

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

Bedeutung GPI-Anker negativer regulatorischer T-Zellen in Patienten nach
hämatopoetischer Stammzelltransplantation mit Alemtuzumab

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

Vorgelegt von

Lukas Anton Schäfer
aus Künzelsau

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 12. Juli 2022

Widmung

Für die Patienten. Für Lisa. Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1 Das Immunsystem	3
2.2 Das erworbene Immunsystem	3
2.3 T-Lymphozyten.....	4
2.4 CD4^{pos} T-Helferzellen	5
2.5 Regulatorische T-Zellen, Treg.....	6
2.5.1 Phänotypische Charakterisierung von Treg	7
2.5.2 Entwicklung und Differenzierung von Treg.....	9
2.5.3 Funktionelle Charakterisierung von Treg	10
2.5.4 Oberflächenmarker von Treg	12
2.5.4.1 GARP	12
2.5.4.2 HLA-DR und CD45RA.....	13
2.6 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation	14
2.6.1 Der Ablauf einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation.....	14
2.6.2 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation.....	15
2.6.3 Donor Lymphozyten Infusionen.....	16
2.6.4 Dosisreduzierte Konditionierung kombiniert mit Alemtuzumab-basierter T-Zell- Depletion	17
2.7 Graft-versus-Host-Disease	19
2.7.1 Formen der Graft-versus-Host-Disease	20
2.7.2 Akute Graft-versus-Host-Disease.....	21
2.7.3 Pathophysiologie der akuten Graft-versus-Host-Disease	22
2.7.3.1 Phase 1: Schädigung des Empfängerorgans	23
2.7.3.2 Phase 2: Aktivierung und Differenzierung von Spender-TZ	23
2.7.3.3 Phase 3: Schädigung des Empfängerorgans durch die Konditionierung.....	24
2.7.4 Prophylaxe und Therapie der akuten Graft-versus-Host-Disease.....	24
2.7.5 Chronische Graft-versus-Host-Disease.....	25
2.8 Regulatorische T-Zellen und Graft-versus-Host-Disease nach allogener Stammzelltransplantation	25

3. Material	27
3.1 Laborgeräte	27
3.2 Software	27
3.3 Verbrauchsmaterialien	28
3.4 Chemikalien	28
3.5 Medien und Seren	29
3.6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen	29
3.7 Zytokine und Beads	30
3.8 Kits zur MACS-Isolation, CFSE-Färbung und FOXP3-Färbung	30
3.9 Antikörper	30
3.10 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	31
3.10.1 PBMC gesunder Spender	31
3.10.2 PBMC der Patienten.....	31
4. Methoden.....	34
4.1 Arbeiten an der Zellkultur.....	34
4.2 Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus peripherem Blut (Ficoll)	34
4.3 Zählung von Zellen und Bestimmung der Lebendzellzahl	34
4.4 Durchflusszytometrie (FACS)	35
4.5 Durchflusszytometrische Färbungen.....	35
4.5.1 Färbung von Oberflächenmarkern von Zellen mit Fluoreszenz-Antikörpern (FACS- Färbung).....	35
4.5.2 Intrazelluläre Färbung von FOXP3.....	36
4.5.3 Messung der GARP-Expression nach Stimulation.....	38
4.5.4 Färbung von GPI-Ankern mit fluoreszierendem Aerolysin (FLAER)	38
4.5.5 Färbung von Zellen mit CFSE und Messung der Zellproliferation.....	39
4.6 Durchflusszytometrische Zellsortierung, SORT	40
4.7 Treg-Suppressionstest	40
4.8 Statistische Auswertung	41
4.9 Versicherung über die eigenständige Erarbeitung und Auswertung der in Abschnitt 5 und 6 gezeigten und diskutierten Daten.....	41
5. Ergebnisse	42
5.1 Rekonstitution GPI-Anker ^{neg} , CD52 ^{neg} TZ nach Alemtuzumab-basierter TZD	43
5.2 Rekonstitution von CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ bei Patienten mit aGVHD GVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.....	46
5.3 Rekonstitution CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} CD52 ^{neg} TZ bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.....	47

5.4 Rekonstitution von Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	48
5.4.1 Durchflusszytometrische Identifikation von regulatorischen T-Zellen (Treg).....	48
5.4.2 Absoluter Anteil von Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	49
5.4.3 Relativer Anteil von Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	50
5.5 Rekonstitution von CD52^{neg} Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	51
5.6 Weitere Charakterisierung und Identifikation von Treg-Subpopulationen bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	53
5.6.1 Expression des Oberflächenmarkers GARP auf Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.....	53
5.6.2 Expression der Oberflächenmarker HLA-DR und CD45RA auf Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	56
5.6.2.1 Aktivierte, suppressive HLA-DR ^{pos} CD45RA ^{neg} Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	57
5.6.2.2 HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{neg} - Gedächtnis oder Memory-Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.....	59
5.6.2.3 Naive, HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{pos} Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	61
5.7 Korrelation der Rekonstitution von Treg mit dem klinischen Verlauf einer GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	63
5.7.1 Immunrekonstitution eines Patienten mit aGVHD und cGVHD im Verlauf nach Alemtuzumab-basierter TZD	63
5.7.2 Immunrekonstitution eines Patienten mit aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	65
5.7.3 Immunrekonstitution eines Patienten mit cGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	67
5.7.4 Immunrekonstitution eines Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	69
5.8 Funktionelle Untersuchungen Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD	70
5.8.1 GARP-Expression von CD52 ^{pos} und CD52 ^{neg} Treg im Vergleich nach unspezifischer Stimulation.....	70
5.8.2 Funktionelle Untersuchung von CD52 ^{pos} und CD52 ^{neg} Treg mittels CFSE-basierter Suppressionstest.....	72
5.8.2.1 CFSE-basierter Suppressionstest der CD3 ^{pos} CD4 ^{neg} TZ von Patient 4	73
5.8.2.2 CFSE-basierter Suppressionstest der CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ von Patient 4.....	75

6. Diskussion	78
6.1 Immunrekonstitution nach Alemtuzumab-basierter TZD	78
6.2 Immunrekonstitution von Treg und Entwicklung einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	81
6.2.1 Absoluter und relativer Anteil von Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD	81
6.2.2 Rekonstitution CD52 ^{neg} Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD	83
6.2.3 Rekonstitution CD52 ^{neg} Treg korreliert mit dem klinischen Verlauf einer GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	84
6.3 Rekonstitution von Treg-Subgruppen nach Alemtuzumab-basierter TZD	85
6.3.1 Expression von GARP nach Alemtuzumab-basierter TZD	85
6.3.2 Expression von HLA-DR und CD45RA nach Alemtuzumab-basierter TZD	86
6.3.2.1 Rekonstitution von stark suppressiven, HLA-DR ^{pos} CD45RA ^{neg} Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD	86
6.3.2.2 Rekonstitution von HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{neg} - Gedächtnis oder Memory-Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD	86
6.3.2.3 Rekonstitution von naiven HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{pos} Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD	87
6.4 Funktionelle Untersuchungen der Suppressionsfähigkeit von CD52^{neg}Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD	88
6.5 Treg und die Entwicklung einer cGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD	89
6.6 Methodische Probleme	91
6.6.1 Durchflusszytometrische Identifikation und Isolation von Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD	91
6.6.2 Durchführung der CFSE-basierten Suppressions-Tests	92
6.7 Klinische Bedeutung und zukünftige therapeutische Implikationen	93
7. Zusammenfassung	98
8. Literaturverzeichnis	100
9. Protokolle	123
Danksagung	133
Lebenslauf	134

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: "Timeline Treg cell discovery". Übernommen aus Sakaguchi et al. 2010, Nature Reviews.	6
Abbildung 2: "Treg cell differentiation". Übernommen aus Sakaguchi et al. 2010, Nature Reviews.	8
Abbildung 3: Darstellung der Vorgehensweise zur Analyse.	42
Abbildung 4: Darstellung der CD52 ^{pos} und CD52 ^{neg} CD4 ^{pos} TZ von Patient 5 an Tag 229 nach aHSZT. Beispiel der Gatingstrategie.	43
Abbildung 5: Darstellung der CD52 ^{pos} und CD42 ^{neg} bzw. FLAER ^{pos} und FLAER ^{neg} CD3 ^{pos} und CD4 ^{pos} TZ von Patient 10 an Tag 180 nach aHSZT. Beispiel der Gatingstrategie.	45
Abbildung 6: Entwicklung einer GVHD nach aHSZT der untersuchten Patienten.	46
Abbildung 7: Relativer Anteil CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ (bezogen auf CD3 ^{pos} TZ) bei Patienten mit aGVHD, cGVHD oder keiner GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.	46
Abbildung 8: Relativer Anteil CD3 ^{pos} , CD4 ^{pos} , CD52 ^{neg} TZ (in %, bezogen auf die CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ) bei Patienten mit aGVHD, cGVHD oder keiner GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.	47
Abbildung 9: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von Treg mittels CD25 und inverser Korrelation von CD127 von Patient 33, 202 Tage nach aHSZT.	48
Abbildung 10: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von Treg mittels CD25 und intrazellulärer Färbung von FOXP3 von Patient 33, 202 Tage nach aHSZT.	49
Abbildung 11: Anzahl absoluter Treg (CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} -TZ/l) bei Patienten mit aGVHD, cGVHD oder keiner GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.	50
Abbildung 12: Relativer Anteil Treg (CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} TZ, in % der CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ) bei Patienten mit einer aGVHD, cGVHD oder keiner GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.	51
Abbildung 13: Verteilung von CD52 ^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD25 ^{pos} , FOXP3 ^{pos} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.	52
Abbildung 14: Verteilung von CD52 ^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD25 ^{pos} , CD127 ^{neg} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.	52
Abbildung 15: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von aktivierten, GARP ^{pos} Treg von Patient 5, 105 Tage nach aHSZT.	54
Abbildung 16: Verteilung von GARP ^{pos} -Treg (bezogen auf CD4 ^{pos} FOXP3 ^{pos}) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.	54
Abbildung 17: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg und deren GARP-Expression von Patient 5, 105 Tage nach aHSZT.	55
Abbildung 18: GARP-Expression von CD52 ^{pos} - und CD52 ^{neg} -Treg (bezogen auf GARP ^{pos} CD4 ^{pos} FOXP3 ^{pos}) bei Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD.	55
Abbildung 19: aktivierte GARP ^{pos} CD52 ^{pos} Treg (in %, bezogen auf GARP ^{pos} CD4 ^{pos} FOXP3 ^{pos}) bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.	56
Abbildung 20: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von HLA-DR ^{pos} CD45RA ^{neg} Treg und deren CD52-Expression von Patient 1, 28 Tage nach aHSZT.	57
Abbildung 21: Verteilung von aktivierten, HLA-DR ^{pos} CD45RA ^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD4 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.	57

Abbildung 22: Verteilung der aktivierten CD52 ^{pos} HLA-DR ^{pos} CD45RA ^{neg} Treg (in %, bezogen auf alle HLA-DR ^{pos} CD45RA ^{neg} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.	58
Abbildung 23: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{neg} Treg und deren CD52-Expression von Patient 1, 28 Tage nach aHSZT.	59
Abbildung 24: Verteilung von HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD4 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.	59
Abbildung 25: Verteilung der CD52 ^{pos} HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{neg} Treg (in %, bezogen auf alle HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{neg} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.	60
Abbildung 26: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{pos} Treg und deren CD52-Expression von Patient 1, 28 Tage nach aHSZT.	61
Abbildung 27: Verteilung von HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD4 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.	61
Abbildung 28: Verteilung der CD52 ^{pos} HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{pos} Treg (bezogen auf alle HLA-DR ^{neg} CD45RA ^{pos} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.	62
Abbildung 29: Entwicklung der CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 5 nach 69, 105, 229 und 468 Tagen nach aHSZT.	64
Abbildung 30: Entwicklung der GARP ^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg) bei Patient 5 nach 69, 229 und 468 Tagen nach aHSZT.	64
Abbildung 31: Entwicklung der CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 2 nach 54, 103 und 237 Tagen nach aHSZT.	66
Abbildung 32: Entwicklung der GARP ^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg) bei Patient 2 nach 54, 103 und 237 Tagen nach aHSZT.	66
Abbildung 33: Entwicklung der CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 24 nach 48, 162 und 392 Tagen nach aHSZT.	67
Abbildung 34: Entwicklung der GARP ^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg) bei Patient 24 nach 48, 162 und 392 Tagen nach aHSZT.	68
Abbildung 35: Entwicklung der CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 41 nach 56, 105 und 385 Tagen nach aHSZT.	69
Abbildung 36: Entwicklung der CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg) und deren CD52-Expression bei Patient 41 nach 56, 105 und 385 Tagen nach aHSZT.	70
Abbildung 37: GARP-Expression von CD52 ^{pos} und CD52 ^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD25 ^{pos} CD127 ^{neg} Treg) von Patient 2 vor und 24h nach Stimulation in-vitro.	71
Abbildung 38: GARP-Expression von CD52 ^{pos} und CD52 ^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD25 ^{pos} CD127 ^{neg} Treg) von Patient 6 vor und 24h nach Stimulation in-vitro.	71
Abbildung 39: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation und Messung der Proliferation der CFSE-gefärbten Teff (CD3 ^{pos} CD4 ^{neg} TZ) über Abnahme des CFSE-Gehalts.	73
Abbildung 40: Vergleich der Suppressionsfähigkeit CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg im Ansatz mit CD3 ^{pos} CD4 ^{neg} TZ (Teff) bei Patient 4.	74
Abbildung 41: Proliferation der CD3 ^{pos} CD4 ^{neg} TZ bei Koninkubation mit CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg Patient 4.	74
Abbildung 42: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation und Messung der Proliferation der CFSE-gefärbten Tresp (CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ) über Abnahme des CFSE-Gehalts.	75

Abbildung 43: Vergleich der Suppressionsfähigkeit CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg im Ansatz mit CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ (Tresp) bei Patient 4.	76
Abbildung 44: Proliferation der CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ bei Koninkubation mit CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg Patient 4.	76
Abbildung 45: Durchflusszytometrische Identifikation von CD25 ^{pos} CD127 ^{neg} Treg und CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg über eine intrazelluläre Färbung von FOXP3 von Patient 33.	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schweregradbeurteilung der akuten GVHD nach Organen (modifiziert nach Zeiser et al. 2020 - Onkopedia-Leitlinie „akute GVHD“).	22
Tabelle 2: Gesamtschweregrad der akuten GVHD (mod. nach Glucksberg et al. 1974 und Zeiser et al. 2020 - Onkopedia-Leitlinie „akute GVHD“).	22
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten fluoreszenzmarkierten Ak.	31
Tabelle 4: Übersicht über die untersuchten Patienten mit Angabe über Alter, Geschlecht, Diagnose, Zeitpunkt der Probenentnahme nach aHSZT und GVHD-Entwicklung, Panel, DLI-Gabe und Versterben.	34
Tabelle 5: Panel A zur Identifikation von Treg mittels intrazellulärer Färbung.	37
Tabelle 6: Panel B zur Identifikation von Treg mittels intrazellulärer Färbung.	37
Tabelle 7: Panel C zur Identifikation von Treg ohne intrazelluläre Färbung.	37
Tabelle 8: Panel D zur Identifikation von Treg nach Stimulation.	38
Tabelle 9: Panel E zur Färbung von GPI-Ankern, CD52 und Treg.	39
Tabelle 10: Darstellung des prozentualen Anteils der CD52 ^{pos} und CD52 ^{neg} CD4 ^{pos} TZ (bezogen auf die CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ).	44
Tabelle 11: Entwicklung der CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg (% der CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 5 nach 69, 105, 229 und 468 Tagen nach aHSZT.	64
Tabelle 12: Entwicklung der CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg (in (% der CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 2 nach 54, 103 und 237 Tagen nach aHSZT.	66
Tabelle 13: Entwicklung der CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg und deren CD52-Expression bei Patient 24 nach 48, 162 und 392 Tagen nach aHSZT.	68
Tabelle 14: Entwicklung der CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg) und deren CD52-Expression bei Patient 41 nach 56, 105 und 385 Tagen nach aHSZT.	69
Tabelle 15: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg bei Patient 4.	74
Tabelle 16: Prozentualer Anteil der proliferierenden Teff im Ansatz mit CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg bei Patient 4.	75
Tabelle 17: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg bei Patient 4.	77
Tabelle 18: Prozentualer Anteil der proliferierenden Tresp im Ansatz mit CD52 ^{pos} Treg und CD52 ^{neg} Treg bei Patient 4.	77
Tabelle 19: Durchflusszytometrische Identifikation von CD25 ^{pos} CD127 ^{neg} Treg und CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} Treg über eine intrazelluläre Färbung von FOXP3 von Patient 33.	92

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Ag	Antigen
aGVHD	akute GVHD
aHSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
Ak	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle (englisch: antigen-presenting cell)
Auto-Ak	Autoantikörper
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Unterscheidungsgruppen (englisch: cluster of differentiation)
cGVHD	chronische GVHD
CO₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DC	dendritische Zelle
dest.	destilliert
DLI	Donor Lymphozyten Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie (englisch: fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLAER	fluoreszierendes Aerolysin (fluorescent aerolysin)
FOXP3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	Vorwärtslichtstreuung (englisch: forward scatter)
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (englisch: granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
GPI-Anker	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker
GVHD	Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (englisch: graft-versus-host-disease)
GVL	Transplantat-gegen-Leukämie Reaktion (englisch: graft-versus-leukemia reaction)
KG	Körpergewicht
HLA	humanes Leukozytenantigen

HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation (englisch: hematopoietic stem cell transplantation)
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
MACS	Magnet-assoziierte Zellsortierung (englisch: magnetic activated cell sorting)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (englisch: major histocompatibility complex)
noGVHD	keine/ohne GVHD
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
OKT3	Handelsname für Muromab-CD3, monoklonaler Anti-CD3-Antikörper
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (englisch: peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Phosphatpuffer (englisch: phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
pTreg	periphere regulatorische T-Zelle
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
RIC	dosisreduzierte Konditionierung (englisch: reduced intensity conditioning)
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: rounds per minute)
SCT	Stammzelltransplantation (englisch: stem cell transplantation)
SSC	Seitwärtslichtstreuung (englisch: sideward scatter)
Teff	T-Effektor-Zelle, Effektor-Zellen, CD3 ^{pos} CD4 ^{neg} TZ
TH, THZ	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle, regulatorische T-Zellen
Tresp	T-Responder-Zelle, Responder-Zellen, CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ
Tx	Transplantation
TZ	T-Zelle
TZD	T-Zell Depletion (englisch: T cell depletion)
TZR	T-Zell Rezeptor (englisch: T cell receptor)
u.a.	unter anderem

1. Einleitung

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) stellt für viele maligne hämatopoetische Erkrankungen eine mögliche kurative Therapieoption dar. Bei der allogenen Stammzelltransplantation (aHSZT) werden hämatopoetische Stammzellen eines Fremdspenders asserviert und einem Empfänger nach erfolgter Konditionierung transplantiert, um eine Rekonstitution der Hämatopoese zu ermöglichen. Die aHSZT ist mit vielen Risiken und Komplikationen verbunden. Neben einem Rezidiv der Grunderkrankung und opportunistischen Infektionen zählt die Graft-versus-Host-Reaktion (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion, auf Englisch: Graft-versus-Host disease, GVHD) zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität nach einer aHSZT (Ukena et al. 2011). Die GVHD beruht auf der Bildung von alloreaktiven Spender T-Lymphozyten (T-Zellen, TZ), die sich gegen Zellen und Gewebe des Empfängerorganismus wenden. Um das Risiko für eine GVHD zu senken, wird u.a. der monoklonale CD52-Antikörper (Ak) Alemtuzumab zur T-Zell-Depletion (TZD) eingesetzt. Zellen, die das Oberflächenmolekül CD52 tragen, zu denen alloreaktive T-Lymphozyten zählen, werden von Alemtuzumab gebunden und depletiert. Sie können sich nachfolgend nicht mehr gegen den Empfänger richten und keine GVHD initiieren.

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Patienten, nach Alemtuzumab-Gabe, Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker negative (GPI^{neg}) Effektor-TZ rekonstituieren, welche über Jahre nach der aHSZT nachweisbar bleiben. Da das Oberflächenmolekül CD52 über einen GPI-Anker exprimiert wird, rekonstituieren diese Patienten CD52-negative (CD52^{neg}) TZ (Meyer et al. 2010). Weiter konnte bereits gezeigt werden, dass diese CD52^{neg} TZ funktionell in ihrer antiviralen Funktion beeinträchtigt sind (Kouka 2016). Trotz Einsatz von Alemtuzumab zur TZD entwickeln jedoch weiterhin viele Patienten eine GVHD nach aHSZT.

Pathophysiologisch kann eine GVHD mit einer Störung der Immunhomöostase verglichen werden, bei der es zu einem Ungleichgewicht aus überschießender Aktivität und mangelhafter Regulation kommt (Beres et Drobyski, 2013). Regulatorische T-Zellen (Treg) als Teil des erworbenen Immunsystems wiederum gelten als Vermittler der immunologischen Homöostase und Toleranz. Damit sind sie entscheidend an der Pathophysiologie einer GVHD beteiligt. In anderen Arbeiten konnte dieser Zusammenhang bereits gezeigt werden: Patienten mit einer GVHD scheinen

funktionell beeinträchtigte Treg und/oder eine verringerte Anzahl an Treg aufzuweisen (Hoffmann et Edinger, 2006).

Daher ist das Ziel dieser Arbeit, ein besseres Verständnis für die Bedeutung von Treg für den klinischen Verlauf und die Entwicklung einer GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD zu erhalten. Dabei soll ein Schwerpunkt auf die unterschiedlichen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften CD52-positiver (CD52^{pos}) bzw. GPI-Anker^{pos} (GPI^{pos}) und CD52-negativer (CD52^{neg}) bzw. GPI-Anker^{neg} (GPI^{neg}) Treg gelegt werden. Dazu werden Blutproben von Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD, die eine akute (aGVHD), chronische (cGVHD) oder keine GVHD (noGVHD) entwickeln, im weiteren klinischen Verlauf auf das Vorhandensein von CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg untersucht. Von einzelnen Studienpatienten werden zusätzlich zu mehreren Zeitpunkten nach aHSZT Blutproben asserviert, auf das Vorhandensein von CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg untersucht und mit dem klinischen Verlauf korreliert, um individuelle Patientenverläufe besser charakterisieren zu können. Weiter soll eine Analyse der Expression des Treg-Aktivierungsmarkers GARP (Glycoprotein A repetitions predominant), sowie den Oberflächenmarkern HLA-DR und CD45RA auf CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg erfolgen, um weitere Subpopulationen zu identifizieren und damit eine weitere phänotypische und funktionelle Bewertung zu ermöglichen.

Vor dem Hintergrund der bereits bekannten beeinträchtigten Effektorfunktion bei CD52^{neg} TZ, soll dies auch für CD52^{neg} Treg überprüft werden. Diese Arbeit unternimmt somit den Versuch, CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg funktionell miteinander zu vergleichen.

Die phänotypische und funktionelle Charakterisierung soll insgesamt einen Beitrag zum besseren Verständnis der Bedeutung von Treg bei der Entwicklung einer GVHD im Allgemeinen und im Speziellen für die Bedeutung von CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg für die Entwicklung einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD leisten.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Mai 2020 im British Journal of Haematology veröffentlicht: Woelfinger et al. (2020) CD52-negative T cells predict acute graft-versus-host disease after an alemtuzumab-based conditioning regimen *bjh*.16706

2. Literaturdiskussion

2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus nicht nur vor äußeren Pathogenen wie Bakterien, Viren und Parasiten, sondern auch vor potentiell schädlichen körpereigenen Einflüssen, wie entarteten Zellen oder autoreaktiven Zellen. Insgesamt können vier Hauptaufgaben des Immunsystems unterschieden werden: die Erkennung pathogener Erreger („immunological recognition“) und damit die Unterscheidung zwischen dem Körpereigenen und dem Körperfremden; die eigentliche Immunreaktion, bei der eine Infektion oder ein Erreger eingedämmt und eliminiert wird („immune effector functions“); die Regulation und Kontrolle einer Immunreaktion, um eine überschießenden Immunreaktion zu vermeiden („immune (self-)regulation“). Und schließlich das immunologische Gedächtnis („immunological memory“), damit der Körper bei einem erneuten Kontakt sofort eine spezifische Immunreaktion initiieren kann (Murphy et al. 2012).

Das Immunsystem erfüllt diese Aufgaben über ein komplexes Netzwerk von untereinander interagierenden Immunzellen und löslichen Komponenten. Dieses Netzwerk kann in einen angeborenen, unspezifischen Teil und einen erworbenen, adaptiven und spezifischen Teil unterteilt werden (Murphy et al. 2012).

Der Ursprung aller Immunzellen sind Vorläuferzellen: pluripotente hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark, aus denen sich alle Immunzellen entwickeln und differenzieren. Aus myeloischen Vorläuferzellen entwickeln sich Granulozyten, Makrophagen, Thrombozyten und Erythrozyten. Aus lymphatischen Vorläuferzellen B-Lymphozyten (B-Zellen), T-Lymphozyten (T-Zellen, TZ) und natürliche Killerzellen. Während B-Zellen schon im Knochenmark zu Plasmazellen reifen, wandern Vorläufer der T-Zellen in den Thymus und differenzieren dort über weitere Schritte zu antigenspezifischen CD4- und CD8-positiven TZ. CD (Cluster of differentiation) steht dabei meist für ein zellspezifisches, membrangebundenes Glykoprotein, das nur von einer bestimmten Gruppe von Zellen exprimiert wird und sich daher zur immunphänotypischen Identifikation und Klassifikation von Zellen eignet.

2.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem ist nicht von Geburt an einsatzfähig, sondern benötigt im Vorfeld eine Prägung. Die Immunantwort ist dabei spezifisch und nur gegen das Antigen (Ag), das die Immunreaktion hervorgerufen hat, gerichtet. Vermittelt wird die Immunantwort durch B- und T-Lymphozyten. Charakteristisches Merkmal der B-Zellen

ist ihre Fähigkeit, Ak auf der Oberfläche zu exprimieren und nach ihrer Aktivierung zu sezernieren. Ak gehören zur Klasse der Immunglobuline und haben drei wesentliche Eigenschaften: Sie können einen Erreger oder ein Ag opsonieren und binden, das Komplementsystem aktivieren und den Erreger damit neutralisieren (Neumann 2008, S. 45 ff.). Sie stehen für die humorale Komponente des erworbenen Immunsystems. Die zelluläre Komponente wird durch das Zusammenspiel zwischen B-Zellen, TZ und APC vermittelt. Aber erst über die Verbindung zwischen angeborenem und erworbenen Immunsystem und nachfolgender Ausbildung von Erreger-spezifischen Gedächtniszellen kann ein dauerhafter immunologischer Schutz erreicht werden.

2.3 T-Lymphozyten

TZ wandern nach Bildung im Knochenmark zur weiteren Differenzierung in den Thymus und sind durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD3 charakterisiert und definiert (Delves et Roitt 2000). TZ haben allgemein die Fähigkeit, mit Hilfe ihres T-Zell Rezeptors (TZR) und CD3, Peptide (Ag), die über MHC-Moleküle präsentiert werden, zu erkennen (Parkin et Cohen, 2011). Die Entstehung des TZR erfolgt über somatische Rekombination. Dabei werden für den TZR-codierende Genabschnitte umgelagert, wodurch eine mehr oder weniger zufällige Anordnung der Gene entsteht. Dadurch entsteht ein großes Repertoire an TZR, welche verschiedenste Ag binden können (Kaye et al. 1991, Kersh et al. 2001). Dies kann aber auch dazu führen, dass TZ entstehen, die mit ihrem TZR körpereigene Ag erkennen. Diese TZ werden als autoreaktive TZ bezeichnet und können nach Bindung körpereigener Strukturen eine Immunreaktion gegen selbige initiieren, was als Autoimmunerkrankung bezeichnet wird. Entscheidend ist daher die Ausbildung einer Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen, die als Selbsttoleranz bezeichnet wird. Darunter versteht man allgemein die Fähigkeit des Immunsystems, körpereigene Stoffe bzw. Ag als solche zu erkennen und gegenüber körperfremden zu unterscheiden. Selbsttoleranz ist dabei immer spezifisch für ein Ag, während z.B. die medikamentöse Immunsuppression zur Aufrechterhaltung einer Toleranz nach Organtransplantation immer unspezifisch ist (Monteiro et al. 2016). Um das Auftreten von Autoimmunerkrankungen zu verhindern und eine Toleranz aufzubauen, durchlaufen TZ während ihrer Entwicklung im Thymus einen Selektionsprozess. Bei der positiven Selektion werden TZ, die körpereigene MHC-Moleküle mit einer ausreichenden Affinität binden können, selektiert, während TZ, deren TZR MHC-Moleküle nicht erkennen kann, apoptotisch werden. Weiter werden TZ, die körpereigene Peptide binden können, ebenfalls apoptotisch. Dies wird

als negative Selektion bezeichnet und soll das Auftreten von autoreaktiven TZ verhindern (Starr et al. 2003). Positive und negative Selektion zählen zu den Formen der zentralen Toleranz. Dennoch kann es vorkommen, dass autoreaktive TZ entstehen, die den Selektionsprozess überleben und in die Peripherie gelangen, womit das Risiko für die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung besteht (Bouneaud et al. 2000; Mason 2001). Neben der zentralen Toleranz verfügt der Körper zusätzlich über Mechanismen der peripheren Toleranz, um autoreaktive TZ zu kontrollieren bzw. eine Toleranz gegenüber körperfremden Stoffen zu etablieren. Die periphere Toleranz wird u.a. über immunsuppressive Zellpopulationen vermittelt, wozu Treg zählen (Sakaguchi et al. 2007; Wing et Sakaguchi 2012). Neben der Entwicklung des TZR erfolgt im Thymus zudem die Differenzierung der beiden Hauptpopulationen von TZ: CD4-positive ($CD4^{pos}$) und CD8-positive ($CD8^{pos}$) TZ. Nach der weiteren Differenzierung im Thymus zirkulieren die naiven TZ im Blut und in den peripheren lymphatischen Organen (Ferenčík 2006, S. 57). Nach der Aktivierung entwickeln sich $CD8^{pos}$ TZ zu zytotoxischen TZ, welche die Aufgabe haben, mit Viren infizierte oder entartete, nicht funktionsfähige körpereigene Zellen zu eliminieren; $CD4^{pos}$ TZ werden zu T-Helferzellen.

2.4 $CD4^{pos}$ T-Helferzellen

$CD4^{pos}$ T-Helferzellen haben eine wichtige Funktion bei der Vermittlung von adaptiven Immunreaktionen, indem sie, die von APCs über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentierten Ag erkennen können und dadurch aktiviert werden. Sie wirken vor allem immunmodulatorisch über die Sekretion von Zytokinen, welche andere Immunzellen aktivieren können. Nach Aktivierung können sich naive $CD4^{pos}$ TZ in verschiedene T-Helferzellen-Gruppen differenzieren. Zu dieser heterogenen Gruppe gehören u.a. T-Helfer-1- (Th1), T-Helfer-2-Zellen (Th2) und Treg. Die Entscheidung, in welche T-Helferzelle sich die naive $CD4^{pos}$ TZ entwickelt, wird durch das umgebende Zytokinmilieu bestimmt. Die einzelnen T-Helferzellen wiederum unterscheiden sich nicht nur in ihrem Phänotyp, sondern auch in ihren funktionellen Eigenschaften und den Zytokinen, die sie sezernieren (Zhu et al. 2010; Mosmann and Coffmann 1989; Bottomly 1988).

2.5 Regulatorische T-Zellen, Treg

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, ist die Aufrechterhaltung einer Selbsttoleranz essentiell für den menschlichen Körper. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten zur Etablierung einer peripheren Toleranz, am wichtigsten ist jedoch die aktive Regulation oder Suppression von autoreaktiven Zellen durch immunsuppressive Zellen. Diese immunsuppressiven Zellen, die Immunantworten gegenüber eigenen und fremden Ag hemmen und begrenzen, werden als regulatorische T-Zellen (Treg) bezeichnet (Josefowicz et al. 2012, Sakaguchi et al. 2011). Die Existenz von immunregulatorischen Zellen, sogenannte „Suppressorzellen“, wurde erstmals in den 1970er Jahren aufgegriffen und diskutiert, jedoch ohne eine bestimmte Zellpopulation identifizieren zu können. Gershon und Kondo konnten damals zeigen, dass die Entwicklung einer Toleranz abhängig von Lymphozyten aus dem Thymus und nicht etwa abhängig von B-Lymphozyten ist (Gershon et Kondo 1970). Schließlich war es die Gruppe um Sakaguchi, die 1995 eine immunsuppressive T-Zell-Population innerhalb der CD4^{pos} TZ charakterisieren konnte, die konstitutiv den Oberflächenmarker CD25 exprimiert (Sakaguchi et al. 1995). Das Oberflächenmolekül CD25 entspricht der alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2). CD25 wird von ungefähr 5-10% aller reifen CD4^{pos} TZ exprimiert. Sakaguchi konnte zudem zeigen, dass eine Depletion von CD25 in Mäusen zur Entstehung einer schweren generalisierten Autoimmunreaktion führt, die wiederum durch Transfusion von CD25^{pos} TZ verhindert werden konnte. Die von Sakaguchi beschriebene T-Zell-Population hat daher nicht nur immunsuppressive Eigenschaften, sondern nimmt insgesamt eine immunmodulatorische Funktion innerhalb des Immunsystems ein und ist essentiell für die Aufrechterhaltung und Funktion des Immunsystems.

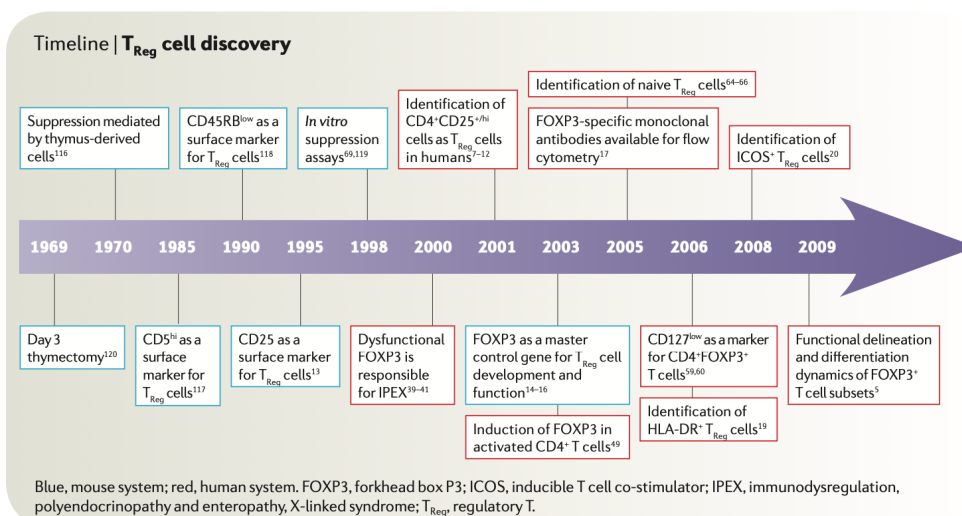


Abbildung 1: "Timeline Treg cell discovery". Übernommen aus Sakaguchi et al. 2010, Nature Reviews.

2.5.1 Phänotypische Charakterisierung von Treg

Die Erstbeschreibung und Identifikation von Treg erfolgte zu Beginn über das Oberflächenmolekül CD25. Es zeigte sich jedoch, dass die alleinige Verwendung von CD25 und CD4 zur Identifikation von Treg nicht ausreichend ist, da auch aktivierte Effektor-TZ CD25 exprimieren können (Sakaguchi et al. 2010). Im Jahr 2003 entdeckten mehrere Gruppen unabhängig voneinander den Transkriptionsfaktor FOXP3 aus der forkhead-Familie. FOXP3 ist essentiell für die Entwicklung und Funktion von Treg und eignet sich als linienspezifischer Marker zur Identifikation (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Khattri et al. 2003). Fehler oder Mutationen im FOXP3-Gen führen zur Entwicklung von schwerwiegenden Autoimmunerkrankungen; beim Menschen zur Entwicklung des IPEX-Syndroms (immune dysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome) (Bennett et al. 2001). Betroffene Patienten entwickeln bereits in den ersten Lebensmonaten verschiedene Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, Entzündungen von Haut und Schilddrüse sowie Enteropathien, die zu Wachstumsstörungen und Mangelerscheinungen führen können. Die Ursache des IPEX-Syndroms sind dysfunktionale Treg aufgrund von Mutationen des FOXP3-Gens (Gambineri et al. 2003).

Doch auch die Verwendung von FOXP3 zur Identifikation von Treg ist unter Umständen problematisch: Wang et al. konnten zeigen, dass aktivierte TZ vorübergehend FOXP3 exprimieren können, ohne sich in einen regulatorischen Phänotyp zu entwickeln (Wang et al. 2008). Außerdem verhindert die alleinige Verwendung von FOXP3 weitere Charakterisierungen, da Treg für die intrazelluläre FOXP3-Färbung permeabilisiert werden müssen und nicht mehr für funktionelle Untersuchungen verwendet werden können. Die Identifikation von Treg kann jedoch unter Zuhilfenahme des Oberflächenmarkers CD127 erfolgen, der für alpha-Kette des IL-7-Rezeptors steht (Liu et al. 2006, Seddiki et al. 2006). Liu et al. konnten zeigen, dass man unter Zuhilfenahme der CD127-Expression $CD25^{pos}$ und $CD4^{pos}$ Treg von aktivierten $CD25^{pos}$ TZ unterscheiden kann: Es besteht ein inverses Verhältnis zwischen der CD127- und CD25-Expression: $CD25^{pos}$ Treg zeigen eine verminderte (Englisch: downregulation) oder negative CD127-Expression. FOXP3 scheint dabei mit dem Promoter von CD127 zu interagieren und damit die Expression von CD127 zu vermindern. Hofmeister et al. konnten zudem zeigen, dass die Expression von CD127 nach T-Zell-Aktivierung in vitro abnimmt (Hofmeister et al. 1999). Damit kann CD127 als Biomarker zur Identifikation von Treg verwendet werden (Ardon et al. 2010;

Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006; Codarri et al. 2007; Hartigan-O'Connor et al. 2007; Hoffmann et al. 2007; Miyara and Sakaguchi, 2007).

Zusammengefasst können Treg somit durchflusszytometrisch als CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ und FOXP3-positive (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) oder als CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ positive und CD127-negative (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{neg/int}) Zellen identifiziert werden.

Neben CD25 exprimieren Treg noch eine Reihe weiterer Oberflächenmarker, anhand derer eine Identifikation und Unterscheidung möglich ist. U.a. exprimieren Treg CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), membran-gebundener Transformierender Wachstumsfaktor- β (transforming growth factor (TGF)- β), OX-40, glucocorticoid-induced TNFR-related receptor (GITR), CD39, CD73, HELIOS (Ikaros family zinc-finger protein 2), lymphocyte activation gene-3 (LAG-3), fibrinogen-like protein-2 (FGL-2) und GARP. Angesichts der Vielfalt an identifizierten Oberflächenmarkern der komplexen Treg-Funktion stellen die erwähnten Oberflächenmarker jedoch nur eine Auswahl dar.

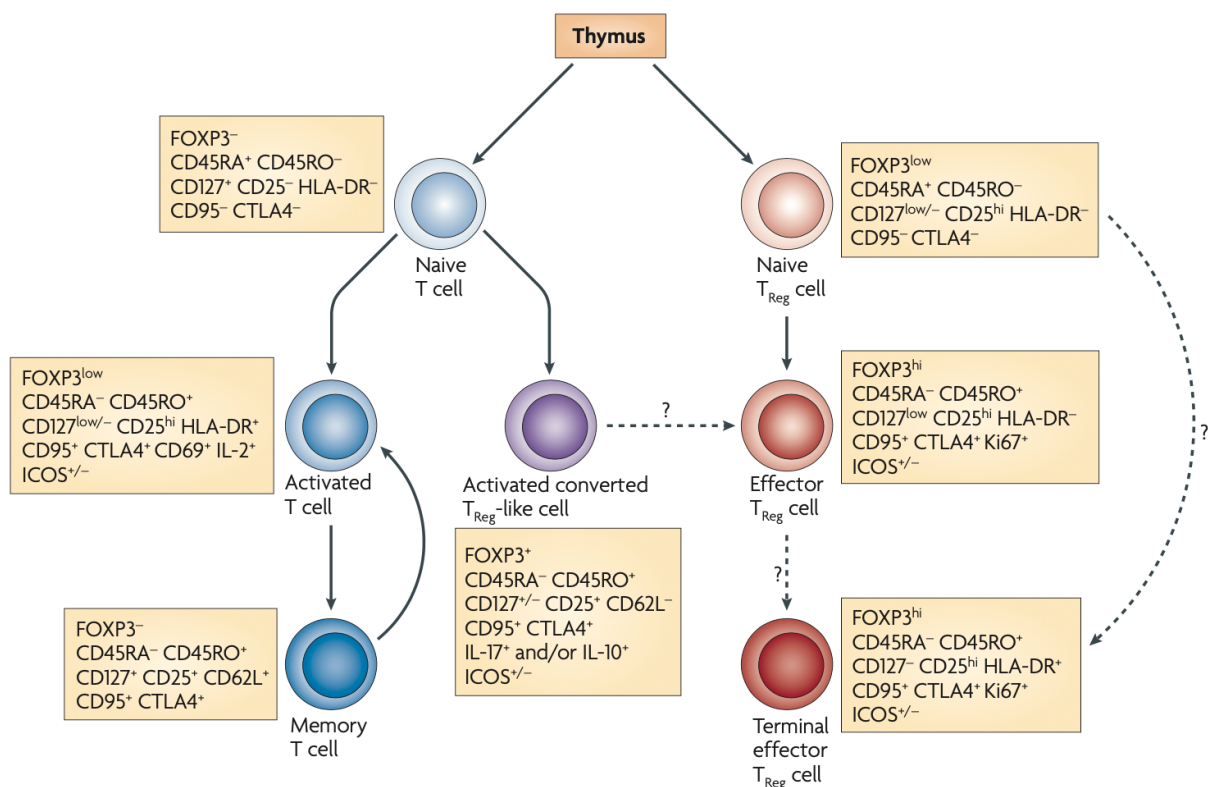


Abbildung 2: "Treg cell differentiation". Übernommen aus Sakaguchi et al. 2010, Nature Reviews.

2.5.2 Entwicklung und Differenzierung von Treg

Treg können vereinfacht in zwei verschiedene Hauptgruppen entsprechend ihres Ursprungs unterteilt werden: natürliche vorkommende Treg (**nTreg** oder **tTreg** für „thymic-derived“-Treg) und induzierte Treg (**iTreg** oder **pTreg** für periphere, extrathymische Treg).

nTreg entwickeln sich ausschließlich im Thymus. Sie entstehen aus CD4^{pos} TZ, die positiv selektiert wurden und eine relativ hohe Avidität für Autoantigene haben (Josefowicz et al. 2012). Aufgrund einer nachfolgenden Interaktion zwischen TZR, DC und Thymusstroma kommt es unter dem Einfluss von IL-2, TGF- β , IL-7 und IL-15 über weitere Zwischenschritte zur Expression von FOXP3 und damit zur Entwicklung von natürlichen Treg (Hsieh et al. 2012). Reife nTreg verlassen dann den Thymus und wandern in die Peripherie um autoreaktive TZ, die die negative Selektion im Thymus unterlaufen haben, zu hemmen (Monteiro et al. 2016 S. 210). Lange Zeit ging man davon aus, dass nTreg anerg seien und selbst nach adäquater Stimulation nur wenig proliferieren würden. In vivo zeigte sich jedoch, dass sich nTreg sehr wohl teilen, wenn sie Empfängern appliziert werden oder entsprechender Ag-Stimulation ausgesetzt wurden (Fisson et al. 2003). nTreg finden sich konstitutiv in sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz und mukosaassoziierten Lymphfollikel (MALT), wo sie sich in ständigem Austausch mit CD4^{pos} TZ, CD8^{pos} TZ und APC befinden. Dort hemmen Treg Priming und Proliferation der Zellen und hindern damit die Zellen am Verlassen der sekundären lymphatischen Organe und modulieren Immunreaktionen bereits in der Anfangsphase (Davidson and Shevach 2011). Treg können jedoch nicht nur in sekundär lymphatischen Organen gefunden werden, sondern finden sich vermehrt auch in nicht-lymphatischen Geweben, vor allem jedoch bei einer Inflammation, wo sie überschießende Immunreaktionen hemmen und damit kontrollieren können, um schließlich eine Zerstörung des Gewebes zu verhindern.

Induzierte Treg (iTreg) oder periphere Treg (pTreg) entstehen in der Peripherie aus konventionellen CD4^{pos}, CD25^{neg} TZ, mutmaßlich während einer chronischen Exposition mit Ag, sowie unter dem Einfluss von IL-2, TGF- β und gleichzeitiger Kostimulation des TZR (Chen et al. 2010, Kanamori et al. 2016). iTreg zeichnen sich also dadurch aus, dass sie Autoantigene mit hoher Avidität binden können und abhängig von IL-2 und TGF- β sind (D'Cruz et Klein, 2000). Beide Voraussetzungen führen in der Folge zu einer verstärkten Expression von FOXP3 (Chen et al. 2003; Fantini et al. 2004). iTreg sind vor allem an der Aufrechterhaltung der Toleranz an Schleimhäuten und Infektionen beteiligt. An diesen Flächen kommt es zu einem

ständigen Austausch mit fremden Ag, z.B. Nahrungsbestandteilen oder dort „ansässigen“ Bakterien. Um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern, hemmen iTreg überschießende Immunantworten auf körperfremde Ag.

Eine Differenzierung von nTreg und iTreg über spezifische Marker ist bisher nicht möglich.

Weiter scheinen Treg insgesamt eine deutlich heterogenere Zellpopulation darzustellen, als die Einteilung in nTreg und iTreg vermuten ließe. Zum Beispiel weisen Treg in nicht-lymphoiden Organen (so genannte tissue Treg cells) im Vergleich zu Treg in sekundären lymphatischen Organen deutlich verschiedene Genexpressionsprofile auf, die die Funktion beeinflussen: Treg, die den Transkriptionsfaktor T-bet exprimieren, hemmen spezifisch die TH1- und T-Zell-Aktivierung (Levine et al. 2017).

2.5.3 Funktionelle Charakterisierung von Treg

Wie schon erwähnt, zeichnen sich Treg durch ihre Fähigkeit aus, andere Immunzellen zu hemmen. Dadurch sind sie essentiell an der Kontrolle und Limitierung von Immunreaktionen und damit an der Aufrechterhaltung einer Selbsttoleranz beteiligt. Die suppressiven Eigenschaften von Treg können im Rahmen eines Suppressionsassays untersucht werden, bei dem Treg mit Responder-TZ (Tresp) koinkubiert werden und die Proliferation der Responder-TZ gemessen wird. Anhand der Proliferation der Responder-TZ kann die Suppression der Treg abgeschätzt werden. Die Trennung von Treg und Responder-TZ mittels einer semipermeablen Membran führt zu einer abgeschwächten Hemmung, so dass ein wesentlicher Teil der Treg-vermittelten Hemmung kontaktabhängig zu sein scheint (Takahashi et al. 1998; Thornton et Shevach 1998). Es können daher kontaktabhängige und kontaktunabhängige Mechanismen der Suppression unterschieden werden. Einige dieser Mechanismen sollen nun im Folgenden näher beschrieben werden:

Die kontaktabhängige Suppression erfolgt über die Expression von inhibitorischen Oberflächenmolekülen wie CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) und LAG-3 (lymphocyte activation gene 3).

CTLA-4 konkurriert mit CD28 um die Bindung an die Liganden CD80/CD86 auf TZ. CD28 steht dabei für ein kostimulatorisches Molekül, das essentiell für die Aktivierung und Proliferation von TZ ist. Aufgrund der höheren Affinität von CTLA-4 zu CD80/CD86 nimmt die Bindung von CD28 und CD80/CD86 ab, womit der TZ ein essentieller kostimulatorischer Stimulus entzogen wird, was in der Folge zu einer verminderten T-Zellproliferation führt (Yokosuka et al. 2010). LAG-3 verstärkt die Interaktion von Treg

mit DC und hemmt deren Reifung, was über eine verminderte Expression von kostimulatorischen Faktoren zu einer verminderten Aktivierung und Proliferation von TZ führt (Schmidt et al. 2012; Liang et al. 2008). Treg wirken also immunomodulatorisch, indem sie die Interaktion zwischen DC und TZ beeinflussen. Neben der Expression von inhibitorischen Oberflächenmolekülen können Treg direkt eine Zytolyse bzw. Apoptose von Effektorzellen induzieren. Sie nutzen dabei Granzyme A und Perforine und können damit direkt aktivierte CD4^{pos} und CD8^{pos} TZ abtöten und damit Immunreaktionen modulieren und hemmen (Grossman et al. 2004). Im Rahmen von kontaktunabhängigen Mechanismen erzeugen Treg über unterschiedliche Wege ein immunsuppressives Milieu, das mit dem proinflammatorischen Milieu interagiert. Im Mittelpunkt stehen dabei die immunsuppressiven Zytokine TGF- β , IL-10 und IL-35. In welchem Ausmaß die einzelnen Zytokine an der Treg-vermittelten Suppression beteiligt sind, ist aktuell noch unklar und wird kontrovers diskutiert.

TGF- β hat ganz unterschiedliche Funktionen und kann von verschiedenen Zelltypen gebildet werden. Die latente Form von TGF- β wird von dem Oberflächenmolekül GARP gebunden, das von aktivierten Treg exprimiert wird (Tran et al. 2009). An der Oberfläche gebundenes TGF- β ist an der Induktion der Expression von IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) auf DC beteiligt. IDO ist ein Enzym, das Tryptophan metabolisiert. Dies führt über eine Depletion von Tryptophan und durch die Abbauprodukte von Tryptophan zur Induktion der Apoptose und damit insgesamt zu suppressiv.

IL-10 (Cytokine-synthesis inhibitory factor, CSIF) wird vor allem von Monozyten und TH2-Lymphozyten gebildet und hat vor allem inhibitorische Wirkungen über eine Blockade des nukleären Faktors NF- κ B und den JAK-Stat-Signalweg. Treg können auch IL-10 sezernieren. Erstmals wurde dies im Mausmodell gezeigt, bei dem Treg in der Mucosa des Darms IL-10 produzierten und auf diesem Weg protektiv auf die Entwicklung einer Kolitis wirkten (Asseman et al. 1999; Rubtsov et al. 2008). IL-10 hemmt über den IL-10-Rezeptor zudem direkt die Differenzierung und Proliferation von TZ und fördert die Differenzierung von naiven TZ zu IL-10 produzierenden TZ (Huber et al. 2011; Groux et al. 1997).

IL-35 zählt wie IL-10 zu den immunsuppressiven Zytokinen und wird vor allem von Treg sezerniert. IL-35 scheint dabei essentiell für die suppressiven Eigenschaften von Treg zu sein (Collison et al. 2007). IL-35 hemmt die Proliferation von TZ und moduliert deren Differenzierung zu IL-35 produzierenden Tr35-Zellen (Collison et al. 2010). Die

weitere Charakterisierung von IL-35 und Tr35-Zellen ist aktuell noch Gegenstand der Forschung.

Eine weitere kontaktunabhängige Möglichkeit andere Zellen zu hemmen, erfolgt über eine Störung des Metabolismus. Treg können TZ direkt hemmen, indem sie selbst IL-2 vermehrt verbrauchen und damit den TZ entziehen. Treg sind, wie auch andere TZ, essentiell abhängig von IL-2, können dieses Zytokin jedoch nicht selbst produzieren, da FOXP3 direkt an den IL-2-Promoter bindet und damit eine Aktivierung der IL-2-Produktion nach TZR-Stimulation verhindert (Chen et al. 2006; Su et al. 2004). Treg exprimieren daher vermehrt einen hochaffinen IL-2-Rezeptor, der IL-2 in der Umgebung binden kann. Über einen Treg-induzierten Entzug von IL-2 kann es dann in der Folge zu einer Apoptose von TZ kommen (Thornton and Shevach, 1998; de la Rosa et al. 2004; Pandiyan et al. 2007). Außerdem können Treg CD39 und CD73 exprimieren. Beide Moleküle sind Ektoenzyme, die lokal ATP zu Adenosin abbauen können und damit die lokale Konzentration von ATP verringern können und über eine Aktivierung des Adenosin-Rezeptors 2A die Proliferation von TZ hemmen (Kobie et al. 2006; Deaglio et al. 2007; Borsellino et al. 2007).

2.5.4 Oberflächenmarker von Treg

2.5.4.1 GARP

Der Oberflächenmarker GARP steht für glycoprotein-A repetitions predominant (GARP) oder LRRC32. GARP wurde erstmals 1994 von Ollendorf et al. erwähnt. (Ollendorff et al. 1994; Roubin et al. 1996). Wang et al. konnten zeigen, dass aktivierte Treg GARP selektiv exprimieren und die suppressive Fähigkeit von Treg direkt mit der GARP-Expression korreliert (Wang et al. 2009). GARP kann somit zur Identifikation von aktivierten Treg verwendet werden (Wang et al. 2012; Battaglia and Roncarolo, 2009). Die extrazelluläre Domäne von GARP ist an der Bildung, Bindung und Aktivierung von latentem TGF- β beteiligt. Latentes TGF- β selbst ist ein pleiotropes Zytokin, das vielfältige Funktionen in der Zelldifferenzierung, der Apoptose, Entzündung und Tumorprogression hat. Nach einer Bindung an den TGF- β -Rezeptor kommt es über unterschiedliche Schritte zur Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3, die wiederum SMAD4 binden. Der Komplex transloziert dann in den Nukleus der Zelle und beeinflusst die Genexpression unterschiedlicher Gene. Nakamura et al. stellten 2001 als erstes die These auf, dass Treg über produziertes und an der Zelloberfläche über einen Rezeptor gebundenes TGF- β Zell-Kontakt-abhängig suppressiv wirken können (Nakamura et al. 2001). Die Expression von GARP scheint

somit direkt in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt zu sein (Cuende et al. 2015).

2.5.4.2 HLA-DR und CD45RA

Baecher-Allan et al. konnten eine Treg-Subpopulation identifizieren, die durch eine verstärkte Expression des HLA-Klasse II Allels DR (HLA-DR) charakterisiert ist und für eine Treg-Population mit vermehrten suppressiven Eigenschaften steht (Baecher-Allan et al. 2006). Diese Subpopulation wies zudem eine verstärkte Expression von FOXP3 auf und zeigt im Vergleich zu einer HLA-DR-negativen Treg-Population eine stärkere Hemmung von TZ auf. Diese Hemmung wird von dieser Population kontakt-abhängig vermittelt.

Die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45RA bezeichnet ein Glykoprotein, das vor allem von naiven TZ exprimiert wird. CD45RA kann daher genutzt werden, um naive TZ zu identifizieren (Akbar et al. 1988). Nach Antigenexposition oder Aktivierung von naiven TZ exprimieren die nun aktivierten TZ eine Isoform CD45R0 und kein CD45RA mehr. Schaier et al. konnten 2012 zeigen, dass die Subpopulation der CD45RA-negativen, HLA-DR-positiven ($CD45RA^{neg}$ $HLA-DR^{pos}$) Treg zum einen die immunsuppressiven Eigenschaften des gesamten Treg Pools beeinflussen und ein Abfall dieser Population mit einem signifikant erhöhten Risiko für eine Transplantat-Abstoßung nach Nierentransplantation einherging (Schaier et al. 2012). Weiter konnten sie zeigen, dass der Anteil der HLA-DR-positiven, CD45RA-negativen ($HLA-DR^{pos}$ $CD45RA^{neg}$) Treg nach Nierentransplantation abnahm und im ersten Jahr nach Transplantation weiter vermindert blieb. Bei Patienten, die das Nierentransplantat im Verlauf akzeptierten und es zu keiner Abstoßung kam, kam es zu einer Erholung dieser Population. Schaier et al. schlagen daher vor, diese Treg-Subpopulation nach Transplantation zu überwachen, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern. Mit Hilfe von HLA-DR und CD45RA können zudem zwei weitere Zellpopulationen identifiziert werden: HLA-DR-negative, CD45RA-negative ($HLA-DR^{neg}$ $CD45RA^{neg}$) Treg, welche für Memory oder Gedächtnis-Treg stehen und HLA-DR-negative, CD45RA-positive ($HLA-DR^{neg}$ $CD45RA^{pos}$) Treg, welche für naive Treg stehen. Die Gruppe um Dong konnte mit Hilfe einer Einzelzell-Analyse bereits zeigen, dass es bei Patienten, die eine aGVHD entwickeln, im Vergleich zu Patienten, die keine GVHD entwickeln, zu einer Depletion dieser naiven Treg-Population kommt (Dong et al. 2013).

2.6 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) wird zur Therapie von malignen hämatopoetischen Erkrankungen eingesetzt und stellt für viele Erkrankungen die letzte mögliche kurative Therapie dar (Tabbara et al. 2002). Das therapeutische Ziel ist dabei, mit der Hilfe von Stammzellen eines Spenders die fehlerhafte oder entartete Hämatopoese zu ersetzen und zu erneuern (Juric MK et al. 2016). Bei einer HSZT werden pluripotente hämatopoetische Stammzellen von einem Spender entnommen und einem Empfänger appliziert. Eine erste Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen nach Radiochemotherapie wurde 1957 von E. Donnal Thomas durchgeführt (Thomas et al. 1957). Die Stammzellen können autolog, d.h. vom Patienten selbst, oder allogene, d.h. von einem Spender, eines anderen Individuums, gewonnen werden. Als Spender für eine allogene HSZT (aHSZT) kommen Familienangehörige oder Fremdspender in Frage. Entscheidend für die Umsetzbarkeit und den Erfolg ist der HLA-Status des Spenders. Es wird dabei versucht, einen möglichst HLA-passenden Spender zu finden. Bei einer Übereinstimmung der Allele von HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1 zwischen Spender und Empfänger spricht man von einer HLA-passenden (humanes Leukozytenantigen, „matched“ oder identen) Transplantation. Wenn kein Spender mit einer vollständigen Übereinstimmung gefunden wird, spricht man von einer HLA-nicht-identischen oder HLA-teilidenten („mismatched“) Transplantation. Weiter können Stammzellen aus verschiedenen Geweben entnommen werden, wie dem Knochenmark (KMT: Knochenmarktransplantation), dem peripheren Blut (PBSZT: periphere Blutstammzelltransplantation) oder dem Nabelvenenblut. Stammzellen aus dem peripheren Blut weisen einen höheren Gehalt an CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen auf. Dies führt zu einer schnelleren Rekonstitution im Vergleich zur Verwendung von Stammzellen aus dem Knochenmark (Weaver, Buckner, Longin et al. 1993).

2.6.1 Der Ablauf einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Der Ablauf der HSZT kann in verschiedene Abschnitte unterteilt werden. Zu Beginn erfolgt nach erfolgreicher Spendersuche die Entnahme der Stammzellen des Spenders oder des Patienten selbst. Anschließend erfolgt eine Phase, die als Konditionierung bezeichnet wird. Das Ziel der Konditionierung ist die Zerstörung verbliebener maligner Zellen und damit die direkte Therapie der Grundkrankheit, die Elimination möglichst vieler immunkompetenter Zellen des Empfängers, um das Risiko

einer Transplantatabstoßung zu minimieren, sowie die Herstellung einer Knochenmarksaplasie, d.h. die Schaffung von Raum für die neuen Spenderzellen, um ein späteres Anwachsen (Engraftment) zu ermöglichen (Gyurkocza et Sandmaier 2014).

Die Konditionierung kann dabei über eine Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI) oder eine Hochdosis-Chemotherapie, die mit einer Bestrahlung kombiniert werden kann, erfolgen. Die Konditionierung kann dabei myeloablativ erfolgen, d.h. dass die patienteneigene Hämatopoese nahezu vollständig zerstört wird (Myeloblation, „myeloablative conditioning“, MAC) oder nicht-myeloablativ bzw. dosis-reduziert („reduced-intensity conditioning“, RIC) mit einer reduzierten Dosis. Die Rekonstitution der Hämatopoese des Spenders erfolgt bei dosisreduzierten Konditionierungsprotokollen verzögert oder sogar unvollständig mit einer Persistenz der patienteneigenen Hämatopoese. In diesem Fall kann ein gemischter Chimärismus beobachtet werden: nach genotypischer Analyse der Hämatopoese findet sich ein gemischtes Profil mit Hämatopoese die zu Teilen vom Spender und zu Teilen vom Empfänger stammt. Durch die Entwicklung von nicht-myeloablativen Konditionierungsprotokollen konnte insgesamt über eine Reduktion der Toxizität, die behandlungsassoziierte Mortalität („treatment-related mortality“, TRM) reduziert werden (Slavin et al. 1998). Damit können auch Patienten, die sonst aufgrund ihrer Komorbiditäten nicht für eine myeloablative HSZT geeignet wären, eine aHSZT erhalten (Maris et al. 2003). Anschließend erfolgt die Applikation der Stammzellen des Spenders, die intravenös, ähnlich einer Bluttransfusion, infundiert werden und sich im Knochenmark niederlassen, was als Homing bezeichnet wird (Herold et al. 2020).

2.6.2 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Bei einer aHSZT werden Stammzellen eines Spenders einem genetisch fremden Empfänger infundiert (Giralt et Bishop, 2009). Der antileukämische Effekt wird dabei zum einen über die Konditionierungstherapie, zum anderen über den Graft-versus-Leukämie-Effekt (GVL, antileukämischer Effekt, englisch: graft-versus-leukemia reaction) vermittelt (Horowitz et al. 1990, Dickinson et al. 2017). In einem Transplantat eines Spenders sind nicht nur Stammzellen enthalten, sondern immer auch andere Immunzellen, insbesondere TZ. Diese TZ können das Gewebe des Empfängers als „fremd“ erkennen und angreifen. Dies führt dazu, dass eventuell noch vorhandene maligne Zellen nachhaltig angegriffen und eliminiert werden können. Dieser erwünschte Effekt wird dann als GVL-Effekt bezeichnet. Dies ist aller

Wahrscheinlichkeit nach auch eine der Ursachen dafür, dass das Risiko für ein Rezidiv nach einer aHSZT geringer ist als bei einer autologen HSZT.

Die Anwendung der HSZT und speziell der aHSZT zur Therapie von hämatologischen Neoplasien hat in den letzten Jahren, aufgrund von Fortschritten bei der Spenderauswahl und der Weiterentwicklung von Therapieprotokollen, zugenommen. Dennoch ist die aHSZT immer noch eine Therapie, die mit vielen Risiken und Komplikationen einhergehen kann: Zu den häufigsten Ursachen von Morbidität und Mortalität nach einer aHSZT zählen ein Rezidiv der Grunderkrankung, opportunistische Infektionen und die Entwicklung einer GVHD (Treleaven et Barrett 2008; Ukena et al. 2011; Ball et Egeler 2008). Entscheidende Faktoren für eine erfolgreiche aHSZT sind, neben der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger, der CMV-Status von Spender und Empfänger, das Geschlecht, die Blutgruppenkompatibilität, die Anzahl der Schwangerschaften und frühere Transfusionen des Spenders (Possinger et Regierer 2012).

2.6.3 Donor Lymphozyten Infusionen

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, kann der GVL-Effekt therapeutisch genutzt werden, um maligne Zellen, die im Rahmen der Konditionierung nicht eliminiert wurden und potentiell zu einem Rezidiv führen könnten, zu entfernen. Der GVL-Effekt kann jedoch auch mittels Donor Lymphozyten Infusionen (Donor Lymphocyte Infusion, DLI) über die Transplantation hinaus genutzt und verstärkt werden. Dabei werden Patienten nach aHSZT erneut Spenderlymphozyten appliziert. Dadurch kann bei einem Rezidiv oder einem Abfall des Chimärismus eine Remission ohne eine erneute Chemotherapie oder Bestrahlung erreicht werden. Die applizierten Spenderlymphozyten erkennen noch vorhandene maligne Zellen als fremd an und initiieren eine Abwehrreaktion gegen selbige. Mit jeder DLI-Gabe besteht aber immer auch das Risiko, dass sich die Spenderlymphozyten nicht nur gegen die malignen Zellen, sondern auch gegen gesunde Körperzellen wenden können und damit eine GVHD auslösen können. Mittels DLI-Gaben soll die Immunrekonstitution unterstützt und der GVL-Effekt verstärkt werden, ohne gleichzeitig eine GVHD auszulösen (Kolb 2008). Neben dem therapeutischen Einsatz werden DLI auch präemptiv und prophylaktisch eingesetzt (Possinger et Regierer 2012). Entscheidend dabei sind u.a. der MRD (von englisch: minimal residual disease; steht allgemein für residuelle Tumorzellen die mittels FACS oder NGS nachgewiesen werden können und damit ein Monitoring der Erkrankung ermöglichen) und der Chimärismus: die

Rezidivwahrscheinlichkeit und das Risiko für eine Transplantatabstoßung steigen mit ansteigenden MRD-Markern oder einem fallenden Spenderchimärismus, während ein kompletter Spenderchimärismus mit einem erhöhten GVHD-Risiko einhergeht. Mit Hilfe der Applikation von DLI kann es zu einer Umwandlung eines gemischten Chimärismus zu einem kompletten Spenderchimärismus kommen (Liesveld et Rothberg 2008). Limitiert bleibt der Einsatz von DLI durch ein fehlendes Ansprechen, fehlende Spender oder die Entwicklung einer GVHD. Um das GVHD-Risiko in Folge einer DLI weiter zu minimieren, können die in den DLI enthaltenen CD8-positiven TZ depletiert werden. Dadurch kann das GVHD-Risiko gesenkt werden und ähnliche gute Ergebnisse, im Sinne einer Remission, erzielt werden (Giralt et al. 1995).

2.6.4 Dosisreduzierte Konditionierung kombiniert mit Alemtuzumab-basierter T-Zell-Depletion

Dosisreduzierte Konditionierungsregime (reduced intensity conditioning, RIC) werden vor allem bei Patienten mit fortgeschrittenem Alter und anderen Komorbiditäten eingesetzt. Weitere Vorteile von RICs liegen in einem guten Anwachsen des Transplantats sowie einer besseren Verträglichkeit. Trotz der Vorteile deuten Studien jedoch darauf hin, dass viele Patienten nach einer RIC eine GVHD entwickeln: abhängig vom Protokoll entwickeln 30-70% der Patienten eine GVHD. Damit ist die Entwicklung einer GVHD entscheidend für die Nicht-Rezidiv-assoziierte Mortalität (non-relapse-mortality) nach einer RIC (Chakraverty et al. 2010). Daher wurde versucht, das Risiko für die Entwicklung einer GVHD nach RIC zu reduzieren. Dies kann mit Hilfe einer T-Zell-Depletion (TZD) erreicht werden. Dabei werden gezielt die an der Entstehung einer GVHD beteiligten TZ aus dem Transplantat entfernt. Die TZD kann auf der einen Seite das Risiko für eine GVHD reduzieren, kann aber auf der anderen Seite gleichzeitig das Risiko für opportunistische Infektionen, ein Rezidiv oder eine insuffiziente Rekonstitution (englisch: graft failure) erhöhen (Booth et Veys 2013). Kottaridis et al. entwickelten ein Protokoll für eine dosisreduzierte Konditionierung, das auf Fludarabin basiert (Kottaridis et al. 2000). Dieser Ansatz wurde von Meyer et al. mit einer TZD mit Alemtuzumab und präemptiven CD8-depletierten DLI kombiniert (Meyer et al. 2007). Die Konditionierung erfolgt mit Melphalan und Fludarabin, die TZD mit 100 mg Alemtuzumab (Campath-1H). Alemtuzumab selbst ist ein humanisierter, monoklonaler Ak, der gegen das Oberflächenmolekül CD52 gerichtet ist und nach Bindung mittels Komplementaktivierung zu einer Lyse der Zielzelle führt (Chakraverty et al. 2010; Hale et al. 1988). Physiologisch wird CD52 von B- und TZ exprimiert,

jedoch nicht oder nur in geringen Mengen auf hämatopoetischen Stammzellen, weshalb Alemtuzumab zur TZD eingesetzt werden kann. Alemtuzumab ist dabei sehr effektiv: >95% aller CD4^{pos}- und >80% aller CD8^{pos}-T-Zellen können damit depletiert werden (Baker et al. 2017). Die Applikation kann dabei direkt vor Transplantation erfolgen („Campath in vivo“ oder in-vivo depletion) oder dem Stammzellpräparat beigegeben werden („Campath in the bag“ oder „in-vitro depletion“) (Novitzky et al. 2013, Chakraverty et al. 2010, Novitzky et al. 1999). Frühe Phase-II-Studien konnten bereits zeigen, dass eine Behandlung mit Alemtuzumab vor aHSZT mit einer geringeren GVHD-Inzidenz, Schwere und Mortalität und insgesamt einer geringeren Nicht-Rezidiv-Mortalität einherging (Kottaridis et al. 2000, Chakraverty et al. 2002). Das Auftreten einer schweren aGVHD konnte von 35-50% auf 10-20% reduziert werden (Perez-Simon et al. 2002, Chakraverty et al. 2002). Es scheint jedoch zu einer erhöhten Rate an Transplantatversagen und einer verzögerten Immunrekonstitution zu kommen mit erhöhtem Risiko für Virusreaktivierungen (Ho et Soiffer 2001, Chakrabarti et al. 2002). Durch die lange Halbwertszeit von Alemtuzumab, welches bis zu 56 Tage nach HSZT nachgewiesen werden kann, kann die TZ-Rekonstitution, vor allem die Rekonstitution der CD4^{pos} TZ, verzögert sein (Morris et al. 2003). Um das Rezidivrisiko zu senken und die Immunrekonstitution zu unterstützen, erhielten Patienten, die keine GVHD entwickeln, in der oben beschriebenen Studie CD8-depletierte DLI. Die Applikation erfolgte 60 und 120 Tage nach der HSZT. Die CD8-Depletion der DLI wurde durchgeführt, um das Risiko für die Entwicklung einer GVHD zu reduzieren (Meyer et al. 2007). CD8-depletierte DLI erhielten die Patienten, wenn sie keine oder nur eine leichte GVHD (<I°) entwickelten. Im Anschluss wurden das Auftreten einer GVHD, die Entwicklung des Chimärismus und die Immunrekonstitution beobachtet. Mit Hilfe der DLI-Applikation konnte ein kompletter Spenderchimärismus erreicht werden (Meyer et al. 2010). Mit Einsatz von Alemtuzumab zur TZD rekonstituieren Patienten CD52^{neg} TZ, die über einen längeren Zeitraum persistieren (Meyer et al. 2010). Das Auftreten von CD52^{neg} TZ nach dem Einsatz von Alemtuzumab findet sich nicht nur nach einer TZD im Rahmen der aHSZT, sondern wurde auch bei anderen Krankheitsbildern beschrieben. So können CD52^{neg} TZ nach der Behandlung der rheumatoiden Arthritis oder des B-Zell-Non-Hodgkin Lymphoms mit Alemtuzumab nachgewiesen werden (Hertenstein et al. 1995; Brett et al. 1996). Bedeutung, Funktion und Folgen einer Rekonstitution von CD52^{neg} Zellen ist allerdings noch nicht abschließend geklärt und damit weiter Gegenstand der Forschung.

2.7 Graft-versus-Host-Disease

Wie in Abschnitt 2.6.3 schon erwähnt, besteht das Transplantat bei einer allogenen HSZT nicht nur aus Stammzellen des Spenders, sondern auch aus anderen Immunzellen des Spenders, insbesondere TZ, die den erwünschten GVL-Effekt vermitteln (Dickinson et al. 2017). Diese TZ können aber auch das gesunde Spendergewebe und Spenderzellen als „fremd“ erkennen und potentiell angreifen. Wenn sich diese Zellen nicht nur gegen noch vorhandene bösartige Zellen, sondern gegen gesundes, körpereigenes Gewebe wenden, spricht man einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion oder Graft-versus-Host-Disease (GVHD). Das Ziel und gleichzeitig die Herausforderung im Kontext der aHSZT bestehen darin, eine Balance zwischen erwünschtem GVL-Effekt und unerwünschter GVHD-Entwicklung zu finden. Bis zu 40-60% aller Patienten entwickeln nach einer aHSZT eine GVHD. Damit ist die GVHD eine der häufigsten Komplikationen und eine Hauptursache für die nicht-Rezidiv-assoziierte Mortalität nach einer aHSZT (Treleaven et Barrett 2008, Choi et Reddy 2014). Die klinische Relevanz der GVHD wird noch einmal verdeutlicht, dass weltweit pro Jahr ca. 25000 aHSZT durchgeführt werden und es damit in der Folge mindestens 10000 behandlungsdürftige Patienten mit einer GVHD pro Jahr gibt (Gratwohl et al. 2010; Ferrara et al. 2009). Daher hat die Prophylaxe, Diagnose und Therapie einer GVHD im Kontext der aHSZT eine enorme Bedeutung.

Erstmalig beschrieben wurde die GVHD von van Bekkum (van Bekkum et al. 1967). Von ihm untersuchte Mäuse entwickelten nach einer Bestrahlung eine Knochenmarksaplasie und erhielten fremdes Knochenmark. Daraufhin entwickelten die Mäuse eine damals als „sekundäre Erkrankung“ oder „runt disease“ bezeichnete Erkrankung, die durch Durchfälle, Gewichtsverlust und Leberveränderungen gekennzeichnet war und später als GVHD identifiziert wurde. Bei der Entwicklung einer GVHD nach aHSZT erkennen TZ des Spenders (Donor bzw. Graft) HLA-Ag bzw. präsentierte Peptide des Empfängers (Host) als Fremd an und greifen diese in der Folge an. Entscheidend für die Entwicklung und den Schweregrad einer GVHD sind dabei die Menge und Zusammensetzung von TZ des Spenders, die im Rahmen der Transplantation übertragen werden (Kernan et al. 1986), und die unterschiedlichen HLA-Moleküle zwischen Spender und Empfänger (Mismatch) (Sangiolo et al. 2010). Deswegen sind das Auftreten und die Schwere einer GVHD bei einer nicht-HLA-identischen aHSZT größer. Aber auch bei einer HLA-identischen aHSZT kann sich eine GVHD entwickeln (Storb et Champlin, 1991). Spender und Empfänger können sich in den sogenannten Nebenhistokompatibilitätsantigenen (englisch: minor

histocompatibility antigens, mHags) unterscheiden. mHags sind Peptide, die nicht im HLA-Locus codiert sind, aber auf HLA-Molekülen präsentiert werden und von Spender-TZ erkannt werden können (Goulmy 1996). Einige mHags sind dabei ausschließlich auf dem Y-Chromosom lokalisiert, weshalb ein unterschiedliches Geschlecht zwischen Spender und Empfänger ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer GVHD darstellt (Jagasia et al. 2012, Martin et al. 1998; Hansen et al. 1999). Weitere Faktoren, die mit einem erhöhten Risiko einer GVHD assoziiert sind, sind das Alter von Spender und Empfänger, sowie die Art und Intensität der Konditionierung.

2.7.1 Formen der Graft-versus-Host-Disease

Die GVHD kann historisch in zwei Verlaufsformen eingeteilt werden, die sich im klinischen Verlauf und der Therapie unterscheiden: die akute GVHD (aGVHD) und die chronische GVHD (cGVHD) (Glucksberg et. al 1974; Ferrara et al. 2009, Pidala 2011). Die aGVHD wurde dadurch definiert, dass sie vor Tag 100 nach aHSZT auftritt, während die cGVHD nach Tag 100 auftritt. Die zeitliche Unterscheidung ist heutzutage in der Praxis nicht mehr haltbar. Patienten, die mit einer dosisreduzierten Konditionierung allogenen transplantiert wurden und im weiteren Verlauf DLI erhalten, können auch noch 100 Tage nach Transplantation Symptome entwickeln, die eher einer aGVHD entsprechen (Mielcarek et Leisenring 2003). Umgekehrt können Patienten Symptome einer cGVHD schon 50 bis 60 Tage nach Transplantation entwickeln (Mielcarek et Leisenring, 2003; Mielcarek et al. 2005). 2005 erfolgte durch die NIH Consensus Conference eine Überarbeitung dieser Einteilung. Es wurden mehrere neue Diagnosekriterien für die aGVHD und cGVHD erarbeitet und ein organspezifisches Punktesystem entwickelt, um den Schweregrad zu evaluieren (Filipovich et al. 2005). Mit Hilfe der NIH-Kriterien und des Punktesystems kann der Krankheitsverlauf besser eingeschätzt werden und erlaubt somit ein Monitoring der GVHD (Socié et Ritz 2014). Zur aGVHD zählen demnach eine klassische akute GVHD, die vor Tag 100 nach Transplantation auftritt und eine persistierende, rezidivierende oder späte akute GVHD, die nach Tag 100 nach HSZT auftritt, mit jeweils Fehlen von klinischen Symptomen einer chronischen GVHD (Arnaout et al. 2014). Die cGVHD wird in eine klassische chronische GVHD, mit klinischen Zeichen einer chronischen GVHD und einem „Overlap-Syndrom“, bei dem gleichzeitigen Auftreten von Symptomen einer akuten und chronischen GVHD unterteilt (Filipovich et al. 2005).

2.7.2 Akute Graft-versus-Host-Disease

Ungefähr 40-60% aller Patienten, die eine aHSZT erhalten, entwickeln in der Folge eine aGVHD, die nachfolgend für 15-30% aller Todesfälle nach Transplantation verantwortlich ist (Ferrara et al. 2009). Im Median tritt eine aGVHD ungefähr 15 bis 30 Tage nach Transplantation, bei einer TZD jedoch insgesamt später auf (Antin et al. 1991). Klinisch manifestiert sich eine aGVHD gehäuft in der Haut, in der Leber und im Gastrointestinaltrakt. Potentiell kann jedoch jedes Organ betroffen sein.

Eine Manifestation der Haut zeigt sich als makulopapulöses Exanthem und einer Erythrodermie. Häufig bestehen parallel dazu starker Juckreiz oder Schmerzen. Betroffen sind vor allem lichtexponierte Stellen wie Gesicht, Nacken, Unterarme und Brust sowie die Hand- und Fußfläche. Milde Formen betreffen ca. 25% der Haut, während bei der Maximalform die ganze Körperoberfläche betroffen sein kann und es zu Blasenbildung und nekrotischer Ablösung der Epidermis kommen, ähnlich wie bei einer Verbrennung (Ziemer et al. 2014).

Eine aGVHD der Leber zeigt sich klinisch durch Ikterus, Cholestase und Hepatitis mit laborchemischem Anstieg des Bilirubins. Da ein Anstieg des Bilirubins relativ unspezifisch ist und verschiedene Ursachen hat, sollte ggf. zur Diagnosesicherung eine Leberbiopsie erwogen werden. (Akpek et al. 2002).

Eine aGVHD des Darms zeigt sich typischerweise als massive wässrige, teilweise blutige Diarrhoe (mit bis zu 10 Liter pro Tag), die von schmerzhaften abdominellen Krämpfen (Tenesmen) begleitet werden. Bei dem Verdacht auf eine aGVHD des Darmes ist ggf. eine histologische Sicherung mittels Koloskopie und Probiopsien aus dem terminalen Ileum indiziert (Kreisel et al. 2012). Histologische Kriterien für eine aGVHD des Darms sind die Anzahl der Apoptosen, Kryptenabszesse und Epithelverlust (Lerner et al. 1974, Zeiser et al. 2020 - Onkopedia-Leitlinie „akute GVHD“).

Die Einteilung der aGVHD erfolgt anhand verschiedener Stadien und Grade, die sich an den Arbeiten von Glucksberg et al. (1974), Przepiorka et al. (1995) und Shulman et al. (1980) orientieren. Es können vier verschiedene Stadien unterschieden werden, die sich jeweils auf die Schwere der Ausprägung und Befall der einzelnen Organe beziehen (Harris et al. 2016, Zeiser et al. 2020 - Onkopedia-Leitlinie „akute GVHD“):

	Haut	Leber	Darm
Schweregrad	Klinisches Bild	Bilirubin mg/dl	Diarrhoe ml/Tag
1	Exanthem <25 % KO*	2 – 3	500 – 1000
2	Exanthem 25-50 % KO*	3,1 – 6	1000 – 1500
3	Exanthem 50 % der KO*	6,1 – 15	1500 – 2000
4	generalisierte Erythrodermie oft Desquamation und Bulla	>15	>2000 oder schwere abdominelle Schmerzen und / oder Ileus

Tabelle 1: Schweregradbeurteilung der akuten GVHD nach Organen (modifiziert nach Zeiser et al. 2020 - Onkopedia-Leitlinie „akute GVHD“).

Die Bestimmung des Schweregrads der aGVHD erfolgt nach Bestimmung des Schweregrads der einzelnen Organe:

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

Tabelle 2: Gesamtschweregrad der akuten GVHD (mod. nach Glucksberg et al. 1974 und Zeiser et al. 2020 - Onkopedia-Leitlinie „akute GVHD“).

2.7.3 Pathophysiologie der akuten Graft-versus-Host-Disease

Nach Billingham müssen 3 immunologische Voraussetzungen vorhanden sein, damit sich eine aGVHD entwickeln kann (Billingham 1966):

- 1.) Das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten.
- 2.) Der Empfänger muss Ag exprimieren, die vom Spender nicht exprimiert werden.
- 3.) Der Empfänger ist unfähig, eine Reaktion gegen Spenderzellen einzuleiten, um diese zu bekämpfen.

Nach Hill und Morris können in der Entstehung der aGVHD drei Phasen unterschieden werden: Eine unspezifische Schädigung des Empfängerorgans durch vorangegangene Therapien führt zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (I). APCs werden aktiviert und präsentieren Empfänger-Ag den Spender-TZ, die dadurch aktiviert werden und proliferieren (II). Diese erkennen das Empfängerorgan als „fremd“ an und greifen es an (III) (Morris und Hill 2007; Ferrara et al. 2005). Entscheidend sind hierbei immunkompetente TZ im Transplantat. Diese können Ag des Empfängers auf Empfänger APCs als fremd erkennen (Choi et al. 2010).

2.7.3.1 Phase 1: Schädigung des Empfängerorgans

Die erste Phase beginnt dabei schon vor der eigentlichen aHSZT mit einer unspezifischen Schädigung des Empfängerorgans. Dies kann durch die zugrundeliegende Erkrankung, vorausgegangene Therapien oder die Konditionierung vor Stammzelltransplantation hervorgerufen werden. Eine Ganzkörperbestrahlung (englisch: total body irradiation, TBI) führt z.B. zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF-alpha), IL-1 und IL-6 (Xun et al. 1994) und zu direkter Schädigung und Untergang des Darmepithels. In der Folge können Bestandteile von Bakterien wie z.B. Lipopolysaccharide in die Blutbahn translozieren und dort über die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen aktivieren, die wiederum proinflammatorische Zytokine freisetzen. Das proinflammatorische Milieu aktiviert zudem APCs des Empfängers, die vermehrt Ag prozessieren und über HLA-Rezeptoren präsentieren (Koyama et al. 2012; Shlomchik et al. 1999). Es entsteht eine sich selbst verstärkende Kaskade, die zu einer generellen Inflammation führt (Hill et al. 1997; Hill et Ferrara 2000). Dies ist mitunter auch der Grund für ein erhöhtes GVHD-Risiko bei Verwendungen von intensiven Konditionierungsprotokollen (Hill et al. 1997).

2.7.3.2 Phase 2: Aktivierung und Differenzierung von Spender-TZ

Zentral für die zweite Phase ist die Interaktion zwischen APCs und Spender-TZ im Transplantat. Das proinflammatorische Milieu führt zu einer Proliferation der Spender-TZ, die in die Zielorgane der GVHD migrieren können (Chakraverty et al. 2006). Dort werden den Spender-TZ für sie fremde Ag – Alloantigene – von Spender oder Empfänger APCs, vor allem DC, präsentiert und dadurch aktiviert. Es entstehen alloreaktive TZ, die das Immunsystem nicht eliminieren kann. Aktivierte TZ sezernieren unterschiedliche Zytokine, u.a. Interferon-Gamma, IL-2 und TNF-alpha. Diese Zytokine führen dazu, dass TZ proliferieren und vermehrt Th1-Zellen gebildet werden.

MHC-I-Unterschiede stimulieren CD8^{pos} TZ und MHC-Klasse-II-Unterschiede stimulieren CD4^{pos} TZ (Korngold et Sprent, 1985). DC wiederum können die Funktion von TZ nach Aktivierung weiter modulieren, so dass die Zytokin-Sekretion weiter verstärkt wird, es zu einer Lyse von Zellen kommt und Makrophagen weiter aktiviert werden.

2.7.3.3 Phase 3: Schädigung des Empfängergewebes durch die Konditionierung

In der letzten Phase kommt es konsekutiv zur Schädigung des Empfängergewebes durch Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Weiter kommt es durch die Schädigung der Darmschleimhaut zur Freisetzung von Lipopolysacchariden (LPS), welche wiederum die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF-alpha, initiieren. TNF-alpha wieder kann dann direkt über TNF-Rezeptoren oder über den Fas-Signalweg zu einer weiteren Gewebsschädigung führen (Ferrara et al. 2009).

2.7.4 Prophylaxe und Therapie der akuten Graft-versus-Host-Disease

Um das Risiko einer aGVHD zu reduzieren, erhalten alle Patienten neben der TZD im Rahmen des Konditionierungsregimes nach aHSZT standardmäßig eine immunsuppressive Therapie. In Deutschland kommen am häufigsten Calcineurin-Inhibitoren wie Ciclosporin A (CSA) oder Tacrolimus in Kombination mit Methotrexat (MTX) oder Mycophenolat Mofetil (MMF) zum Einsatz (Sabry et al. 2009; Lai et al. 2014; Kharfan-Dabaja et al. 2014; Hamilton et al. 2015). Umfang und Dauer der Immunsuppression sind dabei individuell unterschiedlich und direkt von bestehenden Risikofaktoren abhängig, insbesondere dem HLA-Mismatch und der Herkunft der Stammzellen (Fremd- oder Familienspender) (Storb et al. 1986; Perkins et al. 2010; Cutler et al. 2014). Entwickeln Patienten nach aHSZT Zeichen einer aGVHD oder cGVHD, entscheidet der Schweregrad über das weitere Vorgehen. Ab einem Schweregrad II sollte eine systemische immunsuppressive Therapie eingeleitet bzw. die bestehende immunsuppressive Therapie intensiviert werden. Die initiale Therapie besteht aus der Gabe von Kortikosteroiden, z.B. Methylprednisolon (2 mg/kg KG) für 14 Tage oder länger. Komplette Remissionen können dadurch in ungefähr einem Viertel der Fälle, Teilremissionen in ungefähr der Hälfte der Fälle erzielt werden. Bei Nicht-Ansprechen oder ausbleibender Zeichen einer Remission handelt es sich um eine „steroid-refraktäre GVHD“ bzw. ein steroid-refraktärer Verlauf. Dies erfordert die Einleitung einer Zweitlinientherapie. Als Zweitlinientherapie kommen unterschiedliche

Medikamente und Verfahren in Frage, wie z.B. Immunsuppressiva wie MMF oder eine extrakorporale Photopherese (Wolff et al. 2013; Schneiderman 2017).

Neben der medikamentösen oder interventionellen Therapie bestehen zudem zelluläre Ansätze bei denen mesenchymale Stromazellen (Ball et al. 2013; Kuci et al. 2016) oder Treg appliziert werden und hoffnungsvolle Resultate zeigten (Hoffmann et Edinger, 2006; Hoffmann et al. 2006).

2.7.5 Chronische Graft-versus-Host-Disease

Die cGVHD kann allgemein als eine verspätet einsetzende Reaktion des Spenderimmunsystems gegen das Gewebe des Empfängers beschrieben werden und manifestiert sich erst im Verlauf nach aHSZT (im Durchschnitt 2-18 Monate nach aHSZT) und stellt damit eine der Langzeitkomplikationen dar (Ramachandran et al. 2019). Ungefähr die Hälfte aller Patienten, die eine aHSZT erhalten, entwickeln im weiteren Verlauf eine cGVHD und ungefähr ein Viertel aller Todesfälle nach aHSZT gehen ursächlich auf die Entwicklung einer cGVHD zurück (Wolff et al. 2011; Lee et al. 2003; Akpek et al. 2001).

Das Krankheitsbild ähnelt in der klinischen Ausprägung Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Sklerodermie oder einem Sjögren-Syndrom. Es kann nahezu jedes Organ betroffen sein, vor allem sind jedoch Haut und Schleimhäute (Poikilodermie, sklerotische Veränderungen), Augen (Photophobie, Rötung, vermehrter Tränenfluss), Gastrointestinaltrakt, Leber, Lunge, Muskeln und Gelenke (Kontrakturen, Gelenksteifigkeit) betroffen. Es kommt zu fibrotischen Prozessen, an denen vor allem CD4^{pos}, TH-2-Helferzellen und B-Lymphozyten beteiligt sind (Higman et Vogelsang 2004).

2.8 Regulatorische T-Zellen und Graft-versus-Host-Disease nach allogener Stammzelltransplantation

Zusammengefasst kann eine aGVHD als ein Ungleichgewicht zwischen überschießender Aktivität und mangelhafter Regulation des Immunsystems beschrieben werden (Beres et Drobyski, 2013). Daher zielen aktuell viele Therapie- und Forschungsansätze darauf ab, dieses Ungleichgewicht auszugleichen. Therapeutisch kann dies über eine pharmakologische Hemmung der überschießenden Aktivität des Immunsystems über die Gabe von Immunsuppressiva erfolgen. Probleme entstehen jedoch durch die unspezifische Hemmung des gesamten Immunsystems und damit einhergehender Hemmung der Rekonstitution und unerwünschte Folgen durch die Toxizität, Nebenwirkungen und Interaktionspotential

der eingesetzten Immunsuppressiva. Physiologischerweise wird dieses Gleichgewicht u.a. auch durch Treg aufrechterhalten, weshalb Treg und der Einsatz von Treg zur Therapie der aGVHD nach aHSZT in den Fokus verschiedener Arbeitsgruppen rückten (Sakaguchi et al. 2006; Curotto de Lafaille et Lafaille, 2009). Erste Versuche erfolgten in GVHD-Modellen der Maus. Dort konnte gezeigt werden, dass es zu einem zunehmenden Verlust von Treg während der Entwicklung einer aGVHD kommt, wodurch in der Folge vermehrt autoreaktive Spender-TZ auftreten, die proinflammatorische Zytokine bilden und die Pathogenese der GVHD initiieren und aufrechterhalten (Chen et al. 2007). Taylor et al. zeigten, dass eine CD25-Depletion zum Fortschreiten einer GVHD führt, während der adoptive Transfer von CD25-positiven TZ zu einem Rückgang der GVHD führt (Taylor et al. 2002). Diese Ergebnisse konnten teilweise auch beim Menschen nachgewiesen werden, indem die relative und absolute Anzahl der Treg während der Rekonstitution nach aHSZT untersucht wurde. Die Gruppe um Miura konnte dabei als erstes eine inverse Korrelation zwischen Treg-Anzahl und Inzidenz und Schwere einer aGVHD zeigen (Miura et al. 2004). Da damals noch keine FOXP3-Ak vorhanden waren, maßen sie die FOXP3-Expression mittels PCR. Patienten, die eine GVHD entwickelten, wiesen dabei allgemein eine geringere FOXP3-Expression auf, die mit Fortschreiten der aGVHD weiter abnahm. Magenau et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen: Patienten mit einer aGVHD zeigten im Vergleich zu Patienten, die keine GVHD entwickelten, eine verminderte Anzahl an Treg auf, die mit zunehmender Schwere der GVHD weiter abnahm (Magenau et al. 2010).

Die Bedeutung von Treg für die Rekonstitution und Pathogenese einer GVHD nach aHSZT ist mittlerweile gesichert. Diese Arbeit versucht ein besseres Verständnis für die Bedeutung von Treg im Allgemeinen und CD52^{pos} sowie CD52^{neg} Treg im Speziellen für die Rekonstitution und Entwicklung einer aGVHD bei Patienten nach aHSZT mit Alemtuzumab zu leisten.

3. Material

3.1 Laborgeräte

Name	Hersteller
Autoklav, Systec V-150	KSG Sterilisatoren, Olching Systec GmbH, Wettenberg
CO ₂ -Inkubator, Brutschrank HeraCell 150	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer, BD FACS Canto™ II	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer/ Zellsorter, BD FACS Aria™ I	BD Biosciences, Heidelberg
Eismaschine UBE50/53	Ziegra, Isernhagen
Feinwaage, 0,05-210 g FlexCycler	Sartorius, Göttingen
Gefrierschrank (-80°C)	Hera freeze, Heraeus/Kendro, Langenselbold
Kryo-Einfriergerät Mr. Frosty	Nalge Nunc, Wiesbaden
Kühl- und Gefrierkombination (4°C, -20°C)	Privileg, Fürth
MACS-Ständer MultiStand™	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Mehrkanalpipetten 5-50 µl, 25-200 µl	Brand, Wertheim
Mikroliterpipetten Transferpette R S 0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Brand, Wertheim
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25 (für Zellkultur)	Zeiss, Jena
Pipette, 1-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe PipetBoy Integra	Biosciences, Fernwald
Schüttelgerät, Lab Dancer	VWR, Darmstadt
Sterile Werkbank, HERAsafe Typ HS 18	Kendro, Hanau
Stickstoff-Kryo-Bank XLC 1370	MVE Europe, Solingen
Taylor-Wharton XL-180 Stickstoff-Tank,	Tec Lab, Königstein
Vortex MS2 Minishaker IKA®	IKA, Staufen
Waage Sartorius (BA 2100 S) (0,5 g-2100 g)	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellseparations-Magnete	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1S-	Kendro, Langenselbold

3.2 Software

Name	Hersteller
Expo32	Beckmann Coulter, Krefeld; Software zur FACS-Auswertung
FlowJo	Version 7.6.4., Firma FlowJo; Software zur FACS-Auswertung
FACS-Diva Software	BD Biosciences, Heidelberg; Software zur FACS-Auswertung
GraphPad PRISM	GraphPad Software, Inc.; Software zur Statistik

3.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bechergläser: 200 ml, 500 ml und 1000 ml	Schott Ag, Mainz
Cellstainer	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Kryoröhrchen, Nunc	Greiner, Nürtingen
Deckgläser, 24x32 mm	Menzel, Braunschweig
Einmalpipetten, steril 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml	Greiner, Nürtingen
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, Erembodegen
Falcon, Tube 15 ml, 50 ml	Greiner, Nürtingen
Filter für Zellseparationssäulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Gewebekulturplatten 6-, 24-, 96- Lochgewebekulturplatten	Greiner, Nürtingen
Glasflaschen, 1000 ml	Schott Ag, Mainz
Handschuhe	Lohmann & Rauscher, Neuwied
Leucosep™ Röhrchen 50 ml mit Trennscheibe	Greiner, Nürtingen
Petrischalen 94 mm, 60 mm, 35 mm	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 10-200 µl, 100-1250 µl	Starlab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße (Eppis) 500 µl, 1500 µl und 2000 µl	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter 20 µm	Whatman, München
Steritop™	Millipore, Eschborn
Zählkammer Fuchs-Rosenthal	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zellfilter 70 µm, 30 µm	BD Bioscience, Erembodegen
Zellkultur-Röhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner, Nürtingen
Zellkulturflasche 25 cm ² , 80 cm ² Kulturfläche	Greiner, Nürtingen
Zellseparationssäulen MS-Säulen, LS-Säulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach

3.4 Chemikalien

Name	Hersteller
BD Cytofix/Cytoperm Fixation & Permeation Solution	BD Biosciences, Erembodegen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe; Merck Darmstadt
EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)	Applichem, Gatersleben; Sigma, Taufkirchen
EDTA Disodiumsalz	Merck Biosciences GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (reinst)	Applichem, Gatersleben
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Erembodegen
Ficoll Lymphozyten Trennmedium (LSM 1077)	PAA Laboratories GmbH Pasching (A)

Fox P3 Staining Set Fitc anti Human Fix/Perm Diluent (FOXP3 Kit) Fix/Perm Concentrate (FOXP3 Kit)	eBioscience
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck Biosciences GmbH, Darmstadt
PBS (phosphate-buffered saline), flüssig	Gibco BRL, Karlsruhe
PHA (Phytohämagglutinin)	Oxoid GmbH, Wesel
TAE-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Merck Biosciences GmbH, Darmstadt
Tween20 (Detergens)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck Biosciences GmbH, Darmstadt

3.5 Medien und Seren

Name	Hersteller
AIM-V™ Medium	Gibco™ (Invitrogen), Karlsruhe
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
BSA (bovine Serum Albumin)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
FCS (engl.: fetal calf serum, fötales Kälberserum)	PAA Laboratories, Pasching (A)
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Humanalbumin Alburex 20%	CSL Behring, Offenbach
Humanes Serum	gepooltes Serum gesunder Spender, Blutbank Universitätsmedizin Mainz
Penicillin/Streptomycin	Gibco™ (Invitrogen), Karlsruhe
PBS Gibco 14190 Dulbecco's	Gibco™ (Invitrogen), Karlsruhe
Phytohämagglutinin (PHA)	Oxoig, Merck Biosciences, Darmstadt
RPMI Medium 1640, flüssig	Gibco™ (Invitrogen), Karlsruhe
RPMI only	Gibco™ (Invitrogen), Karlsruhe
X-VIVO15 T-Zellkulturmedium	Biowhittaker, Viersen (B)

3.6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4°C.

Medium	Zusammensetzung
Einfriermedium	AIM-V o. X-Vivo-15, 8% Humanalbumin, 10 U/ml Heparin; Zur Kryokonservierung wurde dem Medium kurz vor der Verwendung 10% DMSO frisch zugegeben.
T-Zellmedium	AIM-V, 10% Humanserum
Zellkulturmedium	RPMI 1640, 10%FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
FACS-Fix	243 ml PBS, 6,8 ml 37% Formaldehyd
FACS-Puffer	500 ml PBS, 0,5g BSA, Steril filtrieren mittels 0,22 µm SteriCupFilter
MACS-Puffer	500 ml PBS, 2,5g BSA, 2 mM EDTA (pH 8), Steril filtrieren mittels 0,22 µm

PBS/BSA	50 ml PBS, 0,25 g BSA, Steril filtrieren durch 0,2 µm Filter
PBS/EDTA	500 ml PBS, 2 ml EDTA (pH 8)
Saponin-Puffer	500 ml PBS, 0,5 g BSA, 0,5 g 10 % Saponin
Trypanblau	1 l H ₂ O, 2 g Trypanblau

3.7 Zytokine und Beads

Name	Hersteller
IL-2 (Interleukin-2)	Chiron Behring GmbH & Co, Marburg
Dynabeads human T-Activating CD3/ CD28	Life Technologies/Invitrogen
OKT3 (Muromab CD3)	Jannsen Cilag, Neuss

3.8 Kits zur MACS-Isolation, CFSE-Färbung und FOXP3-Färbung

Name	Hersteller
MACS Säulen Separations Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Micro Beads CD4 human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Micro Beads CD8 human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit CellTrace™ CFSE (Component A), 10 vials, each containing 50 µg of lyophilized powder DMSO (Component B), 1 vial containing 0.5 mL of high- quality dimethylsulfoxide	Invitrogen
Fox P3 Staining Set Fitc anti Human Fix/Perm Diluent (FOXP3 Kit) Fix/Perm Concentrate (FOXP3 Kit)	eBioscience

3.9 Antikörper

Antigen	Fluorochrom	Spezies	Hersteller	Volumen pro Ansatz		
				Verdünnung	einzel	ab 2 AK
IgG/IgG1	FITC/PE	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
IgG 1k	PE	Maus	BD	01:20	2 µl	2 µl
IgG 1	APC	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
IgG 1k	V450	Maus	BD	Pur	1 µl	1 µl
CD3	FITC	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
CD3	PE	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
CD3	V450	Maus	BD	1:5	2 µl	2 µl
CD3						
CD4	FITC	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
CD4	PE	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
CD4	APC	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
CD8	PE	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
CD8	APC	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
CD8	APC-H7	Maus	BD	Pur	5 µl	2,5 µl
CD8	FITC	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
CD16	PE	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
CD25	PE	Maus	Beckmann Coulter	Pur	10 µl	10 µl
CD25	V450	Maus	BD	Pur	2 µl	2 µl
CD127	FITC	Maus	eBioscience	Pur	5 µl	5 µl
CD127	PE	Maus	eBioscience	Pur	10 µl	10 µl

CD45 RA	BH	Maus	Miltenyi	Pur	1 µl	1 µl
CD52	FITC	Maus	Serotec	Pur	2 µl	2 µl
CD52	PE	Maus	Serotec	Pur	5 µl	2,5 µl
CD56	PC5	Maus	Beckmann Coulter	Pur	5 µl	2,5 µl
FOXP3	FITC	Maus	eBioscience	Pur	5 µl	2,5 µl
HLA-DR	APC	Maus	BD	Pur	5 µl	2 µl
GARP	Alexa Fluor 647	Maus	eBioscience	Pur	5 µl	5 µl
FLAER	FITC, Alexa Fluor 488	Maus	Biozol	Pur	6,25 µl	6,25 µl

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten fluoreszenzmarkierten Ak.

3.10 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

3.10.1 PBMC gesunder Spender

Die in dieser Arbeit verwendeten mononukleären Zellen des peripheren Bluts (englisch: peripheral blood mononuclear cell, PBMC) gesunder Spender stammen von Routine-Blutspenden der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz. Die Vollblutspende wurde dort vorab zu einem „Buffy coat“ (BC, auch als „Leukozytenfilm“ bezeichnet) verarbeitet. Aus den erhaltenen „Buffy coat“ konnten dann PBMC, mittels Ficoll-Separation, wie nachfolgend beschrieben, isoliert werden.

3.10.2 PBMC der Patienten

Die in der Arbeit verwendeten PBMC stammen von Patienten, die an einer klinischen Studie der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz teilgenommen haben (interne Studiennummer: #177, Ethik-Nummer: 837. 175. 03 (3837)). Die Patienten, die an unterschiedlichen hämatopoetischen Neoplasien erkrankt waren, erhielten im Rahmen dieser Studie eine aHSZT. Dabei wurde eine dosisreduzierte Konditionierung mit Fludarabin und Melphalan und eine TZD mit Alemtuzumab kombiniert (Meyer et al. 2007). Alemtuzumab wurde in vivo mit einer Dosis von 100 mg appliziert. Im Anschluss erfolgte die aHSZT. Nach der Transplantation erhielten alle Patienten eine GVHD-Prophylaxe mittels Ciclosporin bis Tag 50 und nachfolgend CD8-depletierte DLI in steigender Dosis prophylaktisch im Abstand von 60-90 Tagen, sofern die Immunsuppression bereits beendet werden konnte und keine aGVHD bestand. DLI-Gaben wurden im Verlauf beendet, sofern es zur Entwicklung einer GVHD Grad II oder höher kam. Aufbau und Protokoll der Studie wurden im Vorfeld von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Mainz genehmigt. Alle Patienten wurden über den Aufbau der Studie aufgeklärt und gaben anschließend ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie und der Spende von Blutproben zur weiteren immunologischen Forschung. Im Aufbau der Studie war vorgesehen, dass den Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der erfolgten HSZT Blutproben

entnommen wurden. Dies erfolgte standardisiert 60 und 360 Tage nach der aHSZT. Dabei wurden jeweils ungefähr 50 ml venöses Blut asserviert. Zusätzlich wurden Proben im Rahmen der Nachsorge bei klinischen Auffälligkeiten, wie zum Beispiel der Neudiagnose oder Verschlechterung einer bereits bestehenden GVHD abgenommen, um kritische Punkte der Immunrekonstitution zu identifizieren. Das Studien-Kollektiv der teilnehmenden Patienten kann als Hoch-Risiko-Kollektiv beschrieben werden: Die Studienteilnehmer litten unter fortgeschrittenen hämatologischen Neoplasien, die durch ein hohes Progressions- und Rezidivrisiko charakterisiert werden können und dadurch häufig für eine myeloablative HSZT nicht geeignet waren. Die „Studie 177“ wurde im Jahr 2011 geschlossen, jedoch wurden weiterhin Patienten analog zu diesem Protokoll transplantiert und in dieser Arbeit untersucht. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 47 Studienteilnehmer oder analog transplantierte Patienten untersucht. In der nachfolgenden Tabelle finden sich die Daten der hier untersuchten Patienten im Hinblick auf Alter, Geschlecht, Grunderkrankung, Probendatum (bezogen auf das Datum der aHSZT), Entwicklung einer GVHD, DLI-Gabe, Versterben und Färbung.

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	Tage nach Tx	GVHD	DLI	+	Panel
1	67	w	sek. AML	28	aGVHD	Nein	Ja	B
1	67	w	sek. AML	70	aGVHD	Nein	Ja	B
2	36	w	DLCL	54	aGVHD	Nein	Ja	B
2	36	w	DLCL	103	aGVHD	Nein	Ja	B
2	36	w	DLCL	237	aGVHD	Nein	Ja	B
3	62	m	primäre Myelofibrose	81	aGVHD	Ja	Nein	C
4	43	w	MM	86	aGVHD	Nein	Ja	B
4	43	w	MM	196	aGVHD	Nein	Ja	B
5	50	m	sek. AML	69	aGVHD	Nein	Nein	B
5	50	m	sek. AML	105	aGVHD	Nein	Nein	B
6	63	m	AML	135	aGVHD	Nein	Ja	D
7	64	m	MM	63	aGVHD	Nein	Ja	B
8	72	w	AML	66	aGVHD	Ja	Nein	B
8	72	w	AML	108	aGVHD	Ja	Nein	B
8	72	w	AML	146	aGVHD	Ja	Nein	B
9	57	m	CML	95	aGVHD	Nein	Ja	B
10	55	w	DLCL	180	aGVHD	Nein	Nein	E
11	56	w	AML	141	aGVHD	Nein	Ja	A
12	65	m	MM	85	aGVHD	Nein	Ja	C
13	53	m	B-NHL	103	aGVHD	Nein	Ja	B
14	60	m	T-NHL	49	aGVHD	Nein	Nein	B

15	50	w	AILD	110	aGVHD	Nein	Nein	B
16	56	w	MM	341	aGVHD	Nein	Nein	B
17	25	m	HLH	86	aGVHD	Nein	Ja	B
18	67	m	primäre Myelofibrose	286	aGVHD	Nein	Ja	C
Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	Probe Tage nach Tx	GVHD	DLI	+	+
19	69	m	Post-PV- Myelofibrose	392	cGVHD	Ja	Nein	C
5	51	m	sek. AML	229	cGVHD	Nein	Nein	B
5	51	m	sek. AML	468	cGVHD	Nein	Nein	B
20	70	m	AML	624	cGVHD	Ja	Nein	B
21	60	m	MPN	286	cGVHD	Ja	Nein	B
22	53	m	NHL	2007	cGVHD	Nein	Ja	B
23	71	m	AML	560	cGVHD	Nein	Nein	B
24	53	m	AML	48	cGVHD	Ja	Nein	B
24	54	m	AML	162	cGVHD	Ja	Nein	B
24	54	m	AML	392	cGVHD	Ja	Nein	B
25	52	w	CML	355	cGVHD	Nein	Ja	C
26	44	w	AML	288	cGVHD	Nein	Ja	B
27	68	m	MDS	524	cGVHD	Nein	Nein	B
28	59	m	B-NHL	1648	cGVHD	Ja	Ja	B
29	42	w	AML Rez.	94	cGVHD	Ja	Ja	B
Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	Probe Tage nach Tx	GVHD	DLI	+	+
30	57	m	MDS	54	noGVHD	Nein	Ja	B
31	47	m	MM	195	noGVHD	Ja	Nein	C
32	64	m	B-NHL	2571	noGVHD	Ja	Nein	B
33	58	m	MDS	202	noGVHD	Ja	Ja	B
34	55	w	MM	131	noGVHD	Ja	Nein	B
35	55	m	AML	138	noGVHD	Ja	Nein	B
36	32	w	AML	61	noGVHD	Ja	Ja	B
37	68	w	AML	119	noGVHD	Nein	Ja	B
38	59	w	IMF	41	noGVHD	Nein	Nein	B
39	67	m	IMF	69	noGVHD	Ja	Nein	B
40	69	w	AML	1160	noGVHD	Ja	Ja	B
41	56	m	MM	56	noGVHD	Ja	Nein	B
41	56	m	MM	105	noGVHD	Ja	Nein	B
41	57	m	MM	385	noGVHD	Ja	Nein	B

42	72	m	AML	496	noGVHD	Ja	Ja	B
43	58	w	sek. AML	293	noGVHD	Ja	Nein	B
44	65	m	sek. AML	825	noGVHD	Nein	Ja	A
45	52	m	MM	105	noGVHD	Nein	Nein	B
46	61	m	NHL	1480	noGVHD	Nein	Nein	B
47	58	m	AML	343	noGVHD	Ja	Nein	B

Tabelle 4: Übersicht über die untersuchten Patienten mit Angabe über Alter, Geschlecht, Diagnose, Zeitpunkt der Probenentnahme nach aHSZT und GVHD-Entwicklung, Panel, DLI-Gabe und Versterben.

4. Methoden

Die Laborprotokolle der verwendeten Methoden finden sich im Anhang und entsprechen den Standardprotokollen der AG Meyer (resp. AG Wagner).

4.1 Arbeiten an der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die dabei eingesetzten Medien wie Lösungen, Puffer und Verbrauchsmaterialien wurden steril verpackt geliefert oder mittels Sterilfiltration oder Autoklavieren sterilisiert. Kultivierung und Bebrütung erfolgten im CO₂-Inkubator bei 37°C mit einem fünfprozentigen CO₂-Gehalt in einer wasserdampfhaltigen Umgebung. Alle weiter verwendeten Ak und Reagenzien wurden steril gelagert und steril verwendet.

4.2 Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus peripherem Blut (Ficoll)

Die Isolierung von PBMC erfolgt in dieser Arbeit mittels einer Dichtengradienten-Zentrifugation. Dabei werden die PBMC durch ein Lymphozyten-Separationsmedium aus Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymeren (Ficoll, hier Ficoll-Medium: Histopaque 1077 von Sigma- Aldrich) aufgereinigt. Anschließend werden die Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation durch die konstante Zentrifugalkraft und Viskosität des Ficoll-Mediums anhand ihrer Dichte separiert, wodurch schlussendlich PBMC isoliert werden können.

4.3 Zählung von Zellen und Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zählung der PBMC erfolgt mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Diese hat folgende Eigenschaften: eine Gesamtfläche von 16 mm², eine von Tiefe 0,2 mm und ein Volumen von 3,2 µl. Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein bestimmtes Volumen der Zellsuspension in einer bestimmten Verdünnung auf die vorbereitete Fuchs-

Rosenthal-Zählkammer aufgetragen. Nach Zählung der Zellen, kann dann unter Beachtung der Verdünnung die Zellzahl berechnet werden. Durch die Verdünnung der Zellen mit physiologischer Trypanblau-Lösung kann zudem die Vitalität der Zellen beurteilt werden: Vitale Zellen weisen eine intakte Membran auf und nehmen den Farbstoff nicht auf, während avitale oder apoptotische Zellen den Farbstoff aufgrund von Schäden der Membran aufnehmen und sich in der Folge sichtbar verfärben.

4.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (englisch: „fluorescence activated cell sorting“, FACS) können Zellen anhand ihrer Größe und Granularität analysiert werden, die einzeln und mit einer hohen Geschwindigkeit an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbeifließen. Zum anderen ermöglicht die Durchflusszytometrie die Analyse und Charakterisierung von zellspezifischen Ag auf oder in den Zellen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Ak. Grundlage der Messung ist die Emission von optischen Signalen, wenn die Zelle den Laserstrahl in einer Küvette passiert. Damit kann jede Zelle einzeln analysiert werden. Bei der Passage des Laserstrahls entsteht Streulicht bzw. ein Fluoreszenzsignal, das im Anschluss von einem Detektor ausgewertet wird. Dabei korreliert die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe und Struktur der Zelle. Die zu untersuchenden Zellen passieren dabei drei Laser unterschiedlicher Wellenlänge. Bei der Passage gibt die Vorwärtslichtstreuung (forward scatter, FSC) Auskunft über die Zellgröße, die Seitwärtslichtstreuung (sideward scatter, SSC) über die Granularität. Der Nachweis von zellspezifischen Ag erfolgt über eine im Vorfeld durchgeführte Färbung der zu untersuchenden Zellen mit fluoreszenzstoffmarkierten Ak. Somit können verschiedene Ag auf den Zellen nachgewiesen und quantifiziert werden, womit verschiedene Zellpopulationen identifiziert werden können. Die erfassten Signale werden dann digitalisiert und mit Hilfe der FACS-Diva Software analysiert. Für die weitere Analyse der FACS-Daten wurde die Software Expo32 und FlowJo verwendet.

4.5 Durchflusszytometrische Färbungen

4.5.1 Färbung von Oberflächenmarkern von Zellen mit Fluoreszenz-Antikörpern (FACS-Färbung)

Zur Identifikation und Charakterisierung verschiedener Zellpopulationen wurden zelluläre Oberflächenmoleküle von PBMC oder TZ mit fluoreszenzstoffmarkierten Ak angefärbt. Die in dieser Arbeit verwendeten Ak waren monoklonale, anti-humane Ak

mit den Fluorochrom-Farbstoffen Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Blue horizon und APC gekoppelt mit H7 (APC-H7). Dadurch ließen sich mit einer Messung bis zu fünf verschiedene zellspezifische Ag nachweisen und damit einzelne Zellpopulationen identifizieren und untersuchen. Die eingesetzten Ak wurden dabei entweder in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration oder mit Antikörperkonzentrationen, welche zuvor mittels einer Titrationskurve bestimmt wurden, verwendet. Der genaue Vorgang der Färbung mit fluoreszenzstoffmarkierten Ak ist im Anhang zu finden. Nachdem die Zellen aufgetaut und gezählt wurden, werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und in der jeweiligen Zellkonzentration (100.000 – 200.000 Zellen pro FACS-Tube) auf die FACS-Tubes verteilt. Nach einem erneuten Waschvorgang können die Ak hinzugegeben werden und für 15 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4°C im Dunkeln, jeweils abhängig vom verwendeten Ak, inkubiert werden. Nach der Inkubation wird erneut FACS-Puffer hinzugegeben und die Probe gewaschen. Nach dem Waschvorgang werden die Ak-gefärbten Zellen in den FACS-Tubes in FACS-Fix fixiert und können im Anschluss mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert werden. Durch die Fixierung mittels FACS-Fix können die Proben bis zu einer Woche bei 4°C gelagert und untersucht werden.

4.5.2 Intrazelluläre Färbung von FOXP3

Ein charakteristisches und zu ihrer Identifikation wesentliches Merkmal von Treg ist die konstitutive Expression des intrazellulären Transkriptionsfaktors FOXP3. Dies wurde anhand eines in der Arbeitsgruppe etablierten Protokolls mit Hilfe des FOXP3-Staining-Sets von eBioscience durchgeführt. Vorab erfolgt hierbei eine FACS-Färbung von oberflächlichen Strukturen wie in Punkt 4.6.1 beschrieben. Anschließend werden die Zellen nicht fixiert, sondern in Saponin-Puffer (ein Detergenz, im Protokoll als Perm/Fix bezeichnet) aufgenommen und für eine Stunde inkubiert. Saponin permeabilisiert die Zellen und führt dazu, dass die Ak in die Zelle diffundieren und dort z.B. intrazelluläre Proteine wie Zytokine oder Transkriptionsfaktoren binden können. Nach mehreren Waschschritten erfolgt eine Blockade mit Rattenserum für 15 Minuten bei 4°C. Dies soll eine unspezifische Bindung des FOXP3-Ak verhindern. Ohne einen weiteren Waschschriff wird dann direkt der Fluorochrom-markierte FOXP3-Ak hinzugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach weiteren Waschschriffen können die Zellen wieder in FACS-Puffer aufgenommen werden und durchflusszytometrisch analysiert werden.

Wie bereits in Abschnitt 2.5.1. ausgeführt, können Treg durchflusszytometrisch als CD3^{pos}, CD4^{pos}, CD25^{pos} und FOXP3^{pos} (CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}FOXP3^{pos}) oder als CD3^{pos}, CD4^{pos}, CD25^{pos} und CD127^{neg/int} (CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}CD127^{neg/int}) Zellen identifiziert werden (Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006; Codarri et al. 2007; Hartigan- O'Connor et al. 2007). In manchen Fällen kam es zu Abweichungen und Anpassungen des Panels, worauf im Abschnitt der Ergebnisse hingewiesen wird. Zur weiterführenden phänotypischen Charakterisierung wurden die Zellen zudem mit GARP, HLA-DR und CD45RA gefärbt. Folgende Panel wurden zur Identifikation und Charakterisierung von Treg verwendet:

Tube	FITC	PE	APC	BH	APCH7
1	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
2	CD3	CD4			
3			CD3		CD4
4				CD3	
5		CD25	CD52	CD3	CD4
6		CD127	CD52	CD3	CD4
7	FOXP3	CD25	CD52	CD3	CD4
8	FOXP3	CD25	CD52	CD3	CD4
9	FOXP3	CD25	CD52	CD3	CD4

Tabelle 5: Panel A zur Identifikation von Treg mittels intrazellulärer Färbung.

Tube	FITC	PE	APC	BH	APCH7
1	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
2	CD3	CD4			
3			CD3		CD4
4	CD127	CD25	CD52	CD3	CD4
5	CD127	CD25	GARP	CD3	CD4
6	FOXP3	CD25	CD52	CD3	CD4
7	FOXP3	CD52	GARP	CD3	CD4
8	FOXP3	CD52	HLA-DR	CD45RA	CD4

Tabelle 6: Panel B zur Identifikation von Treg mittels intrazellulärer Färbung.

Tube	FITC	PE	APC	BH	APCH7
1	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
2	CD3	CD4			
3			CD3		CD4
4	CD127	CD25	CD52	CD3	CD4
5	CD127	CD25	GARP	CD3	CD4

Tabelle 7: Panel C zur Identifikation von Treg ohne intrazelluläre Färbung.

4.5.3 Messung der GARP-Expression nach Stimulation

Wie unter 2.5.5.1 beschrieben, können über die GARP-Expression aktivierte Treg identifiziert werden. Um eine funktionelle Charakterisierung der Treg zu erhalten, wurden PBMC von Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD für insgesamt 96 Stunden in T-Zell-Medium (90% AIM und 10% gepooltes humanes Serum) inkubiert und mit IL-2 (100 U/ml T-Zell-Medium) und OKT3 (30 µg/ml T-Zell-Medium) stimuliert. Eine durchflusszytometrische Messung der GARP-Expression erfolgte zum Zeitpunkt 0 und nach 24 Stunden. Folgendes Panel wurde dafür verwendet:

Tube	FITC	PE	APC	BH	APCH7
1	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
2	CD45				
3		CD45			
4			CD45		
5					CD45
6	CD127	CD52	GARP	CD25	CD4
7	No	No	No	No	No
nach 24 Stunden Inkubation					
8	CD127	CD52	GARP	CD25	CD4

Tabelle 8: Panel D zur Identifikation von Treg nach Stimulation.

4.5.4 Färbung von GPI-Ankern mit fluoreszierendem Aerolysin (FLAER)

In dieser Arbeit wurden Glycosylphosphatidylinositol-Anker (kurz GPI-Anker, engl. GPI anchor) mit Hilfe von FLAER (englisch; fluorescein-labeled proaerolysin; fluoreszierendes Aerolysin) gefärbt. FLAER, ein Prototoxin des Bakteriums *Aeromonas hydrophilia*, wird vor allem in der Diagnostik der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) verwendet (Diep et al. 1998). FLAER bindet direkt an GPI-Anker und kann gekoppelt an Alexa 488 im FITC-Kanal detektiert werden. Dadurch kann das Vorhandensein von GPI-Ankern nachgewiesen werden (Lima 2019). Bei der PNH können aufgrund einer Mutation keine GPI-Anker mehr gebildet werden. Physiologisch werden über GPI-Anker zahlreiche Proteine wie z.B. CD55, CD59 und CD52 an der Zelloberfläche verankert. Die Färbung von PBMC mit FLAER erfolgt direkt nach der FACS-Färbung, ohne vorherige Aufnahme der gefärbten Zellen in FACS-Fix. Die Zellen werden in 125 µl kaltem PBS (4°C) resuspendiert. Zusätzlich werden 6,25 µl FLAER hinzugegeben und die Lösung 20 Minuten auf Eis (im Dunkeln) inkubiert. Im Anschluss erfolgen Waschriffe mit kaltem PBS (4°C), um das ungebundene FLAER zu entfernen. Danach können die Zellen in 500 µl

zweiprozentiger Paraformaldehydlösung fixiert werden. Folgendes Panel wurde für die Färbung verwendet:

Tube	FITC	PE	APC	BH	APCH7
1	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
2	CD45				
3		CD45			
4			CD45		
5					CD45
6	CD127	CD25	CD52	CD3	CD4
7	CD127	CD25	GARP	CD3	CD4
8	FLAER	CD127	CD52	CD25	CD4

Tabelle 9: Panel E zur Färbung von GPI-Ankern, CD52 und Treg.

4.5.5 Färbung von Zellen mit CFSE und Messung der Zellproliferation

Zur Messung der Proliferation von Lymphozyten im FACS wurde in dieser Arbeit der Fluoreszenzfarbstoff CFSE (5,6-Carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester) verwendet. CFSE ist lipophil und kann in die Zellen diffundieren. Dort wird er von zellulären Esterasen gespalten und bindet irreversibel an zelluläre Amine. Teilen sich die Zellen, wird dann jeweils die Hälfte des gebundenen CFSE an die Tochterzellen weitergegeben, was dazu führt, dass die CFSE-Intensität mit jeder Zellteilung abnimmt. Dies ermöglicht die Messung der Zellproliferation über die Abnahme der CFSE-Intensität für bis zu neun Teilungsschritte der Zelle. Die Färbung der Lymphozyten mit CFSE ist angelehnt an die Vorgehensweise, die Hawkins erstmalig beschrieben hat (Hawkins et al. 2007). Lymphozyten werden, wie vorab beschrieben, aufgetaut, gezählt und in warmen FACS-Puffer aufgenommen. Dann erfolgt die Zugabe von CFSE-haltigen Lösung, die sich aus einer Mischung aus dem Farbstoff CFSE und DMSO zusammensetzt, um eine Endkonzentration des Farbstoffs von 2,5 mM zu erhalten. Um die Toxizität des Farbstoffs auf die Viabilität der Zellen zu reduzieren, erfolgt die Inkubation für zehn Minuten bei 37°C. Im Anschluss erfolgt eine erneute Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit einer Suspension aus AIMV und 10% Humanserum mit dem Ziel, noch nicht gebundenes CFSE zu binden. Nach der Inkubation werden die Zellen noch insgesamt zwei Mal mit der Suspension aus AIMV und 10% Humanserum gewaschen, um weiteres, nicht gebundenes CFSE zu entfernen.

4.6 Durchflusszytometrische Zellsortierung, SORT

Mit der Durchflusszytometrie ist es nicht nur möglich Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle zu charakterisieren, sondern in einem weiteren Schritt auch zu sortieren (Cellsort). Dadurch können definierte Zellpopulationen isoliert werden. Zur Vorbereitung der Zellen wurde eine Konzentration von $50-70 \times 10^6$ PBMC zweimal in MACS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4°C mit CD52 (FITC; 70 µl), CD4 (PE; 70 µl), CD3 (V450; 70 µl) und CD8 (APC; 50 µl) inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen, 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und wiederum in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen. Um das Risiko für eine Verstopfung des FACS-Geräts zu reduzieren, wurde die Zellsuspension zum Schluss noch über einen gekühlten Filter (70 µm) gegeben, um etwaige Zellklumpen auszusieben. Zur Analyse der Daten wurde die FACSDiva Software verwendet. Die durchflusszytometrische Zellsortierung wurde dabei in Kooperation mit dem Tumorstudienzentrum an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

4.7 Treg-Suppressionstest

Um die Funktion von Treg zu beurteilen, kann man deren suppressiven Fähigkeiten mit Hilfe eines Proliferations- bzw. Suppressionsassays untersuchen. Dabei werden Responder-Zellen (Tresp) oder Effektor-TZ (Teff) oder PBMC mit CFSE gefärbt und zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen Treg inkubiert. Tresp oder Teff werden anschließend mit IL-2 und OKT3 stimuliert und damit zur Proliferation angeregt. Anschließend erfolgt eine Inkubation für fünf Tage bei 37°C und 5% CO₂. Im Anschluss kann dann die suppressive Fähigkeit der Treg indirekt mittels durchflusszytometrischer Analyse der Proliferation der Tresp oder Teff gemessen werden. In einem parallelen Ansatz werden zudem Tresp und Teff ohne Treg inkubiert, um eine Negativkontrolle zu erhalten, da sich die Zellen in diesem Ansatz ungehindert teilen können. In weiteren Ansätzen wird das Verhältnis von Tresp oder Teff zu Treg, ähnlich wie bei einer Titration, verändert, um später eine konzentrationsabhängige Hemmung erzielen zu können. In Ansätzen mit mehr Treg würde man dementsprechend eine vermehrte Proliferationshemmung erwarten, entsprechend können sich die Tresp oder Teff weniger teilen. Da die Generation von Treg von Patienten in dieser Arbeit aufgrund der vorangegangenen Therapien und beginnenden Rekonstitution wenig ergiebig war, wurde im Ansatz nicht die Menge an Treg verändert, sondern die Menge an Tresp bzw. Teff verändert und die Treg-

Konzentrationen konstant gehalten. Weiterhin wurden PBMC gesunder Spender als Tresp und Teff ausgewählt, um eine möglicherweise fehlerhafte Proliferation Patienteneigener Tresp oder Teff auszuschließen. Tresp oder Teff wurden wie beschrieben mittels einer Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert. Um die funktionellen Eigenschaften von CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg getrennt beurteilen zu können, wurden PBMC von Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD vorab mittels einem SORT als CD4^{pos} CD25^{pos} CD127^{neg} TZ identifiziert und anhand ihrer CD52-Expression in CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg sortiert. Grundlage waren Blutproben von Patienten, bei denen in Voruntersuchungen bereits ein annähernd ausgeglichenes Verhältnis zwischen CD52^{pos} und CD52^{neg} TZ festgestellt werden konnte. Zusammengefasst ergaben sich also zwei Ansätze für den Suppressionsassays - ein Ansatz mit CD52^{pos} Treg und ein Ansatz mit CD52^{neg} Treg eines Patienten eines Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD, die jeweils mit CFSE-gefärbten PBMC von gesunden Spendern inkubiert wurden.

4.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung, wie auch die Erstellung der Schaubilder erfolgte mit GraphPadPrism (Version 5). Zur deskriptiven Statistik wurden Mittelwert, Median, die 25%- und 75%-Quartile sowie die Standardabweichung verwendet. Weiter wurden nicht-parametrische Tests verwendet, da die untersuchten Marker keiner Normalverteilung entsprachen. Mit dem Wilcoxon-Vorzeichenrangtest wurden die Marker GARP, HLA-DR und CD45RA bei verbundenen Stichproben paarweise verglichen, um eine Gegenüberstellung von CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg innerhalb eines Patienten zu ermöglichen. Der Vergleich der Marker zwischen den einzelnen GVHD-Verläufen erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Waren die Resultate signifikant, erfolgten im Anschluss weitere post-hoc Tests.

4.9 Versicherung über die eigenständige Erarbeitung und Auswertung der in Abschnitt 5 und 6 gezeigten und diskutierten Daten

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten, Ergebnisse und Diskussionsabschnitte, sind ausschließlich, durch mich, Lukas Anton Schäfer, erarbeitet und entwickelt worden.

5. Ergebnisse

Im Rahmen der Nachsorge nach Alemtuzumab-basierter TZD wurden Patienten in regelmäßigen Abständen Blutproben entnommen und klinisch im Hinblick auf die Entwicklung einer GVHD untersucht. Wurde eine GVHD festgestellt, wurde diese analog der Glucksberg-Kriterien klassifiziert (Filipovich et al. 2005). Abhängig von der Entwicklung einer GVHD wurden drei Patientengruppen identifiziert: Patienten, die eine akute GVHD entwickelten (aGVHD), Patienten, die eine chronische GVHD entwickelten (cGVHD), sowie Patienten, die zum Zeitpunkt der Beobachtung keine Zeichen einer GVHD aufwiesen (keine GVHD oder noGVHD). Aus den gewonnenen Blutproben der drei Patientengruppen wurden für diese Arbeit PBMC und im Speziellen Treg durchflusszytometrisch analysiert. Neben der CD52-Expression wurde die Expression weiterer Oberflächenantigene gemessen, um spezielle Treg-Subpopulationen zu identifizieren und diese quantitativ und qualitativ zu charakterisieren und ggf. mit dem klinischen Verlauf einer GVHD zu korrelieren. Über serielle Messungen einzelner Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Alemtuzumab-basierter TZD wurde zudem versucht die Immunrekonstitution zu beurteilen und dies direkt mit dem klinischen Verlauf in Verbindung zu bringen. Dieses Vorgehen wird im folgenden Schaubild erneut zusammengefasst:

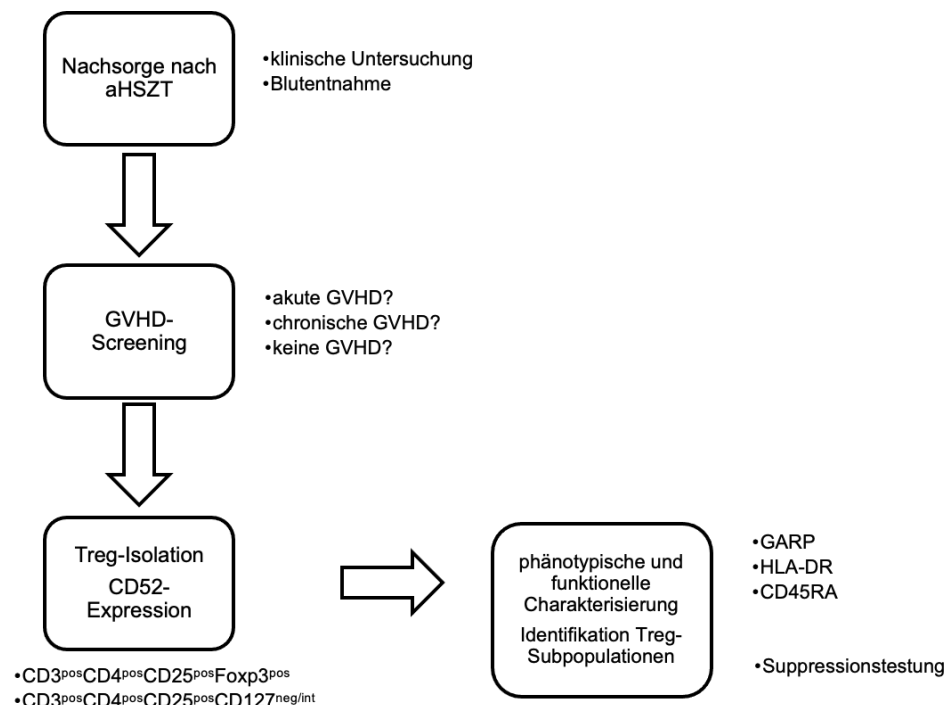


Abbildung 3: Darstellung der Vorgehensweise zur Analyse.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen vorgestellt.

5.1 Rekonstitution GPI-Anker^{neg}, CD52^{neg} TZ nach Alemtuzumab-basierter TZD

PBMC von Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD wurden mit den Ak CD3 (BH/V450), CD4 (APC-Cy7) und CD52 (APC) gefärbt, welche die Identifikation von CD4^{pos} TZ erlauben. Nach Setzen eines Lymphozytengates über ein Forward- und Sidewardscatter konnten CD4^{pos} TZ gegen CD52 aufgetragen werden. Damit kann der prozentuale Anteil von CD52^{pos} und CD52^{neg} CD4^{pos} TZ dargestellt werden.

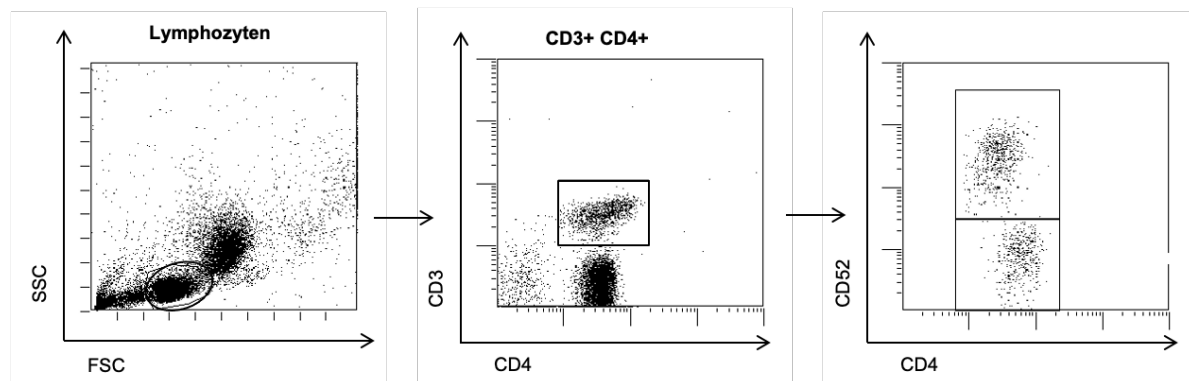


Abbildung 4: Darstellung der CD52^{pos} und CD52^{neg}CD4^{pos} TZ von Patient 5 an Tag 229 nach aHSZT. Beispiel der Gatingstrategie.

Patienten-Nummer	Tage nach HSZT	CD3 ^{pos} CD4 ^{pos}		DLI-Gabe
		CD4 ^{pos} CD52 ^{pos} (%)	CD4 ^{pos} CD52 ^{neg} (%)	
1	28	2,3	98,3	Nein
1	70	8,6	91,3	Nein
2	54	3,8	96,1	Nein
2	103	5,4	94,5	Nein
2	237	2	98	Nein
3	81	17	84,3	Nein
4	86	1,8	98,3	Nein
4	196	13,7	86,3	Nein
5	69	6,5	93,2	Nein
5	105	11,4	88,8	Nein
5	229	52,3	47,7	Nein
5	468	85,1	14,9	Nein
6	135	0,1	99,9	Nein
7	63	5,7	94,3	Nein
8	66	6,2	94,2	Nein
8	108	10,2	90,3	Nein
8	146	9,4	90,7	Nein
9	95	16,4	83	Nein
10	180	28,8	71,1	Nein
11	141	6,1	94	Nein

12	85	6,1	94,3	Nein
13	103	14,5	85,7	Nein
14	49	4,7	95,3	Nein
15	110	8,5	91,5	Nein
16	341	5,1	94,9	Nein
17	86	3,6	96,8	Nein
18	286	97,3	2,7	Nein
19	392	99	0,9	Ja
20	624	99,8	0,2	Nein
21	286	99,8	0	Nein
22	2007	74	26	Ja
23	560	19,5	80,5	Ja
24	48	46	54	Nein
24	162	42,3	57,8	Nein
24	392	99,3	0,7	Nein
25	355	27,3	72,7	Ja
26	288	2,5	97,7	Ja
27	524	86,4	13,7	Nein
28	1648	99,7	0,3	Nein
29	94	47,2	53,5	Nein
30	54	92	8	Nein
31	195	70,4	29,6	Ja
32	2571	99,4	0,7	Ja
33	202	59,8	40,2	Ja
34	131	18,2	82,2	Ja
35	138	10	89	Nein
36	61	97,7	2,3	Ja
37	119	73	27	Nein
38	41	76	24	Nein
39	69	4,1	95,7	Nein
40	1160	99,9	0,1	Ja
41	56	43,4	56,7	Nein
41	105	86	14	Ja
41	385	99,8	0,2	Ja
42	496	96,8	3,3	Ja
43	293	90,9	9,1	Ja
44	825	98,8	1,3	Nein
45	105	91,3	8,9	Nein
46	1480	48,4	51,8	Nein
47	343	94,3	5,7	Ja

Tabelle 10: Darstellung des prozentualen Anteils der CD52^{pos} und CD52^{neg} CD4^{pos} TZ (bezogen auf die CD3^{pos} CD4^{pos} TZ).

Insgesamt konnten 47 Patienten an unterschiedlichen Zeitpunkten nach aHSZT untersucht werden (Tage nach aHSZT: 28 bis 2571, Mittelwert: 332 Tage; Median: 139 Tage). Wie schon in anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, konnte auch hier gezeigt werden, dass fast alle untersuchten Patienten $CD52^{neg}CD4^{pos}$ TZ rekonstituierten und diese über einen längeren Zeitraum nach aHSZT persistieren und nachweisbar blieben. Die Analyse erfolgte dabei bei 19 Patienten zu einem relativ frühen Zeitpunkt nach HSZT (bis Tag 100) zwischen Tag 28 und Tag 95. Bei 30 Patienten zu einem späteren Zeitpunkt nach HSZT (nach Tag 100), zwischen Tag 103 und Tag 2571. Bei allen Patientenproben vor Tag 100 nach aHSZT konnten $CD52^{neg}$ TZ nachgewiesen werden. Bei den Patienten Nummer 1, 2, 4, 5, 8, 24 und 41 erfolgten zusätzlich serielle Messungen im Verlauf zum klinischen und laborchemischen Monitoring der Entwicklung einer GVHD und Beurteilung der Immunrekonstitution.

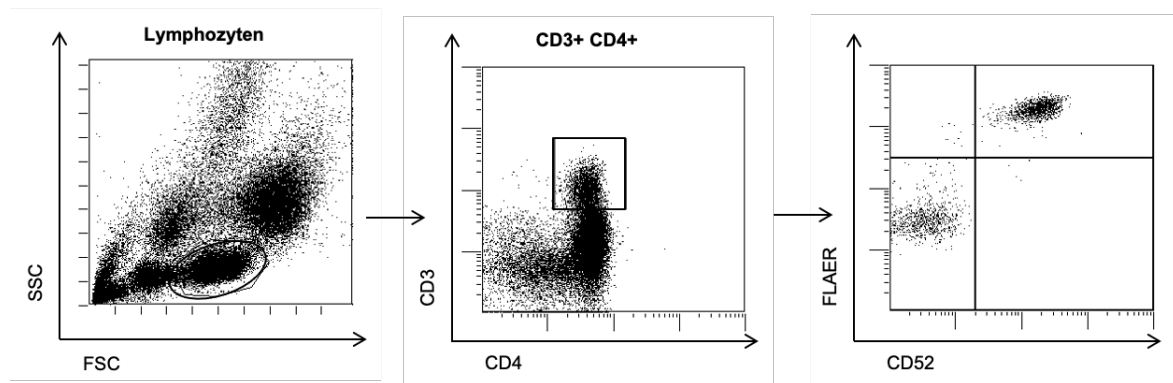


Abbildung 5: Darstellung der $CD52^{pos}$ und $CD42^{neg}$ bzw. $FLAER^{pos}$ und $FLAER^{neg}$ $CD3^{pos}$ und $CD4^{pos}$ TZ von Patient 10 an Tag 180 nach aHSZT. Beispiel der Gatingstrategie.

Weiter konnte in Vorarbeiten bereits gezeigt werden, dass die Rekonstitution $CD52^{neg}$ TZ auf einer fehlenden Expression des GPI-Ankers beruht. GPI-Anker können mit FLAER (FITC) angefärbt werden. Auch in dieser Arbeit konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Abbildung 6 zeigt, dass das Fehlen von $CD52$ auf dem Fehlen des GPI-Ankers beruht.

5.2 Rekonstitution von $CD3^{pos}CD4^{pos}$ TZ bei Patienten mit aGVHD, cGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

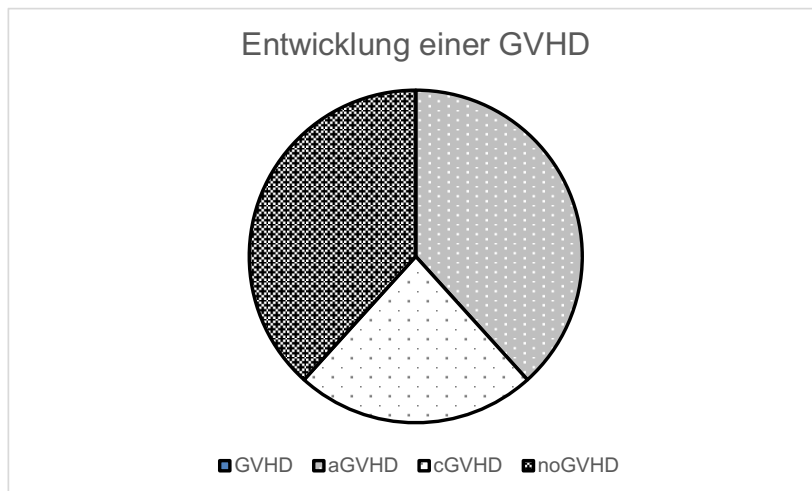


Abbildung 6: Entwicklung einer GVHD nach aHSZT der untersuchten Patienten.

Von den insgesamt 47 untersuchten Patienten entwickelten 18 Patienten im Verlauf eine aGVHD, 11 Patienten eine cGVHD, und 18 Patienten, entwickelten keine GVHD über den beobachteten Zeitraum. Patient 5 entwickelte zu Beginn aGVHD, welche im Verlauf in eine cGVHD überging.

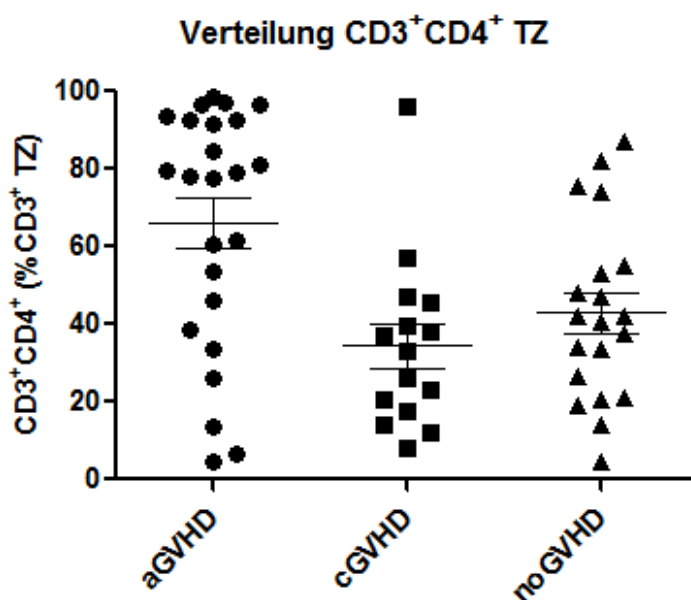


Abbildung 7: Relativer Anteil $CD3^{pos}CD4^{pos}$ TZ (bezogen auf $CD3^{pos}$ TZ) bei Patienten mit aGVHD, cGVHD oder keiner GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.

Patienten mit einer aGVHD rekonstituierten im Vergleich zu Patienten mit einer cGVHD oder keiner GVHD vermehrt $CD3^{pos}CD4^{pos}$ TZ: relativer $CD3^{pos}CD4^{pos}$ TZ-Anteil (in %, bezogen auf die $CD3^{pos}$ TZ) von Patienten mit aGVHD (Mittelwert:

66,05%, Median: 78,70%, 25%-Quartil: 40,30, 75%-Quartil: 92,65, Standardabweichung: 30,95) im Vergleich zu Patienten mit einer cGVHD (Mittelwert: 34,39%, Median: 32,90%, 25%-Quartil: 17,50, 75%-Quartil: 45,60, Standardabweichung: 22,28) oder Patienten, die keine GVHD entwickelten (Mittelwert: 42,92%, Median: 41,20%, 25%-Quartil: 22,55, 75%-Quartil: 54,50, Standardabweichung: 23,07). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p = 0,0085$).

5.3 Rekonstitution $CD3^{pos}CD4^{pos}CD52^{neg}$ TZ bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

Bezogen auf die CD52-Expression zeigte sich, dass Patienten mit einer aGVHD im Vergleich zu Patienten mit einer cGVHD oder keiner GVHD bezogen auf die Population der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ TZ vermehrt $CD3^{pos}CD4^{pos}CD52^{neg}$ TZ rekonstituierten: Relativer Anteil $CD3^{pos}CD4^{pos}CD52^{neg}$ TZ (bezogen auf die $CD3^{pos}CD4^{pos}$ TZ) von Patienten mit aGVHD (Mittelwert: 88,31%, Median: 94,00%, 25%-Quartil: 87,55, 75%-Quartil: 95,70, Standardabweichung: 18,89) im Vergleich zu Patienten mit einer cGVHD (Mittelwert: 34,71%, Median: 26,00%, 25%-Quartil: 0,7000, 75%-Quartil: 57,80, Standardabweichung: 33,51) oder Patienten, die keine GVHD entwickelten (Mittelwert: 24,25%, Median: 9,100%, 25%-Quartil: 2,300, 75%-Quartil: 40,20, Standardabweichung: 28,78). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Die absoluten Zahlen werden in Abschnitt 5.4.2 dargestellt.

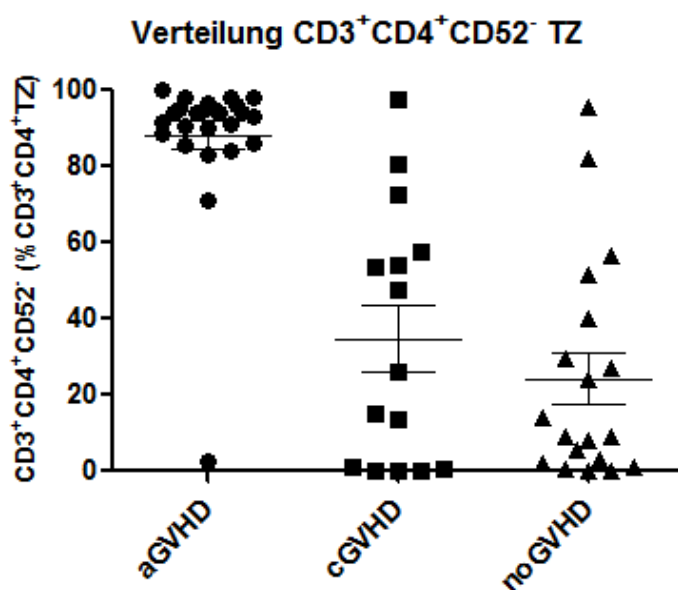


Abbildung 8: Relativer Anteil $CD3^{pos}$, $CD4^{pos}$, $CD52^{neg}$ TZ (in %, bezogen auf die $CD3^{pos}CD4^{pos}$ TZ) bei Patienten mit aGVHD, cGVHD oder keiner GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.

5.4 Rekonstitution von Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

5.4.1 Durchflusszytometrische Identifikation von regulatorischen T-Zellen (Treg)

Treg wurden als $CD3^{pos} CD4^{pos} CD25^{pos} CD127^{neg}$ oder $CD3^{pos} CD4^{pos} CD25^{pos} FOXP3^{pos}$ Zellen identifiziert und nachfolgend mit der Entwicklung bzw. dem klinischen Verlauf einer GVHD korreliert (Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006; Codarri et al. 2007; Hartigan- O'Connor et al. 2007).

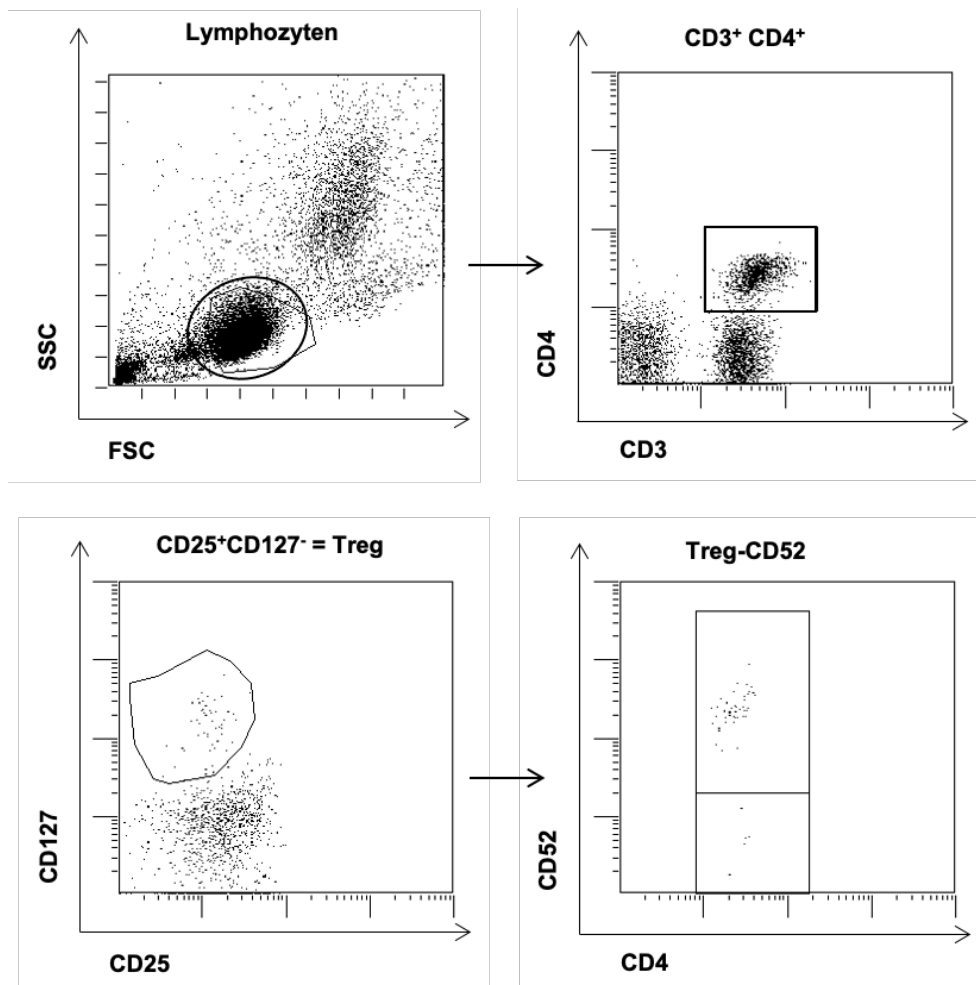


Abbildung 9: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von Treg mittels CD25 und inverser Korrelation von CD127 von Patient 33, 202 Tage nach aHSZT.

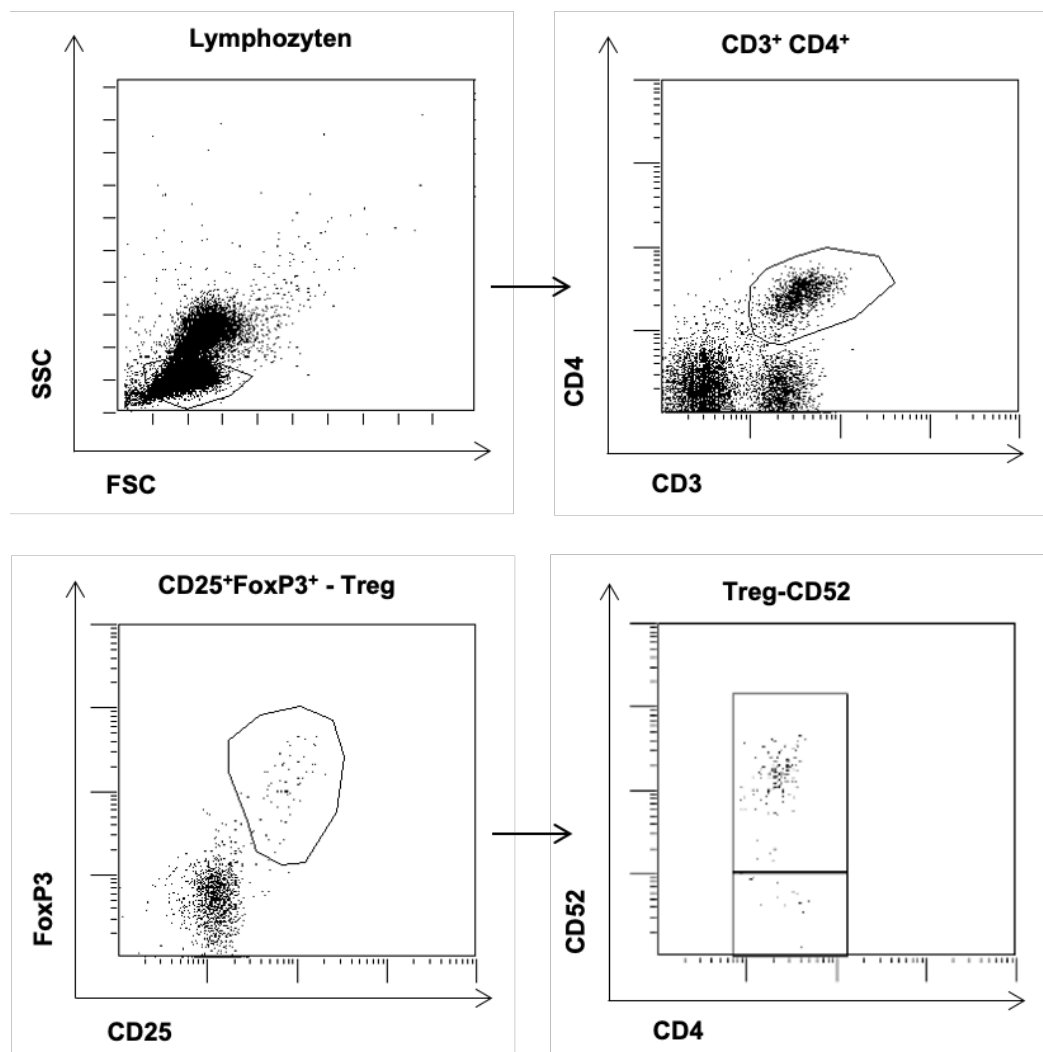


Abbildung 10: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von Treg mittels CD25 und intrazellulärer Färbung von FOXP3 von Patient 33, 202 Tage nach aHSZT.

5.4.2 Absoluter Anteil von Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

Die absoluten $CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}FOXP3^{pos}$ Treg-Zahlen konnten mit Hilfe vorhandener Laborwerte (Differentialblutbild: Leukozyten/nl) berechnet werden. Die Ergebnisse wurden mit dem klinischen Verlauf der Entwicklung einer GVHD korreliert. Insgesamt konnten bei 46 Patienten absolute Treg-Zahlen ermittelt werden. In Blutproben von Patienten mit aGVHD und cGVHD konnten tendenziell mehr Treg nachgewiesen werden als im Vergleich zu Patienten, die keine GVHD entwickelten: absolute Treg von Patienten mit aGVHD (Mittelwert: 40013 Treg/l, Median: 26380 Treg/l, 25%-Quartil: 6342 Treg/l, 75%-Quartil: 66567 Treg/l, Standardabweichung: 42634 Treg/l) im Vergleich zu Patienten mit einer cGVHD (Mittelwert: 65775 Treg/l, Median: 43271 Treg/l, 25%-Quartil: 16177 Treg/l, 75%-Quartil: 100435 Treg/l, Standardabweichung: 71286 Treg/l) oder Patienten die keine GVHD entwickelten (Mittelwert: 47614 Treg/l, Median: 8874 Treg/l, 25%-Quartil: 3140 Treg/l, 75%-Quartil:

27742 Treg/l, Standardabweichung: 127757 Treg/l). Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

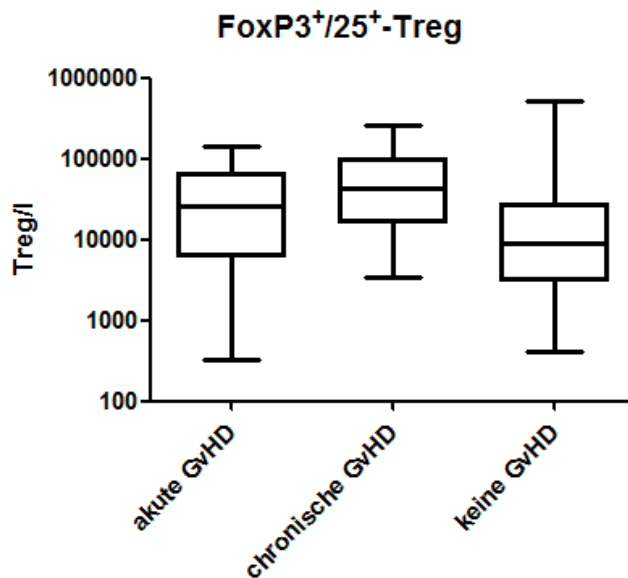


Abbildung 11: Anzahl absoluter Treg ($CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}FOXP3^{pos}$ -TZ/l) bei Patienten mit aGVHD, cGVHD oder keiner GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.

5.4.3 Relativer Anteil von Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

Bezogen auf alle $CD3^{pos}CD4^{pos}$ TZ wiesen Patienten mit einer aGVHD im Vergleich zu Patienten mit einer cGVHD oder keiner GVHD tendenziell verminderte relative Treg-Werte auf: relativer Treg-Anteil von Patienten mit aGVHD (Mittelwert: 8,363 %, Median: 7,6%, 25%-Quartil: 3, 75%-Quartil: 9,6, Standardabweichung: 8,9) im Vergleich zu Patienten mit einer cGVHD (Mittelwert: 12,48%, Median: 9,2%, 25%-Quartil: 6, 75%-Quartil: 20,05, Standardabweichung: 7,7) oder Patienten, die keine GVHD entwickelten (Mittelwert: 11,08%, Median: 7,8%, 25%-Quartil: 2,75, 75%-Quartil: 10,5, Standardabweichung: 14,88). Dies war wie auch schon bei dem Vergleich der absoluten Werte statistisch nicht signifikant.

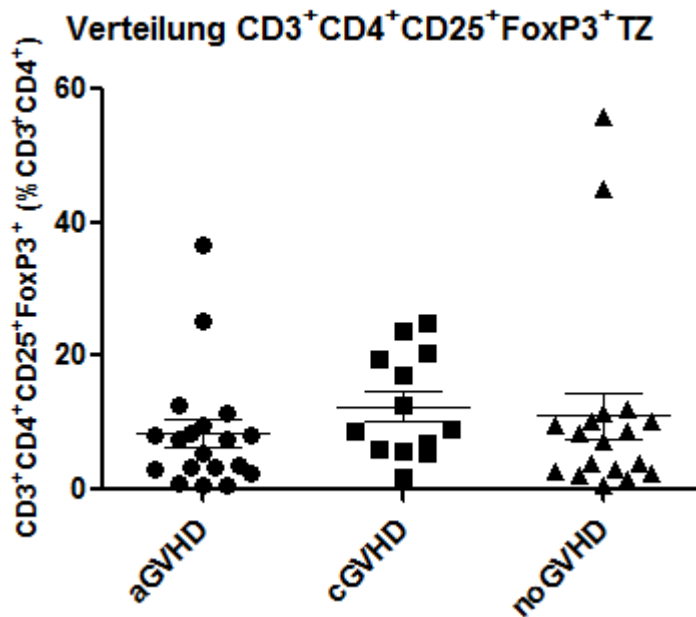


Abbildung 12: Relativer Anteil Treg ($CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}FOXP3^{pos}$ TZ, in % der $CD3^{pos}CD4^{pos}$ TZ) bei Patienten mit einer aGVHD, cGVHD oder keiner GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.

5.5 Rekonstitution von $CD52^{neg}$ Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

In einem nächsten Schritt wurden die Treg der einzelnen Gruppen auf ihre Expression des Oberflächenmarkers CD52 hin analysiert. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer aGVHD (Mittelwert: 120 Tage nach aHSZT; Median: 103 Tage nach aHSZT) vor allem Treg rekonstituieren, die den Marker CD52 nur sehr gering exprimierten ($CD25^{pos}FOXP3^{pos}CD52^{neg}$ -TZ (in %, bezogen auf Treg): Mittelwert: 83%, Median: 88%, 25%-Quartil: 74, 75%-Quartil: 96, Standardabweichung: 14,42). Treg der Patienten mit cGVHD (Mittelwert: 538 Tage nach aHSZT; Median: 392 Tage nach aHSZT) oder keiner GVHD (Mittelwert: 441 Tage nach aHSZT; Median: 166 Tage nach aHSZT) wiesen eine deutlich höhere Expression von CD52 auf: Patienten mit cGVHD ($CD25^{pos}FOXP3^{pos}CD52^{neg}$ -TZ: cGVHD: Mittelwert: 15%, Median: 7%, 25%-Quartil: 1,85, 75%-Quartil: 25,80, Standardabweichung: 17,64) und Patienten ohne GVHD ($CD25^{pos}FOXP3^{pos}CD52^{neg}$ -TZ: keine GVHD: Mittelwert: 11,28 %, Median: 7,5%, 25%-Quartil: 1,275, 75%-Quartil: 21,4, Standardabweichung: 12,02). Der Unterschied von Patienten mit aGVHD zu Patienten mit cGVHD war statistisch signifikant ($p < 0,0001$), wie auch der Unterschied zwischen Patienten mit aGVHD zu Patienten ohne GVHD ($p < 0,0001$).

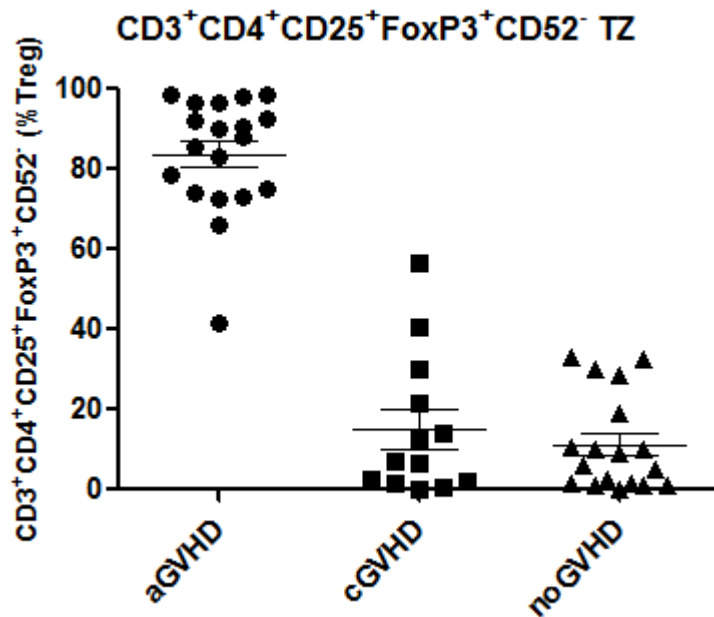


Abbildung 13: Verteilung von CD52^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD25^{pos}, FOXP3^{pos} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.

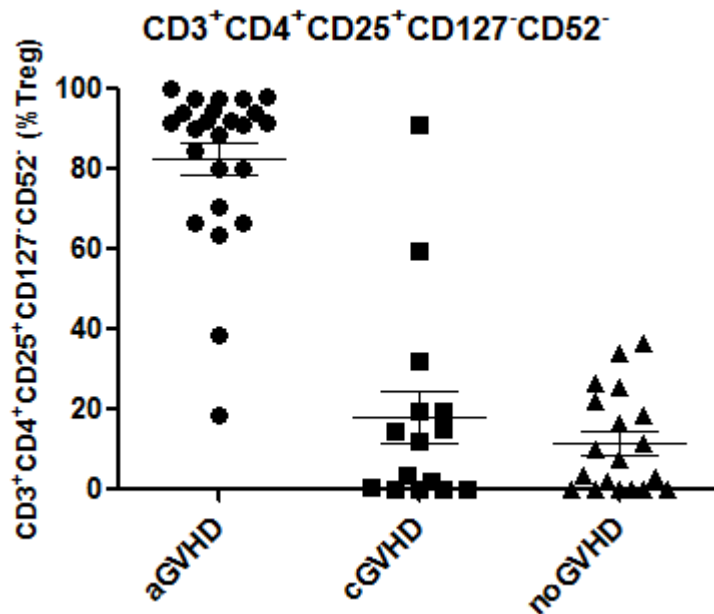


Abbildung 14: Verteilung von CD52^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD25^{pos}, CD127^{neg} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.

Auch über die Identifikation von Treg mit CD25 und CD127 ließen sich ähnliche Ergebnisse nachweisen: Patienten mit aGVHD rekonstituieren vor allem CD52^{neg}-Treg (Mittelwert: 82,51%, Median: 91,30%, 25%-Quartil: 73,10, 75%-Quartil: 94,50, Standardabweichung: 19,98), im Vergleich zu Patienten mit einer cGVHD (Mittelwert: 18,07%, Median: 12,20%, 25%-Quartil: 0,3000, 75%-Quartil: 19,80, Standardabweichung: 25,89) oder Patienten ohne GVHD (Mittelwert: 11,49%, Median: 7,400%, 25%-Quartil: 0,0, 75%-Quartil: 22,20, Standardabweichung: 12,45). Der

Unterschied von Patienten mit aGVHD zu Patienten mit cGVHD war statistisch signifikant ($p < 0,0001$), wie auch der Unterschied zwischen Patienten mit aGVHD zu Patienten ohne GVHD ($p < 0,0001$). Diese Beobachtung ist somit unabhängig davon, mit welcher Methode Treg identifiziert wurden.

5.6 Weitere Charakterisierung und Identifikation von Treg-Subpopulationen bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

Zur weiteren Charakterisierung und Identifikation von Treg-Subpopulationen wurden Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD auf die Expression des funktionellen Markers GARP und der Oberflächenmarker HLA-DR und CD45RA untersucht. Im Anschluss erfolgte die Analyse der CD52-Expression der untersuchten Treg-Subpopulationen und die Korrelation mit der Entwicklung einer GVHD, die in diesem Unterkapitel näher spezifiziert wird.

5.6.1 Expression des Oberflächenmarkers GARP auf Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung wurde die Expression des Oberflächenmarkers GARP bestimmt. GARP identifiziert spezifisch aktivierte Treg. Aktivierte Treg können somit als $CD25^{pos}$ $FOXP3^{pos}$ $GARP^{pos}$ Zellen bezeichnet werden.

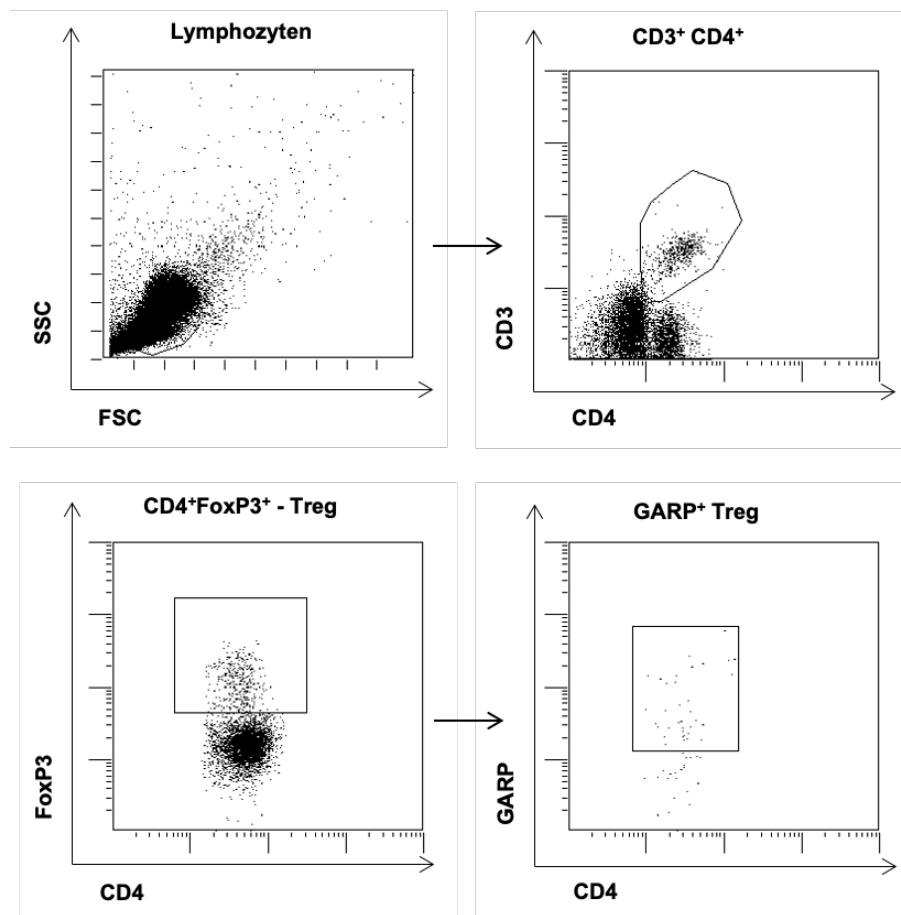


Abbildung 15: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von aktivierten, GARP^{pos} Treg von Patient 5, 105 Tage nach aHSZT.

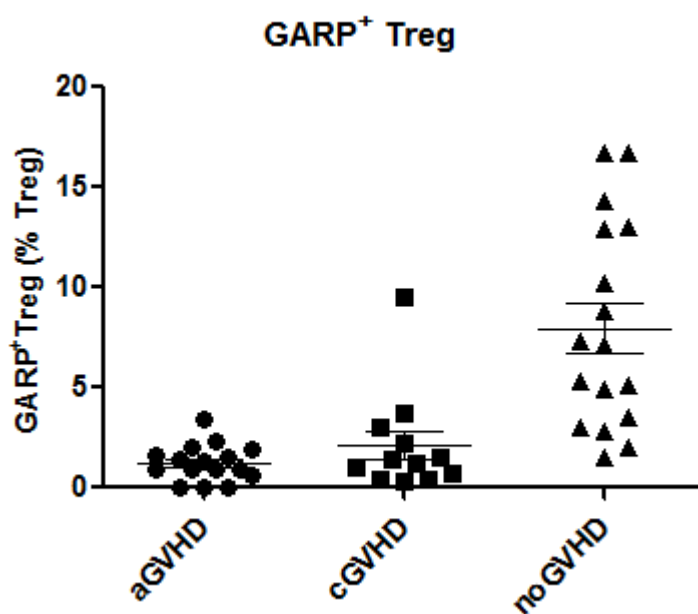


Abbildung 16: Verteilung von GARP^{pos}-Treg (bezogen auf CD4^{pos}FOXP3^{pos}) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.

Bezogen auf den klinischen Verlauf und die Entwicklung einer GVHD rekonstituierten Patienten mit einer aGVHD (aGVHD: Mittelwert: 1,226%, Median: 1,100%, 25%-Quartil: 0,6750, 75%-Quartil: 1,825, Standardabweichung: 0,9115), und Patienten mit cGVHD (cGVHD: Mittelwert: 2,108%, Median: 1,300%, 25%-Quartil: 0,4750, 75%-Quartil: 2,800, Standardabweichung: 2,558) signifikant weniger GARP^{pos} Treg (in %, bezogen auf Treg) als Patienten, die keine GVHD entwickelten (noGVHD: aGVHD: Mittelwert: 7,947%, Median: 7,100%, 25%-Quartil: 3,250, 75%-Quartil: 12,95, Standardabweichung: 5,140). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p = < 0.0001$).

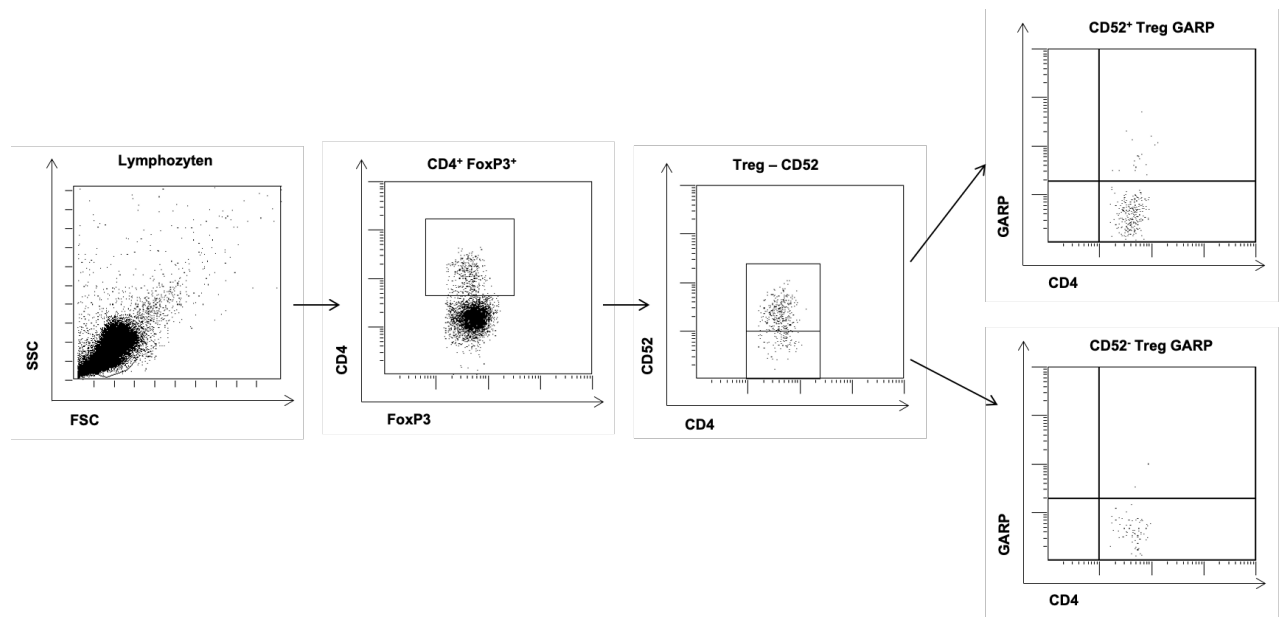


Abbildung 17: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von CD52^{pos}Treg und CD52^{neg}Treg und deren GARP-Expression von Patient 5, 105 Tage nach aHSZT.

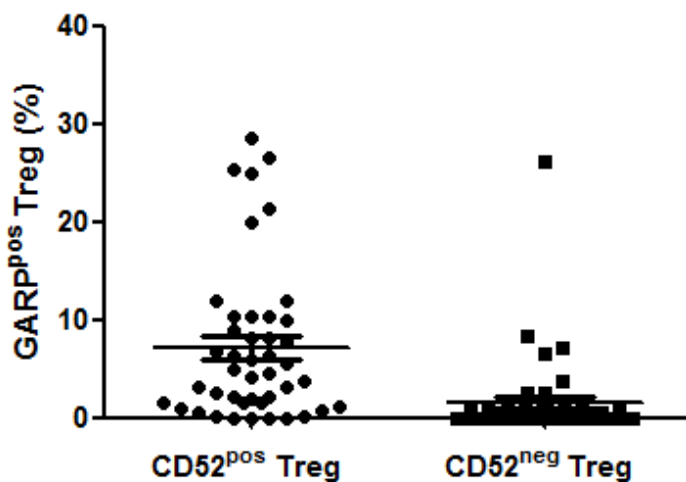


Abbildung 18: GARP-Expression von CD52^{pos}- und CD52^{neg}-Treg (bezogen auf GARP^{pos}CD4^{pos}FOXP3^{pos}) bei Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD.

Bezogen auf die CD52-Expression konnte ein Unterschied der GARP-Expression nachgewiesen werden: GARP konnte dabei nahezu ausschließlich auf CD52^{pos} Treg nachgewiesen werden: CD52^{pos} Treg wiesen eine statistisch signifikant (p-Wert: < 0.0001) stärkere Expression von GARP auf (Mittelwert: 7,191%, Median: 4,750%, 25%-Quartil: 1,500, 75%-Quartil: 10,20, Standardabweichung: 7,868) im Vergleich zur Expression von GARP auf CD52^{neg} Treg (Mittelwert: 1,557%, Median: 0,0%, 25%-Quartil: 0,0, 75%-Quartil: 1,175, Standardabweichung: 4,264).

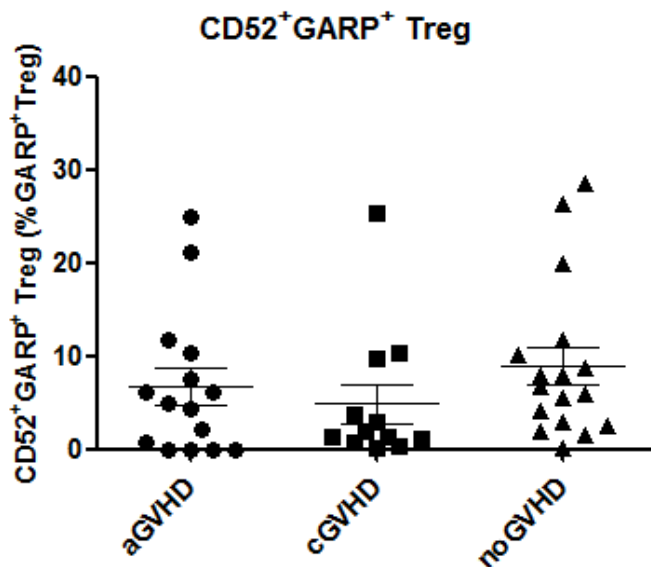


Abbildung 19: aktivierte GARP^{pos}CD52^{pos} Treg (in %, bezogen auf GARP^{pos}CD4^{pos}FOXP3^{pos}) bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TTD.

Bezogen auf die Entwicklung einer GVHD zeigten sich keine statistischen Auffälligkeiten im Hinblick auf den Nachweis GARP^{pos} CD52^{pos} Treg (p-Wert: 0,1619). GARP^{pos} CD52^{pos} Treg (in %; bezogen auf GARP^{pos} Treg) fanden sich bei Patienten mit aGVHD (Mittelwert: 6,767%, Median: 5,000%, 25%-Quartil: 0,0, 75%-Quartil: 10,40, Standardabweichung: 7,705), cGVHD (Mittelwert: 5,025%, Median: 1,750%, 25%-Quartil: 0,9000, 75%-Quartil: 8,375, Standardabweichung: 7,282) und ohne GVHD (Mittelwert: 9,094%, Median: 6,800%, 25%-Quartil: 2,850, 75%-Quartil: 11,10, Standardabweichung: 8,393).

5.6.2 Expression der Oberflächenmarker HLA-DR und CD45RA auf Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TTD

Weiter können über die Analyse der Expression der Oberflächenmarker HLA-DR und CD45RA weitere Treg-Subpopulationen unterschieden und differenziert werden:

aktivierte bzw. stark suppressive Treg (HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg}); Gedächtnis- oder Memory-Treg (HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg}) und naive Treg (HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos}).

5.6.2.1 Aktivierte, suppressive HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

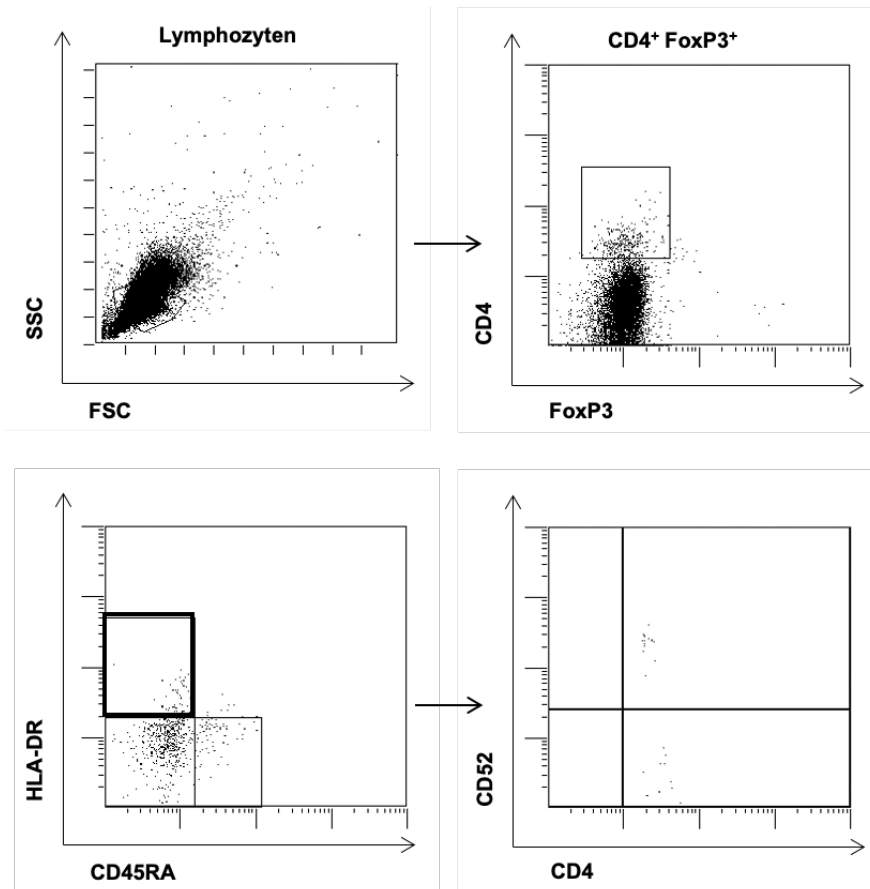


Abbildung 20: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg und deren CD52-Expression von Patient 1, 28 Tage nach aHSZT.

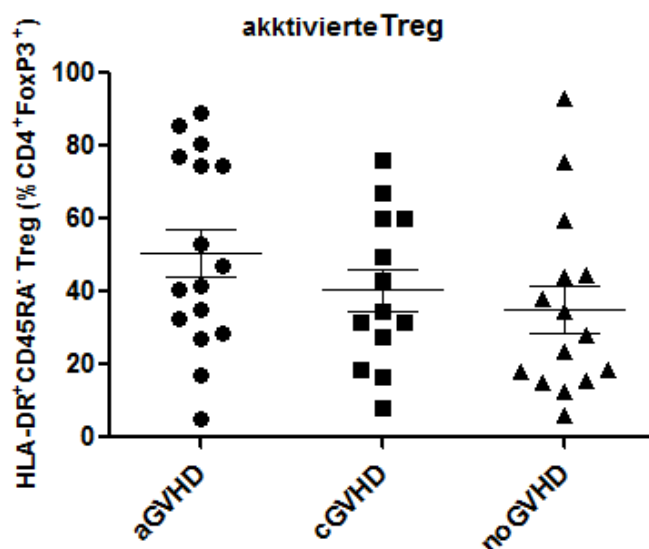


Abbildung 21: Verteilung von aktivierten, HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD4^{pos}FOXP3^{pos} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.

Bezogen auf den klinischen Verlauf und die Entwicklung einer GVHD zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (p-Wert: 0,1932) zwischen dem relativen Anteil der stark immunsuppressiven HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg Population (in %, bezogen auf CD4^{pos}FOXP3^{pos} Treg) von Patienten mit aGVHD (aGVHD: Mittelwert: 50,63%, Median: 44,45%, 25%-Quartil: 29,50, 75%-Quartil: 76,38, Standardabweichung: 26,40), cGVHD (cGVHD: Mittelwert: 40,43%, Median: 34,60%, 25%-Quartil: 23,25, 75%-Quartil: 60,10, Standardabweichung: 20,97) und Patienten, die keine GVHD entwickelten (noGVHD: Mittelwert: 35,13%, Median: 27,90%, 25%-Quartil: 15,80, 75%-Quartil: 44,70, Standardabweichung: 24,82). Tendenziell schienen jedoch Patienten mit einer aGVHD vermehrt stark immunsuppressive, HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg zu rekonstituieren.

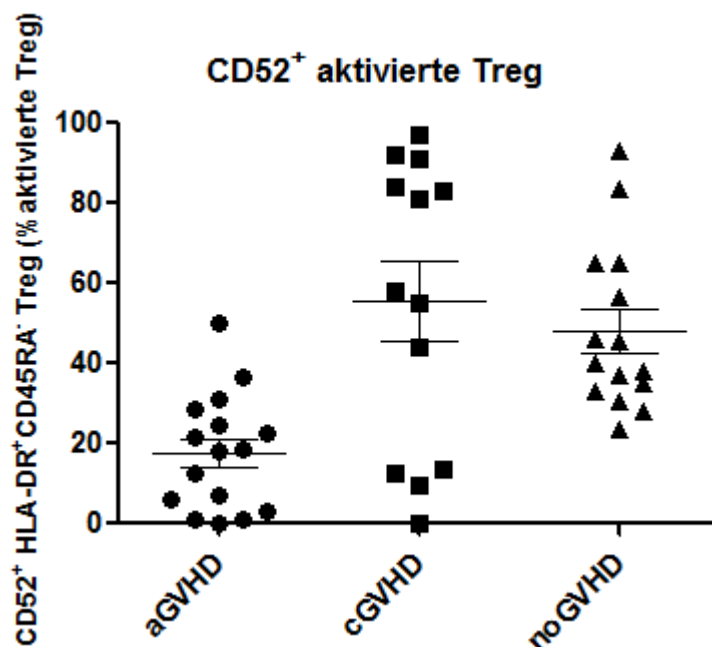


Abbildung 22: Verteilung der aktivierten CD52^{pos} HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg (in %, bezogen auf alle HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.

Wie auch bereits bei der Expression von GARP zeigte sich eine signifikant höhere Expression von CD52 auf HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg bei Patienten mit cGVHD (p = 0,0110) und keiner GVHD (p = < 0.0001) im Vergleich zu Patienten mit aGVHD: Mittelwert: 17,68%, Median: 18,35%, 25%-Quartil: 3,675, 75%-Quartil: 27,75, Standardabweichung: 14,54. Im Vergleich zur Expression von CD52 auf HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg bei Patienten mit cGVHD (Mittelwert: 55,42%, Median: 58,10%, 25%-Quartil: 12,95, 75%-Quartil: 87,55, Standardabweichung: 35,92) und ohne GVHD (Mittelwert: 48,07%, Median: 40,00%, 25%-Quartil: 33,30, 75%-Quartil: 64,90, Standardabweichung: 20,64) fand sich kein signifikanter Unterschied.

5.6.2.2 HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg}- Gedächtnis oder Memory-Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

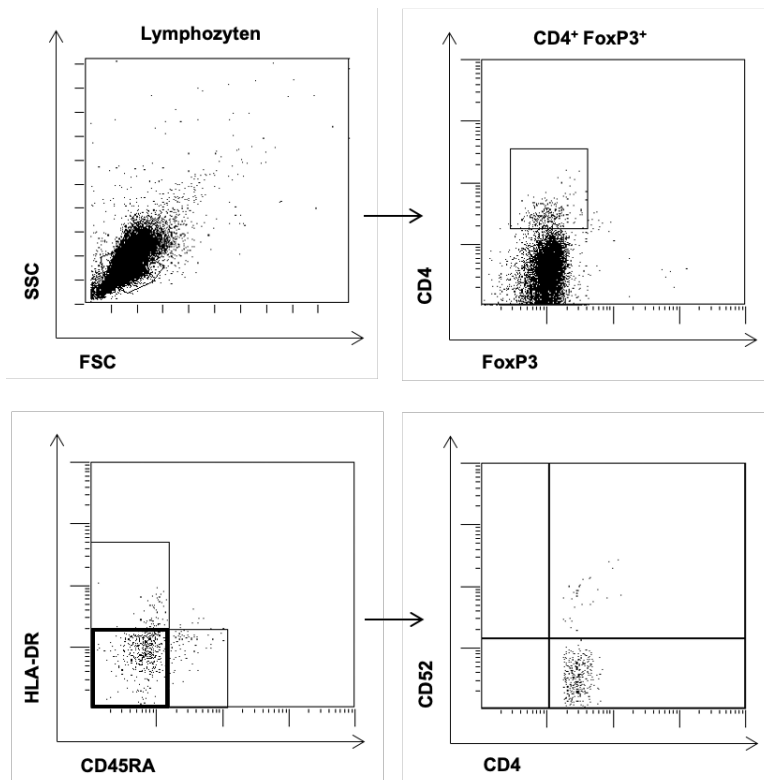


Abbildung 23: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} Treg und deren CD52-Expression von Patient 1, 28 Tage nach aHSZT.

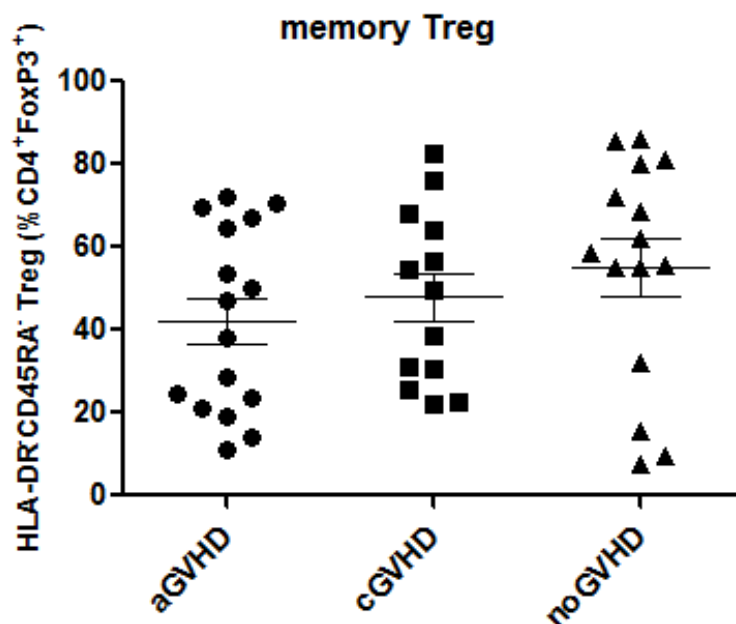


Abbildung 24: Verteilung von HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD4^{pos}FOXP3^{pos} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.

Bezogen auf den klinischen Verlauf und die Entwicklung einer GVHD zeigten sich keine statistischen Auffälligkeiten (p-Wert: 0,2887) zwischen den HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} Memory-/Gedächtnis-Treg (bezogen auf CD4^{pos}FOXP3^{pos} Treg) von

Patienten mit aGVHD (aGVHD: Mittelwert: 42,18%, Median: 42,60%, 25%-Quartil: 21,83, 75%-Quartil: 66,58, Standardabweichung: 22,21), Patienten mit cGVHD (cGVHD: Mittelwert: 47,86%, Median: 49,40%, 25%-Quartil: 28,10, 75%-Quartil: 65,95, Standardabweichung: 20,92) und Patienten ohne GVHD (noGVHD: Mittelwert: 55,05%, Median: 58,80%, 25%-Quartil: 32,30, 75%-Quartil: 80,00, Standardabweichung: 26,87).

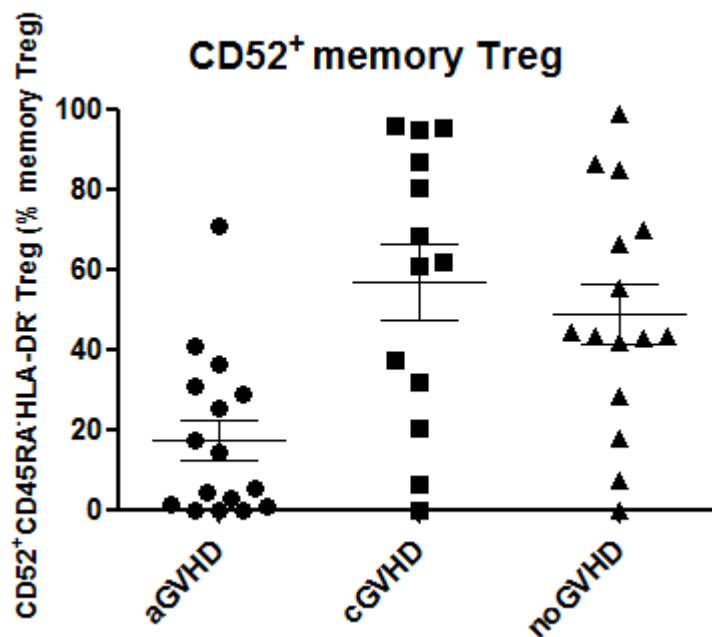


Abbildung 25: Verteilung der CD52^{pos} HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} Treg (in %, bezogen auf alle HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.

Wie bei den aktivierten HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg zeigte sich eine signifikant höhere Expression von CD52 auf den HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} Memory-Treg bei Patienten mit einer cGVHD ($p = 0,002$) und keiner GVHD ($p = 0,0033$) im Vergleich zu Patienten mit aGVHD: Mittelwert: 17,70%, Median: 10,10%, 25%-Quartil: 1,275, 75%-Quartil: 30,65, Standardabweichung: 20,24. Im Vergleich zur Expression von CD52 auf HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} Treg bei Patienten mit cGVHD (Mittelwert: 34,42%, Median: 62,10%, 25%-Quartil: 26,15, 75%-Quartil: 90,95, Standardabweichung: 34,42) und ohne GVHD (Mittelwert: 48,93%, Median: 43,80%, 25%-Quartil: 28,70, 75%-Quartil: 70,00, Standardabweichung: 28,84) fand sich kein signifikanter Unterschied.

5.6.2.3 Naive, HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos} Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

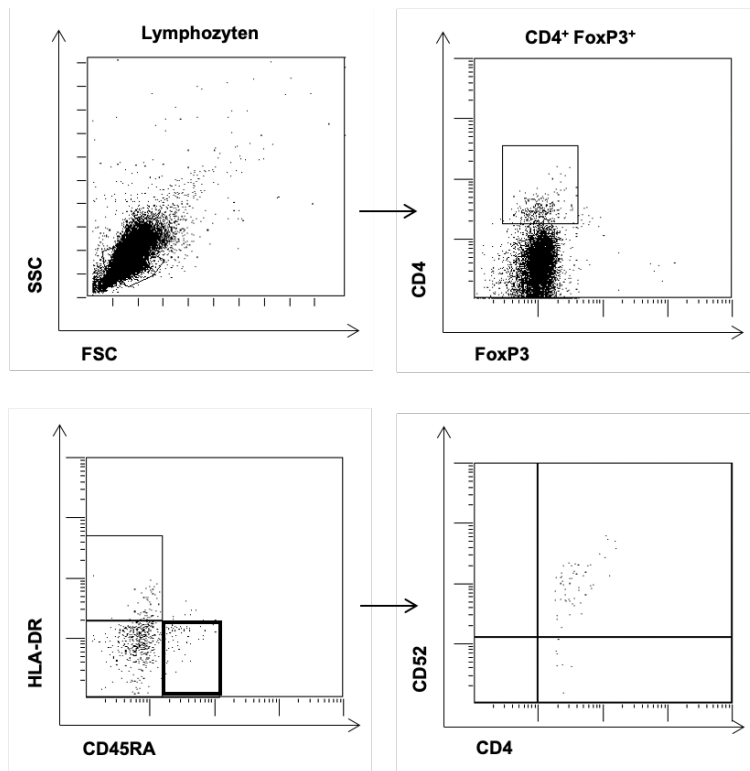


Abbildung 26: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation von HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos} Treg und deren CD52-Expression von Patient 1, 28 Tage nach aHSZT.

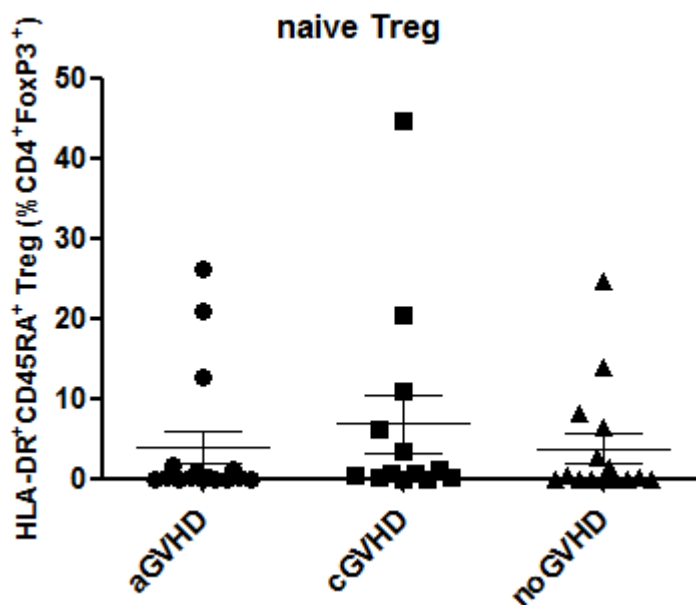


Abbildung 27: Verteilung von HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD4^{pos}FOXP3^{pos} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.

Bezogen auf den klinischen Verlauf und die Entwicklung einer GVHD zeigten sich keine statistischen Auffälligkeiten (p-Wert: 0,3302) zwischen den HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos} naiven Treg (bezogen auf CD4^{pos}FOXP3^{pos} Treg) von Patienten mit

aGVHD (aGVHD: Mittelwert: 4,069%, Median: 0,2000%, 25%-Quartil: 0,0, 75%-Quartil: 1,725, Standardabweichung: 8,309), Patienten mit cGVHD (cGVHD: Mittelwert: 6,962%, Median: 0,9000%, 25%-Quartil: 0,4000, 75%-Quartil: 8,700, Standardabweichung: 12,87) und Patienten ohne GVHD (noGVHD: Mittelwert: 3,907 %, Median: 0,4000%, 25%-Quartil: 0,0, 75%-Quartil: 6,500, Standardabweichung: 7,062). 42 Patientenproben konnten auf das Vorhandensein von HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos} naiven Treg analysiert werden. Der Nachweis von naiven Treg gelang dabei bei 27 Patienten (entsprechend 64% der untersuchten Proben). Bei 16 dieser 27 Patienten (entsprechend 55%) lag der Anteil der naiven Treg, bei unter 2%. Bei 16 Patienten (entsprechend 38%) ließen sich keine naiven Treg nachweisen.

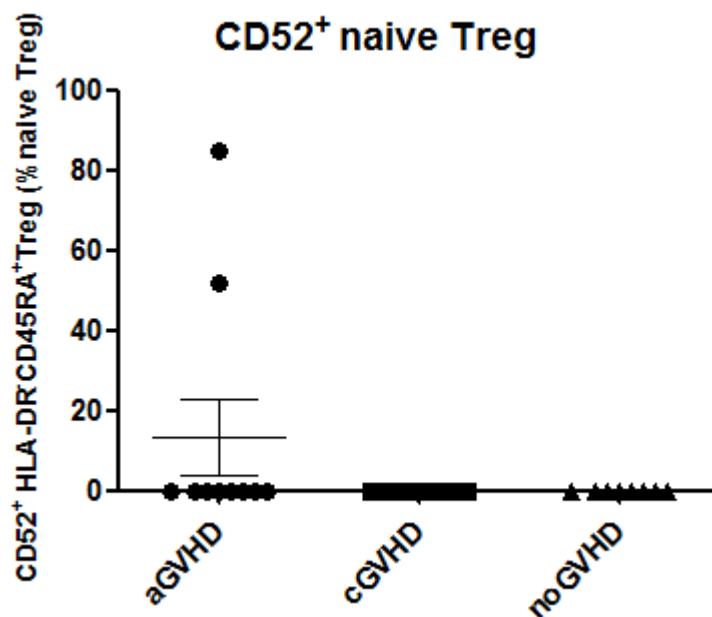


Abbildung 28: Verteilung der CD52^{pos} HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos} Treg (bezogen auf alle HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos} Treg) zwischen Patienten mit aGVHD, cGVHD und ohne GVHD.

CD52^{pos} naive Treg (in %, bezogen auf naive Treg) fanden sich nur bei Patienten mit aGVHD oder cGVHD (aGVHD: Mittelwert: 13,69%, Median: 0,0%, 25%-Quartil: 0,0, 75%-Quartil: 12,98, Standardabweichung: 29,90; cGVHD: Mittelwert: 10,00%, Median: 0,0%, 25%-Quartil: 0,0, 75%-Quartil: 0,0, Standardabweichung: 31,62). Es bestand dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen. Sofern naive Treg rekonstituierten, waren diese unabhängig von der Entwicklung einer GVHD vor allem CD52^{neg}.

5.7 Korrelation der Rekonstitution von Treg mit dem klinischen Verlauf einer GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

Im Rahmen der Nachsorge erfolgten zu festen Zeitpunkten in der KMT-Ambulanz der Universitätsmedizin Mainz klinische Visiten und laborchemische Kontrollen (Studie #808; „Untersuchungen zur Rekonstitution des Immunsystems in Patienten nach Stammzelltransplantation“, Ethik-Nummer: 837.185.00 (2551), Antrag Prof. Dr. Huber, Prof. Dr. Wölfel, PD Dr. Herr, Dr. R. G. Meyer). Bei einer akuten klinischen Verschlechterung oder Auftreten von Zeichen einer GVHD erfolgte eine frühzeitigere Vorstellung. Proben wurden während der klinischen Visite asserviert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. So konnten serielle Untersuchungen zu mehreren Zeitpunkten bzw. über einen längeren Zeitraum bei einem Patienten erfolgen. Dies ermöglichte eine Nachvollziehbarkeit der Immunrekonstitution und eine Korrelation mit dem klinischen Verlauf.

5.7.1 Immunrekonstitution eines Patienten mit aGVHD und cGVHD im Verlauf nach Alemtuzumab-basierter TZD

Patient 5 wurde bei sekundärer AML am 29.09.2011 allogenen stammzelltransplantiert. Proben konnten zu folgenden Zeitpunkten asserviert werden: am 07.12.2011 (entsprechend Tag 69 nach aHSZT), am 12.01.2012 (entsprechend Tag 105 nach aHSZT), am 15.05.2012 (entsprechend Tag 229 nach aHSZT) und am 09.01.2013 (entsprechend Tag 468 nach aHSZT). Ungefähr 60 Tage nach aHSZT entwickelte der Patient Zeichen einer aGVHD der Haut, welche histologisch gesichert wurde. Stadiengerecht wurde eine Steroidstoß-Therapie eingeleitet. Aufgrund des Auftretens einer aGVHD erhielt Patient 5 keine DLI. Zum zweiten Zeitpunkt 105 Tage nach aHSZT bestanden weiter Zeichen einer aGVHD der Haut, jedoch deutlich regredient, sodass die Therapie angepasst wurde. Im weiteren Verlauf imponierten zunehmende Zeichen der cGVHD, eine histopathologische Sicherung erfolgt am 09.05.2012, ungefähr zum Zeitpunkt der dritten Probenentnahme, welche den Befund einer chronisch lichenoiden GVHD der Haut bestätigten. Eine letzte Probenasservation gelang am 09.01.2013, entsprechend 468 Tage nach aHSZT. Klinisch bestanden weiter Zeichen der cGVHD in milder Ausprägung.

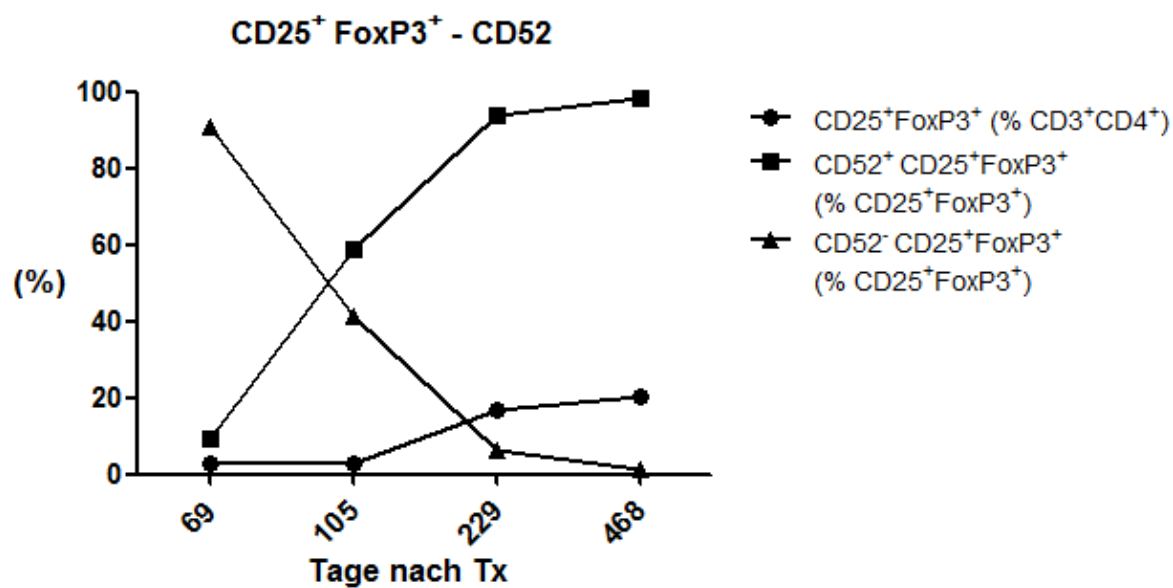


Abbildung 29: Entwicklung der CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg (in %, bezogen auf CD3^{pos}CD4^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 5 nach 69, 105, 229 und 468 Tagen nach aHSZT.

Tage nach HSZT	CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} (% der CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ)	CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos}	
		CD52 ^{pos} (%)	CD52 ^{neg} (%)
69	2,6	9,4	90,6
105	3	58,6	41,4
229	17	93,6	6,4
468	20,5	98,5	1,5

Tabelle 11: Entwicklung der CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg (% der CD3^{pos}CD4^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 5 nach 69, 105, 229 und 468 Tagen nach aHSZT.

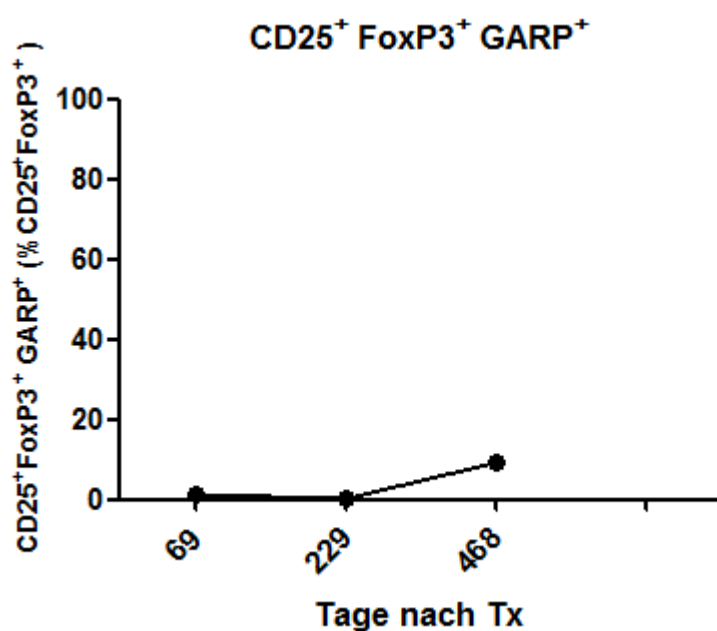


Abbildung 30: Entwicklung der GARP^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg) bei Patient 5 nach 69, 229 und 468 Tagen nach aHSZT.

Zum Zeitpunkt der Diagnose der aGVHD fanden sich Patient 5 zum einen anteilig nur geringe Treg-Zahlen, welche vorwiegend CD52^{neg} waren. Im weiteren klinischen Verlauf mit Besserung der klinischen Symptomatik und Konversion in eine cGVHD kam es neben einem Anstieg des Anteils der Treg an den CD4^{pos} TZ von 2,6% auf 20,5% zu einer starken Zunahme CD52^{pos} Treg. Waren nach 69 Tagen nur ca. 9,1% der Treg CD52^{pos}, waren es nach 468 Tagen 98,5%. Neben dem Anstieg der CD52^{pos} Treg kam es zudem zu einer Zunahme der Subpopulationen der GARP^{pos} Treg. Unabhängig von der beobachteten Subpopulation, nahm der Anteil CD52^{pos} Zellen innerhalb der Subpopulation über den Verlauf zu, der Anteil CD52^{neg} Zellen ab.

5.7.2 Immunrekonstitution eines Patienten mit aGVHD nach

Alemtuzumab-basierter TZD

Patient 2 wurde bei einem diffus großzelligen B-NHL am 06.04.2011 allogent stammzelltransplantiert. Proben konnten zu folgenden Zeitpunkten asserviert werden: am 30.05.2011 (entsprechend Tag 54 nach aHSZT), am 18.07.2011 (entsprechend Tag 103 nach aHSZT) und am 29.11.2011 (entsprechend Tag 237 nach aHSZT). Bereits früh nach aHSZT entwickelte Patient 2 eine aGVHD der Haut, sodass die Immunsuppression mit Ciclosporin nach aHSZT verlängert wurde, eine Steroid-Stoßtherapie war zu Beginn nicht notwendig. Im weiteren Verlauf zeigte sich die Haut-GVHD nach sukzessiver Reduktion der Immunsuppression progredient (ca. 60% der KOF), zusätzlich entwickelte Patient 2 eine aGVHD des Darms, insgesamt einer schweren aGVHD Schweregrad III entsprechend. Eine histologische Sicherung erfolgte im August 2011. Eine Steroid-Stoßtherapie wurde begonnen. Bei weiter persistierender aGVHD der Haut erhielt Patient 2 in der Folge wiederholt extrakorporale Photopheresen (ECP). Aufgrund des Auftretens einer aGVHD Schweregrad III erhielt Patient 2 keine DLI. Unter den genannten Maßnahmen kam es zu keiner wesentlichen Besserung der GVHD-Symptomatik. Am 06.03.2012 erfolgte ursprünglich eine geplante stationäre Aufnahme zur Therapiefortsetzung mit dem 4. Zyklus der ECP. Bereits bei Aufnahme zeigten sich insgesamt progrediente GVHD-Manifestationen an der Haut mit akuter Weichteilinfektion des linken Unterschenkels bei gleichzeitig reduziertem Allgemeinzustand. Trotz adäquater antibiotischer wie auch immunsuppressiver Therapie zeigte sich die GVHD-Symptomatik nicht kontrolliert, infektiöse Komplikationen gestalteten den Verlauf erschwert. Patient 2 verstarb schließlich am 08.05.2012 bei septischem Multiorganversagen und progredienter, nicht kontrollierter aGVHD der Haut und des Darmes.

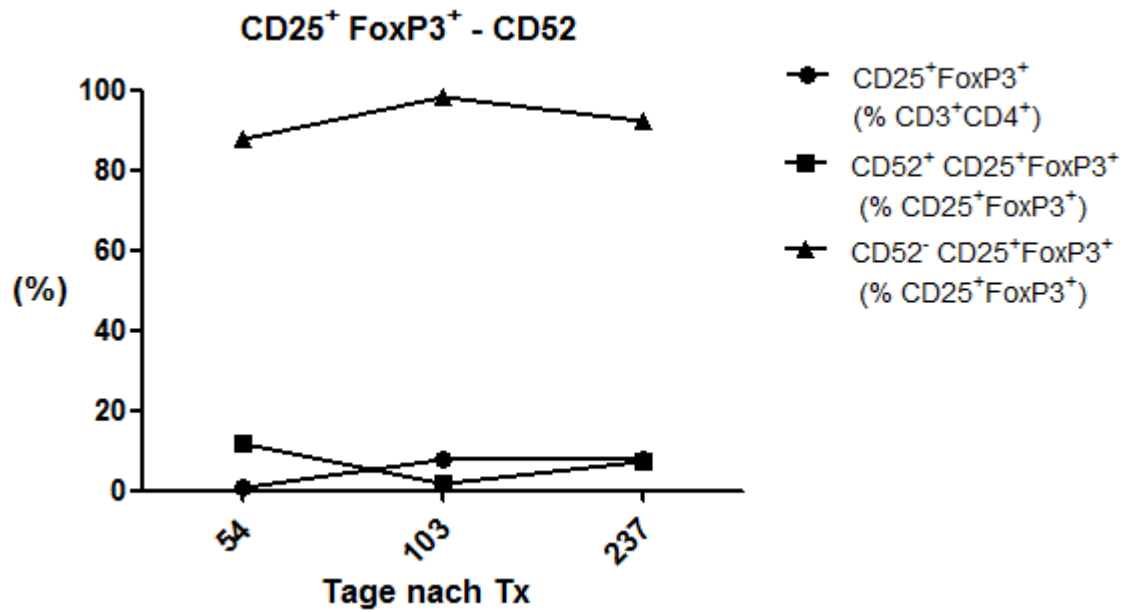


Abbildung 31: Entwicklung der CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg (in %, bezogen auf CD3^{pos}CD4^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 2 nach 54, 103 und 237 Tagen nach aHSZT.

Tage nach HSZT	CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} (% der CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ)	CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos}	
		CD52 ^{pos} (%)	CD52 ^{neg} (%)
54	0,7	12	88
103	7,6	1,6	98,4
237	8	7,5	92,5

Tabelle 12: Entwicklung der CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg (in (% der CD3^{pos}CD4^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 2 nach 54, 103 und 237 Tagen nach aHSZT.

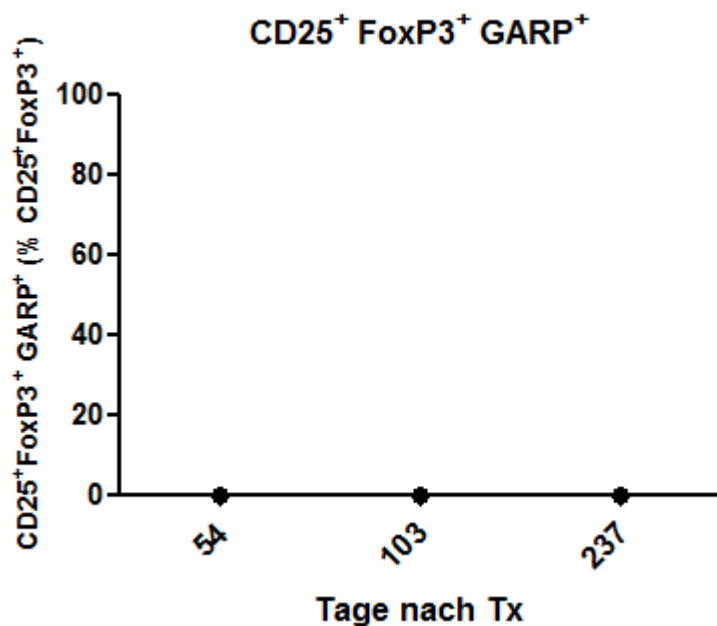


Abbildung 32: Entwicklung der GARP^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg) bei Patient 2 nach 54, 103 und 237 Tagen nach aHSZT.

Die Treg Rekonstitution bei Patient 2 mit persistierender aGVHD zeigte nur einen geringen Anstieg im weiteren klinischen Verlauf. Identifizierte Treg waren zu Beginn zu 88% CD52^{neg}, im weiteren Verlauf expandierte diese Population weiter, sodass nach 237 Tagen 92,5% aller Treg CD52^{neg} waren. Eine Rekonstitution Treg CD52^{pos} Treg konnte nicht beobachtet werden. GARP^{pos} Treg konnten zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

5.7.3 Immunrekonstitution eines Patienten mit cGVHD nach

Alemtuzumab-basierter TZD

Patient 24 wurde bei einer AML am 19.04.2011 allogenen stammzelltransplantiert. Proben konnten am 06.06.2011 (entsprechend Tag 48 nach aHSZT), 28.09.2011 (entsprechend Tag 162 nach aHSZT) und am 15.05.2012 (entsprechend Tag 392 nach aHSZT) asserviert werden. Im klinischen Verlauf entwickelte Patient 24 nur leichte Symptome einer cGVHD mit Hautrötung an Rücken und Arme, sodass er analog Studie 177 vorgesehen am 28.09.2011 (entsprechend 162 Tage nach aHSZT) eine erste CD8-depletierte DLI erhielt. Eine zweite CD8-depletierte DLI erhielt Patient 24 am 22.12.2011 (entsprechend 247 Tage nach aHSZT). Anfang des Jahres 2012 entwickelte Patient 24 progrediente Zeichen einer cGVHD der Mundschleimhaut und der Haut, sodass die DLI-Gaben nicht fortgesetzt wurden. Eine Steroid-Stoßtherapie wurde nicht durchgeführt.

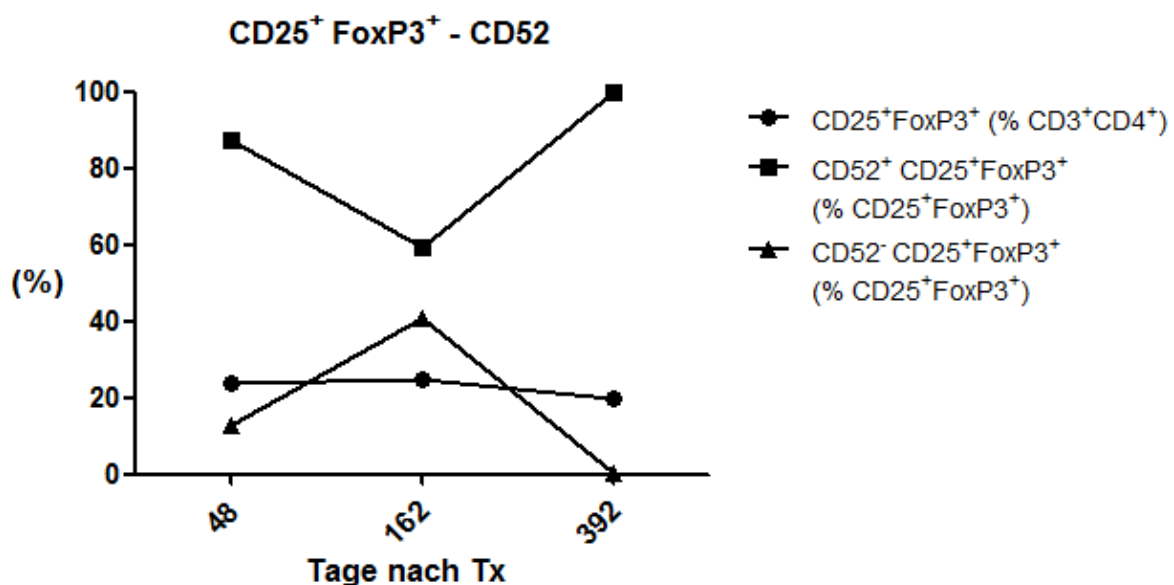


Abbildung 33: Entwicklung der CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg (in %, bezogen auf CD3^{pos}CD4^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 24 nach 48, 162 und 392 Tagen nach aHSZT.

Tage nach HSZT	CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} (% der CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ)	CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos}	
		CD52 ^{pos} (%)	CD52 ^{neg} (%)
48	23,7	87,3	12,7
162	24,9	59,4	40,6
392	19,6	99,9	0,1

Tabelle 13: Entwicklung der CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg und deren CD52-Expression bei Patient 24 nach 48, 162 und 392 Tagen nach aHSZT.

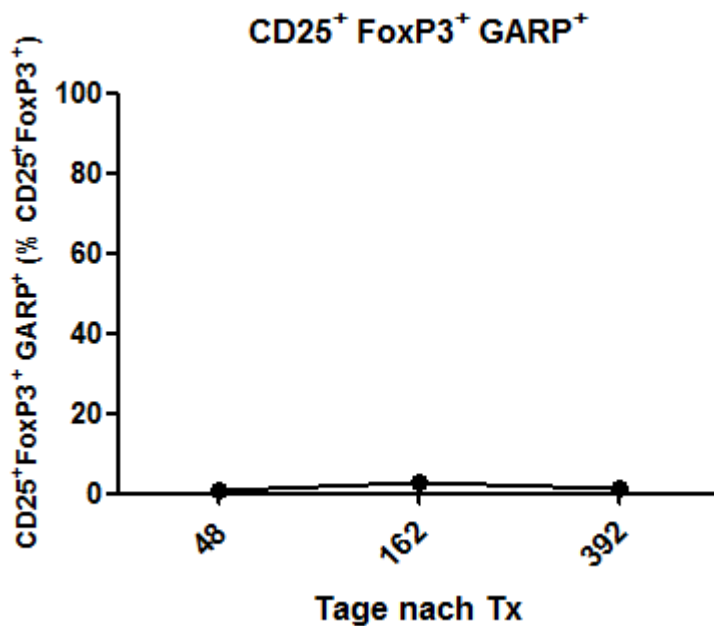


Abbildung 34: Entwicklung der GARP^{pos} Treg (in %, bezogen auf CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg) bei Patient 24 nach 48, 162 und 392 Tagen nach aHSZT.

Bei einem Vergleich der Rekonstitution der Treg mit dem klinischen Verlauf von Patient 24 fällt auf, dass bereits früh nach aHSZT viele Treg nachgewiesen werden konnten, die vorwiegend (87,3%) CD52^{pos} waren. Mit Beginn der leichten GVHD-Symptomatik und noch vor der ersten DLI-Gabe war ein Rückgang der CD52^{pos} Treg-Population zu verzeichnen. Nach 2 DLI-Gaben und klinisch milden cGVHD-Symptomen waren nahezu 100% der rekonstituierenden Treg CD52^{pos}. GARP^{pos} Treg waren über den beobachteten Zeitraum in nur geringen Mengen nachzuweisen.

5.7.4 Immunrekonstitution eines Patienten ohne GVHD nach

Alemtuzumab-basierter TZD

Patient 41 wurde am 02.03.2010 bei einem multiplen Myelom allogenen stammzelltransplantiert. Proben konnten am 27.04.2010 (entsprechend Tag 56 nach aHSZT), 15.06.2010 (entsprechend Tag 105 nach aHSZT) und am 22.03.2011 (entsprechend Tag 385 nach aHSZT) asserviert werden. Patient 41 zeigte zu den genannten Zeitpunkten keine Zeichen einer aGVHD oder cGVHD. Eine CD8-depletierte DLI erhielt Patient 41 am 10.06.2010 (entsprechend Tag 100 nach aHSZT). Bei milden Zeichen einer aGVHD mit leichter Hautrötung nach der ersten CD8-depletierten DLI im August 2010 wurden weiteren Gaben ausgesetzt. Histologisch ließen sich keine Zeichen einer aGVHD nachweisen.

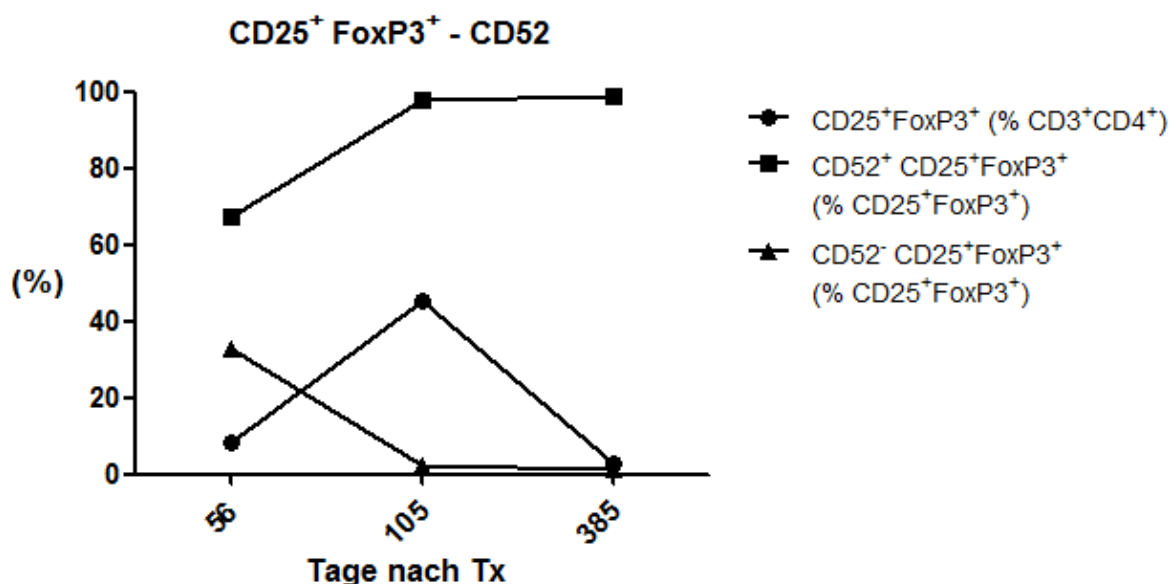


Abbildung 35: Entwicklung der CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg (in %, bezogen auf CD3^{pos}CD4^{pos} TZ) und deren CD52-Expression bei Patient 41 nach 56, 105 und 385 Tagen nach aHSZT.

Tage nach aHSZT	CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} (% der CD3 ^{pos} CD4 ^{pos} TZ)	CD25 ^{pos} FOXP3 ^{pos} (%)	
		CD52 ^{pos}	CD52 ^{neg}
56	8,3	67,2	32,8
105	45,1	97,6	2,4
385	2,9	98,6	1,4

Tabelle 14: Entwicklung der CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg (in %, bezogen auf CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg) und deren CD52-Expression bei Patient 41 nach 56, 105 und 385 Tagen nach aHSZT.

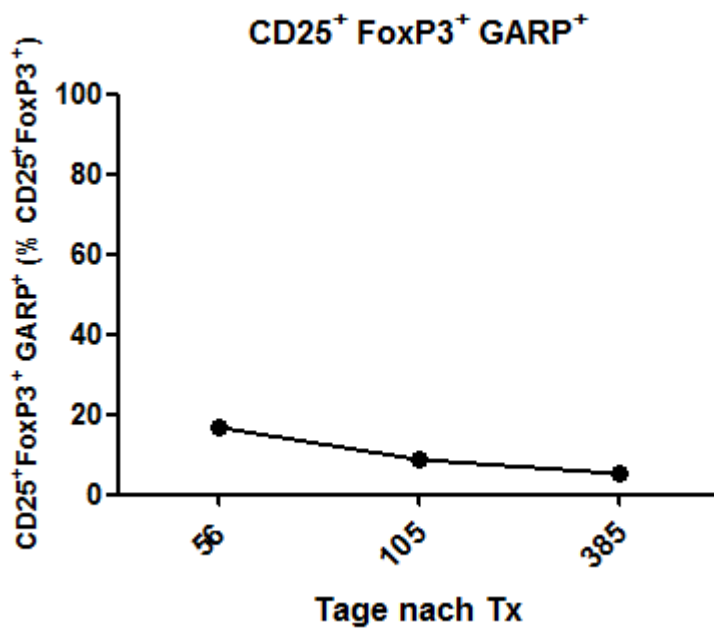


Abbildung 36: Entwicklung der CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg (in %, bezogen auf CD25^{pos}FOXP3^{pos}Treg) und deren CD52-Expression bei Patient 41 nach 56, 105 und 385 Tagen nach aHSZT.

Bei einem Vergleich der Rekonstitution der Treg mit dem klinischen Verlauf von Patient 41 zeigt sich, dass er bereits früh nach aHSZT einen hohen Anteil an CD52^{pos} Treg rekonstituierte und deren Anteil über den weiteren Verlauf kontinuierlich anstieg und expandierte. GARP^{pos} Treg rekonstituierten früh nach aHSZT in relativ hoher Anzahl, um im Verlauf abzunehmen. Es fanden sich keine Zeichen einer GVHD über den beobachteten klinischen Verlauf.

5.8 Funktionelle Untersuchungen Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD

5.8.1 GARP-Expression von CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg im Vergleich nach unspezifischer Stimulation

Die bereits unter 5.5 beschriebenen Analyse der GARP-Expression erfolgte von Proben, die ex vivo analysiert wurden. Es kann damit der Aktivitätszustand der Treg zum Zeitpunkt der Probenabnahme beschrieben werden. Zur funktionellen Untersuchung, ob Treg mittels Stimulation in vitro aktiviert werden können, wurden PBMC von Patient 2 und Patient 6 wie unter 4.6.3 beschrieben mit IL-2 und OKT3 für 24 Stunden stimuliert und die GARP-Expression vor Stimulation und nach Ende der Stimulation gemessen.

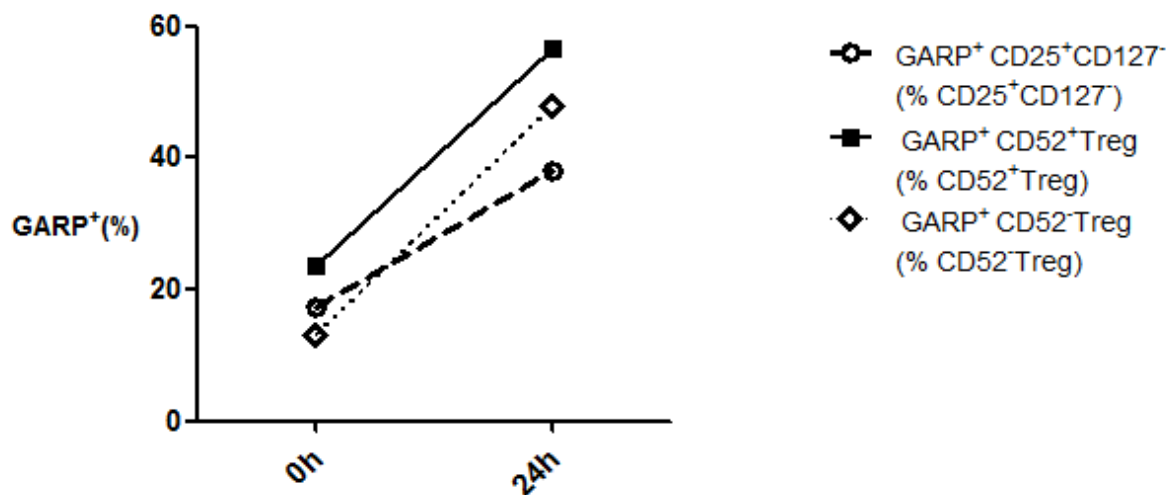


Abbildung 37: GARP-Expression von CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD25^{pos}CD127^{neg} Treg) von Patient 2 vor und 24h nach Stimulation in-vitro.

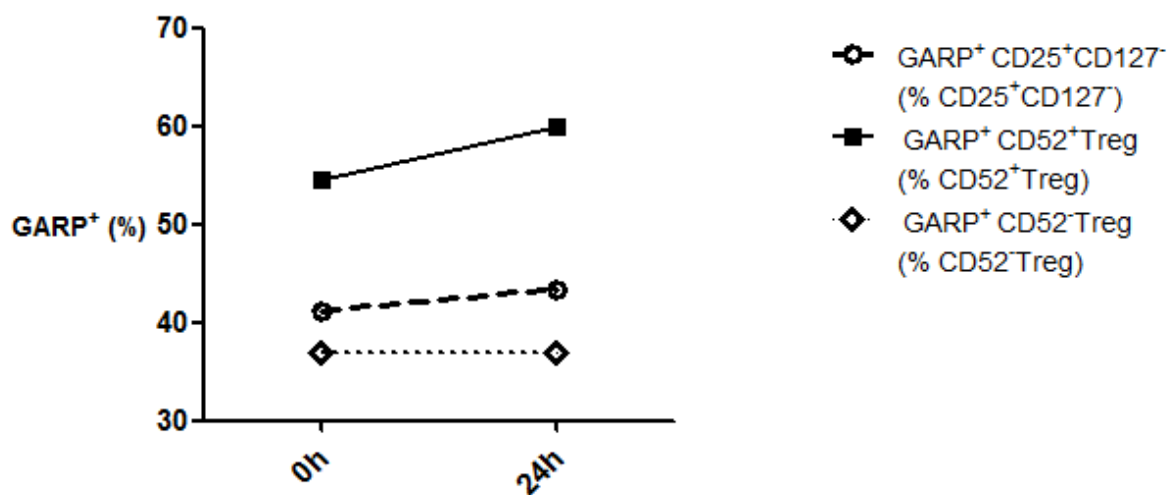


Abbildung 38: GARP-Expression von CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg (in %, bezogen auf CD25^{pos}CD127^{neg} Treg) von Patient 6 vor und 24h nach Stimulation in-vitro.

Die Stimulation mit IL-2 und OKT3 für 24 Stunden führte bei beiden Patienten zu einer verstärkten GARP-Expression der Treg in vitro. Eine verstärkte GARP-Expression konnte dabei sowohl bei CD52^{pos} Treg, als auch bei CD52^{neg} Treg nachgewiesen werden. CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg schienen somit in vitro nach Stimulation GARP vermehrt zu exprimieren und damit aktivierbar zu sein. Auffallend war jedoch, die insgesamt stärkere Expression von GARP auf CD52^{pos} Treg im Vergleich zu CD52^{neg} Treg.

5.8.2 Funktionelle Untersuchung von CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg mittels CFSE-basiertem Suppressionstest

Nach Etablierung des unter 4.8 beschriebenen CFSE-basierten Suppressionstests bei gesunden Spender-PBMC wendeten wir diesen Test bei Treg von Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD an. Damit sollte die Suppressionsfähigkeit von CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg getrennt überprüft und verglichen werden. Essentiell für einen Vergleich der Suppressionsfähigkeit ist dabei eine ausreichende und vergleichbare, möglichst gleiche Anzahl von CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg. Ein erster Versuch erfolgte mit PBMC von Patient 5 am 06.08.2012, entsprechend 312 Tagen nach aHSZT. Nach der FACS-basierten Sortierung konnten 100000 CD52^{pos} und 5000 CD52^{neg} Treg gewonnen werden. Eine Versuchsdurchführung zum Vergleich der beiden Subpopulationen war bei diesen unterschiedlichen und für die Versuchsdurchführung zu geringen Zellzahlen nicht möglich. Ein erneuter Versuch erfolgte mit PBMC von Patient 4 am 17.09.2012 entsprechend 82 Tage nach aHSZT und am 05.11.2012 entsprechend 131 Tage nach aHSZT. Am 17.09.2012 konnten 7500 CD52^{pos} und 390000 CD52^{neg} Treg sowie am 05.11.2012 17500 CD52^{pos} und 425000 CD52^{neg} Treg gewonnen werden, sodass eine Durchführung abermals weder möglich noch sinnvoll war. Es erfolgte daher ein engmaschiges Monitoring der CD52-Expression von Patient Nr. 4. Im weiteren Verlauf rekonstituierte Patient Nr. 4 im Verlauf nahezu gleiche große Mengen an CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg, was eine FACS-basierte Sortierung mit nachfolgendem Suppressionstest ermöglichte. Nach der Sortierung konnten am 18.03.2013, entsprechend 264 Tagen nach aHSZT, 295000 CD52^{pos} Treg und 595000 CD52^{neg} Treg sortiert werden. Als Tresp oder Teff dienten gesunde Spender-PBMC, welche im Verlauf mit CFSE (FITC), CD3 (BH V450) und CD4 (APC-Cy7) gefärbt wurden. Tresp wurden als CFSE^{pos} CD3^{pos} CD4^{pos} Zellen, Teff als CFSE^{pos} CD3^{pos} CD4^{neg} Zellen identifiziert. Wie unter 4.8 beschrieben, wurden die Tresp, bzw. die Teff mit CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg in zunehmender Konzentration inkubiert und mit IL-2 und OKT3 stimuliert. Nach insgesamt fünf Tagen wurde die CFSE-Konzentration der CD3^{pos} CD4^{pos} Tresp und CD3^{pos} CD4^{neg} Teff und damit die Proliferation der Tresp bzw. Teff gemessen. Über die Konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation der CFSE-gefärbten Tresp bzw. Teff konnte die Suppressionsfähigkeit der CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg getrennt beurteilt werden.

Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo 10.7.1. über das vorhandene Proliferationswerkzeug.

5.8.2.1 CFSE-basierter Suppressionstest der CD3^{pos}CD4^{neg} TZ von Patient 4

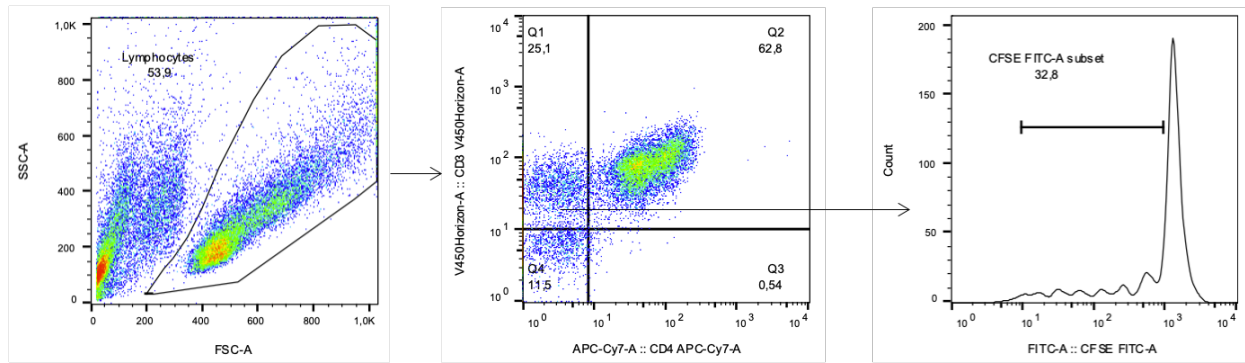
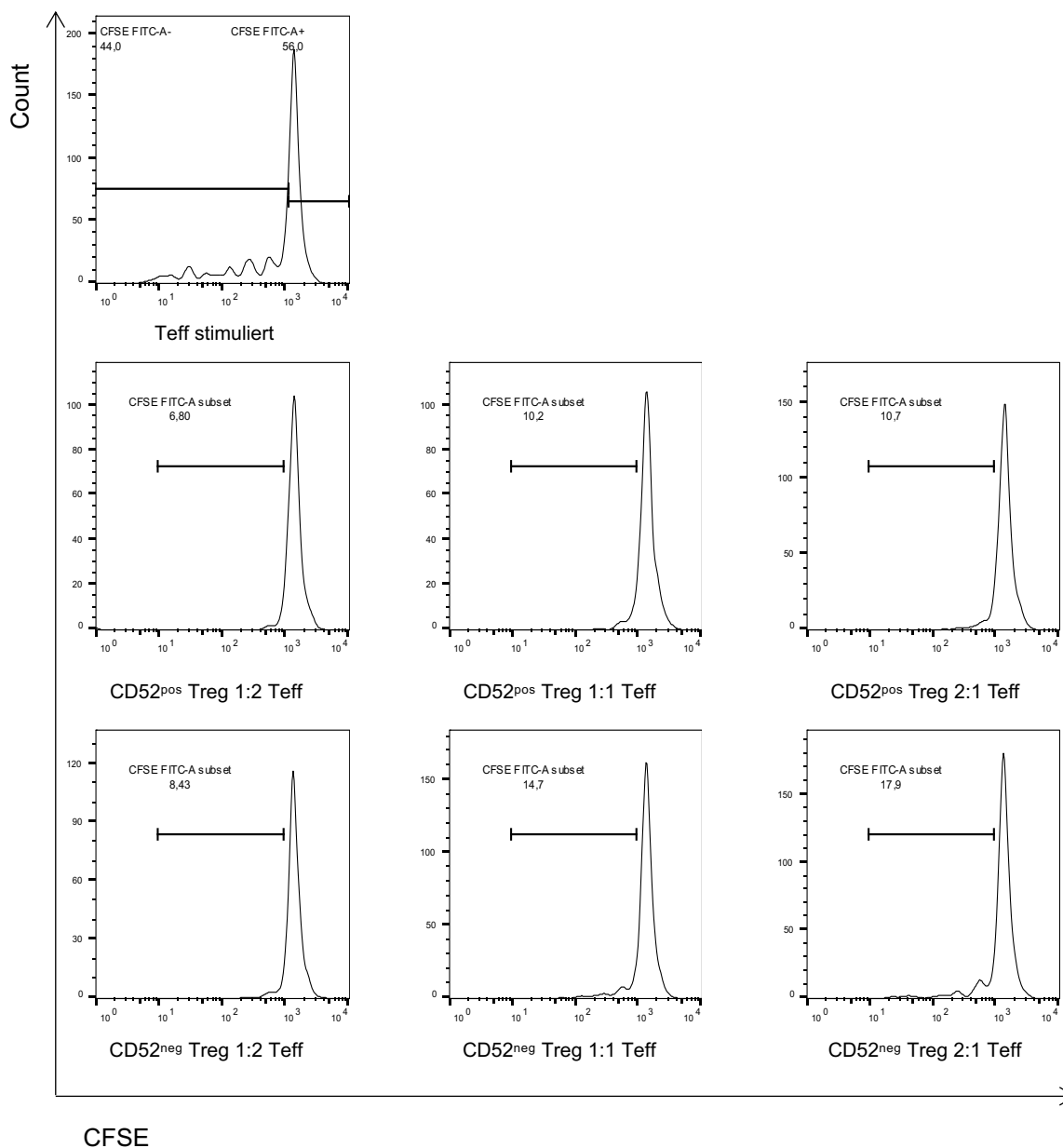


Abbildung 39: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation und Messung der Proliferation der CFSE-gefärbten Teff (CD3^{pos}CD4^{neg} TZ) über Abnahme des CFSE-Gehalts.



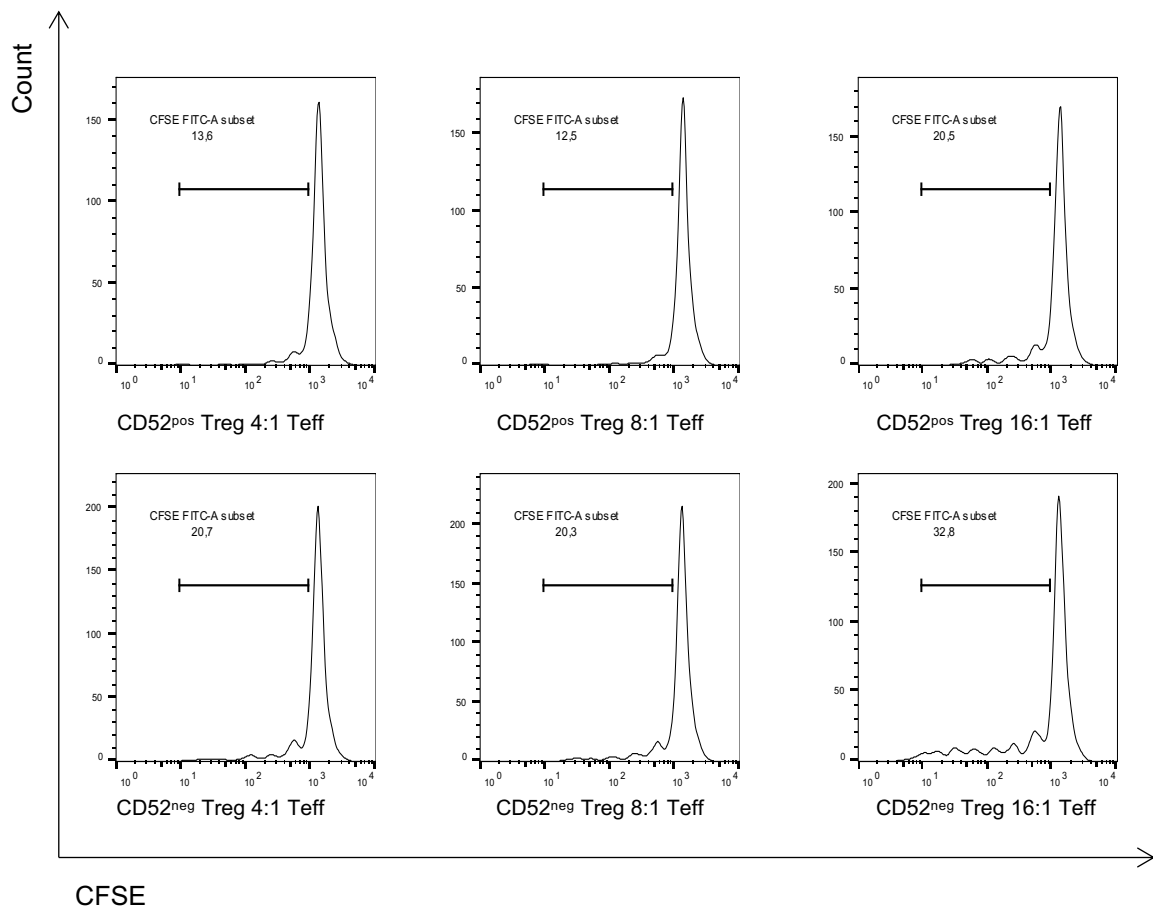


Abbildung 40: Vergleich der Suppressionsfähigkeit CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg im Ansatz mit CD3^{pos}CD4^{neg} TZ (Teff) bei Patient 4.

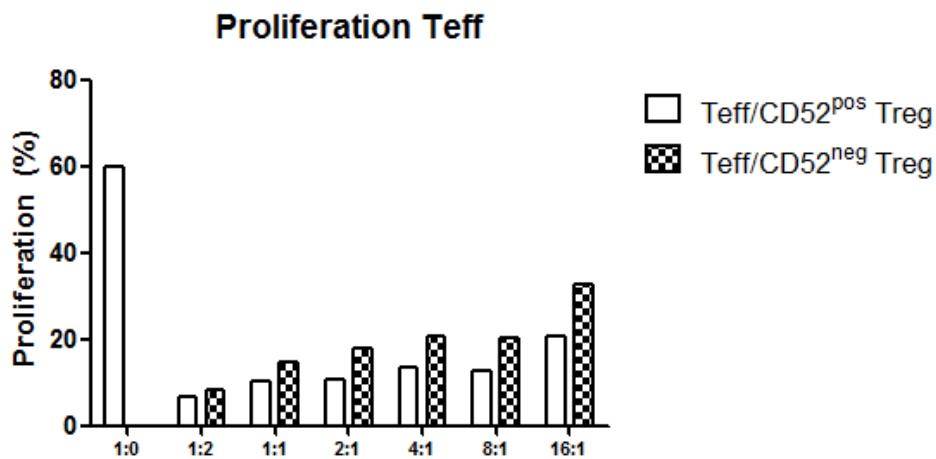


Abbildung 41: Proliferation der CD3^{pos}CD4^{neg} TZ bei Koninkubation mit CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg Patient 4.

Verhältnis Teff:Treg	1:0	1:2	1:1	2:1	4:1	8:1	16:1
Ansatz mit CD52 ^{pos} Treg	60%	6,8%	10,2%	10,7%	13,6%	12,5%	20,5%
Ansatz mit CD52 ^{neg} Treg		8,4%	14,7%	17,9%	20,7%	20,3%	32,8%

Tabelle 15: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg bei Patient 4.

Verhältnis Teff:Treg	1:0	1:2	1:1	2:1	4:1	8:1	16:1
Ansatz mit CD52 ^{pos} Treg	10%	2%	3,7%	3%	3,8%	3,7%	6%
Ansatz mit CD52 ^{neg} Treg		2,2%	3,9%	5%	5,7%	4,7%	8,8%

Tabelle 16: Prozentualer Anteil der proliferierenden Teff im Ansatz mit CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg bei Patient 4.

5.8.2.2 CFSE-basierter Suppressionstest der CD3^{pos}CD4^{pos} TZ von Patient 4

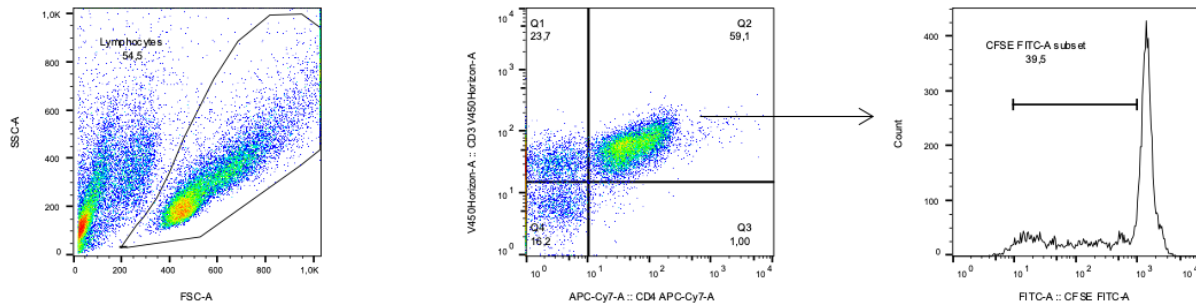
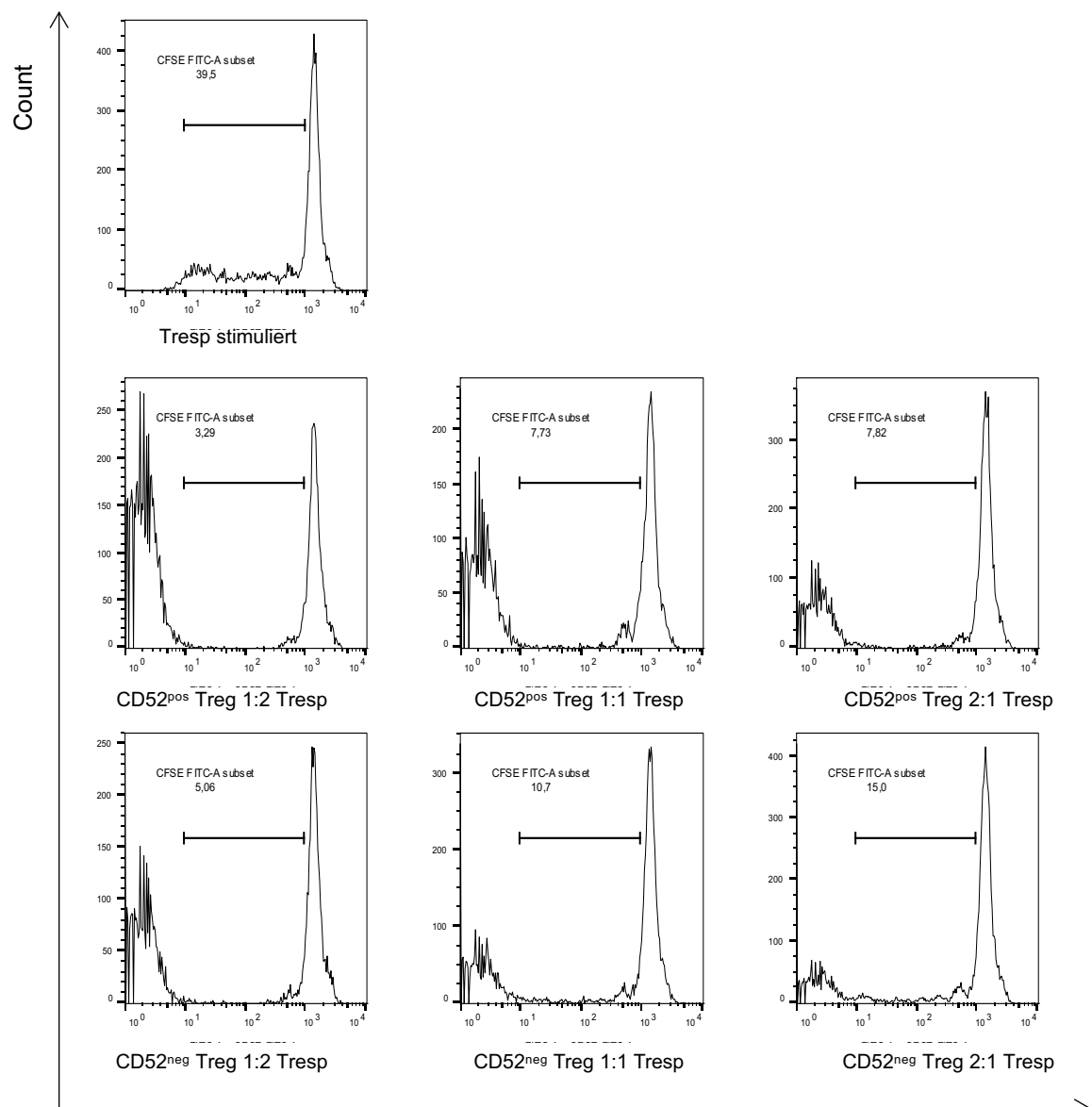


Abbildung 42: Beispiel der Gatingstrategie zur Identifikation und Messung der Proliferation der CFSE-gefärbten Tresp (CD3^{pos}CD4^{pos} TZ) über Abnahme des CFSE-Gehalts.



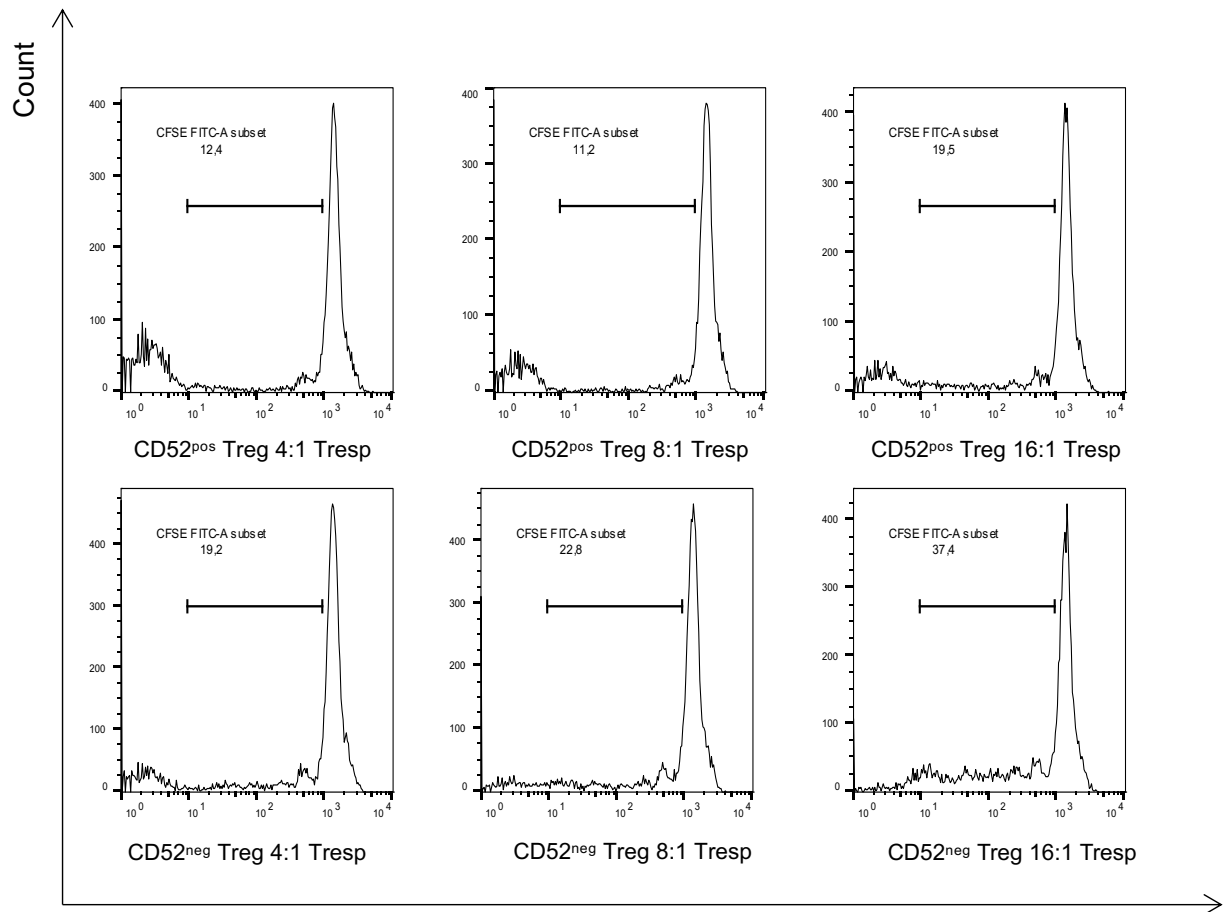


Abbildung 43: Vergleich der Suppressionsfähigkeit CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg im Ansatz mit CD3^{pos}CD4^{pos} TZ (Tresp) bei Patient 4.

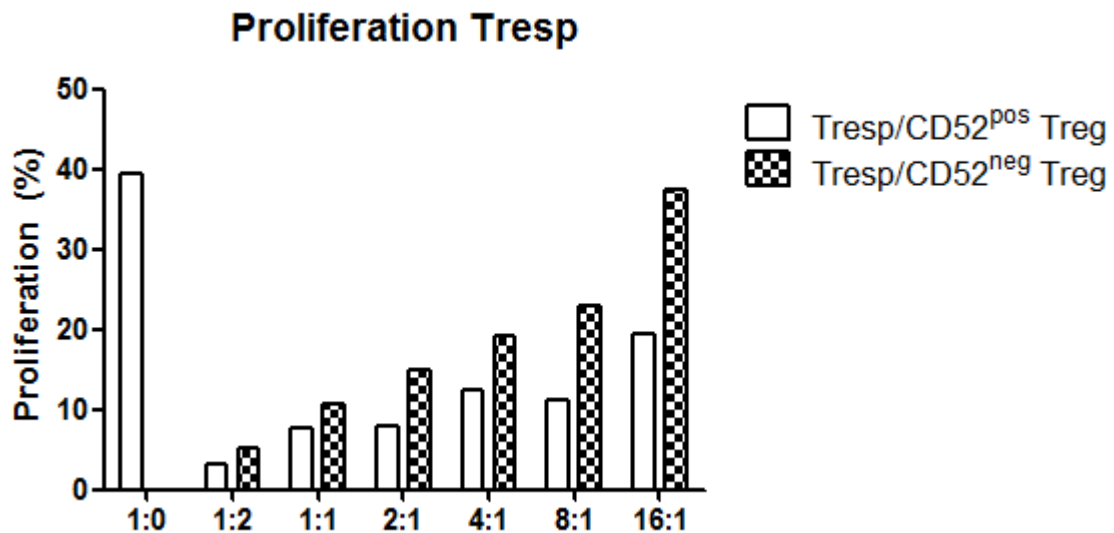


Abbildung 44: Proliferation der CD3^{pos}CD4^{pos} TZ bei Koninkubation mit CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg Patient 4.

Verhältnis Tresp:Treg	1:0	1:2	1:1	2:1	4:1	8:1	16:1
Ansatz mit CD52 ^{pos} Treg	39,5%	3,29%	7,73%	7,82%	12,4%	11,2%	19,5%
Ansatz mit CD52 ^{neg} Treg		5,06%	10,7%	15%	19,2%	22,8%	37,4%

Tabelle 17: Vergleich der Suppressionsfähigkeit von Treg zwischen CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg bei Patient 4.

Verhältnis Tresp:Treg	1:0	1:2	1:1	2:1	4:1	8:1	16:1
Ansatz mit CD52 ^{pos} Treg	39%	15,7%	21,5%	20,9%	25,6%	26,3%	22,8%
Ansatz mit CD52 ^{neg} Treg		19,7%	21,9%	27,6%	29,4%	27,7%	37,8%

Tabelle 18: Prozentualer Anteil der proliferierenden Tresp im Ansatz mit CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg bei Patient 4.

In beiden Ansätzen mit CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg ließ sich eine konzentrationsabhängige Suppression der Proliferation der Teff (CD3^{pos}CD4^{neg} TZ) bzw. Tresp (CD3^{pos}CD4^{pos} TZ) nachweisen. Mit zunehmender Teff- bzw. Tresp-Anzahl zeigt sich eine Zunahme der Proliferation gleichbedeutend mit einer Abnahme von CFSE. Sowohl CD52^{pos} als auch CD52^{neg} Treg waren somit in der Lage die Proliferation von Teff und Tresp zu unterdrücken. Teff und Tresp zeigten jedoch eine verstärkte Proliferation, wenn sie mit CD52^{neg} Treg inkubiert wurden. Die Treg-vermittelte Suppression war im Ansatz mit CD52^{neg} Treg im Vergleich zum Ansatz mit den CD52^{pos} Treg somit geringer ausgeprägt. CD52^{neg} Treg scheinen also im Vergleich zu CD52^{pos} Treg eine verminderte Suppressionsfähigkeit aufzuweisen.

6. Diskussion

6.1 Immunrekonstitution nach Alemtuzumab-basierter TZD

Alemtuzumab (Campath-1H) bindet als monoklonaler Ak das GPI-verankerte Oberflächenmolekül CD52 auf Lymphozyten. Durch Alemtuzumab gebundene Zellen werden nachfolgend entweder Ak-abhängig oder Komplement-vermittelt lysiert (Rebello et al. 2002; Bindon et al. 1988). Damit können bis zu >95% aller CD4^{pos}- und >80% aller CD8^{pos}-TZ depletiert werden und das Risiko für eine Entwicklung einer GVHD nach aHSZT deutlich gesenkt werden (Baker et al. 2017). Alemtuzumab wird daher zur TZD im Kontext der aHSZT eingesetzt. Die physiologische Bedeutung und Funktion von CD52 ist bislang nicht vollständig verstanden. CD52 wird neben Lymphozyten auch von Monozyten, DC und CD34^{pos} hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Entscheidend für die CD52-abhängige Lyse durch Alemtuzumab scheint das Ausmaß der CD52-Expression zu sein. Während TZ eine hohe Expression von CD52 zeigen, ist die Expression von CD52 auf hämatopoetischen Stammzellen deutlich geringer ausgeprägt, so dass es zu keiner signifikanten Depletion und funktionellen Einschränkung der Stammzellen kommt (Klabusay et al. 2007; Gilleece et al. 1993). Die Immunrekonstitution, vermittelt durch hämatopoetische Stammzellen, scheint somit nur geringfügig beeinträchtigt zu sein. Nach Alemtuzumab-basierter TZD ist jedoch gehäuft eine verzögerte Immunrekonstitution zu beobachten (Morris et al. 2003; Schmidt-Hieber et al. 2010; Thepot et al. 2010). Dies könnte mit der relativ langen Halbwertszeit und damit verlängerten Wirkung von Alemtuzumab assoziiert sein: Alemtuzumab kann noch bis zu 56 Tage nach aHSZT in einer Konzentration mit depletierender Wirkung nachgewiesen werden und möglicherweise rekonstituierende TZ weiter depletieren (Morris et al. 2003). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, wie auch die Gruppe um Loeff konnten bereits zeigen, dass CD52^{neg} TZ nach Alemtuzumab-basierter TZD rekonstituieren und über einen längeren Zeitraum, selbst nach Rekonstitution des Immunsystems, persistieren (Meyer et al. 2010, Loeff et al. 2018). Die Persistenz CD52^{neg} TZ nach Alemtuzumab-basierter TZD über einen längeren Zeitraum konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Wir untersuchten Blutproben von insgesamt 47 Patienten in einem Zeitraum von 28 bis 2571 Tagen nach aHSZT. Nahezu alle Patienten rekonstituierten CD52^{neg} TZ. Der fehlende Nachweis von CD52 an der Zelloberfläche beruht bei den untersuchten Proben auf einer fehlenden Expression des GPI-Ankers. Mittels FLAER-Färbung konnte das Fehlen der GPI-Anker auf den CD52^{neg} TZ nachgewiesen und somit

bestätigt werden. Das Auftreten von CD52^{neg} TZ nach einer Therapie Alemtuzumab ist in der Literatur nicht nur für die aHSZT beschrieben. Auch nach dem Einsatz von Alemtuzumab in der Therapie anderer Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis oder B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen, können CD52^{neg} TZ nachgewiesen werden (Hertenstein et al. 1995; Brett et al. 1996). CD52^{neg} TZ können auch unabhängig vom Einsatz von Alemtuzumab bei Gesunden oder Patienten nach aHSZT, die eine Konditionierung ohne Alemtuzumab erhielten, nachgewiesen werden. Der Anteil der CD52^{neg} TZ ist jedoch mit <2% sehr gering (Garland et al. 2005). Eine so genannte GPI-Anker negative Hämatopoese scheint möglicherweise im niedrigen Prozentbereich physiologisch zu sein, aufgrund des immunologischen Selektionsdrucks jedoch in gesunden Individuen ohne klinische Relevanz. Unter einer Therapie mit Alemtuzumab oder nach einer intensiven Konditionierung mit nachfolgender aHSZT könnte dieser Selektionsdruck geringer ausgeprägt sein, GPI-Anker^{neg} TZ könnten expandieren und vermehrt nachgewiesen werden.

Loeff et. al beschrieben 2018 eine weitere Hypothese für das Auftreten CD52^{neg} bzw. GPI-Anker^{neg} TZ. Ursächlich könnte eine Mutation des PIGA-Gens sein, welches für die GPI-Anker codiert. Das PIGA-Gen befindet sich in einem Bereich des Genoms, welcher durch häufige, polyklonale Mutationen charakterisiert ist. Eine Erkrankung bei der ursächlich das PIGA-Gen mutiert ist, ist die paroxysmal nächtliche Hämoglobinurie (PNH). Die PNH ist eine erworbene klonale Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (Herold, 2020). Die Mutation im PIGA-Gen führt zu einer gestörten Expression der GPI-Anker verankerten Proteine wie CD52, CD55 oder CD59. CD55 und CD59 zählen zu den komplementregulierenden Proteinen, hemmen den terminalen Membranangriffskomplexes des Komplementsystems und schützen damit Zellen vor einer Lyse durch das Komplementsystem. Fehlen CD55 und CD59, wird die Erythrozytenmembran nur unzureichend geschützt, so dass es über eine Komplementaktivierung zu Hämolyse, Thrombophilie und Panzytopenie kommt.

Eine PNH kann sich jedoch auch sekundär aus einer aplastischen Anämie entwickeln. Aplastische Anämien können eine autoimmune Genese aufweisen, sodass immunsuppressive Medikamente, wie Alemtuzumab, zur Therapie eingesetzt werden. Young et al. entwickelten die Hypothese, dass eine PNH nach aplastischer Anämie durch die der aplastischen Anämie zugrunde liegenden Autoimmunität zu einem Selektionsvorteil CD52^{neg} bzw. GPI-Anker^{neg} Zellen führen könnte. Infolge der Expansion könnte sich klinisch das Bild einer PNH zeigen. (Young et al. 2002). Die

Entwicklung von PNH-typischen Symptomen konnte bei den hier untersuchten Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD nicht beobachtet werden.

Eine weitere Hypothese, welche die vermehrte Rekonstitution von CD52^{neg} TZ zu Teilen erklären könnte, besteht darin, dass rekonstituierende CD52^{pos} TZ im Beisein von Alemtuzumab weiter depletiert werden. Rekonstituierende CD52^{neg} TZ sind durch die fehlende Expression von CD52 resistent gegenüber Alemtuzumab. Sie werden folglich nicht depletiert. Die Rekonstitution CD52^{neg} TZ könnte somit temporär begünstigt werden und wie auch in der von Young beschriebenen Hypothese einem immunologischen Selektionsvorteil unterliegen, was zu einer vermehrten Proliferation CD52^{neg} TZ führen könnte (Taylor et al. 1997; Rawstron et al. 1999). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass es nach Beendigung der Therapie mit Alemtuzumab und damit Ende des Selektionsvorteils zu einem Rückgang der CD52^{neg} TZ kam (Hertenstein et al. 1995). Diese Hypothesen sind auch auf die hier untersuchten Patienten übertragbar: Alemtuzumab hätte die CD52^{pos} TZ weiter depletieren können und damit den CD52^{neg} TZ aus dem Transplantat einen Selektionsvorteil verschaffen können, welche dann vermehrt expandieren würden.

Nach erfolgreichem Engraftment mit zunehmender Rekonstitution der Spender-Hämatopoese und nachlassender Alemtuzumab-Wirkung scheint der immunologische Selektionsvorteil abzunehmen, GPI-Anker^{pos}, CD52^{pos} Zell-Populationen könnten nun expandieren, der Anteil GPI-Anker^{neg}, CD52^{neg} Zellen abnehmen. Bei Patienten wiederum, die kein erfolgreiches Engraftment aufweisen oder immunologische Komplikationen, wie eine GVHD, entwickeln, könnte der immunologische Selektionsvorteil weiter bestehen, GPI-Anker^{neg}, CD52^{neg} Zell-Populationen weiter expandieren und persistieren.

Weiter könnte eine beeinträchtigte Thymusfunktion infolge des fortgeschrittenen Alters der Patienten die verzögerte Immunrekonstitution und Rekonstitution GPI-Anker^{neg}, CD52^{neg} Zell-Populationen begünstigt haben (Hu et al. 2019, Brett et al. 1996). Die TZ-Rekonstitution könnte aufgrund der beeinträchtigten Thymusfunktion insuffizient und verzögert sein und damit über einen längeren Zeitraum von proliferierenden GPI-Anker^{neg}, CD52^{neg} TZ aus dem Transplantat abhängig sein. Überwunden könnte dies physiologisch durch eine Erholung der Thymusfunktion mit neu entstehenden, naiven GPI-Anker^{pos}, CD52^{pos} TZ oder klinisch und therapeutisch durch DLI-Gaben.

Die hier genannten Effekte könnten somit die Persistenz GPI-Anker^{neg}, CD52^{neg} Zell-Populationen nach Alemtuzumab-basierter TZD erklären.

6.2 Immunrekonstitution von Treg und Entwicklung einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

Die Entwicklung einer aGVHD nach aHSZT kann pathophysiologisch mit einer Störung der Immunhomöostase verglichen werden, bei der es zu einem Ungleichgewicht aus überschießender Aktivität und mangelhafter Regulation kommt (Beres et Drobyski, 2013). Treg sind über ihre immunsuppressiven Eigenschaften entscheidend an der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase und Toleranz beteiligt und damit entscheidend für die Pathophysiologie der aGVHD. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der Rekonstitution und der Anzahl von Treg und der Entwicklung einer GVHD zeigen, weshalb wir in dieser Arbeit den absoluten und relativen Anteil von Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD und die Entwicklung einer GVHD untersuchten.

6.2.1 Absoluter und relativer Anteil von Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD

Die Bedeutung der relativen oder absoluten Anzahl von Treg nach aHSZT für die Entwicklung einer GVHD wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Sanchez et al. untersuchten die Rekonstitution von Treg nach aHSZT und konnten keinen Unterschied zwischen der Anzahl an Treg bei Patienten mit oder ohne GVHD nachweisen (Sanchez et al. 2004). Mehrere Gruppen berichteten von einer erniedrigten Treg-Häufigkeit bei Patienten, die eine GVHD nach aHSZT entwickeln, u.a. konnte die Gruppe um Magenau zeigen, dass bei Patienten, die eine aGVHD entwickelten die Treg-Häufigkeit um bis zu 40% vermindert war im Vergleich zu Patienten, die keine GVHD entwickelten (Magenau et al. 2010). Alho et al. untersuchten 2016 die Immunrekonstitution und die Entwicklung einer GVHD bei 107 Patienten nach RIC. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer GVHD weniger Treg rekonstituierten und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer GVHD besaßen. Ursächlich scheint ein Ungleichgewicht aus einer verminderten Rekonstitution von Treg bei einer verhältnismäßig gesteigerten Rekonstitution von Effektor-TZ zu sein (Alho et al. 2016). Li et. al. konnten zum einen eine signifikante Reduktion der Häufigkeit von Treg bei Patienten mit aGVHD und cGVHD im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen. Zum anderen schien die Treg Häufigkeit mit dem Schweregrad der GVHD zu korrelieren (Li et al. 2010). Diese Ergebnisse konnten bei den untersuchten Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD nur teilweise bestätigt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der absoluten Anzahl

von Treg oder dem relativen Anteil von Treg an den CD3^{pos}CD4^{pos} TZ und der Entwicklung einer GVHD. Patienten mit einer aGVHD oder cGVHD schienen sogar tendenziell absolut mehr Treg zu rekonstituieren. Bezogen auf den Anteil der Treg an der Population der CD3^{pos}CD4^{pos} TZ schienen Patienten mit aGVHD tendenziell weniger Treg zu rekonstituieren. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden. Zu betonen ist hierbei, dass sich die Transplantationsprotokolle der untersuchten Patienten der anderen Arbeitsgruppen deutlich voneinander unterschieden und kein Alemtuzumab zur TZD enthielten. Die Wirkungen von Alemtuzumab auf die Immunrekonstitution, im Speziellen auf die Rekonstitution von Treg, ist bisher nur unzureichend untersucht. Alemtuzumab scheint jedoch Treg induzieren zu können. Die Gruppe um Watanabe konnte zeigen, dass eine Kostimulation mit Alemtuzumab die Bildung von Treg induzieren konnte. Diese von ihnen als Anti-CD52-induzierten Treg bezeichneten Treg zeigten suffiziente suppressive Eigenschaften und konnten die Proliferation von CD4^{pos} und CD8^{pos} TZ hemmen (Watanabe et al. 2006). Im SCID-Maus-Modell konnten diese Zellen eine GVHD-ähnliche Symptomatik bessern. Rowan konnte wiederum zeigen, dass CD52 als ein kostimulatorisches Molekül bei der TZ-Aktivierung beteiligt ist (Rowan et al. 1995). Aufgrund dieser Hinweise besteht die Vermutung, dass Alemtuzumab auch bei den untersuchten Patienten eine Treg-Proliferation induziert haben könnte.

Alemtuzumab wird auch in der Behandlung der multiplen Sklerose eingesetzt, jedoch in einer anderen Dosierung, als im Kontext der TZD. Zhang et al. untersuchten die Immunrekonstitution bei Patienten, die mit 12 mg Alemtuzumab für fünf Tage mit einer Wiederholung nach 12 Monaten für erneut drei Tagen, behandelt wurden. Sieben Tage nach Applikation von Alemtuzumab zeigte sich eine nahezu vollständige Depletion aller zirkulierenden CD4^{pos} TZ. Auch bei diesen Patienten konnte eine Expansion von Treg bei gleichzeitig verzögerter Rekonstitution der CD3^{pos} CD4^{pos} TZ beobachtet werden (Zhang et al. 2013). Die Gruppe um Havari wiederholte die klinischen Ergebnisse und untersuchte die Wirkung von Alemtuzumab auf Treg in vitro. Alemtuzumab führte in vitro zu einer komplementabhängigen Lyse der TZ und zu einem Anstieg von TZ mit regulatorischen Eigenschaften. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der TZ ohne Alemtuzumab komplementabhängig lysiert wurden, zeigte sich durchschnittlich ein 13-facher Anstieg der Treg-Anzahl. Diese Alemtuzumab-induzierten Treg exprimierten FOXP3 und zeigten suppressive Eigenschaften über Zell-Kontakt-abhängige und IL-2-abhängige Mechanismen. Langfristig scheint Alemtuzumab dabei Anzahl, Verhältnisse und Eigenschaften der

gesamten Lymphozyten-Population zu verändern und damit das Zytokin-Profil von einem pro-inflammatorischen zu einem anti-inflammatorischen Profil hin zu verändern. Dieses neue „Ausbalancieren“ des Immunsystems scheint die Ursache der langfristigen Wirkung von Alemtuzumab in der Therapie der multiplen Sklerose zu sein (Havari et al. 2014). Alemtuzumab scheint also durch einen bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus zu einer Expansion von Treg zu führen. Diese Befunde könnten die Diskrepanz zwischen den hier gezeigten Ergebnissen für die Immunrekonstitution von Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD und die Entwicklung einer GVHD nach aHSZT und den bisherigen Ergebnissen in der Literatur, erklären.

6.2.2 Rekonstitution CD52^{neg} Treg bei Patienten mit aGVHD, cGVHD und Patienten ohne GVHD

Eine Besonderheit der Immunrekonstitution nach Alemtuzumab-basierter TZD ist die bereits in vorherigen Abschnitten beschriebene Rekonstitution CD52^{neg} TZ. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Treg als Subpopulation der CD4^{pos} TZ auch ohne das Oberflächenmolekül CD52 rekonstituieren. Vergleicht man nun die Rekonstitution der CD52^{neg} Treg zwischen Patienten, die eine aGVHD, cGVHD und keine GVHD entwickelten, zeigt sich ein signifikanter Unterschied: Patienten mit einer aGVHD rekonstituieren vor allem CD52^{neg} Treg, während Patienten mit einer cGVHD oder noGVHD kaum, bzw. signifikant weniger CD52^{neg} Treg rekonstituieren. Die rekonstituierenden Treg von Patienten, die eine cGVHD oder keine GVHD entwickelten, waren vor allem CD52^{pos}. In dem untersuchten Patientenkollektiv findet sich eine Korrelation zwischen der Entwicklung einer aGVHD und der Rekonstitution von CD52^{neg} Treg. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits eine verminderte Effektorfunktion bei CD52^{neg} TZ nachweisen: CD52^{neg}/GPI^{neg} TZ zeigten eine eingeschränkte CMV- und EBV-spezifische T-Zell-Antwort. Auf der Grundlage der essentiellen Bedeutung von Treg für die Immunhomöostase und die Entwicklung einer aGVHD entwickelten wir die Hypothese, dass auch CD52^{neg} Treg im Vergleich zu den CD52^{pos} Treg funktionell beeinträchtigt sind. Durch die möglicherweise verminderte suppressive Funktion könnten CD52^{neg} Treg in der Folge die Entwicklung einer aGVHD nicht verhindern, was die klinische Korrelation zwischen Entwicklung einer aGVHD und der Rekonstitution CD52^{neg} Treg erklären könnte.

6.2.3 Rekonstitution CD52^{neg} Treg korreliert mit dem klinischen Verlauf einer GVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD

Nachdem sich eine deutliche Korrelation zwischen der Entwicklung einer aGVHD und der Rekonstitution von CD52^{neg} Treg zeigte, wollten wir den klinischen Verlauf einer GVHD bei unterschiedlichen Patienten mit der Rekonstitution von CD52^{neg} Treg vergleichen. Dafür erfolgten serielle Messungen der CD52^{neg} Treg und eine direkte Korrelation mit dem klinischen Verlauf und der Entwicklung einer GVHD. Vier Patienten konnten über einen längeren Zeitraum klinisch beobachtet werden und die Rekonstitution untersucht werden. Auch hier konnte eine deutliche Korrelation zwischen der Rekonstitution von CD52^{neg} Treg und dem klinischen Verlauf einer GVHD nachgewiesen werden. Patient 5 entwickelte früh nach aHSZT eine aGVHD, zu diesem Zeitpunkt rekonstituierten vor allem CD52^{neg} Treg. Im weiteren klinischen Verlauf und nach Einleitung der Therapie der aGVHD kam es zur klinischen Besserung. Parallel dazu rekonstituierten und expandierten CD52^{pos} Treg, zum letzten Beobachtungszeitpunkt rekonstituierten nahezu ausschließlich CD52^{pos} Treg. Patient 2 wiederum entwickelte früh eine aGVHD und zeigte während des gesamten klinischen Verlaufs Zeichen einer aGVHD im Sinne einer persistierenden aGVHD trotz Einleitung einer adäquaten Therapie der aGVHD. Zum Zeitpunkt der ersten Probenasservation rekonstituierten vor allem CD52^{neg} Treg; parallel zur weiter bestehenden und sich verschlechternden klinischen Präsentation der aGVHD nahm der Anteil der CD52^{neg} Treg an der rekonstituierenden Treg weiter zu. Eine Rekonstitution und Expansion von CD52^{pos} Treg konnte während des gesamten klinischen Verlaufs nicht beobachtet werden. Patient 24 entwickelte während des gesamten beobachteten klinischen Verlaufs ausschließlich Zeichen einer cGVHD und erhielt im Verlauf zweimalig DLI. Bereits früh nach aHSZT rekonstituierten vor allem CD52^{pos} Treg. Mit Beginn der leichten GVHD-Symptomatik und noch vor der ersten DLI-Gabe war eine Abnahme der CD52^{pos} Treg zu verzeichnen. Nach 2 DLI-Gaben und klinisch milden cGVHD-Symptomen rekonstituierten nahezu wieder ausschließlich CD52^{pos} Treg. Patient 41 zeigte zu den untersuchten Zeitpunkten nach aHSZT keine Zeichen einer aGVHD oder cGVHD. Bereits früh nach aHSZT rekonstituierte er vor allem CD52^{pos} Treg. Der Anteil der CD52^{pos} Treg nahm über den gesamten klinischen Verlauf weiter zu, parallel zum unauffälligen klinischen Verlauf ohne Entwicklung einer GVHD.

Es konnte anhand von vier Patienten exemplarisch eine Korrelation zwischen der Rekonstitution CD52^{neg} Treg und der Entwicklung einer aGVHD und dem klinischen Verlauf einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD gezeigt werden. Patienten,

die im Verlauf nach aHSZT führend CD52^{pos} Treg rekonstituieren und expandierten, entwickelten keine GVHD oder im Verlauf Zeichen einer cGVHD. Die Rekonstitution von führend CD52^{neg} Treg konnte vor allem bei Patienten mit einer aGVHD beobachtet werden. Die Rekonstitution CD52^{neg} Treg scheint somit mit der Entwicklung und dem klinischen Verlauf einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD assoziiert zu sein.

6.3 Rekonstitution von Treg-Subgruppen nach Alemtuzumab-basierter TZD

In der Literatur wird neben der Rekonstitution niedriger Treg-Zahlen eine veränderte Expression von Oberflächenmarker auf Treg als weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer aGVHD nach aHSZT genannt. Über spezielle Oberflächenmarker können definierte Treg-Subgruppen identifiziert werden, welche innerhalb des Treg-Pools spezielle Funktionen haben, so dass eine Änderung der Expression mit einer veränderten Funktion des Treg-Pools einhergehen kann. Wir untersuchten in dieser Arbeit die Expression der Oberflächenmarker GARP, CD45RA und HLA-DR.

6.3.1 Expression von GARP nach Alemtuzumab-basierter TZD

Wang et al. konnten zeigen, dass über die Expression des Oberflächenmarkers GARP (Glycoprotein A repetitions predominant) aktivierte Treg identifiziert werden können (Wang et al. 2008). Nach Analyse der GARP-Expression auf Treg und Korrelation mit dem klinischen Verlauf und der Entwicklung einer GVHD zeigte sich, dass sich GARP^{pos} Treg in dem untersuchten Patientenkollektiv signifikant häufiger bei Patienten, die keine GVHD entwickelten, nachweisen ließen. Aktivierte, GARP^{pos} Treg fanden sich signifikant weniger häufig bei Patienten mit aGVHD oder cGVHD. Probst-Kepper et al. konnten 2009 zeigen, dass eine verminderte Expression von GARP (in ihren Versuchen über siRNA) zu einer verminderten Suppressionsfähigkeit und geringeren Expression von FOXP3 führten (Probst-Kepper et al. 2009). Dies lässt den Schluss zu, dass möglicherweise eine geringere Aktivität von Treg die Entwicklung und den Verlauf einer aGVHD oder cGVHD fördern könnte. Eine Untersuchung der GARP-Expression auf CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg zeigte, dass GARP nahezu ausschließlich auf CD52^{pos} Treg exprimiert wird. GARP wird nicht mit Hilfe eines GPI-Ankers auf der Oberfläche exprimiert. Die fehlende Expression von GPI-Anker nach Alemtuzumab-basierter TZD scheint somit nicht die Ursache der selektiven Expression von GARP auf CD52^{pos} Treg zu sein. Da es sich um ex-vivo-Analysen handelt, ist nicht klar, ob CD52^{neg} Treg GARP funktionell nicht exprimieren können oder ob andere, bisher unbekannte Faktoren eine Expression von GARP auf CD52^{neg} Treg verhindern.

Wir stimulierten daher CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg in vitro und maßen die GARP-Expression vor Stimulation und nach Ende der Stimulation. Eine verstärkte GARP-Expression nach Stimulation im Sinne einer Aktivierung von Treg konnte dabei sowohl bei CD52^{pos} Treg als auch bei CD52^{neg} Treg nachgewiesen werden. CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg scheinen somit in vitro nach Stimulation GARP vermehrt exprimieren zu können und damit aktivierbar zu sein. Auffallend war jedoch die insgesamt stärkere Expression von GARP auf CD52^{pos} Treg im Vergleich zu CD52^{neg} Treg nach unspezifischer Stimulation. Da die Expression von GARP mit der suppressiven Wirkung korreliert, besteht die Vermutung, dass sich CD52^{pos} Treg zum einen besser aktivieren lassen und zum anderen die suppressive Wirkung CD52^{pos} Treg stärker ausgeprägt sein könnte im Vergleich zu den CD52^{neg} Treg. Dies unterstützt die Hypothese, dass CD52^{neg} Treg im Vergleich zu CD52^{pos} Treg funktionell eingeschränkt sein könnten.

6.3.2 Expression von HLA-DR und CD45RA nach Alemtuzumab-basierter TZD

Über die Analyse der Expression der Oberflächenmarker HLA-DR und CD45RA können weitere Treg-Subpopulationen unterschieden und differenziert werden: aktivierte bzw. stark suppressive Treg (HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg}); Gedächtnis- oder Memory-Treg (HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg}) und naive Treg (HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos}).

6.3.2.1 Rekonstitution von stark suppressiven, HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD

In dem untersuchten Patientenkollektiv ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Rekonstitution von stark suppressiven, HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg und dem klinischen Verlauf einer GVHD nachvollziehen. HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg stehen für stark suppressive, aktivierte Treg. Im Vergleich zu aktivierten GARP^{pos} Treg scheint es sich jedoch um einen anderen Aktivitätszustand zu handeln. HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg ließen sich tendenziell häufiger bei Patienten mit aGVHD nachweisen. Die CD52-Expression der HLA-DR^{pos} CD45RA^{neg} Treg war signifikant geringer ausgeprägt bei Patienten mit einer aGVHD. Patienten mit einer aGVHD wiesen also suppressive, aktivierte Treg auf, die größtenteils CD52^{neg} waren.

6.3.2.2 Rekonstitution von HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} - Gedächtnis oder Memory-Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD

Die HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} Treg-Population beschreibt Gedächtnis oder Memory-Treg. Es zeigte sich kein Unterschied in der Rekonstitution der Memory-Treg zwischen

den einzelnen Patientengruppen. Es ist bereits bekannt, dass die frühe Rekonstitution nach aHSZT vor allem aus den im Transplantat vorhandenen Spender-TZ erfolgt (Roux et al. 1996). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits durch Chimärismus-Analyse gezeigt werden, dass diese Zellen zu einem großen Teil zur Spender-Hämatopoese zählen. Eine Chimärismus-Analyse erfolgte in diesem Fall nicht. Die rekonstituierenden HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} Treg der Patienten mit aGVHD waren erneut vor allem CD52^{neg}, während HLA-DR^{neg} CD45RA^{neg} Treg bei Patienten mit cGVHD oder keiner GVHD CD52^{pos} waren.

6.3.2.3 Rekonstitution von naiven HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos} Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD

Über die Bestimmung der HLA-DR^{neg} CD45RA^{pos} Treg können naive Treg identifiziert werden. Es zeigte sich kein Unterschied in der Rekonstitution der naiven Treg zwischen den einzelnen Patientengruppen. Auffallend war jedoch, dass die naiven Treg anteilmäßig nur eine sehr kleine Population innerhalb der gesamten Treg-Population ausmachen. Es ist jedoch bekannt, dass erst Monate bis Jahre nach aHSZT neu gebildete naive Treg rekonstituieren und innerhalb des Treg-Pools zunehmen. Ursächlich dafür ist die mit dem Alter abnehmende Thymus-Funktion, sowie Schädigungen der Thymusfunktion durch die vorangegangenen zytostatischen Therapien (Krenger et al. 2011). Das mediane Alter der hier untersuchten Patientenkohorte lag zwischen 54 und 58 Jahren. Interessanterweise war die Population der naiven Treg unabhängig von der Entwicklung einer GVHD zum überwiegenden Teil CD52^{neg}. Die Ursache hierfür bleibt unklar und konnte in Vorarbeiten nicht reproduziert werden. Mögliche Ursachen könnten in der schon beschriebenen verzögerten bzw. sehr späten Rekonstitution der naive Treg liegen. Vorstellbar wäre aber auch eine erhöhte Suszeptibilität der naiven Treg für Alemtuzumab, so dass nur die CD52^{neg} naiven Treg nach aHSZT expandieren können. Auch hier wäre eine Chimärismus-Analyse interessant, um die rekonstituierenden CD52^{neg} naiven Treg der Spender oder Empfänger-Hämatopoese zuordnen zu können. Weiter könnten methodische Schwierigkeiten diese Diskrepanz erklären. Wie unter 5.6.2.3 beschrieben gelang der Nachweis von naiven Treg nur bei knapp der Hälfte aller Patienten, wiederum bei der Hälfte dieser Patienten ließen sich überhaupt nur geringe Anteile (<2%) nachweisen. Aufgrund der geringen Stichprobe und nur kleiner Zellzahlen besitzt dieses Ergebnis eine geringe Aussagekraft und bedarf weiterer Untersuchungen.

6.4 Funktionelle Untersuchungen der Suppressionsfähigkeit von CD52^{neg}Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD

Neben einer verzögerten Treg Rekonstitution und einer veränderten Expression von Oberflächenmarker auf Treg werden funktionelle Veränderungen von Treg als mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer aGVHD diskutiert. Wir entwickelten daher die Hypothese, dass CD52^{neg} Treg im Vergleich zu den CD52^{pos} Treg funktionell beeinträchtigt sein könnten. Wir untersuchten daher die Suppressionsfähigkeit von CD52^{pos} Treg und CD52^{neg} Treg im Vergleich. Aufgrund methodischer Hürden, welche in Abschnitt 6.6.2 erläutert werden, war die Durchführung des CFSE-basierten Suppressionstests nur bei einem Patienten (Patient 4) möglich. Sowohl CD52^{pos} als auch CD52^{neg} Treg von Patient 4 zeigten immunsuppressive Eigenschaften und konnten die Proliferation der CD3^{pos} CD4^{neg} Teff und CD3^{pos} CD4^{pos} Tresp unterdrücken. Teff und Tresp zeigten jedoch eine verstärkte Proliferation, wenn sie mit CD52^{neg} Treg inkubiert wurden. Die Suppressionsfähigkeit der CD52^{neg} Treg scheint also im Vergleich zur Suppressionsfähigkeit der CD52^{pos} Treg geringer ausgeprägt zu sein. Die Wiederherstellung einer Immunhomöostase nach aHSZT oder die Kontrolle inflammatorischer Reaktionen wie eine aGVHD könnte von CD52^{neg} Treg weniger gut etabliert bzw. kontrolliert werden. Die verminderte Suppressionsfähigkeit der CD52^{neg} Treg könnte damit eine Ursache für die klinische Korrelation der Rekonstitution CD52^{neg} Treg und dem Auftreten einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD darstellen.

Eine mögliche Erklärung der verminderten Suppressionsfähigkeit der CD52^{neg} Treg könnte durch den Verlust von immunmodulatorischen Funktionen erklärbar sein. CD52 kann durch einen von Phospholipase C abhängigen Mechanismus von der Zelloberfläche abgespalten werden (Clark et Cooke, 2013). Lösliches CD52 (sCD52) kann über eine Bindung an das inhibitorische Molekül Siglec-10 (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins-10) die T-Zell-Aktivierung verhindern (Clark et Cooke, 2013). Über den gleichen Mechanismus konnte lösliches CD52 die Proliferation von TZ in vitro hemmen (Bandala-Sanchez et al. 2013, Crocker et al. 2007, Razi et Varki, 1999). Diese immunoregulatorischen Eigenschaften könnten zudem durch Alemtuzumab blockiert werden. CD52^{neg} Treg könnten aufgrund der fehlenden Expression von CD52 kein lösliches CD52 bilden und damit diese immunmodulatorischen Funktionen nicht erfüllen. Dies könnte eine mögliche Ursache für die verminderte Suppressionsfähigkeit von CD52^{neg} Treg darstellen. Da Treg über unterschiedliche Mechanismen (siehe Abschnitt 2.5.3) suppressiv wirken und die

fehlende Expression von CD52 (infolge des Verlustes von GPI-Ankern und der Expansion GPI^{neg} Treg) möglicherweise nur eine immunsuppressive Teilfunktion einschränkt, besteht auch bei CD52^{neg} Treg eine immunsuppressive Wirkung im Sinne einer Hemmung der Proliferation im beschriebenen Versuchsansatz. Diese scheint jedoch im Vergleich zu den CD52^{pos} Treg schwächer zu sein. In weiterführenden Untersuchungen könnten immunsuppressive Teilfunktionen getrennt untersucht werden, um ein besseres Verständnis für die verminderte immunsuppressive Wirkung CD52^{neg} Treg zu schaffen.

6.5 Treg und die Entwicklung einer cGVHD nach Alemtuzumab-basierter TTD

Die cGVHD ähnelt klinisch einer Autoimmunerkrankung und kann als eine verspätet einsetzende Reaktion des Spenderimmunsystems gegen das Gewebe des Empfängers beschrieben werden. Die Pathophysiologie scheint komplexer zu sein und ist bisher nur unzureichend verstanden. In der Therapie der cGVHD kommen wie auch bei der Therapie der aGVHD immunsuppressive Medikamente wie auch immunmodulatorische Substanzen zum Einsatz. Finazzi et al. untersuchten retrospektiv die Entwicklung einer GVHD in verschiedenen Konditionierungsregimen mit Alemtuzumab-basierter TTD. 20 bzw. 10 Prozent der untersuchten Patienten entwickelte dabei eine cGVHD. Interessanterweise entwickelten zwölf Patienten davon direkt eine cGVHD ohne vorher eine aGVHD oder andere Zeichen einer GVHD aufgewiesen zu haben (Finazzi et al. 2019). In der untersuchten Stichprobe entwickelten elf Patienten eine cGVHD. Die in der Literatur für die aGVHD beschriebene inverse Korrelation zwischen dem Auftreten einer aGVHD und der Anzahl an Treg scheint für die cGVHD weniger eindeutig zu sein. Zorn und Li konnten eine Assoziation zwischen reduzierten Treg-Zahlen und der Entwicklung einer cGVHD zeigen (Zorn et al. 2005; Li et al. 2010), Clark, Sanchez und Ukena konnten dies nicht bestätigen, sie konnten sogar eine erhöhte Anzahl von Treg bei Patienten mit einer cGVHD nachweisen (Clark et al. 2004; Sanchez et al. 2004; Ukena et al. 2011). Wir konnten in der untersuchten Stichprobe keinen signifikanten Unterschied zwischen der absoluten und relativen Anzahl der Treg nach aHSZT nachweisen. Bezogen auf die Rekonstitution der CD52^{neg} CD4^{pos} TZ oder CD52^{neg} Treg glich die Rekonstitution dieser Zellpopulationen bei Patienten cGVHD am ehesten der Rekonstitution der Patienten, die keine GVHD entwickelten. Im Vergleich zu Patienten mit aGVHD rekonstituierten Patienten mit einer cGVHD vor allem CD4^{pos} TZ und Treg, welche

CD52 exprimierten. Die Bedeutung von CD52^{neg} Treg für die Entwicklung einer cGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD ist somit weniger eindeutig. Trotz Rekonstitution von CD52^{pos} Treg entwickeln Patienten eine cGVHD. Es lässt sich daher vermuten bzw. bestätigt die bisherige Annahme, dass sich die Pathophysiologie der aGVHD von der cGVHD unterscheidet bzw. die pathophysiologische Bedeutung von Treg und im Speziellen von CD52^{neg} Treg für die Entwicklung einer aGVHD eine andere sein muss als für die Pathophysiologie der cGVHD. Betrachtet man die Rekonstitution aktivierter, GARP^{pos} Treg zeigt sich, dass Patienten mit cGVHD signifikant weniger GARP^{pos} Treg aufweisen als Patienten, die keine GVHD entwickelten. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die seriellen Untersuchungen im Verlauf bei Patient 5 und Patient 24. Die Rekonstitution GARP^{pos} Treg verlief über den Verlauf bei Patient 24 durchgehend auf einem niedrigen Niveau, parallel zum klinischen Verlauf der cGVHD. Patient 5 zeigte zu Beginn Zeichen einer aGVHD bei wenigen GARP^{pos} Treg, deren Anteil mit der Entwicklung einer cGVHD zuerst zunahm, um dann im Verlauf wieder abzunehmen. Zusammengefasst scheint die Rekonstitution CD52^{neg} TZ und Treg für die Entwicklung einer cGVHD weniger relevant zu sein - Patienten mit cGVHD wiesen jedoch signifikant weniger aktivierte, GARP^{pos} Treg auf.

Alho et al. untersuchten bei 107 Patienten die Immunrekonstitution der CD4^{pos} TZ, CD8^{pos} TZ und Treg über zwei Jahre nach aHSZT mit einer RIC, jedoch ohne Einsatz von Alemtuzumab. Bei Patienten, die eine cGVHD entwickelten, rekonstituierten die CD8^{pos} TZ im Vergleich zu den CD4^{pos} TZ und Treg viel schneller. Es kam zu einem Überwiegen der Effektor-TZ und insgesamt zu einer ungleichmäßigen Rekonstitution der TZ-Populationen. Eine ungleichmäßige Rekonstitution bzw. Erholung der TZ-Populationen könnte eine weitere Ursache für die Entwicklung einer cGVHD darstellen (Alho et al. 2016). Neben Treg und einer ungleichmäßigen TZ-Rekonstitution scheinen B-Zellen für die Pathophysiologie der cGVHD bedeutsam zu sein. B-Zellen haben neben der Fähigkeit Ak zu produzieren zudem die Eigenschaft Ag TZ zu präsentieren. Beide Eigenschaften könnten die Entwicklung einer cGVHD initiieren und unterhalten (Linhares et al. 2013). Bei Patienten mit cGVHD lassen sich zum einen häufiger Autoantikörper (Auto-Ak) nachweisen, zum anderen haben Patienten mit Auto-Ak häufiger cGVHD-assoziierte Symptome als Patienten ohne Auto-Ak (Patriarca et al. 2006). Weiter scheinen Auto-Ak gegen den Platelet-derived growth factor (PDGF) für die Entwicklung einer cGVHD relevant zu sein. PDGF-Auto-Ak stimulieren über verschiedene Wege eine Kaskade an Reaktionen, welche zu Entzündung und Fibrose beitragen können. Dieser Umstand erklärt zudem, warum der Einsatz des Anti-CD20-

Ak Rituximab in der Therapie der cGVHD eingesetzt werden kann und vereinzelt eine Besserung der klinischen Symptomatik erzielt. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bisher keine CD52^{neg} B-Zellen bei Patienten nach Alemtuzumab-basierter TZD nachgewiesen werden.

6.6 Methodische Probleme

6.6.1 Durchflusszytometrische Identifikation und Isolation von Treg nach Alemtuzumab-basierter TZD

Treg wurden in dieser Arbeit als durchflusszytometrisch als CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}FOXP3^{pos} oder CD3^{pos}CD4^{pos}CD25^{pos}CD127^{neg/int} Zellen identifiziert (Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006; Codarri et al. 2007; Hartigan- O'Connor et al. 2007). FOXP3 ist essentiell für Entwicklung und Funktion von Treg und gilt als linienspezifischer Marker zur Identifikation von Treg. Wir nutzten daher FOXP3 für die Charakterisierung von Treg und zur Identifikation weiterer Treg-Subgruppen. Wie unter 2.5.1 beschrieben limitiert die alleinige Verwendung von FOXP3 weitere Untersuchungen, da die Zellen für die intrazelluläre Färbung von FOXP3 permeabilisiert werden. Funktionelle Untersuchungen zur Testung der Suppression oder Zytokin-Sekretion sind nachfolgend somit nicht mehr möglich. Liu et al. konnten bereits zeigen, dass mit Hilfe von CD127^{neg} CD25^{pos} Treg von aktivierten CD25^{pos} TZ unterscheiden werden können. Entscheidend ist das inverse Verhältnis: CD25^{pos} Treg weisen eine verminderte CD127-Expression auf. Diese konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Zum einen konnten in den einzelnen Patientenproben nahezu gleiche Treg-Zahlen bestimmt werden, unabhängig davon, ob Treg über FOXP3 oder CD127 identifiziert wurden. Vor allem aber konnte gezeigt werden, dass die Population der CD127^{neg} CD25^{pos} TZ im CFSE-basierten Suppressionstest, die Proliferation von Tresp oder Teff hemmen kann und somit suppressive Eigenschaften besitzt. Die Gating-Strategie zur Identifikation von TZ oder im Speziellen von Treg erfolgt meist in einem ersten Schritt über ein Lymphozyten-Gate, welches im Forward- und Sidewardscatter bestimmt werden kann. Durch die intrazelluläre Färbung werden alle Zellen permeabilisiert, wodurch sich die Granularität und die Größe der Zellen verändert. Damit einhergehend verändert sich die Position der Zellen im Forward- und Sidewardscatter, so dass die Identifikation des Lymphozyten-Gates nach der intrazellulären Färbung erschwert und nicht vollständig kompatibel ist. Dies könnten die vereinzelt Abweichungen bei der Identifikation von Treg über FOXP3 oder CD127 erklären. Als Beispiel ist hier Patient 33 dargestellt.

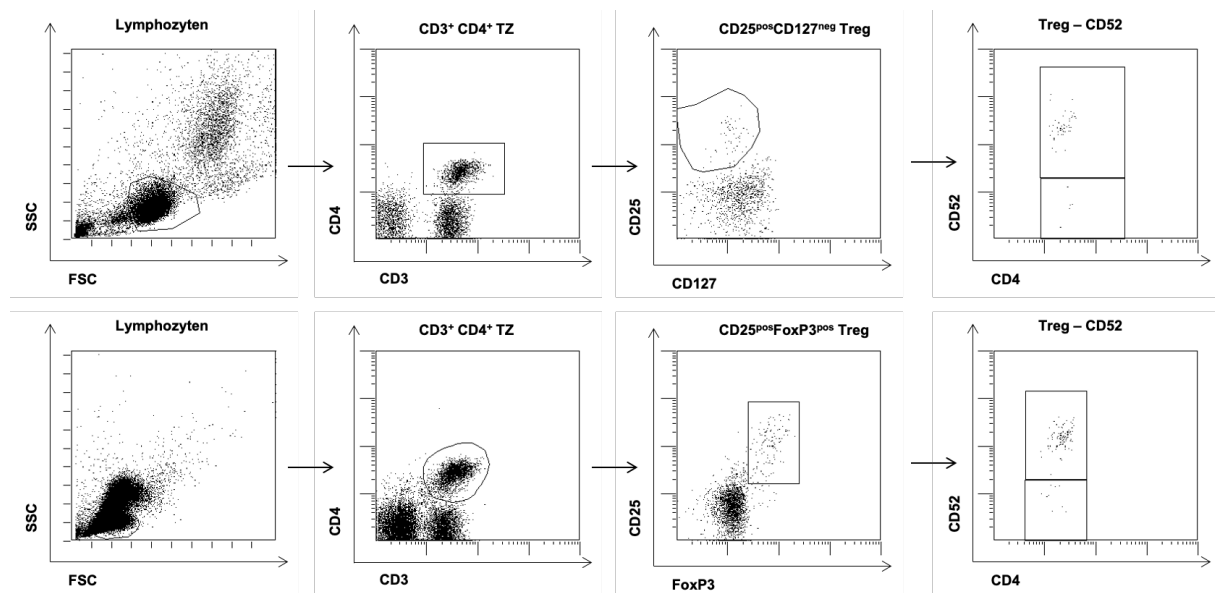


Abbildung 45: Durchflusszytometrische Identifikation von $CD25^{pos}CD127^{neg}$ Treg und $CD25^{pos}FOXP3^{pos}$ Treg über eine intrazelluläre Färbung von FOXP3 von Patient 33.

	Lymphozyten (%)	$CD3^{pos} CD4^{pos}$ TZ (%)	Treg (%)	52^{pos} Treg (%)	52^{neg} Treg (%)
$CD25^{pos}CD127^{neg}$ Treg	47,2	10,4	3,5	88,4	11,6
$CD25^{pos}FOXP3^{pos}$ Treg	66,4	8,6	3,9	90	10

Tabelle 19: Durchflusszytometrische Identifikation von $CD25^{pos}CD127^{neg}$ Treg und $CD25^{pos}FOXP3^{pos}$ Treg über eine intrazelluläre Färbung von FOXP3 von Patient 33.

6.6.2 Durchführung der CFSE-basierten Suppressions-Tests

Zur Messung der Treg-vermittelten Suppression wurde ein CFSE-basierter Suppressions-Test verwendet. Methodische Schwierigkeiten bestanden vor allem darin ausreichend Treg der Patienten zur Durchführung des Suppressionstests zu gewinnen. Um die Suppressionsfähigkeit von $CD52^{pos}$ Treg mit $CD52^{neg}$ Treg getrennt vergleichen zu können, ist eine ausreichend große und möglichst gleich große Population $CD52^{pos}$ Treg und $CD52^{neg}$ Treg essentiell. Wir mussten also einen Zeitpunkt nach aHSZT identifizieren, bei dem die Patienten ungefähr genauso viele $CD52^{pos}$ Treg wie $CD52^{neg}$ Treg rekonstituiert hatten. Dies gestaltete sich schwierig, da sowohl die Rekonstitution als auch die CD52-Expression häufig verzögert und sehr dynamisch waren. Wir entschlossen uns daher zu einem engmaschigeren Monitoring der Rekonstitution bei einzelnen Patienten. Patient Nr. 4 konnte als potentieller Kandidat identifiziert werden bei dem die CD52-Expression sich zunehmend anglich. Trotzdem mussten drei Versuche unternommen werden, um ausreichend Zellen für einen Suppressions-Test zu erhalten. Limitierende Faktoren waren zum einen die

absolute Zellzahl und zum anderen die Verfügbarkeit von Blutproben. Da die untersuchten Patienten nach aHSZT sich in der Phase der Rekonstitution befanden, bestand häufig noch zusätzlich eine Lymphopenie, so dass größere Mengen Blut notwendig gewesen wären, um ausreichende Zellzahlen zur Durchführung einer FACS-basierten Sortierung zu erhalten. Dies wiederum warf unweigerlich ethische Fragen auf, da eine Schädigung der Patienten auf keinen Fall in Kauf genommen werden durfte. Ein weiterer relevanter und limitierender Aspekt war die FACS-basierte Sortierung und vor allem die Dauer der FACS-basierten Sortierung. Eine zu lange andauernde Sortierung hatte einen relevanten Einfluss auf die Qualität und Vitalität der sortierten Zellen, so dass die Zellsortierung möglichst kurzgehalten werden musste, um möglichst wenige Zellen zu verlieren. Dies sind Gründe dafür, dass der Suppressions-Test nur an einem Patienten durchgeführt werden konnte. Um das Ergebnis des CFSE-basierter Suppressions-Tests zu bestätigen, sind Wiederholungen des Testes notwendig. In Vorbereitung sollte ein automatisches Screening auf die CD52-Rekonstitution bei jeder klinischen Visite etabliert werden.

6.7 Klinische Bedeutung und zukünftige therapeutische Implikationen

Nachdem in dieser Arbeit die Korrelation zwischen der Rekonstitution der CD52^{neg} Treg und der Entwicklung einer aGVHD gezeigt werden konnte, möchte ich nun mögliche therapeutische Implikationen diskutieren.

Die Rekonstitution CD52^{neg} Treg scheint mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer aGVHD einherzugehen. Die Bestimmung der CD52^{neg} Treg könnte daher als prädiktiver Marker zur Risikoabschätzung einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD verwendet werden. Die Anforderungen an einen Biomarker bestehen allgemein darin, dass er Aussagen über das Vorhandensein einer Erkrankung mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität ermöglichen soll. Weiter kann bzw. sollte ein Biomarker Hilfestellung über die die Schwere und das Ausmaß einer Erkrankung geben, um frühzeitig eine Diagnose zu stellen und daraufhin eine Therapie einleiten zu können (Biomarkers Definitions Working G. 2001; Brower V. 2011). Idealerweise sollte zudem nach Einleitung einer spezifischen Therapie über die Zu- oder Abnahme eines Biomarkers das Therapieansprechen überprüft werden können. Bisher erfolgt eine Kontrolle des Therapieansprechens einer aGVHD vor allem über eine Kontrolle des klinischen Ansprechens mit Ab- oder Zunahme der aGVHD-assoziierten Symptome. Das klinische Ansprechen auf eine spezifische aGVHD-Therapie nach vier Wochen zeigte sich als nützlicher Prädiktor für die Non-Relapse-Mortalität (NRM) und

dient daher häufig als primärer Endpunkt in den meisten klinischen Studien zur Therapie der aGVHD (MacMillan et al. 2010; Martin et al. 2009). Problematisch bleibt jedoch weiterhin, dass eine Veränderung der klinischen Symptome immer noch einen schlechten positiven Vorhersagewert hat und die Dauer von vier Wochen immer noch einen relativ langen Zeitraum darstellt. Die Etablierung eines relevanten Biomarker für eine aGVHD mit hoher Sensitivität und Spezifität bleibt daher weiter erstrebenswert. Die Kontrolle der Rekonstitution der CD52^{neg} Treg als Baustein im Monitoring der Entwicklung einer aGVHD bzw. zum Monitoring des Therapieansprechens nach Einleitung einer Therapie der aGVHD erscheint aus meiner Sicht erstrebenswert und attraktiv. Die gute Korrelation der Rekonstitution der CD52^{neg} Treg mit dem klinischen Verlauf erlaubte es in unserer Stichprobe in einzelnen Fällen sogar eine laborchemische Zunahme der CD52^{neg} Treg noch vor den ersten klinischen Symptomen einer aGVHD zu detektieren. Weiter ist der diagnostische Nachweis von CD52^{neg} Treg relativ einfach und kostensparend umsetzbar. Zur Etablierung von CD52^{neg} Treg als Biomarker der aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD ist die untersuchte Stichprobe jedoch zu klein und müsste auf eine größere Stichprobe ausgedehnt werden. Weiter könnte mit Hilfe eines größeren Patientenkollektivs und einer engmaschigeren Kontrolle der Rekonstitution der CD52^{neg} Treg der kritische Zeitpunkt für die Entwicklung einer aGVHD definiert werden und weiter ein Cut-off-Wert gefunden werden, ab dem die Entwicklung einer aGVHD mit einem erhöhten Risiko einhergeht. So könnte ein Monitoring der Rekonstitution mit einem Therapiemanagement der aGVHD einhergehen.

Schließlich bleibt die Möglichkeit, den therapeutischen Einsatz von Treg zu diskutieren. Der therapeutische Einsatz von Treg ergibt sich direkt aus deren Funktion und Bedeutung für die Immunhomöostase. Treg besitzen potentiell die Eigenschaften, das Ungleichgewicht aus überschießender Aktivität und mangelhafter Regulation bei einer aGVHD zu beheben. Therapiestrategien zielen daher darauf ab, den Anteil von Treg zu erhöhen. Dies kann über einen adoptiven Transfer von Treg als Infusion erreicht werden. Zu Beginn bestand die Sorge, dass der adoptive Transfer von Treg selbst eine aGVHD initiieren oder verschlimmern könnte. Dies konnte in murinen Studien ausgeschlossen werden: Treg selbst induzieren dabei keine GVHD - selbst, wenn sie in hohen Dosen oder mit unterschiedlichen MHC-Komplexen infundiert werden (Taylor et al. 2001; Edinger et al. 2003). Eine erste Phase-I-Studie wurde an der Universität Minnesota durchgeführt. Treg wurden dabei aus Spender-Nabelschnurblut isoliert und in vitro expandiert. 23 Patienten, die in der Folge eine

doppelte Nabelschnur-Transplantation durchliefen, erhielten zu unterschiedlichen Zeitpunkten, u.a. zum Zeitpunkt des Engraftments, Treg-Infusionen. Die Infusionen selbst erzeugten keine Toxizität, relevante Nebenwirkungen traten nicht auf. Ein Effekt der Treg-Infusionen auf die Entwicklung konnte wie erwartet aufgrund der simultanen GVHD-Prophylaxe mittels CsA und MMF in diesem Ansatz nicht direkt untersucht werden, jedoch konnte dieser Ansatz die Sicherheit und Durchführbarkeit zeigen (Brunstein et al. 2011). Di Ianni et al. untersuchten die Effektivität von Treg-Infusionen im Rahmen der haploidentischen SCT. Dafür verwendeten sie Spender-Treg, die vorab im Rahmen einer Leukapherese mittels CD25-Beads generiert und angereichert wurden. Die Patienten erhielten eine erste Treg-Infusion vier Tage vor der geplanten SCT. Die applizierten Dosen variierten von $2-4 \times 10^6$ Treg pro kg KG. Weiter wurden Treg in einer Dosierung von 2×10^6 Treg pro kg KG zusammen mit den CD34-positiven Stammzellen am Tag der HSZT transplantiert, da das Risiko eine schwere akute GVHD zu entwickeln bei einer haploidentischen SCT aufgrund der HLA-Disparität deutlich erhöht ist. Erstaunlicherweise entwickelten die meisten Patienten keine klinisch relevante aGVHD, nur zwei der insgesamt 26 Patienten zeigten eine aGVHD Grad II oder höher. Neben dem geringeren Auftreten und Ausprägung einer GVHD rekonstituierten Patienten die Treg-Infusionen erhielten schneller und entwickelten weniger CMV-Reaktivierungen im Vergleich zu Patienten, die keine Treg-Infusionen erhielten (Di Ianni et al. 2011). Bisher liegen jedoch nur Daten von wenigen, kleinen Studien vor, so dass es zur weiteren Evaluation der Wirksamkeit von Treg-Infusionen größerer, multizentrischer Studien bedarf. Einige Fragen sind dabei noch ungeklärt, zum Beispiel im Hinblick auf den Zeitpunkt der Treg-Applikation, die Dosis oder die Art der Expansion von Treg.

Der therapeutische Einsatz von Treg bleibt dabei nicht nur auf die aGVHD nach aHSZT beschränkt. Treg werden therapeutisch zum Beispiel auch im Rahmen der Transplantation solider Organe eingesetzt. Dort stehen sie als Vermittler der Toleranz im Fokus um eine Abstoßung eines transplantierten Organs zu verhindern. Das Überleben eines transplantierten Organs ist dabei vor allem abhängig von chronischen Immunantworten gegen das Transplantat (im Sinne einer Abstoßungsreaktion) und den toxischen Wirkungen der Immunsuppression. Hier sollen vor allem die nephrotoxischen und diabetogenen Calcineurin-Inhibitoren genannt werden. Das Ziel adoptiver Treg-Therapien besteht darin, Alloimmunität zu reduzieren und gleichzeitig eine eigene Immuntoleranz zu etablieren. Als Beispiel kann hier eine Phase I/IIa Studie von Roemheld et al. genannt werden (Roemhild et al. 2020). Hier wurde Patienten

peripheres Blut zwei Wochen vor Nierentransplantation entnommen, daraus Treg isoliert und in vitro expandiert. zwei Wochen nach Nierentransplantation erhielten die Studienpatienten autologe Treg-Infusionen. Ziel war es zum einen die Durchführung und Sicherheit der Treg-Gaben zu zeigen und zum anderen über die Treg-Infusionen die Immunsuppression nach Transplantation einzusparen und zu reduzieren. Die Immunsuppression konnte in der Treg-Gruppe auf eine Monotherapie reduziert werden, während die Kontroll-Gruppe zwei Jahre nach Transplantation weiter eine zweifache bis dreifache Immunsuppression benötigte. Nebenwirkungen durch die Treg-Applikationen konnten nicht beobachtet werden.

Eine weitere Hypothese bestand darin, dass der Gehalt an Treg im Transplantat mit der Entwicklung einer akuten GVHD assoziiert sein könnte. Diese konnte von Pabst et al. 2007 bestätigt werden: Patienten, die einen erhöhten Gehalt an Treg im Transplantat aufwiesen, entwickelten signifikant weniger akute GVHD nach HSZT (Pabst et al. 2007). Weitere Studien zogen diese Erkenntnisse jedoch wiederum in Zweifel (Pastore et al. 2012; Rezvani et al. 2006). Zusammengefasst scheint die Anzahl von Spender-Treg im Transplantat die Entwicklung einer aGVHD zu beeinflussen. Der genaue Einfluss kann jedoch aufgrund von geringen Patientenzahlen und der doch großen Unterschiede innerhalb der Patientengruppen in Bezug auf die verwendete Konditionierung und den angewendeten Immunsuppressiva nicht abschließend bewertet werden (Edinger et Hoffmann, 2013). Zudem erfolgt bisher keine standardisierte phänotypische Analyse des Transplantats. Aus Tierversuchen konnte ein signifikanter Effekt nur gezeigt werden, wenn der Treg-Gehalt im Transplantat deutlich über dem physiologischen Gehalt lag.

Zu betonen ist, dass Treg nicht nur die Entwicklung einer GVHD verhindern, sondern auch allgemein das Engraftment des Transplantats erleichtern und damit die Rekonstitution unterstützen können. (Trenado et al. 2003; Hanash et Levy 2005; Joffre et al. 2004). Fujisaki konnte sogar zeigen, dass sich Treg im Knochenmark bevorzugt in der Nähe von hämatopoetischen Stammzellen ansiedeln, um ein Milieu zu etablieren und aufrechtzuerhalten, indem hämatopoetische Stammzellen engraften und rekonstituieren können (Fujisaki et al. 2011).

Im Hinblick auf eine Prävention oder Therapie einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter T2D bestünde theoretisch ein weiterer Therapieansatz darin, speziell den Anteil der CD52^{pos} Treg zu erhöhen bzw. die Rekonstitution der CD52^{pos} Treg zu unterstützen. Im Rahmen der Studie 177 erhielten Patienten bereits CD8-depletierte DLI, um das Rezidivrisiko zu senken und die Immunrekonstitution zu unterstützen. Die

Applikation erfolgte 60 und 120 Tage nach aHSZT und war nur auf Patienten beschränkt, die keine oder nur eine leichte aGVHD (<I°) entwickelten. Mit Hilfe der DLI-Applikation konnte ein kompletter Spenderchimärismus erreicht werden (Meyer et al. 2010). Ein neuer Ansatz zur Prävention oder Therapie einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD könnte in modifizierten DLI-Gaben liegen. Die bisher CD8-depletierten DLI könnten so modifiziert werden, dass die DLI führend Treg enthielten. Dies könnte die Rekonstitution der Treg-Population unterstützen und zusätzlich eine aGVHD verhindern ohne den GVL-Effekt zu reduzieren. Über eine Modifikation der DLI mit Anreicherung von Treg könnten zudem auch Patienten DLI erhalten, die bereits eine aGVHD entwickelt haben. Di Ianni et al. nutzen 2017 Treg-DLI bei einem Patienten mit einem Frührezidiv nach zweiter aHSZT bei einer akuten Promyelozytenleukämie und konnten eine GVHD verhindern, ohne den GVL-Effekt zu hemmen. Das Treg-DLI Produkt wurde über eine Depletion der CD8^{pos} und CD19^{pos} Zellen mit nachfolgender Positivselektion der CD25^{pos} TZ hergestellt. Eine Modifikation der CD8-depletierten DLI mit führendem Treg-Anteil und eine Fortsetzung der DLI-Gaben auch bei Patienten mit aGVHD könnte somit einen neuen vielversprechenden Ansatz in der Therapie der aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD darstellen.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Treg und im Speziellen CD52^{neg}/GPI-Anker^{neg} Treg nach aHSZT mit Alemtuzumab-basierter TZD untersucht. Treg als Vermittler einer Immuntoleranz sind essentiell für die Unterdrückung einer GVHD. Nach Alemtuzumab-basierter TZD kann die Rekonstitution CD52^{neg} TZ beobachtet werden, welche über einen längeren Zeitraum nach aHSZT persistieren. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Rekonstitution CD52^{neg} TZ beruht dabei auf einer Expansion GPI-Anker^{neg} TZ des Spenders.

Es ist bereits bekannt, dass die antivirale Funktion CD52^{neg} TZ beeinträchtigt ist. Daher gingen wir der Hypothese nach, dass auch CD52^{neg} Treg funktionell beeinträchtigt sein könnten und somit ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer GVHD bestünde. Wir versuchten daher, CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg phänotypisch und funktionell weiter zu charakterisieren um damit ein besseres Verständnis für das gehäufte Auftreten einer GVHD trotz TZD mit Alemtuzumab zu gewinnen. Die Rekonstitution CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg wurde mit dem klinischen Verlauf und Auftreten einer GVHD korreliert. Es konnte eine eindeutige Korrelation zwischen dem Auftreten einer aGVHD und der Rekonstitution CD52^{neg} Treg bei einer Patientenstichprobe von 47 Patienten gezeigt werden. Bei vier Patienten konnten über serielle Messungen die Rekonstitution der CD52^{neg} Treg mit dem individuellen klinischen Verlauf einer GVHD korreliert und bestätigt werden. Die Rekonstitution CD52^{neg} Treg scheint somit einen Risikofaktor für die Entwicklung einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD darzustellen.

Eine weitere phänotypische Charakterisierung erfolgte über die Analyse des Oberflächenmarkers GARP, welcher aktivierte Treg definiert. In der untersuchten Stichprobe wiesen Patienten mit einer GVHD, unabhängig davon, ob es sich um eine aGVHD oder eine cGVHD handelte, signifikant weniger aktivierte GARP^{pos} Treg auf. Weiter fand sich eine GARP-Expression nahezu ausschließlich auf CD52^{pos} Treg. In funktionellen Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg nach unspezifischer Stimulation GARP exprimieren können. CD52^{neg} Treg scheinen somit theoretisch in der Lage zu sein GARP nach unspezifischer Stimulation zu exprimieren und aktiviert zu werden. Die Ursache für die signifikante Reduktion aktivierter, GARP^{pos} Treg bei Patienten mit GVHD und die selektive Expression von GARP auf CD52^{pos} Treg bedarf daher weiterer Untersuchungen.

Wir untersuchten die suppressive Fähigkeit CD52^{pos} und CD52^{neg} Treg, um diese funktionell miteinander vergleichen zu können: beide Populationen zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation. Die Treg-vermittelte Suppression war jedoch bei den CD52^{pos} Treg im Vergleich zu den CD52^{neg} Treg signifikant stärker ausgeprägt. CD52^{neg} Treg scheinen weniger immunsuppressiv zu wirken. Dies konnte im Detail bei einem Patienten nachgewiesen werden.

Zusammenfassend betont diese Arbeit die Bedeutung von Treg und im Speziellen die Rekonstitution CD52^{neg} Treg für die Entwicklung einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD. CD52^{neg} Treg scheinen phänotypisch und funktionell beeinträchtigt zu sein. Damit spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer aGVHD nach Alemtuzumab-basierter TZD.

8. Literaturverzeichnis

- Akbar** AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol*. 1988 Apr 1;140(7):2171-8. PMID: 2965180.
- Akpek** G, Zahurak ML, Piantadosi S, Margolis J, Doherty J, Davidson R, Vogelsang GB. Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2001 Mar 1;97(5):1219-26. doi: 10.1182/blood.v97.5.1219. Erratum in: *Blood* 2002 Jan 1;99(1):14. PMID: 11222363.
- Alho** AC, Kim HT, Chammas MJ, Reynolds CG, Matos TR, Forcade E, Whangbo J, Nikiforow S, Cutler CS, Koreth J, Ho VT, Armand P, Antin JH, Alyea EP, Lacerda JF, Soiffer RJ, Ritz J. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood*. 2016 Feb 4;127(5):646-57. doi: 10.1182/blood-2015-10-672345. Epub 2015 Dec 15. PMID: 26670634; PMCID: PMC4742552.
- Antin** JH, Bierer BE, Smith BR, Ferrara J, Guinan EC, Sieff C, Golan DE, Macklis RM, Tarbell NJ, Lynch E, et al. Selective depletion of bone marrow T lymphocytes with anti-CD5 monoclonal antibodies: effective prophylaxis for graft-versus-host disease in patients with hematologic malignancies. *Blood*. 1991 Oct 15;78(8):2139-49. PMID: 1717080.
- Ardon** H, Verbrinnen B, Maes W, Beez T, Van Gool S, De Vleeschouwer S. Technical advancement in regulatory T cell isolation and characterization using CD127 expression in patients with malignant glioma treated with autologous dendritic cell vaccination. *J Immunol Methods*. 2010 Jan 31;352(1-2):169-73. doi: 10.1016/j.jim.2009.10.007. Epub 2009 Oct 27. PMID: 19874827.
- Arnaout** K, Patel N, Jain M, El-Amm J, Amro F, Tabbara IA. Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Invest*. 2014 Aug;32(7):349-62. doi: 10.3109/07357907.2014.919301. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24902046.
- Asseman** C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*. 1999 Oct 4;190(7):995-1004. doi: 10.1084/jem.190.7.995. PMID: 10510089; PMCID: PMC2195650.
- Baecher-Allan** C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol*. 2006 Apr 15;176(8):4622-31. doi: 10.4049/jimmunol.176.8.4622. PMID: 16585553.
- Baker** D, Herrod SS, Alvarez-Gonzalez C, Giovannoni G, Schmierer K. Interpreting Lymphocyte Reconstitution Data From the Pivotal Phase 3 Trials of Alemtuzumab. *JAMA Neurol*. 2017 Aug 1;74(8):961-969. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.0676. PMID: 28604916; PMCID: PMC5710323.
- Ball** LM, Bernardo ME, Roelofs H, van Tol MJ, Contoli B, Zwaginga JJ, Avanzini MA, Conforti A, Bertaina A, Giorgiani G, Jol-van der Zijde CM, Zecca M, Le Blanc K, Frassoni F, Egeler RM, Fibbe WE, Lankester AC, Locatelli F. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host

disease. *Br J Haematol*. 2013 Nov;163(4):501-9. doi: 10.1111/bjh.12545. Epub 2013 Aug 31. PMID: 23992039.

Ball LM, Egeler RM; EBMT Paediatric Working Party. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Jun;41 Suppl 2:S58-64. doi: 10.1038/bmt.2008.56. PMID: 18545246.

Bandala-Sanchez E, Zhang Y, Reinwald S, Dromey JA, Lee BH, Qian J, Böhmer RM, Harrison LC. T cell regulation mediated by interaction of soluble CD52 with the inhibitory receptor Siglec-10. *Nat Immunol*. 2013 Jul;14(7):741-8. doi: 10.1038/ni.2610. Epub 2013 May 19. PMID: 23685786.

Battaglia M, Roncarolo MG. The Tregs' world according to GARP. *Eur J Immunol*. 2009 Dec;39(12):3296-300. doi: 10.1002/eji.200940117. PMID: 19904770.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):20-1. doi: 10.1038/83713. PMID: 11137993.

Beres AJ, Drobyski WR. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front Immunol*. 2013 Jun 24;4:163. doi: 10.3389/fimmu.2013.00163. PMID: 23805140; PMCID: PMC3690651.

Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966-1967;62:21-78. PMID: 4875305.

Bindon CI, Hale G, Waldmann H. Importance of antigen specificity for complement-mediated lysis by monoclonal antibodies. *Eur J Immunol*. 1988 Oct;18(10):1507-14. doi: 10.1002/eji.1830181006. PMID: 2973413.

Biomarkers Definitions Working Group.. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89-95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989. PMID: 11240971.

Booth C, Veys P. T cell depletion in paediatric stem cell transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2013 May;172(2):139-47. doi: 10.1111/cei.12004. PMID: 23574311; PMCID: PMC3628317.

Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1225-32. doi: 10.1182/blood-2006-12-064527. Epub 2007 Apr 20. PMID: 17449799.

Bottomly K. A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes. *Immunol Today*. 1988 Sep;9(9):268-74. doi: 10.1016/0167-5699(88)91308-4. PMID: 2908229.

Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*. 2000 Dec;13(6):829-40. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00080-7. PMID: 11163198.

Brett SJ, Baxter G, Cooper H, Rowan W, Regan T, Tite J, Rapson N. Emergence of CD52-, glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient lymphocytes in rheumatoid arthritis patients following Campath-1H treatment. *Int Immunol*. 1996 Mar;8(3):325-34. doi: 10.1093/intimm/8.3.325. PMID: 8671618.

Brower V. Biomarkers: Portents of malignancy. *Nature*. 2011 Mar 24;471(7339):S19-21. doi: 10.1038/471S19a. PMID: 21430715.

Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, Defor T, Levine BL, June CH, Rubinstein P, McGlave PB, Blazar BR, Wagner JE. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011 Jan 20;117(3):1061-70. doi: 10.1182/blood-2010-07-293795. Epub 2010 Oct 15. PMID: 20952687; PMCID: PMC3035067.

Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, Kottaridis PD, Peggs K, O'Gorman P, Chakraverty R, Marshall T, Osman H, Mahendra P, Craddock C, Waldmann H, Hale G, Fegan CD, Yong K, Goldstone AH, Linch DC, Milligan DW. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4357-63. doi: 10.1182/blood.v99.12.4357. PMID: 12036862.

Chakraverty R, Côté D, Buchli J, Cotter P, Hsu R, Zhao G, Sachs T, Pitsillides CM, Bronson R, Means T, Lin C, Sykes M. An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med*. 2006 Aug 7;203(8):2021-31. doi: 10.1084/jem.20060376. Epub 2006 Jul 31. PMID: 16880259; PMCID: PMC2118376.

Chakraverty R, Orti G, Roughton M, Shen J, Fielding A, Kottaridis P, Milligan D, Collin M, Crawley C, Johnson P, Clark A, Parker A, Bloor A, Pettengell R, Snowden J, Pettitt A, Clark R, Hale G, Peggs K, Thomson K, Morris E, Mackinnon S. Impact of in vivo alemtuzumab dose before reduced intensity conditioning and HLA-identical sibling stem cell transplantation: pharmacokinetics, GVHD, and immune reconstitution. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):3080-8. doi: 10.1182/blood-2010-05-286856. Epub 2010 Jun 29. PMID: 20587785.

Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, Milligan DW, Kottaridis PD, Verfuerth S, Geary J, Thuraisundaram D, Branson K, Chakrabarti S, Mahendra P, Craddock C, Parker A, Hunter A, Hale G, Waldmann H, Williams CD, Yong K, Linch DC, Goldstone AH, Mackinnon S. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):1071-8. doi: 10.1182/blood.v99.3.1071. PMID: 11807015.

Chen C, Rowell EA, Thomas RM, Hancock WW, Wells AD. Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J Biol Chem*. 2006 Dec 1;281(48):36828-34. doi: 10.1074/jbc.M608848200. Epub 2006 Oct 6. PMID: 17028180.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1875-86. doi: 10.1084/jem.20030152. PMID: 14676299; PMCID: PMC2194145.

Chen W, Konkel JE. TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells. *J Mol Cell Biol*. 2010 Feb;2(1):30-6. doi: 10.1093/jmcb/mjp004. Epub 2009 Jul 31. PMID: 19648226; PMCID: PMC2905060.

Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3804-13. doi: 10.1182/blood-2007-05-091074. Epub 2007 Aug 10. PMID: 17693581; PMCID: PMC2077325.

Choi SW, Levine JE, Ferrara JL. Pathogenesis and management of graft-versus-host disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010 Feb;30(1):75-101. doi: 10.1016/j.iac.2009.10.001. PMID: 20113888; PMCID: PMC4141413.

Choi SW, Reddy P. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Sep;11(9):536-47. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.102. Epub 2014 Jun 24. PMID: 24958183; PMCID: PMC4151470.

Clark FJ, Gregg R, Piper K, Dunnion D, Freeman L, Griffiths M, Begum G, Mahendra P, Craddock C, Moss P, Chakraverty R. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2410-6. doi: 10.1182/blood-2003-06-2073. Epub 2003 Nov 6. PMID: 14604970.

Clark M, Cooke A. Regulation unmasked by activation. *Nat Immunol*. 2013 Jul;14(7):696-7. doi: 10.1038/ni.2646. PMID: 23778805.

Codarri L, Vallotton L, Ciuffreda D, Venetz JP, Garcia M, Hadaya K, Buhler L, Rotman S, Pascual M, Pantaleo G. Expansion and tissue infiltration of an allospecific CD4+CD25+CD45RO+IL-7Ralphahigh cell population in solid organ transplant recipients. *J Exp Med*. 2007 Jul 9;204(7):1533-41. doi: 10.1084/jem.20062120. Epub 2007 Jun 25. PMID: 17591854; PMCID: PMC2118630.

Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, Finkelstein D, Forbes K, Workman CJ, Brown SA, Rehg JE, Jones ML, Ni HT, Artis D, Turk MJ, Vignali DA. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*. 2010 Dec;11(12):1093-101. doi: 10.1038/ni.1952. Epub 2010 Oct 17. PMID: 20953201; PMCID: PMC3008395.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007 Nov 22;450(7169):566-9. doi: 10.1038/nature06306. PMID: 18033300.

Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2007 Apr;7(4):255-66. doi: 10.1038/nri2056. PMID: 17380156.

Cuende J, Liénart S, Dedobbeleer O, van der Woning B, De Boeck G, Stockis J, Huygens C, Colau D, Somja J, Delvenne P, Hannon M, Baron F, Dumoutier L, Renauld JC, De Haard H, Saunders M, Coulie PG, Lucas S. Monoclonal antibodies against GARP/TGF- β 1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo. *Sci Transl Med*. 2015 Apr 22;7(284):284ra56. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa1983. PMID: 25904740.

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009 May;30(5):626-35. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.002. PMID: 19464985.

Cutler C, Logan B, Nakamura R, Johnston L, Choi S, Porter D, Hogan WJ, Pasquini M, MacMillan ML, Hsu JW, Waller EK, Grupp S, McCarthy P, Wu J, Hu ZH, Carter SL, Horowitz MM, Antin JH. Tacrolimus/sirolimus vs tacrolimus/methotrexate as GVHD prophylaxis after matched, related donor allogeneic HCT. *Blood*. 2014 Aug 21;124(8):1372-7. doi: 10.1182/blood-2014-04-567164. Epub 2014 Jun 30. PMID: 24982504; PMCID: PMC4141519.

D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1152-9. doi: 10.1038/ni1264. Epub 2005 Oct 16. PMID: 16227983.

Davidson TS, Shevach EM. Polyclonal Treg cells modulate T effector cell trafficking. *Eur J Immunol*. 2011 Oct;41(10):2862-70. doi: 10.1002/eji.201141503. Epub 2011 Aug 30. PMID: 21728170; PMCID: PMC3813905.

de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 2004 Sep;34(9):2480-8. doi: 10.1002/eji.200425274. PMID: 15307180.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1257-65. doi: 10.1084/jem.20062512. Epub 2007 May 14. PMID: 17502665; PMCID: PMC2118603.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul 6;343(1):37-49. doi: 10.1056/NEJM200007063430107. PMID: 10882768.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul 13;343(2):108-17. doi: 10.1056/NEJM200007133430207. PMID: 10891520.

Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Del Papa B, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y, Velardi A, Aversa F, Martelli MF. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3921-8. doi: 10.1182/blood-2010-10-311894. Epub 2011 Feb 3. PMID: 21292771.

Dickinson AM, Norden J, Li S, Hromadnikova I, Schmid C, Schmetzer H, Jochem-Kolb H. Graft-versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for

Leukemia. *Front Immunol.* 2017 Jun 7;8:496. doi: 10.3389/fimmu.2017.00496. PMID: 28638379; PMCID: PMC5461268.

Diep DB, Nelson KL, Raja SM, Pleshak EN, Buckley JT. Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem.* 1998 Jan 23;273(4):2355-60. doi: 10.1074/jbc.273.4.2355. PMID: 9442081.

Dong S, Maiella S, Xhaard A, Pang Y, Wenandy L, Larghero J, Becavin C, Benecke A, Bianchi E, Socié G, Rogge L. Multiparameter single-cell profiling of human CD4+FOXP3+ regulatory T-cell populations in homeostatic conditions and during graft-versus-host disease. *Blood.* 2013 Sep 5;122(10):1802-12. doi: 10.1182/blood-2013-02-482539. Epub 2013 Jul 1. PMID: 23818545.

Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med.* 2003 Sep;9(9):1144-50. doi: 10.1038/nm915. Epub 2003 Aug 17. PMID: 12925844.

Edinger, M. and P. Hoffmann. "Natural CD4 + CD25 + FOXP3 + regulatory T cells in graft-versus-host disease." 2013. *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416004-0.00012-4>

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* 2004 May 1;172(9):5149-53. doi: 10.4049/jimmunol.172.9.5149. PMID: 15100250.

Ferenčík, M. *Kompedium der Immunologie*. 1. Auflage. Wien: Springer, 2006, S. 57 ff.

Ferrara JL, Cooke KR, Deeg HJ (eds) *Graft-vs.-host disease*. Marcel Dekker, New York, 2005

Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009 May 2;373(9674):1550-61. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60237-3. Epub 2009 Mar 11. PMID: 19282026; PMCID: PMC2735047.

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME. 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. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005 Dec;11(12):945-56. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.09.004. PMID: 16338616.

Finazzi MC, Boschini C, Craddock C, Rambaldi A, Ward J, Malladi RK. Characteristics of graft-versus-host disease occurring after alemtuzumab-containing allogeneic stem cell transplants: incidence, organ involvement, risk factors and survival. *Br J Haematol.* 2020 Feb;188(4):550-559. doi: 10.1111/bjh.16200. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31713861.

Fisson S, Darrasse-Jèze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL. Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med*. 2003 Sep 1;198(5):737-46. doi: 10.1084/jem.20030686. Epub 2003 Aug 25. PMID: 12939344; PMCID: PMC2194185.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6. doi: 10.1038/ni904. Epub 2003 Mar 3. PMID: 12612578.

Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, Silberstein L, Putheti P, Larocca R, Gao W, Saito TI, Lo Celso C, Tsuyuzaki H, Sato T, Côté D, Sykes M, Strom TB, Scadden DT, Lin CP. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature*. 2011 Jun 8;474(7350):216-9. doi: 10.1038/nature10160. PMID: 21654805; PMCID: PMC3725645.

Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol*. 2003 Jul;15(4):430-5. doi: 10.1097/00002281-200307000-00010. PMID: 12819471.

Garland RJ, Groves SJ, Diamanti P, West SE, Winship KL, Virgo PF, Robinson SP, Oakhill A, Cornish JM, Pamphilon DH, Marks DI, Goulden NJ, Steward CG. Early emergence of PNH-like T cells after allogeneic stem cell transplants utilising CAMPATH-1H for T cell depletion. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Aug;36(3):237-44. doi: 10.1038/sj.bmt.1705049. PMID: 15968291.

Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970 May;18(5):723-37. PMID: 4911896; PMCID: PMC1455602.

Gilleece MH, Dexter TM. Effect of Campath-1H antibody on human hematopoietic progenitors in vitro. *Blood*. 1993 Aug 1;82(3):807-12. PMID: 7687895.

Giralt S, Bishop MR. Principles and overview of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Treat Res*. 2009;144:1-21. doi: 10.1007/978-0-387-78580-6_1. PMID: 19779888; PMCID: PMC6953421.

Giralt S, Hester J, Huh Y, Hirsch-Ginsberg C, Rondón G, Seong D, Lee M, Gajewski J, Van Besien K, Khouri I, Mehra R, Przepiorka D, Körbling M, Talpaz M, Kantarjian H, Fischer H, Deisseroth A, Champlin R. CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1995 Dec 1;86(11):4337-43. PMID: 7492795.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct;18(4):295-304. doi: 10.1097/00007890-197410000-00001. PMID: 4153799.

Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol*. 1996 Feb;8(1):75-81. doi: 10.1016/s0952-7915(96)80108-7. PMID: 8729449.

Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshimi A, Szer J, Lipton J, Schwendener A, Gratwohl M, Frauendorfer K, Niederwieser D, Horowitz M, Kodera Y; Worldwide Network of Blood and Marrow Transplantation. Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. *JAMA*. 2010 Apr 28;303(16):1617-24. doi: 10.1001/jama.2010.491. PMID: 20424252; PMCID: PMC3219875.

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):589-601. doi: 10.1016/j.immuni.2004.09.002. PMID: 15485635.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):737-42. doi: 10.1038/39614. PMID: 9338786.

Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014 Jul 17;124(3):344-53. doi: 10.1182/blood-2014-02-514778. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24914142; PMCID: PMC4102707.

Hale G, Cobbold S, Waldmann H. T cell depletion with CAMPATH-1 in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1988 Apr;45(4):753-9. doi: 10.1097/00007890-198804000-00018. PMID: 3282358.

Hamilton BK, Rybicki L, Dean R, Majhail NS, Haddad H, Abounader D, Hanna R, Sobecks R, Duong H, Hill BT, Copelan E, Bolwell B, Kalaycio M. Cyclosporine in combination with mycophenolate mofetil versus methotrexate for graft versus host disease prevention in myeloablative HLA-identical sibling donor allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol*. 2015 Feb;90(2):144-8. doi: 10.1002/ajh.23882. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25353395.

Hanash AM, Levy RB. Donor CD4⁺CD25⁺ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1828-36. doi: 10.1182/blood-2004-08-3213. Epub 2004 Oct 19. PMID: 15494429.

Hansen JA, Yamamoto K, Petersdorf E, Sasazuki T. The role of HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Rev Immunogenet*. 1999;1(3):359-73. PMID: 11256427.

Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, Chanswangphuwana C, Efebera YA, Holler E, Litzow M, Ordemann R, Qayed M, Renteria AS, Reshef R, Wölfl M, Chen YB, Goldstein S, Jagasia M, Locatelli F, Mielke S, Porter D, Schechter T, Shekhovtsova Z, Ferrara JL, Levine JE. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jan;22(1):4-10. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.001. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26386318; PMCID: PMC4706482.

Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4⁺ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods*. 2007 Jan 30;319(1-2):41-52. doi: 10.1016/j.jim.2006.10.008. Epub 2006 Nov 3. PMID: 17173927.

Havari E, Turner MJ, Campos-Rivera J, Shankara S, Nguyen TH, Roberts B, Siders W, Kaplan JM. Impact of alemtuzumab treatment on the survival and function of human regulatory T cells in vitro. *Immunology*. 2014 Jan;141(1):123-31. doi: 10.1111/imm.12178. PMID: 24116901; PMCID: PMC3893855.

Hawkins ED, Hommel M, Turner ML, Battye FL, Markham JF, Hodgkin PD. Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2057-67. doi: 10.1038/nprot.2007.297. PMID: 17853861.

Herold G. Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold; 2020.

Hertenstein B, Wagner B, Bunjes D, Duncker C, Raghavachar A, Arnold R, Heimpel H, Schrezenmeier H. Emergence of CD52-, phosphatidylinositolglycan-anchor-deficient T lymphocytes after in vivo application of Campath-1H for refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 1995 Aug 15;86(4):1487-92. PMID: 7632956.

Higman MA, Vogelsang GB. Chronic graft versus host disease. *Br J Haematol*. 2004 May;125(4):435-54. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04945.x. PMID: 15142114.

Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*. 1997 Oct 15;90(8):3204-13. PMID: 9376604.

Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000 May 1;95(9):2754-9. PMID: 10779417.

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 Dec 1;98(12):3192-204. doi: 10.1182/blood.v98.12.3192. PMID: 11719354.

Hoffmann HJ, Malling TM, Topcu A, Ryder LP, Nielsen KR, Varming K, Dahl R, Omland O, Sigsgaard T. CD4dimCD25bright Treg cell frequencies above a standardized gating threshold are similar in asthmatics and controls. *Cytometry A*. 2007 Jun;71(6):371-8. doi: 10.1002/cyto.a.20389. PMID: 17458883.

Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Piseshka B, Dada A, Niemand C, Assenmacher M, Orsó E, Andreesen R, Holler E, Edinger M. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Mar;12(3):267-74. doi: 10.1016/j.bbmt.2006.01.005. PMID: 16503495.

Hoffmann P, Edinger M. CD4+CD25+ regulatory T cells and graft-versus-host disease. *Semin Hematol*. 2006 Jan;43(1):62-9. doi: 10.1053/j.seminhematol.2005.09.006. PMID: 16412790.

Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, Rajnavolgyi E, Muegge K, Durum SK. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1999 Mar;10(1):41-60. doi: 10.1016/s1359-6101(98)00025-2. PMID: 10379911.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61. doi: 10.1126/science.1079490. Epub 2003 Jan 9. PMID: 12522256.

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990 Feb 1;75(3):555-62. PMID: 2297567.

Hsieh CS, Lee HM, Lio CW. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2012 Feb 10;12(3):157-67. doi: 10.1038/nri3155. PMID: 22322317.

Hu Y, Turner MJ, Shields J, Gale MS, Hutto E, Roberts BL, Siders WM, Kaplan JM. Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. *Immunology*. 2009 Oct;128(2):260-70. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03115.x. PMID: 19740383; PMCID: PMC2767316.

Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor W Jr, Huber FJ, Chaudhry A, Kamanaka M, Kobayashi Y, Booth CJ, Rudensky AY, Roncarolo MG, Battaglia M, Flavell RA. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*. 2011 Apr 22;34(4):554-65. doi: 10.1016/j.immuni.2011.01.020. PMID: 21511184; PMCID: PMC3113617.

human CD4⁺ Treg cells. *J Exp Med*. 2006, 203:1701-1711.

Jagasia M, Arora M, Flowers ME, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, Urbano-Ispizua A, Pavletic SZ, Haagenson MD, Zhang MJ, Antin JH, Bolwell BJ, Bredeson C, Cahn JY, Cairo M, Gale RP, Gupta V, Lee SJ, Litzow M, Weisdorf DJ, Horowitz MM, Hahn T. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):296-307. doi: 10.1182/blood-2011-06-364265. Epub 2011 Oct 18. PMID: 22010102; PMCID: PMC3251233.

Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4216-21. doi: 10.1182/blood-2004-01-0005. Epub 2004 Feb 19. PMID: 14976053; PMCID: PMC2516529.

Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531-64. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623. Epub 2012 Jan 6. PMID: 22224781; PMCID: PMC6066374.

Juric MK, Ghimire S, Ogonek J, Weissinger EM, Holler E, van Rood JJ, Oudshoorn M, Dickinson A, Greinix HT. Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Front Immunol*. 2016 Nov 9;7:470. doi: 10.3389/fimmu.2016.00470. PMID: 27881982; PMCID: PMC5101209.

Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* 2016 Nov;37(11):803-811. doi: 10.1016/j.it.2016.08.012. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27623114.

Kaye J, Kersh G, Engel I, Hedrick SM. Structure and specificity of the T cell antigen receptor. *Semin Immunol.* 1991 Sep;3(5):269-81. PMID: 1724735.

Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood.* 1986 Sep;68(3):770-3. PMID: 3527302.

Kersh GJ, Miley MJ, Nelson CA, Grakoui A, Horvath S, Donermeyer DL, Kappler J, Allen PM, Fremont DH. Structural and functional consequences of altering a peptide MHC anchor residue. *J Immunol.* 2001 Mar 1;166(5):3345-54. doi: 10.4049/jimmunol.166.5.3345. PMID: 11207290.

Kharfan-Dabaja M, Mhaskar R, Reljic T, Pidala J, Perkins JB, Djulbegovic B, Kumar A. Mycophenolate mofetil versus methotrexate for prevention of graft-versus-host disease in people receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Jul 25;(7):CD010280. doi: 10.1002/14651858.CD010280.pub2. PMID: 25061777.

Khatttri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):337-42. doi: 10.1038/ni909. Epub 2003 Mar 3. PMID: 12612581.

Klabusay M, Sukova V, Coupek P, Brychtova Y, Mayer J. Different levels of CD52 antigen expression evaluated by quantitative fluorescence cytometry are detected on B-lymphocytes, CD 34+ cells and tumor cells of patients with chronic B-cell lymphoproliferative diseases. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007 Sep;72(5):363-70. doi: 10.1002/cyto.b.20181. PMID: 17428002.

Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol.* 2006 Nov 15;177(10):6780-6. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.6780. PMID: 17082591.

Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood.* 2008 Dec 1;112(12):4371-83. doi: 10.1182/blood-2008-03-077974. PMID: 19029455.

Korngold R, Sprent J. Surface markers of T cells causing lethal graft-vs-host disease to class I vs class II H-2 differences. *J Immunol.* 1985 Nov;135(5):3004-10. PMID: 3876371.

Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, Chakraverty RK, Chakrabarti S, Robinson S, Peggs K, Verfuere S, Pettengell R, Marsh JC, Schey S, Mahendra P, Morgan GJ, Hale G, Waldmann H, de Elvira MC, Williams CD, Devereux S, Linch DC, Goldstone AH, Mackinnon S. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood.* 2000 Oct 1;96(7):2419-25. PMID: 11001893.

Kouka, A (2016) Bedeutung der GPI-Anker für die EBV-spezifische T-Zellantwort nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation [Dissertation]. Mainz: Fachbereich Medizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz; <http://d-nb.info/1130817431>

Koyama M, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Wilson YA, Don AL, Lineburg KE, Cheong M, Robb RJ, Markey KA, Varelias A, Malissen B, Hämmerling GJ, Clouston AD, Engwerda CR, Bhat P, MacDonald KP, Hill GR. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2011 Nov 29;18(1):135-42. doi: 10.1038/nm.2597. PMID: 22127134.

Kreisel W, Dahlberg M, Bertz H, Harder J, Potthoff K, Deibert P, Schmitt-Graeff A, Finke J. Endoscopic diagnosis of acute intestinal GVHD following allogeneic hematopoietic SCT: a retrospective analysis in 175 patients. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Mar;47(3):430-8. doi: 10.1038/bmt.2011.137. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21706064; PMCID: PMC3296915.

Krenger W, Blazar BR, Holländer GA. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2011 Jun 23;117(25):6768-76. doi: 10.1182/blood-2011-02-334623. Epub 2011 Mar 22. PMID: 21427289; PMCID: PMC3128475.

Kuçi Z, Bönig H, Kreyenberg H, Bunos M, Jauch A, Janssen JW, Škifić M, Michel K, Eising B, Lucchini G, Bakhtiar S, Greil J, Lang P, Basu O, von Luetlichau I, Schulz A, Sykora KW, Jarisch A, Soerensen J, Salzmann-Manrique E, Seifried E, Klingebiel T, Bader P, Kuçi S. 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 Aug;101(8):985-94. doi: 10.3324/haematol.2015.140368. Epub 2016 May 12. PMID: 27175026; PMCID: PMC4967578.

Lai YR, Chen YH, Hu DM, Jiang M, Liu QF, Liu L, Hou J, Schwarzenberger P, Li QC, Zhang ZM, Liu KY, Huang XJ. 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). *J Hematol Oncol*. 2014 Aug 21;7:59. doi: 10.1186/s13045-014-0059-3. PMID: 25139202; PMCID: PMC4237802.

Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003 Apr;9(4):215-33. doi: 10.1053/bbmt.2003.50026. PMID: 12720215.

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. *Transplant Proc*. 1974 Dec;6(4):367-71. PMID: 4155153.

Levine AG, Mendoza A, Hemmers S, Moltedo B, Niec RE, Schizas M, Hoyos BE, Putintseva EV, Chaudhry A, Dikiy S, Fujisawa S, Chudakov DM, Treuting PM, Rudensky AY. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature*. 2017 Jun 15;546(7658):421-425. doi: 10.1038/nature22360. Epub 2017 Jun 7. Erratum in: *Nature*. 2017 Sep 20;; PMID: 28607488; PMCID: PMC5482236.

Li Q, Zhai Z, Xu X, Shen Y, Zhang A, Sun Z, Liu H, Geng L, Wang Y. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res.* 2010 Sep;34(9):1158-68. doi: 10.1016/j.leukres.2010.03.017. Epub 2010 Apr 20. PMID: 20409584.

Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S, Tybulewicz V, Vignali D, Clynes R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol.* 2008 May 1;180(9):5916-26. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5916. PMID: 18424711.

Liesveld JL, Rothberg PG. Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? *Bone Marrow Transplant.* 2008 Sep;42(5):297-310. doi: 10.1038/bmt.2008.212. Epub 2008 Jul 28. PMID: 18660844.

Lima M. Laboratory studies for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, with emphasis on flow cytometry. *Pract Lab Med.* 2020 Mar 10;20:e00158. doi: 10.1016/j.plabm.2020.e00158. PMID: 32195308; PMCID: PMC7078534.

Linhares YP, Pavletic S, Gale RP. Chronic GVHD: Where are we? Where do we want to be? Will immunomodulatory drugs help? *Bone Marrow Transplant.* 2013 Feb;48(2):203-9. doi: 10.1038/bmt.2012.76. Epub 2012 May 14. PMID: 22580766.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* 2006 Jul 10;203(7):1701-11. doi: 10.1084/jem.20060772. Epub 2006 Jul 3. PMID: 16818678; PMCID: PMC2118339.

Loeff FC, Falkenburg JHF, Hageman L, Huisman W, Veld SAJ, van Egmond HME, van de Meent M, von dem Borne PA, Veelken H, Halkes CJM, Jedema I. High Mutation Frequency of the PIGA Gene in T Cells Results in Reconstitution of GPI Anchor-/CD52- T Cells That Can Give Early Immune Protection after Alemtuzumab-Based T Cell-Depleted Allogeneic Stem Cell Transplantation. *J Immunol.* 2018 Mar 15;200(6):2199-2208. doi: 10.4049/jimmunol.1701018. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29427418.

MacMillan ML, DeFor TE, Weisdorf DJ. The best endpoint for acute GVHD treatment trials. *Blood.* 2010 Jul 1;115(26):5412-7. doi: 10.1182/blood-2009-12-258442. Epub 2010 Apr 13. PMID: 20388871.

Magenau JM, Qin X, Tawara I, Rogers CE, Kitko C, Schlough M, Bickley D, Braun TM, Jang PS, Lowler KP, Jones DM, Choi SW, Reddy P, Mineishi S, Levine JE, Ferrara JL, Paczesny S. Frequency of CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Jul;16(7):907-14. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.02.026. Epub 2010 Mar 17. PMID: 20302964; PMCID: PMC2916071.

Maris MB, Niederwieser D, Sandmaier BM, Storer B, Stuart M, Maloney D, Petersdorf E, McSweeney P, Pulsipher M, Woolfrey A, Chauncey T, Agura E, Heimfeld S, Slattery J, Hegenbart U, Anasetti C, Blume K, Storb R. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2003 Sep 15;102(6):2021-30. doi: 10.1182/blood-2003-02-0482. Epub 2003 Jun 5. PMID: 12791654.

Martin PJ, Bachier CR, Klingemann HG, McCarthy PL, Szabolcs P, Uberti JP, Schuster MW, Weisdorf D, Chao NJ, Kebriaei P, Shpall EJ, Macmillan ML, Soiffer RJ. Endpoints for clinical trials testing treatment of acute graft-versus-host disease: a joint statement. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Jul;15(7):777-84. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.03.012. Epub 2009 May 13. PMID: 19539208; PMCID: PMC2814363.

Martin PJ, Gooley T, Anasetti C, Petersdorf EW, Hansen JA. HLAs and risk of acute graft-vs.-host disease after marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1998;4(3):128-33. doi: 10.1053/bbmt.1998.v4.pm9923410. PMID: 9923410.

Mason D. Some quantitative aspects of T-cell repertoire selection: the requirement for regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2001 Aug;182:80-8. doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1820106.x. PMID: 11722625.

Meyer RG, Britten CM, Wehler D, Bender K, Hess G, Konur A, Hartwig UF, Wehler TC, Ullmann AJ, Gentilini C, Uharek L, Huber C, Kolbe K, Herr W. Prophylactic transfer of CD8-depleted donor lymphocytes after T-cell-depleted reduced-intensity transplantation. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):374-82. doi: 10.1182/blood-2006-03-005769. Epub 2006 Aug 29. PMID: 16940425.

Meyer RG, Wagner EM, Konur A, Bender K, Schmitt T, Hemmerling J, Wehler D, Hartwig UF, Roosnek E, Huber C, Kolbe K, Herr W. Donor CD4 T cells convert mixed to full donor T-cell chimerism and replenish the CD52-positive T-cell pool after alemtuzumab-based T-cell-depleted allo-transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Apr;45(4):668-74. doi: 10.1038/bmt.2009.212. Epub 2009 Aug 17. PMID: 19684624.

Mielcarek M, Burroughs L, Leisenring W, Diaconescu R, Martin PJ, Sandmaier BM, Maloney DG, Maris MB, Chauncey TR, Shizuru JA, Blume KG, Hegenbart U, Niederwieser D, Forman S, Bruno B, Woolfrey A, Storb R. Prognostic relevance of 'early-onset' graft-versus-host disease following non-myeloablative haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 2005 May;129(3):381-91. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05458.x. PMID: 15842663.

Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers ME, Maloney DG, Sandmaier BM, Maris MB, Storb R. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):756-62. doi: 10.1182/blood-2002-08-2628. Epub 2003 Mar 27. PMID: 12663454.

Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Phelps ML, Shin T, Matsui EC, Matsui WH, Arai S, Fuchs EJ, Vogelsang GB, Jones RJ, Hess AD. Association of Foxp3 regulatory gene expression with

graft-versus-host disease. *Blood*. 2004 Oct 1;104(7):2187-93. doi: 10.1182/blood-2004-03-1040. Epub 2004 Jun 1. PMID: 15172973.

Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. 2007 Mar;13(3):108-16. doi: 10.1016/j.molmed.2007.01.003. Epub 2007 Jan 24. PMID: 17257897.

Monteiro, M., Agua-Doce, A., Azevedo, R.I., Lacerda, J., & Graça, L. (2016). Regulatory T Cells: Translational Immunology: Mechanisms and Pharmacologic Approaches. In: Seng-Lai Tan, Translational Immunology, Academic Press, Pages 205-246, ISBN 9780128015773, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801577-3.00009-5>.

Morris EC, Rebello P, Thomson KJ, Peggs KS, Kyriakou C, Goldstone AH, Mackinnon S, Hale G. 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 Jul 1;102(1):404-6. doi: 10.1182/blood-2002-09-2687. Epub 2003 Mar 6. PMID: 12623851.

Morris ES, Hill GR. Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2007 Apr;137(1):3-19. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06510.x. PMID: 17359368.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73. doi: 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045. PMID: 2523712.

Murphy K, Travers P, Walport M (2018) Janeway C. Janeway's immunobiology. 9th ed. New York: Garland Science; 3

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 2001 Sep 3;194(5):629-44. doi: 10.1084/jem.194.5.629. PMID: 11535631; PMCID: PMC2195935.

Neumann, J. Immunbiologie - Eine Einführung. 1. Auflage. Heidelberg: Springer Verlag, 2008, S. 1 ff.

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). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Dec;19(12):1753-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.10.001. Epub 2013 Oct 9. PMID: 24120379.

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 Feb 27;67(4):620-6. doi: 10.1097/00007890-199902270-00022. PMID: 10071037.

Ollendorff V, Noguchi T, deLapeyriere O, Birnbaum D. The GARP gene encodes a new member of the family of leucine-rich repeat-containing proteins. *Cell Growth Differ*. 1994 Feb;5(2):213-9. PMID: 8180135.

Pabst C, Schirutschke H, Ehninger G, Bornhäuser M, Platzbecker U. The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR+ and CD4+foxp3+ predicts the risk of acute graft versus host disease after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors. *Clin Cancer Res.* 2007 May 15;13(10):2916-22. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2602. PMID: 17504991.

Pandiyar P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1353-62. doi: 10.1038/ni1536. Epub 2007 Nov 4. PMID: 17982458.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 2001 Jun 2;357(9270):1777-89. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7. PMID: 11403834.

Pastore D, Delia M, Mestice A, Carluccio P, Perrone T, Gaudio F, Curci P, Rossi AR, Ricco A, Specchia G. CD3+/Tregs ratio in donor grafts is linked to acute graft-versus-host disease and immunologic recovery after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Jun;18(6):887-93. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.10.039. Epub 2011 Nov 4. PMID: 22062803.

Patriarca F, Skert C, Sperotto A, Zaja F, Falletti E, Mestroni R, Kikic F, Calistri E, Fili C, Geromin A, Cerno M, Fanin R. The development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graft-vs-host disease and immune recovery. *Exp Hematol.* 2006 Mar;34(3):389-96. doi: 10.1016/j.exphem.2005.12.011. PMID: 16543073.

Pérez-Simón JA, Kottaridis PD, Martino R, Craddock C, Caballero D, Chopra R, García-Conde J, Milligan DW, Schey S, Urbano-Ispizua A, Parker A, Leon A, Yong K, Sureda A, Hunter A, Sierra J, Goldstone AH, Linch DC, San Miguel JF, Mackinnon S; Spanish and United Kingdom Collaborative Groups for Nonmyeloablative Transplantation. Nonmyeloablative transplantation with or without alemtuzumab: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood.* 2002 Nov 1;100(9):3121-7. doi: 10.1182/blood-2002-03-0701. PMID: 12384408.

Perkins J, Field T, Kim J, Kharfan-Dabaja MA, Fernandez H, Ayala E, Perez L, Xu M, Alsina M, Ochoa L, Sullivan D, Janssen W, Anasetti C. A randomized phase II trial comparing tacrolimus and mycophenolate mofetil to tacrolimus and methotrexate for acute graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Jul;16(7):937-47. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.01.010. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20102746.

Pidala J. Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Control.* 2011 Oct;18(4):268-76. doi: 10.1177/107327481101800407. PMID: 21976245.

Possinger K, **Regierer AC**. *Facharzt Hämatologie Onkologie.* 2. Aufl. Munich: Urban & Fischer; 2012.

Probst-Kepper M, Geffers R, Kröger A, Viegas N, Erck C, Hecht HJ, Lünsdorf H, Roubin R, Moharregh-Khiabani D, Wagner K, Ocklenburg F, Jeron A, Garritsen H, Arstila TP, Kekäläinen E, Balling R, Hauser H, Buer J, Weiss S. GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human

regulatory T cells. *J Cell Mol Med*. 2009 Sep;13(9B):3343-57. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00782.x. Epub 2009 May 13. PMID: 19453521; PMCID: PMC4516490.

Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995 Jun;15(6):825-8. PMID: 7581076.

Ramachandran V, Kolli SS, Strowd LC. Review of Graft-Versus-Host Disease. *Dermatol Clin*. 2019 Oct;37(4):569-582. doi: 10.1016/j.det.2019.05.014. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31466596.

Rawstron AC, Rollinson SJ, Richards S, Short MA, English A, Morgan GJ, Hale G, Hillmen P. The PNH phenotype cells that emerge in most patients after CAMPATH-1H therapy are present prior to treatment. *Br J Haematol*. 1999 Oct;107(1):148-53. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01676.x. PMID: 10520035.

Razi N, Varki A. Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation. *Glycobiology*. 1999 Nov;9(11):1225-34. doi: 10.1093/glycob/9.11.1225. PMID: 10536038.

Rebello P, Hale G. Pharmacokinetics of CAMPATH-1H: assay development and validation. *J Immunol Methods*. 2002 Feb 1;260(1-2):285-302. doi: 10.1016/s0022-1759(01)00556-7. PMID: 11792397.

Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, Keyvanfar K, Montero A, Hensel N, Kurlander R, Barrett AJ. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1291-7. doi: 10.1182/blood-2006-02-003996. Epub 2006 Apr 20. PMID: 16627754; PMCID: PMC1895877.

Roemhild A, Otto NM, Moll G, Abou-El-Enein M, Kaiser D, Bold G, Schachtner T, Choi M, Oellinger R, Landwehr-Kenzel S, Juerchott K, Sawitzki B, Giesler C, Seifried A, Beier C, Wagner DL, Schlickeiser S, Streitz M, Schmuck-Henneresse M, Amini L, Stervbo U, Babel N, Volk HD, Reinke P. Regulatory T cells for minimising immune suppression in kidney transplantation: phase I/IIa clinical trial. *BMJ*. 2020 Oct 21;371:m3734. doi: 10.1136/bmj.m3734. PMID: 33087345; PMCID: PMC7576328.

Roubin R, Pizette S, Ollendorff V, Planche J, Birnbaum D, Delapeyriere O. Structure and developmental expression of mouse Garp, a gene encoding a new leucine-rich repeat-containing protein. *Int J Dev Biol*. 1996 Jun;40(3):545-55. PMID: 8840187.

Roux E, Helg C, Dumont-Girard F, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood*. 1996 May 1;87(9):3984-92. PMID: 8611731.

Rowan WC, Hale G, Tite JP, Brett SJ. Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) triggers activation of normal human T lymphocytes. *Int Immunol*. 1995 Jan;7(1):69-77. doi: 10.1093/intimm/7.1.69. PMID: 7718516.

Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR Jr, Muller W, Rudensky AY. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):546-58. doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.017. PMID: 18387831.

Sabry W, Le Blanc R, Labbé AC, Sauvageau G, Couban S, Kiss T, Busque L, Cohen S, Lachance S, Roy DC, Roy J. 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. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Aug;15(8):919-29. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.04.004. Epub 2009 Jun 10. PMID: 19589481.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):490-500. doi: 10.1038/nri2785. Epub 2010 Jun 18. PMID: 20559327.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006 Aug;212:8-27. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x. PMID: 16903903.

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. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64. PMID: 7636184.

Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37 Suppl 1:S116-23. doi: 10.1002/eji.200737593. PMID: 17972355.

Sakaguchi S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol*. 2011;707:3-17. doi: 10.1007/978-1-61737-979-6_1. PMID: 21287325.

Sanchez J, Casaño J, Alvarez MA, Roman-Gomez J, Martin C, Martinez F, Gomez P, Serrano J, Herrera C, Torres A. Kinetic of regulatory CD25^{high} and activated CD134⁺ (OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol*. 2004 Sep;126(5):697-703. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05108.x. PMID: 15327522.

Sangiolo D, Storb R, Deeg HJ, Flowers ME, Martin PJ, Sandmaier BM, Kiem HP, Nash RA, Doney K, Leisenring WM, Georges GE. Outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation from HLA-identical siblings for severe aplastic anemia in patients over 40 years of age. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Oct;16(10):1411-8. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.04.005. Epub 2010 Apr 18. PMID: 20403449; PMCID: PMC2934906.

Schaier M, Seissler N, Schmitt E, Meuer S, Hug F, Zeier M, Steinborn A. DR(high⁺)CD45RA(-)-Tregs potentially affect the suppressive activity of the total Treg pool in renal transplant

patients. PLoS One. 2012;7(3):e34208. doi: 10.1371/journal.pone.0034208. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22470536; PMCID: PMC3314602.

Schmidt SV, Nino-Castro AC, Schultze JL. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. Front Immunol. 2012 Sep 4;3:274. doi: 10.3389/fimmu.2012.00274. PMID: 22969767; PMCID: PMC3432880.

Schmidt-Hieber M, Schwarck S, Stroux A, Ganepola S, Reinke P, Thiel E, Uharek L, Blau IW. Immune reconstitution and cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation: the important impact of in vivo T cell depletion. Int J Hematol. 2010 Jun;91(5):877-85. doi: 10.1007/s12185-010-0597-6. Epub 2010 May 21. PMID: 20490728.

Schneiderman J. Extracorporeal photopheresis: cellular therapy for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2017 Dec 8;2017(1):639-644. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.639. PMID: 29222315; PMCID: PMC6142534.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. J Exp Med. 2006 Jul 10;203(7):1693-700. doi: 10.1084/jem.20060468. Epub 2006 Jul 3. PMID: 16818676; PMCID: PMC2118333.

Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. Science. 1999 Jul 16;285(5426):412-5. doi: 10.1126/science.285.5426.412. PMID: 10411505.

Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, Hackman R, Tsoi MS, Storb R, Thomas ED. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. Am J Med. 1980 Aug;69(2):204-17. doi: 10.1016/0002-9343(80)90380-0. PMID: 6996481.

Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. Blood. 1998 Feb 1;91(3):756-63. PMID: 9446633.

Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. Blood. 2014 Jul 17;124(3):374-84. doi: 10.1182/blood-2014-01-514752. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24914139; PMCID: PMC4102710.

Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. Annu Rev Immunol. 2003;21:139-76. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107. Epub 2002 Oct 16. PMID: 12414722.

Storb R, Champlin RE. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. Bone Marrow Transplant. 1991 Aug;8(2):69-72. PMID: 1933061.

Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Farewell V, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med*. 1986 Mar 20;314(12):729-35. doi: 10.1056/NEJM198603203141201. PMID: 3513012.

Su L, Creusot RJ, Gallo EM, Chan SM, Utz PJ, Fathman CG, Ermann J. Murine CD4+CD25+ regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene. *J Immunol*. 2004 Oct 15;173(8):4994-5001. doi: 10.4049/jimmunol.173.8.4994. PMID: 15470042.

Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch Intern Med*. 2002 Jul 22;162(14):1558-66. doi: 10.1001/archinte.162.14.1558. PMID: 12123398.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*. 1998 Dec;10(12):1969-80. doi: 10.1093/intimm/10.12.1969. PMID: 9885918.

Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3493-9. doi: 10.1182/blood.v99.10.3493. PMID: 11986199.

Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med*. 2001 Jun 4;193(11):1311-8. doi: 10.1084/jem.193.11.1311. PMID: 11390438; PMCID: PMC2193378.

Taylor VC, Sims M, Brett S, Field MC. Antibody selection against CD52 produces a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in human lymphocytes by a novel mechanism. *Biochem J*. 1997 Mar 15;322 (Pt 3)(Pt 3):919-25. doi: 10.1042/bj3220919. PMID: 9148769; PMCID: PMC1218275.

Thepot S, Zhou J, Perrot A, Robin M, Xhaard A, de Latour RP, Ades L, Ribaud P, Petropoulou AD, Porcher R, Socié G. The graft-versus-leukemia effect is mainly restricted to NIH-defined chronic graft-versus-host disease after reduced intensity conditioning before allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2010 Nov;24(11):1852-8. doi: 10.1038/leu.2010.187. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20827288.

Thomas ED, Lochte HL, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957 Sep 12;257(11):491-6. doi: 10.1056/NEJM195709122571102. PMID: 13464965.

Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287-96. doi: 10.1084/jem.188.2.287. PMID: 9670041; PMCID: PMC2212461.

Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 11;106(32):13445-50. doi: 10.1073/pnas.0901944106. Epub 2009 Jul 27. PMID: 19651619; PMCID: PMC2726354.

Treleaven J, **Barrett** AJ (2008) Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Clinical Practice Churchill Livingstone, Elsevier, 2009

Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, Cohen JL. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(11):1688-96. doi: 10.1172/JCI17702. PMID: 14660744; PMCID: PMC281639.

Ukena SN, Grosse J, Mischak-Weissinger E, Buchholz S, Stadler M, Ganser A, Franzke A. Acute but not chronic graft-versus-host disease is associated with a reduction of circulating CD4(+)CD25 (high)CD127 (low/-) regulatory T cells. *Ann Hematol*. 2011 Feb;90(2):213-8. doi: 10.1007/s00277-010-1068-0. Epub 2010 Sep 22. PMID: 20859740.

van Bekkum, Dirk Willem; Vries, M. J. de (1967): Radiation chimaeras. London: Logos Press.

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 Aug 11;106(32):13439-44. doi: 10.1073/pnas.0901965106. Epub 2009 Jul 28. PMID: 19666573; PMCID: PMC2726405.

Wang R, Wan Q, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS One*. 2008 Jul 16;3(7):e2705. doi: 10.1371/journal.pone.0002705. PMID: 18628982; PMCID: PMC2442191.

Wang R, Zhu J, Dong X, Shi M, Lu C, Springer TA. GARP regulates the bioavailability and activation of TGFβ. *Mol Biol Cell*. 2012 Mar;23(6):1129-39. doi: 10.1091/mbc.E11-12-1018. Epub 2012 Jan 25. PMID: 22278742; PMCID: PMC3302739.

Watanabe T, Masuyama J, Sohma Y, Inazawa H, Horie K, Kojima K, Uemura Y, Aoki Y, Kaga S, Minota S, Tanaka T, Yamaguchi Y, Kobayashi T, Serizawa I. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells. *Clin Immunol*. 2006 Sep;120(3):247-59. doi: 10.1016/j.clim.2006.05.006. Epub 2006 Jun 22. PMID: 16797237.

Weaver CH, Buckner CD, Longin K, Appelbaum FR, Rowley S, Lilleby K, Miser J, Storb R, Hansen JA, Bensinger W. Syngeneic transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1993 Oct 1;82(7):1981-4. PMID: 7691244.

Wing JB, Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol*. 2012 Jun 29;3:178. doi: 10.3389/fimmu.2012.00178. PMID: 22754556; PMCID: PMC3386489.

Woelfinger P, Epp K, Schaefer L, Kriege D, Theobald M, Bopp T, Wagner-Drouet EM. CD52-negative T cells predict acute graft-versus-host disease after an alemtuzumab-based conditioning regimen. *Br J Haematol*. 2020 Oct;191(2):253-262. doi: 10.1111/bjh.16706. Epub 2020 May 14. PMID: 32410220.

Wolff D, Ayuk F, Elmaagacli A, Bertz H, Lawitschka A, Schleuning M, Meyer RG, Gerbitz A, Hilgendorf I, Hildebrandt GC, Edinger M, Klein S, Halter J, Mousset S, Holler E, Greinix HT. 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. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 May;19(5):767-76. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.01.018. Epub 2013 Jan 29. PMID: 23376495.

Wolff D, Bertz H, Greinix H, Lawitschka A, Halter J, Holler E. The treatment of chronic graft-versus-host disease: consensus recommendations of experts from Germany, Austria, and Switzerland. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Oct;108(43):732-40. doi: 10.3238/arztebl.2011.0732. Epub 2011 Oct 28. PMID: 22114649; PMCID: PMC3221419.

Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood*. 1994 Apr 15;83(8):2360-7. PMID: 8161803.

Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, Yagita H, Tokunaga M, Saito T. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):326-39. doi: 10.1016/j.immuni.2010.09.006. PMID: 20870175.

Young NS, Maciejewski JP, Sloand E, Chen G, Zeng W, Risitano A, Miyazato A. The relationship of aplastic anemia and PNH. *Int J Hematol*. 2002 Aug;76 Suppl 2:168-72. doi: 10.1007/BF03165111. PMID: 12430920.

Zeiser R, Wolff D, Scheid C, Luft T, Greinix H, Dreger P, Finke J, Holler E für die DAG-KBT, Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V.; Onkopedia-Leitlinie, Graft-versus-Host Erkrankung, akut; Version/Stand Januar 2020 (zitiert am 22.10.2021, URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/graft-versus-host-erkrankung-akut/@@guideline/html/index.html>)

Zhang X, Tao Y, Chopra M, Ahn M, Marcus KL, Choudhary N, Zhu H, Markovic-Plese S. Differential reconstitution of T cell subsets following immunodepleting treatment with alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol*. 2013 Dec 15;191(12):5867-74. doi: 10.4049/jimmunol.1301926. Epub 2013 Nov 6. PMID: 24198283.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-89. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212. PMID: 20192806; PMCID: PMC3502616.

Ziemer M, Haeusermann P, Janin A, Massi D, Ziepert M, Wolff D, Greinix H, Hillen U. Histopathological diagnosis of graft-versus-host disease of the skin: an interobserver comparison. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Jul;28(7):915-24. doi: 10.1111/jdv.12215. Epub 2013 Aug 1. PMID: 23906476.

Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, Bellucci R, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, Ritz J. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2903-11. doi: 10.1182/blood-2005-03-1257. Epub 2005 Jun 21. PMID: 15972448; PMCID: PMC1895303.

9. Protokolle

(entsprechen den Standardprotokollen der AG Meyer/Wagner)

9.1 Zellen Zählen

(Standardprotokoll AG Meyer, März 2011)

- Kammer: Fuchs-Rosenthal-Kammer

Vorbereitung:

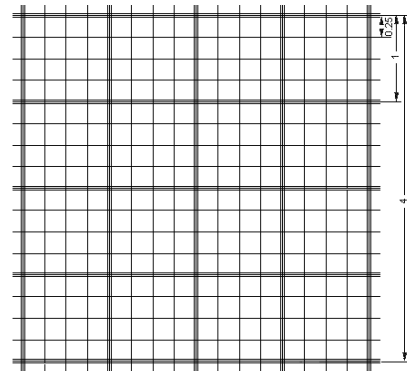
- Deckglas mittels Wasser auf Kammer befestigen
- Newton'schen Ringe müssen zu sehen sein
- Zellmaterial in unsterile Zählplatte geben (mind. 15 µl)

Durchführung: (außerhalb der Flow)

- Zellen mit Trypanblau (cave: toxisch) im Verhältnis 1:2 mischen
- keine Inkubation notwendig, Probe in Kammer füllen, Zellen kurz setzen lassen
- Eines der 16 Quadrate (16 Kleinstquadrate) auszählen
- gezählt werden nur Zellen, die NICHT blau gefärbt sind
- Es kann ebenfalls der %-Anteil der blauen (= toten) Zellen gezählt werden
- Gezählte Zahl $\times 10^4$ = Zellzahl / ml
- Das Volumen, in das die Zellen aufgenommen wurden, multiplizieren
- Folgende Formel gilt: $Z_U = Z_a / F_a \times \text{Kammertiefe(mm)} \times V_U$

- Z_U = Zellen pro ml Untersuchungsmaterial
- Gesamtfläche: 16 mm²
- Z_a = ausgezählte Zellen
- Tiefe: 0,2 mm
- F_a = ausgezählte Fläche [mm²]
- Volumen: 3,2 µl
- V_U = Verdünnung des Untersuchungsmaterials

- Bei hohen Zellzahlen kann zu der 1:2 Verdünnung noch mehr verdünnt werden. Den Faktor muss man aber später bei der Formel berücksichtigen



9.2 Kryokonservierung/ Einfrieren von Zellen

(Standardprotokoll AG Meyer/Wagner, Januar 2016)

Ansetzen des Mediums:

- Pro Nunc wird 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 benötigen 3 ml, mit Überschuss 4 ml, davon sind 10% 400 µl

→ 3,6 ml Einfriermedium + 400 µl DMSO

Durchführung:

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

cave: max. 50×10^6 PBMC in 1 ml wegfrieren

9.3 Auftauen kryokonservierter Zellen

(Standardprotokoll AG Meyer, März 2011)

Medium:

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

Vorbereitung:

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

Durchführung:

- Nunc aus der -80°C oder Stickstoffbank holen
- Nunc ins warme Wasserbad stellen
- 5 ml Pipette mit Medium aufziehen (wäscht zelltoxisches DMSO aus)
- Medium langsam in die aufgetaute Zellsuspension geben
- durch kontrolliertes Resuspendieren die Zellen mischen, Volumen langsam vergrößern sonst platzen die Zellen
- öfters das Medium wechseln und Nunc gut spülen
- komplette Suspension in Tube geben
- Zellen abzentrifugieren bei 1500 rpm für 5 min
- Überstand dekantieren
- Pellet in 10ml Medium aufnehmen und Zellen zählen
- Zellen abzentrifugieren bei 1500 rpm für 5 min
- Zellpellet nun in dem Medium aufnehmen in dem weiter gearbeitet wird
- Empfindliche Zellen sollten mehrfach gewaschen werden

cave: schnelles Arbeiten ohne Unterbrechung

9.4 FICOLL-Separation

(Standardprotokoll AG Meyer, Mai 2011)

Methode für Buffy Coats (BC) und peripheres Blut (pB)

- Pro 10 ml pB werden ca. 10×10^6 PBMCs gewonnen (bei gesundem Spender) BC entspricht ca. 500 ml peripheren Blut

Durchführung:

- BC oder pB (steril) in Zellkulturflasche überführen/füllen
- 4 x 50 ml Ficoll-Röhrchen mit Fritte verwenden
- Röhrchen mit je 15 ml Ficoll-Trennmedium befüllen
- kurz Zentrifugieren bis Medium komplett unter der Fritte ist
- nun das Blut gleichmäßig auf die 4 Röhrchen verteilen:
 - **Wichtig:** mind. 15 ml (max. 35 ml) Blut pro Röhrchen
 - Restl. Volumen (bis 50 ml) mit PBS ausgleichen
 - Das Blut kann auch vorher verdünnt werden
 - Aufwirbelungen vermeiden, beeinflusst die Auftrennung der Zellen
- Zentrifugieren 20 min, 2300 rpm, **ohne** Bremse, **ohne** Beschleunigung
- gleiche Anzahl an leeren 50 ml Falcons vorbereiten
- vorsichtig PBMC-Bande (weißer Ring zwischen Plasma und Ficoll) abnehmen und in 50 ml Falcon überführen
 - will man eine Thrombozyten-Kontamination vermeiden sollte man vorher den Plasmaring absaugen
- mit PBS (+2 mM EDTA) auf 50 ml auffüllen
- Zentrifugieren (8 min, 1800 rpm)
- **Achtung:** Pellet noch sehr weich, deshalb unter Sicht abkippen
- Überstand abkippen und auf 50 ml mit PBS (+2 mM EDTA) auffüllen
- Zentrifugieren 5 min, 1500 rpm
- evtl. Zellpellets poolen und mit PBS (+2 mM EDTA) auffüllen
- Zentrifugieren 5 min, 1500 rpm
- ggf. Zellen über Cell Strainer (70 μ m) geben (bei klumpigem Zellpellet)
- Zellpellets poolen und mit PBS zum Zählen auffüllen (BC: 50 ml, pB: 5-8 ml)
- Zellen zählen
- bei starker Thrombozyten-Kontamination: Zentrifugieren 10 min, 1000 rpm, danach 15 min, 800 rpm
- Zellen können eingefroren oder direkt weiter verwendet werden

9.5 FACS-Färbung

(Standardprotokoll AG Meyer, März 2011)

Zellzahl:

- mind. $0,05 \times 10^6$ Zellen, optimal $0,1-0,2 \times 10^6$ Zellen pro Tube; max. 2×10^6 Zellen

Durchführung:

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

9.6 FLAER-Färbung

(Standardprotokoll AG Meyer, März 2011)

- Vorbereitung: Tubes, kaltes PBS und PBS/EDTA, FACS-Antikörper, Flaer Fix (2% Formaldehydlösung: 47,28 ml PBS + 2,72 ml 37%iges Formaldehyd)
- Zentrifuge auf 4°C einstellen
- Zellen Auftauen, Zentrifugieren, Dekantieren, „Aufratschen“, Waschen in kaltem PBS
- Zellen zählen
- Zentrifugieren, dekantieren, erneut in kaltem PBS aufnehmen
- auf FACS-Tubes verteilen, etwa $0,2 - 0,5 \times 10^6$ Zellen/Tube
- Zentrifugieren, Dekantieren, auf Zellstoff abtropfen lassen
- Antikörper nach Panel pipettieren
- Inkubation je nach Antikörper
- 0,5 ml kaltes PBS dazugeben
- Zentrifugieren 10 min 1100 rpm bei 4°C
- Dekantieren und in 125 µl kaltem PBS Resuspendieren
- FLAER hinzufügen (6,25 µl FLAER-Reagenz – Alexa Fluor 488, FITC)

- Gut Vortexen
- Inkubation 20 min im Kühlschrank
- Zentrifugieren 10 min 1100 rpm bei 4°C
- Resuspendieren in kaltem PBS und erneut zentrifugieren
- Fixieren mit Flaeer Fix in dem man 2% Paraformaldehyd hinzufügt
- FACS (sofort am gleichen Tag)

9.7 FOXP3 FACS-Färbung

(Standardprotokoll AG Meyer, März 2011)

Vorbereitung:

- ca. $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen pro Tube
- Waschpuffer: Permeabilization Buffer (10-fach) eBioscience
 - ➔ 1:10 verdünnen mit Aqua dest.
 - ➔ benötigte Menge berechnen und ansetzen
 - ➔ ca. 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
- cave: Die FACS-AK sind steril zu behandeln

Durchführung:

- Vorgehen analog einer normalen FACS-Färbung, aber zu mit FOXP3 zu färbende Proben (FOXP3-Proben) nicht fixieren
- das Pellet in 1 ml Perm/Fix resuspendieren
- 30 min bei RT inkubieren
- 2x mit Waschpuffer waschen:
 - ➔ Auffüllen mit 1 ml Waschpuffer
 - ➔ Zentrifugieren 5 min bei 1500 rpm
 - ➔ 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
 - ➔ Auffüllen mit 1 ml Waschpuffer
 - ➔ Zentrifugieren 5 min bei 1500 rpm

→ Dekantieren und „Aufratschen“

- 500-1000 µl FACS-Fix pro Tube
- Zellen schnellstmöglich messen (FACS binnen max. 12 h)
- Probe gut Vortexen

9.8 CFSE-Färbung

(Standardprotokoll AG Meyer, März 2013)

cave:

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

Vorbereitung:

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

Durchführung:

- Zellen Auftauen und Zählen
- Zellen in warmem FACS-Puffer (PBS/ 0,1% BSA) lösen
 - → Auflösen in 0,5 ml FACS-Puffer / Mio. Zellen, max. Volumen 20 ml
- 0,5 µl CFSE-Lösung / ml FACS-Puffer dazugeben, gut Vortexen
- 10 min bei 37°C inkubieren (cave: Zeit einhalten wg. Zelltoxizität)
- Abstoppen mit doppelter Menge AIMV+10%HS (gemessen am FACS-Puffer)
- 5 min bei RT inkubieren
- Zentrifugieren 5 min bei 1500 rpm und Dekantieren
- Wasch-Schritt 2x wiederholen (Proteine im Medium binden freies CFSE)

cave:

- frische Zellen sind am besten geeignet
- aufgetaute Zellen: 2-6 h in Kulturmedium bei 37°C ruhen lassen

9.9 FACS-SORT

Vorbereitung: MACS-Puffer, AIM-V 10% HS, MACS-Zellfilter (70 µm vorab in Kühlschrank - 20°C legen), 15 ml Falcon Tubes, Eis, Kühlbox zum Proben-transport

- Zellen auftauen in PBS/EDTA, zweimal in MACS-Puffer Auflösen, Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT), Dekantieren

- Zellen zählen und auf 15 ml Falcon Tubes verteilen
- je ein Tube für jede Fluorchromfarbe, sowie ein ungefärbtes Kompensationstube mit ca. $0,1-0,2 \times 10^6$ Zellen pro Tube verwenden
- ca. 5 μ l Ak pro Tube verwenden
- 1. Tube: ungefärbt, ca. $0,1-0,2 \times 10^6$ Zellen
- 4-5 Tubes (abhängig von der Anzahl der Fluorochrome) zur Kompensation:
 - 2. Tube: Einzelfärbung, ca. $0,1-0,2 \times 10^6$ Zellen
 - 3. Tube: Einzelfärbung, ca. $0,1-0,2 \times 10^6$ Zellen
 - 4. Tube: Einzelfärbung, ca. $0,1-0,2 \times 10^6$ Zellen
 - 5. Tube: Einzelfärbung, ca. $0,1-0,2 \times 10^6$ Zellen
- SORT-Tube: 6. Tube: restliche Zellen. (ca. $50-70 \times 10^6$ Zellen)
 - Probe mit CD52 FITC (70 μ l), CD4 PE (70 μ l), CD3 V450 (70 μ l) und CD8 APC (50 μ l) färben
 - 15 Min. bei 4°C inkubieren
- 1 ml in MACS-Puffer (Tubes zur Kompensation 1 ml; SORT-Tube 4 ml) Auflösen, Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, RT), Dekantieren
- Tubes zur Kompensation in 0,5 ml und SORT-Tube in 3 ml MACS-Puffer aufnehmen
- über einen gekühlten MACS-Zellfilter (70 μ m) mögliche Zellklumpen aussortieren
- Tubes auf Eis geben
- SORT (über das Tumorstimmungs-Zentrum)
- nach SORT: Kontroll-FACS zur Kontrolle der Reinheit der sortierten Zellen

9.10 Proliferationsassay, CFSE-basierter Suppressionstest

(Standardprotokoll AG Meyer, Juni 2013)

Bezeichnung:

- Treg = gesortete (Patienten)-Treg: CD4⁺CD25⁺CD127⁻: 52⁺/-
- Tresp = T-Responder-Zellen, CD3^{pos}CD4^{pos} TZ, gesunder Spender
- Teff = T-Effektor-Zellen, CD3^{pos}CD4^{neg} TZ, gesunder Spender
- KM = Kulturmedium = AIM-V + 10% HS

Tag 0:

- Gewinnung der SORT-PBMC: PBMC-Isolation via Ficoll-Dichtezentrifugation
 - cave: möglichst frisches Blut, keine eingefrorene Probe
- ggf. Aufreinigung nach CD3/CD4 via MACS-Isolation (Ziel: SORT-Dauer reduzieren)
- Zellen über Nacht aufgelöst in AIM-V + 10% HS im Brutschrank inkubieren
- spätestens hier SORT-Protokoll (per Fax) abschicken

Tag 1:

- morgens: Zellen für SORT vorbereiten und sortieren (siehe **SORT-Protokoll**)

- 15 ml Tubes für die CD52⁺/⁻-Fraktionen mit 8 ml AIM-V + 10% HS auffüllen
- Gewinnung der Tresp
 - dafür gesunder Spender = BC aus Blutbank; frisch oder eingefrorene Probe
 - Zellen auftauen und Inkubation im Brutschrank in AIM-V + 10% HS
 - optional MACS-Isolation von CD8⁺-T-Zellen
- SORT (via Tumorstimmungszentrum)
 - Tube 1: CD52⁺-Treg
 - Tube 2: CD52⁻-Treg
 - (Zellzahl von SORT übernehmen, zählen schwierig, da wenig Zellen...)
 - am besten: $0,5 \times 10^6$ Zellen von jeder Fraktion
 - Tubes mit KM auffüllen und 15 min bei 1200 rpm zentrifugieren
 - Zellen in 10 ml KM in 50 ml Falcon resuspendieren und Inkubation bei 37°C im Brutschrank
- **CFSE Färbung der Tresp** (siehe Protokoll)
- **Proliferationsassay**
- Inkubation bei 37°C im Brutschrank, 96-Well mit Alufolie verpacken

Proliferationsassay

- (für jede CD52⁺/⁻-Treg-Fraktion einzelner Ansatz wiederholen)
- 96-Well-Platte mit rundem Boden oder besser mit Spitzboden
- hier exemplarisch für 500.000 CD52⁺/⁻-Treg nach SORT
 - Treg aufteilen in 5 Teile
 - nach SORT $0,5 \times 10^6$ Treg → 1 Teil = $0,1 \times 10^6$
 - dann ist 1 Teil Tresp = $0,1 \times 10^6$ CFSE-gefärbte Tresp; Auflösen und Verteilen
- KM mit Stimulation via IL-2 und OKT3 (Endkonzentration auf 200 µl Endvolumen!)
 - IL-2: 100 U/ml und OKT3: 30 ng/ml
- Platte belegen und titrieren
- Platte in verschließbare Plastikhülle oder Alufolie, um Verdunstung zu reduzieren; wichtig v.a. für die äußeren Reihen der 96-Well-Platte
- Inkubation im Brutschrank bei 37°C

Belegung der 96-Well-Platte:

- generell alles Auflösen in KM
- Gesamtvolumen pro Well = 200 µl, davon 4 Teile

- 50 µl KM
- 50 µl Treg
- 50 µl Tresp
- 50 µl KM mit Stimulation
- 50 µl in A1, A2, E-H, (nicht B, C und D!)
- alle Treg aufgelöst in 250 µl
 - 50 µl in B
 - 2 x 50 µl in C
 - 2 x 50 µl in D
- Treg-Verdünnungsreihe: Verdünnen bis 16:1 oder noch weiter
 - 50 µl aus D in E, Resuspendieren
 - 50 µl aus E in F, Resuspendieren
 - usw.
 - 50 µl Rest dann in B
- CFSE-gefärbte Tresp, je 50.000, aufgelöst in 50 µl in A1, A2, C-H (nicht B!)
- KM, 50 µl in A1, E-H, (nicht B, C und D!), 100 µl in A2
- KM mit Stimulation, 50 µl in A1, B-H, (nicht A2!)

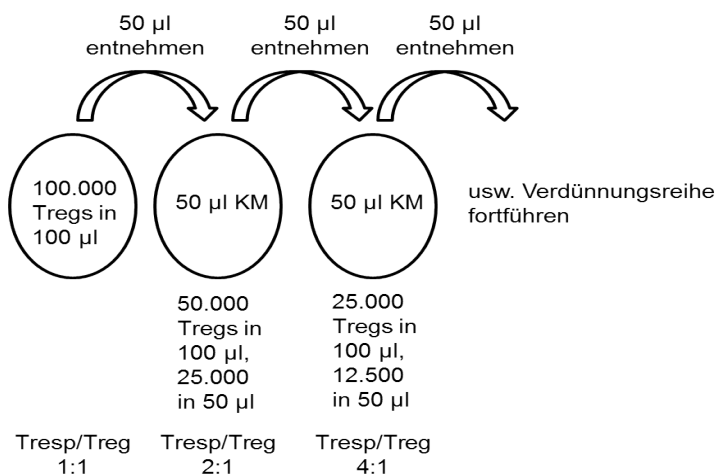
	Tresp/Treg	Tresp/Treg
	Stimuliert	Unstimuliert
A	1:0	1:0
B	0:1	
C	1:2	
D	1:1	
E	2:1	
...	...	
H	16:1	

Suppression
↓

Treg-Verdünnungsreihe/Titration:

Ziel: 200 µl Volumen / Well

- Vorab 50 µl KM



im Anschluss:

- Tresp (50.000) in 50 µl / Well
- 50 µl KM mit Stimulation

Tag 5:

- Messung der CFSE-Konzentration der Tresp

9.11 MACS-Isolation mittels Säulen

(Standardprotokoll AG Meyer, April 2011)

- Säule + Beads von Miltenyi
- Max. pro MS-Säule: 10×10^6 gelabelte Zellen oder 100×10^6 Zellen insgesamt

Durchführung:

- Zellen auftauen und in Medium waschen
- Nun **auf Eis** arbeiten
- Zellpellet in 10ml kaltem MACS-Puffer (4°C) aufnehmen und Zellen zählen
- Zentrifugieren (1500 rpm 5 min), Dekantieren und „Aufratschen“
- berechnet auf gesamte Zellzahl:
 - ➔ Je 10×10^6 Zellen in 80 µl MACS-Puffer aufnehmen
 - ➔ Je 10×10^6 Zellen 20 µl MikroBeads dazugeben
- Probe Vortexen
- Bei 4°C für 15 min inkubieren
- Zellen mit 2 ml MACS-Puffer waschen
- 5 min bei 1500 rpm, in dieser Zeit
 - ➔ Säulen vorbereiten (Magneten + Filter + Säule) und aufbauen
 - ➔ Negativ- Fraktions-Tubes unter die Säule stellen
- Probe Dekantieren und „aufratschen“
- 500 µl MACS-Puffer in den Filter auf der Säule geben
- Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendieren
- möglichst blasenfrei Probe in den Filter auf der Säule geben
- Durchlaufen lassen, in das „Negativ-Fraktion“-Tube
- Mit 500 µl MACS-Puffer das Tube spülen und in den Filter auf der Säule geben
- Mit 500 µl MACS-Puffer den Filter auf der Säule spülen, Filter werfen
- Mit 500 µl MACS-Puffer nur die Säule spülen
- Säule aus dem Magneten entfernen und auf das „Positiv-Fraktion“-Tube setzen
- Jetzt schnell mit 1000 µl MACS-Puffer und dem Stempel die Zellen eluieren
- Stempel wieder steril herausziehen und mit 1000 µl MACS-Puffer wiederholen
- Säule werfen und die „Positiv-Fraktion“ zählen
- Zellen bei 1500 rpm 5 min abzentrifugieren und im gewünschten Medium aufnehmen

Danksagung

Aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version nicht enthalten.

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version nicht enthalten.

