.
13. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *New Engl J Med*. 2007;357(15):1472-5.
14. van Rood JJ. The detection of transplantation antigens in leukocytes. *Semin Hematol*. 1968;5(2):187-214.
15. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, Buckner CD, Storb R, Giblett ER. Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. *N Engl J Med*. 1980;303(10):565-7.
16. EBMT. EBMT Activity Survey 2013. 2013.
17. Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J. Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(6):485-93.
18. Ferrara JLM, Deeg HJ. Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 1991;324(10):667-74.
19. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):371-80.
20. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:139-70.
21. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol*. 2001;29(3):259-77.

22. Jacobsohn DA. Acute graft-versus-host disease in children. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41(2):215-21.
23. Karrer S. Graft-versus-Host-Disease der Haut. *Der Hautarzt.* 2003;54(5):465-82.
24. Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus HM, Fu J, Uberti JP. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(2):121-9.
25. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JHF, Vossen J, et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *New Engl J Med.* 1996;334(5):281-5.
26. Pasquini MC WZ. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary slides 2013 [Available from: <https://www.cibmtr.org/referencecenter/slidesreports/summaryslides/Pages/index.aspx#DownloadSummarySlides>.
27. Falkenburg JHF, van de Corput L, Marijt EWA, Willemze R. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Experimental Hematology.* 2003;31(9):743-51.
28. McSweeney PA ND, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG,, Chauncey TR GT, Hegenbart U, Nash RA, Radich J, Wagner JL, Minor S,, Appelbaum FR BW, Bryant E, Flowers MED, Georges GE, Grumet FC, Kiem HP,, Torok-Storb B YC, Blume KG, Storb RF. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood.* 2001;97(11):3390-400.
29. Rodt H, Thierfelder S, Eulitz M. Anti-lymphocytic antibodies and marrow transplantation. 3. Effect of heterologous anti-brain antibodies on acute secondary disease in mice. *Eur J Immunol.* 1974;4(1):15-9.
30. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet.* 2009;373(9674):1550-61.
31. Poire X, van Besien K. Alemtuzumab in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther.* 2011;11(8):1099-111.
32. Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood.* 1991;78(8):2120-30.
33. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, di Bartolomeo P, et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood.* 2001;98(10):2942-7.
34. Ho VT SR. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2001;98(12):3192-204.
35. Waldmann H, Hale G. CAMPATH: from concept to clinic. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360(1461):1707-11.
36. Rodig SJ, Abramson JS, Pinkus GS, Treon SP, Dorfman DM, Dong HY, et al. Heterogeneous CD52 expression among hematologic neoplasms: implications for the use of alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Clin Cancer Res.* 2006;12(23):7174-9.
37. Hernandez-Campo PM, Almeida J, Sanchez ML, Malvezzi M, Orfao A. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70(2):71-81.
38. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Dyer MJS, et al. Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: Correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H. *Leukemia Research.* 1998;22(2):185-91.
39. Gribben JG, Hallek M. Rediscovering alemtuzumab: current and emerging therapeutic roles. *Br J Haematol.* 2009;144(6):818-31.
40. Golay J, Manganini M, Rambaldi A, Introna M. Effect of alemtuzumab on neoplastic B cells. *Haematologica.* 2004;89(12):1476-83.
41. Nuckel H, Frey UH, Roth A, Duhrsen U, Siffert W. Alemtuzumab induces enhanced apoptosis in vitro in B-cells from patients with chronic lymphocytic leukemia by antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Eur J Pharmacol.* 2005;514(2-3):217-24.

42. Hale G BS, Chumbley G, Hoang T, Metcalf D, Munro AJ, Waldmann H. Removal of T Cells From Bone Marrow For Transplantation: A Monoclonal Antilymphocyte Antibody That Fixes Human Complement. *Blood*. 1983;62(4):873-82.
43. Burns DM, Rana S, Martin E, Nagra S, Ward J, Osman H, et al. Greatly reduced risk of EBV reactivation in rituximab-experienced recipients of alemtuzumab-conditioned allogeneic HSCT. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(6):825-32.
44. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112(12):4371-83.
45. Alyea E, Weller E, Schlossman R, Canning C, Webb I, Doss D, et al. T-cell--depleted allogeneic bone marrow transplantation followed by donor lymphocyte infusion in patients with multiple myeloma: induction of graft-versus-myeloma effect. *Blood*. 2001;98(4):934-9.
46. Soiffer RJ, Alyea EP, Hochberg E, Wu C, Canning C, Parikh B, et al. Randomized trial of CD8+ T-cell depletion in the prevention of graft-versus-host disease associated with donor lymphocyte infusion. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(11):625-32.
47. Nimer SD, Giorgi J, Gajewski JL, Ku N, Schiller GJ, Lee K, et al. Selective depletion of CD8+ cells for prevention of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. A randomized controlled trial. *Transplantation*. 1994;57(1):82-7.
48. Giralt S, Hester J, Huh Y, Hirschginsberg C, Rondon G, Seong D, et al. Cd8-Depleted Donor Lymphocyte Infusion as Treatment for Relapsed Chronic Myelogenous Leukemia after Allogeneic Bone-Marrow Transplantation. *Blood*. 1995;86(11):4337-43.
49. Meyer RG, Britten CM, Wehler D, Bender K, Hess G, Konur A, et al. Prophylactic transfer of CD8-depleted donor lymphocytes after T-cell-depleted reduced-intensity transplantation. *Blood*. 2007;109(1):374-82.
50. Shimoni A, Nagler A. Non-myeloablative stem cell transplantation- (NST) chimerism testing as guidance for immune-therapeutic manipulations. *Leukemia*. 2001;15(12):1967-75.
51. Garland RJ, Groves SJ, Diamanti P, West SE, Winship KL, Virgo PF, et al. Early emergence of PNH-like T cells after allogeneic stem cell transplants utilising CAMPATH-1H for T cell depletion. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36(3):237-44.
52. Lay AN. GPI-Anker negative T-Zellen persistieren nach Alemtuzumab basierter Konditionierung im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation [Dissertation]. Mainz: Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität; 2013.
53. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4(+)/CD25(+) T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *Journal of Immunology*. 1998;160(3):1212-8.
54. Sakaguchi S SN, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64.
55. Stephens LA, Mottet C, Mason C, Powrie F. Human CD4(+)/CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *European Journal of Immunology*. 2001;31(4):1247-54.
56. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *The Journal of Immunology*. 2001;167(3):1245-53.
57. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002;16(2):311-23.
58. Khattry R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):337-42.
59. Ramsdell F, Ziegler SF. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(5):343-9.
60. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.

61. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30(6):899-911.
62. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1693-700.
63. Nettenstrom L, Alderson K, Raschke EE, Evans MD, Sondel PM, Olek S, et al. An optimized multi-parameter flow cytometry protocol for human T regulatory cell analysis on fresh and viably frozen cells, correlation with epigenetic analysis, and comparison of cord and adult blood. *J Immunol Methods*. 2013;387(1-2):81-8.
64. Wang YM, Ghali J, Zhang GY, Hu M, Wang Y, Sawyer A, et al. Development and function of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nephrology (Carlton)*. 2015.
65. Wang YM, Ghali J, Zhang GY, Hu M, Wang Y, Sawyer A, et al. Development and function of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nephrology (Carlton)*. 2016;21(2):81-5.
66. Wing JB, Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol*. 2012;3:178.
67. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008;124(1):13-22.
68. Vignali D. How many mechanisms do regulatory T cells need? *Eur J Immunol*. 2008;38(4):908-11.
69. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523-32.
70. Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J*. 2015;36(3):273-9.
71. Liu T, Soong L, Liu G, Konig R, Chopra AK. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4<sup>+</sup> Treg cells. *Biol Direct*. 2009;4:40.
72. Bollyky PL, Falk BA, Long SA, Preisinger A, Braun KR, Wu RP, et al. CD44 costimulation promotes FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *J Immunol*. 2009;183(4):2232-41.
73. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*. 2011;317(5):620-31.
74. Hoerning A, Koss K, Datta D, Boneschanski L, Jones CN, Wong IY, et al. Subsets of human CD4(+) regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3. *Eur J Immunol*. 2011;41(8):2291-302.
75. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, et al. Only the CD62L<sup>+</sup> subpopulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood*. 2005;105(5):2220-6.
76. Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol*. 2008;38(4):921-4.
77. de Oliveira CE, Gasparoto TH, Pinheiro CR, Amor NG, Nogueira MRS, Kaneno R, et al. CCR5-Dependent Homing of T Regulatory Cells to the Tumor Microenvironment Contributes to Skin Squamous Cell Carcinoma Development. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(12):2871-80.
78. Ward ST, Li KK, Hepburn E, Weston CJ, Curbishley SM, Reynolds GM, et al. The effects of CCR5 inhibition on regulatory T-cell recruitment to colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(2):319-28.
79. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2002;99(10):3493-9.
80. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Immunoregulatory T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;196(3):401-6.
81. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9(9):1144-50.
82. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, et al. Recipient-type specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host

- disease while maintaining graft-versus-leukemia. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(11):1688-96.
83. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2010;117(3):1061-70.
84. Pierini A, Alvarez M, Negrin RS. NK Cell and CD4+FoxP3+ Regulatory T Cell Based Therapies for Hematopoietic Stem Cell Engraftment. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9025835.
85. Theil A, Tuve S, Oelschlägel U, Maiwald A, Döhler D, Oßmann D, et al. Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease. *Cytotherapy*. 2015;17(4):473-86.
86. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood*. 2014;124(4):638-44.
87. Aldrich S. Product Information Histopaque 10771 [Available from: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/10771pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/10771pis.pdf)].
88. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andrä I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*. 2017;47(10):1584-797.
89. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.-5.1.11.
90. Rothe G. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. *Zelluläre Diagnostik Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger; 2007. p. 27-70.
91. Collison LW, Vignali DA. In vitro Treg suppression assays. *Methods Mol Biol*. 2011;707:21-37.
92. Quah BJ, Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *J Vis Exp*. 2010(44).
93. ThermoFisher. User Guide CellTrace Cell Proliferation Kits [Available from: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0002595\\_CellTrace\\_Cell\\_Proliferation\\_Kits\\_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogQ2VsbnFRyYWNlIENlbnGwgUHJvbGlmZXJhdGlvbiBlXRz](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0002595_CellTrace_Cell_Proliferation_Kits_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogQ2VsbnFRyYWNlIENlbnGwgUHJvbGlmZXJhdGlvbiBlXRz)].
94. Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, Chakraverty RK, Chakrabarti S, Robinson S, et al. In vivo CAMPATH-1H prevents GvHD following nonmyeloablative stem-cell transplantation. *Cytotherapy*. 2001;3(3):197-201.
95. Robin M, Raj K, Chevret S, Gauthier J, de Lavallade H, Michonneau D, et al. Alemtuzumab versus anti-thymocyte globulin in patients transplanted from an unrelated donor after a reduced intensity conditioning. *Eur J Haematol*. 2018.
96. Kroger N, Shaw B, Iacobelli S, Zabelina T, Peggs K, Shimoni A, et al. Comparison between antithymocyte globulin and alemtuzumab and the possible impact of KIR-ligand mismatch after dose-reduced conditioning and unrelated stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2005;129(5):631-43.
97. Marsh JC, Pearce RM, Koh MB, Lim Z, Pagliuca A, Mufti GJ, et al. Retrospective study of alemtuzumab vs ATG-based conditioning without irradiation for unrelated and matched sibling donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a study from the British Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(1):42-8.
98. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701-11.
99. Matthews K, Lim Z, Afzali B, Pearce L, Abdallah A, Kordasti S, et al. Imbalance of effector and regulatory CD4 T cells is associated with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation using a reduced intensity conditioning regimen and alemtuzumab. *Haematologica*. 2009;94(7):956-66.

100. Perz JB, Gurel S, Schonland SO, Hegenbart U, Ho AD, Dreger P. CD4+CD25highCD127low regulatory T cells in peripheral blood are not an independent factor for chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:606839.
101. Fujioka T, Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, et al. Frequency of CD4(+)*FOXP3*(+) regulatory T-cells at early stages after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic SCT predicts the incidence of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(6):859-64.
102. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, et al. High donor *FOXP3*-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*. 2006;108(4):1291-7.
103. Magenau JM, Qin X, Tawara I, Rogers CE, Kitko C, Schlough M, et al. Frequency of CD4(+)*CD25*(hi)*FOXP3*(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(7):907-14.
104. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, et al. Reduced frequency of *FOXP3*+ CD4+*CD25*+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106(8):2903-11.
105. Matos TR, Hirakawa M, Alho AC, Neleman L, Graca L, Ritz J. Maturation and Phenotypic Heterogeneity of Human CD4+ Regulatory T Cells From Birth to Adulthood and After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2020;11:570550.
106. Alho AC, Kim HT, Chammas MJ, Reynolds CG, Matos TR, Forcade E, et al. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood*. 2016;127(5):646-57.
107. Ukena SN, Grosse J, Mischak-Weissinger E, Buchholz S, Stadler M, Ganser A, et al. Acute but not chronic graft-versus-host disease is associated with a reduction of circulating CD4(+)*CD25* (high)*CD127* (low/-) regulatory T cells. *Ann Hematol*. 2011;90(2):213-8.
108. Clark FJ, Gregg R, Piper K, Dunnion D, Freeman L, Griffiths M, et al. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+*CD25*high regulatory T cells. *Blood*. 2004;103(6):2410-6.
109. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Phelps ML, Shin T, Matsui EC, et al. Association of *Foxp3* regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood*. 2004;104(7):2187-93.
110. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, et al. Glucocorticoids upregulate *FOXP3* expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(6):1425-33.
111. Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C. Enrichment of CD4+ *CD25*high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(11):1512-7.
112. Schneider M, Munder M, Karakhanova S, Ho AD, Goerner M. The initial phase of graft-versus-host disease is associated with a decrease of CD4+*CD25*+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol*. 2006;28(6):382-90.
113. Loeff FC, Falkenburg JHF, Hageman L, Huisman W, Veld SAJ, van Egmond HME, et al. 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*. 2018;200(6):2199-208.
114. Rawstron AC, Rollinson SJ, Richards S, Short MA, English A, Morgan GJ, et al. The PNH phenotype cells that emerge in most patients after *CAMPATH-1H* therapy are present prior to treatment. *British Journal of Haematology*. 1999;107(1):148-53.
115. Haas J, Würthwein C, Korporeal-Kuhnke M, Viehoveer A, Jarius S, Ruck T, et al. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Short- and Long-Term Effects of Immunodepletion on the Peripheral Treg Compartment. *Front Immunol*. 2019;10:1204.
116. Rao SP, Sancho J, Campos-Rivera J, Boutin PM, Severy PB, Weeden T, et al. Human peripheral blood mononuclear cells exhibit heterogeneous *CD52* expression levels and show differential sensitivity to alemtuzumab mediated cytotoxicity. *PLoS One*. 2012;7(6):e39416.

117. Hertenstein B, Wagner B, Bunjes D, Duncker C, Raghavachar A, Arnold R, et al. Emergence of CD52-, phosphatidylinositolglycan-anchor-deficient T lymphocytes after in vivo application of Campath-1H for refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 1995;86(4):1487-92.
118. Taylor VC, Sims M, Brett S, Field MC. Antibody selection against CD52 produces a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in human lymphocytes by a novel mechanism. *Biochem J*. 1997;322 ( Pt 3):919-25.
119. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1995;333(19):1253-8.
120. Morris EC, Rebello P, Thomson KJ, Peggs KS, Kyriakou C, Goldstone AH, et al. 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*. 2003;102(1):404-6.
121. de Lima M, Bonamino M, Vasconcelos Z, Colares M, Diamond H, Zalcberg I, et al. Prophylactic donor lymphocyte infusions after moderately ablative chemotherapy and stem cell transplantation for hematological malignancies: high remission rate among poor prognosis patients at the expense of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27(1):73-8.
122. Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev*. 2010;36(7):528-38.
123. Schmid C, Labopin M, Schaap N, Veelken H, Brecht A, Stadler M, et al. Long-term results and GvHD after prophylactic and preemptive donor lymphocyte infusion after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2021.
124. Rowan WC, Hale G, Tite JP, Brett SJ. Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) triggers activation of normal human T lymphocytes. *Int Immunol*. 1995;7(1):69-77.
125. Watanabe T, Masuyama J, Sohma Y, Inazawa H, Horie K, Kojima K, et al. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells. *Clin Immunol*. 2006;120(3):247-59.
126. Bandala-Sanchez E, Zhang Y, Reinwald S, Dromey JA, Lee BH, Qian J, et al. T cell regulation mediated by interaction of soluble CD52 with the inhibitory receptor Siglec-10. *Nat Immunol*. 2013;14(7):741-8.
127. Rashidi M, Bandala-Sanchez E, Lawlor KE, Zhang Y, Neale AM, Vijayaraj SL, et al. CD52 inhibits Toll-like receptor activation of NF-kappaB and triggers apoptosis to suppress inflammation. *Cell Death Differ*. 2018;25(2):392-405.
128. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013;19(6):355-67.
129. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7176-86.
130. Airas L, Niemelä J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S. Differential Regulation and Function of CD73, a Glycosyl-Phosphatidylinositol-linked 70-kD Adhesion Molecule, on Lymphocytes and Endothelial Cells. *The Journal of Cell Biology*. 1997;136(2):421-31.
131. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004;21(4):589-601.
132. Ukena SN, Velaga S, Geffers R, Grosse J, Baron U, Buchholz S, et al. Human regulatory T cells in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;118(13):e82-92.
133. Velaga S, Ukena SN, Dringenberg U, Alter C, Pardo J, Kershaw O, et al. Granzyme A Is Required for Regulatory T-Cell Mediated Prevention of Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124927.
134. Wysocki CA, Jiang Q, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, McKinnon KP, Su L, et al. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106(9):3300-7.
135. Chao CC, Jensen R, Dailey MO. Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells. *J Immunol*. 1997;159(4):1686-94.

136. MacLeod MK, Clambey ET, Kappler JW, Marrack P. CD4 memory T cells: what are they and what can they do? *Semin Immunol.* 2009;21(2):53-61.
137. Rosenblum MD, Way SS, Abbas AK. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(2):90-101.
138. Wang Y, Zhao XY, Xu LP, Zhang XH, Han W, Chen H, et al. Lower incidence of acute GVHD is associated with the rapid recovery of CD4+CD25+CD45RA+ regulatory T cells in patients who received haploidentical allografts from NIMA-mismatched donors: A retrospective (development) and prospective (validation) cohort-based study. *Oncoimmunology.* 2016;5(12):e1242546.
139. Saha S, Anilkumar AA, Mayor S. GPI-anchored protein organization and dynamics at the cell surface. *J Lipid Res.* 2016;57(2):159-75.
140. Fujita M, Kinoshita T. GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(8):1050-8.
141. Loertscher R, Lavery P. The role of glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored cell surface proteins in T-cell activation. *Transpl Immunol.* 2002;9(2-4):93-6.
142. Stefanova I, Horejsi V, Ansotegui IJ, Knapp W, Stockinger H. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science.* 1991;254(5034):1016-9.

## 9. Danksagung

Zuerst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater dafür, dass er mir die Möglichkeit zu dieser Doktorarbeit gegeben hat und für alle meine Fragen immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Meiner Betreuerin danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas, die geduldige Einführung und die gute Betreuung während der gesamten Zeit.

Mein weiterer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, die mich freundlich und hilfsbereit aufgenommen hat, gemeinsame Mittagspausen zelebriert hat und schöne Weihnachtsfeiern und Sommerfeste veranstaltet hat.

Dem ehemaligen Tumorkonzentrationszentrum der Uniklinik Mainz danke ich für die Durchführung der Zellsortierungen.

Außerdem danke ich meiner Familie, die immer an mich geglaubt hat und mich ermutigt hat weiterzumachen, wenn es mir schwergefallen ist und die Arbeit etwas ins Stocken geraten ist.

Zuletzt danke ich meinem Partner, der immer für mich da ist, mir zuhört, mich ermutigt und stolz auf mich ist, selbst, wenn ich es gerade nicht bin.

## 10. Tabellarischer Lebenslauf

### ➤ Katharina Epp

#### Studium

➤ 04/2010-03/2016	<b>Johannes-Gutenberg-Universität Mainz</b> Humanmedizin
➤ 04/2016-05/2017	<b>TU Dresden</b> Humanmedizin (im Praktischen Jahr)

#### Wissenschaftlicher Werdegang

➤ seit 10/2013	<b>Doktorandin, III. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz</b>
➤ 10/2014	<b>Jahrestagung DGHO, Hamburg</b> Kongressvortrag
➤ 05/2015	<b>CIMT annual meeting, Mainz</b> Posterpräsentation und Kongressvortrag

#### Praktisches Jahr

➤ 05/2016-08/2016	<b>Universitätsklinikum Dresden</b> Innere (Hämatologie/Onkologie, Pneumologie)
➤ 09/2016-12/2016	<b>CHU Sud Réunion (Ile de la Réunion)</b> Chirurgie (Unfallchirurgie, Neurochirurgie)
➤ 01/2017-04/2017	<b>Krankenhaus Dresden Neustadt</b> Neurologie

#### Nebenerwerbstätigkeiten

➤ 07/2012-04/2016	<b>Radiologische Gemeinschaftspraxis Radiomed, Wiesbaden</b> Studentische Mitarbeiterin, MRT-Bedienung
-------------------	---

## Berufliche Tätigkeiten

---

- seit 08/2017 **Universitätsklinikum Dresden, Medizinische Klinik I**  
Assistenzärztin

## Sprachkenntnisse und Auslandsaufenthalte

---

- Sprachen **Englisch:** Fließend in Wort und Schrift  
**Französisch:** Fließend in Wort und Schrift
- Auslandsaufenthalt 09/2016-12/2016 **Ile de la Reunion (Frankreich)**  
PJ-Tertial Chirurgie