

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik

der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Rekonstitution regulatorischer T-Lymphozyten nach allogener
Stammzelltransplantation und ihre Bedeutung bei der Entstehung einer GVHD**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Medizin

der Universitätsmedizin

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Pascal Wölfinger

aus Bad Soden am Taunus

Mainz, 2018

Wissenschaftlicher

Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 11.12.2018

Widmung

Ich widme diese Promotionsschrift allen Patienten, die ich in meinen ersten drei Berufsjahren begleiten durfte und vor allem denjenigen, die trotz dieser schwierigen Zeit nie verlegen waren und mit großem Optimismus Blut für wissenschaftliche Zwecke bereit waren zu spenden. Dafür danke ich allen Patienten und Angehörigen und wünsche ihnen das Beste für die Zukunft.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	14
2. Literaturdiskussion.....	16
2.1. Allogene Stammzelltransplantation	16
2.1.1. Definition, Wirkmechanismus und Ziele	16
2.1.2. Indikationen	17
2.1.3. Konditionierung und T-Zell-Depletion	17
2.1.3.1. Alemtuzumab (Campath 1H)	18
2.1.3.2. Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)	19
2.1.4. Graft-versus-Host Disease (GVHD)	20
2.1.4.1. Akute Graft-versus-Host-Disease (aGVHD)	21
2.1.4.2. Chronische Graft-versus-Host-Disease (cGVHD)	25
2.1.4.3. Prophylaxe und Behandlung der GVHD	26
2.2. Das Immunsystem	27
2.2.1. Grundlagen des Immunsystems	27
2.2.2. T-Lymphozyten (T-Zellen)	29
2.2.2.1. Zytotoxische T-Lymphozyten	29
2.2.2.2. T-Helfer-Lymphozyten	30
2.3. Regulatorische T-Lymphozyten	31
2.3.1. Identifizierung von Treg und Bedeutung sowie Funktion von spezifischen Treg „Markern“	32
2.3.1.1. CD25, CD127 und Foxp3	32
2.3.1.2. HELIOS	33
2.3.1.3. Glycoprotein A repetitions predominant (GARP)	34
2.3.1.4. Immunoglobulin-like transcript 3 (ILT3)	34
2.3.1.5. Granzym A, CTLA4, CD39, CD44	35
2.3.1.6. CD62L, CXCR3, CCR5, HLA-DR	35
2.3.1.7. CD45RA	35
2.3.1.8. Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR)	36
2.3.2. Die Rolle von Treg bei der Entstehung einer GVHD	36
2.3.2.1. Klinische Studien zur möglichen therapeutischen Nutzung von Treg	37
2.4. Vorarbeiten	38
3. Material und Methoden	40
3.1. Humane Proben	40
3.1.1. Patientenblut	40
3.1.2. Buffy-Coats	41
3.1.3. Patientenliste	41
3.1.4. Materialgewinnung/ Aufbewahrung	43

3.1.4.1.	Definition und Gewinnung von Mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	43
3.1.4.2.	Einfrieren von Mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	44
3.1.4.3.	Auftauen von Mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	44
3.1.4.4.	Definition und Gewinnung von Serum.....	44
3.1.4.5.	Einfrieren von Serum.....	44
3.1.4.6.	Auftauen von Serum.....	44
3.2.	Durchflusszytometrie und durchflusszytometrische Tests	45
3.2.1.	Definition der Durchflusszytometrie.....	45
3.2.2.	Antikörper für Durchflusszytometrie	45
3.2.3.	Gerät (Durchflusszytometrie).....	48
3.2.4.	Protokolle der Färbung (Durchflusszytometrie).....	48
3.2.5.	Durchflusszytometrische Pannels und Strategien zur Testung verschiedener Marker und Einflussgrößen von Treg	48
3.2.5.1.	CD52-Screening mit Treg-Markern bei Patientenproben nach Alemtuzumab-basierte T-Zell-Depletion	48
3.2.5.2.	Screening der Expression von Treg-Marker nach Inkubation mit Immunsuppressiva in vitro.....	49
3.2.5.3.	Screening der Expression von GARP in Treg nach Stimulation von PBMC von Patientenproben nach Alemtuzumab-basierter T-Zell-Depletion in vitro.....	51
3.2.6.	Computergestützte Auswertung der durchflusszytometrischen Tests	51
3.3.	Suppressionstests	52
3.3.1.	Definition und Grundlagen.....	52
3.3.2.	Suppressionstests zur Bestimmung der Suppressionsfähigkeit von Treg-Subgruppen unter verschiedenen Einflussgrößen.....	56
3.3.2.1.	Suppressionstests zur Unterscheidung der Suppressionsfähigkeit von CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg.....	56
3.3.2.2.	Suppressionstests zur Unterscheidung der Suppressionsfähigkeit von Patienten-Treg unabhängig vom Konditionierungsregime im Vergleich zu Treg von gesunden Kontrollpersonen.....	56
3.3.2.3.	Suppressionstests zur Testung des Einflusses von Patientenserum auf die Proliferation von Teff und Suppressionsfähigkeit von Treg.....	57
3.3.2.4.	Suppressionstests zur Testung der Rolle von immunsuppressiven Medikamenten auf die Suppressionsfähigkeit von Treg	57
3.3.3.	Auswertung der Suppressionstests	57
3.4.	Molekularbiologische Methoden.....	58
3.4.1.	Grundlagen der Nukleinsäuren-Sequenzierung	58
3.4.1.1.	RNS-Sequenzierung und Genexpressionsanalyse	59
3.4.1.2.	Genexpressionsanalysen zur Feststellung von Unterschieden zwischen CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg.....	60
3.5.	Statistische Auswertung	61
3.6.	Versicherung über die eigenständige Erarbeitung und Auswertung der im Ergebnis- und Diskussionsteil gezeigten und diskutierten Daten	62

3.7.	Materialien und Geräte	62
3.7.1.	Puffer, Lösungen und Medien	62
3.7.2.	Chemikalien und Reagenzien.....	63
3.7.3.	Geräte	63
3.7.4.	Plastikwaren	64
3.7.5.	Glaswaren.....	65
3.7.6.	Zytokine	65
3.7.7.	Kits	65
3.7.8.	Magnetischen Beads	65
3.7.9.	Software.....	66
4.	Ergebnisse	67
4.1.	Die Rolle von CD52 bei der Entstehung der GVHD nach Alemtuzumab-basierter T-Zell-Depletion.....	67
4.1.1.	Relativer Anteil von Treg in Bezug auf GVHD.....	67
4.1.2.	CD52-Negativität als Marker für die Entstehung einer akuten GVHD.....	68
4.1.3.	Die Rekonstitution von CD52 ^{neg} Treg korreliert mit dem Auftreten von aGVHD	69
4.1.4.	Unterschiede in der Expression von HELIOS, ILT3 und GARP zwischen CD52 ^{pos} und CD52 ^{neg} Treg	70
4.1.5.	GARP-Expression nach Stimulation im Vergleich zwischen CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg	75
4.2.	Einfluss von Immunsuppressiva auf die Expression ausgewählter Treg-Marker.....	77
4.3.	Funktionelle Testung von Treg mittels Suppressionstests.....	78
4.3.1.	Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg	78
4.3.2.	Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg von gesunden Individuen und Patienten mit GVHD unabhängig vom Konditionierungsregime.....	81
4.3.3.	Testung des Einflusses des Serums von Patienten mit GVHD auf die Suppressionsfähigkeit von Treg und die Proliferationsfähigkeit von Teff.....	86
4.3.4.	Effekt von Glukokortikoiden und Ciclosporin A auf die Suppressionsfähigkeit von Treg	92
4.4.	Testung auf Molekularbiologische Unterschiede zwischen CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg	94
4.4.1.	Vorbereitung und Qualitätskontrollen zur Testung auf molekularbiologische Unterschiede zwischen CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg	94
4.4.2.	Ergebnisse der Testung auf molekularbiologische Unterschiede zwischen CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg	97
5.	Diskussion	102
5.1.	Methodische Problematik bei der Isolation von Treg und Suppressionstests.....	102
5.2.	Die Rolle von Treg allgemein und die Rolle von CD52, GARP, ILT3 und HELIOS in Treg nach Alemtuzumab-basierter T-Zell-Depletion.....	106
5.3.	Die Rolle des Serums von GVHD-Patienten und von Serum-Hitzeinaktivierung im Hinblick auf deren Einfluss auf eine antiproliferative Wirkung auf Lymphozyten.	111
5.4.	Klinische Relevanz und Ausblick dieser Forschungsarbeiten	113

6.	Zusammenfassung	115
7.	Literatur.....	117
8.	Anhang	127

Abkürzungsverzeichnis

aGVHD	akute Graft-versus-Host-Disease
aHSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
Ak	Antikörper
AML	akut myeloische Leukämie
ALL	akut lymphatische Leukämie
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
BK-Virus	Humanes Polyomavirus 1 Virus
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl- Ester
CMML	chronisch myelomonozytäre Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
cGVHD	chronische Graft-versus-Host-Disease
CSA	Cyclosporin A
DAGKBT	Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V
DAMP	damage-associated molecular pattern
DLI	donor lymphocyte infusion
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECP	extrakorporale Photopherese
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant
GVL	Graft-versus-Leukemie-Effekt
GVHD	Graft-versus-Host-Disease
IFN γ	Interferon gamma
IL 2	Interleukin 2
ILT3	Immunoglobulin-like transcript 3

KM	Knochenmark
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MHC	minor histocompatibility antigen
MMF	Mycophenolat Mofetil
MTX	Methotrexat
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PB	peripheres Blut
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
RIC	Reduced Intensity conditioning
TBI	total body irradiation
TCD	T-Zell-Depletion
Teff	Effektor-T-Lymphozyten
TGFbeta	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Treg	regulatorische T-Zellen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „GVHD Pathophysiology“. Übernommen aus Graft-versus-Host Disease (58). (Seite 23)

Abbildung 2: Korrelation zwischen dem Auftreten einer aGVHD und CD52^{neg} Treg (Seite 38)

Abbildung 3: Graphische Darstellung Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Medium
übernommen aus:
<https://dublinlisacoolsaet.wordpress.com/2013/05/03/pbmc-fasen/> (08.05.2018)
(Seite 43)

Abbildung 4: Prinzip der Zellsortierung mittels FACS aus
<http://www.abcam.com/protocols/fluorescence-activated-cell-sorting-of-live-cells>
(08.05.2018) (Seite 53)

Abbildung 5: Prinzip der Fluoreszenzabnahme nach CFSE-Färbung bei Zellteilung
übernommen aus <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/newsletters-and-journals/bioprobex-journal-of-cell-biology-applications/bioprobex-73/bioprobex-73-cell-proliferation-generational-tracing.html> (08.05.2018). (Seite 54)

Abbildung 6: CD8-basierte Gating-Strategie für die Analyse der Teff-Proliferation nach CFSE-Färbung (Seite 57)

Abbildung 7: Relativer Treg-Anteil zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD, keiner GVHD und gesunden Kontrollen (Seite 67)

Abbildung 8: CD52-Expression innerhalb zytotoxischer T-Lymphozyten, T-Helfer-Lymphozyten und Treg aller gescreenter Patienten (n=20). (Seite 68)

Abbildung 9: CD52-Expression von Treg zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD, ohne GVHD und gesunden Individuen. (Seite 69)

Abbildung 10: Expression des Transkriptionsfaktors HELIOS im Vergleich zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg und zwischen den GVHD-Gruppen (Seite 70)

Abbildung 11: Expression von ILT3 im Vergleich zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg und zwischen den GVHD-Gruppen (Seite 72)

Abbildung 12: Expression von GARP im Vergleich zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg und zwischen den GVHD-Gruppen (Seite 74)

Abbildung 13: GARP-Expression nach Stimulation im Vergleich zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg (Seite 75)

Abbildung 14: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg bei Patient 1 (Seite 77)

Abbildung 15: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg bei Patient 19 (Seite 78)

Abbildung 16: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg bei Patient 20 (Seite 79)

Abbildung 17: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg von Patient 1 und einem gesunden Individuum (Seite 81)

Abbildung 18: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg von Patient 22 und einem gesunden Individuum sowie Einfluss des Serums von Patient 22 auf die Suppressionsfähigkeit von Treg und die Proliferationsfähigkeit von Teff (Seite 82/83)

Abbildung 19: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg von Patient 21 und einem gesunden Individuum sowie Einfluss des Serums von Patient 21 auf die Suppressionsfähigkeit von Treg und die Proliferationsfähigkeit von Teff (Seite 84)

Abbildung 20: Einfluss von Serum von Patienten nach aHSZT ohne GVHD (Patient 19, 23, 24 und 25) auf die Proliferationsfähigkeit von gesunden Teff (Seite 86)

Abbildung 21: Einfluss von Serum von Patienten nach aHSZT mit aGVHD (Patient 3, 6, 26, 27 und 28) auf die Proliferationsfähigkeit von gesunden Teff (Seite 88/89)

Abbildung 22: Einfluss der Hitzeinaktivierung des Serums auf den Serum-Effekt auf die Suppressionsfähigkeit von Treg (Seite 90)

Abbildung 23: Testung des Effekts von Immunsuppressiva auf die Suppressionsfähigkeit von Treg (Seite 92)

Abbildung 24: Treg und Verteilung zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} bei Patient 20 (Seite 93)

Abbildung 25: Durchflusszytometrische Reinheitskontrolle nach FACS-basierter Sortierung CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg von Patient 20 (Seite 94)

Abbildung 26: Qualitätskontrolle der isolierten RNS (Seite 95)

Abbildung 27: Darstellung der Treg-Gates in PBMC, Reinheitskontrolle und Negativfraktion nach MACS-basierter Treg-Isolation (Seite 102)

Abbildung 28: Durchflusszytometrische Darstellung der Treg nach MACS-Isolation und FACS-Sort (Seite 103)

Abbildung 29: Darstellung von CD52 und dem gpi-Anker auf Treg von Patient 2 (Seite 104)

Abbildung 30: Korrelation zwischen CD52 und ILT3 beziehungsweise GARP bei Lymphozyten (Seite 108)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Organstadien der aktuellen GvHD nach Harris (62) (Seite 22)

Tabelle 2: Gesamtschweregrad der GVHD nach Glucksberg (57) (Seite 22)

Tabelle 3: Diagnostische Manifestation/ Symptom der cGVHD nach NIH (65).
Übernommen aus <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/graft-versus-host-erkrankung-chronisch/@@view/html/index.html> (Datum: 08.05.2018) (Seite 25)

Tabelle 4: Interne Nummern der verwendeten Buffy-Coats (Seite 41)

Tabelle 5: Patientenliste mit Nummer, Alter, Erkrankung, Konditionierungsregime, Zeitpunkt der Probenabnahme, Art der GVHD (Seite 42)

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper mit Spezies, Fluorochrom, Klon und Hersteller (Seite 46)

Tabelle 7: Treg-Pannel für Patientenproben, die eine Alemtuzumab-haltige TCD erhalten haben (Seite 48)

Tabelle 8: Pannel zur Testung von Treg Markern nach Inkubation von Treg mit Prednisolon oder CSA (Seite 49)

Tabelle 9: Pannel zur Testung der GARP-Expression von Treg vor und nach Stimulation (Seite 50)

Tabelle 10: Expression ausgewählter Treg-Marker nach Inkubation ohne Immunsuppressiva, mit Prednisolon oder mit CSA für 24 Stunden (exemplarisch für ein gesundes Individuum) (Seite 76)

Tabelle 11: Unterschiede in der Genexpression zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg für die Gene von CD52 (CD52), dem pgi-Anker (PIG-Gene), GARP (LRRC32), ILT3 (LILRB4) und HELIOS (IKZF2) (Seite 96)

Tabelle 12: Darstellung der Genexpression verschiedenen Marker zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg (Seite 97-100)

1. Einleitung

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind Teil des erworbenen Immunsystems und haben essentielle Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase indem sie überschießende Immunreaktionen, die unter anderem Autoimmunerkrankungen auslösen können, verhindern können (1, 2).

Die vorliegende Promotionsschrift befasst sich mit der Rolle Treg in Bezug auf die Graft-versus-Host-Disease (GVHD) nach allogener Stammzelltransplantation (aHSZT) im Allgemeinen und im Speziellen nach Alemtuzumab (monoklonaler CD52-Antikörper)-basierter T-Zell-Depletion (TCD) im Rahmen der Konditionierungsschemotherapie vor aHSZT. Viele bereits publizierte wissenschaftliche Studien lassen vermuten, dass Treg in Patienten, die unter einer GVHD leiden, funktionell beeinträchtigt sind und/oder ihre Anzahl verringert ist (3). Es konnte bereits im Vorfeld gezeigt werden, dass die Rekonstitution CD52^{neg} Treg mit dem Auftreten einer akuten GVHD (aGVHD) korreliert und CD52^{neg} Treg eine geringere Expression des Treg-Aktivierungsmarkers GARP (Glycoprotein A repetitions predominant) zeigten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD52^{neg} Treg keinen gpi-Anker exprimieren, der das CD52-Molekül auf der Zellmembran fixiert (unveröffentlicht). Diese Ergebnisse sollten in der vorliegenden Arbeit unter anderem bestätigt werden. Neben der Expression von GARP wurde die Expression zweier anderer Marker in Bezug auf CD52^{neg} Treg und CD52^{pos} Treg untersucht: Zum einen die Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors HELIOS (4) untersucht und zum anderen die Expression von ILT3 (Immunoglobulin-like transcript 3), einem Protein dem eine Rolle in Bezug auf die Suppressionsfähigkeit von Treg zugeschrieben wird (5).

Um die funktionellen Unterschiede zwischen CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg zu untersuchen, wurden sogenannte Suppressionstests durchgeführt in denen CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg der selben Patienten FACS-basiert sortiert wurden und anschließend für 5 Tage mit mononukleäre Zellen des peripheren Blutes als „Effektor-T-Zellen“ (englisch: Peripheral blood mononuclear cell, kurz: PBMC) inkubiert und stimuliert wurden. Bezüglich der Suppressionsfähigkeit beider Gruppen wurden danach deskriptive Vergleiche angestellt.

Im zweiten Teil wurde die Rolle von Treg unabhängig vom Konditionierungsregime analysiert: Es wurde untersucht, ob Treg von Patienten mit akuter und chronischer GVHD (aGVHD und cGVHD) eine verminderte Suppressionsfähigkeit haben im Vergleich zu Treg von gesunden Probanden. Um die Rolle des Serums von Patienten mit GVHD in Bezug auf die Proliferationsfähigkeit von Effektor-T-Zellen zu untersuchen, wurden oben genannte Suppressionstests mit Patientenseren durchgeführt und im direkten Vergleich mit Serum gesunder Spender gegenübergestellt, um herauszufinden, ob die verschiedenen Seren einen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit von Teff oder die Suppressionsfähigkeit von Treg haben. Zum Vergleich wurden diese Tests auch mit Seren von Patienten nach aHSZT, die keine GVHD entwickelten, durchgeführt.

Um den Effekt von Medikamenten, die das Immunsystem unterdrücken, welche die Standardtherapie bei GVHD sind, auf Treg zu untersuchen, wurden Treg mit Kortikosteroiden und/oder Calcineurin-Inhibitoren inkubiert und deren Suppressionsfähigkeit untersucht.

Das Ziel dieses Forschungsvorhaben war es Kenntnisse über die Rolle von Treg in Bezug auf die Entstehung und die generelle Rolle bei einer GVHD zu erlangen um den Stellenwert einer Manipulation von Treg zur Behandlung einer GVHD oder der therapeutischen Treg-Therapie von Fremdspendern zu untersuchen. Es sollte gezeigt werden, ob eine Applikation von funktionsfähigen Fremdspender-Treg oder die Manipulation patienteneigener Treg als therapeutische Option in Frage kommt-klinische Studien zu diesem Thema laufen bereits (6-8).

2. Literaturdiskussion

2.1. Allogene Stammzelltransplantation

2.1.1. Definition, Wirkmechanismus und Ziele

Als allogene hämatopoetischen Stammzelltransplantation (aHSZT) bezeichnet man die Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen eines Individuums auf ein anderes, genetisch fremdes Individuum (9). Die Gewinnung der Stammzellen kann dabei aus dem Knochenmark (KM) (meist Beckenkamm) oder durch Mobilisation der Stammzellen mit Hilfe von Wachstumsfaktoren und anschließender Leukapherese aus dem peripheren Blut (PB) erfolgen. Daneben ist auch die Verwendung von Stammzellen aus Nabelschnurblut möglich (10). Abzugrenzen von der aHSZT ist die autologe hämatopoetischen Stammzelltransplantation, bei der der Patient nach myeloablativer Hochdosischemotherapie seine eigenen, vorher kryokonservierten Stammzellen retransfundiert bekommt, um einer durch die Hochdosischemotherapie verursachten irreversiblen KM-Insuffizienz zu entgehen (11).

Wird ein Patient, der unter einer hämatologischen Erkrankung leidet, alleine mit einer Polychemotherapie und/oder Strahlentherapie behandelt, ist je nach Erkrankung mit Rezidivraten von bis zu 100% zu rechnen. In diesen Fällen stellt die aHSZT oftmals die einzige potentiell kurative Therapieoption dar (12-14). Um ein suffizientes Anwachsen der Spenderzellen zu gewährleisten (Entgraftment), erhalten die zu behandelnden Patienten vor dem eigentlichen Stammzelltransfer eine Therapie aus verschiedenen stammzelltoxischen Substanzen und die im PB zirkulierenden T-Lymphozyten werden zusätzlich medikamentös depletiert (Konditionierungstherapie) (15). Die genaue Zusammensetzung der Konditionierungstherapie richtete sich nach der Art der Erkrankung, dem Remissionsstatus und dem Alter sowie den Komorbiditäten des Patienten. Durch den Transfer der hämatopoetischen Spenderstammzellen, die ins Knochenmark des Empfängers wandern und dort ein neues hämatopoetisches System ausbilden, wird das blutbildende System eines fremden Spenders auf einen Empfänger übertragen (9). Das neu heranwachsende Immunsystem ist potentiell in der Lage maligne entartete Zellen des Empfängers als „fremd“ zu erkennen und abzutöten. Dieser Effekt wird als Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL) bezeichnet und entspricht einer lebenslangen Immuntherapie (16). Die Intention einer aHSZT ist potentiell immer kurativ.

2.1.2. Indikationen

Für viele hämatologische Erkrankungen wie akute myeloische Leukämien (AML), die nach Klassifikation des European Leukemia Networks (ELN) nicht als „favorable“ (gute Prognose) klassifiziert werden (17), deren Vorläuferstadien wie chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) oder Formen des myelodysplastischen Syndroms (MDS), akute lymphatische Leukämie (ALL) und B- oder T-Zell-Lymphome in gewissen Stadien ist die aHSZT aktuell zum Teil die einzige kurative Therapieoption. Daneben werden zum Teil Patienten allogent transplantiert, die unter chronisch myeloischer Leukämie (CML), Myelofibrose, chronisch lymphatischer Leukämie (CLL), sehr schwerer aplastischer Anämie oder einem multiplen Myelom leiden und auf Standardtherapieregime nicht adäquat ansprechen. Die „Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V.“ (DAGKBT) (www.dag-kbt.de) definiert in ihren Leitlinien die Indikationen zur aHSZT und orientiert sich hierbei an den Richtlinien der European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) (www.ebmt.org) (18).

2.1.3. Konditionierung und T-Zell-Depletion

Um einen Patient für den Transfer von hämatopoetischen Stammzellen vorzubereiten, ist es nötig knochenmarktoxische Substanzen und/oder eine Bestrahlung durchzuführen, um ein Anwachsen der neuen Stammzellen (Entgraftment) gewährleisten zu können. Dieses Therapieschema wird als Konditionierung bezeichnet. Man unterscheidet hierbei die „klassischen“ myeloablativen Konditionierungsregime und die „neueren“ dosisreduzierten Konditionierungsregime. Myeloablativ Konditionierungsregime bestehen meist aus einer Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation (TBI)), einer Hochdosistherapie Cyclophosphamid und Busulfan in verschiedenen Kombinationen und zum Teil dem T-Zell-depletierenden Medikament Antithymozytenglobulin (ATG) (siehe unten) (19-21). Da diese Konditionierungsregime trotz guter Ergebnisse in Bezug auf Remissionsraten und Entgraftment wegen ihrer hohen Toxizität eine hohe therapieassoziierte Mortalität und Morbidität aufweisen, die vor allem ältere und vorerkrankte Patienten betrifft, wurden im Verlauf der Jahre die Dosen der

Bestrahlung und Chemotherapeutika oder die Substanzen selbst immer wieder verändert und besser verträgliche sogenannte „dosisreduzierte Konditionierungsregime“ (Reduced Intensity conditioning (RIC)) entwickelt, die die aHSZT auch älteren und vorerkrankten Patienten ermöglichte. 1997 zeigten Storb et al. als eine der ersten Gruppen im Hundemodell, dass eine deutliche niedrigere Bestrahlungsdosis in Kombination mit Immunsuppression ausreichend ist, um ein erfolgreiches Entgraftment zu erreichen (22). Circa 20 Jahren nach den ersten Anwendungen dieser RIC-Regime lässt sich zusammenfassend berichten, dass durch deren Entwicklung einem viel größeren Patientenkollektiv eine aHSZT ermöglicht werden konnte, die Toxizität gesenkt werden konnte und ungefähr gleiche Raten an GVHD beobachtet werden konnten. Zu beachten ist jedoch, dass sich RIC-Regime kaum für hämatologische Erkrankungen mit hoher Kinetik eignen, da aufgrund niedrigerer Toxizität auch die medikamentöse Anti-Malignom-Wirkung schwächer ist als bei myeloablativen Konditionierungsregimen. Daher ist für den kurativen Aspekt bei RIC vor allem der GVL-Effekt maßgeblich (23-25). Welches Regime im Einzelfall gewählt wird, ist daher immer unter Berücksichtigung von Alter, Komorbiditäten, zumutbarer Toxizität und Art sowie Stadium der Erkrankung zu entscheiden (26, 27). Wie weiter unten zu lesen, wird die sogenannte Graft-versus-Host-Disease (GVHD) nach aHSZT vor allem durch immunkompetente Spender-T-Lymphozyten verursacht. Um das Entstehungsrisiko einer GVHD möglichst gering zu halten, wurden T-Zell-depletierende Verfahren entwickelt (28, 29). Kehrseite dieser Graft-Manipulation sind allerdings zum einen ein erhöhtes Rezidivrisiko und die erhöhte Gefahr von Infektionen sowie Entgraftment-Komplikationen und gemischte Chimärismen (30, 31). Die beiden häufigsten Methoden zur T-Zell-Depletion werden im Folgenden besprochen:

2.1.3.1. Alemtuzumab (Campath 1H)

Alemtuzumab (Handelsname: Campath 1H) ist ein monoklonaler Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD52 (32), welches sich unter anderem auf reifen T-Zellen, jedoch nicht auf hämatopoetischen Stammzellen befindet und zur TCD verwendet werden kann (33-37). Der Antikörper kann dem Patienten vor Transplantation verabreicht werden („Campath in vivo“) (36) oder auch in das Stammzellpräparat selbst gegeben werden („Campath in the bag“) (35, 38). Es konnte gezeigt werden,

dass durch RIC mit Alemtuzumab-basierter TCD das Risiko für die Entstehung einer GVHD reduziert werden konnte (39) und die Nicht-Rezidiv-Mortalität (Englisch: non-relapse-mortality) reduziert werden konnte (40). In Bezug auf Virusreaktivierungen und die Immunrekonstitution zeigte sich jedoch auch Nachteile: Morris et al. konnten 2003 zeigen, dass Alemtuzumab noch 2 Monate nach Transplantation in zytotoxischer Konzentration nachweisbar war (41). Außerdem war die Rate an Reaktivierungen des Cytomegalievirus (CMV) erhöht und die Immunrekonstitution verspätet (42). Bezüglich des Epstein-Barr-Virus (EBV) kann auch vermutet werden, dass eine TCD mit Alemtuzumab eine verzögerte Rekonstitution von EVB-spezifischen T-Zellen mit sich bringt, was zu erhöhter Rate an Reaktivierungen führt (43).

Neben der aHSZT wird oder wurde Alemtuzumab in der Therapie der CLL eingesetzt (44). Auch bei der Transplantation von soliden Organen wurden Studien zu Alemtuzumab durchgeführt: Morgan et al. fassten 2012 in einem systemischen Review zusammen, dass Alemtuzumab in der Nierentransplantation vergleichbar gute Ergebnisse bezüglich Organabstoßung und verspäteter Funktionsaufnahme des transplantierten Organs zeigte wie Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) (45). Eine andere Studie zeigte, dass Alemtuzumab in Bezug auf Organabstoßung nach Nieren- oder Bauchspeicheldrüsentransplantation Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) überlegen war (46).

2.1.3.2. Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)

ATG ist ein Gemisch aus polyklonalen Antikörpern, die gegen Lymphozyten gerichtet sind. Aktuell sind 3 verschiedenen Produkte verfügbar: Zum einen ein vom Pferd stammendes polyklonales Immunglobulin G (IgG), welches mit humanen Thymozyten immunisiert wurde und für die Behandlung der aplastischen Anämie eingesetzt wird (47). Die anderen beiden Substanzen stammen vom Kaninchen ab: das polyklonale IgG „ATG-Thymoglobulin“, welches mit humanen Thymozyten immunisiert wurde und zum anderen das „ATG-Fresenius / Neovii“ ein polyklonales IgG, welches mit einer humanen T-Zell-Leukämie Zelllinie immunisiert wurde (48). Zur TCD vor aHSZT wird in unserem Zentrum aktuell ATG-Fresenius / Neovii verwendet.

Finke et al. konnten 2009 zeigen, dass ATG im Vergleich zu Cyclosporin plus Methotrexat zu einer Halbierung der Rate an schwerer und sehr schwerer akuter GVHD (24% auf 12%) führt und es anstatt bei 42% nur noch bei 12% der Patienten zu einer schweren chronischen GVHD kam (28, 49).

Baron et al. fassten 2017 eine Vielzahl von retrospektiven Studien zusammen und zeigten, dass Patienten mit myeloablativer Konditionierungstherapie, die ATG erhielten, im Vergleich zu Patienten, die kein ATG erhielten, weniger höhergradige GVHD entwickelten, niedrigere Raten an Nicht-Rezidiv-Mortalität (non-relapse-mortality) aufwiesen und ein besseres Gesamtüberleben (overall survival) zeigten (48).

Es kann hierbei keine Empfehlung ausgesprochen werden, ob eine der beiden Substanzen generell vorzuziehen ist, da dieses von verschiedenen Faktoren abhängen kann- in einer kleinen Kohorte konnte gezeigt werden, dass Patienten, die Alemtuzumab erhielten eine höhere Rate an CMV- und Humanes Polyomavirus 1 (BK-Virus)-Virus-Reaktivierungen beziehungsweise Infektionen erlitten, als Patienten, die ATG erhielten (50).

2.1.4. Graft-versus-Host Disease (GVHD)

GVHD bezeichnet eine unerwünschte durch Immunzellen des Spenders ausgelöste Entzündungsreaktion im Gewebe des Empfängers, die potentiell jedes Gewebe betreffen kann und aktuell eine der häufigsten Komplikationen nach aHSZT darstellt. Sie kann potentiell tödlich verlaufen und stellt eine der größten klinischen Herausforderungen im Kontext der allogenen Stammzelltransplantation dar. Eine GVHD wird sowohl nach myeloablativer als auch nach dosisreduzierter Konditionierung beobachtet (51). Je nach klinischem Erscheinungsbild und zeitlicher Entstehung unterscheidet man zwischen akuter und chronischer GVHD (52). Verschiedene Faktoren wie die Konditionierung, die immunsuppressive Therapie, die Verabreichung von Spenderlymphozyten (englisch: donor lymphocyte infusion (DLI)), Wahl des Spenders und Wahl der Stammzellquelle beeinflussen das zeitliche Auftreten einer GVHD (53).

2.1.4.1. Akute Graft-versus-Host-Disease (aGVHD)

Die aGVHD als akute Entzündungsreaktion betrifft vor allem die Haut (Hautrötung, Dermatitis), den Darm (Colitiden mit zum Teil schwersten blutigen Diarrhoen) und die Leber (Cholestase, Hepatitis), wobei die Haut meist das erste betroffene Organ darstellt. Es ist an dieser Stelle deutlichzumachen, dass potentiell jedes Gewebe betroffen sein kann. aGVHD generell tritt bei 30-50% der Patienten nach aHSZT auf, aGVHD vom Grad 3-4 bei ca 14% der Patienten nach aHSZT. Risikofaktoren sind vor allem genetische Unterschiede zwischen Spender und Empfänger wie HLA-Mismatch, Nicht-Verwandtschaft von Spender und Empfänger, weiblicher Spender für männlichen Empfänger, Spenderstammzellen aus dem PB anstatt KM und das Konditionierungsregime (54-56). Aktuell verschuldet die aGVHD circa 15-30% der Todesfälle im Zuge einer aHSZT (57). Die frühere Definition, die besagt, dass eine aGVHD in den ersten 100 Tagen nach aHSZT auftritt, ist heute nicht mehr geläufig.

Goldstandard für die Diagnostik ist für die aGVHD des Darms eine histologische Begutachtung nach Biopsie. Im Präparat zeigen sich Apoptosen, Kryptenabszesse und Epithelverlust. Je nach Schweregrad können vereinzelte Nekrosen mit oder ohne Apoptosen des Kryptenepithels und fakultativ eine Kryptendilatation ohne Verlust von Krypten auftreten, jedoch kann es auch zu Nekrosen und Untergang vollständiger Einzelkrypten mit Verlust zusammenhängender Krypten, fokalen mikroskopischen Mukosadefekten bis hin zu diffusen mikroskopischen Mukosadefekten oder zum vollständigen Epithelverlust kommen (58).

Die aGVHD der Haut manifestiert sich vor allem als makulopapulöses Exanthem sowie Erythrodermie mit Juckreiz. Bei unklarem klinischen Befund kann auch hier die histologische Begutachtung wegweisend sein (59).

Ist nach aHSZT eine Erhöhung des Bilirubins feststellbar, so kann dieses auf eine aGVHD der Leber hinweisen. Auch hier ist eine histologische Begutachtung nach Probengewinnung teilweise nötig. Histologisch zeigen sich eine lobuläre Hepatitis, Cholestase, Apoptosen der Gallengangsepithelien, mit Zelltrümmern gefüllte, proliferierende Ductuli, periduktale lymphozytäre Infiltrationen und segmentale Nekrosen (60).

Um eine aGVHD in Schweregrade einzuteilen, wird zunächst das organspezifische Bewertungssystem nach Harris verwendet, welches je nach klinischer Manifestation oder laborspezifischen Marker 1-4 Punkte vergibt (61) (siehe Tabelle 1):

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

Tabelle 1: Organstadien der aktuen GvHD nach Harris (61).

Zusammenfassend kann dann ein „Gesamtschweregrad nach Glucksberg“ ermittelt werden, der die GVHD nach der Summe der einzelnen Organmanifestationen in die 4 Schweregrade „leicht“, „moderat“, „schwer“ und „sehr schwer“ einteilt (56) (siehe Tabelle 2):

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

Tabelle 2: Gesamtschweregrad der GVHD nach Glucksberg (56).

Pathophysiologisch liegen einer aGVHD verschiedenen Mechanismen zugrunde. Ferrara beschrieb 2009 ein 3-Phasen-Model in dem es zunächst zu einem Gewebeschaden durch die zytotoxischen Substanzen der Konditionierungstherapie kommt. Dadurch werden proinflammatorische Zytokine (Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Interleukin-1 sowie Interleukin-6) freigesetzt. Dies führt zu einer Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (Phase 1). Diese aktivieren Spender-T-Lymphozyten zur Proliferation, Differenzierung und Migration. Außerdem werden natürliche Killerzellen, TNF α und Interleukin-1 aktiviert beziehungsweise freigesetzt (Phase 2). In Phase 3 kommt es dann zur Zerstörung von Empfängerorgane durch die vorher aktivierten Immunzellen. Außerdem werden durch den Gewebeschaden in der Darmschleimhaut Lipopolysaccharide frei, die die TNF α -Produktion fördern. TNF α kann wiederum über TNF-Rezeptoren direkt oder über den sogenannten Fas-Signalweg zur Gewebeerstörung beitragen (siehe Abbildung 1) (57).

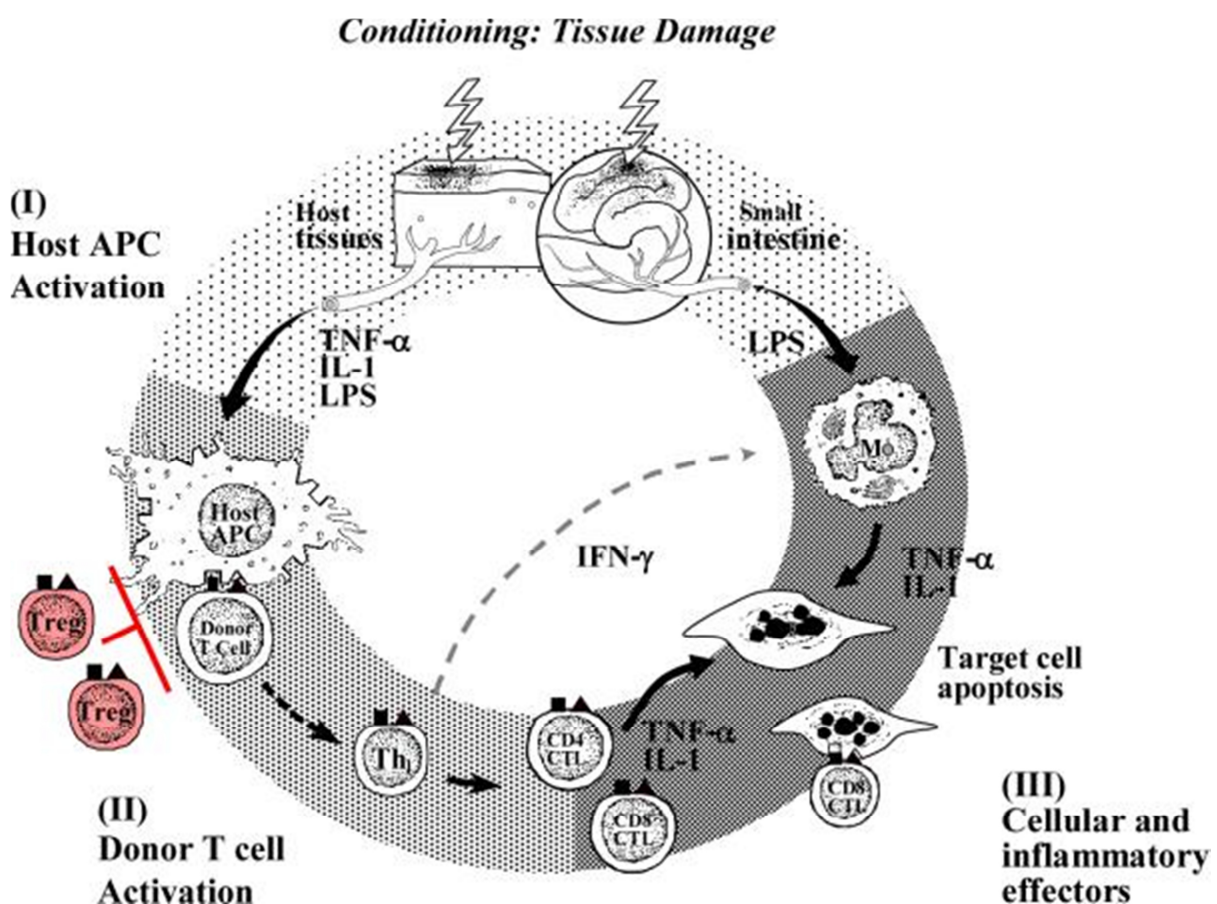


Abbildung 1: „GVHD Pathophysiology“. Übernommen aus Graft-versus-Host Disease (57).

Zeiser et al. veröffentlichten 2017 einen Review-Artikel unter anderem zur Biologie der Entstehung einer aGVHD in welchem dem Darm eine zentrale Rolle zugeschrieben wird: Die Prozesse der frühen Phase in der Entstehung einer aGVHD seien Neoangiogenese und die Infiltration des Verdauungstraktes mit Zellen des angeborenen Immunsystems wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten und die daraus resultierende Bildung von freien Radikalen, die zur Schädigung von Geweben und einer erhöhten Permeabilität vor allem im Bereich des Darmes führen. Eine Immunantwort von Teilen des angeborenen und erworbenen Abwehrsystems können nach Aussagen der Autoren durch sogenannte sterile damage-associated molecular pattern (DAMP) (unter anderem: Adenosintriphosphat, Heparinsulfat, high-mobility group box 1 Protein, sialic acid-binding immunoglobulin-type Lectins, Teile von Mitochondrien, Interleukin 33 und Biglycan) und sogenannte pathogen-associated molecular pattern (PAMP) (unter anderem: Lipopolysaccharide) ausgelöst werden. Durch DAMPs und PAMPs wird in weiterer Folge auch die vermehrte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen angeregt.

Den T-Lymphozyten wird bei der späteren Zerstörung von Geweben die zentrale Rolle zugeschrieben- die bedeutendste Mediatorfunktion habe hierbei FAS und die Freisetzung von Granzym B und Perforin. Für die Aktivierung der T-Lymphozyten sei die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen, die Patienten-MHC oder Proteine des sogenannten minor histocompatibility antigen (MHC) präsentieren, von hervorragender Bedeutung. Daneben seien kostimulatorische Moleküle wichtig: In Bezug auf die aGVHD spielen vor allem CD28, ICOS (CD278), die TNFR superfamily Rezeptoren CD40L (CD154), OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) und negative regulatory pathways anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) (CD152), programmed death 1 (PD-1) (CD279), PD-L1 (CD274) und B7-H3 (CD276) eine Rolle. Die dritte Säule der T-Lymphozyten-Aktivierung bilden die Zytokine: wichtige Vertreter im konkreten Sachverhalt seien Interleukin-1 β , Interferon γ , Interleukin 2 und TNF (54).

Zusammenfassend lässt sich daher schlussfolgern, dass T-Lymphozyten zwar die hauptverantwortlichen Zellen der in der Pathogenese einer aGVHD zu sein scheinen, aber auch andere Immunzellen involviert zu sein scheinen.

2.1.4.2. Chronische Graft-versus-Host-Disease (cGVHD)

Im Gegensatz zur aGVHD setzt die cGVHD zumeist erst später (durchschnittlich 2-18 Monate) nach aHSZT ein und ist durch eher narbige Umbauprozesse oder Immunreaktionen, die Autoimmunerkrankungen ähneln, charakterisiert. Potentiell kann auch hierbei jedes Gewebe betroffen sein. Die häufigsten Lokalisationen jedoch befinden sich an Haut und Schleimhäuten (Poikilodermie, Lichen-Planus-artige, sklerotische, Morphea-artige und Lichen-Sklerosus-artige Veränderungen), Augen (Rötung, vermehrter Tränenfluss, Photophobie), Darm, Leber, Lunge oder den Gelenken (Fasciitis, Gelenkssteifigkeit oder Kontrakturen bei Fasciitis oder Sklerose). Die cGVHD tritt bei bis zu 70% der Patienten nach aHSZT auf (62, 63). Beschriebene Risikofaktoren für die Entstehung einer cGVHD sind das HLA-Mismatch, Spenderstammzellen aus dem PB anstatt KM, höheres Empfänger- und/oder Spenderalter sowie vorangegangene Infektionen (55, 64).

Die Diagnose der cGVHD erfolgt vor allem klinisch durch eine ausführliche Anamnese und Krankenuntersuchung und wird anhand der Kriterien des National Institutes of Health Consensus Development Project gestellt (64) (siehe Tabelle 3). Der Gesamtschweregrad wird anhand der Organmanifestationen errechnet und nach den NIH-Konsensus-Kriterien von 2005 sowie der Nachfolgekonzferenz 2014 als „mild“, „moderat“ und „schwer“ definiert (65).

Haut	Poikilodermie, Lichen-Planus-artige, sklerotische, Morphea-artige und Lichen-Sklerosus-artige Veränderungen
Mund-schleimhaut	Lichen-Planus-artige Veränderungen Genitale, Lichen-Planus-artige und Lichen-Sklerosus-artige Veränderungen, vaginale Vernarbungen (Frauen), Phimose oder Uretherstenosierung (Männer)
Muskeln	Fasciitis, Gelenkssteifigkeit oder Kontrakturen wegen Fasciitis oder Sklerose
GIT	Strikturen oder Stenosierungen im oberen oder mittleren Drittel des Ösophagus
Lunge	Bronchitis-obliterans-Syndrom mit Abfall der FEV1 >10% im Vergleich zum Vorbefund bzw. FEV1/FVC <0,75 nach Ausschluss anderer Ursachen inkl. HR-CT in Expiration und BAL. Eine histologische Sicherung sollte nur in Situation mit therapierelevanter Differenzialdiagnose, z. B. Nachweis einer Infektion und gleichzeitigem Verdacht auf BOS, erfolgen. In der Regel ist eine transthorakale Biopsie nötig, da transbronchiale Biopsien eine sehr geringe Sensitivität aufweisen.

Tabelle 3: Diagnostische Manifestation/ Symptom der cGVHD nach NIH (64). Übernommen aus <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/graft-versus-host-erkrankung-chronisch/@@view/html/index.html> (Datum: 08.05.2018).

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Unterscheidung zwischen einer reinen aGVHD oder cGVHD nicht immer eindeutig möglich ist. Beim sogenannten „Overlap-Syndrom“ geht eine aGVHD in eine cGVHD über beziehungsweise sind beide Entitäten gleichzeitig vorhanden. Dies ist mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet (66).

2.1.4.3. Prophylaxe und Behandlung der GVHD

Um das Auftreten einer GVHD möglichst zu verhindern ist neben einer T-Zell-Depletion in allen Konditionierungsregimen eine GVHD-Prophylaxe mit immunsupprimierenden Medikamenten vorgesehen. Die häufigsten Vertreter dieser sogenannten Immunsuppressiva sind die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A (CSA) oder Tacrolimus in Kombination mit dem Folsäure-Antagonist Methotrexat (MTX) oder Mycophenolat Mofetil (MMF) (67-70). Ebenso können mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus eingesetzt werden und zeigen günstige Eigenschaften in Bezug auf die Rekonstitution von Treg (71). Die Art der Kombination der verschiedenen Medikamente richtet sich stark nach der Art des Stammzellproduktes (Familien- oder Fremdspender) und nach GVHD-Risiko beziehungsweise HLA-Mismatch (72-74).

Kommt es trotz der oben genannten Prophylaxe zur Entstehung einer aGVHD oder cGVHD, so muss nach Schweregrad entschieden werden, ob eine Therapie nötig ist oder nicht. Aktuell ist die Standard-Erstlinientherapie bei einer GVHD Grad 2 oder höher eine systemischen Immunsuppression mit Kortikosteroiden (Prednison/ Prednisolon 2mg/kg Körpergewicht) (75). Daneben werden je nach Manifestationsort lokal wirkende Kortikosteroide eingesetzt. Kommt es zu keiner Besserung der Klinik (=Progression nach 3 Tagen; keine Veränderung nach 7 Tagen; kein Abklingen nach 14 Tagen) so spricht man von einer „steroid-refraktären GVHD“ und es muss eine Zweitlinientherapie begonnen werden. Für die Zweitlinientherapie gibt es diverse Möglichkeiten, wie die extrakorporale Photopherese (ECP) (76) oder die Kombination aus anderen Immunsuppressiva. Neuere Studien zeigen auch einen positiven Effekt durch zelluläre Therapien wie den Transfer von regulatorischen T-Zellen (Treg) (3, 77) oder mesenchymalen Stromazellen (78, 79).

2.2. Das Immunsystem

2.2.1. Grundlagen des Immunsystems

Das Immunsystem schützt den Körper vor Infektionen und anderen Noxen. Man unterscheidet zwei verschiedene Systeme- das angeborene Immunsystem, das von Geburt an zur Verfügung steht und Pathogene sofort eliminieren kann. Beim erworbenen (adaptiven) Immunsystem, welches sich erst ausbilden muss, kommt es erst im Lauf von bis zu Tagen zu einer Immunantwort, die jedoch hochspezifisch ist und ein immunologisches Gedächtnis ausbilden kann. Zunächst müssen die einzelnen Bestandteile des Immunsystems ein Pathogen erkennen, danach abwehren und ein immunologisches Gedächtnis ausbilden. Daneben ist die Immunhomöostase, also das Verhindern überschießender Immunreaktionen von zentraler Bedeutung.

Aus den hämatopoetischen Stammzellen im KM bilden sich neben roten Blutkörperchen (Erythrozyten) und den Blutplättchen (Thrombozyten) lymphatische und myeloische Vorläuferzellen, die der Ursprung der lymphatischen und der myeloischen Zelllinie sind. Aus ihnen entwickeln sich die verschiedenen Zellen des Immunsystems: Aus den myeloischen Vorläuferzellen entstehen die Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und dendritische Zellen, die Teil des angeborenen Immunsystems sind. Aus den lymphatischen Vorläuferzellen entwickelt sich neben den antigenspezifischen Lymphozyten des adaptiven Immunsystems auch natürlichen Killerzellen, die Teil des angeborenen Immunsystems sind und für die unspezifische Erkennung und das Abtöten als pathologisch erkannter Zellen verantwortlich sind.

Die antigenspezifischen Lymphozyten sind der zentrale Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Ihre Aufgabe ist die Erkennung und Bindung von Antigenen. Man unterscheidet hierbei B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (umgangssprachlich auch B-Zellen beziehungsweise T-Zellen genannt; Englisch: B cell und T cell): B-Lymphozyten differenzieren nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen aus und sind dann in der Lage Antikörper (Immunglobuline) zu produzieren. Naiven T-Lymphozyten wandeln sich nach ihrer Aktivierung in T-Effektorlymphozyten um, die sich weiter in zytotoxische T-Lymphozyten, T-Helfer-Lymphozyten oder regulatorische T-Zellen ausdifferenzieren (siehe unten). Ein Teil der B- und T-Lymphozyten differenziert weiter zu Gedächtniszellen aus, um eine schnellere und

stärkere Immunreaktion bei erneuter Infektion mit demselben Krankheitserreger zu ermöglichen.

Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet. B-Lymphozyten reifen auch hier heran, während T-Lymphozyten zu ihrer Reifung in den Thymus wandern. Daher bezeichnet man Knochenmark und Thymus als zentrale beziehungsweise primäre lymphatische Organe. In den Lymphknoten, der Milz und in mukosalen lymphatischen Geweben, die als periphere oder sekundäre lymphatische Organe bezeichnet werden, wird dann die adaptive Immunantwort angestoßen.

T-Lymphozyten benötigen zwei verschiedene Signale, um aktiviert zu werden. Das erste Signal ist die Bindung des Antigenes an den T-Lymphozyten. Das zweite Signal erfolgt über die Antigenpräsentation: Unreife dendritische Zellen nehmen mittels Phagozytose ein Pathogen auf und bauen diesen intrazellulär ab. Danach wandern sie zu den peripher lymphatischen Organen und präsentieren Fragmente von Antigenen des Pathogens, welche als sogenannte kostimulatorische Moleküle bezeichnet werden, an ihrer Oberfläche. Diese kostimulatorischen Moleküle führen als zweites Signal zusammen mit dem ersten Signal zur Stimulation von T-Lymphozyten in den peripher lymphatischen Organen. Daneben produzieren die aktivierten dendritischen Zellen Zytokine, die Einfluss auf andere Teile des Immunsystems haben. B-Lymphozyten benötigen für ihre Aktivierung ebenfalls ein zweites Signal, welches sie jedoch nicht von den dendritischen Zellen, sondern von einer aktivierten T-Helfer-Lymphozyten erhalten.

Der T-Zellrezeptor erkennt ein präsentiertes Antigen nur, wenn dieses an ein bestimmtes Zelloberflächenprotein, das als MHC-Molekül (major histocompatibility complex) bezeichnet wird, gebunden ist, das heisst es kann nur der Komplex aus MHC-Molekül und Antigen erkannt werden.

Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem reagiert das angeborene Immunsystem zwar deutlich schneller, aber diesem System steht nur ein begrenztes Repertoire an Antigenrezeptoren zur Verfügung, sodass nur bestimmte Krankheitserreger erkannt und bekämpft werden können. Jeder Lymphozyt besitzt nur einen Antigenrezeptor. Durch genetische Mechanismen steht dem adaptiven Immunsystem aber eine riesige Vielfalt von Antigenrezeptoren zur Verfügung- dadurch befindet sich immer zumindest ein Lymphozyt im Organismus, der einen spezifischen Antigenrezeptor

trägt, um das Pathogen, das aktuell die Infektion hervorruft, zu binden. Bindet ein Antigen an einen Lymphozyten, kommt es zur klonalen Expansion des Lymphozyten mit der Bildung einer Vielzahl von Lymphozyten mit demselben Antigenrezeptor (klonale Selektion). Um die Bildung autoimmunreaktiver T-Lymphozyten zu verhindern, die sich gegen körpereigene Antigene richten, hat der menschliche Organismus das Prinzip der klonalen Depletion konserviert: Im Zuge der Aktivierung von Lymphozyten über die zwei oben beschriebenen Signale werden dem Lymphozyten über den Antigenrezeptor Überlebenssignale vermittelt, die essentiell sind, damit er nicht in Apoptose (programmierter Zelltod) geht. Potentiell autoreaktive Lymphozyten, deren Antigenrezeptoren körpereigene Antigene erkennen und auch Lymphozyten ohne Antigenrezeptor, erhalten keine Überlebenssignale und gehen vor ihrer Reifung in Apoptose.

Das Immunsystem kann auf zwei verschiedene Arten agieren- über das sogenannte humorale System, das heisst über nicht-zelluläre Mechanismen in dem vor allem die Antikörper, die von den B-Zellen beziehungsweise Plasmazellen gebildet werden und das Komplementsystem die zentrale Rolle spielen und über eine zellvermittelte Immunantwort, die essentiell ist für die Abwehr intrazellulärer Pathogene (80-82).

Im Folgenden wird im Speziellen auf die Lymphozyten eingegangen, die sich in zytotoxische T-Lymphozyten, T-Helfer-Lymphozyten und regulatorische T-Lymphozyten aufteilen.

2.2.2. T-Lymphozyten (T-Zellen)

Alle T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche CD3. Zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) formt CD3 einen Komplex, der der Antigenerkennung dient (80-82).

2.2.2.1. Zytotoxische T-Lymphozyten

Zytotoxische T-Lymphozyten tragen CD8 auf ihrer Oberfläche und werden daher auch CD8^{pos} T-Lymphozyten genannt. CD8 erkennt Peptide, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Sie sind spezialisiert darauf Zellen direkt abzutöten, die Bakterien enthalten, mit Viren infiziert sind oder anderweitig nicht funktionsfähig sind. Nachdem ein zytotoxischer T-Lymphozyt an seine Zielzelle gebunden hat, werden in die Membran der Zielzelle sogenannte Perforine geschleust, die sie durchlässig macht. Durch die sich bildenden durchlässigen Stellen werden mit

Granzymen gefüllte Vesikel in die Zielzelle eingebracht, die wiederum sogenannte Caspasen aktivieren, die für DNA-Fragmentierung und Apoptoseeinleitung verantwortlich sind. Daneben wird das an der Zielzellenmembran ansässige Fas-Protein durch den Fas-Liganden des zytotoxischen Lymphozyten gebunden- diese Bindung induziert ebenfalls Apoptose. (80-82).

2.2.2.2. T-Helfer-Lymphozyten

T-Helfer-Lymphozyten tragen den Marker CD4 auf ihrer Oberfläche und werden daher auch CD4^{pos} T-Lymphozyten genannt. CD4 erkennt Peptide, die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Sie haben im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Lymphozyten keine zytotoxischen Fähigkeiten, sondern haben immunmodulatorische Wirkung durch die Ausschüttung von Zytokinen mit denen anderen Zellen des Immunsystems angelockt und aktiviert werden können: Durch das unterschiedliche Profil an Zytokinen, die T-Helfer-Lymphozyten ausschütten, werden T-Helfer-1- und T-Helfer-2-Lymphozyten unterschieden, die rein morphologisch nicht unterschieden werden können: T-Helfer 1- Lymphozyten schütten die Zytokine Interleukin 2 (IL 2) und Interferon gamma (IFNg) aus. Durch IL 2 wird die Proliferation von T-Lymphozyten und die Zytotoxizität von zytotoxischen T-Lymphozyten angeregt. IFNg aktiviert Makrophagen, induziert die Zytotoxizität natürlicher Killerzellen und fördert die Bildung von T-Helfer-1-Lymphozyten bei Hemmung der Bildung von T-Helfer 2-Lymphozyten. T-Helfer-1- Lymphozyten sorgen für die Abwehr intrazellulärer Bakterien und fungieren als Helferzellen, indem sie nach Bindung des Antigens an ihren Antigenrezeptor als zweites Signal bei der Stimulierung von B-Lymphozyten helfen. T-Helfer 2-Lymphozyten sind nicht dazu in der Lage Zellen direkt zu zerstören und fungieren nur als Helferzellen und schütten die Zytokine Interleukin 4, Interleukin 5, Interleukin 6 und Interleukin 10 aus. Durch die Ausschüttung dieser Zytokine wird vor allem die Bildung von Antikörpern durch Plasmazellen gefördert (80-82).

2.3. Regulatorische T-Lymphozyten

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind definiert als $CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}Foxp3^{pos}$ (83) oder als $CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}CD127^{neg/int}$ (84) Lymphozyten.

Treg dienen durch Hemmung der Proliferation anderer T-Lymphozyten-Untereinheiten der Immunhomöostase, das heißt der Aufrechterhaltung einer adäquaten Immunantwort bei gleichzeitiger Vermeidung der Entstehung von autoreaktiven T-Lymphozyten, die Autoimmunreaktionen hervorrufen können. Eine gestörte Funktion von regulatorischen T-Zellen wird zum Beispiel im Kontext von Autoimmunerkrankungen oder chronisch entzündlichen Erkrankungen bedeutsam (85). Auf der anderen Seite wurden in Tumorgeweben eine erhöhte Treg-Dichte festgestellt: In einer Studie von Wolf et al. konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Dichte an Treg in Gewebeproben von Ovarialkarzinomen mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet war (86). Unter anderem schilderte auch Whiteside den Dualismus von günstigen immunsupprimierenden Eigenschaften von Treg und schädlichen Einflüssen bei bestimmten Krebserkrankungen (87). Es wird daher angenommen, dass Treg in einigen Situationen positive Eigenschaften auf den Verlauf vor allem chronischer oder Autoimmunkrankheiten nehmen können, durch ihre immunsupprimierende Wirkung aber auch zu einer Tumorprogression beitragen können.

Einleitend lässt sich daher sagen, dass Treg im gesunden Individuum das Gleichgewicht des Immunsystems zwischen nützlicher und schädlicher Wirkung mitbestimmen, aber sowohl bei einigen Krankheitsentitäten numerische Veränderungen in Treg oder deren Funktionseinschränkungen maßgeblich sein können und dass bei Tumorerkrankungen Treg auch eine schädliche Rolle spielen können und daher in ihrer Rolle weder generell als positiv oder negativ angesehen werden sollten, sondern wie alle anderen Bestandteile des Immunsystems adäquat funktionieren müssen, um Gesundheit aufrechtzuerhalten, aber bei Veränderung dessen auch schädlich sein können.

2.3.1. Identifizierung von Treg und Bedeutung sowie Funktion von spezifischen Treg „Markern“

Seit die Biologie und Medizin Treg als Untereinheit von T-Lymphozyten definiert hat, wurde eine Vielzahl an verschiedenen „Markern“ beschrieben, die Treg zum einen definieren sollen und/oder essentiell für deren Funktion sind. Im Folgenden seien die wichtigsten vorgestellt und deren Bedeutung diskutiert:

2.3.1.1. CD25, CD127 und Foxp3

Foxp3 (Forkhead-Box-Protein P3) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription von Genen reguliert, die essentielle Bedeutung für die Funktion und Aufrechterhaltung von Treg haben (2, 88, 89). 1959 wurden mehr oder minder zufällig durch die Forschungsgruppe um Russell et al. erstmals die „scurfy mouse“ (Englisch scurfy= schorfig) beschrieben. Bei diesen Mäusen wurde die erste sogenannte X-linked Krankheit beschrieben, die durch eine rezessive Mutation zustande kommt (90). Erst ab 1991 konnten Godfrey et al. zeigen, dass das klinische Bild der „scurfy mouse“ durch massive Infiltrationen von lymphatischen und myeloischen Zellen in diversen Organen zustande kommt und dort eine Autoimmunkrankheit auslöst (91-93). Zehn Jahre später konnte dann schließlich eine Mutation im *Foxp3*-Gen als Ursache des klinischen Bildes der „scurfy mouse“ erstmals beschrieben werden (88). Im selben Jahr wurde eine *Foxp3*-Mutation auch als Ursache des „immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome“ (IPEX-Syndrom) beschrieben (94). In den Jahren 2003 und 2005 konnte dann nachgewiesen werden, dass Foxp3 essentielle Bedeutung für Treg besitzt (95, 96) und Treg-spezifisch ist (97).

CD25 ist die alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors. Es ist auf der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten und konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen zu finden und ist daher nicht alleine linienspezifisch für Treg (98).

2006 wurde durch Liu et al. beschrieben, dass Treg eine Runterregulation (Englisch: downregulation) des Interleukin-7-Rezeptors CD127 aufweisen und daher auch als $CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}CD127^{neg/int}$ definiert werden können (84).

Bis heute sind einige „Marker“ definiert worden, die zum einen die Linienspezifität definieren sollen oder auch Marker für die Aktivierung von Treg oder deren Funktion darstellen. Da eine vollständige Aufzählung und Diskussion aller Moleküle und

„Marker“, die in die komplexe Treg-Funktion eingebunden sind, den Rahmen dieser Dissertationsschrift überschreiten würden, wird im Folgenden ein Überblick über einige Marker gegeben, die in der derzeitigen Literatur vorkommen und auch Thema dieser Dissertationsschrift sein werden:

2.3.1.2. HELIOS

Der Transkriptionsfaktor HELIOS (Ikaros family zinc-finger protein 2 [*IKZF2*]) gehört zu der sogenannten „Ikaros-Gruppe“, die aus 5 verschiedenen Mitgliedern besteht: Ikaros (*IKZF1*), Helios, Aiolos (*IKZF3*), Eos (*IKZF4*) und Pegasus (*IKZF5*) (99). Dieser Transkriptionsfaktoren fungieren unter anderem als transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren bei der Differenzierung von T- und B-Lymphozyten (100). 1998 konnte gezeigt werden, dass Helios bereits in frühesten hämatopoetischen Zellen des Embryos nachgewiesen werden konnte und auch in hämatopoetischen Stammzellen des Erwachsenen und einigen Untergruppen von T-Lymphozyten zu finden ist (101, 102).

HELIOS wird von einigen Autoren ähnlich wie Foxp3 eine herausragende Rolle in der Funktionalität und Regulation von Treg zugeschrieben: Takatori et al zeigten, dass HELIOS^{pos} Treg in Verbindung mit Foxp3 eine potentere Funktion aufwiesen (103, 104). Die Autorengruppe um Thornton et al. postulierten 2010, dass HELIOS^{pos} Treg „natürliche“, vom Thymus abstammende Treg, sogenannte nTreg oder tTreg seien und grenzten diese von peripher induzierten Treg, sogenannte pTreg oder iTreg ab (105). Ob eine sichere Unterscheidung dieser beiden Entitäten anhand von HELIOS möglich ist, ist jedoch fraglich- Himmel et al. zeigten, dass HELIOS^{pos} Treg und HELIOS^{neg} Treg gleichzeitig vorkommen und die Expression von HELIOS nicht exklusiv für vom Thymus abstammende Treg sei (106). Auch Gottschalk et al. konnten zeigen, dass HELIOS auch in pTreg/ iTreg exprimiert wurde und kritisierten die Bezeichnung von HELIOS als exklusiven Marker für nTreg/ tTreg (107). Es ist bis dato also nicht abschließend geklärt wie weit die Rolle von HELIOS reicht beziehungsweise ob HELIOS als exklusiver Marker für eine bestimmte Treg-Untergruppe angesehen werden kann.

2.3.1.3. Glycoprotein A repetitions predominant (GARP)

GARP wurde als ein Marker für aktivierte Treg vorgeschlagen (108-110) und fungiert als Konvertase für Transforming growth factor beta (TGFbeta), der durch GARP von seiner latenten Form in die aktive Form konvertiert wird (109, 111, 112). TGF beta wiederum fungiert als regulierendes Zytokin bei diversen Treg Funktionen. Tüttenberg und Jonuleit et al. beschrieben neben dem membrangebundenen GARP auch eine lösliche Variante mit potentiell antiinflammatorischer Wirkung (113). Der Einsatz von GARP als Arzneimittel zur Treg- Modulierung wird diskutiert (114).

2.3.1.4. Immunoglobulin-like transcript 3 (ILT3)

ILT3 wurde 1997 durch Celle et al. als ein Zelloberflächenmolekül der Immunglobulin-Superfamilie beschrieben, welches auf antigenpräsentierenden Zellen (Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) exprimiert wird und deren Eigenschaft zur Antigenpräsentation verringert (115). ILT3 wird eine Rolle in der Vermittlung von immunologischer Toleranz zugeschrieben (116) und hat immunsupprimierende Wirkung (117), die über T-Lymphozyten vermittelt wird: Sogenannte „tolergene“ dendritische Zellen können Treg aktivieren und sind somit für die Kontrolle einer eventuell überschießenden Immunantwort verantwortlich (118). Diese „Tolerogenität“ kann durch ILT3 verstärkt werden. Dadurch kann intrazellulär unter anderem durch Inhibition der NF-kappaB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)- Aktivierung und extrazellulär durch die Induktion von Anergie und regulatorischen Funktionen in T-Lymphozyten eine supprimierende Wirkung auf Effektor-T-Lymphozyten hervorgerufen werden (117).

Ulges et al. publizierten 2015 eine wissenschaftliche Arbeit über ILT3 in der im murinen Modell gezeigt werden konnte, dass durch Gen-Knockout der beta-Untereinheit der Creatinkinase 2 in Treg ILT3^{pos} Treg entstanden. Das heisst ILT3^{pos} Treg korrelierten mit CK2-negativen Treg. CK2^{pos} Treg waren maßgeblich verantwortlich, um eine T-Helfer-2-Lymphozyten-vermittelte pulmonale antiallergische Reaktion hervorzurufen. ILT3-positive und somit CK2^{neg} Treg waren nicht in der Lage eine spezielle Untereinheit von dendritischen Zellen zu aktivieren, die für die eine T-Helfer-2-Lymphozyten-vermittelte antiallergische Reaktion verantwortlich ist (5).

2.3.1.5. Granzym A, CTLA4, CD39, CD44

Den folgenden Markern werden bedeutende Einflüsse bei der immunsuppressive Wirkung von Treg zugeschrieben: Velaga et al zeigten 2015, dass die Protease Granzym A eine Rolle in der Treg-vermittelten Verhinderung von akuter Darm-GVHD spielt (119). Der Knockout von Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (kurz CTLA4 oder CD152) schwächte im murinen Modell die supprimierende Immunantwort von Treg ab (120). Im humanen Modell wurde CD39 eine Rolle in der Verhinderung von Autoimmunkrankheiten durch Treg zugeschrieben (121). CD44^{pos} Treg konnten im murinen Modell eine höhere Suppressionsfähigkeit zeigen als CD44^{neg} Treg (122).

2.3.1.6. CD62L, CXCR3, CCR5, HLA-DR

Andere Marker spielen eine Rolle bei der zielgerichteten Wanderung von Treg (homing) oder mediierten den Zell-Zell-Kontakt, der unerlässlich für eine suffiziente Treg-Wirkung ist: Ermann et al. zeigten 2005, dass nur CD62L^{pos} Treg in der Lage waren eine schwere Darm-GVHD im Mausmodell zu verhindern, da sie fähig waren in die relevanten Gewebe (wie in dieser Studie den Darm) vorzudringen, was den CD62L^{neg} Treg nicht möglich war (123). Die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 sind in der Lage Einfluss auf das Rekrutieren von Treg zu nehmen: Oldham et al. beschrieben 2011, dass die beiden Rezeptoren Treg gezielt in die Bereiche von Nierenzellkarzinomen steuern können (124). In Bezug auf HLA-DR wurde beschrieben, dass HLA-DR^{pos} Treg eine höhere Genexpression aufweisen, die unter anderem für Zell-Kontakt-abhängige Proteine kodieren (125).

2.3.1.7. CD45RA

Die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 ist generell auf hämatopoetischen Zellen exprimiert. Bis dato sind verschiedene Isoformen bekannt, die durch alternatives Splicing entstehen, bekannt. CD45RA ist ein Marker, der zur Unterscheidung zwischen naiven T-Lymphozyten von Gedächtnis-T-Lymphozyten herangezogen werden kann, die CD45R0 tragen. Diese Unterscheidung lässt sich auch auf Treg beziehen (126).

2.3.1.8. Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR)

Der Oberflächenrezeptor GITR ist auch bekannt als Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18 (TNFRSF18) und activation- inducible TNFR family receptor (AITR) und ist Mitglied der sogenannten tumor necrosis factor receptor superfamily (127, 128). Shimizu et al. zeigten 2002, dass nach GITR-Stimulation in Treg deren Suppressionsfähigkeit abgeschwächt war und dass das Blockieren von GITR Autoimmunerkrankungen auslöst, was darauf hinweist, dass GITR eine wichtige Rolle in der Funktionsfähigkeit von Treg spielt (129). Bezüglich einer möglichen Bedeutung als therapeutisches Target wurden 2002 Daten von Krausz et al. veröffentlicht, die erhöhte Raten an GITR^{pos} Treg in Lymphknotenmetastasen von Brustkrebspatientinnen zeigten (130). Auch Cohen et al. untermauerten eine mögliche Bedeutung in der Anti-Tumor-Therapie indem sie zeigen konnten, dass der agonistisch wirkende anti-GITR-Antikörper DTA-1 in einem Melanom-Modell (B16 melanoma tumors) eine intratumorale Treg-Akkumulation verhindern konnte indem die Foxp3-Expression verhindert wurde (131). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Schaer et al.: Sie konnten zeigen, dass die Aktivierung GITR eine Destabilisierung und somit Funktionseinschränkung von Treg hervorrief und damit eine schädliche Wirkung von Treg auf die Anti-Tumor-Immunität abgeschwächt werden konnte (132).

2.3.2. Die Rolle von Treg bei der Entstehung einer GVHD

In bereits vielen Publikationen wurde bereits die Rolle von Treg bei der Entstehung von aGVHD und cGVHD diskutiert- es wurden verschiedenste Gründe und Mechanismen angeführt, warum Treg potentiell eine GVHD verhindern können, sich eine mögliche dahingehende Therapieoption aber nur teilweise in die klinische Praxis umsetzen lässt:

Einige Autorengruppen korrelierten die Rekonstitution von absoluten und relativen Treg-Mengen nach aHSZT mit der Entwicklung einer GVHD und konnten zeigen, dass niedrigere Treg-Frequenzen mit dem gehäuftten Auftreten und schwereren Stadien der GVHD korrelierten (133-135). Neben der Annahme, dass niedrigere Treg-Frequenzen die Entstehung einer GVHD begünstigen, beschreiben andere Autoren funktionelle Einschränkungen von Treg. Hierbei zeigten sich jedoch viele Kontroversen und uneinheitliche Ergebnisse- Noel et al. berichten sogar von erhöhter

Suppressionsfähigkeit der Treg von GVHD-Patienten (136). Daneben sollte der Immunsuppression und den Konditionierungsregimen und deren Einfluss auf die Rekonstitution von Treg Rechnung getragen werden: Scottà et al. untersuchten den Einfluss der Immunsuppressiva Tacrolimus, MMF und Methylprednisolon auf Treg und konnten zeigen, dass Phänotyp, Funktion und Stabilität dadurch nicht beeinflusst wurden (137). In Bezug auf Alemtuzumab beschrieben Havari et al. eine Vergrößerung der Treg-Population nach Inkubation von PBMC mit Alemtuzumab in vitro (138). Auch Zhang et al. beschrieben, dass nach Behandlung mit Alemtuzumab innerhalb der CD4^{pos} T-Lymphozyten-Population die Treg-Population vermehrt rekonstituierte, wobei hier Patienten mit Multipler Sklerose behandelt wurden (139). Vorarbeiten wurde zu diesem Thema auch in diversen murinen Studien geleistet: Unter anderem zeigten Nguyen et al. 2007 (140) und Hoffmann et al. 2002 (141), dass Treg in der Lage sind GVHD im murinen Modell zu unterdrücken.

2.3.2.1. Klinische Studien zur möglichen therapeutischen Nutzung von Treg

Um das Wissen um Treg und ihre Wirkung in Bezug auf eine GVHD ausnutzen zu können, gibt es bereits klinische Studien zur zellulären Treg-Therapie für Patienten mit GVHD (6). Nach ersten Hürden bei Foxp3-Verlust nach repetitiver in vitro Stimulation (89), entwickelten Petra Hoffmann und Matthias Edinger ein Konzept zur in vitro Expansion von Treg um daraus den Weg zur klinischen Anwendung bahnen zu können und ausreichend hohe Zellzahlen zu erhalten (142, 143). Es ist hier allerdings anzumerken, dass es Hinweise gibt, dass eine gezielte Treg-Therapie den GVL-Effekt abschwächt (8) und es daher auch klinische Studien gibt in denen gezielt Treg depletiert werden um den GVL-Effekt zu verstärken um bei refraktären Leukämien einen möglichst starken und effektiven GVL-Effekt zu erzielen (144).

2.4. Vorarbeiten

Im Jahr 2012 präsentierten Eva-Maria Wagner et al. auf dem ASH 2012 (Originaltitel: Functionally Altered GPI-Anchor Negative Treg Following Alemtuzumab-Based T-Cell Depletion Are Associated with Acute GVHD) und Lukas Schäfer et al. auf der DGHO 2012 (Originaltitel: Klinische Evidenz für Funktionell beeinträchtigte Treg nach Alemtuzumab-basierter allogener HSZT) Daten zur Rekonstitution $CD52^{neg}$ bzw $gpi\text{-Anker}^{neg}$ Treg nach Alemtuzumab-basierter TCD nach aHSZT im Rahmen eines Studienprotokolls (Interne Studiennummer: 177)

Sie konnten zeigen, dass Treg nach oben genanntem Konditionierungsregime zum Teil $CD52^{neg}$ rekonstituierten. Diese $CD52^{neg}$ Treg exprimierten zum Großteil auch keinen $gpi\text{-Anker}^{neg}$ und der Anteil der $CD52^{neg}$ Treg korrelierte mit dem Auftreten einer aGVHD (siehe Abbildung 2).

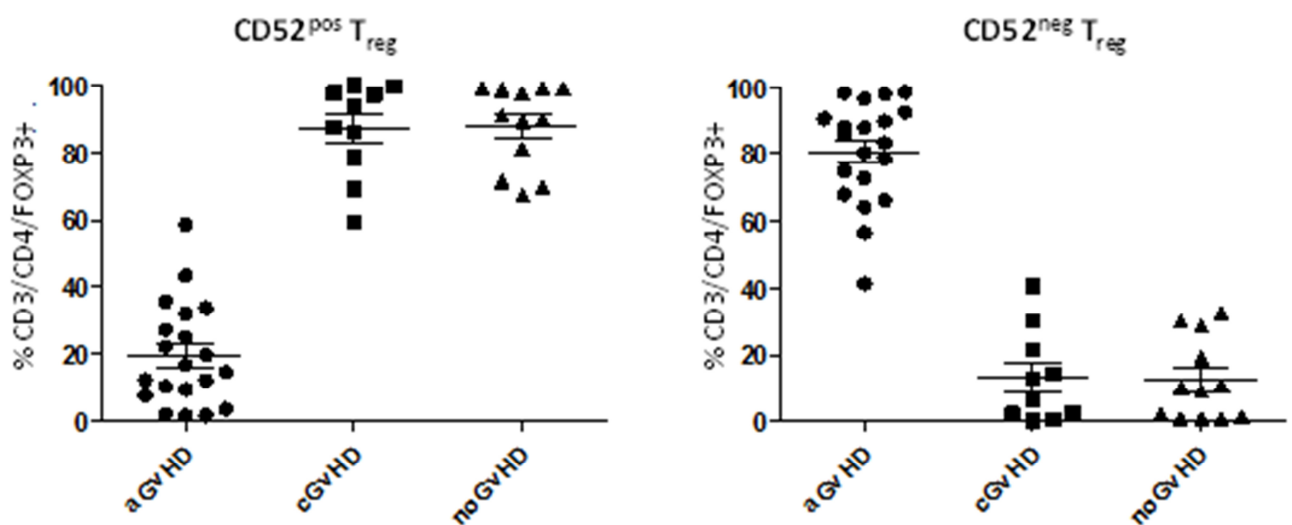


Abbildung 2: Korrelation zwischen dem Auftreten einer aGVHD und $CD52^{neg}$ Treg (Originalabbildung aus Functionally Altered GPI-Anchor Negative Treg Following Alemtuzumab-Based T-Cell Depletion Are Associated with Acute GVHD von Eva-Maria Wagner, ASH 2012)

Des Weiteren wurde beschrieben, dass nur $CD52^{pos}$ Treg den Aktivierungsmarker GARP exprimieren und dass $CD52^{neg}$ T-Lymphozyten eine verminderte CMV-spezifische T-Lymphozyten-Antwort zeigen (eigene Daten, unpubliziert).

Ebenfalls bestätigte Katharina Epp auf der DGHO 2014 diese Erkenntnisse in ihrem Vortrag „Functionally altered GPI-anchor negative regulatory T cells in patients with

acute GVHD after Alemtuzumab based conditioning regimen“ und konnte zeigen, dass CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression der vorbeschriebenen Treg-Marker CD39, CD44, GITR, CXCR3, CCR5, CTLA-4, und Granzym A aufwiesen.

3. Material und Methoden

3.1. Humane Proben

3.1.1. Patientenblut

Die zugrundeliegenden Daten dieser Promotionsschrift stammen aus Experimenten mit Geweben, die aus menschlichem Vollblut gewonnen wurden. Insgesamt wurden 30 Patienten, die an der 3. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz allogene Stammzelltransplantiert wurden, nach aHSZT jeweils 40ml Vollblut und 10 ml Serum zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb der Transplantationsnachsorge abgenommen und weiterverarbeitet. Die Blutabnahme erfolgte falls vorhanden aus zentralen Venenkathetern bei stationären Aufenthalten in der 3. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz und ansonsten aus peripheren Venen im Rahmen von Routinelaborkontrollen in der KMT-Ambulanz der 3. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz. Alle Patienten haben vor der Blutentnahme nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung durch die Ärzte des KMT-Teams der Blutentnahme und wissenschaftlichen Untersuchung ihrer Immunzellen im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie (#808; „Untersuchungen zur Rekonstitution des Immunsystems in Patienten nach Stammzelltransplantation“ [837.185.00 (2551)] Antrag Prof. Dr. Huber, Prof. Dr. Wölfel, PD Dr. Herr, Dr. R. G. Meyer) zugestimmt.

3.1.2. Buffy-Coats

Zur Etablierung der Methoden und zur Erstellung gesunder Vergleichsproben wurden Gewebe aus menschlichen Buffy-Coats (BC) isoliert und verarbeitet. Diese wurden freundlicherweise von der Klinik für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt. BCs, auch als Leukozytenfilm bezeichnet, ist die Grenzschicht zwischen Erythrozyten und Plasma, die entsteht, wenn Vollblut mit Gerinnungshemmern versetzt wird und anschließend sedimentiert oder zentrifugiert wird. BCs bestehen hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten. Für diese Arbeit wurden BCs von 11 gesunden Blutspendern der Transfusionszentrale verwendet (Siehe Tabelle 4).

BC 1703938
BC 1530828
BC 1733411
BC 1727359
BC 1725422
BC 1702525
BC 1635098
BC 1724276
BC 1724270
BC 1727356
BC 1727735

Tabelle 4: Interne Nummern der verwendeten Buffy-Coats.

3.1.3. Patientenliste

Im Folgenden liegt eine Liste vor, die jedem Patienten, dessen Daten in dieser Promotionsschrift verwendet wurden, eine Nummer zuordnet, das Alter, die Erkrankung, das Konditionierungsregime, die Tage nach aHSZT angibt und ob ein Patient eine akute, chronische oder keine GVHD hatte (siehe Tabelle 5).

Patient	Alter	Erkrankung	Konditionierung	Tag nach Tx	GVHD
1	72	AML	Camp/ Flud/ Mel	126	akute
2	65	MM	Camp/ Flud/ Mel	199	akute
3	58	T-NHL	Camp/ Flud/ Mel	104	akute
4	68	AML	Camp/ Flud/ Mel	140	akute
5	31	DLBCL	Camp/ Flud/ Mel	84	akute
6	70	AML	Camp/ Flud/ Mel	117	akute
7	57	DLBCL	Camp/ Flud/ Mel	55	akute
8	63	MDS	Camp/ Flud/ Mel	157	akute
9	57	CML	Camp/ Flud/ Mel	95	akute
10	57	AML	Camp/ Flud/ Mel	155	akute
11	57	MM	Camp/ Flud/ Mel	341	akute
12	63	CMML	Camp/ Flud/ Mel	202	chronische
13	48	MM	Camp/ Flud/ Mel	364	chronische
14	70	sekMF	Camp/ Flud/ Mel	694	chronische
15	43	AML	Camp/ Flud/ Mel	94	chronische
16	72	AML	Camp/ Flud/ Mel	135	keine
17	64	MPN	Camp/ Flud/ Mel	221	keine
18	53	MM	Camp/ Flud/ Mel	140	keine
19	59	MM	Camp/ Flud/ Mel	136	keine
20	66	B-NHL	Camp/ Flud/ Mel	558	keine
21	36	AML	Bu/Cy	833	chronische
22	55	MDS	Flu/ BCNU/ Mel/ ATG	534	akute
23	47	MDS/MPN	FBM/ATG	145	keine
24	69	atyp CML	Mel/Flud/ATG/TBI	142	keine
25	51	Pro-B-ALL	TBI/ Flu/ ATG	201	cGVHD
26	48	AML	Thio/ Flu/Treo/ATG	244	chronische
27	66	MDS	Flu/ Treo/ ATG	664	chronische
28	32	B-ALL	TBI/Cy	3391	chronische
29	55	AML	FBM/ATG	234	akute
30	60	AML	FBM/ATG	191	akute

Tabelle 5: Patientenliste mit Nummer, Alter, Erkrankung, Konditionierungsregime, Zeitpunkt der Probenabnahme, Art der GVHD.

3.1.4. Materialgewinnung/ Aufbewahrung

3.1.4.1. Definition und Gewinnung von Mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Englisch: Peripheral Blood Mononuclear Cells, oder kurz: PBMC) sind einkernige Zellen aus dem peripheren Blut mit rundem Zellkern also vor allem Lymphozyten und Monozyten.

Aus PB oder BCs wurden die PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wird das Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer „Ficoll“ verwendet- dieses ist ein Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin (145).

Um PBMC isolieren zu können, wurde wie folgt nach Herstellerangaben gearbeitet (Ficoll-Medium: Histopaque 1077 von Sigma- Aldrich): Dazu wurden LeucoSep-Röhrchen mit 15 ml Ficoll-Medium beladen und bis zu 35 ml PB (suspendiert mit PBS plus EDTA) vorsichtig auf das Ficoll-Medium pipettiert, ohne dass sich beide Materialien vermischen. Nach Zentrifugation bei 1000 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse befanden sich die PBMC in der Phase oberhalb des Ficoll-Mediums und konnten mit einer Pipette abgenommen werden. Danach wurden sie dreimal mit PBS plus EDTA gewaschen. Anschließend wurden die PBMC mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt (Protokoll/ Formel im Anhang: Zellen zählen) und kryokonserviert oder weiterverarbeitet wurden (siehe Abbildung 3). (Protokoll siehe Anhang: FICOLL-Separationen).

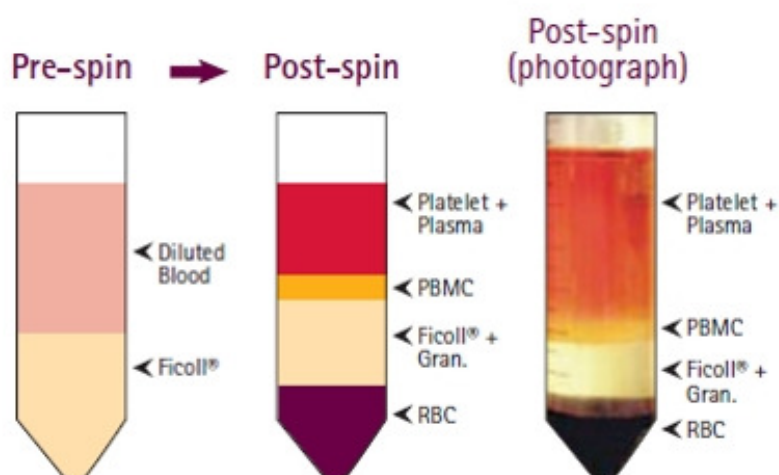


Abbildung 3: Graphische Darstellung Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Medium übernommen aus: <https://dublinlisacoolsaet.wordpress.com/2013/05/03/pbmc-fasen/> (08.05.2018)

3.1.4.2. Einfrieren von Mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die gewaschenen PBMC wurden in Portionen bis zu 50 Mio in 1ml Einfriermedium (60% X-Vivo, 40% ml HSA, 2500 U Heparin) +10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in beschrifteten 2ml-Nuncs zunächst für 3 Tage bei -80°C eingefroren und danach in den -196°C Stickstofftank überführt. (Protokoll siehe Anhang: Zellen einfrieren)

3.1.4.3. Auftauen von Mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Um eingefrorene PBMC zu bearbeiten, wurden diese aus dem Stickstofftank geholt und rasch im 37°C-Wasserbad aufgetaut und noch im möglichst kalten Zustand einmal in PBS plus EDTA gewaschen und anschließend. (Protokoll siehe Anhang: Zellen auftauen).

3.1.4.4. Definition und Gewinnung von Serum

Als Blutserum oder Serum bezeichnet man den flüssigen Teil des Blutes nach abgeschlossener Blutgerinnung. Das heisst es ist frei von Fibrinogen und enthält hauptsächlich Wasser, Proteine (vor allem Albumin) und Elektrolyte. Zur Gewinnung wird Vollblut in Serumröhrchen abgenommen und bei 3500rpm für 10 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand über dem Koagel entspricht dem Serum und kann abpipettiert und eingefroren oder direkt weiterverarbeitet werden. (Protokoll siehe Anhang: Gewinnung von Serum)

3.1.4.5. Einfrieren von Serum

Das Serum wurde zum Einfrieren in Portionen von je 1-2ml in beschriftete 2ml-Nuncs überführt und bei -80° eingefroren. (Protokoll siehe Anhang: Einfrieren von Serum)

3.1.4.6. Auftauen von Serum

Zum Weiterverarbeiten wurde das eingefrorene Serum aus dem -80°C-Gefrierschrank geholt und bei Raumtemperatur oder im 37°C-Wasserbad aufgetaut. (Protokoll siehe Anhang: Auftauen von Serum)

3.2. Durchflusszytometrie und durchflusszytometrische Tests

3.2.1. Definition der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (umgangssprachlich auch FACS (englisch: fluorescence activated cell sorting) genannt) wird verwendet um verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer morphologischer Eigenschaften (Größe, Struktur) und zellspezifischen Oberflächenantigene oder intrazellulärer Antigene zu quantifizieren und zu charakterisieren. Im Durchflusszytometer wird eine Zellsuspension durch hydrodynamischen Druck und mit Hilfe von Mantelflüssigkeit durch einen Messzylinder gepresst. Die Zellen passieren dann Laser unterschiedlicher Wellenlängen. Das Licht der Laser wird dadurch gestreut und von Detektoren erkannt. Dabei ist die Vorwärtslichtstreuung (forward scatter, FSC) ein Anhalt für die Größe der Zellen und die Seitwärtslichtstreuung (sideward scatter, SSC) für die Granularität der Zellen. Um charakteristische Antigene der Zellpopulationen nachzuweisen, werden die Zellsuspensionen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Ak) gegen das nachzuweisende Antigen versetzt. Ein solches Antigen kann sich direkt auf der Zelloberfläche befinden oder auch im Zellinneren verborgen sein wie es unter anderem bei Transkriptionsfaktoren der Fall ist. Bei intrazellulären Antigenen kann es nötig sein eine Zelle für das mögliche Eindringen von Antikörpern mit dafür geeigneten Substanzen durchlässig zu machen. Durch die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (unter anderem: FITC, PE, APC, V450, APC-H7, PE-CY7) kann man in einer Zellsuspension mehrere Antigene gleichzeitig untersuchen und quantifizieren. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden von den Lasern angeregt und emittieren Licht mit einer charakteristischen Wellenlänge, die gemessen wird. Die von den Detektoren erfassten Signale werden dann digitalisiert und mit einer geeigneten Software analysiert (146, 147).

3.2.2. Antikörper für Durchflusszytometrie

In diesem Forschungsprojekt wurden Oberflächen-Antikörper für IgG, CD3, CD4, CD8, CD25, CD127, CD52, GARP, ILT3, CD39, CD44, CXCR3, HLA-DR, GITR und CD62L verwendet. Außerdem wurden intrazelluläre Antikörper für Foxp3, HELIOS, CCR5, CTLA4 und Granzym A verwendet sowie Carboxyfluorescein Succinimidyl-Ester (CFSE). Tabelle 6 gibt alle verwendeten Antikörper mit Spezies, Fluorochrom, Klon und Firma an:

Antikörper	Spezies	Fluorochrom	Klon	Firma
IgG	mouse	PE	SK7	BD
IgG	mouse	FITC	679.1 Mc	Beckmann Coulter
IgG	mouse	APC	679.1 Mc 7	Beckmann Coulter
IgG	mouse	V450	MOPC-21	BD
IgG	mouse	APC-H7	MOPC-21	BD
IgG	mouse	PE-Cy7	MOPC-21	BD
CD3	mouse	FITC	UCHT 1	Beckmann Coulter
CD3	mouse	PE	UCHT 1	Beckmann Coulter
CD3	mouse	APC	UCHT 1	Beckmann Coulter
CD3	mouse	V450	SP 34-2	BD
CD3	mouse	APC-H7	SK7	BD
CD3	mouse	PE-Cy7	SK7	BD
CD127	mouse	FITC	eBio RDR 5	eBioscience
Foxp3	mouse	FITC	PCH 101	eBioscience
CD52	mouse	PE	YTH 34.5	Serotec
CD8	mouse	APC	B 9.11	Beckmann Coulter
GARP	mouse	APC	G14 D9	eBioscience
HELIOS	mouse	APC	22F6	eBioscience
ILT3	mouse	APC	ZM4.1	Invitrogen
CD25	mouse	V450	M-A251	BD
CD4	mouse	APC-H7	RPA-T 4	BD
CFSE		FITC		ThermoFisher
CD39	mouse	APC	TU 66	BD
CD44	rat	APC	IM7	BioLegend
CD62L	mouse	APC	DREG56	BD
CD45RA	mouse	APC	T6D11	Miltenyi
CTLA4	mouse	APC	L3D10	BioLegend
GITR	mouse	APC	621	BioLegend
HLA-DR	mouse	APC	G45-6	BD
CXCR3	mouse	APC	1C6/CXCR3	BD
CCR5	mouse	APC	E11/19	Biolegend
Granzyme A	mouse	APC	CB9	Biolegend
FLAER		FITC		Biozol
OKT3				eBioscience

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper mit Spezies, Fluorochrom, Klon und Hersteller.

3.2.3. Gerät (Durchflusszytometrie)

Alle durchflusszytometrischen Messungen außer den weiter unten aufgeführten FACS-Sorts für Suppressionstests wurden an einem BD FACS Canto II durchgeführt. Die dazu verwendete Software war BD FACS Diva.

3.2.4. Protokolle der Färbung (Durchflusszytometrie)

Die Protokolle zur Durchführung der Oberflächenfärbung und intrazellulären Färbung für Foxp3/ HELIOS sowie für CCR5, CTLA4, Granzyme A befinden sich im Anhang unter „FACS-Färbung“, „Foxp3/ HELIOS-FACS-Färbung“ sowie „Intrazelluläre FACS-Färbung für CCR5, CTLA4, Granzyme A“.

3.2.5. Durchflusszytometrische Pannels und Strategien zur Testung verschiedener Marker und Einflussgrößen von Treg

Im Folgenden werden die verschiedenen in diesem Forschungsprojekt verwendeten durchflusszytometrischen Pannels und Strategien zur Testung verschiedener Marker und Einflussgrößen von Treg dargestellt und erläutert:

3.2.5.1. CD52-Screening mit Treg-Markern bei Patientenproben nach Alemtuzumab-basierte T-Zell-Depletion

Um Treg identifizieren zu können, wurden PBMC auf CD3, CD4, CD25 und CD127 beziehungsweise Foxp3 gefärbt und bei Patienten, die eine Alemtuzumab-basierte TCD erhielten, zusätzlich noch auf CD52 gefärbt. Außerdem wurden die Marker, GARP, ILT3 und HELIOS gefärbt um deren Expression auf und beziehungsweise in Treg identifizieren zu können (siehe Tabelle 7):

Tube/ Fluorochrom	FITC	PE	APC	V450	APC-H7	PE-CY7
IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
CD3 FITC (Komp)	CD3					
CD3 PE (Komp)		CD3				
CD3 APC (Komp)			CD3			
CD3 APC-H7 (Komp)					CD3	
CD3 PE-Cy7 (Komp)						CD3
PBMC (T-Zellen)		CD52	CD8		CD4	CD3
PBMC (CD127)	CD127	CD52	GARP/ ILT3	CD25	CD4	CD3
PBMC (Foxp3)	Foxp3	CD52	HELIOS	CD25	CD4	CD3

Tabelle 7: Treg-Pannel für Patientenproben, die eine Alemtuzumab-basierte TCD erhalten haben.

3.2.5.2. Screening der Expression von Treg-Marker nach Inkubation mit Immunsuppressiva in vitro

Um den Einfluss von Kortikosteroiden und CSA auf die Expression von Treg-Markern zu untersuchen, inkubierten wir PBMC von einem BC für 24h in T-Zell-Medium (90% AIM und 10% gepooltes humanes Serum) in unten aufgeführten Konzentrationen mit Prednisolon und CSA sowie ohne eine der beiden Substanzen und maßen anschließend durchflusszytometrisch die Expression verschiedener Treg-Marker.

- 1) PBMC+10ml T-Zell-Kultur-Medium+ Prednisolon 10mg total
- 2) PBMC+10ml T-Zell-Kultur-Medium+ 2ug CSA total
- 3) PBMC+10ml T-Zell-Kulturmedium ohne Zusatz

Die Auswertung der Expression der Treg-Marker erfolgte nach folgendem Pannel (Tabelle 8):

Name	Tube	Fitc	PE	APC/AlexaFluor	V450	APC-H7	PE-Cy7
IgG Kontrolle	1	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
Kompensation	2	CD3					
Kompensation	3		CD3				
Kompensation	4			CD3			
Kompensation	5					CD3	
Kompensation	6						CD3
CD39	7	Foxp3	CD52	CD39	CD25	CD4	CD3
CD44	8	Foxp3	CD52	CD44	CD25	CD4	CD3
GARP	9	Foxp3	CD52	GARP	CD25	CD4	CD3
CD62L	10	Foxp3	CD52	CD62L	CD25	CD4	CD3
CD45RA	11	Foxp3	CD52	CD45RA	CD25	CD4	CD3
CTLA4/CD152 (izl)	12	Foxp3	CD52	CTLA4/CD152	CD25	CD4	CD3
ILT3	13	Foxp3	CD52	ILT3	CD25	CD4	CD3
GITR	14	Foxp3	CD52	GITR	CD25	CD4	CD3
HLA-DR	15	Foxp3	CD52	HLA-DR	CD25	CD4	CD3
CXCR3	16	Foxp3	CD52	CXCR3	CD25	CD4	CD3
HELIOS (izl)	17	Foxp3	CD52	Helios	CD25	CD4	CD3
Granzyme A (iz)	18	CD127	CD52	Granzyme A	CD25	CD4	CD3
CCR5 (iz)	19	CD127	CD52	CCR5	CD25	CD4	CD3
T-Zell- Zusammensetzung	20	CD52	CD19	CD8		CD4	CD3

Tabelle 8: Pannel zur Testung von Treg Markern nach Inkubation von Treg mit Prednisolon oder CSA.

3.2.5.3. Screening der Expression von GARP in Treg nach Stimulation von PBMC von Patientenproben nach Alemtuzumab-basierter T-Zell-Depletion in vitro

Um die GARP-Expression in stimulierten Treg untersuchen zu können-insbesondere zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg- inkubierten wir PBMC von Patienten nach Alemtuzumab-basierter TCD für 24 Stunden in T-Zell-Medium (90% AIM und 10% gepooltes humanes Serum) + IL2 (100U/ml T-Zell-Medium) und OKT3 (30ug/ml T-Zell-Medium) und maßen durchflusszytometrisch die GARP-Expression nach 0 und 24 Stunden.

Die Auswertung der GARP-Expression erfolgte nach folgendem Pannel (Tabelle 9):

Name	Tube	Fitc	PE	APC/AlexaFluor	V450	APC-H7	PE-Cy7
IgG Kontrolle	1	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
Kompensation	2	CD3					
Kompensation	3		CD3				
Kompensation	4			CD3			
Kompensation	5					CD3	
Kompensation	6						CD3
GARP	7	Foxp3	CD52	GARP	CD25	CD4	CD3

Tabelle 9: Pannel zur Testung der GARP-Expression von Treg vor und nach Stimulation.

3.2.6. Computergestützte Auswertung der durchflusszytometrischen Tests

Die Rohdaten der durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit dem PC-Programm FlowJo (Version 7.6.4., Firma FlowJo) ausgewertet.

3.3. Suppressionstests

3.3.1. Definition und Grundlagen

In sogenannten „Suppressionstests“ soll die Suppressionsfähigkeit von Treg objektiviert werden. Dafür werden zuvor isolierte Treg zusammen mit sogenannten Effektor-T-Lymphozyten (Teff) wie zum Beispiel PBMC oder auch CD25-depletierte PBMC in speziellen Medien inkubiert und mit Substanzen stimuliert, die T-Lymphozyten zur Proliferation anregen. Wie weiter oben beschrieben haben Treg die Fähigkeit die Immunhomöostase aufrechtzuerhalten, indem sie die Proliferation von anderen Lymphozyten hemmen. Misst man die Proliferationsrate der Teff, die mit Treg inkubiert wurden, nach einer bestimmten Zeit, so proliferieren diese Teff bei funktionstüchtigen Treg weniger als Teff, die ohne Treg, also alleine, inkubiert und stimuliert wurden oder mit einer geringeren Anzahl an Treg inkubiert und stimuliert wurden. Es sollte also auch ein titrationsabhängiger Effekt zu beobachten sein. Ein solches Protokoll zur funktionellen Testung von Treg wurde unter anderem von Tran DQ vorgeschlagen (148). In einem solchen Modell ist es potentiell möglich diverse Subgruppen von Treg und Teff zu untersuchen. Es kann zum Beispiel der Einfluss von Treg auf zytotoxische T-Lymphozyten alleine untersucht werden, indem gezielt diese Lymphozytenart isoliert und mit Treg inkubiert wird. Auf der anderen Seite können auch bestimmte Treg-Subgruppen untersucht werden, die einen bestimmten Marker tragen. Dazu ist es nötig geeignete Verfahren zu wählen, um die gewählten Subgruppen von Zielzellen isolieren zu können. Hierbei können verschiedene Sortiermethoden zum Einsatz kommen:

Zum einen ist es möglich über mit Magneten gekoppelten Antikörpern, sogenannte MicroBeads, gewisse Zielantigene auf Zellen zu binden. Lässt man die Zellsuspension durch geeignete mit Magneten versehene Röhrchen laufen, so bleiben die Zellen, die den mit Magneten gekoppelte Antikörper gebunden haben in den magnetischen Röhrchen hängen, während der Teil der Zellsuspension, der nicht das gewünschte Antigen trägt, durch das Röhrchen durchläuft. Der im Röhrchen verbleibende Teil der Zellsuspension kann dann nach Entfernung des Magneten isoliert werden. Eine der heute bekanntesten Methoden ist das „Magnetic Activated Cell Sorting“ (kurz: MACS), das 1990 von Miltenyi et al. erstmals publiziert wurde (149).

Zum anderen ist es möglich Durchflusszytometrie- basiert Zellpopulationen zu sortieren, an die keine MicroBeads, sondern gewöhnliche durchflusszytometrische

Antikörper gebunden sind. Auch wenn FACS bereits die Abkürzung für „fluorescence activated cell sorting“ ist, werden beim klassischen FACS keine Zellen sortiert, sodass sie danach weiterverwendet werden können, sondern nur über ein komplexes maschinelles und PC-gestütztes System graphisch dargestellt. Daher ist der Begriff „FACS“ meist falsch verwendet und es sollte prinzipiell nur von einer Durchflusszytometrie gesprochen werden, was jedoch umgangssprachlich meist zusammengewürfelt wird. Die „Methode FACS“ ist eine Durchflusszytometrie-basierte Methode verschiedene Zellpopulationen auseinanderzusortieren und danach zur Weiterverwendung vorliegen zu haben (150). Diese Methode wurde 1969 von Hulett et al. erstmals beschrieben (151). Dabei werden Zellen, die mit den gewünschten Antikörpern versehen wurden durch ein geeignetes FACS-Gerät geschleust. Dabei befindet sich jede Zelle in einem Tropfen, der elektrisch aufgeladen wird. Die elektrische Ladung ist abhängig von den auf der Zelle gebundenen Antikörpern. Sogenannte „deflection plates“ ziehen die Zellen dann an oder stoßen diese ab je nach elektrischer Ladung und die verschiedenen Zellpopulationen können dann in verschiedene Röhrchen sortiert werden. Dazu siehe Abbildung 4:

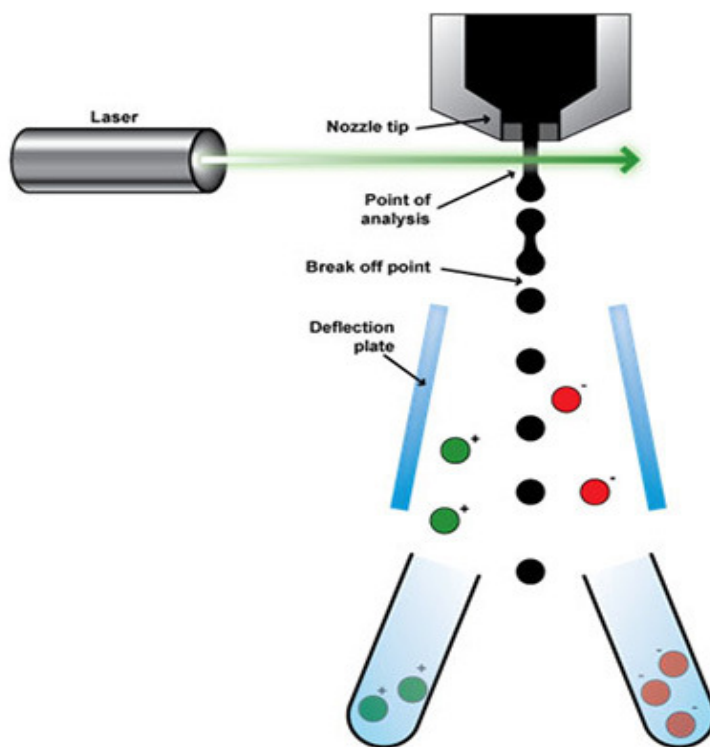


Abbildung 4: Prinzip der Zellsortierung mittels FACS aus <http://www.abcam.com/protocols/fluorescence-activated-cell-sorting-of-live-cells> (08.05.2018)

Um Treg zu isolieren, sind sowohl MACS als auch FACS möglich- der Versuch eine der beiden Methoden als effektiver oder sicherer zu identifizieren erbrachte bis dato keinen klaren Vorteil für eine der beiden Methoden (152).

Nun sei noch diskutiert inwieweit es möglich ist die Proliferation von Treg sichtbar zu machen oder zu messen und somit zu objektivieren: Carboxyfluorescein Succinimidyl- Ester (kurz: CFSE) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch die Zellmembran diffundieren kann und intrazellulär Moleküle binden kann (153). Die Fluoreszenzstärke kann durchflusszytometrisch gemessen werden. Teilt sich eine Zelle, so ist in den beiden Tochterzellen noch die Hälfte der Fluoreszenzstärke der Mutterzelle messbar und in deren vier Tochterzellen jeweils 25% der Fluoreszenzstärke der Mutterzelle und so weiter. Zuvor mit CFSE gefärbte Lymphozyten, die gar nicht proliferiert haben, behalten also ihre Fluoreszenzstärke (siehe Abbildung 5). Über diese Methode ist es möglich zu vergleichen welche Lymphozyten unter bestimmten Bedingungen wie stark proliferiert haben.

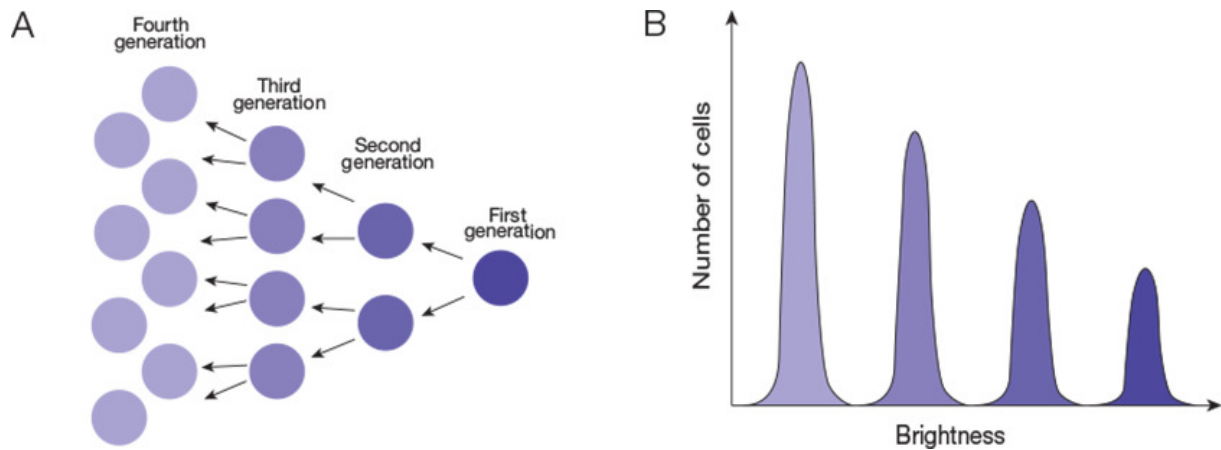


Abbildung 5: Prinzip der Fluoreszenzabnahme nach CFSE-Färbung bei Zellteilung übernommen aus <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/newsletters-and-journals/bioprobables-journal-of-cell-biology-applications/bioprobables-73/bioprobables-73-cell-proliferation-generational-tracing.html> (08.05.2018).

In diesem Forschungsprojekt wurden zur Durchführung von Suppressionstests „FACS-gesortete“ (Protokoll: siehe Anhang „FACS-Sort“) oder MACS-isolierte Treg (Protokoll: siehe Anhang „MACS-Isolation von Treg mittels Säulen“) im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8 mit Teff in einem T-Zell-Medium, bestehend aus AIM V und hitzeinaktiviertem, gepooltem Serum von gesunden Spendern und inkubiert und die Proliferation der Teff nach 5 Tagen durchflusszytometrisch gemessen. Als Teff wurden PBMC verwendet. Den Versuchsansätzen wurde IL2 (100U/ml T-Zell-Medium) und OKT3 (30ug/ml) zugesetzt, um die Treg und die Proliferation der Teff zu stimulieren. Nach 5 Tagen wurden die Versuchsansätze über durchflusszytometrische Messung ausgewertet und die Proliferation der CFSE-gefärbten PBMC anhand CD8^{pos} T-Lymphozyten bestimmt (Protokoll: siehe Anhang: Suppressionstest).

3.3.2. Suppressionstests zur Bestimmung der Suppressionsfähigkeit von Treg-Subgruppen unter verschiedenen Einflussgrößen

Im Folgenden werden die verschiedenen Versuchsansätze bezüglich Suppressionstests dargestellt und erläutert:

3.3.2.1. Suppressionstests zur Unterscheidung der Suppressionsfähigkeit von CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg

Um die Suppressionsfähigkeit von CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg messen und vergleichen zu können, wurden aus den PBMC vom selben Patienten CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg isoliert und mit gesunden Teff inkubiert. Die Menge an proliferierten Teff der beiden Versuchsansätze wurde dann deskriptiv miteinander verglichen. Daneben wurde die Proliferationsrate von Teff alleine ohne Treg nach 5 Tagen gemessen, um eine generelle Proliferation der Teff zeigen zu können. Die höchste Anzahl an Treg konnte erreicht werden, wenn aus Patienten-PBMC zunächst MACS-basiert CD3^{pos}CD4^{pos} PBMC isoliert wurden und anschließend CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg per FACS-Sort von einander getrennt wurden.

3.3.2.2. Suppressionstests zur Unterscheidung der Suppressionsfähigkeit von Patienten-Treg unabhängig vom Konditionierungsregime im Vergleich zu Treg von gesunden Kontrollpersonen

Um die Suppressionsfähigkeit zwischen Patienten-Treg und Treg von gesunden Kontrollpersonen unabhängig vom Konditionierungsregime messen und vergleichen zu können, wurden Treg aus den PBMC von Patienten und den PBMC aus BCs isoliert und mit gesunden Teff eines anderen BCs inkubiert. Die Menge an proliferierten Teff der beiden Versuchsansätze wurde dann deskriptiv miteinander verglichen. Daneben wurde die Proliferationsrate von Teff alleine ohne Treg nach 5 Tagen gemessen, um eine generelle Proliferation der Teff zeigen zu können. In diesen Ansätzen war es ausreichend Treg MACS-basiert und ohne FACS-Sort zu isolieren.

3.3.2.3. Suppressionstests zur Testung des Einflusses von Patientenserum auf die Proliferation von Teff und Suppressionsfähigkeit von Treg

Um die Rolle von Patientenserum auf die Proliferation von Teff bzw die Suppressionsfähigkeit von Treg zu untersuchen, wurde ein T-Zell-Medium aus AIM IV (90%) und Patientenserum (10%) hergestellt und die Teff und Treg mit diesem T-Zell-Medium inkubiert und stimuliert. Um den Einfluss einer Hitzeinaktivierung des Serums zu untersuchen, wurde zum einen mit hitzeinaktivierten Patientenseren und zum anderen mit nativen Patientenseren gearbeitet (Protokoll: siehe Anhang: Hitzeinaktivierung von Serum). Neben Suppressionstests wurde in einem anderen Test nur der Einfluss von Patientenserum auf die Proliferation von Teff untersucht unabhängig von Treg.

3.3.2.4. Suppressionstests zur Testung der Rolle von immunsuppressiven Medikamenten auf die Suppressionsfähigkeit von Treg

Um die Rolle von immunsuppressiven Medikamenten auf die Suppressionsfähigkeit von Treg zu testen, wurden Treg aus BCs für 24 Stunden mit Dexamethason, Tacrolimus und beiden Medikamenten inkubiert, anschließend gewaschen und dann wie oben beschrieben mit gesunden Teff für 5 Tage inkubiert. Bezüglich der Konzentration der Immunsuppressiva wurde sich an der LD50 (Englisch für: mittlere letale Dosis) aus dem Artikel „Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells“ von Scotta C et al. orientiert. Es wurden daher Konzentrationen von 0,5µg/ml für Dexamethason und 2ng/ml für Tacrolimus verwendet (137).

3.3.3. Auswertung der Suppressionstests

Nach 5 Tagen wurde die Zellsuspension in FACS-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch gefärbt (CD3-V450, CD8-APC, zuvor: CFSE-FITC). Die Gatingstrategie ist in Abbildung 6 dargestellt: Es wurden zunächst ein Lymphozytengate gesetzt und anschließend die CD3^{pos}CD8^{pos} PBMC dargestellt und deren CFSE-Fluoreszenzstärke gemessen, zum einen im Darstellungsmodus „pseudocolour“ und zum anderen als Histogramm. Die Ergebnisse wurden dann mittels Histogrammen dargestellt und deskriptiv verglichen.

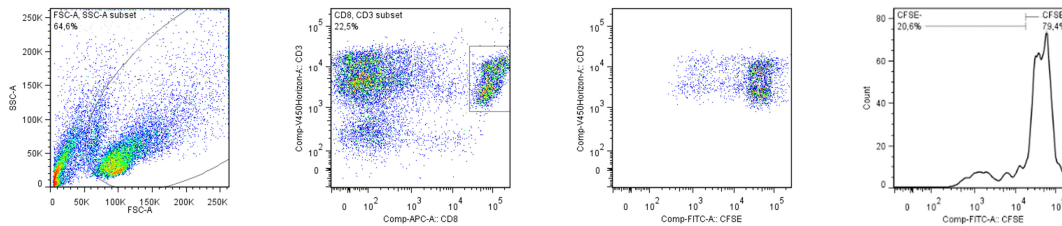


Abbildung 6: CD8-basierte Gating-Strategie für die Analyse der Teff-Proliferation nach CFSE-Färbung

3.4. Molekularbiologische Methoden

Um mehr Verständnis über mögliche Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg auf molekularer Ebene zu erlangen, wurden Analysen der Genexpression in beiden Subgruppen durchgeführt

3.4.1. Grundlagen der Nukleinsäuren-Sequenzierung

Der Begriff Sequenzierung bezeichnet die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem Desoxyribonukleinsäure (DNS)- oder Ribonukleinsäure (RNS)-Molekül (154). Nukleotide sind aufgebaut aus einer der fünf Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T) oder Uracil (U), einem Zuckermolekül (Ribose für die RNS oder Desoxyribose für die DNS) und einem Phosphat-Molekül. In der RNS kommen die Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil vor und in der DNS die Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin. Komplementär sind jeweils die Basenpaare A-T, beziehungsweise A-U und G-C. Spezifische Nukleotid-Abfolgen in den Exons (kodierende Abschnitte) der DNS, die für ein bestimmtes Protein kodieren, werden als Gen bezeichnet. Damit aus den Informationen, die in der DNS gespeichert sind, ein funktionsfähiges Protein entsteht, ist ein Vorgang nötig, den man als Proteinbiosynthese bezeichnet: Die DNS in eukaryotischen Zellen liegt gebunden in den verschiedenen Chromosomen des Zellkerns vor. Zunächst wird aus der doppelsträngigen DNS nachdem diese über verschiedene Mechanismen „ablesbar“ gemacht wurde die einzelsträngige RNS „abgeselen“ (Transkription). Dieser Prozess findet bei eukaryotischen Zellen im Zellkern statt. In verschiedenen Schritten, die als posttranskriptionale Modifikation bezeichnet werden, wird die sogenannte Messenger-RNS (mRNS) stabilisiert. In der daraufhin folgenden Translation versteht

man die Übersetzung der Basensequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz des Proteins. Dieser Schritt geschieht an den Ribosomen (155).

Die beiden „klassischen“ Methoden aus den 1970er Jahren von Maxam und Gilbert (basenspezifische chemische Spaltung der DNS) (156) beziehungsweise von Sanger (Kettenabbruch-Synthese) (157) waren die Vorläufer der modernen Methoden der DNS-Sequenzierung. Heute ist eine Reihe von Methoden verfügbar um schnell und effizient Informationen aus dem Erbgut zu entschlüsseln. Da die DNS in allen Zellen des gesunden menschlichen Körpers identisch ist, ist es von großem Interesse nicht nur die DNS und die in ihr kodierten Gene zu untersuchen, sondern auch das sogenannte Expressionsmuster von Genen. Je nach Bedarf und abhängig von Umwelteinflüssen werden in bestimmten Situationen Gene abgelesen oder auch nicht. Das heißt, um Informationen über die Genexpression zu erhalten, die Auskunft über diverse zelluläre Vorgänge wie beispielsweise Stoffwechselprozesse, die die Zelle an äußere Einflüsse anpassen, ist es notwendig das Profil der RNS-Transkription zu untersuchen also eine Genexpressionsanalyse durchzuführen.

3.4.1.1. RNS-Sequenzierung und Genexpressionsanalyse

Bei der Genexpressionsanalyse können sowohl qualitative Aspekte als auch quantitative Aspekte untersucht werden: Fragen nach qualitativen Aspekten können beispielsweise davon handeln, ob ein bestimmtes Gen unter gewissen Bedingungen überhaupt exprimiert wird und falls ja in welchen Zellen. Quantitative Analysen beschäftigen sich vor allem mit der Stärke der Genexpression. Hierbei kann es interessant sein zu erfahren inwieweit die Stärke der Genexpression zwischen einer gesunden und kranken Zellpopulation beziehungsweise zwischen einem Wildtyp oder einer Mutante variiert. Eine solche Genexpressionsanalyse wurde für das hier behandelte Forschungsprojekt wichtig, um potentielle quantitative oder qualitative Unterschiede in der Genexpression zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg herauszuarbeiten.

Methodisch wird für die Genexpressionsanalyse meist zunächst die RNS in die sogenannte komplementäre DNS (Englisch: complementary DNA, kurz: cDNA) mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNS-abhängigen DNS-Polymerase, umgewandelt, da diese stabiler und besser prozessierbar ist und die Methoden der DNS-Sequenzierung angewendet werden können. Nach anschließender Testung auf ausreichende Menge und Qualität der cDNA kann die eigentliche

Genexpressionsanalyse stattfinden. Die beiden state-of-the-art-Methoden sind zum einen Microarray-basierte Methoden und das sogenannte RNA-Seq (Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung): Bei Microarray-basierten Methoden wird beispielsweise cDNA auf eine wenige Zentimeter messende Platte (CHIP) aufgetragen, die in winzigen Kammern vordefinierte cDNA-Fragmente enthält. Bindet nun ein vorher farbmarkiertes cDNA-Fragment an das sich in der Kammer befindliche cDNA-Fragment, so bildet sich eine Mischfarbe, dessen Intensität und Stärke Informationen über die Genexpression liefert (158). Bei der RNA-Seq wird werden verschiedene Hochdurchsatzmethoden (Next-Generation Sequencing) verwendet (154).

3.4.1.2. Genexpressionsanalysen zur Feststellung von Unterschieden zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg

Zur Feststellung von Unterschieden in der Genexpression zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg wurden von Patient 20 zunächst PBMC isoliert. Anschließend wurden MACS-basiert CD3^{pos}CD4^{pos} PBMC isoliert und per FACS-Sort CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg von einander getrennt. Mit dem NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep Kit for Illumina® (Protocol for use with NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB #E7490)) wurde nach Herstellerangaben die RNA-Isolation, Qualitätskontrollen und die Library Preparation durchgeführt. Dabei konnte eine Gesamtmenge von 7ng RNA eingesetzt werden. Die Qualitätskontrollen wurden nach Herstellerangaben mit dem Invitrogen's Qubit HS Assay und die Testung der Fragmentlängen mit Agilent's 2100 Bioanalyzer HS DNA Assay durchgeführt.

Da die einzelsträngige RNS ein relativ instabiles Molekül ist, wurden Verfahren entwickelt, um ihre „Qualität“ zu testen, bevor mit RNS-Proben weiterführende Tests gemacht werden. Zwei weit verbreitete Methoden sind die Bestimmung des RIN (RNA integrity number)-Wertes und die Bestimmung der sogenannten 28S/18S-Ratio. Der RIN-Wert gibt an inwieweit die untersuchte RNS degradiert und damit für weitere Analysen unbrauchbar ist. Der durch ein kompliziertes mathematisches System errechnete RIN-Wert kann Zahlen zwischen 1 und 10 annehmen, wobei ein RIN-Wert von 1 bedeutet, dass die RNS komplett degradiert ist und ein RIN-Wert von 10 bedeutet, dass die untersuchte RNS komplett intakt ist (159). Die 28S/18S-Ratio ist eine Methode zur Messung der RNA-Integrität mittels Agarose-Gelelektrophorese bei der RNS-Fragmente je nach ihrer Größe unterschiedlich weit auf einem Agarose-

Gel wandern, nachdem es mit einer elektrischen Ladung versehen wurde. Diese Methode ist bezogen auf die Prozessierung der ribosomale RNS: Dabei bestehen 28S-RNS-Fragmente aus 5070 Nukleotiden und die 18S-RNS-Fragmente aus 1869 Nukleotiden- die natürliche Ratio ist daher circa 2,7 bei intakter ribosomaler RNS. In den Naturwissenschaften gilt eine RNS-Probe mit einer 28S/18S-Ratio von >2 als eine Probe von guter Qualität (160).

Die anschließende RNA-Seq-basierten Bearbeitung der Barcoded RNA-Seq Libraries wurden mit dem HiSeq® Rapid SR Cluster Kit v2 nach Herstellerangaben vorbereitet und die Genexpressionsanalysen an einem Illumina HiSeq2500 (HiSeq® Rapid SBS Kit v2 (59 Cycle) durchgeführt. Die Rohdaten wurden anschließend nach Illumina Standardprotokoll prozessiert und ans humane Genom hg18 gemappt und mit der Software CLC Genomics Workbench 11 von Quiagen ausgewertet.

3.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten von Patient 1-20 erfolgte mittels SPSS (Version 23) und GraphPadPrism (Version 5).

Da die verschiedenen Marker nicht normalverteilt waren (Überprüfung mittels Histogrammen, qq-Plots beziehungsweise Boxplots), wurden nicht-parametrische Tests angewendet: Für den paarweise Vergleich der Marker GARP, HELIOS und ILT3 bei verbundenen Stichproben (CD52^{pos} Treg versus CD52^{neg} Treg im selben Patienten) wurde der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest verwendet. Beim Vergleich mehrerer Variablen (>2) bei unverbundenen Stichproben (Unterschiede der Marker zwischen den GVHD-Gruppen) wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließenden post-hoc-Tests, sofern die Ergebnisse aus dem Kruskal- Wallis-Test signifikant waren, verwendet. Daneben wurden als Maße der deskriptiven Statistik Mittelwert, Median und die 25%- sowie 75%-Quartile sowie die Standardabweichung angegeben. Visualisiert wurden die Daten mit Boxplots.

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine explorative Analyse der Daten, das heisst alle p-Werte $< 0,05$ wurden als „statistisch auffällig“ deklariert.

Bezüglich der Daten für die Patienten 21-30 und der Suppressionstests bei Patienten 1-20 wurde rein deskriptiv gearbeitet.

3.6. Versicherung über die eigenständige Erarbeitung und Auswertung der im Ergebnis- und Diskussionsteil gezeigten und diskutierten Daten

Die in dieser Promotionsschrift abgebildeten Patientendaten, Ergebnisse und Diskussionsbeiträge beziehen sich ausschließlich auf Patientenproben- und daten, die durch mich, Pascal Wölfinger und nicht durch Eva-Maria Wagner-Drouet, Lukas Schäfer oder Katharina Epp untersucht wurden.

3.7. Materialien und Geräte

3.7.1. Puffer, Lösungen und Medien

Einfrier-Medium	X-Vivo-15	150 ml
	20 % HSA	100 ml
	Heparin	2500 U
FACS-Puffer	PBS	1000 ml
	BSA 0,1 %	5ml
	EDTA 2mM	2ml
FACS-Fix	PBS	242 ml
	1 % Formaldehyd	6,8 ml
	EDTA 2 mM	1ml
MACS-Puffer	PBS	1000 ml
	BSA 0,5 %	5 g
	EDTA 2 mM	2ml
Trypanblau (Stammlösung)	Trypanblau	2,0 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
Trypanblau (Gebrauchslösung)	Trypanblau Stammlösung	75 ml
	150 mM NaCl	25 ml
T-Zell-Medium	AIM V	90ml
	Gepooltes humanes Serum	10ml

3.7.2. Chemikalien und Reagenzien

Aqua B. Braun	Braun (Melsungen)
EDTA (Ethyldiamin-Tetraessigsäure)	Sigma (Taufkirchen)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure 96 %	Merck
Ficoll- Medium (Histopaque 1077)	Sigma- Aldrich
NaCl	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Serva (Heidelberg)
PBS (phosphate-buffered saline)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Trypanblau	Merck
AIM V	Thermofischer
Trypsin-EDTA	Invitrogen
X-VIVO-15	Lonza (Basel)
Humanes Serum Albumin (HSA)	Eigenherstellung (Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz)

3.7.3. Geräte

Brutschrank Typ 038 B	Horo, Dr.Hofmann (Ostfildern)
CO2-begaster Inkubator, Hera Cell	Heraeus (Langenselbold)
Durchflusszytometer für durchflusszytometrische Analysen	FACS Canto/Aria™ mit Software FACS Diva™, BD Biosciences (Heidelberg)
Durchflusszytometer für FACS-Sort	Aria IIu von BD mit Software FACS Diva 6.13, BD Biosciences (Heidelberg)
Gefrierschrank -80 °C	Hera freeze, Heraeus/Kendro
Kühl- und Gefrierkombinationen 4 °C, -20 °C	Liebherr (Kirchdorf an der Iller)
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss (Jena)
MACS Magnet für Zellseparation	Miltenyi Biotec
Mikroliterpipetten Transferpipette 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Brand (Wertheim)
Pinzetten mit gebogener, gezahnter 0; 8mm Spitze 10 cm	Kat. Nr. 11052 - 10
Pipettirgerät	PipetBoy, IBS Integra Biosciences, VWR (Darmstadt)
Pipette 1-10 µl	Eppendorf (Hamburg)

Illumina HiSeq2500	Illumina
Sterile Werkbank	HERASafe Typ HS 18, Kendro (Hanau)
Stickstoff-Kryo-Bank XLC 1370,	MVE Europe (Solingen)
Air liquide Espace 331	Tec Lab (Königstein)
Stickstoff-Tank	Taylor-Wharton XL-180, Tec Lab
Tiefkühlschrank, -80°C Hera freeze	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Tiefkühlschrank, -30°C	Kirsch (Offenburg)
Tiefkühlschrank, -20°C	Liebherr
Vortex MS2	Minishaker IKA®, IKA (Staufen)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen	Hettich (Tuttlingen) Kendro-Heraeus

3.7.4. Plastikwaren

Einfrierboxen	Nalge Nunc (Wiesbaden)
Einfrier-Röhrchen	Cryotube, 1,8 ml, Nunc (Wiesbaden)
Einfrier-Röhrchenständer	Roth
Einmalpipetten, steril 1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml	Greiner (Nürtingen)
FACS-Röhrchen	BD Falcon, BD Biosciences Europe (Erembodegem, B)
Handschuhe	Semperid (Österreich)
MACS-Säulen (LD + MS)	Miltenyi Biotec
Pipettenspitzen 0,5-10µl, 10-200 µl, 100-1000 µl	Starlab (Ahrensburg)
Reaktionsgefäße (Eppis) 500, 1500 und 2000 µl	Eppendorf
Spritzen 10, 20 und 50 ml Einmalspritzen	Braun
Sterilfilter FP30/0,2 CA-S, FP30/0,45 CA-S, FP30/1,2 CA-S	Schleicher & Schuell (Dassel) SteritopTM, Millipore (Eschborn)

3.7.5. Glaswaren

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

3.7.6. Zytokine

IL-2	Novartis
------	----------

3.7.7. Kits

Foxp3 / Transcription Factor Staining Set	ThermoFisher
CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit	ThermoFisher
NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep Kit for Illumina®	NEB
Invitrogen's Qubit HS Assay	Invitrogen
Agilent's 2100 Bioanalyzer HS DNA Assay	Agilent
HiSeq® Rapid SR Cluster Kit v2	Illumina

3.7.8. Magnetischen Beads

CD4+CD25+CD127 dim/- Regulatory T Cell Isolation Kit II ,human	Miltenyi Biotec
CD4+ T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec

3.7.9. Software

FlowJo 7.6.4. für durchflusszytometrische Analysen	FlowJo
GraphPadPrism 5	GraphPadPrism
SPSS Version 23	IBM
CLC Genomics Workbench 11	Quiagen

4. Ergebnisse

4.1. Die Rolle von CD52 bei der Entstehung der GVHD nach Alemtuzumab-basierter T-Zell-Depletion

Der erste Teil des Ergebnisteils bezieht sich auf Patienten, die nach dem oben genannten Konditionierungsregime (Flu/Mel/Campath) konditioniert wurden (Patienten 1-20). Hier sollen die Ergebnisse von Lukas Schäfer und Katharina Epp bestätigt werden.

4.1.1. Relativer Anteil von Treg in Bezug auf GVHD

Der relative Treg-Anteil von Patienten mit aGVHD (Mittelwert: 2,2%, Median: 2,2%, 25%-Quartil: 1,1, 75%-Quartil: 3, Standardabweichung: 1,1) war niedriger im Vergleich zu zum relativen Treg-Anteil von Patienten mit cGVHD (Mittelwert: 3,4 %, Median: 2,98%, 25%-Quartil: 1,4, 75%-Quartil: 5,8, Standardabweichung: 2,3) und im Vergleich zu Patienten ohne GVHD (Mittelwert: 3,7 %, Median: 2,1, 25%-Quartil: 2, 75%-Quartil: 6,2, Standardabweichung: 2,4). Bei den gesunden Kontrollen konnten die höchsten Werte ermittelt werden (Mittelwert: 3,88 %, Median: 4,5%, 25%-Quartil: 0,82, 75%-Quartil: 5,6, Standardabweichung: 2,6) (Siehe Abbildung 7). Statistisch auffällig waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht (p-Wert: 0,791). Die Werte für die absoluten Treg-Zahlen konnten nicht angegeben werden, da aus dem klinischen Alltag nicht ausreichend „absolute Zahlen“ wie beispielsweise Leukozyten/nl verfügbar waren mit Hilfe derer es möglich gewesen wäre die absoluten Treg-Zahlen zu berechnen.

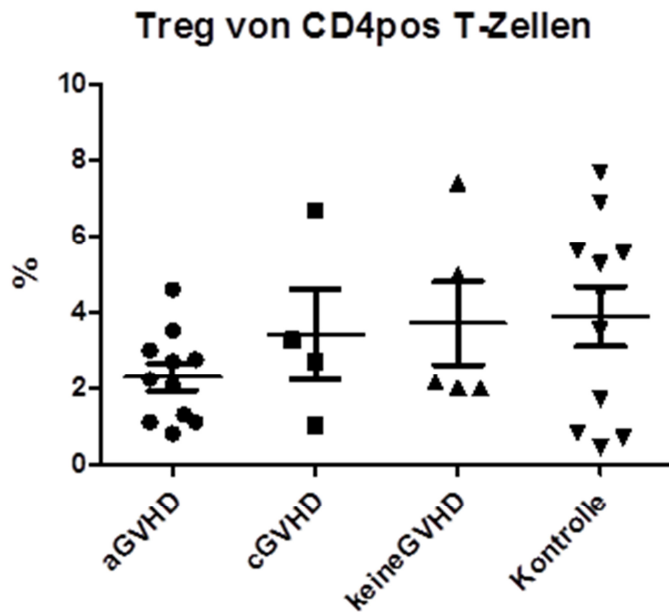


Abbildung 7: Relativer Treg-Anteil zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD, keiner GVHD und gesunden Kontrollen

4.1.2. CD52-Negativität als Marker für die Entstehung einer akuten GVHD

Beim Screening gesunder Individuen (Buffy Coats, n=5) zeigte sich innerhalb der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ bzw. $CD3^{pos}CD8^{pos}$ T-Lymphozyten und der $CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}Foxp3^{pos}$ oder $CD127^{int/neg}$ Treg eine >98%ige CD52-Expression. Innerhalb der T-Lymphozyten-Subgruppen der getesteten Patientenproben (Tage nach aHSZT: 55-694, Mittelwert: 205,8; Median: 140) war die Frequenz an $CD52^{pos}$ T-Zellen im Vergleich zu Gesunden deutlich verringert: Die CD52-Expression innerhalb der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Lymphozyten war am niedrigsten (Mittelwert: 31,17 %, Median: 14,30, 25%-Quartil: 4,8, 75%-Quartil: 56,2, Standardabweichung: 32,8), gefolgt von Treg (Mittelwert: 40 %, Median: 26,4, 25%-Quartil: 6,4, 75%-Quartil: 83,75, Standardabweichung: 37,1) und $CD3^{pos}CD8^{pos}$ T-Lymphozyten (Mittelwert: 55,8%, Median: 68,6, 25%-Quartil: 17,5, 75%-Quartil: 96,1, Standardabweichung: 38,3). Statistisch auffällig waren die Unterschiede zwischen $CD3^{pos}CD4^{pos}$ beziehungsweise $CD3^{pos}CD8^{pos}$ T-Lymphozyten (Signifikanz: 0,000; angepasste Signifikanz: 0,001) und zwischen $CD3^{pos}CD4^{pos}$ T-Lymphozyten und Treg (Signifikanz: 0,035; angepasste Signifikanz: 0,105) (siehe Abbildung 8).

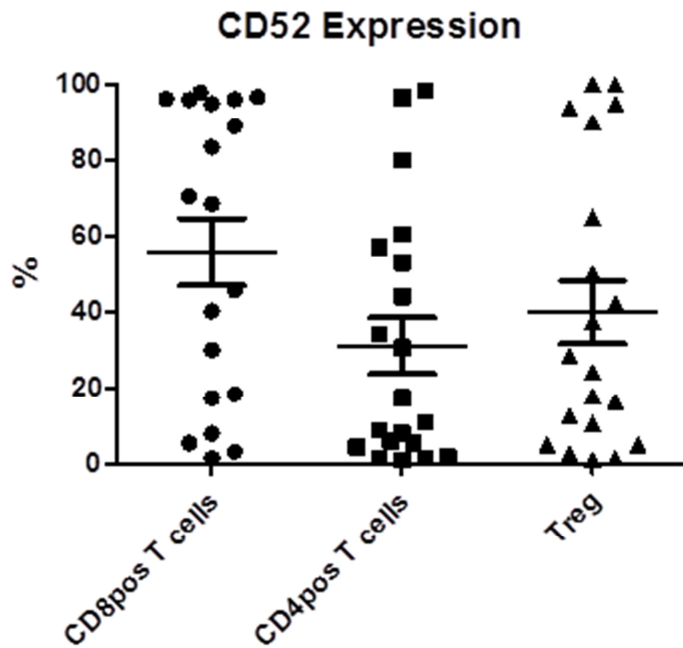


Abbildung 8: CD52-Expression innerhalb zytotoxischer T-Lymphozyten, T-Helfer-Lymphozyten und Treg aller gescreenter Patienten (n=20).

4.1.3. Die Rekonstitution von CD52^{neg} Treg korreliert mit dem Auftreten von aGVHD

Bei der Analyse der relativen Treg-Zahlen während der Rekonstitution nach aHSZT konnten wir Unterschiede zwischen den Patienten mit aGVHD (Tage nach aHSZT: 55-341, Mittelwert: 143 Tage; Median: 126 Tage), cGVHD (Tage nach aHSZT: 94-694, Mittelwert: 338,5 Tage; Median: 283 Tage) und ohne GVHD (Tage nach aHSZT: 135-558, Mittelwert: 238 Tage; Median: 140 Tage) feststellen. Insbesondere die CD52-Expression unterschied sich zwischen den drei Gruppen:

Interessanterweise zeigten Treg von Patienten, die unter aGVHD litten sehr niedrige Level an CD52^{pos} Treg (Mittelwert: 13,1%, Median: 10,7%, 25%-Quartil: 2,7, 75%-Quartil: 18, Standardabweichung: 12,86) im Vergleich zu Patienten mit cGVHD (Mittelwert: 73,15%, Median: 77,5%, 25%-Quartil: 44,45, 75%-Quartil: 97,5, Standardabweichung: 27,9, Signifikanz: 0,016, angepasste Signifikanz: 0,095) und im Vergleich zu Patienten ohne (Mittelwert: 72,6 %, Median: 94%, 25%-Quartil: 37,1, 75%-Quartil: 97,5, Standardabweichung: 33,7, Signifikanz: 0,01, angepasste Signifikanz: 0,059). Gesunde Kontrollen zeigten den höchsten Anteil CD52^{pos} Treg

(Mittelwert: 99,26%, Median: 99,9%, 25%-Quartil: 98,2, 75%-Quartil: 100, Standardabweichung: 1,24). Statistisch auffällig waren dabei die Unterschiede zwischen Patienten mit aGVHD im Vergleich zu Patienten mit cGVHD ($p=0,016$), keiner GVHD ($p=0,01$) und den gesunden Kontrollen ($p=0,000$) in Bezug auf die Signifikanz und zwischen Patienten mit aGVHD und gesunden Kontrollen in Bezug auf die angepasste Signifikanz ($p=0,001$) (siehe Abbildung 9).

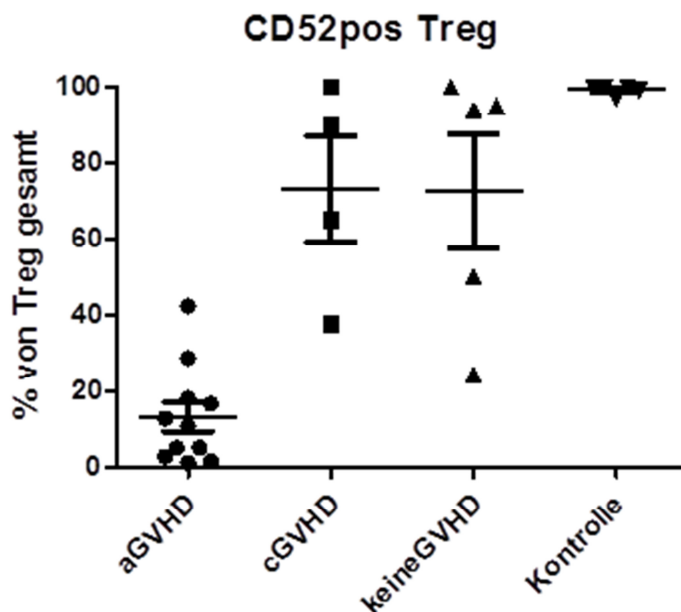


Abbildung 9: CD52-Expression von Treg zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD, ohne GVHD und gesunden Individuen.

4.1.4. Unterschiede in der Expression von HELIOS, ILT3 und GARP zwischen CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg

Um weitere Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg herauszuarbeiten, wurde die Expression des Transkriptionsfaktors HELIOS und der funktionellen Marker ILT3 und GARP untersucht:

Der Transkriptionsfaktor HELIOS konnte sowohl in CD52^{pos} Treg als auch CD52^{neg} Treg der Patientenproben nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich keine statistisch auffälligen Unterschiede (p -Wert: 0,73; CD52^{pos} Treg: Mittelwert: 88,93 %, Median: 91,1%, 25%-Quartil: 84,4, 75%-Quartil: 94,6, Standardabweichung: 7,3; CD52^{neg} Treg: Mittelwert: 86%, Median: 91,7%, 25%-Quartil: 81,75, 75%-Quartil: 93,6, Standardabweichung: 11,8)

Bezüglich der drei Gruppen GVHD zeigten sich ebenfalls keine statistischen Auffälligkeiten (p-Wert: 0,160) zwischen Patienten mit aGVHD (Mittelwert: 84,34%, Median: 91%, 25%-Quartil: 73,05, 75%-Quartil: 92,8, Standardabweichung: 11,99), Patienten mit cGVHD (Mittelwert: 87%, Median: 87,65%, 25%-Quartil: 81,65, 75%-Quartil: 91,7, Standardabweichung: 5,29), Patienten ohne GVHD (Mittelwert: 93,43%, Median: 95,4%, 25%-Quartil: 89,23, 75%-Quartil: 95,65, Standardabweichung: 4,15) und gesunden Individuen (Mittelwert: 85,05%, Median: 85,10%, 25%-Quartil: 77,45, 75%-Quartil: 92,60, Standardabweichung: 8,16) (siehe Abbildung 10).

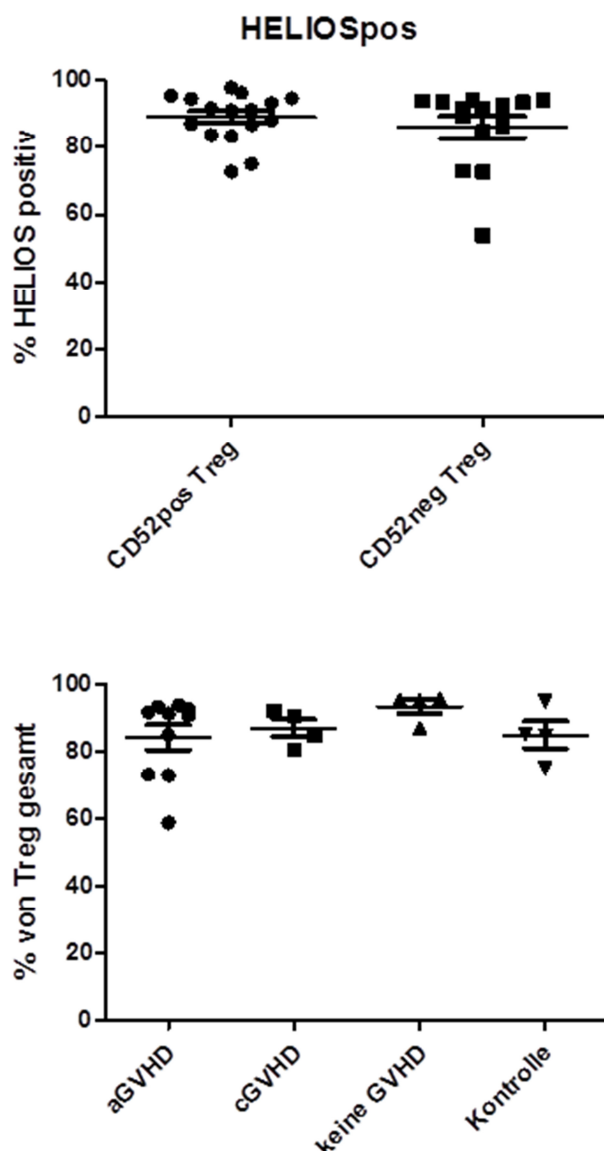
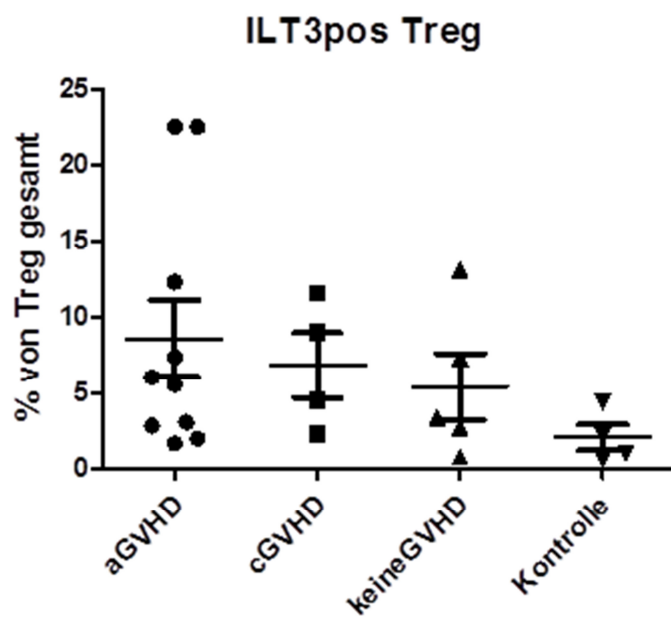


Abbildung 10: Expression des Transkriptionsfaktors HELIOS im Vergleich zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg und zwischen den GVHD-Gruppen

In Bezug auf ILT3 konnten Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg gefunden werden: CD52^{pos} Treg exprimierten statistisch auffällig höhere Mengen (p-Wert: 0,044) an ILT3 auf ihrer Zelloberfläche (Mittelwert: 25,08%, Median: 21,5%, 25%-Quartil: 3,2, 75%-Quartil: 40,8, Standardabweichung: 23,5) im Vergleich zu CD52^{neg} Treg (Mittelwert: 1,3%, Median: 1,1%, 25%-Quartil: 0, 75%-Quartil: 2,2, Standardabweichung: 1,36)

Bezüglich der drei Gruppen GVHD zeigten sich ebenfalls keine statistischen Auffälligkeiten (p-Wert: 0,143) zwischen Patienten mit aGVHD (Mittelwert: 8,573%, Median: 5,8%, 25%-Quartil: 2,60, 75%-Quartil: 14,85, Standardabweichung: 7,98), Patienten mit cGVHD (Mittelwert: 6,83%, Median: 6,74%, 25%-Quartil: 2,79, 75%-Quartil: 10,95, Standardabweichung: 4,25), Patienten ohne GVHD (Mittelwert: 5,43%, Median: 3,37%, 25%-Quartil: 1,71, 75%-Quartil: 10,18, Standardabweichung: 4,89) und gesunden Individuen (Mittelwert: 2,06%, Median: 1,61%, 25%-Quartil: 0,72, 75%-Quartil: 3,85, Standardabweichung: 1,69) (siehe Abbildung 11).



73

Auch in Bezug auf den Aktivierungsmarker GARP konnten Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg festgestellt werden. Es zeigte sich eine statistisch auffällig höhere Expression von GARP auf der Oberfläche (p-Wert: 0,02) von CD52^{pos} Treg (Mittelwert: 15,21%, Median: 9%, 25%-Quartil: 5,5, 75%-Quartil: 15,8, Standardabweichung: 20,82) im Vergleich zu CD52^{neg} Treg (Mittelwert: 2,04%, Median: 1,16%, 25%-Quartil: 0, 75%-Quartil: 3,7, Standardabweichung: 2,17).

Bezüglich der drei Gruppen GVHD zeigten sich ebenfalls keine statistischen Auffälligkeiten (p-Wert: 0,338) zwischen Patienten mit aGVHD (Mittelwert: 4,66%, Median: 3,09%, 25%-Quartil: 1,18, 75%-Quartil: 5,59, Standardabweichung: 4,90), Patienten mit cGVHD (Mittelwert: 3,79%, Median: 3,21%, 25%-Quartil: 2,67, 75%-Quartil: 5,5, Standardabweichung: 1,50), Patienten ohne GVHD (Mittelwert: 6,50%, Median: 6,67%, 25%-Quartil: 4,94, 75%-Quartil: 7,99, Standardabweichung: 1,70) und gesunden Individuen (Mittelwert: 4,58%, Median: 2,45%, 25%-Quartil: 0,7, 75%-Quartil: 6,12, Standardabweichung: 6,35) (siehe Abbildung 12).

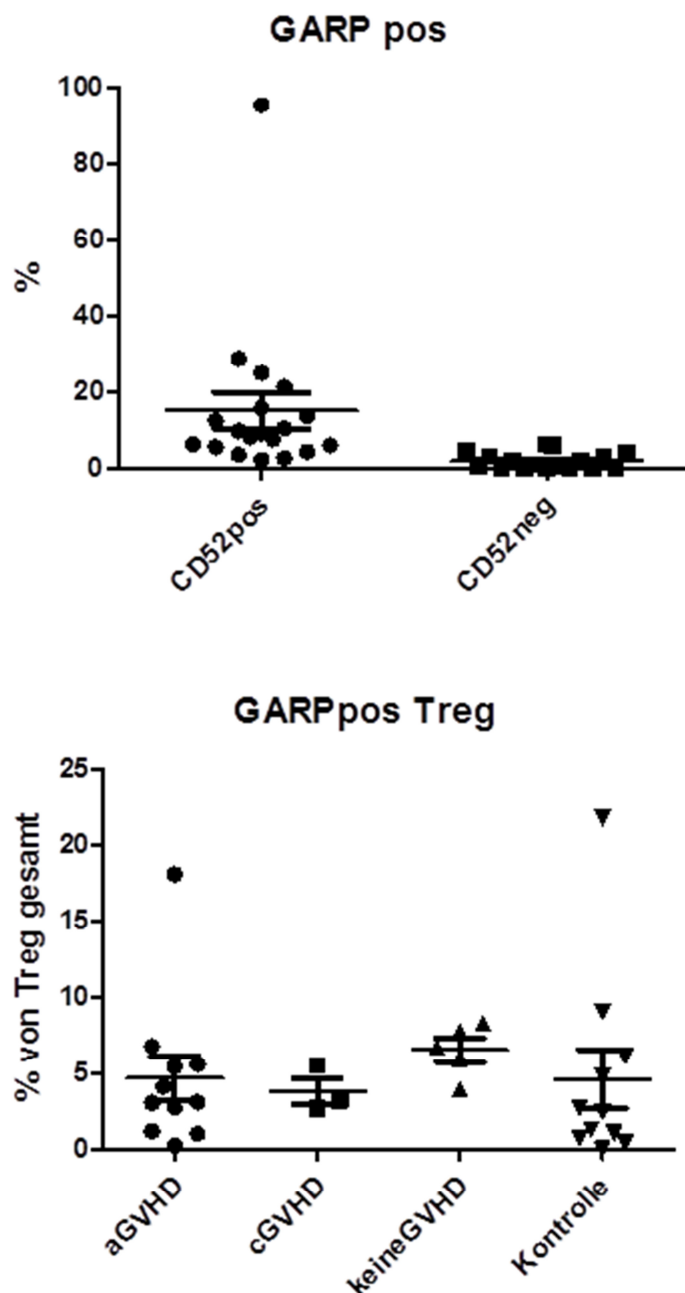


Abbildung 12: Expression von GARP im Vergleich zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg und zwischen den GVHD-Gruppen

4.1.5. GARP-Expression nach Stimulation im Vergleich zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg

Da im Vorfeld nur nicht-aktivierte Treg in Bezug auf ihre GARP-Expression getestet wurden, wurden die PBMC Patient 1, 16 und 19 stimuliert und nach 24 Stunden die GARP-Expression der Treg gemessen. 24 Stunden nach Stimulation zeigten sich in

allen Versuchsansätzen eine gesteigerte GARP-Expression im Vergleich zur GARP-Expression vor Stimulation (siehe Abbildung 13, oberes Bild, Linien verbinden GARP^{pos} Treg je eines Patienten vor und nach Stimulation). Es zeigten sich außerdem eine höhere GARP-Expression der CD52^{pos} Treg im Vergleich zu CD52^{neg} Treg der selben Patienten (siehe Abbildung 13, unteres Bild, Linien verbinden die Werte je eines Patienten). Zu erwähnen sei hier, dass die CD52^{pos} Treg zwar eine höhere GARP-Expression zeigten, die CD52^{neg} Treg jedoch auch fähig waren nach Stimulation GARP zu exprimieren.

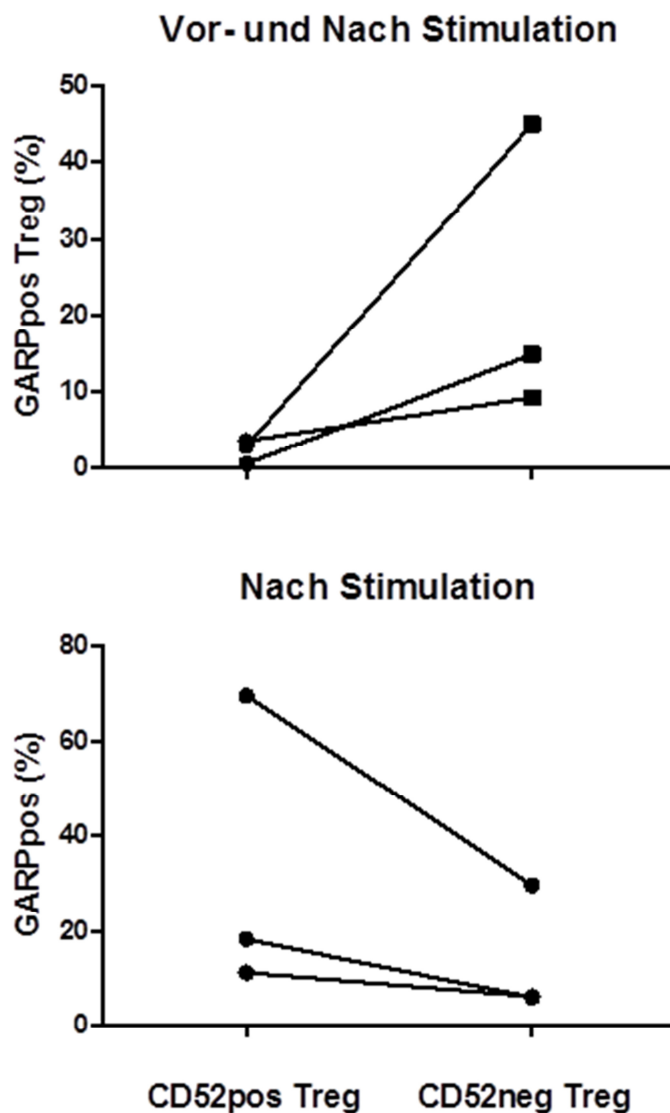


Abbildung 13: GARP-Expression nach Stimulation im Vergleich zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg.

4.2. Einfluss von Immunsuppressiva auf die Expression ausgewählter Treg-Marker

Da Patienten, die unter einer akuten GVHD leiden, zumeist mit immunsupprimierenden Medikamenten wie Kortikosteroiden, Calcineurininhibitoren u.a. behandelt werden müssen und Patienten nach aHSZT, die keine aGVHD entwickeln diese Substanzen nicht erhalten müssen, adressierten wir den Effekt dieser Substanzen auf die Expression bekannter Treg-Marker, um hier Fehlinterpretationen in Bezug eventuelle Unterschiede in der Markerexpression auszuschließen (siehe Kapitel 3.2.5.2.). Es zeigten sich in Bezug auf die Markerexpression (siehe Tabelle 10; Angaben in %; exemplarische Darstellung für ein gesundes Individuum) die in Tabelle 10 dargestellten Unterschiede zwischen Treg, die mit Prednisolon oder Ciclosporin A inkubiert wurden und PBMC, die in nativem T-Zell-Medium inkubiert wurden.

Marker	CD39	CD44	GARP	CD62L	CD45RA	CTLA4	ILT3	GITR	HLA-DR	CXCR3	HELIOS	CCR5	Granzym A
T-Zell-Medium	88,2	99,7	0	99,5	1,92	92,7	1,02	1,49	8,89	7,7	77	0	no
Prednisolon 10mg	86,1	99,3	0	98,7	2,55	95,2	1,29	0,76	4,29	0,76	72,8	0	2,38
CSA 2ug	90	92,9	0,4	98,9	2,54	87,7	0,37	1,61	12	1,1	79,4	0	5,8

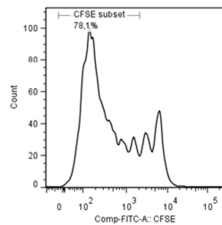
Tabelle 10: Expression ausgewählter Treg-Marker nach Inkubation ohne Immunsuppressiva, mit Prednisolon oder mit CSA für 24 Stunden (exemplarisch für ein gesundes Individuum)

4.3. Funktionelle Testung von Treg mittels Suppressionstests

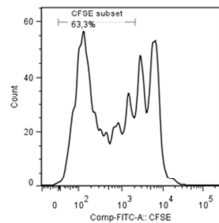
4.3.1. Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg

Um funktionelle Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg herauszuarbeiten, wurden diese wie oben beschrieben FACS-basiert sortiert und mit gesunden Teff für 5 Tage inkubiert. Dieser Versuch wurde für 3 Patienten durchgeführt (Patient 1, 19, 20):

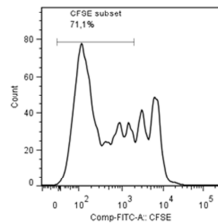
Bei Patient 1 konnte gezeigt werden, dass Teff, die mit CD52^{pos} Treg inkubiert wurden, weniger proliferierten als Teff, die mit CD52^{neg} Treg inkubiert wurden (siehe Abbildung 14)



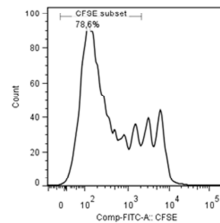
Teff stimuliert CD8



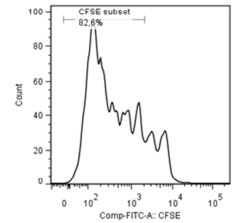
CD52pos Treg 1:1 CD8



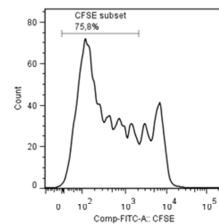
CD52pos Treg 2:1 CD8



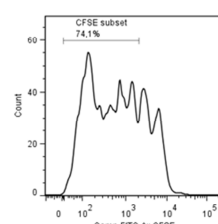
CD52pos Treg 4:1 CD8



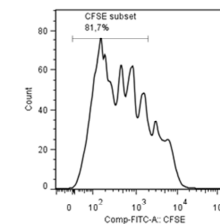
CD52pos Treg 4:1 CD8



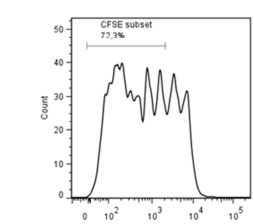
CD52neg Treg 1:1 CD8



CD52neg Treg 2:1 CD8



CD52neg Treg 4:1 CD8

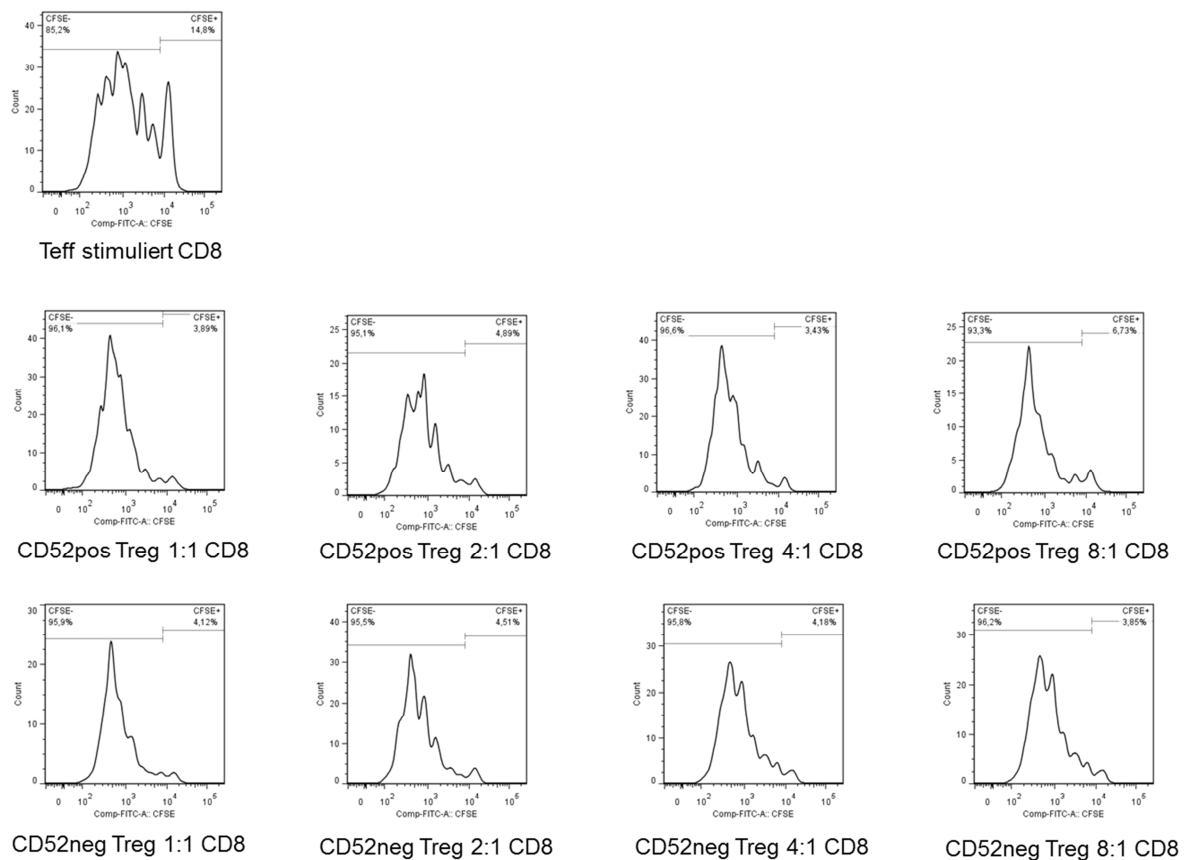


CD52neg Treg 8:1 CD8

Teff # Treg	1 # 0		1 # 1	2 # 1	4 # 1	8 # 1
	78,10%	CD52 ^{pos} Treg	63,30%	71,50%	78,60%	82,60%
		CD52 ^{neg} Treg	75,80%	74,10%	81,70%	72,30%

Abbildung 14: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg bei Patient 1

Bei Patient 19 konnten keine Unterschiede in der Proliferation von Teff festgestellt werden unabhängig, ob sie mit CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg inkubiert wurden. Aufgrund niedriger Zellzahlen wurden PBMCs von Patient 19 ein zweites Mal gesortet und mit dem gleichen Versuchsansatz inkubiert, jedoch waren wiederholt niedrige Zellzahlen und eine geringe Viabilität zu verzeichnen. Daher sind die Ergebnisse dieses Versuches nicht aussagekräftig (sieht Abbildung 15).



Teff # Treg	1 # 0		1 # 1	2 # 1	4 # 1	8 # 1
	85,20%	CD52 ^{pos} Treg	96,10%	95,10%	96,60%	93,30%
		CD52 ^{neg} Treg	95,90%	95,50%	95,80%	96,20%

Abbildung 15: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg bei Patient 19

Bei Patient 20 konnte gezeigt werden, dass Teff, die mit CD52^{pos} Treg inkubiert wurden, sogar stärker proliferierten als Teff, die mit CD52^{neg} Treg inkubiert wurden. Es konnte hier also kein Unterschied in der Suppressionsfähigkeit zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg gezeigt werden (siehe Abbildung 16).

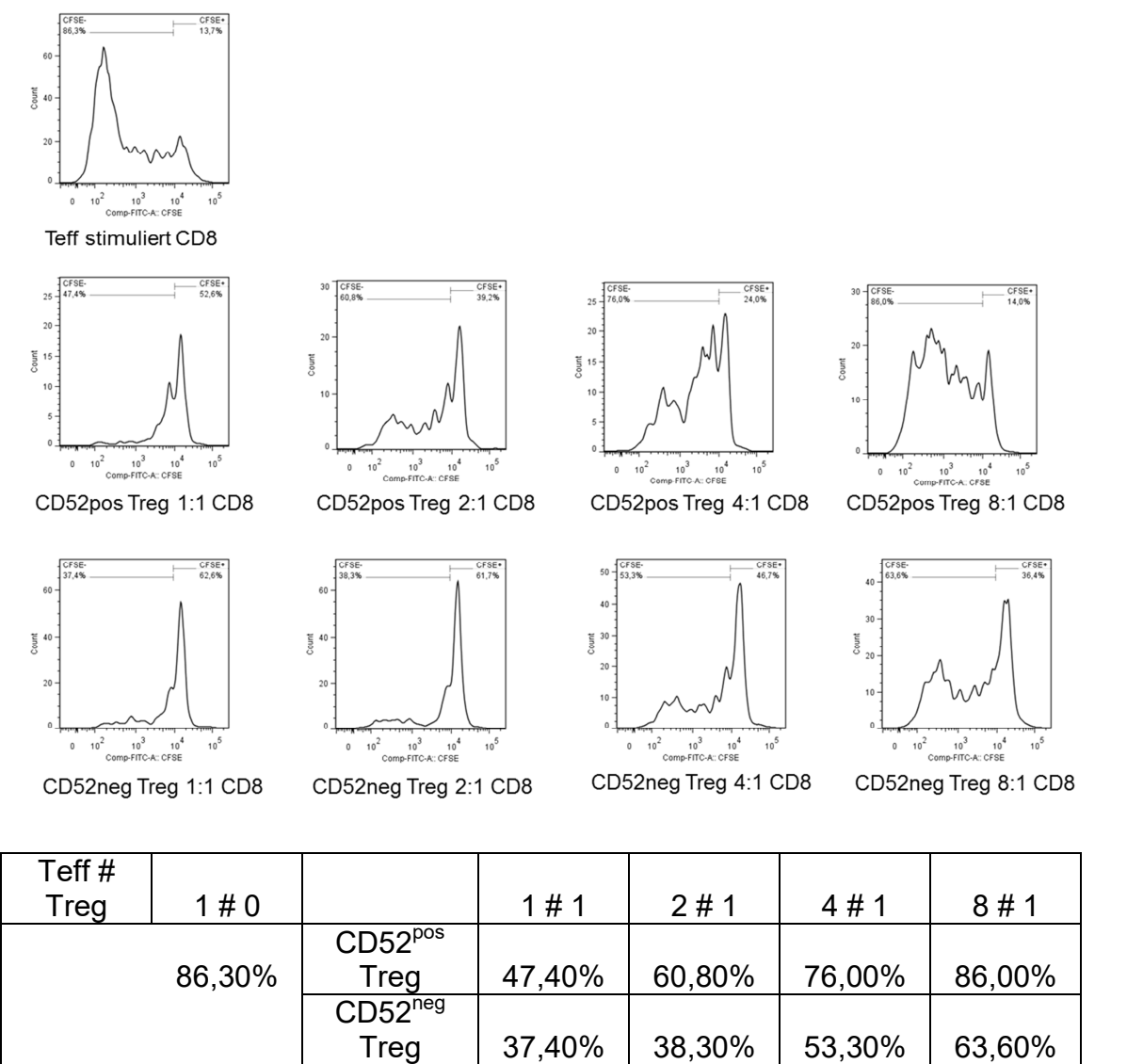
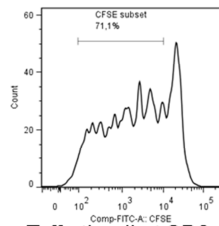


Abbildung 16: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg bei Patient 20

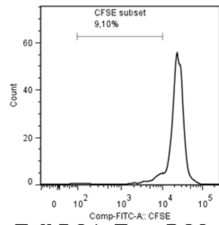
4.3.2. Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg von gesunden Individuen und Patienten mit GVHD unabhängig vom Konditionierungsregime

Um die Suppressionsfähigkeit von Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD oder ohne GVHD unabhängig vom Konditionierungsregime zu untersuchen, inkubierten wir Treg von Patienten mit gesunden Teff und verglichen deren Proliferationsraten mit Teff, die mit gesunden Treg inkubiert wurden (siehe Kapitel 3.3.2.2.). Die Ergebnisse zeigten, dass Treg von Patienten mit aGVHD, nicht jedoch mit cGVHD eine geringere Suppressionsfähigkeit besaßen als Treg von gesunden Individuen:

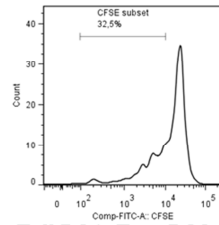
Bei Patient 1 (akute GVHD) konnte gezeigt werden, dass Teff, die mit Treg des Patienten inkubiert wurden, stärker proliferierten als Teff, die mit Treg eines BCs inkubiert wurden. In den letzten beiden Spalten wurde der Suppressionstest mit dem Serum des Patienten anstatt dem gepoolten Serum unseres Labors durchgeführt und es zeigte sich ein antiproliferativer Effekt auf die Teff bzw ein positiver Effekt auf die Treg der Kontrolle (siehe Abbildung 17).



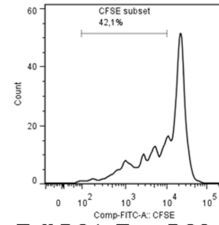
Teff stimuliert CD8



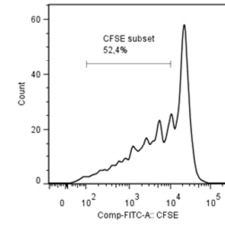
Teff BC1+Treg BC2 1:1



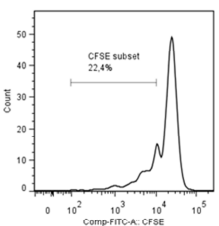
Teff BC1+Treg BC2 2:1



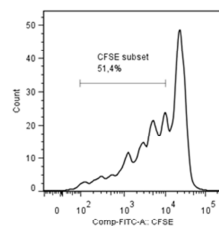
Teff BC1+Treg BC2 4:1



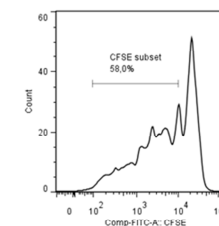
Teff BC1+Treg BC2 8:1



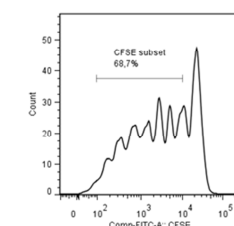
Teff BC1+Treg Patient 1:1



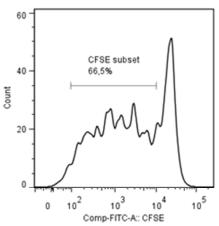
Teff BC1+Treg Patient 2:1



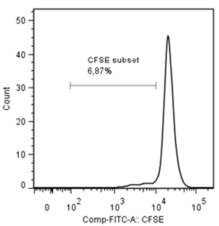
Teff BC1+Treg Patient 4:1



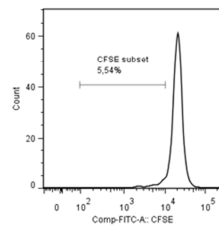
Teff BC1+Treg Patient 8:1



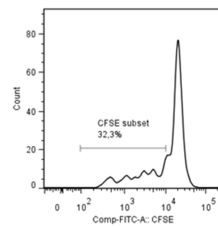
Teff (Serum Patient)



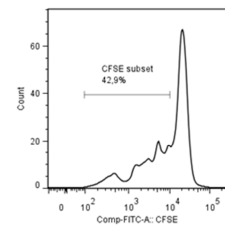
Teff BC1+Treg BC2
(Serum Patient) 1:1



Teff BC1+Treg BC2
(Serum Patient) 2:1



Teff BC1+Treg BC2
(Serum Patient) 4:1

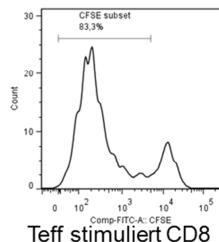


Teff BC1+Treg BC2
(Serum Patient) 8:1

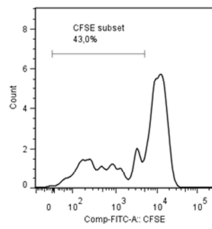
Teff # Treg	1 # 0		1 # 1	2 # 1	4 # 1	8 # 1
Serum normal	71,10%	Treg Patient; Serum normal	22,40%	51,40%	58,00%	68,70%
		Treg Gesund; Serum normal	9,10%	32,50%	42,10%	52,40%
Serum Patient	66,50%	Treg Gesund; Serum Patient	6,87%	5,54%	32,30%	42,90%

Abbildung 17: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg von Patient 1 und einem gesunden Individuum

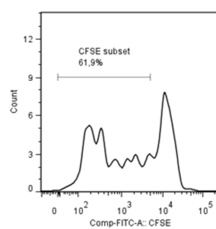
Bei Patient 22 (akute GVHD) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Teff, die mit Treg des Patienten inkubiert wurden, stärker proliferierten wie Teff, die mit Treg eines BCs inkubiert wurden. In den letzten beiden Spalten wurde der Suppressionstest mit dem Serum des Patienten anstatt dem gepoolten Serum unseres Labors durchgeführt und es zeigte sich ein antiproliferativer Effekt auf die Teff bzw ein positiver Effekt auf die Treg der Kontrolle (siehe Abbildung 18).



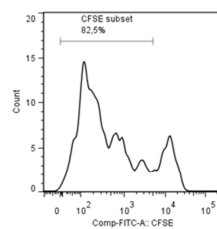
Teff stimuliert CD8



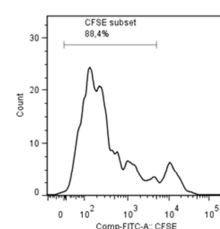
Teff BC1+Treg BC2 1:1



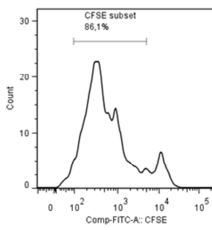
Teff BC1+Treg BC2 2:1



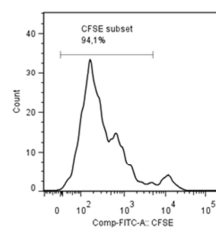
Teff BC1+Treg BC2 4:1



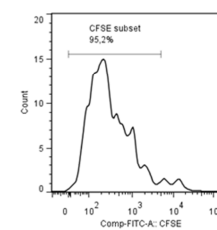
Teff BC1+Treg BC2 8:1



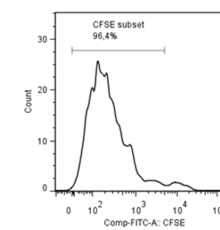
Teff BC1+Treg Patient 1:1



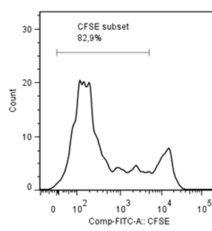
Teff BC1+Treg Patient 2:1



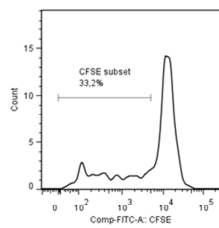
Teff BC1+Treg Patient 4:1



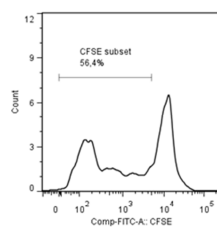
Teff BC1+Treg Patient 8:1



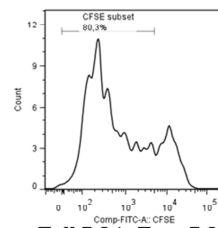
Teff (Serum Patient)



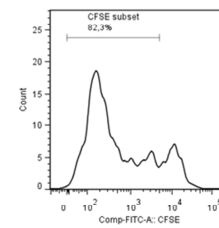
Teff BC1+Treg BC2 (Serum Patient) 1:1



Teff BC1+Treg BC2 (Serum Patient) 2:1



Teff BC1+Treg BC2 (Serum Patient) 4:1

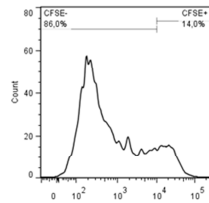


Teff BC1+Treg BC2 (Serum Patient) 8:1

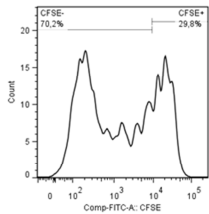
Teff # Treg	1 # 0		1 # 1	2 # 1	4 # 1	8 # 1
Serum normal	83,30%	Treg Patient; Serum normal	86,10%	94,10%	95,20%	96,40%
		Treg Gesund; Serum normal	43,00%	61,90%	82,50%	88,40%
Serum Patient	82,90%	Treg Gesund; Serum Patient	33,20%	56,40%	80,30%	82,30%

Abbildung 18: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg von Patient 22 und einem gesunden Individuum sowie Einfluss des Serums von Patient 22 auf die Suppressionsfähigkeit von Treg und die Proliferationsfähigkeit von Teff

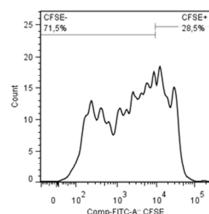
Bei Patient 21 (chronische GVHD) konnten die oben beschriebenen Unterschiede in Bezug auf die Treg nicht gezeigt werden: Teff, die mit Treg des Patienten inkubiert wurden, proliferierten sogar weniger als Teff, die mit Treg eines BCs inkubiert wurden. In den letzten beiden Spalten wurde der Suppressionstest mit dem Serum des Patienten anstatt dem gepoolten Serum unseres Labors durchgeführt und es zeigte sich erneut ein antiproliferativer Effekt auf die Teff bzw ein positiver Effekt auf die Treg der Kontrolle (siehe Abbildung 19).



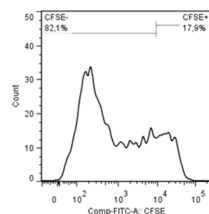
Teff stimuliert CD8



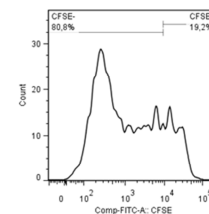
Teff BC1+Treg BC2 1:1



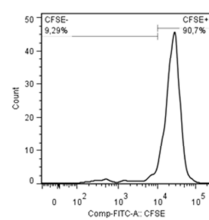
Teff BC1+Treg BC2 2:1



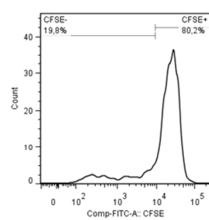
Teff BC1+Treg BC2 4:1



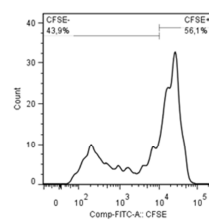
Teff BC1+Treg BC2 8:1



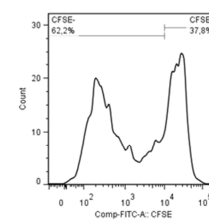
Teff BC1+Treg Patient 1:1



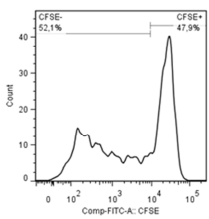
Teff BC1+Treg Patient 2:1



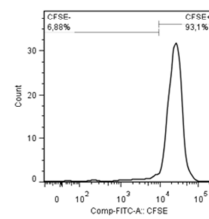
Teff BC1+Treg Patient 4:1



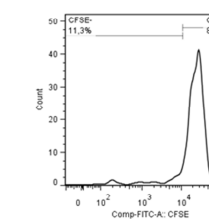
Teff BC1+Treg Patient 8:1



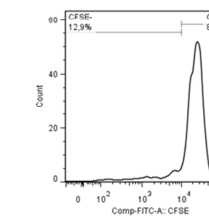
Teff (Serum Patient)



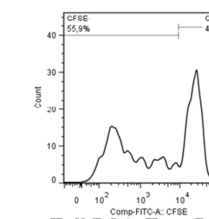
Teff BC1+Treg BC2
(Serum Patient) 1:1



Teff BC1+Treg BC2
(Serum Patient) 2:1



Teff BC1+Treg BC2
(Serum Patient) 4:1



Teff BC1+Treg BC2
(Serum Patient) 8:1

Teff # Treg	1 # 0		1 # 1	2 # 1	4 # 1	8 # 1
Serum normal	86,00%	Treg Patient; Serum normal	9,29%	19,80%	43,90%	62,20%
		Treg Gesund; Serum normal	70,20%	71,50%	82,10%	80,80%
Serum Patient	52,10%	Treg Gesund; Serum Patient	6,88%	11,30%	12,90%	55,90%

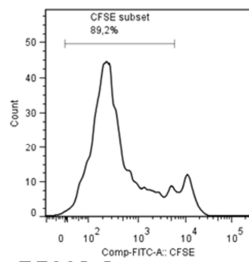
Abbildung 19: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg von Patient 21 und einem gesunden Individuum sowie Einfluss des Serums von Patient 21 auf die Suppressionsfähigkeit von Treg und die Proliferationsfähigkeit von Teff

4.3.3. Testung des Einflusses des Serums von Patienten mit GVHD auf die Suppressionsfähigkeit von Treg und die Proliferationsfähigkeit von Teff

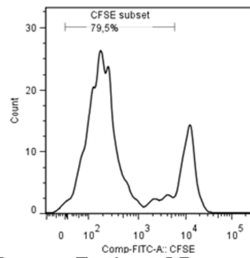
Bezugnehmend auf die Ergebnisse unter 4.3.2. wurden die folgenden Versuchsansätze durchgeführt:

Um die Rolle des Serums von GVHD-Patienten in Bezug auf Treg und Teff in einer noch größeren Probenanzahl zu untersuchen, wurde wie unter 3.3.2.3. beschrieben den Versuchsansätzen anstatt gepooltem Serum von gesunden Spendern das Serum von GVHD-Patienten zugesetzt. Interessanterweise zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der Proliferation von Teff, die mit Seren von GVHD-Patienten inkubiert wurden und Teff, die mit gepooltem Serum von gesunden Spendern inkubiert wurden:

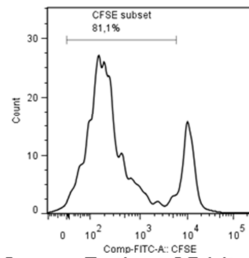
Um herauszufinden, ob das Serum von Patienten nach aHSZT generell einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von Teff hat oder ob dieser Effekt nur auf Patienten mit GVHD zutrifft, wurden Teff von einem gesunden Individuum zunächst für 5 Tage mit den Seren von Patient 19, 23, 24 und 25 inkubiert, die sich einer aHSZT unterzogen hatten, jedoch keine GVHD entwickelten. Um einen möglichen Effekt einer Hitzeinaktivierung zu untersuchen, wurden die Versuche mit hitzeinaktiviertem und nicht-hitzeinaktiviertem Serum von Patienten durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei Patient 19, 23 und 25 keine Unterschiede bezüglich der Teff-Proliferation zu sehen waren und dass eine Hitzeinaktivierung keinen Einfluss hatte. Einzig bei Patient 24 hatte nicht-hitzeinaktiviertes Serum einen hemmenden Einfluss auf die Teff-Proliferation (siehe Abbildung 20). Zu erwähnen sei hier, dass Patient 24 zum Zeitpunkt der Probenabnahme keine immunsupprimierenden Medikamente einnahm. Bei Patient 19 wurde zum Zeitpunkt der Probenabnahme eine aGVHD vermutet und der Patient daher mit 50mg Prednisolon 1x pro Tag behandelt. Es zeigte sich später, dass es sich nicht um eine aGVHD handelte. Trotz der Steroidtherapie zeigten sich keine hemmenden Eigenschaften auf die Teff.



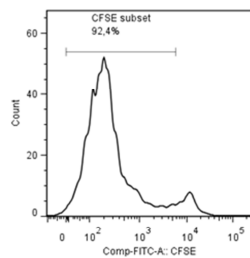
PBMC Serum „gesund“



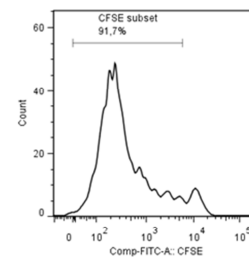
Serum Patient 25 normal



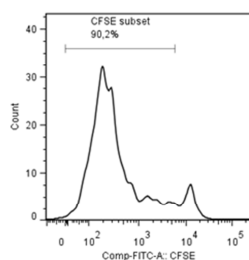
Serum Patient 25 hitzeinaktiviert



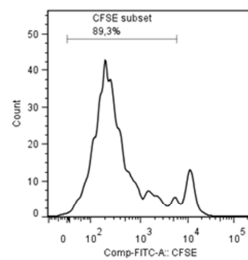
Serum Patient 23 normal



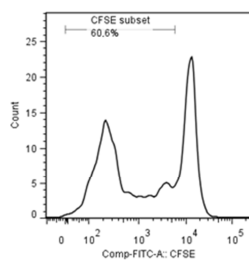
Serum Patient 23 hitzeinaktiviert



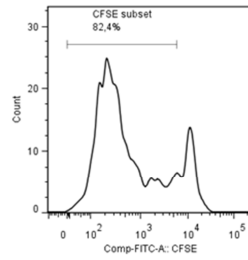
Serum Patient 19 normal



Serum Patient 19 hitzeinaktiviert



Serum Patient 24 normal

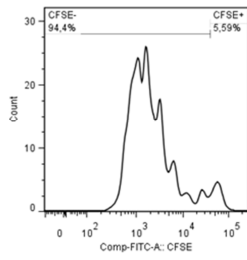


Serum Patient 24 hitzeinaktiviert

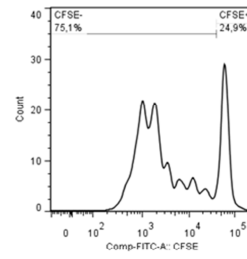
Kontrolle		Patient	19	23	24	25
89,20%	normal		90,20%	92,40%	60,60%	79,50%
	hitzeinaktiviert		89,30%	91,70%	82,40%	81,10%

Abbildung 20: Einfluss von Serum von Patienten nach aHSZT ohne GVHD (Patient 19, 23, 24 und 25) auf die Proliferationsfähigkeit von gesunden Teff

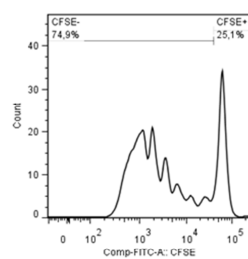
Um herauszufinden, ob das Serum von Patienten nach aHSZT, die eine GVHD entwickelten einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von Teff hat, wurden Teff von gesunden Individuum für 5 Tage mit den Seren von Patient 3, 6, 26, 27 und 28 inkubiert. Um einen möglichen Effekt einer Hitzeinaktivierung zu untersuchen, wurden die Versuche mit hitzeinaktiviertem und nicht-hitzeinaktiviertem Serum von Patienten durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle Patientenseren hemmenden Einfluss auf die Proliferation der Teff hatten. Zu bemerken sei hier, dass Patient 3 zum Zeitpunkt der Probenabnahme keinerlei systemische immunsupprimierende Medikamente erhielt. Einzig bei Patient 26 zeigte sich ein nennenswerter Unterschied zwischen hitzeinaktiviertem und normalem Serum. Patient 26 erhielt zum Zeitpunkt der Probenabnahme 20mg Prednisolon 1x pro Tag (siehe Abbildung 21).



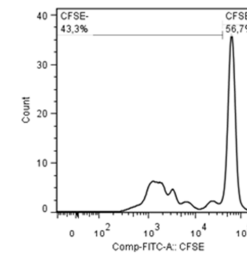
PBMC Serum „gesund“



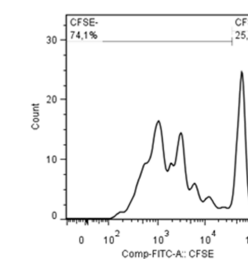
Serum Patient 3 normal



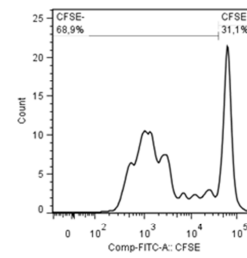
Serum Patient 3 hitzeinaktiviert



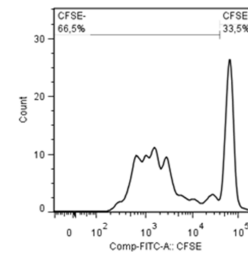
Serum Patient 26 normal



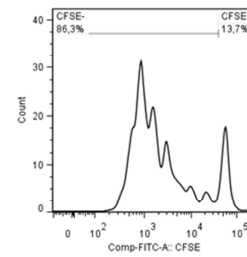
Serum Patient 26 hitzeinaktiviert



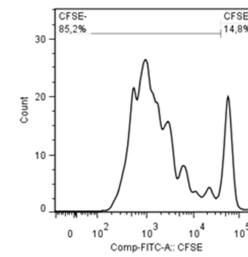
Serum Patient 27 normal



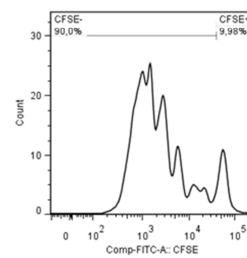
Serum Patient 27 hitzeinaktiviert



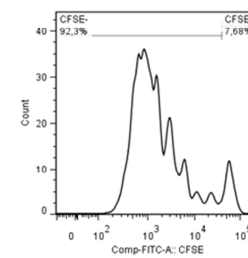
Serum Patient 28 normal



Serum Patient 28 hitzeinaktiviert



Serum Patient 6 normal

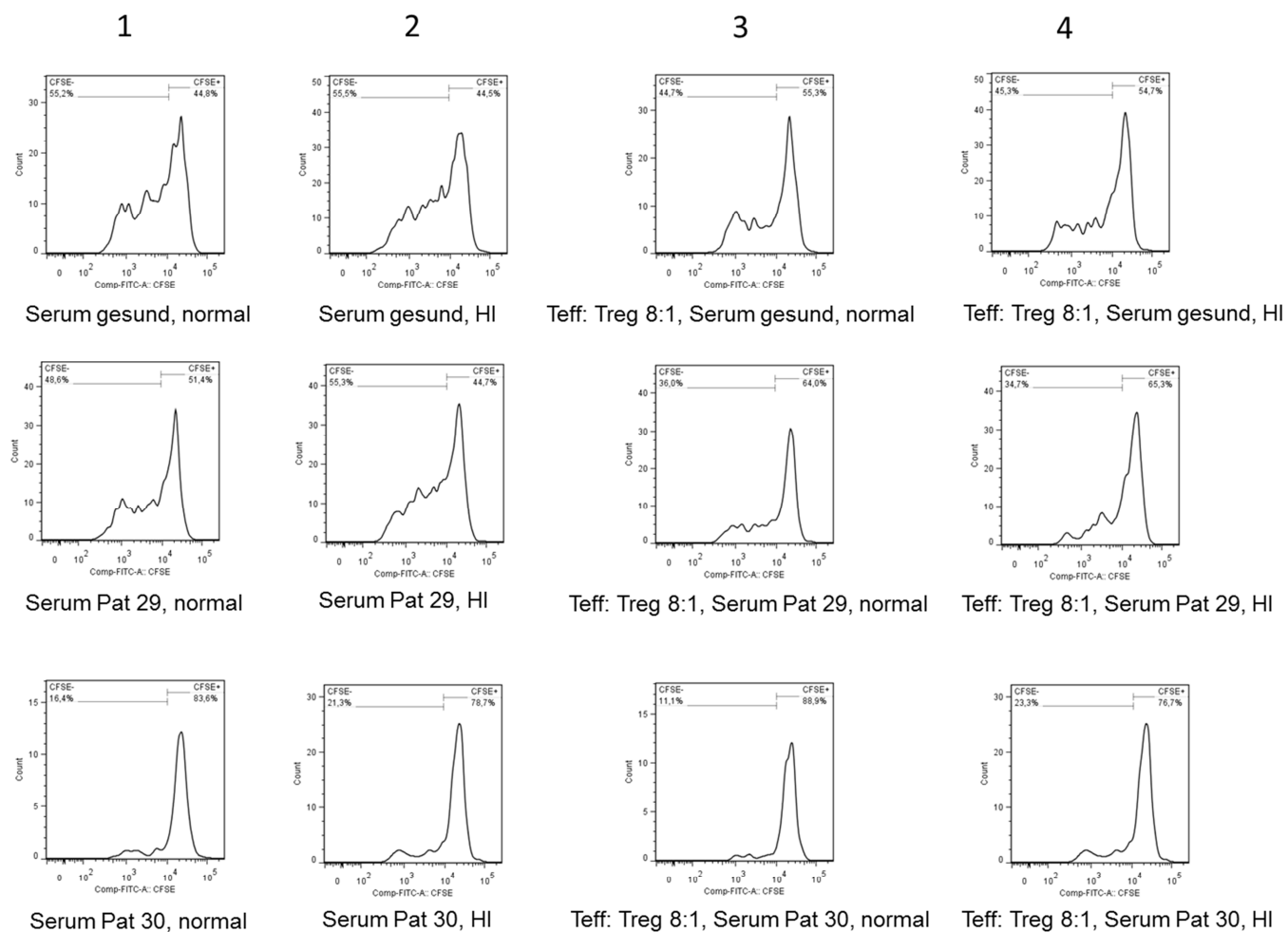


Serum Patient 6 hitzeinaktiviert

Kontrolle		Patient	3	26	27	28	6
94,40%		normal	75,10%	43,30%	68,90%	86,30%	90%
		hitzeinaktiviert	74,90%	74,10%	66,50%	85,20%	92,30%

Abbildung 21: Einfluss von Serum von Patienten nach aHSZT mit aGVHD (Patient 3, 6, 26, 27 und 28) auf die Proliferationsfähigkeit von gesunden Teff

Da sich in den beiden letzten Versuchsansätzen eher kein bzw. geringer Einfluss der Hitzeinaktivierung auf die Proliferation von Teff alleine zeigte, adressierten wir im nächsten Schritt den Einfluss der Hitzeinaktivierung des Serums auf den Serum-Effekt auf die Suppressionsfähigkeit von Treg. Hierzu wurde die Proliferation von Teff in T-Zell-Medium quantifiziert, das zum einen mit Serum eines Gesunden hergestellt wurde und zum anderen mit den Seren von Patient 29 und 30 (beide aGVHD). Beide Ansätze wurden mit Hitzeinaktiviertem (Abbildung 22, Spalte 2) und nicht-hitzeinaktiviertem Serum (Abbildung 22, Spalte 1) durchgeführt. Um auch den Einfluss des Serums auf Treg beurteilen zu können, wurde für alle 3 Probanden-Seren ein Suppressionstest durchgeführt (Teff BC1:Treg BC2-Verhältnis: 8:1) und diese Ansätze jeweils mit hitzeinaktiviertem Serum (Abbildung 22, Spalte 3) und nicht-hitzeinaktiviertem Serum (Spalte 3) inkubiert. Es zeigte sich in Bezug auf die Teff-Proliferation erneut, dass das Serum von aGVHD-Patienten eine hemmende Wirkung hat. Diese Wirkung war bei den hitzeinaktivierten Seren weniger ausgeprägt. Das Serum beider Patienten hatte in den Suppressionstests eine hemmende Wirkung auf die Teff-Proliferation. Die Hitzeinaktivierung hatte im Kontrollsample und bei Patient 29 keinen Einfluss, in Patient 30 hatte das hitzeinaktivierte Serum weniger hemmenden Einfluss auf die Teff-Proliferation.



	Serum Patient	Kontrolle	29	30
Teff Proliferation	normal	55,20%	48,60%	16,40%
	hitzeinaktiviert	55,50%	55,30%	21,30%
Teff # Treg: 8 # 1	normal	44,70%	36,00%	11,10%
	hitzeinaktiviert	45,30%	34,70%	23,30%

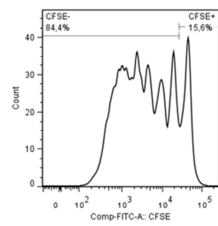
Abbildung 22: Einfluss der Hitzeinaktivierung des Serums auf den Serum-Effekt auf die Suppressionsfähigkeit von Treg

4.3.4. Effekt von Glukokortikoiden und Ciclosporin A auf die Suppressionsfähigkeit von Treg

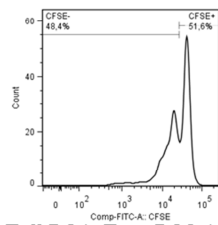
Da die State-of-the-art-Therapie für GVHD-Patienten eine systemische Glucocortikoid-Therapie bzw Therapie mit anderen Immunsuppressiva ist, versuchten wir wie unter 3.3.2.4. beschrieben den Effekt von Glucocortikoiden und Ciclosporin A auf die Suppressionsfähigkeit von Treg zu untersuchen. Von einem gesunden Individuum wurden dazu Treg isoliert und je 0,5 Mio Treg für 24 Stunden in den folgenden Ansätzen inkubiert und mit IL2 und OKT3 stimuliert

- 1) nur T-Zell-Medium 2ml
- 2) 2ml T-Zellmedium + Prednisolon 0,5ug/ml
- 3) 2ml T-Zellmedium+ Tacrolimus 2ng/ml
- 4) 2ml T-Zellmedium+ Prednisolon 0,5ug/ml+ Tacrolimus 2ng/ml

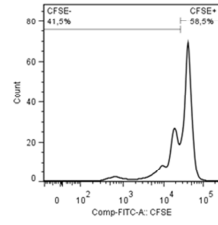
Anschließend wurden die Treg einmal gewaschen und in den Ansätzen 1:1, 2:1, 4:1 und 8:1 inkubiert und nach 5 Tagen die Teff-Proliferation gemessen (siehe 4.3.). Interessanterweise zeigte sich, dass Treg, die mit Glucocortikoiden oder Ciclosporin A inkubiert wurden, in der Lage waren adäquat eine Teff-Proliferation zu unterdrücken, wobei die Titration in diesem Versuchsansatz nicht adäquat funktionierte. Vor allem Ciclosporin A bzw die Kombination aus Ciclosporin A und Glucocortikoiden scheinen einen synergistischen Effekt auf Treg zu haben. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Treg von GVHD-Patienten, die mit Immunsuppressiva behandelt werden zumindest durch diese Medikamente keinen funktionellen Schaden erleiden und die funktionellen Beeinträchtigungen der Treg durch andere Mechanismen bedingt sein könnte (siehe Abbildung 23).



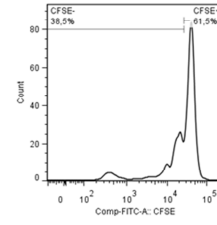
Teff stimuliert



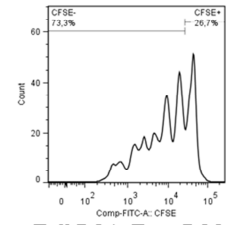
Teff BC1+Treg BC2 1:1



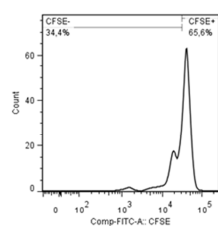
Teff BC1+Treg BC2 2:1



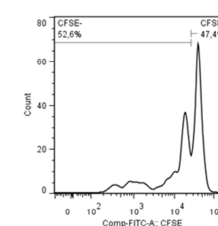
Teff BC1+Treg BC2 4:1



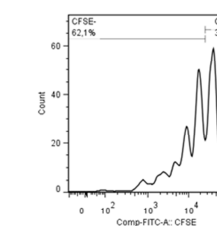
Teff BC1+Treg BC2 8:1



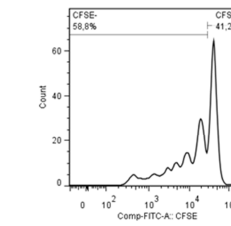
Teff BC1+Treg BC2 1:1, Pred



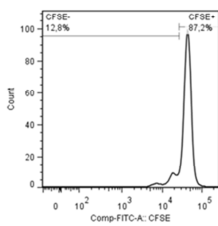
Teff BC1+Treg BC2 2:1, Pred



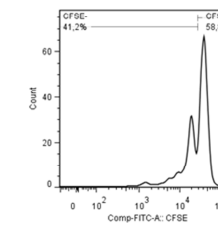
Teff BC1+Treg BC2 4:1, Pred



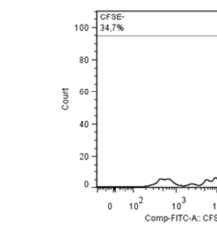
Teff BC1+Treg BC2 8:1, Pred



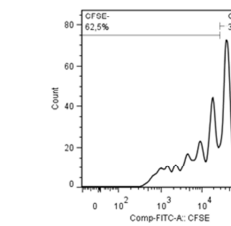
Teff BC1+Treg BC2 1:1, Tac



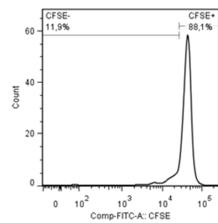
Teff BC1+Treg BC2 2:1, Tac



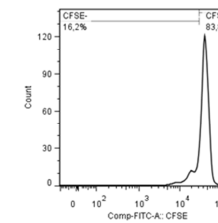
Teff BC1+Treg BC2 4:1, Tac



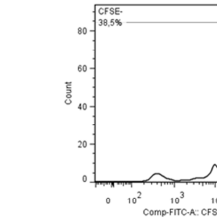
Teff BC1+Treg BC2 8:1, Tac



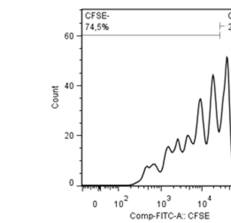
Teff BC1+Treg BC2 1:1, Pred+Tac



Teff BC1+Treg BC2 2:1, Pred+Tac



Teff BC1+Treg BC2 4:1, Pred+Tac



Teff BC1+Treg BC2 8:1, Pred+Tac

Teff # Treg	1 # 0	Ansatz	1 # 1	2 # 1	4 # 1	8 # 1
	84,40%	Kontrolle	48,40%	41,50%	38,50%	73,30%
		Pred	34,40%	52,60%	62,10%	58,80%
		Tac	12,80%	41,20%	34,70%	62,50%
		Pred+Tac	11,90%	16,20%	38,50%	74,50%

Abbildung 23: Testung des Effekts von Immunsuppressiva auf die Suppressionsfähigkeit von Treg

4.4. Testung auf Molekularbiologische Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg

4.4.1. Vorbereitung und Qualitätskontrollen zur Testung auf molekularbiologische Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg

Da bei der Testung der CD52-Expression der einzelnen Patienten bei Patient 20 (keine GVHD) auffiel, dass dieser zum Zeitpunkt der Testung eine Verteilung zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg aufwies (siehe Abbildung 24), die es methodisch möglich erscheinen ließ eine FACS-basierte Sortierung zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg durchzuführen, entschieden wir uns bei diesem Patienten eine Genexpressionsanalyse zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg durchzuführen.

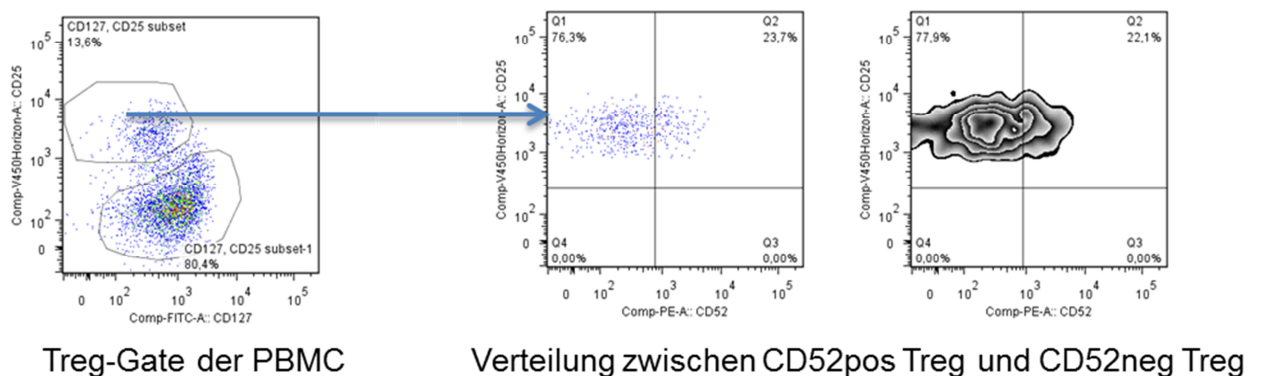


Abbildung 24: Treg und Verteilung zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} bei Patient 20

Die CD3^{pos}CD4^{pos} PBMC wurden MACS-basiert isoliert und per FACS-Sort CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg von einander getrennt und anschließend durchflusszytometrisch eine Reinheitskontrolle der Treg-Populationen durchgeführt (siehe Abbildung 25):

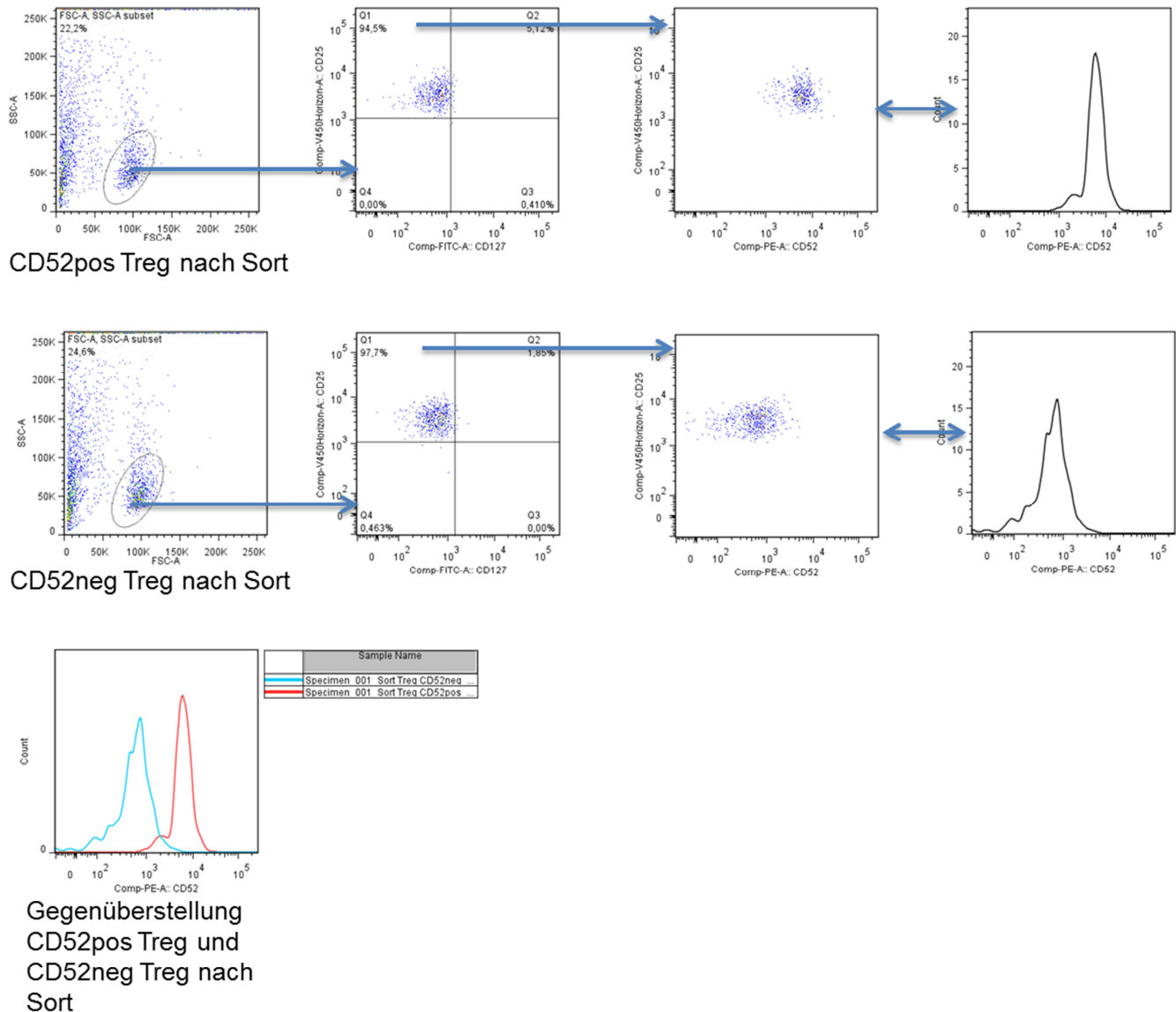
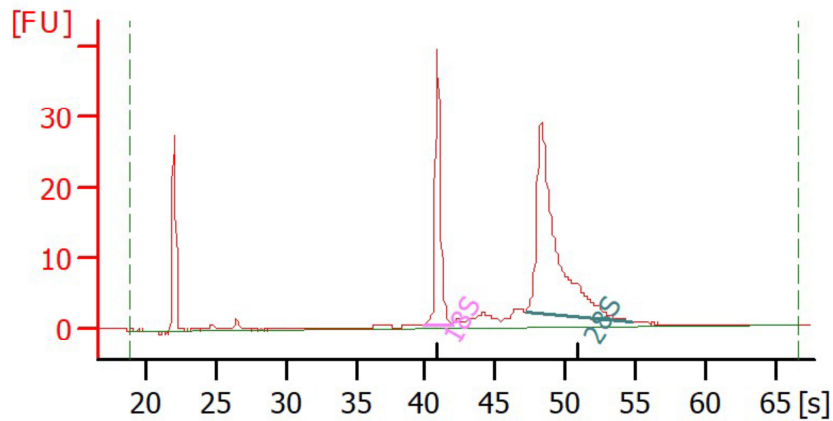
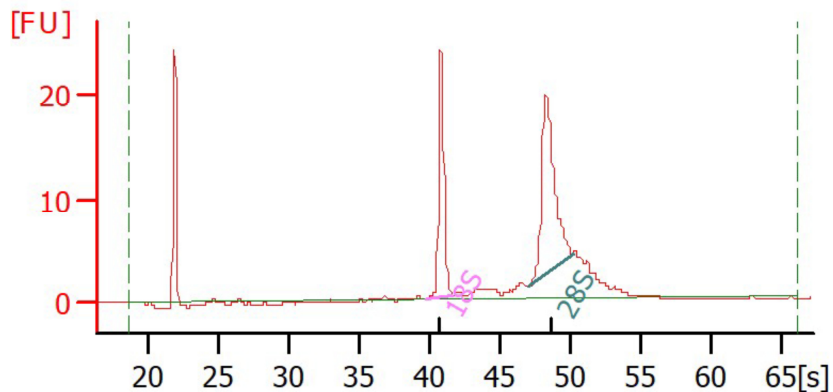


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Reinheitskontrolle nach FACS-basierter Sortierung CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg von Patient 20

Im nächsten Schritt wurde die Qualität der RNS wie unter 3.4.1.2. beschrieben geprüft. Die 28s/18s-Ratio für die RNS von CD52^{neg} Treg lag bei 2,1 und für CD52^{pos} Treg bei 1,5. Bei Werten von >2 kann von einer guten Qualität der isolierten RNS ausgegangen werden, das heißt, dass sie intakt ist und nicht degradiert ist. Der RIN-Wert (RNA integrity number) gibt ebenfalls Informationen über die Qualität der isolierten RNS. Für die CD52^{neg} Treg lag der RIN-Wert bei 9,9 und für die CD52^{pos} Treg bei 9,4, sodass von einer guten Qualität ausgegangen werden kann (siehe Abbildung 26).



Overall Results for sample 1 : Treg CD52neg
 RNA Concentration: 972 pg/ μ l
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2,1
 RNA Integrity Number (RIN): 9.9 (B.02.08)
 Result Flagging Label: RIN: 9.90



Overall Results for sample 2 : Treg CD52pos
 RNA Concentration: 591 pg/ μ l
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1,5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.08)
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Abbildung 26: Qualitätskontrolle der isolierten RNS

Da die RNS in guter Qualität vorlag, wurden wie unter 3.4.1.2. beschrieben die weiteren Schritte zur Genexpressionsanalyse mit dem Illumina HiSeq2500 durchgeführt.

4.4.2. Ergebnisse der Testung auf molekularbiologische Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg

Zunächst sei dargestellt inwieweit sich die Expression der Gene deren Genprodukte zuvor diskutiert wurden unterschied:

Bezüglich der Expression der Gene für CD52 (*CD52*), den pgi-Anker (*PIG*-Gene), GARP (*LRRC32*), ILT3 (*LILRB4*) und HELIOS (*IKZF2*) ließen sich folgende Unterschiede zwischen den beiden Proben feststellen (siehe Tabelle 11):

Gen	Experiment - Difference	Experiment - Fold Change	CD52neg Tregs hg38; Expression values	CD52pos Tregs hg38; Expression values
<i>CD52</i>	-560,0	-1,4	2274,0	1162,7
<i>PIGA</i>	0,4	1,2	2,3	2,1
<i>PIGB</i>	0,4	1,1	4,9	4,5
<i>PIGBOS1</i>	0,2	1,0	10,6	10,4
<i>PIGC</i>	-0,9	-1,1	7,7	7,1
<i>PIGF</i>	-0,6	-1,1	4,8	4,9
<i>PIGG</i>	0,7	1,1	4,9	5,9
<i>PIGH</i>	0,1	1,0	3,1	4,1
<i>PIGK</i>	0,3	1,0	6,4	7,8
<i>PIGL</i>	-0,2	-1,2	1,7	1,2
<i>PIGM</i>	1,0	1,3	3,5	4,6
<i>PIGN</i>	-0,1	-1,1	1,1	1,1
<i>PIGO</i>	0,2	1,0	5,3	5,7
<i>PIGP</i>	-0,3	-1,4	1,3	0,7
<i>PIGQ</i>	-0,5	-1,1	4,2	3,9
<i>PIGS</i>	-1,3	-1,1	21,9	19,9
<i>PIGT</i>	-1,3	-1,2	9,6	6,9
<i>PIGU</i>	-2,7	-1,3	11,9	6,7
<i>PIGV</i>	-0,5	-1,3	2,6	1,6
<i>PIGW</i>	-0,4	-1,2	0,9	1,3
<i>PIGX</i>	-0,9	-1,3	2,4	2,5
<i>PIGY</i>	0,0	1,0	0,0	0,0
<i>PIGZ</i>	-0,2	-6,2	0,4	0,1
<i>LILRB4</i>	0,0	3,9	0,0	0,0
<i>IKZF2</i>	14,7	1,3	36,5	53,3
<i>LRRC32</i>	3,4	1,7	5,4	8,5

Tabelle 11: Unterschiede in der Genexpression zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg für die Gene von CD52 (*CD52*), dem pgi-Anker (*PIG*-Gene), GARP (*LRRC32*), ILT3 (*LILRB4*) und HELIOS (*IKZF2*)

Im nächsten Schritt wurden die Daten, die die höchsten Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} zeigten nach „Experiment-Fold Change“ sortiert um Unterschiede zwischen beiden Proben detektieren zu können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Gen	Experiment - Difference	Experiment - Fold Change	CD52neg Treg, hg38, Expression values	CD52pos Tregs, hg38, Expression values
<i>CLU</i>	-2,7	-18,9	3,8	0,3
<i>HIST1H2AJ</i>	-2,5	-16,1	2,7	0,0
<i>IL26</i>	-2,2	-11,8	3,5	0,3
<i>DTL</i>	-3,8	-11,2	1,4	0,6
<i>TSPAN2</i>	-2,3	-8,4	0,6	0,3
<i>RRM2</i>	-17,2	-8,3	6,1	2,4
<i>MCM10</i>	-2,2	-8,1	0,6	0,4
<i>MYBL2</i>	-9,6	-8,0	3,3	1,5
<i>CDC20</i>	-7,1	-8,0	4,5	1,2
<i>GNLY</i>	-26,1	-7,6	59,2	6,3
<i>GZMA</i>	-31,6	-6,5	28,8	5,3
<i>TYMS</i>	-18,9	-6,4	6,1	3,7
<i>HOPX</i>	-3,4	-6,2	4,1	0,5
<i>CDCA5</i>	-3,8	-6,2	0,6	1,0
<i>FAM111B</i>	-3,3	-5,8	1,5	0,7
<i>CDC45</i>	-2,7	-5,8	1,0	0,8
<i>AC087632.1</i>	-2,8	-5,6	2,9	0,7
<i>CDT1</i>	-5,7	-5,6	3,7	1,6
<i>GIMAP5</i>	-2,7	-5,6	3,7	0,9
<i>PCLAF</i>	-5,9	-5,5	1,7	1,3
<i>RAD51</i>	-2,5	-5,5	0,4	0,6
<i>SULT1A4</i>	-3,3	-5,4	1,3	0,6
<i>UHRF1</i>	-4,7	-5,3	2,0	1,3
<i>ORC1</i>	-2,3	-5,3	1,0	0,6
<i>TRDV1</i>	-2,7	-5,2	4,5	1,3
<i>DLGAP5</i>	-3,4	-5,1	1,1	1,1
<i>PKMYT1</i>	-2,1	-5,1	0,7	0,6
<i>CCNB2</i>	-4,2	-4,9	1,9	0,9
<i>SHCBP1</i>	-2,8	-4,8	1,1	1,1
<i>THEMIS</i>	-8,2	-4,8	5,5	2,1
<i>TK1</i>	-13,4	-4,8	5,9	3,5
<i>E2F1</i>	-3,6	-4,7	2,4	1,0

WDR34	-3,4	-4,7	1,3	1,1
BIRC5	-4,4	-4,7	1,4	1,0
UBE2C	-4,7	-4,6	2,5	1,1
CCNB1	-4,1	-4,6	2,0	1,4
ZWINT	-6,5	-4,4	2,8	2,3
CCNA2	-5,1	-4,3	2,1	1,9
CD40LG	-6,4	-4,1	6,6	2,5
MCM2	-10,1	-4,0	5,9	3,9
SPAG5	-2,7	-3,9	1,4	1,1
CDK1	-3,6	-3,9	2,6	1,2
CORO7-PAM16	-2,1	-3,9	5,5	1,5
GPR25	-11,2	-3,9	14,5	4,2
DUSP5	-2,2	-3,8	2,1	1,0
MKI67	-7,7	-3,8	7,7	3,8
MCM4	-13,1	-3,8	9,0	5,1
ASF1B	-6,5	-3,7	2,4	2,5
AP001458.2	-2,8	-3,7	7,0	2,1
RHOU	-2,4	-3,6	1,9	0,8
ANXA1	-23,2	-3,5	17,9	7,3
C1orf162	-6,0	-3,5	10,2	3,8
COL5A3	-2,9	-3,3	4,7	1,7
UPK3BL1	-3,5	-3,2	4,6	2,0
TPX2	-8,9	-3,2	7,9	4,2
KIFC1	-3,3	-3,2	2,2	1,9
STMN1	-21,1	-3,1	15,0	10,5
TOP2A	-7,2	-3,1	3,1	3,5
AC090527.2	-4,0	-3,1	6,2	3,2
CENPU	-3,5	-3,0	0,8	1,4
PRR11	-3,8	-3,0	4,0	1,7
GINS2	-2,4	-3,0	1,7	1,0
PLK1	-2,9	-3,0	2,2	1,6
FOXM1	-3,2	-3,0	2,1	1,9
AURKB	-3,2	-2,9	1,7	1,8
CCL5	-7,6	-2,9	17,0	3,4
POU2AF1	-2,7	-2,9	1,9	0,9
UBE2T	-3,4	-2,9	4,2	1,8
TC2N	-10,3	-2,8	15,9	7,6
GIMAP8	-3,6	-2,7	4,5	3,1
KIF2C	-2,4	-2,7	3,1	1,9
ST20-MTHFS	-2,7	-2,6	6,2	0,9
MTSS1	-2,9	-2,6	4,9	2,3
TUBA1B	-98,6	-2,6	90,0	59,7
CENPM	-3,7	-2,5	1,6	2,2
PRRG3	-3,6	-2,5	11,1	4,0

AC006978.2	-4,2	-2,5	5,6	1,8
FAM159A	-3,9	-2,5	5,6	2,5
H2AFX	-12,4	-2,5	12,1	10,9
CD38	-3,5	-2,4	4,7	3,3
KIR3DL2	-2,4	-2,4	7,3	2,5
AC010323.1	-7,2	-2,4	3,1	10,4
AC093668.1	-6,8	-2,4	16,2	6,3
FEN1	-6,9	-2,3	4,0	5,1
DHFR	-7,8	-2,3	6,1	4,5
PLPP1	-3,0	-2,3	7,1	2,3
CDCA7	-6,2	-2,3	9,1	5,4
TNFSF8	-5,4	-2,2	7,5	3,7
FABP5	-3,2	-2,2	1,8	2,5
CCR7	-12,0	-2,2	35,8	12,0
LDLOC1	-3,8	-2,2	10,1	1,7
NKG7	-2,7	-2,1	6,5	2,7
DPP4	-11,0	-2,1	14,5	3,9
BUB1	-2,7	-2,1	3,4	3,1
ERAP2	-6,7	-2,1	7,2	7,3
GPR89A	-3,6	-2,1	8,8	3,7
KIF11	-4,8	-2,1	5,8	5,3
TUBB	-64,7	-2,1	92,3	71,7
GLUL	-8,3	-2,0	20,1	12,5
DUT	-8,7	-2,0	13,4	8,3
LIMS2	-3,3	-2,0	6,3	3,3
U2AF1	6,3	2,0	5,3	7,6
KBTBD11	2,6	2,0	3,4	5,9
REC8	9,9	2,0	11,1	32,1
P2RX7	4,6	2,1	4,3	9,8
AC110275.1	2,9	2,1	1,3	2,7
AC040162.1	2,3	2,2	0,5	5,6
IL17RB	3,0	2,2	1,8	9,3
SLFN12	2,1	2,3	1,4	4,8
TSPAN15	3,6	2,5	1,5	6,6
NTNG2	2,7	2,5	2,0	4,8
MDP1	2,6	2,6	1,5	2,9
Z84492.1	6,1	2,6	2,1	6,6
CPT1B	2,2	2,7	1,2	5,3
RAB4B- EGLN2	6,4	2,7	0,0	15,7
PLA2G4B	2,1	2,7	1,3	4,5
GNG8	3,5	2,9	2,1	4,7
B3GALT2	3,3	3,3	1,7	3,8
TNFRSF13B	3,6	3,5	0,3	4,2
AC022826.2	2,9	3,9	0,0	5,4

<i>SOX4</i>	2,6	4,1	0,7	4,1
<i>S100A9</i>	7,1	4,3	0,5	13,5
<i>EPHB6</i>	17,9	4,7	7,1	38,9
<i>TGIF2-C20orf24</i>	3,9	4,9	0,0	2,7
<i>HBA1</i>	6,3	6,0	0,0	8,4
<i>S100A8</i>	3,0	8,1	0,0	5,5
<i>LYZ</i>	15,0	10,2	0,0	23,0
<i>HBB</i>	5,1	11,3	0,0	2,9
<i>HBA2</i>	6,9	16,0	0,0	2,3

Tabelle 12: Darstellung der Genexpression verschiedenen Marker zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg

5. Diskussion

5.1. Methodische Problematik bei der Isolation von Treg und Suppressionstests

Bevor die einzelnen Ergebnisse diskutiert werden, sollen die methodischen Probleme dieses Projektes diskutiert werden. Da es kaum funktionelle Daten zu Treg bei GVHD-Patienten gibt, war es nach Etablierung der Suppressionstests an gesunden Kontrollen mittels Buffy Coats mit sehr großen verfügbaren Zellzahlen und der quasi unerschöpflichen Möglichkeit des Wiederholens eine der größten Herausforderungen diese Tests auf Patientenmaterial zu übertragen, um zum einen die funktionellen Unterschiede zwischen CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg untersuchen zu können und der Frage nachzugehen, ob Treg von Patienten mit GVHD funktionell beeinträchtigte Treg haben:

Wie im Methodenteil beschrieben, isolierten wir für Suppressionstests, die unabhängig vom Konditionierungsregime waren, Treg mit Magnet-gekoppelten Antikörpern (1. Schritt: Negativselektion von Nicht-CD4^{pos}/ CD127^{pos} PBMC; 2. Schritt: Positivselektion von CD25^{pos} PBMC) oder für CD52-basierte Suppressionstests mit Magnet-gekoppelten Antikörpern (Positivselektion von CD4^{pos} PBMC) und anschließender FACS-basierte Zellsortierung der Treg. Ziel war pro Titrationsschritt 50000 Treg zu inkubieren- um die Titrationsschritte zwischen Treg und Treg 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 durchführen zu können, waren folglich pro 93750 Treg pro Patient nötig, für die CD52-basierten Suppressionstests sogar 187500 Treg pro Patient. Die benötigte Anzahl an Treg konnte zumindest bei den CD52-basierten Suppressionstests in nahezu keinem Test erreicht werden. Die Gründe dafür waren vielfältig:

Die Anzahl der Treg beziehungsweise an CD3^{pos}CD4^{pos} PBMC war in Patienten nach aHSZT zum Teil generell sehr niedrig, sodass dies schon eine Limitierung adäquater Zellzahlen sein konnte. Als Limit des abzunehmenden Blutvolumens wurden 100ml festgelegt, um Patienten, die zum Teil post aHSZT niedrige Blutzellzahlen hatten, nicht in Gefahr zu bringen oder zu schaden.

Methodisch war es nicht möglich alle Treg aus einer Zellsuspension zu isolieren. Das Treg-Isolationskit war zwar in der Lage Treg in hoher Reinheit zu generieren, jedoch

waren in der „Negativfraktion“ noch große Mengen an Treg nachweisbar, die nicht isoliert werden konnten (siehe Abbildung 27).

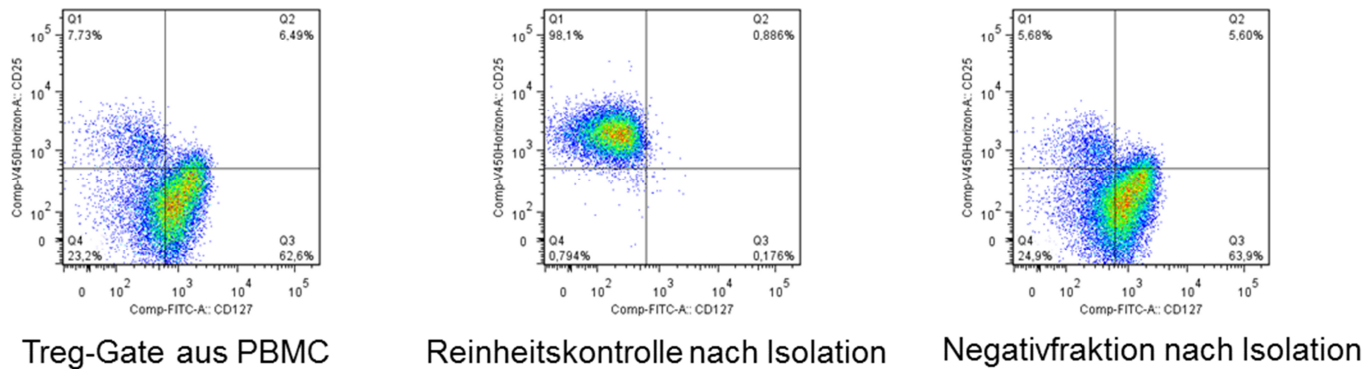


Abbildung 27: Darstellung der Treg-Gates in PBMC, Reinheitskontrolle und Negativfraktion nach MACS-basierter Treg-Isolation

Für die CD52-basierten Suppressionstests konnten wir die höchste Anzahl an Treg isolieren, wenn wir zunächst CD4^{pos} PBMC MACS-basiert isolierten und anschließend eine FACS-Sortierung der CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg durchführten. Auch das CD4-Isolationskit war zwar in der Lage CD3^{pos}CD4^{pos} PBMC in hoher Reinheit zu isolieren, jedoch waren in der Negativfraktion auch große Mengen an CD3^{pos}CD4^{pos} PBMC nachweisbar, die nicht isoliert werden konnten. Es kann als bekannt vorausgesetzt werden, dass MACS-basierte Isolationsverfahren oder auch das FACS-basierte Sortieren von Zellen für menschliche Zellen schädigende Vorgänge sind. Auch nach dem FACS-basierten Sortieren von CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg konnte eine hohe Reinheit der Treg gezeigt werden, jedoch konnte eine hohe Anzahl zerstörter Zellen beziehungsweise Zellfragmente in der anschließenden Reinheitskontrolle gezeigt werden. Im Fall des Suppressionstests von Patient 19 musste der Test sogar wiederholt werden. Es konnten in beiden Fällen keine adäquaten Mengen an Treg isoliert werden. Im FACS-Sorter war nach dem Sortieren eine Zellzahl von circa 10000 CD52^{pos} Treg und 10000 CD52^{neg} Treg gezeigt worden. In der Reinheitskontrolle zeigte sich, dass im vorher festgelegten Lymphozytengate noch 4,21% der CD52^{pos} Treg und 8,57% der CD52^{neg} Treg lagen (siehe Abbildung 28).

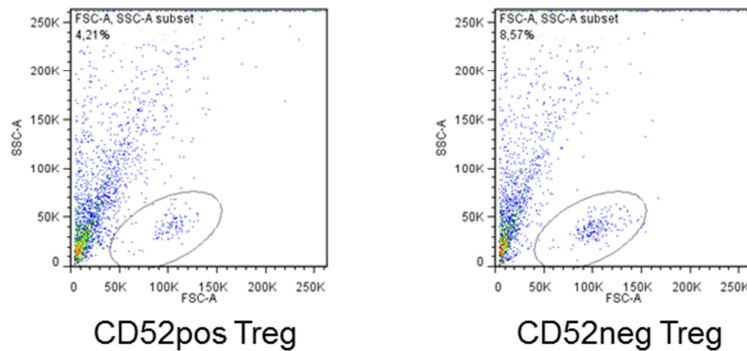


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Darstellung der Treg nach MACS-Isolation und FACS-Sort

Geht man davon aus, dass tatsächlich je 10000 Treg gewonnen werden konnten, was generell wenig wäre und davon nur ca 4,21% beziehungsweise 8,57% lebende Treg sind, ist es nicht verwunderlich, dass in diesem Test keine Suppression durch Treg gezeigt werden konnte.

Ein weiteres Problem bei den CD52-basierten Suppressionstests war die Verteilung von CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg generell. Patienten mit aGVHD hatten zumeist unter 20% CD52^{pos} Treg, sodass eine Isolation adäquater Mengen generell schwierig war. Es war daher nötig auf Patienten 19 und 20 zurückzugreifen, die jedoch keine aGVHD hatten. Patient 20 hatte adäquate Zellmengen. Jedoch zeigten sich hier sogar tendenziell bessere Suppressionseigenschaften der CD52^{neg} Treg im Vergleich zu den CD52^{pos} Treg. Wie im Vorfeld dargestellt fehlen CD52^{neg} Treg die gpi-Anker. Um herauszufinden, warum auch die CD52^{neg} Treg in diesem Versuch adäquat hemmen konnten, nahmen wir Patienten 2 Wochen nach dem Suppressionstest erneut Blut ab und analysierten die Verteilung zwischen CD52 und dem gpi-Anker. Es zeigte sich, dass nahezu alle CD52^{pos} Treg auch gpi-Anker-positiv waren, jedoch auch dass überraschenderweise ein relativ großer Teil der CD52^{neg} Treg in diesem Patienten gpi-Anker-positiv waren (siehe Abbildung 29), was die adäquate Suppressionsfähigkeit dieser Treg erklären könnte.

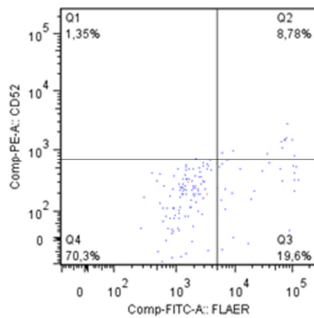


Abbildung 29: Darstellung von CD52 und dem gpi-Anker auf Treg von Patient 2

Da bisher unklar ist, ob CD52 selbst oder der fehlende gpi-Anker eine Funktionsbeeinträchtigung begründen könnte, könnte es sinnvoll sein in einem nächsten Schritt nicht CD52-basiert zu sortieren, sondern gpi-Anker-basiert.

Als letzten Punkt sollten die multifaktoriellen Einflüsse diskutiert werden, die auf Patienten nach aHSZT einwirken, unabhängig davon, ob sie eine aGVHD, cGVHD oder keine GVHD entwickeln. Es gibt bis dato noch keine zusammenfassenden Arbeiten, die den Einfluss von verschiedenen Konditionierungsregimen oder T-Zell-depletierenden Medikamenten auf Treg beschreiben oder verlässlich bewerten beziehungsweise deren Rekonstitutionsverhalten ganzheitlich beschreiben. Daneben gibt es eine Reihe von typischen Komplikationen, die sehr häufig nach aHSZT vorkommen: In der Frühphase und Neutropenie nach aHSZT sind bakterielle Komplikationen häufig (161), während in der späteren Phase vor allem virale Komplikationen, wie CMV-Reaktivierung oder EBV-Reaktivierung relevante Komorbiditäten darstellen (162). Das Immunsystem reagiert auf all diese Ereignisse und es ist möglich, dass Treg dadurch beeinflusst werden und ihre Funktion verbessert oder gehemmt wird. Daneben könnte auch eine iatrogene Beeinflussung der Treg-Anzahl eine Rolle spielen. Außerdem sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass Patienten nach aHSZT eine Reihe an prophylaktischen oder falls nötig therapeutischen Medikamenten verabreicht bekommen, die die Treg-Funktion beeinflussen könnten. Auch in Bezug auf mögliche Medikamenteneinflüsse auf Treg insbesondere im Hinblick auf ein durch die aHSZT neu heranwachsendes Immunsystem ist die Datenlage aktuell spärlich. Scotta et al. beschrieben 2016, dass Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil und Methylprednisolon keinen Einfluss auf den Phänotyp oder die Funktion von Treg haben, jedoch, dass dosisabhängig die Anzahl

lebender Treg und ihre Proliferation von ex vivo in Kultur gehaltenen Treg erniedrigt war (137). In Bezug auf Antimykotika und Treg wiederum findet sich aktuell keine Studie, die deren Einfluss auf Treg untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es methodisch schwierig sein kann adäquate Mengen lebender Treg aus der begrenzten Menge an Patientenblut zu isolieren und dass beachtet werden sollte, dass auf Patienten nach aHSZT unabhängig der Entstehung einer GVHD multiple Einflüsse einwirken, die potentiell die Treg-Funktion verändern könnten und bisher nur sehr unzureichend gezeigt werden konnte, welche Einflüsse, vor allem medikamentös, die Funktionsfähigkeit von Treg beeinflussen. Daneben sei erwähnt, dass einem Patienten nach aHSZT mit zum Teil länger andauernder Blutarmut keine unbegrenzt große Menge an Blut abgenommen werden kann, da dieses die ethischen Grundsätze der Forschung sprengen würde. Andere Patienten, die gegebenenfalls für weitere Tests in Frage gekommen wären, waren zu diesem Zeitpunkt bereits zu krank, sodass es nicht vertretbar gewesen wäre für Forschungszwecke größere Mengen an Blut abzunehmen. Außerdem ist die Zeitspanne in der ein Patient ein Verhältnis zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg hat, welches ein adäquates Sortieren beider Untergruppen ermöglicht hätte, zum Teil sehr kurz. Die Entwicklung von Isolationsverfahren von kleineren Untergruppen von Treg mit möglichst wenigen Arbeitsschritten und Zentrifugationsschritten bei denen immer Zellen verloren gehen und mit hoher Isolationsleistung stellt daher eine Herausforderung dar, die in Zukunft angegangen werden sollte.

5.2. Die Rolle von Treg allgemein und die Rolle von CD52, GARP, ILT3 und HELIOS in Treg nach Alemtuzumab-basierter T-Zell-Depletion.

Regulatorische T-Lymphozyten leisten einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase (1, 85, 163). Es ist bekannt, dass Treg in der Lage sind Teff zu hemmen und daher bei adäquater Funktion in der Lage sind unter anderem Autoimmunkrankheiten zu unterdrücken oder zu verhindern (164) und in einigen Modellen ein erhöhtes Risiko für Rezidive oder Tumorprogress mit regulatorischen T-Zellen in Verbindung gebracht wurde (87). Daneben konnte in vielen Studien eine Rolle bei der Entstehung einer GVHD gezeigt werden (8, 135,

136), jedoch wurden auch in Tumorgeweben erhöhte Treg-Frequenzen festgestellt (87).

In dieser Promotionsschrift konnte ich in einer kleinen Stichprobe zeigen, dass Treg von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation, die eine akute GVHD entwickelten, die Proliferation von Teff schlechter unterdrücken als Treg von gesunden Individuen. Bei Treg von cGVHD Patienten war dies nicht der Fall. In Bezug auf Treg von Patienten mit aGVHD steht das im Einklang mit der Literatur in der mehrheitlich von einer eingeschränkten Treg-Funktion bei Patienten mit aGVHD berichtet wird (3). An dieser Stelle sei angemerkt, dass es auch Autorengruppen gibt, die zeigen konnten, dass Treg von Patienten mit aGVHD eine adäquate Funktion haben (136). Jedoch ist die Datenlage zu diesem Thema uneindeutig und es ist eine Vielzahl von möglichen Gründen beschrieben worden warum Treg von aGVHD Patienten insuffizient sind beziehungsweise warum Veränderungen von Treg zu einer GVHD führen können: Unter anderem wird berichtet, dass sich das Verhältnis von Treg und den anderen Lymphozyten-Untergruppen nach aHSZT „pathologisch“ verändert und es so zur Entstehung einer cGVHD kommen kann (133). Andere Autoren berichten von der Abhängigkeit von Treg von gewissen Markern wie zum Beispiel CD62L (123), dem death receptor 3 (DR3)(165) oder Granzym A (119), die als essentiell für das Verhindern einer GVHD beschrieben werden. Eine größere Stichprobe von Patienten mit aGVHD und cGVHD könnte helfen zu zeigen, ob es sich statistisch beweisen lässt, dass Treg dieser Patienten wirklich schlechter hemmen im Vergleich zu Treg von Gesunden bzw im Vergleich zu Treg von Patienten nach aHSZT, die keine GVHD entwickelten. Im komplexen Zusammenspiel des Immunsystems und der Komplexität der multiplen Einflüsse, die Patienten nach aHSZT erfahren, ist es eine Herausforderung die genauen pathophysiologischen Einflüsse zu erforschen, die für eine mögliche Funktionseinschränkung verantwortlich sind.

Des Weiteren konnte mit dieser Arbeit an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden, dass die Rekonstitution von CD52^{neg} Treg nach Alemtuzumab-basierter T-Zell-Depletion mit dem Auftreten einer aGVHD korreliert. Da keine signifikanten Unterschiede in den relativen Treg-Zahlen vorlagen zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD oder ohne GVHD, liegt es nahe, dass sich CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg funktionell unterscheiden und Einfluss auf die Entstehung einer GVHD nehmen können beziehungsweise dass CD52^{neg} Treg nicht in der Lage sind eine GVHD

adäquat zu unterdrücken. Bereits im Vorfeld konnte durch 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) gezeigt werden, dass CD52^{neg} Treg auch keine gpi-Anker exprimieren. In einer aktuellen Studie von Loeff et al. (166) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die frühe Rekonstitution CD52^{neg} T-Lymphozyten aufgrund des fehlenden gpi-Ankers zustande kommt, als Ursache des GPI-Anker-Verlustes sind dort multiple Mutationen im *PIG-A*-Gen beschrieben. Allerdings wurde die Rolle CD52^{neg} Treg und GVHD nicht untersucht. Zuvor beschrieben bereits Meyer et al. (30) und Garland et al. (167) die Rekonstitution CD52/ gpi-Anker-negativer T-Lymphozyten nach Alemtuzumab-basierter T-Zell-Depletion vor aHSZT.

In Bezug auf den Transkriptionsfaktor HELIOS konnte ich in diesem Forschungsprojekt zwischen CD52^{neg} und CD52^{pos} Treg beziehungsweise GPI-Anker positiven und negativen Treg von Patienten keine Unterschiede feststellen. Allerdings zeigten sich Unterschiede zugunsten der CD52^{pos} Treg beim Aktivierungsmarker GARP und bei ILT3. Es gibt bis dato keine wissenschaftlichen Untersuchungen inwieweit GARP oder ILT3 gpi-Anker-gebunden sind. Schaut man sich zur Verdeutlichung beispielhaft die Lymphozyten von Patient 1 an, so deutet sich an, dass sowohl vor allem ILT3 als auch GARP fast ausschließlich auf CD52^{pos} Lymphozyten beziehungsweise Lymphozyten mit gpi-Anker vorkommen (siehe Abbildung 30).

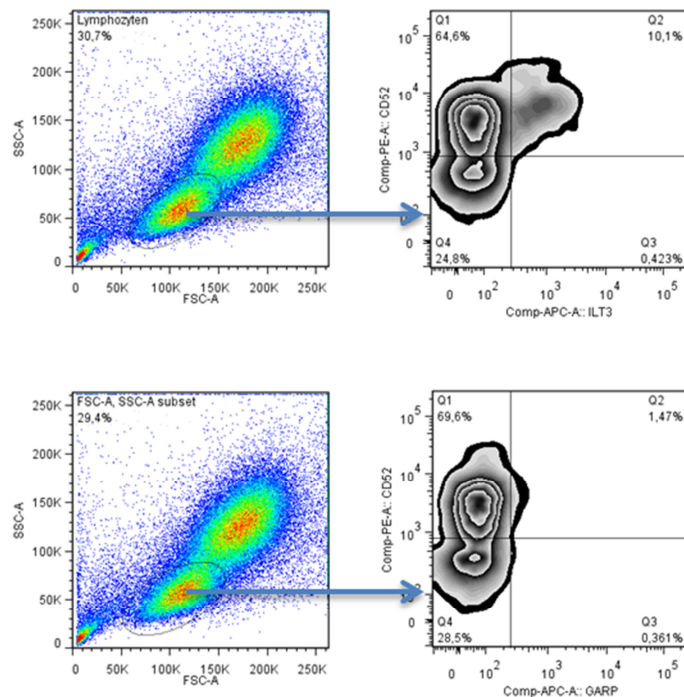


Abbildung 30: Korrelation zwischen CD52 und ILT3 beziehungsweise GARP bei Lymphozyten

In Bezug auf Treg und HELIOS, GARP beziehungsweise ILT3 lassen sich folgende Überlegungen anstellen: HELIOS wird wie weiter oben beschrieben eine herausragende Rolle in der Funktionalität und Regulation von Treg zugeschrieben (103). Ob HELIOS der entscheidende Marker zur Unterscheidung zwischen natürlichen und induzierten Treg ist, ist derzeit nicht eindeutig geklärt (105, 107). In den hier untersuchten Treg konnte ich zwischen 80-100% HELIOS^{pos} Treg nachweisen, unabhängig ob in gesunden Individuen oder Patienten nach aHSZT. Daraus lässt sich schließen, dass HELIOS in diesem Patientenkollektiv keine relevante Rolle in Bezug auf die Entstehung einer GVHD spielt. Anders scheint es in Bezug auf GARP und ILT3 zu sein. Der Aktivierungsmarker GARP (110, 168, 169) konvertiert TGFbeta von seiner latenten Form in die aktive Form (109). GARP wird daher eine unterstützende Rolle der Treg-Funktion zugesprochen. Im hier untersuchten Kollektiv zeigten sich zwischen den Treg von Patienten nach aHSZT und gesunden Individuen keine statistischen Auffälligkeiten, wobei Treg von Patienten ohne GVHD mehr GARP exprimierten als Patienten mit aGVHD. In einem größeren Patientenkollektiv könnte herausgefunden werden ob sich noch größere Unterschiede in Bezug auf GARP zwischen den einzelnen Gruppen zeigen. In Bezug

auf ILT3 zeigte sich, dass CD52^{pos} Treg statistisch auffällig mehr ILT3 exprimierten als CD52^{neg} Treg. Treg von Patienten mit aGVHD zeigten jedoch eine höhere ILT3-Expression als Patienten mit cGVHD oder ohne GVHD oder gesunden Individuen. Bezugnehmend auf die Daten von Ulges et al. (5), die ILT3^{pos} Treg eine Funktionseinschränkung zuwiesen, scheint dies schlüssig in Bezug auf die GVHD-Gruppen. Dass vor allem CD52^{pos} Treg ILT3 exprimieren, spricht allerdings gegen die These, dass CD52^{neg} Treg im Gegensatz zu CD52^{pos} Treg eine Funktionseinschränkung im Sinne der Prävention einer GVHD haben.

Welche Rolle CD52 selbst für die Funktion von T-Lymphozyten und insbesondere für die Treg-Funktion spielt, ist aktuell noch nicht klar belegt. Yang Zhao fasste 2017 104 wissenschaftliche Artikel über die Rolle von CD52 zusammen (170) und kam zu dem Ergebnis, dass CD52 sowohl durch seine intrazellulären Signalkaskaden als auch über lösliches CD52 (engl.: soluble CD52) die Aktivierung von T-Lymphozyten beeinflussen kann.

Schließt man diese Kenntnisse und die Daten des 2018 erschienenen Artikels von Loeff et al. in die Diskussion mit ein, so lassen sich Hinweise auf die widersprüchlichen Ergebnisse der CD52-basierten Suppressionstests generieren: Die Autoren zeigen, dass CD52^{neg} Lymphozyten auch keinen gpi-Anker exprimieren und dies auf eine hohe Mutationsfrequenzen im *PIG-A*-Gen zurückzuführen ist. Trotzdem waren diese CD52^{neg}/ gpi-Anker^{neg} T-Lymphozyten fähig in vitro adäquat auf CMV- und EBV-Infektionen zu reagieren. Abzugrenzen ist diese Arbeit von der Arbeit unserer Forschungsgruppe jedoch, weil in der Arbeit von Loeff et al. ausschließlich zytotoxische und T-Helfer-Lymphozyten untersucht wurden und keine Treg (166). Bezugnehmend auf Abbildung 8 (CD52-Expression innerhalb zytotoxischer T-Lymphozyten, T-Helfer-Lymphozyten und Treg aller gescreenter Patienten (n=20)) sei erwähnt, dass ich auch in den untersuchten Patientenproben CD52^{neg} zytotoxische T-Lymphozyten und CD52^{neg} T-Helfer-Lymphozyten nachweisen konnte. Der Rolle von diesen Zellen muss daher in Bezug auf den potentiellen Einfluss bei einer GVHD ebenso Rechnung getragen werden wie den Treg, was aber in einem anderen Projekt untersucht wird.

Letztlich seien noch die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen diskutiert. Es zeigten sich im Vergleich zwischen den durchflusszytometrischen Analysen und den Genexpressionsanalysen zwischen den CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg andere Ergebnisse als die, die wir aufgrund der Kenntnisse der Proteinlevel, erwartet hätten:

Weder die Expression von der Gene für den gpi-Anker, CD52 noch die der untersuchten Marker ILT3 und GARP wiesen auf die Unterschiede hin, die auf Proteinlevel gefunden wurden. Wie im Ergebnisteil dargestellt, konnte methodisch eine saubere Isolation von CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg erfolgen und eine gute Qualität der isolierten RNA festgestellt werden, was methodische Fehler als relativ unwahrscheinlich erscheinen lässt. Diese Ergebnisse zeigen also ein bisher unklares Bild in Bezug auf die molekularen Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg. Es wird daher nötig sein in einem größeren Kollektiv Genexpressionsanalysen durchzuführen um mehr Wissen über mögliche Unterschiede zwischen diesen Zellen zu generieren. Falls sich die in Tabelle 12 gezeigten Kandidaten auch in noch mehr Patientenproben unterscheiden sollten, kann es lohnenswert sein sich einigen Kandidaten zu widmen und näher zu untersuchen.

5.3. Die Rolle des Serums von GVHD-Patienten und von Serum-Hitzeinaktivierung im Hinblick auf deren Einfluss auf eine antiproliferative Wirkung auf Lymphozyten.

In diesem Projekt konnte ich zeigen, dass das Serum von Patienten mit GVHD einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von Teff hat. Dieser Effekt konnte sowohl beobachtet werden wenn Teff alleine mit T-Zell-Medium inkubiert wurden, welches das Serum von GVHD-Patienten enthielt (direkte Wirkung des Patientenserums) als auch in Suppressionstests bei denen Teff mit Treg gemeinsam in T-Zell-Medium inkubiert wurden, das Serum von GVHD-Patienten enthielt. Im zweiten Ansatz war die Suppression tendenziell sogar stärker ausgeprägt. Dies lässt vermuten, dass das Serum von Patienten mit GVHD Faktoren enthält, die zum einen eine direkte Hemmung der Teff-Funktion vermitteln und zum anderen auch eine zusätzliche indirekte Wirkung über regulatorische T-Zellen triggern. Um eine grundsätzlich hemmende Wirkung von Patienten-Serum nach Transplantation auszuschließen, wurden die gleichen Versuchsansätze mit Serum von Patienten ohne GVHD durchgeführt: Die Seren von Patient 19, 23, 24 und 25 (alle ohne GVHD) wurden untersucht und es zeigten sich adäquate Proliferationsraten der Teff und nur sehr geringe bis gar keine Unterschiede im Vergleich zwischen den Patientenseren und dem Serum gesunder Spender. Da Patienten, die unter einer GVHD leiden, zumeist mit Kortikosteroiden behandelt werden und dieser Fakt für eine Suppression der

Proliferation von Teff verantwortlich sein könnte, wurden vor allem GVHD-Patienten mit nur niedrigen Dosen an Kortikosteroiden für die Versuche ausgewählt (maximal 50mg Prednisolon pro Tag). In der Versuchsanordnung ist ein Einfluss der Immunsuppressiven Therapie jedoch nicht gänzlich auszuschließen. Um den Effekt von immunsupprimierenden Medikamenten auf die Funktion von Treg näher zu untersuchen, wurden Treg mit Prednisolon, Tacrolimus oder beidem für 24 Stunden inkubiert und anschließend deren Funktion in Suppressionstests untersucht. Interessanterweise waren die Treg adäquat in der Lage die Proliferation von Teff zu hemmen, was darauf schließen lässt, dass eine immunsupprimierende Therapie keinen relevanten negativen Einfluss auf die Funktion von Treg und die vorherige Versuchsanordnung hat. Scotta et al. zeigten bereits 2016, dass Kortikosteroide und andere immunsupprimierende Substanzen zwar Dosis-abhängig die Frequenz an lebenden Treg reduzieren, Funktion und Phänotyp aber unverändert blieben (137).

In Bezug auf die Hitzeinaktivierung von Serum ließ sich zeigen, dass die „antiproliferative“ Wirkung von hitzeinaktiviertem Serum teilweise vermindert war, teilweise konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden. Eine Hitzeinaktivierung wurde durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Rolle von Proteinen erhalten zu können, die dadurch denaturiert werden.

Es scheint also der Fall zu sein, dass Substanzen im Serum von Patienten mit GVHD enthalten sind, die einen negativen Effekt auf die Proliferation von Teff haben. In den letzten Jahren sind diverse Publikationen erschienen, die bestimmte Proteine des Serums untersucht haben, die bei Patienten mit GVHD verändert waren: Pidala et al. untersuchten 2017 die Rolle von 42 potentiellen RNA- und 18 potentiellen Protein-Biomarkern in Patienten mit cGVHD und konnten keine Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen zeigen (171). San Min et al. publizieren 2017 ebenfalls eine Studie und zeigten, dass ein Panel aus den Biomarkern Elafin, regenerating islet-derived 3- α , soluble tumour necrosis factor receptor-1, soluble interleukin-2 receptor- α und hepatocyte growth factor statistisch signifikant zwischen Patienten mit aGVHD und ohne GVHD differierte (172). Auch die Gruppe um Zhang et al. beschrieb im selben Jahr, dass einzelne Proteine im Zuge der Entwicklung einer GVHD dynamischen Veränderungen unterworfen sind (173). Trotzdem hat sich bis dato kaum eine Kombination an Serum-Biomarkern etablieren können, die spezifisch die Entstehung einer GVHD voraussagen kann oder Einzug in die tägliche klinische Routine gefunden hat. 2018 publizierten Major-Monfried et al. eine Studie des Mount Sinai

Acute GVHD International Consortium (MAGIC) zu den Biomarkern tumorigenicity-2 (ST2) und regenerating islet-derived protein 3 (α REG3 α), die Aussagen über das Outcome bei steroid-refraktärer GVHD geben und bald Einzug in den klinischen Alltag nehmen sollen (174). Es wird daher nötig sein in Zukunft neben bekannten möglichen Serum-Biomarkern auch neuere Kandidaten zu testen, die verantwortlich für den hier gezeigten antiproliferativen Effekt sein könnten und abzuschätzen inwieweit eine Suppression von T-eff-Proliferation durch das Serum von GVHD-Patienten überhaupt in den Kontext der Entstehung einer GVHD einzuordnen ist. Dazu ist geplant in Kooperation mit Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stefan Tenzer aus dem Institut für Immunologie in Mainz unter anderem mittels Proteom-Analysen und Multizytokin-Analysen zu versuchen die zugrunde liegenden Mechanismen des vorgeschriebenen Serum-Effekts weiter zu entschlüsseln mit dem Ziel mehr Erkenntnisse über die Beeinflussbarkeit oder Vorhersage einer GVHD zu erhalten.

5.4. Klinische Relevanz und Ausblick dieser Forschungsarbeiten

Ich konnte zeigen, dass Treg von Patienten mit aGVHD in Suppressionstests funktionell beeinträchtigt zu sein scheinen. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen der Rekonstitution von CD52^{neg} Treg und der Entstehung einer aGVHD gezeigt werden, die durch die niedrigere Expression von GARP und ILT3 beziehungsweise des gpi-Ankers in CD52^{neg} Treg begründet sein könnte. Daneben wurde ein antiproliferativer Effekt des Serums von GVHD-Patienten gezeigt. Vor allem die CD52-beziehungsweise gpi-Anker-Expression auf T-Lymphozyten kann durchflusszytometrisch schnell und zuverlässig dargestellt werden. Aktuell sammeln wir prospektiv wöchentlich Patientenproben von Patienten, die ein Alemtuzumab-basiertes Konditionierungsregime erhalten haben, um deren Rekonstitution von Lymphozyten in Bezug auf CD52 zu untersuchen. Sollte sich zeigen, dass aufgrund der CD52-Expression das Auftreten einer GVHD mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vorausgesagt werden kann, sollte es möglich sein schon frühzeitig Einfluss auf die Medikation der Patienten, im speziellen auf Immunsuppressiva, zu nehmen, um zu versuchen das Entstehen einer GVHD zu verhindern oder zumindest abzumildern. Außerdem könnte frühzeitig über den Transfer von Treg diskutiert werden. Grundlagenforschung und klinische Studien zu diesem Thema haben aktuell schon neue Konzepte entwickelt: Unter anderem beschrieben Schlöger et al., dass in einem humanisiertem Mausmodell GVHD durch

GP120-aktivierte Treg suffizient behandelt werden könne ohne eine generelle Immunsuppression in der Maus hervorzurufen, die das Risiko für Infektionen oder Rezidive erhöht (175). Andere Studien wie die von Edinger et al. zu Treg-DLIs in der Klinik zeigen in Bezug auf die Behandlung einer GVHD bereits vielversprechende Ergebnisse (6, 141, 142).

Um herauszufinden, ob das Fehlen von CD52 selbst oder das Fehlen des gpi-Ankers beziehungsweise eines gpi-Anker gebundenen Moleküls eine funktionelle Einschränkung von Treg nach Alemtuzumab-basierten Konditionierungsregimen verursacht, könnte experimentell in Treg-Kulturen von Gesunden beispielsweise durch si-RNA, die das CD52-Protein entfernt, untersucht werden oder es könnte die Expression des gpi-Ankers blockiert werden (beispielsweise durch Knock-out des *Pig-A*-Gen) um hier weitere Vergleiche anstellen zu können. Daneben wurde durch die Rolle von soluble GARP diskutiert (113). Eine Möglichkeit wäre zu versuchen Kulturen aus CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg aufzubauen und die Menge an soluble GARP und des assoziierten TGF beta zu quantifizieren. Die Proteinprodukte der in Tabelle 12 gezeigten Gene sollen in Zukunft näher betrachtet werden um deren Einfluss auf mögliche funktionelle Unterschiede zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg herauszufinden. Bevor dies geschieht, ist aber geplant die Genexpression von noch einigen Patientenproben mehr zu untersuchen, um zu sehen, ob sich die Expression einiger Gene auch in einer größeren Gruppe unterscheidet um diese Kandidaten als Grundlage für weitere Forschungsprojekte zu nutzen.

In Bezug auf den Einfluss des Serums auf die Proliferationsfähigkeit von Teff ist geplant einige ausgewählte Zytokine im Serum von Patienten mit aGVHD zu bestimmen und zu vergleichen, ob hier Unterschiede im Vergleich zum Serum von Gesunden oder Patienten nach aHSZT, die keine GVHD entwickelten, vorliegen. Falls es gelingen sollte spezifische Faktoren zu identifizieren, die eine Suppression der Teff-Proliferation unterdrücken, wäre ein nächster Schritt zu identifizieren auf welchen Zelltyp diese Faktoren wirken und inwieweit dies mit der Entstehung einer GVHD vergesellschaftet sein könnte. Ein solcher Faktor könnte dann ex vivo beeinflusst werden und als Therapieoption dem Patienten nützlich sein.

6. Zusammenfassung

Diese Promotionsschrift beschreibt einige Aspekte über die Rolle von Treg in Bezug auf die GVHD nach aHSZT. Es konnten weitere Hinweise dafür erbracht werden, dass Treg in Patienten, die unter einer GVHD leiden, funktionell beeinträchtigt sind: Wie in der Einleitung beschrieben, konnte bereits im Vorfeld gezeigt werden, dass die Rekonstitution CD52^{neg} Treg mit dem Auftreten einer aGVHD korreliert und CD52^{neg} Treg eine geringere Expression des Treg-Aktivierungsmarkers GARP zeigten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD52^{neg} Treg keinen gpi-Anker exprimieren, der das CD52-Molekül auf der Zellmembran fixiert. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrisch bestätigt werden. Neben GARP wurde die Expression zweier anderer Marker untersucht: Die Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors HELIOS zeigte keine auffälligen Unterschiede zwischen CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg. In Bezug auf ILT3, einem Protein, dem eine Rolle in Bezug auf die Suppressionsfähigkeit von Treg zugeschrieben wird, zeigte sich, dass CD52^{pos} Treg statistisch auffällig mehr ILT3 exprimierten im Vergleich zu CD52^{neg} Treg. Die Unterschiede zwischen CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg wurden auch funktionell in Suppressionstests untersucht- bezüglich der Suppressionsfähigkeit beider Gruppen zeigten sich jedoch uneinheitliche Ergebnisse. In einigen Patienten konnte eine verminderte Suppression durch CD52^{neg} Treg bestätigt werden.

Im zweiten Teil wurde die Rolle von Treg unabhängig vom Konditionierungsregime untersucht: Es zeigte sich, dass Treg von Patienten mit akuter GVHD eine verminderte Suppressionsfähigkeit aufwiesen im Vergleich zu Treg von gesunden Probanden. In Bezug auf die chronische GVHD konnte dies nicht gezeigt werden. Um die Rolle des Serums von Patienten mit GVHD in Bezug auf die Proliferationsfähigkeit von Effektor-T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden oben genannte Suppressionstests mit Patientenseren durchgeführt und im direkten Vergleich mit Serum gesunder Spender gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass das Serum von Patienten mit einer akuten GVHD einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von Effektor-T-Lymphozyten zu haben scheint beziehungsweise die supprimierende Funktion von Treg unterstützt. Seren von Patienten nach aHSZT, die keine GVHD entwickelten, zeigten diesen Effekt nicht. Interessanterweise zeigten sich Treg, die mit Kortikosteroiden und/ oder Calcineurin-Inhibitoren inkubiert wurden nicht beeinträchtigt.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass Treg von GVHD-Patienten beeinträchtigt zu sein scheinen, die genauen Mechanismen jedoch noch nicht komplett geklärt sind und dass das Serum von GVHD-Patienten einen bedeutenden Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit von Effektor-T-Lymphozyten hat beziehungsweise die Suppressionsfähigkeit von Treg verstärkt. Diese Effekte sind insbesondere bei Patienten mit akuter GVHD zu beobachten. Aus einem besseren Verständnis der verminderten Treg-Funktion in diesen Patienten hoffen wir in Zukunft prädiktive Marker für die Vorhersage einer akuten GVHD ableiten zu können, und somit auch Patienten zu identifizieren, die sich besonders für therapeutische Ansätze mit regulatorischen T-Zellen eignen.

7. Literatur

1. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(3):108-16.
2. Ramsdell F, Ziegler SF. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(5):343-9.
3. Hoffmann P, Edinger M. CD4+CD25+ regulatory T cells and graft-versus-host disease. *Seminars in hematology*. 2006;43(1):62-9.
4. Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, Park BV, Ceccato CM, Bruno TC, et al. Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS One*. 2012;7(3):e34547.
5. Ulges A, Klein M, Reuter S, Gerlitzki B, Hoffmann M, Grebe N, et al. Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive TH2 responses in vivo. *Nature immunology*. 2015;16(3):267-75.
6. Edinger M, Hoffmann P. Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Current opinion in immunology*. 2011;23(5):679-84.
7. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921-8.
8. Heinrichs J, Bastian D, Veerapathran A, Anasetti C, Betts B, Yu XZ. Regulatory T-Cell Therapy for Graft-versus-host Disease. *Journal of immunology research and therapy*. 2016;1(1):1-14.
9. Giralt S, Bishop MR. Principles and overview of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer treatment and research*. 2009;144:1-21.
10. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *The New England journal of medicine*. 2007;357(15):1472-5.
11. Appelbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL, Graw RG, Levine AS, Deisseroth AB. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood*. 1978;52(1):85-95.
12. Weisdorf D. The role of second transplants for leukemia. *Best practice & research Clinical haematology*. 2016;29(4):359-64.
13. Devillier R, Crocchiolo R, Etienne A, Prebet T, Charbonnier A, Furst S, et al. Outcome of relapse after allogeneic stem cell transplant in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(6):1228-34.
14. de la Morena MT, Gatti RA. A history of bone marrow transplantation. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2010;30(1):1-15.
15. Ho VT, Soiffer RJ. 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.
16. Dickinson AM, Norden J, Li S, Hromadnikova I, Schmid C, Schmetzer H, et al. Graft-versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia. *Frontiers in immunology*. 2017;8:496.
17. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
18. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone marrow transplantation*. 2016;51(6):786-92.
19. Socie G, Clift RA, Blaise D, Devergie A, Ringden O, Martin PJ, et al. Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood*. 2001;98(13):3569-74.
20. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschorner WE, Bias WB, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *The New England journal of medicine*. 1983;309(22):1347-53.

21. Petersen FB, Deeg HJ, Buckner CD, Appelbaum FR, Storb R, Clift RA, et al. Marrow transplantation following escalating doses of fractionated total body irradiation and cyclophosphamide--a phase I trial. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1992;23(5):1027-32.
22. Storb R, Yu C, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, Kiem HP, et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood*. 1997;89(8):3048-54.
23. Barrett AJ, Savani BN. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents. *Leukemia*. 2006;20(10):1661-72.
24. Giralt S. Reduced-intensity conditioning regimens for hematologic malignancies: what have we learned over the last 10 years? *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2005:384-9.
25. Buffart TE, Janssen JJ, Huijgens PC. Reduced-intensity conditioning regimens in malignant haematological diseases. *The Netherlands journal of medicine*. 2005;63(2):43-51.
26. Bornhauser M, Kienast J, Trenscher R, Burchert A, Hegenbart U, Stadler M, et al. Reduced-intensity conditioning versus standard conditioning before allogeneic haemopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia in first complete remission: a prospective, open-label randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(10):1035-44.
27. Platzbecker U, Thiede C, Fussel M, Geissler G, Illmer T, Mohr B, et al. Reduced intensity conditioning allows for up-front allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after cytoreductive induction therapy in newly-diagnosed high-risk acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2006;20(4):707-14.
28. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2009;10(9):855-64.
29. Jakubowski AA, Small TN, Young JW, Kernan NA, Castro-Malaspina H, Hsu KC, et al. T cell depleted stem-cell transplantation for adults with hematologic malignancies: sustained engraftment of HLA-matched related donor grafts without the use of antithymocyte globulin. *Blood*. 2007;110(13):4552-9.
30. 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 transplantation*. 2010;45(4):668-74.
31. Elmaagacli AH, Peceny R, Steckel N, Trenscher R, Ottinger H, Grosse-Wilde H, et al. Outcome of transplantation of highly purified peripheral blood CD34+ cells with T-cell add-back compared with unmanipulated bone marrow or peripheral blood stem cells from HLA-identical sibling donors in patients with first chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2003;101(2):446-53.
32. Waldmann H, Hale G. CAMPATH: from concept to clinic. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005;360(1461):1707-11.
33. Hale G, Cobbold S, Novitzky N, Bunjes D, Willemze R, Prentice HG, et al. CAMPATH-1 antibodies in stem-cell transplantation. *Cytotherapy*. 2001;3(3):145-64.
34. Naparstek E, Delukina M, Or R, Nagler A, Kapelushnik J, Varadi G, et al. Engraftment of marrow allografts treated with Campath-1 monoclonal antibodies. *Experimental hematology*. 1999;27(7):1210-8.
35. Novitzky N, Thomas V, Hale G, Waldmann H. Ex vivo depletion of T cells from bone marrow grafts with CAMPATH-1 in acute leukemia: graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Transplantation*. 1999;67(4):620-6.
36. Chakraverty R, Orti G, Roughton M, Shen J, Fielding A, Kottaridis P, et al. Impact of in vivo alemtuzumab dose before reduced intensity conditioning and HLA-identical sibling stem cell transplantation: pharmacokinetics, GVHD, and immune reconstitution. *Blood*. 2010;116(16):3080-8.

37. Gribben JG, Hallek M. Rediscovering alemtuzumab: current and emerging therapeutic roles. *British journal of haematology*. 2009;144(6):818-31.
38. Novitzky N, Davison G, Abdulla R, Mowla S. Definition of the variables affecting efficacy of immunodepletion ex vivo of peripheral blood progenitor cell grafts by alemtuzumab (Campath in the bag). *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2013;19(12):1753-9.
39. Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, Chakraverty RK, Chakrabarti S, Robinson S, et al. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood*. 2000;96(7):2419-25.
40. Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, Milligan DW, Kottaridis PD, Verfuert S, et al. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood*. 2002;99(3):1071-8.
41. 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.
42. Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, Kottaridis PD, Peggs K, O'Gorman P, et al. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood*. 2002;99(12):4357-63.
43. Chakrabarti S, Milligan DW, Pillay D, Mackinnon S, Holder K, Kaur N, et al. Reconstitution of the Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response following T-cell-depleted myeloablative and nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2003;102(3):839-42.
44. Osterborg A, Foa R, Bezares RF, Dearden C, Dyer MJ, Geisler C, et al. Management guidelines for the use of alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2009;23(11):1980-8.
45. Morgan RD, O'Callaghan JM, Knight SR, Morris PJ. Alemtuzumab induction therapy in kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Transplantation*. 2012;93(12):1179-88.
46. Farney AC, Doares W, Rogers J, Singh R, Hartmann E, Hart L, et al. A randomized trial of alemtuzumab versus antithymocyte globulin induction in renal and pancreas transplantation. *Transplantation*. 2009;88(6):810-9.
47. Yang N, Chen J, Zhang H, Dai Z, Yao H, Ma X, et al. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in immunosuppressive therapy of treatment-naïve aplastic anemia: a systematic review and meta-analysis. *Annals of hematology*. 2017;96(12):2031-43.
48. Baron F, Mohty M, Blaise D, Socie G, Labopin M, Esteve J, et al. Anti-thymocyte globulin as graft-versus-host disease prevention in the setting of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2017;102(2):224-34.
49. Finke J, Schmoor C, Bethge WA, Ottinger H, Stelljes M, Volin L, et al. Long-term outcomes after standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-human-T-lymphocyte immunoglobulin in haemopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: final results of a randomised controlled trial. *The Lancet Haematology*. 2017;4(6):e293-e301.
50. Park SH, Choi SM, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kim SH, et al. Infectious complications associated with alemtuzumab use for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: comparison with anti-thymocyte globulin. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2009;11(5):413-23.
51. Couriel DR, Saliba RM, Giralt S, Khouri I, Andersson B, de Lima M, et al. Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2004;10(3):178-85.
52. Pidala J. Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 2011;18(4):268-76.

53. Valks R, Fernandez-Herrera J, Bartolome B, Fraga J, Dauden E, Garcia-Diez A. Late appearance of acute graft-vs-host disease after suspending or tapering immunosuppressive drugs. *Archives of dermatology*. 2001;137(1):61-5.
54. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *The New England journal of medicine*. 2017;377(22):2167-79.
55. Nassereddine S, Rafei H, Elbahesh E, Tabbara I. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer research*. 2017;37(4):1547-55.
56. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18(4):295-304.
57. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet (London, England)*. 2009;373(9674):1550-61.
58. Lerner KG, Kao GF, Storb R, Buckner CD, Clift RA, Thomas ED. Histopathology of graft-vs.-host reaction (GvHR) in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation proceedings*. 1974;6(4):367-71.
59. Ziemer M, Haeusermann P, Janin A, Massi D, Ziepert M, Wolff D, et al. Histopathological diagnosis of graft-versus-host disease of the skin: an interobserver comparison. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2014;28(7):915-24.
60. Stift J, Baba HA, Huber E, Federmann B, Fischer HP, Schmitt-Graeff A, et al. Consensus on the histopathological evaluation of liver biopsies from patients following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2014;464(2):175-90.
61. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2016;22(1):4-10.
62. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2017;129(1):30-7.
63. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2003;9(4):215-33.
64. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(3):389-401.e1.
65. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11(12):945-56.
66. Pidala J, Vogelsang G, Martin P, Chai X, Storer B, Pavletic S, et al. Overlap subtype of chronic graft-versus-host disease is associated with an adverse prognosis, functional impairment, and inferior patient-reported outcomes: a Chronic Graft-versus-Host Disease Consortium study. *Haematologica*. 2012;97(3):451-8.
67. Sabry W, Le Blanc R, Labbe AC, Sauvageau G, Couban S, Kiss T, et al. Graft-versus-host disease prophylaxis with tacrolimus and mycophenolate mofetil in HLA-matched nonmyeloablative transplant recipients is associated with very low incidence of GVHD and nonrelapse mortality. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2009;15(8):919-29.
68. Lai YR, Chen YH, Hu DM, Jiang M, Liu QF, Liu L, et al. Multicenter phase II study of a combination of cyclosporine a, methotrexate and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis: results of the Chinese Bone Marrow Transplant Cooperative Group (CBMTCG). *Journal of hematology & oncology*. 2014;7:59.

69. Kharfan-Dabaja M, Mhaskar R, Reljic T, Pidala J, Perkins JB, Djulbegovic B, et al. Mycophenolate mofetil versus methotrexate for prevention of graft-versus-host disease in people receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The Cochrane database of systematic reviews. 2014(7):Cd010280.
70. Hamilton BK, Rybicki L, Dean R, Majhail NS, Haddad H, Abounader D, et al. Cyclosporine in combination with mycophenolate mofetil versus methotrexate for graft versus host disease prevention in myeloablative HLA-identical sibling donor allogeneic hematopoietic cell transplantation. American journal of hematology. 2015;90(2):144-8.
71. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, Kasran A, Boon L, Hilbrands LB, et al. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells. Bone marrow transplantation. 2007;39(9):537-45.
72. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. The New England journal of medicine. 1986;314(12):729-35.
73. Perkins J, Field T, Kim J, Kharfan-Dabaja MA, Fernandez H, Ayala E, et al. A randomized phase II trial comparing tacrolimus and mycophenolate mofetil to tacrolimus and methotrexate for acute graft-versus-host disease prophylaxis. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2010;16(7):937-47.
74. Cutler C, Logan B, Nakamura R, Johnston L, Choi S, Porter D, et al. Tacrolimus/sirolimus vs tacrolimus/methotrexate as GVHD prophylaxis after matched, related donor allogeneic HCT. Blood. 2014;124(8):1372-7.
75. Wolff D, Ayuk F, Elmaagacli A, Bertz H, Lawitschka A, Schleuning M, et al. Current practice in diagnosis and treatment of acute graft-versus-host disease: results from a survey among German-Austrian-Swiss hematopoietic stem cell transplant centers. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2013;19(5):767-76.
76. Schneiderman J. Extracorporeal photopheresis: cellular therapy for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease. Hematology American Society of Hematology Education Program. 2017;2017(1):639-44.
77. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Piseshka B, et al. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2006;12(3):267-74.
78. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, van Tol MJ, Contoli B, Zwaginga JJ, et al. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. British journal of haematology. 2013;163(4):501-9.
79. Kuci Z, Bonig H, Kreyenberg H, Bunos M, Jauch A, Janssen JW, et al. Mesenchymal stromal cells from pooled mononuclear cells of multiple bone marrow donors as rescue therapy in pediatric severe steroid-refractory graft-versus-host disease: a multicenter survey. Haematologica. 2016;101(8):985-94.
80. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet (London, England). 2001;357(9270):1777-89.
81. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. The New England journal of medicine. 2000;343(1):37-49.
82. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. The New England journal of medicine. 2000;343(2):108-17.
83. Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, et al. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. Immunity. 2007;27(5):786-800.
84. 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. The Journal of experimental medicine. 2006;203(7):1701-11.

85. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(7):523-32.
86. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(23):8326-31.
87. Whiteside TL. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2014;63(1):67-72.
88. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics*. 2001;27(1):68-73.
89. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wietzorek G, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *European journal of immunology*. 2009;39(4):1088-97.
90. Russell WL, Russell LB, Gower JS. EXCEPTIONAL INHERITANCE OF A SEX-LINKED GENE IN THE MOUSE EXPLAINED ON THE BASIS THAT THE X/O SEX-CHROMOSOME CONSTITUTION IS FEMALE. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1959;45(4):554-60.
91. Godfrey VL, Wilkinson JE, Rinchik EM, Russell LB. Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(13):5528-32.
92. Blair PJ, Bultman SJ, Haas JC, Rouse BT, Wilkinson JE, Godfrey VL. CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1994;153(8):3764-74.
93. Godfrey VL, Rouse BT, Wilkinson JE. Transplantation of T cell-mediated, lymphoreticular disease from the scurfy (sf) mouse. *The American journal of pathology*. 1994;145(2):281-6.
94. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics*. 2001;27(1):20-1.
95. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature immunology*. 2003;4(4):337-42.
96. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 2003. 299: 1057-1061. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2017;198(3):981-5.
97. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 2005;22(3):329-41.
98. Sakaguchi S, Sakaguchi N, 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995;155(3):1151-64.
99. John LB, Ward AC. The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Molecular immunology*. 2011;48(9-10):1272-8.
100. Heizmann B, Kastner P, Chan S. The Ikaros family in lymphocyte development. *Current opinion in immunology*. 2017;51:14-23.
101. Kelley CM, Ikeda T, Koipally J, Avitahl N, Wu L, Georgopoulos K, et al. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol*. 1998;8(9):508-15.
102. Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, et al. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes & development*. 1998;12(6):782-96.
103. Takatori H, Kawashima H, Matsuki A, Meguro K, Tanaka S, Iwamoto T, et al. Helios Enhances Treg Cell Function in Cooperation With FoxP3. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2015;67(6):1491-502.

104. Sebastian M, Lopez-Ocasio M, Metidji A, Rieder SA, Shevach EM, Thornton AM. Helios Controls a Limited Subset of Regulatory T Cell Functions. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2016;196(1):144-55.
105. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2010;184(7):3433-41.
106. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2013;190(5):2001-8.
107. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2012;188(3):976-80.
108. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13439-44.
109. Wang R, Zhu J, Dong X, Shi M, Lu C, Springer TA. GARP regulates the bioavailability and activation of TGFbeta. *Molecular biology of the cell*. 2012;23(6):1129-39.
110. Battaglia M, Roncarolo MG. The Tregs' world according to GARP. *European journal of immunology*. 2009;39(12):3296-300.
111. Edwards JP, Fujii H, Zhou AX, Creemers J, Unutmaz D, Shevach EM. Regulation of the expression of GARP/latent TGF-beta1 complexes on mouse T cells and their role in regulatory T cell and Th17 differentiation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2013;190(11):5506-15.
112. Gauthy E, Cuende J, Stockis J, Huygens C, Lethe B, Collet JF, et al. GARP is regulated by miRNAs and controls latent TGF-beta1 production by human regulatory T cells. *PLoS One*. 2013;8(9):e76186.
113. Hahn SA, Stahl HF, Becker C, Correll A, Schneider FJ, Tuettenberg A, et al. Soluble GARP has potent antiinflammatory and immunomodulatory impact on human CD4(+) T cells. *Blood*. 2013;122(7):1182-91.
114. Shevach EM. Garp as a therapeutic target for modulation of T regulatory cell function. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2017;21(2):191-200.
115. Cella M, Dohring C, Samaridis J, Dessing M, Brockhaus M, Lanzavecchia A, et al. A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *The Journal of experimental medicine*. 1997;185(10):1743-51.
116. Vlad G, Chang CC, Colovai AI, Vasilescu ER, Cortesini R, Suci-Foca N. Membrane and soluble ILT3 are critical to the generation of T suppressor cells and induction of immunological tolerance. *International reviews of immunology*. 2010;29(2):119-32.
117. Suci-Foca N, Cortesini R. Central role of ILT3 in the T suppressor cell cascade. *Cellular immunology*. 2007;248(1):59-67.
118. Adorini L, Penna G. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. *Human immunology*. 2009;70(5):345-52.
119. 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.
120. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008;322(5899):271-5.
121. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225-32.
122. Liu T, Soong L, Liu G, Konig R, Chopra AK. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. *Biology direct*. 2009;4:40.

123. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, et al. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood*. 2005;105(5):2220-6.
124. Oldham KA, Parsonage G, Bhatt RI, Wallace DM, Deshmukh N, Chaudhri S, et al. T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6. *European urology*. 2012;61(2):385-94.
125. Geraldles L, Morgado J, Almeida A, Todo-Bom A, Santos P, Paiva A, et al. Expression patterns of HLA-DR+ or HLA-DR- on CD4+/CD25++/CD127low regulatory T cells in patients with allergy. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2010;20(3):201-9.
126. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, et al. Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood*. 2006;107(7):2830-8.
127. Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, et al. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(12):6216-21.
128. Kwon B, Yu KY, Ni J, Yu GL, Jang IK, Kim YJ, et al. Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(10):6056-61.
129. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature immunology*. 2002;3(2):135-42.
130. Krausz LT, Fischer-Fodor E, Major ZZ, Fetica B. GITR-expressing regulatory T-cell subsets are increased in tumor-positive lymph nodes from advanced breast cancer patients as compared to tumor-negative lymph nodes. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2012;25(1):59-66.
131. Cohen AD, Schaer DA, Liu C, Li Y, Hirschhorn-Cymerman D, Kim SC, et al. Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation. *PLoS One*. 2010;5(5):e10436.
132. Schaer DA, Budhu S, Liu C, Bryson C, Malandro N, Cohen A, et al. GITR pathway activation abrogates tumor immune suppression through loss of regulatory T cell lineage stability. *Cancer immunology research*. 2013;1(5):320-31.
133. 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.
134. Li Q, Zhai Z, Xu X, Shen Y, Zhang A, Sun Z, et al. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leukemia research*. 2010;34(9):1158-68.
135. Zhai Z, Sun Z, Li Q, Zhang A, Liu H, Xu J, et al. Correlation of the CD4+CD25high T-regulatory cells in recipients and their corresponding donors to acute GVHD. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2007;20(5):440-6.
136. Noel G, Bruniquel D, Birebent B, DeGuibert S, Grosset JM, Bernard M, et al. Patients suffering from acute graft-versus-host disease after bone-marrow transplantation have functional CD4+CD25hiFoxp3+ regulatory T cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2008;129(2):241-8.
137. Scotta C, Fanelli G, Hoong SJ, Romano M, Lamperti EN, Sukthankar M, et al. Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells. *Haematologica*. 2016;101(1):91-100.
138. Havari E, Turner MJ, Campos-Rivera J, Shankara S, Nguyen TH, Roberts B, et al. Impact of alemtuzumab treatment on the survival and function of human regulatory T cells in vitro. *Immunology*. 2014;141(1):123-31.
139. Zhang X, Tao Y, Chopra M, Ahn M, Marcus KL, Choudhary N, et al. Differential reconstitution of T cell subsets following immunodepleting treatment with alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal

antibody) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2013;191(12):5867-74.

140. Nguyen VH, Zeiser R, Dasilva DL, Chang DS, Beilhack A, Contag CH, et al. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood*. 2007;109(6):2649-56.

141. 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.

142. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreesen R, et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood*. 2006;108(13):4260-7.

143. Hoffmann P, Eder R, Edinger M. Polyclonal expansion of human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2011;677:15-30.

144. Nikiforow S, Kim HT, Daley H, Reynolds C, Jones KT, Armand P, et al. A phase I study of CD25/regulatory T-cell-depleted donor lymphocyte infusion for relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2016;101(10):1251-9.

145. Noble PB, Cutts JH. Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*. 1967;8(5):110-1.

146. Robinson JP, Roederer M. HISTORY OF SCIENCE. Flow cytometry strikes gold. *Science*. 2015;350(6262):739-40.

147. Galbraith D. Flow cytometry and cell sorting: the next generation. *Methods* (San Diego, Calif). 2012;57(3):249-50.

148. Tran DQ. In vitro suppression assay for functional assessment of human regulatory T cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2013;979:199-212.

149. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231-8.

150. Valet G. Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2003;17(3):213-22.

151. Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*. 1969;166(3906):747-9.

152. Baecher-Allan C. Human CD25high Tregs: isolation by beads versus by FACS sorting. *Clinical immunology* (Orlando, Fla). 2006;120(2):234-5.

153. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and cell biology*. 1999;77(6):499-508.

154. Wilhelm BT, Landry JR. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* (San Diego, Calif). 2009;48(3):249-57.

155. Zwieb C. The principles of RNA structure architecture. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2014;1097:33-43.

156. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(2):560-4.

157. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.

158. Nazar RN, Chen P, Dean D, Robb J. DNA chip analysis in diverse organisms with unsequenced genomes. *Molecular biotechnology*. 2010;44(1):8-13.

159. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*. 2006;7:3.

160. Skrypina NA, Timofeeva AV, Khaspekov GL, Savochkina LP, Beabealashvili R. Total RNA suitable for molecular biology analysis. *Journal of biotechnology*. 2003;105(1-2):1-9.

161. Vavilov VN, Averyanova MY, Bondarenko SN, Stancheva NV, Zubarovskaya LS, Afanasyev BV. [Bacterial infections in the early period after allogeneic bone marrow transplantation]. *Terapevticheskii arkhiv*. 2015;87(7):88-93.

162. Lin R, Liu Q. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of hematology & oncology*. 2013;6:94.
163. Battaglia M, Roncarolo MG. The fate of human Treg cells. *Immunity*. 2009;30(6):763-5.
164. Tao JH, Cheng M, Tang JP, Liu Q, Pan F, Li XP. Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases. *Inflammation*. 2016.
165. Nishikii H, Kim BS, Yokoyama Y, Chen Y, Baker J, Pierini A, et al. DR3 signaling modulates the function of Foxp3+ regulatory T cells and the severity of acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2016;128(24):2846-58.
166. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2018.
167. 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 transplantation*. 2005;36(3):237-44.
168. Probst-Keppler M, Buer J. FOXP3 and GARP (LRRC32): the master and its minion. *Biology direct*. 2010;5:8.
169. Sun L, Jin H, Li H. GARP: a surface molecule of regulatory T cells that is involved in the regulatory function and TGF-beta releasing. *Oncotarget*. 2016;7(27):42826-36.
170. Zhao Y, Su H, Shen X, Du J, Zhang X, Zhao Y. The immunological function of CD52 and its targeting in organ transplantation. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2017;66(7):571-8.
171. Pidala J, Sigdel TK, Wang A, Hsieh S, Inamoto Y, Martin PJ, et al. A combined biomarker and clinical panel for chronic graft versus host disease diagnosis. *The journal of pathology Clinical research*. 2017;3(1):3-16.
172. Min SS, Mehra V, Clay J, Cross GF, Douiri A, Dew T, et al. Composite biomarker panel for prediction of severity and diagnosis of acute GVHD with T-cell-depleted allogeneic stem cell transplants-single centre pilot study. *Journal of clinical pathology*. 2017.
173. Zhang C, Huang W, Zhang P, Zhang Q, Guo G, Gu F, et al. Dynamic changes in serum cytokine levels and their clinical significance in predicting acute GVHD. *Oncotarget*. 2017;8(32):53691-700.
174. Major-Monfried H, Renteria AS, Pawarode A, Reddy P, Ayuk F, Holler E, et al. MAGIC biomarkers predict long term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. *Blood*. 2018.
175. Schloder J, Berges C, Tuettenberg A, Jonuleit H. Novel Concept of CD4-Mediated Activation of Regulatory T Cells for the Treatment of Graft-Versus-Host Disease. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1495.

8. Anhang

Protokolle:

FICOLL-Separationen

Buffy-Coat (BC)

Durchführung:

- 4 x 50ml Röhrchen mit je 15ml Ficoll-Medium befüllen
- BC steril in eine ZK-Flasche überführen
- Volumen auf 140ml mit PBS/ 2mM EDTA auffüllen
- Jedes Röhrchen mit 35ml der Zellsuspension langsam überschichten
- Aufwirbelungen vermeiden, beeinflusst die Auftrennung der Zellen
- zentrifugieren 20 min, 2300 rpm, ohne Bremse, ohne Beschleunigung
- gleiche Anzahl an leeren 50ml Röhrchen vorbereiten
- vorsichtig PBMC-Bande (weißer Ring zwischen Plasma und Ficoll) abnehmen,
→ will man eine Thrombozyten-Kontamination vermeiden sollte man vorher den Plasmaring absaugen
- in 50ml Röhrchen überführen
- mit PBS/ 2mM EDTA auf 50ml auffüllen
- zentrifugieren 8 min, 1800 rpm
- **Achtung:** Pellet noch sehr weich, deshalb unter Sicht abkippen
- Überstand abkippen und auf 50ml mit PBS/ 2mM EDTA auffüllen
- zentrifugieren 5 min, 1500 rpm
- Zellpellets poolen und mit PBS/ 2mM EDTA auf 50 ml auffüllen
- zentrifugieren 5 min, 1500 rpm
- Überstand abkippen
- Zellpellets gut resuspendieren und mit PBS/ 2mM EDTA auf 50ml auffüllen
- Zellen zählen
- Zellen können eingefroren oder direkt weiter verwendet werden
- bei starker Thrombozyten-Kontamination:
→ zentrifugieren 10 min, 1000 rpm, danach 15 min, 800 rpm
- bei Klumpen-Bildung:
→ Zellen über Cell Strainer (70µm) geben

Patienten-Vollblut

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

Einfrieren von Zellen

Ansetzten des Mediums:

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

Durchführung:

- Die Zellen werden abzentrifugiert und dekantiert
- Das Pellet wird mit der jeweiligen Menge an frisch angesetztem Medium resuspendiert
- Die Nunc's mit je 1ml Zellsuspension füllen
- Ohne Verzögerung die Nunc's in Isopropyl-Becher sog. „Frosties“ (im Kühlschrank vorkühlen) stellen. Diese sorgen dafür dass die Temperatur konstant pro Minute um 1°C sinkt. Dadurch bleibt die Kristallbildung sehr gering, und somit werden weniger Zellen zerstört.

Wichtiges:

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

Auftauen von Zellen

Medium:

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

Vorbereitung:

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

Durchführung:

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

- schnelles Arbeiten ohne Unterbrechung

Zellen Zählen

Kammer: Fuchs-Rosenthal-Kammer

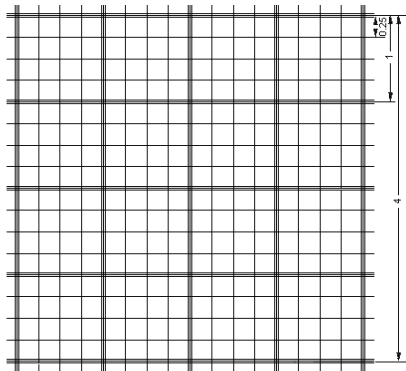
Vorbereitung:

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

Durchführung:

Außerhalb der Flow:

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



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

Gewinnung von Serum

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

Hitzeinaktivierung von Serum

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

Einfrieren von Serum

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

Auftauen von Serum

Vorbereitung:

- Wasserbad (37°C) einschalten

Durchführung:

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

FACS-Färbung

Zellzahl:

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

Durchführung:

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

Anmerkung:

- Die FACS –AK sind steril zu behandeln

Foxp3/ HELIOS-FACS-Färbung

Vorbereitung:

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

Durchführung:

- normale FACS-Färbung durchführen
 - ➔ entsprechende Proben nicht fixieren
- das Pellet in 1ml Perm/Fix resuspendieren
- 30min bei RT inkubieren
- 2x mit Waschpuffer waschen:
 - ➔ Mit 1 ml Waschpuffer auffüllen
 - ➔ 5 min bei 1500 upm zentrifugieren
 - ➔ Dekantieren und aufratschen
- in das Pellet 2µl Serum geben und resuspendieren
- 15 min bei RT inkubieren
- ohne waschen 5µl Foxp3-AK dazu geben
- 30 min bei RT inkubieren
- 2x mit Waschpuffer waschen
 - ➔ Mit 1 ml Waschpuffer auffüllen
 - ➔ 5 min bei 1500 upm zentrifugieren
 - ➔ Dekantieren und aufratschen
- 500-1000µl FACS-Fix pro Tube

- Zellen schnellstmöglich messen (max. 12h)
- Probe gut vortexen

Intrazelluläre FACS-Färbung für CCR5, CTLA4, Granzyme A

Vorbereitung:

- **Waschpuffer:** BD Perm/Wash Puffer (10-fach)
 - ➔ 1:10 verdünnen mit Aqua dest.
 - ➔ benötigte Menge berechnen und ansetzen
 - ➔ 1-2 Tage haltbar bei 4°C
- Die FACS-AK sind steril zu behandeln

Durchführung:

- normale FACS-Färbung durchführen
 - ➔ entsprechende Proben **nicht fixieren**
- das Pellet in 250 µl Cytofix/Cytoperm BD resuspendieren
- 20 min bei 4°C inkubieren
- 2x mit **Waschpuffer** waschen:
 - ➔ Mit 1 ml Waschpuffer auffüllen
 - ➔ 5 min bei 1500 upm zentrifugieren
 - ➔ Dekantieren und aufratschen
- X µl intrazellulären FACS AK direkt auf das Pellet geben
- resuspendieren
- 30 min bei 4°C inkubieren
- 2x mit **Waschpuffer** waschen
 - ➔ Mit 1 ml Waschpuffer auffüllen
 - ➔ 5 min bei 1500 upm zentrifugieren
 - ➔ Dekantieren und aufratschen
- 500-1000µl FACS-Fix pro Tube
- Zellen schnellstmöglich messen (max.12h)
- Probe gut vortexen

MACS-Isolation mittels Säulen

- Säule + Beads von Miltenyi
- **MS- Säule:** 10 mio gelabelte Zellen bei max. 200 mio Zellen insgesamt
- **LS- Säule:** 100 mio gelabelte Zellen bei max. 2 mrd. Zellen insgesamt

Durchführung:

- Zellen auftauen und in Medium waschen
- Nun **auf Eis** arbeiten
- Zellpellet in 10ml kaltem MACS-Puffer (4°C) aufnehmen
- Zellen zählen
- 1500 upm 5 min zentrifugieren,
- dekantieren und aufratschen
- berechnet auf gesamte Zellzahl:
 - ➔ Je 10 mio Zellen in 80 µl MACS-Puffer aufnehmen
 - ➔ Je 10 mio Zellen 20 µl MikroBeads dazugeben
- Probe vortexen
- Bei 4°C für 15 min inkubieren
- Zellen mit 5 ml MACS-Puffer waschen
- 5 min bei 1500 upm, in dieser Zeit
 - ➔ Säulen vorbereiten (Magneten + Filter + Säule) und aufbauen
 - ➔ Negativ- Fraktions-Tubes unter die Säule stellen
- Probe dekantieren und aufratschen
- **500 µl (3ml)** MACS-Puffer in den Filter auf der Säule geben
- Zellpellet in **500 µl (3ml)** MACS-Puffer resuspendieren
- möglichst blasenfrei Probe in den Filter auf der Säule geben
- Durchlaufen lassen, in das „Negativ-Fraktion“-Tube
- Mit **500 µl (3ml)** MACS-Puffer das Tube spülen und in den Filter auf der Säule geben
- Mit **500 µl (3ml)** MACS-Puffer den Filter auf der Säule spülen
- Den Filter werfen
- Mit **500 µl (3ml)** MACS-Puffer nur die Säule spülen
- Säule aus dem Magneten entfernen und auf das „Positiv-Fraktion“-Tube setzen
- Jetzt schnell mit **1000 µl (5ml)** MACS-Puffer und dem Stempel die Zellen eluieren
- Den Stempel steril wieder herausziehen und mit **1000 µl (5ml)** MACS-Puffer den Schritt wiederholen
- Säule werfen und die „Positiv-Fraktion“ zählen
- Zellen bei 1500 upm 5 min abzentrifugieren und im gewünschten Medium aufnehmen.

MACS-Isolation von Treg mittels Säulen

Übernommen und abgeändert aus dem Originalprotokoll des Herstellers Miltenyi Biotec (CD4+CD25+CD127 dim/– Regulatory T Cell Isolation Kit II ,human , Hersteller: Miltenyi Biotec)

Schritt 2 und 3 entsprechen einer Negativselektion von Nicht-CD4positiven/ CD127hochpositiven PBMC

Schritt 4 und 5 entsprechen einer anschließenden Positivselektion von CD25 positiven PBMC

„1. Sample preparation

When working with anticoagulated peripheral blood or buffy coat, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) should be isolated by density gradient centrifugation, for example, using Ficoll-Paque™.

▲ **Note:** To remove platelets after density gradient separation, resuspend cell pellet in buffer and centrifuge at 200×g for 10–15 minutes at 20 °C.

Carefully aspirate supernatant. Repeat washing step.

When working with tissues or lysed blood, prepare a single-cell suspension using standard methods.

For details refer to the protocols section at www.miltenyibiotec.com/protocols.

▲ Dead cells may bind non-specifically to MACS MicroBeads.

To remove dead cells, we recommend using density gradient centrifugation or the Dead Cell Removal Kit (# 130-090-101).

2. Magnetic labeling of non-CD4+ and CD127high cells

▲ Work fast, keep cells cold, and use pre-cooled solutions. This will prevent capping of antibodies on the cell surface and non-specific cell labeling.

▲ Volumes for magnetic labeling given below are for up to 10^7 total cells. When working with fewer than 10^7 cells, use the same volumes as indicated. When working with higher cell numbers, scale up all reagent volumes and total volumes accordingly (e.g. for 2×10^7 total cells, use twice the volume of all indicated reagent

volumes and total volumes).

▲ For optimal performance it is important to obtain a single-cell suspension before magnetic labeling. Pass cells through 30 µm nylon mesh (Pre-Separation Filters, 30 µm, # 130-041-407) to remove cell clumps which may clog the column. Moisten filter with buffer before use.

▲ The recommended incubation temperature is 2–8 °C. Higher temperatures and/or longer incubation times may lead to non-specific cell labeling. Working on ice may require increased incubation times.

1. Determine cell number.
2. Centrifuge cell suspension at 300×g for 10 minutes. Aspirate supernatant completely.
3. Resuspend cell pellet in 40 µL of buffer per 10⁷ total cells.
4. Add 10 µL of CD4+CD25+CD127 dim/– T Cell Biotin-Antibody Cocktail II per 10⁷ total cells.
5. Mix well and incubate for 5 minutes in the refrigerator (2–8 °C).
6. Add 30 µL of buffer and 20 µL of Anti-Biotin MicroBeads per 10⁷ total cells.
7. Mix well and incubate for 10 minutes in the refrigerator (2–8 °C).
8. Adjust the volume to a minimum of 500 µL of buffer.

▲ **Note:** Resuspend up to 10⁸ cells in 500 µL of buffer. For higher cell numbers, scale up buffer volume accordingly. For higher cell numbers, scale up buffer volume accordingly.

9. Proceed to magnetic separation

3. Magnetic separation: Depletion of non-CD4+ and CD127 high cells

▲ Choose an appropriate MACS Column and MACS Separator according to the number of total cells and the number of CD4+CD25+CD127 dim/– cells. For details refer to table in section 1.4.

▲ Always wait until the column reservoir is empty before proceeding to the next step.

Depletion with LD Columns

1. Place LD Column in the magnetic field of a suitable MACS Separator. For details see LD Column data sheet.
2. Prepare column by rinsing with 2 mL of buffer.
3. Apply cell suspension onto the column.
4. Collect unlabeled cells that pass through and wash column with 2×1 mL of buffer. Collect total effluent; this is the unlabeled pre-enriched CD4+ cell fraction. Perform washing steps by adding buffer two times. Only add new buffer when the column reservoir is empty.

4. Magnetic labeling of CD4+CD25+CD127 dim/– regulatory T cells

▲ Volumes for magnetic labeling given below are for an initial starting cell number of up to 10^7 total cells. For higher initial cell numbers, scale up all volumes accordingly.

1. Centrifuge cell suspension at $300\times g$ for 10 minutes. Aspirate supernatant completely.
2. Resuspend cell pellet in 90 μL of buffer per 10^7 total cells.
3. Add 10 μL of CD25 MicroBeads II per 10^7 total cells.
4. Mix well and incubate for 15 minutes in the refrigerator (2–8 °C).
5. (Optional) Add staining antibodies, e.g., 10 μL of CD25-APC (# 130-092-858), 10 μL of CD4-FITC (# 130-080-501), and 10 μL of CD127-PE, and incubate for 5 minutes in the dark in the refrigerator (2–8 °C).
6. Wash cells by adding 1–2 mL of buffer and centrifuge at $300\times g$ for 10 minutes. Aspirate supernatant completely.
7. Resuspend up to 10^8 cells in 500 μL of buffer.

5. Magnetic separation: Positive selection of CD4+CD25+CD127 dim/– regulatory T cells. Positive selection with MS Columns

▲ To achieve highest purities, perform two consecutive column runs.

1. Place MS Column in the magnetic field of a suitable MACS

Separator. For details refer to MS Column data sheet.

2. Prepare column by rinsing with 500 μ L of buffer.
3. Apply cell suspension onto the column. Collect flow-through containing unlabeled cells.
4. Wash column with 3 $\times$ 500 μ L of buffer. Collect unlabeled cells that pass through and combine with the effluent from step 3.
5. Remove column from the separator and place it on a suitable collection tube.
6. Pipette 1 mL of buffer onto the column. Immediately flush out the magnetically labeled cells by firmly pushing the plunger into the column.
7. To increase purity of CD4+CD25+CD127 dim/– cells, the eluted fraction can be enriched over a second MS Column. Repeat the magnetic separation procedure as described in steps 1 to 6 by using a new column.”

CFSE-Färbung

- CFSE = FITC, aber viel höhere Fluoreszenz
- Kein PE im Panel benutzen da keine Kompensation möglich ist
- CFSE stark zelltoxisch, Inkubationszeiten einhalten
- CFSE interkaliert in die DNA

Vorbereitung:

- Medien: FACS-Puffer (PBS+1% BSA+ 2mM EDTA) → **auf 37°C erhitzen**
AIM V + 10%HS
- Auflösen CFSE: 1 Röhrchen mit 18 μ l DMSO lösen
→ c= 5mM, später 0,5mM Endkonzentration

Durchführung:

- Zellen in warmen FACS-Puffer lösen
→ 0,5ml FACS-Puffer / mio Zellen
→ max. 20ml
- 0,5 μ l CFSE-Lsg. / ml FACS-Puffer dazugeben
- gut vortexen
- 10 min bei 37°C inkubieren

- abstoppen mit doppelter Menge AIMV+10%HS (gemessen am FACS-Puffer)
- 5 min bei RT inkubieren
- zentrifugieren 5 min bei 1500 upm und dekantieren
- Wasch-Schritt noch 2x wiederholen (Proteine im Medium binden freies CFSE)

Weiter Schritte:

- Proliferations-Assay: Zellen nicht fixieren, weiter s. Protokoll
- FACS-Messung: Oberflächenmarker Färbung anschließen, Zellen können fixiert werden

Anmerkung:

- frische Zellen sind am besten geeignet
- aufgetaute Zellen: 2-6h in Kulturmedium bei 37°C ruhen lassen
- Kontrollen: Negativ: nur Zellen
 Positiv: Zellen + CFSE ohne weitere Marker

FACS-Sort

- Normale FACS-Färbung durchführen mit den Antikörpern nach denen gesortet werden soll
- Zellen nicht fixieren, sondern in FACS-Puffer oder MACS-Puffer aufnehmen und auf Eis stellen
- Das FACS-Sort-Gerät anschalten und das Pannel nach dem gesortet werden soll einstellen
- Den Sortvorgang starten und die gewünschten Zellpopulationen in FACS-Tubes sammeln. Dabei stets auf Eis arbeiten.
- Nachdem der Sortvorgang beendet ist, Kontroll-FACS für die Reinheit der gesorteten Population.

Suppressionstests

- Gewinnung PBMCs für Teff und für Treg
- Aufreinigung der Treg
 - mittels MACS-Isolation für nicht CD52-basierte Suppressionstests
 - mittels MACS-Isolation von CD3posCD4pos PBMC und anschließend Sort nach CD52pos Treg und CD52neg Treg

Panel für CD52-basierten Sort:

FITC	PE	APC	V450	APC-H7	PE-Cy7
CD127	CD52		CD25		

- CFSE Färbung der Teff

Proliferationsassay

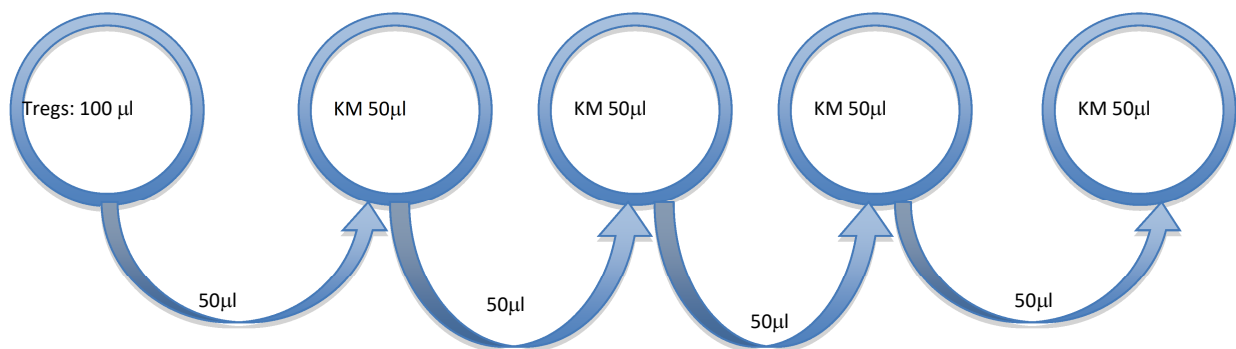
Materialien:

- 96-Well-Platte mit Spitzboden
- 4 Komponenten:
 1. PBMC
 2. Tregs
 3. T-Zell-Medium
 4. OKT3 + IL-2
- Ziel: jeweils 200 µl Gesamtvolumen pro Well
 - bei n Komponenten 200/n µl pro Komponente pro Well
 - jede Komponente so einstellen, dass dann in 200 µl richtige Konzentration
 - z.B. 4 Komponenten, d.h. jede in 200:4 = 50 µl
 - gewünschte Konzentration in 200 µl z.B.: 3µg/ml d.h. in 50 µl auf
 - Ziel: 2×10^4 - 1×10^5 Zellen/ Well (96-Well-Platte mit spitzen Boden)
 - ACHTUNG: Zellen keine Konzentrationen
 - 1×10^5 pro 50 µl im Well; also $c = 2 \times 10^6$ /ml
- Stimulation der T-Zellen mit wird IL2 (100U/ml T-Zell-Medium) und OKT3 (30ug/ml)
- Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 5 Tage

Belegung der 96-Well-Platte

Verhältnis	T-Zellen	Tregs
1:0	1×10^5	0
1:1	1×10^5	$0,5 \times 10^5$
2:1	1×10^5	$0,25 \times 10^5$
4:1	1×10^5	$0,125 \times 10^5$
8:1	1×10^5	$0,0625 \times 10^5$

Titration:



KM: Kulturmedium= T-Zell-Medium

Tag 5:

FACS-Messung der Teff:

Danksagung

Gelöscht für Online-Version

Lebenslauf

Persönliche Daten :

Vor- und Nachname: Pascal Wölfinger

E-Mail: pascal.woelfinger@gmx.de

Geburtstag/-Ort: 09.09.1987 in Bad Soden
(Taunus)

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1994 - 1998 Frauenhofschule, Frankfurt am Main (Grundschule)

1998 - 2007 Eichendorffschule, Kelkheim Taunus (Gymnasium)

Hochschulstudium:

2008 - 2014 Studium der Humanmedizin, Medizinische Universität
Wien

Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.
univ.:
"LNK-Expression in Megakaryozyten in myeloproliferativen
Erkrankungen
(essentielle thrombozythämie)"
durchgeführt am Research Center for Molecular Medicine of the
Austrian
Academy of Sciences bei Frau Prof. Dr. Christine Mannhalter (2011
- 2014)

2007 - 2008 Studium der Rechtswissenschaften, Goethe Universität (Frankfurt am Main)

Besuchte Wahlfächer:

Medizinisch-naturwissenschaftliche Grundlagen

Ernährungsphysiologie

Viktor Frankl Seminar: Logotherapie und Existenzanalyse in der
Praxis

Ultraschall in der Medizin

Leukämie und Lymphome

Klinische und experimentelle Onkologie

Famulaturen:

09/2010 Kliniken des Main-Taunus-Kreises, Bad Soden	Allgemeinchirurgie
09/2011 Nordwestkrankenhaus, Frankfurt am Main	Onkologie/Hämatologie
07/2013 AKH, Wien	Onkologie/Hämatologie
08/2013 AKH, Wien	Pathologie
03/2014 AKH, Wien	Unfallchirurgie

Tertiale:

10/2012 SMZ Ost, Wien	Innere Medizin
11/2012 Wilhelminenspital, Wien	Intensivmedizin
12/2012 SMZ Ost, Wien	Urologie
01/2013 AKH, Wien	Unfallchirurgie
02/2013 St. Josef Krankenhaus, Wien	Allgemeinchirurgie, Orthopädie, Gyn. Chirurgie
09/2013 Universitätsklinikum, Mainz	Pädiatrische Hämatologie, Onkologie
10/2013 Jüdisches Krankenhaus, Berlin	Psychiatrie
11/2013 Jüdisches Krankenhaus, Berlin	Neurologie
12/2013 Waldfriede Krankenhaus, Berlin	Gynäkologie
01/2014 Universitätsklinikum, Frankfurt am Main	Augenheilkunde
01/2014 Horst-Schmidt-Kliniken, Wiesbaden	HNO
02/2014 Universitätsklinikum, Mainz	Dermatologie

Bisherige Beschäftigung als Arzt:

01/15 bis dato: Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Assistenzarzt) III. Medizinische Klinik der Universitätsmedizin Mainz

Interessen und Kenntnisse:

Sprachkenntnisse:	Englisch (fließend)
EDV-Kenntnisse:	Microsoft Word/ Excel/ PowerPoint, EndNote, SSPS (medizinische Statistik)
Hobbys:	Schach spielen, Sport (Rennrad fahren, Fußball spielen), Angeln gehen

Hofheim

Pascal Wölfinger