

**Aus der Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie
und internistischer Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**Eingereicht über
das Institut für Veterinärpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Regulatorische T-Zellen als adjuvante Therapie der akuten
Graft versus Host Erkrankung im xenogenen Maus-Modell**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Anne Zobel
Tierärztin aus Berlin**

**Berlin 2018
Journal-Nr.: 3996**

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und internistischer Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über
das Institut für Veterinärpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Regulatorische T-Zellen als adjuvante Therapie der akuten
Graft versus Host Erkrankung im xenogenen Maus-Modell**

INAUGURAL – Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anne Zobel
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2018

Journal-Nr.: 3996

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopfleisch
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Petra Reinke
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Mice; animal models; T lymphocytes; stem cells; transplantation;
haematopoiesis; blood disorders; graft versus host reactions;
immunosuppression; immunosuppressive agents

Tag der Promotion: 22.03.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-904-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

I. <u>Abkürzungsverzeichnis</u>	VIII
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Literatur</u>	3
2.1. Das Immunsystem	3
2.1.1. Angeborene Immunabwehr	3
2.1.2. Adaptive Immunabwehr	4
2.1.2.1. T-Zellen	4
2.1.2.2. T-Zellrezeptor (TCR)	6
2.1.2.3. T-Zellantwort	7
2.1.2.3.1. T-Zell vermittelte Transplantatabstoßung	8
2.2. Regulatorische T-Zellen	10
2.2.1. Natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg): Entwicklung und Phänotyp	10
2.2.2. Periphere nTreg Homöostase	11
2.2.3. Induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg)	12
2.2.4. Treg Specific Demethylated Region (TSDR)	12
2.2.5. Wirkmechanismen von nTreg und iTreg	13
2.2.6. Effektivität polyklonaler versus Antigen-spezifischer Treg	15
2.2.7. Klinische Relevanz regulatorischer T-Zellen	15
2.2.7.1. Relevanz von nTreg bei Organtransplantationen	15
2.2.7.2. Relevanz von nTreg bei Stammzelltransplantation	17
2.3. Graft versus Tumor Effekt	18
2.4. Graft versus Host Disease (GvHD)	18
2.4.1. Akute Graft versus Host Disease	18
2.4.1.1. Zielgewebe akuter Graft versus Host Disease	21
2.4.1.2. Klassische Therapie akuter GvHD	22
2.4.1.2.1. Ciclosporin A (CsA)	22
2.4.1.2.2. Mycophenolat-Mofetil (MMF)	23
2.4.1.2.3. Glukokortikoide	23
2.4.1.3. Klinische Relevanz regulatorischer T-Zellen im Zusammenhang mit GvHD	25
2.4.1.3.1. Xenogene Modelle zu regulatorischen T-Zellen und GvHD	26
3. <u>Material</u>	27
4. <u>Methoden</u>	35
4.1. Zellen	35
4.2. Isolation humaner mononukleärer Blutzellen (huPBMCs) aus Vollblut	35
4.3. Isolation CD4+CD25+FoxP3+ „nTreg“ Zellen aus humanen PBMCs	36

4.4. Phänotypische Charakterisierung der Zellisolate mittels Durchflusszytometrie.....	37
4.5. <i>In vitro</i> Expansion CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen (nTreg).....	37
4.5.1. Polyklonale Expansion humaner nTreg.....	38
4.6. Analyse der suppressiven Kapazität expandierter nTreg (Suppressionassay).....	38
4.7. Analyse des Zytokinprofils expandierter nTreg (Zytokinassay).....	40
4.8. Versuchsablauf allgemein.....	42
4.8.1. Versuchsgruppen.....	43
4.8.1.1. Kontrollgruppen.....	43
4.8.1.2. Adoptiver Zelltransfer natürlicher regulatorischer T-Zellen als Monotherapie.....	45
4.8.1.3. Effektivität des adoptiven Transfers natürlicher regulatorischer T-Zellen in Kombination mit Standardimmunsuppression.....	46
4.8.2. Monitoring.....	47
4.9. Analyseverfahren.....	49
4.9.1. Durchflusszytometrie.....	49
4.9.1.1. Färbeverfahren allgemein.....	49
4.9.1.2. Blutentnahme Tag +7.....	50
4.9.1.3. Organentnahme post mortem.....	50
4.9.1.3.1. Aufbereitung der Gewebe.....	51
4.9.1.3.2. Färbungen.....	52
4.9.2. Histologie.....	55
4.9.3. Statistik.....	56
5. <u>Ergebnisse</u>	57
5.1. Isolation und polyklonale Expansion humaner nTreg unter Erhalt des suppressiven Phänotyps.....	57
5.2. Die suppressive Kapazität von nTreg auf konventionelle T-Zellen wird durch die polyklonale Expansion nicht vermindert.....	59
5.3. Polyklonal expandierte nTreg produzieren nach exogener Stimulation keine proinflammatorischen Zytokine.....	61
5.4. Die Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert eine klinisch manifeste, letale xenogene Graft versus Host Disease.....	63
5.5. Klassische, zellbasierte und kombinierte Immunsuppression führen zu verlängertem Überleben bei variablem klinischen Erscheinungsbild.....	67
5.6. Der prozentuale Anteil an zirkulierenden CD45+ humane Zellen hängt vom Zeitpunkt der Blutentnahme ab.....	78

5.7. Die Infiltration humaner Zellen und die Inflammation der Gewebe wird durch die Wahl der Immunsuppression bestimmt.....	80
5.8. Die Infiltration der Gewebe mit humanen CD45+ Zellen ist abhängig von der Wahl der Immunsuppression.....	96
5.9. Die prozentuale Anteil an FoxP3+ T-Zellen im Gewebe hängt von der Wahl der Immunsuppression ab.....	102
5.10. Die Wahl der Immunsuppression beeinflusst die Proliferation CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischer T-Zellen.....	109
6. <u>Diskussion</u>	112
7. <u>Zusammenfassung</u>	124
8. <u>Summary</u>	126
9. <u>Literaturverzeichnis</u>	128
10. <u>Anhang</u>	
10.1. Abbildungsverzeichnis.....	156
10.2. Tabellenverzeichnis.....	158
11. <u>Danksagung</u>	159
12. <u>Selbstständigkeitserklärung</u>	160

I. **Abkürzungsverzeichnis**

aGVHD	akute <i>Graft versus Host Disease</i>
allo	allogen
APC	Allophycocyanin
APCs	<i>antigen presenting cells</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
BIM	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BOS	Bronchiolitis obliterans Syndrom
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CMV	Zytomegalivirus (<i>Cytomegalovirus</i>)
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CsA	Ciclosporin A
CTL	zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T-cell</i>)
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DC	<i>dendritic cells</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
EAE	experimentelle Autoimmun Enzephalitis
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
ECD	Phycoerythrin-Texas Red Konjugat (<i>energy coupled dye</i>)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FoxP3	<i>Forkhead-Box Protein P3</i>
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GMP	Gute Herstellungspraxis (<i>Good Manufacturing Practice</i>)
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
GvL	<i>Graft versus Leukemia</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	<i>humane leukocyte antigen</i>
hu	human
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
i.v.	<i>intravenös</i>
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
IPS	idiopathisches Pneumonie Syndrom
iTreg	induzierte regulatorische T-Zellen
IVC	individuell ventilierter Käfig (<i>individually ventilated cage</i>)
k.a.	keine Angabe
L/D	<i>Live / Dead</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	<i>monoclonal Antibody</i>
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
Mean	Mittelwert
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMF	Mycophenolat Mofetil
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
n	Menge
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
p.os	per oral

PAMPs	<i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PB	Pacific Blue
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protein
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PO	Pacific Orange
Pred.	Methylpredisolon
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
TCR	<i>T-cell Receptor</i>
T _{CM}	zentrale T-Gedächtniszelle (<i>central memory T-cell</i>)
T _{EM}	effektorische T-Gedächtniszelle (<i>effector memory T-cell</i>)
T _{EMRA}	<i>Terminal differentiated effector memory T-cell</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
T _H	T-Helfer-Zelle
Tkonv	konventionelle T-Zelle
™	<i>Trademark</i> (Warenzeichen)
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
T _R 1	regulatorische T-Zelle Typ 1 (<i>T-regulatory cell type 1</i>)
TSDR	<i>Treg-specific demethylated region</i>
Tx	Transplantation
xeno	xenogen

1. Einleitung

Die Transplantation allogener Stammzelltransplantationen dient zur Therapie maligner und nicht-maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Die Zahl der Transplantationen ist über die letzten Jahre kontinuierlich gestiegen (Passweg et al. 2016).

Akute und chronische Graft versus Host Disease sind unerwünschte und potentiell letale Erkrankungen infolge einer Transplantation. Sie stellen mit ihrer hohen Morbidität- und Mortalitätsrate die größte Limitation für den Erfolg einer Stammzelltransplantation dar (Ferrara und Deeg 1991; Copelan 2006; Green und Hind 2016). Je nach Konditionierungsregime, Transplantatzusammensetzung, Ursprung des Transplantats, mismatch der HLA-Antigene zwischen Spender und Empfänger u.a. sind bis zu 80% der Patienten von einer akuten GvHD betroffen (Ball und Egeler 2008; Martin et al. 2012).

Die präemptive, sowie *first-* und *second line* Therapie besteht in der Applikation von Immunsuppressiva (Martin et al. 2012). Dazu zählen Medikamente wie Ciclosporin A, Mycophenolat-Mofetil und Prednisolon, wobei die Behandlung mit Steroiden weiterhin den Goldstandard darstellt (Martin et al. 2012; Wolff et al. 2013). Diese Medikamente sind, vor allem bei Langzeittherapie mit einer Reihe unerwünschter Wirkungen assoziiert. Dazu zählen neben nephro- und hepatotoxischen Wirkungen (Dieterle et al. 1990; Bennett et al. 1996; de Mattos, Angelo M. et al. 2000; Elsallabi et al. 2016; Matsukuma et al. 2016) auch Tumorrückfälle bzw. die de novo Entstehung sekundärer Tumorerkrankungen (Buell et al. 2005; Lowe et al. 2007; Piselli et al. 2014) und Infektionen durch die allgemein herabgesetzte Immunkompetenz (Sayer et al. 1994; Orlicka et al. 2013). Mitunter kommt es auch zum Therapieversagen mit sehr schweren Verläufen und zum Tod des Patienten (Pidala und Anasetti 2010; McDonald 2016).

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind im Körper für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und eine physiologische Immunhomöostase verantwortlich (Sakaguchi 2000). Sie modulieren Immunprozesse durch die Interaktion mit Antigenpräsentierenden Zellen, konventionellen T-Zellen und zum Teil auch Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (Thornton und Shevach 1998; Sakaguchi 2000; Shevach et al. 2001; Benoist und Mathis 2012). Bei einem Mangel an Treg kann es zu schweren Immundysregulationen und Autoimmunerkrankungen kommen (Sakaguchi et al. 1995; Wildin et al. 2001). Auch im Zusammenhang mit allogenen Transplantationen spielen diese Zellen eine Rolle. Der Anteil an Treg im Transplantat beeinflusst den klinischen Verlauf nach Stammzelltransplantation (Rezvani et al. 2006; Li et al. 2010; Danby et al. 2015). Sowohl experimentelle Tiermodelle (Hoffmann et al. 2002; Taylor 2002), als auch Studien an Patienten zeigen den positiven Effekt einer adjuvanten Treg-Therapie (Brunstein et al. 2011b; Di Ianni et al. 2011a). Für eine etwaige breite klinische Anwendung ist die Untersuchung der Interaktion mit konventionellen Immunsuppressiva essentiell. Die

Studienlage zum Einfluss der verschiedenen Immunsuppressiva ist zum Teil unvollständig und die Ergebnisse sind nicht einheitlich. Für eine klinische Anwendung ist diese Untersuchung jedoch wichtig.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Effektivität polyklonal expandierter regulatorischer T-Zellen und deren Wechselwirkung mit konventionellen Immunsuppressiva in einem xenogenen Mausmodell einer akuten GvHD zu klären. Es war zu untersuchen, wie klinischer Verlauf, Überleben, sowie Zellinfiltration und Inflammation in die Gewebe durch die Therapie beeinflusst werden. Vor allem sollte die Menge an FoxP3+ T-Zellen im Gewebe post mortem analysiert werden, um den Einfluss der klassischen Immunsuppressiva auf Treg darzustellen.

Eine Hypothese dieser Arbeit war, dass Tiere, die regulatorische Zellen als Monotherapie erhalten dosisabhängig vor einer xenogenen GvHD geschützt werden. Weiterhin wurde angenommen, dass der Anteil an regulatorischen T-Zellen im Gewebe von der Wahl der Immunsuppression beeinflusst wird und der klinische Verlauf damit entsprechend korreliert. Die Annahme war, dass Tiere unter Behandlung mit Ciclosporin A einen geringen Anteil an FoxP3+ Zellen im Gewebe aufweisen, als Mäuse unter Behandlung mit Glukokortikoiden, da dies sich mit dem Großteil der Studien anderer Arbeitsgruppen decken würde.

2. Literatur

2.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem dient dem Schutz des Organismus vor Fremdanitigenen. Es setzt sich aus primären (Thymus und Knochenmark) und sekundären (Milz, Lymphknoten, Tonsillen, Pey-er'schen Platten des Ileums) Immunorganen zusammen und besitzt humorale und zelluläre Bestandteile. Für eine adäquate Immunantwort auf Antigene ist die Unterscheidung zwischen „eigen“ und fremd“ essentiell. Ein wesentliches Merkmal des Immunsystems ist dabei die Selbsttoleranz gegenüber körpereigenem Antigen. Wird dieser Zustand aufgehoben, kann es in der Folge zur Entstehung von Autoimmunität kommen (Vollmar et al. 2013: S.117). Die Immunantwort kann über zwei Effektorsysteme vermittelt werden: die angeborene Immunabwehr, welche sich unspezifisch gegen eine Vielzahl von Erregerstrukturen richtet und die antigenspezifische adaptive oder erworbene Immunabwehr.

2.1.1. Angeborene Immunabwehr

Das angeborene Immunsystem setzt sich aus einer komplexen Anzahl von gelösten und zellulären Bestandteilen zusammen. Humorale Bestandteile sind Komplementproteine, während zu den Zellen des angeborenen Immunsystems neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, Makrophagen und dendritische Zellen gehören.

Als erste physiologische Barriere gegen Pathogene dienen zudem die Haut, Schleimhäute, die Flimmerhärchen des Respirationstraktes und der natürliche Darmflora. Die angeborene Immunabwehr ist nicht Erreger-spezifisch und richtet sich vor allem gegen nicht-selbst Moleküle oder Strukturen, die in einem breiten Spektrum von Erregern vorkommen und für deren Überleben oder Funktion essentiell sind. Zu diesen Virulenzfaktoren zählen z.B. bestimmte Membranbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS), Flagellin und Murein oder auch virale doppelsträngige RNA, die im Wirt nicht vorkommen (Alexander und Rietschel 2001; Akira et al. 2006; Takeuchi und Akira 2009). Diese sog. *pathogen associated molecular proteins (PAMPs)* werden von entsprechenden Rezeptoren (*pathogen recognition receptors; PRR*) erkannt, woraufhin durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokinen eine schnelle Immunantwort initiiert wird (Mogensen 2009), worüber im weiteren Verlauf das adaptive Immunsystem mit der Entwicklung einer Antigen-spezifischen Immunantwort beginnen kann.

Die Struktur der an der Immunantwort beteiligten PRR ist im Genom festgelegt und kann nicht an jeweilige Pathogene spezifisch angepasst werden (Mogensen 2009). Die angeborene Immunabwehr ist somit nicht in der Lage ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen.

2.1.2. Adaptive Immunabwehr

Die adaptive Immunabwehr ist im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort antigenspezifisch. Sie ist in der Lage ein immunologisches Gedächtnis in Form von Antikörpern und Gedächtniszellen zu bilden, welche zu einer schnellen und effektiven Immunantwort bei wiederholtem Kontakt mit einem Pathogen führen kann (Gray 1993).

Die zelluläre Komponente bilden B- und T-Zellen, die von ihnen produzierten Zytokine, Lymphokine und Immunglobuline den humoralen Anteil der adaptiven Immunabwehr. Die humorale Abwehr richtet sich gegen extrazelluläre Erreger und mikrobielle Toxine, während die zelluläre Immunantwort intrazelluläre Erreger, die von Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) über *major histocompatibility* Komplexe (MHC) präsentiert werden entweder direkt oder indirekt eliminiert. Durch die Präsentation von Peptiden an B- und T-Zellen mittels APCs des unspezifischen Immunsystems und die Sekretion von Zytokinen sind angeborene und erworbene Immunabwehr eng miteinander verknüpft (Dempsey et al. 2003).

2.1.2.1. T-Zellen

Im Thymus reifen T-Zellen aus lymphatischen, zunächst CD4-CD8- doppeltnegativen Vorläuferzellen des Knochenmarks zu adulten T-Lymphozyten heran und durchlaufen dabei komplexe Prägungs- und Selektionsstufen (Starr et al. 2003), wobei ein Großteil der Thymozyten noch vor Beginn der weiteren Selektionsschritte aussortiert wird (Klein et al. 2014). Durch APCs und Thymusepithelzellen im Thymuskortex und der Medulla werden über MHC I und MHC II Antigene an CD4+CD8+ doppeltpositive Thymozyten präsentiert (Klein et al. 2014). Im klassischen Modell unterliegen Zellen, mit einer zu hohen Affinität gegenüber dem MHC/Peptidkomplex der Negativselektion, bei der autoreaktive Zellen in Apoptose übergehen (Felix und Allen 2007). Dieser Mechanismus dient der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz. Zellen, die das Antigen adäquat, aber nicht zu schwach erkennen werden im Thymusmark im weiteren Schritt (Positivselektion) zu naiven, konventionellen CD4+ und CD8+ einfachpositiven T-Zellen und wandern in die Peripherie aus (Starr et al. 2003). Spezialisierte T-Zellen mit höherer Affinität gegenüber körpereigenen Peptiden als naive konventionelle T-Zellen wie natürliche regulatorische T-Zellen gehen als eigenständige Population aus dem Thymus hervor (Starr et al. 2003; Sakaguchi 2004; Hsieh et al. 2012; Caramalho et al. 2015) (Abbildung 1). Nach Auswanderung aus dem Thymus migrieren naive T-Zellen in sekundäre Lymphorgane, um von mit Peptid-beladenen APCs aktiviert zu werden. Die Aktivierung führt zur Reifung und Teilung der Zelle und dauert bei naiven T-Zellen je nach Antigen dosis und Costimulation 6-30h; zum Vergleich: eine T-Gedächtniszelle benötigt nach Erkennung eines bekannten Antigens 0,5-2h (Sallusto und Lanzavecchia 2002). T-Zellen werden anhand ihrer

Oberflächenmoleküle, ihrem primären Wirkmechanismus, sowie den von ihnen produzierten Zytokinen kategorisiert (Abb. 2). Zytotoxische (CTL) CD8⁺ erkennen prozessierte Fremdantigene, die über MHC I dargeboten werden. Im Zytosol der APCs befindliche Antigene werden im Endoplasmatischen Retikulum an MHC I Moleküle gebunden und gelangen als MHC I / Peptidkomplex in den Golgi Apparat und anschließend an die Zelloberfläche (Guermontprez et al. 2002). CD8⁺ Zellen erkennen diesen Komplex und lysieren die Zielzelle über Exozytose von Granzym, Perforin und Granulysin oder den Fas (CD95)/FasL (CD95L) Weg, über Einleitung der Caspase Kaskade, die die Apoptose der Zielzelle herbeiführt (Harty et al. 2000). CD8⁺ T-Zellen sezernieren zudem proinflammatorische Zytokine wie Interferon gamma (IFN γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) und aktivieren darüber Makrophagen und Granulozyten (Harty et al. 2000; Mahnke et al. 2013).

Klassische T_H1 und T_H2 CD4⁺ Zellen fungieren als Helferzellen und führen über die Produktion von Zytokinen zur Aktivierung anderer Immunzellen. Sie erkennen Fremdpeptide, die über MHC II präsentiert werden. Die MHC II Moleküle in APCs binden in Vesikeln befindliche Peptide. In diesen Vesikeln können Mikroorganismen oder auch nur deren Toxine prozessiert werden. Erst im angesäuerten Milieu der Vesikel kann der Komplex MHC II/Peptidkomplex gebildet werden (Neefjes et al. 2011). Nach Aktivierung einer CD4⁺ T-Helferzelle werden je nach Subtyp der Zelle Zytokine sezerniert, die entweder Effektorzellen aktivieren oder die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen mit anschließender Bildung von Immunglobulinen (Ig) anregen (O'Garra und Arai 2000). T_H1 Zellen produzieren die proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-12, Tumornekrosefaktor β und IFN γ , welche die zelluläre Immunantwort mittels Aktivierung von Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen initiiert. Diese Zellen spielen bei Elimination intrazellulärer Infektionen und in der Pathologie von Autoimmunerkrankungen eine Rolle (Romagnani 2000; Wynn 2015; Zhu und Paul 2008; Wynn 2015). Die von T_H2 Zellen produzierten Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 u.a. regulieren die Produktion von IgG und IgE (O'Garra et al. 1997; Romagnani 2000; Zhu und Paul 2008; Broere et al. 2011) und sind damit für die Antikörper-medierte Immunreaktion verantwortlich. Durch ihren Einfluss auf Mastzellen und eosinophile Granulozyten sind sie auch an der Pathologie von allergischen Reaktionen beteiligt (Deo et al. 2010). Bestimmte Subtypen der T-Zellen sind somit mit unterschiedlichen Erkrankungen in der Humanmedizin assoziiert (Romagnani 2000; Wynn 2015). Neben den „klassischen“ T_H1 und T_H2 Zellen existieren weitere Untergruppen von CD4⁺ T-Zellen, die je nach Phänotyp direkte Effektorfunktion (Huang et al. 1992; Norris et al. 2001; Appay et al. 2002; Porakishvili et al. 2004; Appay 2004; Marshall und Swain 2011) oder regulatorische Funktionen haben (Sakaguchi et al. 1995; Sakaguchi 2000; Sakaguchi 2004).

T-Zellselektion im Thymus:

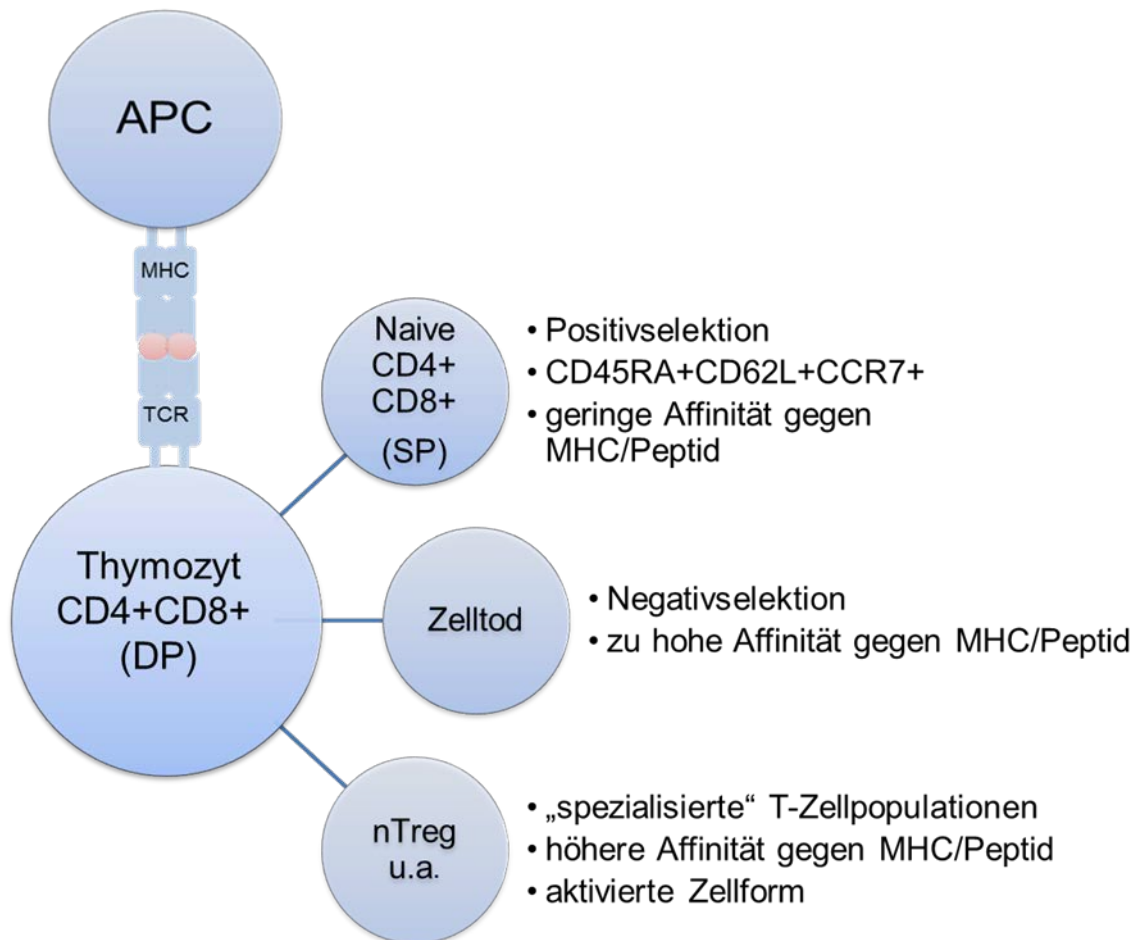


Abbildung 1: **T-Zellselektion im Thymus:** Schematische Darstellung der T-Zellselektion im Thymus

Abkürzung: APC Antigenpräsentierende Zellen, MHC Major Histokompatibilitätskomplex, TCR T-Zellrezeptor, nTreg natürliche regulatorische T-Zellen, DP doppelt positiv, SP single positiv

2.1.2.2. T-Zellrezeptor (TCR)

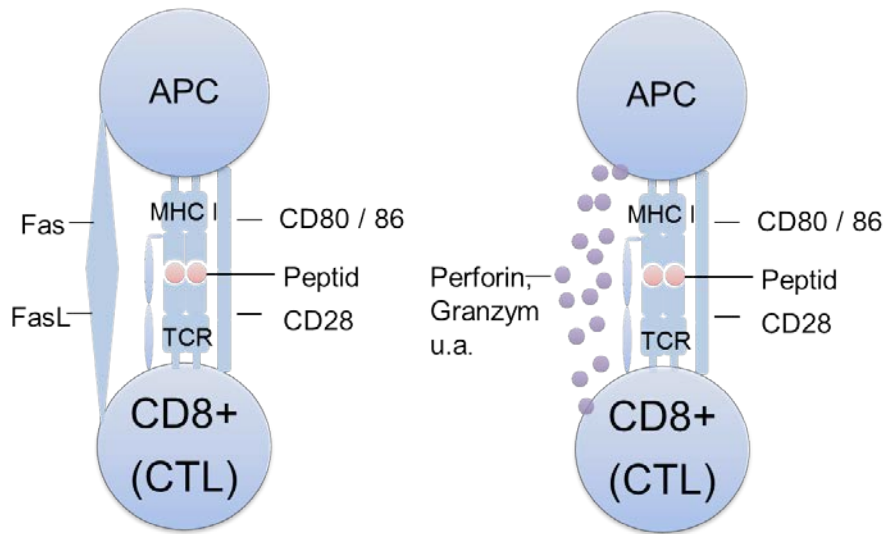
Der T-Zellrezeptor (TCR) wurde in seiner Struktur erstmals 1983 beschrieben (Meuer et al. 1983). Er ist ein Heterodimer aus zwei transmembrangebundenen Glykoproteinketten, zu meist $\alpha\beta$ -Ketten, seltener $\gamma\delta$ -Ketten, mit je einer konstanten und einer variablen Region extrazellulär, sowie einem zytoplasmatischem C-terminalen Ende und einer Transmembrandomäne (Call und Wucherpfennig 2004). Die variable Region setzt sich aus V, J und D (nur bei der β -Kette) Segmenten zusammen. Diese multiplen Gensegmente werden während der Ontogenese rekombiniert (Davis und Bjorkman 1988; Nikolich-Zugich et al. 2004), wodurch T-Lymphozyten ihre Vielfalt erhalten, um ein großes Spektrum an Fremdanigenen erkennen zu können, wobei jeder T-Zellrezeptor spezifisch für ein MHC Molekül auf APCs ist (MHC

Restriktion) (Hodges et al. 2002; Archbold et al. 2008), eine Kreuzreaktivität aber vorkommen kann (Hennecke und Wiley 2001). Zusammen mit dem Oberflächenmolekül CD3 bildet der TCR den CD3/T-Zellrezeptorkomplex.

2.1.2.3. T-Zellantwort

T-Zellen erkennen nur an MHC-gebundene Fremddantigene mittels ihres T-Zellrezeptors (Hennecke und Wiley 2001); eine Interaktion mit gelöstem Antigen findet nicht statt. Die T-Zellantwort erfolgt in der sog. immunologischen Synapse (Sallusto und Lanzavecchia 2002). Diese entsteht im Raum zwischen einer Antigenpräsentierenden Zelle und einer T-Zelle, wenn der TCR seinen Liganden erkennt (Alarcón et al. 2011). Dabei werden alle für die Immunantwort nötigen Oberflächenmoleküle, auch co-stimulatorische Proteine aktiv in Richtung der APC ausgerichtet (Huppa und Davis 2003). Die immunologische Synapse formiert sich innerhalb weniger Minuten (Alarcón et al. 2011) und bleibt je nach Immunantwort (direkt oder indirekt) für mehrere Stunden bestehen (Huppa und Davis 2003). Bei einer indirekten Immunantwort über T-Helferzellen bleibt die Synapse bis zu 24h bestehen, während eine Immunreaktion über zytotoxische T-Zellen (direkte Immunantwort) innerhalb weniger Minuten abgeschlossen ist und die immunologische Synapse entsprechend nur vorübergehend besteht (Huppa und Davis 2003). Der Kontakt zwischen MHC/Peptid mit dem TCR allein führt nicht zur Initiierung einer Immunantwort. Dazu sind zusätzlich co-stimulatorische Signale über Zytokine und Moleküle auf den T-Zellen und den APCs nötig (Smith-Garvin et al. 2009). CD28 ist ein Protein auf der Zelloberfläche, welches von ca. 80% (alle CD4+ und 50% der CD8+) der T-Zellen dauerhaft exprimiert wird (Lenschow et al. 1996) und der Rezeptor für CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2) auf Antigenpräsentierenden Zellen ist. Nach Bindung seines Liganden kommt es zur gesteigerten Produktion von IL-2 mRNA, durch Produktion von Bcl-X_L zur verbessertem Überleben der T-Zelle und Eintritt der Zelle in den Zellzyklus (Lenschow et al. 1996; Sharpe und Freeman 2002). CD152 (CTLA-4) wird, anders als CD28 nicht konstitutiv auf T-Zellen exprimiert. Die Expression des Proteins wird nach Kontakt mit einer APC und Bindung von CD28 gesteigert (Lenschow et al. 1996) und führt über Reduktion der IL-2 mRNA und Verhinderung des Eintritts der T-Zelle in den Zellzyklus zur Reduktion der Immunantwort und verhindert ein Überschießen der Reaktion (Krummel und Allison 1995; Walunas et al. 1996) und ist damit der Gegenspieler von CD28. Regulatorische T-Zellen exprimieren CTLA-4 dauerhaft, wenn auch nicht spezifisch und scheinen darüber einen Teil ihrer suppressiven Eigenschaften zu vermitteln (Kolar et al. 2009; Sojka et al. 2009). Als Rezeptor für CD152 fungieren, wie bei CD28, CD80 und CD86 (Linsley et al. 1991; Azuma et al. 1993; Sharpe und Freeman 2002).

A: T-Zellantwort CD8



B: T-Zellantwort CD4

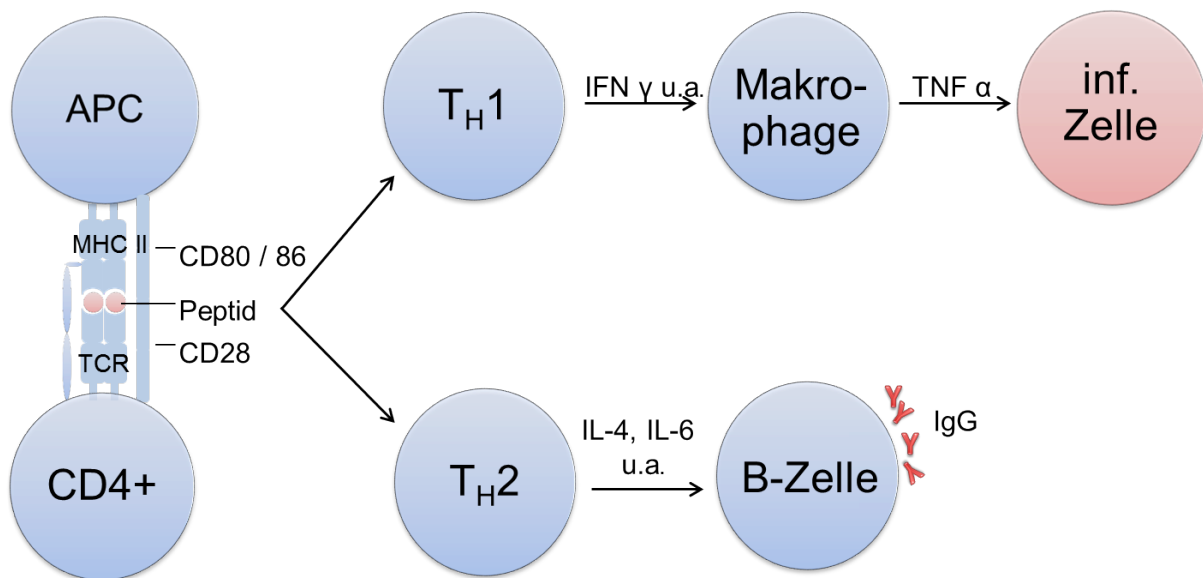


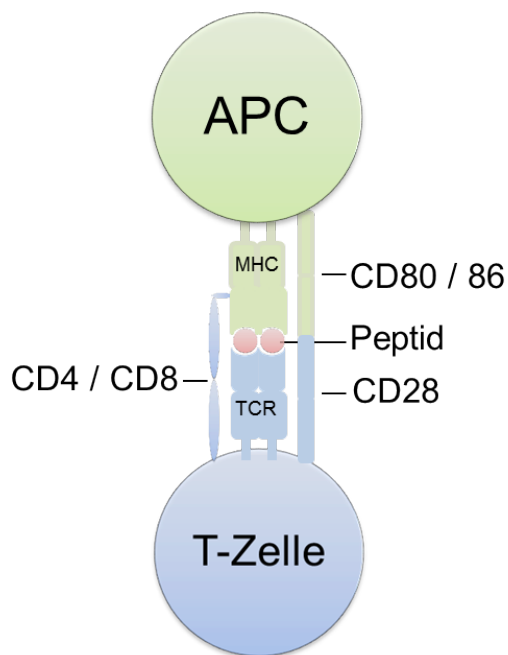
Abb. 2: **T-Zellantwort und T-Zellpopulationen nach Oberflächenmolekül CD4 und CD8:** Schematische Darstellung der T-Zellpopulationen und der T-Zellantwort abhängig vom Zelltyp. Abkürzung: APC Antigenpräsentierende Zellen, MHC Major Histokompatibilitätskomplex, TCR T-Zellrezeptor, CTL zytotoxische (*cytotoxic*) T-Zelle, IFN γ Interferon gamma, TNF α Tumornekrosefaktor alpha, IL Interleukin, IgG Immunglobulin gamma

2.1.2.3.1. T-Zell vermittelte Transplantatabstoßung

Allogene Transplantationsabstoßungen können durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden (Abb. 3). Der direkte Mechanismus erfolgt über Erkennung des allogenen MHC/Peptidkomplexes und führt zur Einleitung einer zellulären Immunantwort (Benichou et

al. 2011). Dafür wandern die intakten allo-MCH Moleküle des Spenders in sekundäre Lymphorgane aus und kommen so direkt in Kontakt mit den T-Zellen des Empfängers, welche dann in das Transplantat einwandern (Ingulli 2008). Über die Zeit werden die APCs des Spenders verdrängt und die Präsentation von Fremdpeptiden findet über die dendritischen Zellen des Empfängers statt. Die direkte Alloreaktion kann über CTLs und damit direkte Lyse der Empfängerzellen oder CD4+ T-Helferzellen und entweder T_H1 Antwort mit Aktivierung von Makrophagen und nachfolgender Gewebeerstörung durch $TNF\alpha$ oder T_H2 Antwort mit Aktivierung von B-Zellen und Antikörperproduktion stattfinden (Game und Lechler 2002). Die indirekte Erkennung der allogenen Antigene wird über körpereigene MHC, welche Fremdpeptide präsentieren und minor Histokompatibilitätsantigene vermittelt (Ingulli 2008). Hier wird die Antwort durch CD4+ Helferzellen initiiert, welche dann, wie bei der direkten Abstoßung, zur Aktivierung von Makrophagen oder B-Zellen mit anschließender Immunglobulinproduktion führt. Auch können T_H1 Zellen über die Sekretion von IL-2 CD8+ CTLs aktivieren, die daraufhin das transplantierte Gewebe angreifen (Game und Lechler 2002). Innerhalb der peripheren T-Zellpopulation besitzen ca. 10% der Zellen eine Alloreaktivität (Kranz 2000).

A



B

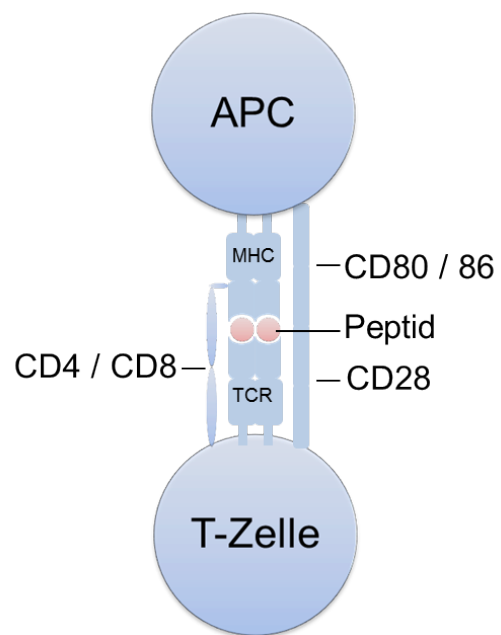


Abb. 3: **Direkte und indirekte T-Zellvermittelte Abstoßungsreaktion:**

Schematische Darstellung einer direkten (A) und einer indirekten (B) T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion im Empfänger. Zellen des Spenders dargestellt in grün, Empfängerzellen in blau.

2.2. Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind im Körper für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz, Immunhomöostase und Modulation immunologischer Prozesse verantwortlich. Fehlen diese Zellen, kommt es zu schweren Autoimmunerkrankungen wie dem IPEX-Syndrom (*Immuno-dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked Syndrome*) des Menschen (Sakaguchi et al. 1995; Wildin et al. 2001), der *scurfy-like disease* der Maus (Lahl et al. 2007) oder überschießenden Immunreaktionen (Rudensky 2011).

Je nach Ursprung und Phänotyp lassen sich natürliche und induzierte regulatorische T-Zellen unterscheiden (Bluestone und Abbas 2003; Cottrez und Groux 2004; Ohkura et al. 2013) (Tabelle 1).

2.2.1. Natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg): Entwicklung und Phänotyp

Natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) gehen als eigenständige T-Zellpopulation aus dem Thymus hervor (Starr et al. 2003; Sakaguchi 2004; Hsieh et al. 2012; Caramalho et al. 2015). Wie genau es zu dieser Entwicklung kommt ist noch nicht abschließend untersucht. Ein zentraler Mechanismus scheint jedoch eine erhöhte Affinität der nTreg gegenüber präsentierten Selbstpeptiden zu sein, während konventionelle T-Zellen (T_{konv}) bei erhöhter Autoaktivität der Negativselektion unterliegen (Jordan et al. 2001; Suto et al. 2002; Hsieh et al. 2012). Vor allem dendritische Zellen spielen hierbei eine zentrale Rolle. Sie präsentieren im Thymus Antigene über MHC II an den T-Zellrezeptor der nTreg und steuern damit deren Entwicklung (Leventhal et al. 2016). Zusätzlich zum reinen TCR Signal über das prozessierte Antigen ist die Interaktion der Co-Rezeptoren CD80 oder CD86 auf den APC mit dem CD28 Rezeptor auf den regulatorischen T-Zellen für die Entwicklung der Zellen wichtig (Hsieh et al. 2012). Neben der TCR/MHC Interaktion scheinen auch Zytokine, allen voran IL-2 bei der Entwicklung von nTreg im Thymus eine Rolle zu spielen (Josefowicz et al. 2012; Cheng et al. 2013; Caramalho et al. 2015), wobei andere Studien diesen Zusammenhang nicht herstellen konnten (Fontenot et al. 2005b). Erste Untersuchungen, die hinweisend auf eine Population suppressiver Zellen im Thymus sind, beschrieben das Auftreten von spontaner Thyreoiditis bei thymektomierten Ratten (Penhale et al. 1973).

Initial wurden nTreg einzig über die Expression von CD4 und die alpha Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) phänotypisiert (Sakaguchi et al. 1995; Sakaguchi et al. 2001; Jonuleit et al. 2001; Dieckmann et al. 2001). Da aber auch aktivierte, konventionelle T-Zellen CD25 exprimieren war eine Differenzierung der beiden Zellpopulationen nur unzureichend möglich (Ukena et al. 2011a). Der wichtigste Marker für nTreg zurzeit ist der intrazelluläre Transkriptionsfaktor Forkhead-Box Protein P3 (FoxP3). FoxP3 steuert die Entwicklung von nTreg im Thymus und deren suppressive Eigenschaften im Organismus (Fontenot et al. 2003; Hori et

al. 2003; Yagi et al. 2004), wobei auch das Milieu der Zellen eine Rolle spielt und Einfluss auf die suppressiven Kapazitäten hat (Schadenberg 2011).

Die Induktion von FoxP3 in den Vorläuferzellen im Thymus erfolgt unter dem Einfluss von IL-2. Die erhöhte Affinität des TCR zu körpereigenem MHC führt zur Hochregulation von CD25 auf den Vorläuferzellen und resultiert in erhöhter Empfänglichkeit für IL-2, welche wiederum die Induktion von FoxP3 beeinflusst (Lio 2008). IL-2 ist damit für eine stabile Expression von FoxP3 verantwortlich, wodurch eine enge Verbindung zur Immunhomöostase und Fitness der Zellen besteht (Fontenot et al. 2005). Natürliche regulatorische T-Zellen machen beim Menschen etwa 5-10% der Gesamt CD4+ Population aus (Le und Chao 2007).

Ein weiterer Marker, der zur Differenzierung verwendet wird ist der Interleukin-7 (IL-7) Rezeptor (CD127). Zwischen der Expression von CD127 und FoxP3 besteht eine inverse Korrelation (Liu et al. 2006). Während aktivierte CD4+CD25+ T_{konv} CD127 in hohem Maße exprimieren, wird es auf natürlichen Treg herunterreguliert (Liu et al. 2006, Seddiki et al. 2006). Zusätzlich reguliert FoxP3 die Expression von CD127 direkt über die Bindung an dessen Promoter (Liu et al. 2006; Seddiki et al. 2006; Arroyo Hornero et al. 2017).

2.2.2. Periphere nTreg Homöostase

Für einen stabilen peripheren T-Zellpool sind mehrere Faktoren wichtig. Wie bei konventionellen T-Zellen ist die Interaktion von CD28 mit dem entsprechenden B.7 Rezeptor (CD80 oder CD86) auch für nTreg wichtig (Attridge und Walker 2014). Die Blockade von CD28 oder CD80/CD86 führt zu einer gesenkten Anzahl von nTreg in der Peripherie (Tang et al. 2003) und ist u.a. assoziiert mit der Entwicklung von autoimmun-bedingtem Diabetes (Salomon et al. 2000). Entsprechend dieses Zusammenspiels ergibt sich auch ein Zusammenhang zwischen dendritischen Zellen und der Größe des peripheren Treg-Zellkompartiments. Dabei spielt neben der Interaktion von CD28 und CD80/CD86 auf den dendritischen Zellen auch die Verfügbarkeit von mit Peptid-beladenen MHC II-Komplexen auf DCs eine Rolle (Attridge und Walker 2014), da dendritische Zellen die Proliferation von nTreg in der Peripherie (Zou et al. 2010; Suffner et al. 2010) induzieren. Experimentell entstehen schwere Immundefizienzen, wenn dieses Zusammenspiel fehlt (Ohnmacht et al. 2009). Die Menge des benötigten Antigens zur Expansion von nTreg ist etwa 10-100fach geringer als zur Aktivierung von naiven T-Zellen (Sakaguchi et al. 2008). *In vivo* ist zusätzlich IL-2 für die Reifung und Teilung der Zellen in der Peripherie (Zorn et al. 2006) und deren Überleben essentiell (Almeida et al. 2002; D'Cruz und Klein 2005) und auch die Funktion natürlicher regulatorischer T-Zellen ist eng mit IL-2 assoziiert (Malek et al. 2002; Setoguchi et al. 2005). Natürliche Treg können IL-2 nicht selbst produzieren und sind auf das von aktivierten T-Effektorzellen sezernierte IL-2 angewiesen (Malek und Bayer 2004; Setoguchi et al. 2005b). Im Zuge einer Immunantwort

durch Effektorzellen werden in einem der ersten Schritte nTreg durch das produzierte IL-2 aktiviert, wodurch die enge Beziehung dieser beiden „Systeme“ deutlich wird (O’Gorman et al. 2009). Das Spektrum der Antigenerkennung von nTreg ist vergleichbar mit dem von konventionellen CD4+ Zellen (Benoist und Mathis 2012).

2.2.3. Induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg)

Induzierte regulatorische T-Zellen gehen in der Peripherie aus konventionellen T-Zellen hervor und sind eine sehr heterogene Zellpopulation. Sie entstehen aus konventionellen CD4+CD25-FoxP3- T-Zellen nach Stimulation mit Fremdanthigenen unter subimmunogenen Konditionen z.B. als Teil des Darm- und Schleimhaut-assoziierten Immungewebes (gut-associated lymphoid tissue (GALT) und mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) (Faria, Ana M C und Weiner 2005; Kang et al. 2007b) und unter Einfluss von u.a. Transforming growth factor beta (TGF β) (Fu et al. 2004), aber auch durch chronische Entzündungen, Allergien u.a. (Curotto de Lafaille, Maria A et al. 2008). Eine zweite Population von iTreg entsteht simultan während einer T-Effektorzellantwort im inflammatorischen Milieu (Bilate und Lafaille 2012) und sowohl virale, als auch parasitäre und bakterielle Entzündungen können *in vivo* zur Induktion von iTreg führen (Bilate und Lafaille 2012). Für die Transformation in iTreg sind dendritische Zellen die potentesten APCs (Coombes et al. 2007; Yamazaki et al. 2007; Tawara et al. 2010), aber auch nTreg können aus konventionellen T-Zellen Treg induzieren (Jonuleit et al. 2002; Dieckmann et al. 2002). CD4+ iTreg können entsprechend ihres Vorkommens und den ihnen zugeschriebenen Wirkmechanismen weiter in T_R1, T_H3 u.a. Zellen unterteilt werden (Jonuleit und Schmitt 2003; Cottrez und Groux 2004; Carrier et al. 2007; Hall et al. 2011), wobei die Nomenklatur oft nicht einheitlich ist (Hawrylowicz und O’Garra 2005). Die Frequenz an iTreg in der Peripherie liegt, je nach Studie zwischen 4-7% innerhalb aller CD4+ Zellpopulation (Lathrop et al. 2008; Dons et al. 2012). *In vitro* können konventionelle T-Zellen unter Zugabe von TGF und Rapamycin bzw. Retinolsäure und IL-2 zu iTreg konvertiert werden, die *in vivo* funktionell sind (Zheng et al. 2002; Chen et al. 2003; Hippen et al. 2011a).

2.2.4. Treg Specific Demethylated Region (TSDR)

Natürliche regulatorische T-Zellen zeichnen sich durch eine stabile Expression von FoxP3 aus. Dieser Zustand wird durch die DNA Demethylierung in einer spezifischen Region des FoxP3 Lokus, der *Treg Specific Demethylated Region* (TSDR) erreicht (Baron et al. 2007). Der Methylierungsstatus der TSDR lässt jedoch keine Aussage über das Level der FoxP3 Expression, sondern nur über deren Stabilität zu (Polansky et al. 2008). Die Demethylierung

findet bereits in einem frühen Stadium während der Reifung der Zellen im Thymus statt und ist abgeschlossen, wenn die Zellen in die Peripherie auswandern (Toker et al. 2013). Induzierte regulatorische T-Zellen sind in der TSDR nicht oder nur unvollständig demethyliert, wodurch ihre FoxP3 Expression nur transient und nicht stabil ist (Baron et al. 2007; Floess et al. 2007; Polansky et al. 2008; Chen et al. 2011). Bei iTreg besteht daher die Möglichkeit eines „Zurückfallens“ in einen aktivierten, zytokinproduzierenden Effektorzellphänotyp ohne regulatorische Eigenschaften (Huehn et al. 2009; Kim et al. 2012).

2.2.5. Wirkmechanismen von nTreg und iTreg

Regulatorische T-Zellen vermitteln ihre suppressiven Eigenschaften über eine Vielzahl von Mechanismen. Nach bisheriger Studienlage kann jedoch kein Mechanismus ausschließlich nTreg oder iTreg zugeschrieben werden, da die *in vitro* Daten mitunter konträr zu *in vivo* Beobachtungen sind und der Wirkmechanismus evtl. vom Aktivierungsstatus der Zellen und dem Milieu bzw. der anatomischen Lokalisation der Immunreaktion abhängt (Vignali 2012).

Je nach Studie werden einzelne Wirkmechanismen eher nTreg oder iTreg zugeschrieben, wobei einige Analysen keine Unterscheidung der Zelltypen bei der Beschreibung machen.

In vitro wurde der direkte Zell-Zell-Kontakt als wichtigster Wirkmechanismus von nTreg beschrieben, da eine Immunmodulation durch Einsetzen einer Membran und damit Trennung der Zellkompartimente in der Zellkultur unterdrückt wurde (Thornton und Shevach 1998; Takahashi et al. 1998). *In vivo* können die Zellen außerdem indirekt über die Interaktion mit APCs, insbesondere dendritischen Zellen und direkt über Lyse der Effektorzelle agieren (Miyara und Sakaguchi 2007). Diese direkte Wirkung wird vor allem über Perforin und Granzym Proteine und daraus resultierend Zelllyse vermittelt (Grossman et al. 2004; Gondek et al. 2005; Shevach 2009). Auch T_{R1} iTreg können eine Immunantwort über diesen Weg vermitteln (Grossman et al. 2004). Indirekt inhibieren Treg eine Effektorantwort über die Interaktion von CTLA-4 der Treg und CD80/CD86 der DCs, wodurch dendritische Zellen zur Synthese und Sekretion immunsuppressiver Moleküle (Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)) angeregt werden (Vignali, Dario A A 2012). Zudem steht der B.7 Rezeptor nach Bindung an CTLA-4 nicht mehr für die Bindung an CD28 konventioneller T-Zellen zur Verfügung, wodurch ein wichtiger Schritt in der Aktivierung effektorischer T-Zellen unterbunden wird (Tang et al. 2006; Tadokoro et al. 2006). Zudem beeinflussen Treg die Reifung und Funktion dendritischer Zellen (Misra et al. 2004; Lewkowich et al. 2005) und führen zu verringerter Expression der costimulatorischen Moleküle CD80/CD86 wodurch die Aktivierung von Effektorzellen verringert wird (Cederbom et al. 2000). Ein Mechanismus, der vor allem, aber nicht exklusiv iTreg zugeschrieben wird, ist die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine. Dabei spielen vor allem IL-10 und *Transforming growth factor beta* (TGF β), aber auch IFN γ

eine Rolle (Annacker et al. 2001; Schmidt et al. 2012; Chowdary Venigalla et al. 2012). So modulieren T_R1 Zellen eine Immunantwort z.B. als Teil der oralen (Battaglia et al. 2004) oder Darm-assoziierten Abwehr über die Sekretion von IL-10 und TGF β (Groux et al. 1997; Annacker et al. 2003; Cottrez und Groux 2004) und sind mit der Entstehung von autoimmunbedingtem Diabetes (Typ 1 Diabetes) (Chujo et al. 2015), chronischen Erkrankungen (Carpentier et al. 2009) und Asthma (Hawrylowicz und O'Garra 2005) assoziiert. T_H3 Zellen produzieren vorwiegend TGF β und sind Teil der oralen Immunabwehr (Weiner 2001) und können den Verlauf einer experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) beeinflussen (Carrier et al. 2007). Eine Immunmodulation kann auch durch das „Abfangen“ und Nutzen des von konventionellen Effektorzellen produzierten Wachstumsfaktors IL-2 durch regulatorische T-Zellen bewirkt werden (Vignali 2012). Das IL-2 steht dadurch nicht mehr für die Effektorzellen zur Verfügung und die Zellen unterliegen der Apoptose oder werden nicht mehr weiter aktiviert (Scheffold et al. 2007; Pandiyan et al. 2007; Shevach 2009). Welche der beschriebenen Mechanismen eventuell prädominierend an der Immunregulation beteiligt ist, kann bisher nicht abschließend beurteilt werden. Natürliche und induzierte regulatorische T-Zellen haben im Körper jedoch synergistische Effekte (Curotto de Lafaille, Maria A und Lafaille 2009) und die Immunmodulation durch regulatorische T-Zellen ist ein mehrstufiger Prozess, deren Effektivität durch die Beeinflussung eines einzelnen Schritts beeinträchtigt werden kann (Sakaguchi et al. 2009).

Tabelle 1: Unterscheidung natürlicher und induzierter regulatorischer T-Zellen:
Schematischer Überblick der im Organismus vorkommenden Treg-Populationen und Unterscheidung der Zellen anhand ihres Ursprungs, des Phänotyps, der Art der Immunsuppression, sowie der Rolle in Immunprozessen und des Demethylierungsstatus¹.

	nTreg	iTreg	Tr1	Th3
Ursprung	Thymus	Peripherie	Peripherie	Peripherie
Phänoytp	CD4+CD25+ CD127-FoxP3+	CD4+FoxP3-/+	CD4+CD25-	CD4+CD25+
Suppression	Zell-Zell-Kontakt	IL-10	IL-10, TGF- β , (IFN γ)	TGF- β
Rolle in Immunprozessen	Regulation Autoimmuner- krankung & I nflammation	Regulation Autoimmuner- krankung & Inflammation	Darmimmunität Teil des GALT, Autoimmuner- krankung	orale Immunität, Teil des MALT
Demethylierung	Vollständig, stabil	unvollständig	unvollständig	unvollständig

2.2.6. Effektivität polyklonaler versus Antigen-spezifischer Treg

Regulatorische T-Zellen erkennen, wie konventionelle T-Zellen spezifische Antigene über ihren TCR. Dabei ist das Repertoire an möglich zu erkennenden Antigenen ebenso vielfältig wie bei T_{konv} (Benoist und Mathis 2012), wodurch die Menge an Treg, die ein ganz bestimmtes Antigen erkennen sehr gering ist. Da natürliche Treg nur einen geringen prozentualen Anteil innerhalb der gesamten CD4 Population ausmachen, ist für eine klinische Anwendung eine Expansion der Zellen im Vorfeld essentiell. Natürliche regulatorische T-Zellen können *in vitro* polyklonal über die Stimulation von CD3 und CD28 mittels magnetischer Partikel (*beads*) unter Erhalt ihres Phänotyps und ihrer suppressiven Eigenschaften expandiert werden (Godfrey et al. 2004; Hoffmann et al. 2004; Hippen et al. 2011b) und sind der Lage *in vitro* und *in vivo* Immunprozesse zu modulieren (Godfrey et al. 2004; Hoffmann et al. 2004; Battaglia et al. 2005; Battaglia et al. 2006; Peters et al. 2008; Vendetti et al. 2010; Hippen et al. 2011b; Sarkar et al. 2014; Earle et al. 2005). Innerhalb dieser polyklonal expandierten nTreg Population sind nur wenige Antigen-spezifische Zellen und damit die „Chance“, dass eine Zelle auf ihr zugehöriges Antigen trifft verhältnismäßig gering. Daher sind Antigen-spezifisch expandierte nTreg *in vitro* und *in vivo* effizienter. Eine Suppression der allogenen Effektorantwort kann mit einer geringen Menge an nTreg erreicht werden (Cohen et al. 2002; Chai et al. 2008; Peters et al. 2008; Veerapathran et al. 2011; Singh et al. 2012; Landwehr-Kenzel et al. 2014), ohne, dass die allgemeine Immunantwort vermindert wird (Govender et al. 2014). Antigen-spezifische nTreg können *in vitro* durch Co-Kultivierung mit dendritischen Zellen oder B-Zellen auch unter Guten Herstellungspraxis-Bedingungen (*Good Manufacturing Practice; GMP*) unter Erhalt ihrer immunmodulatorischen Kapazitäten expandiert werden (Cohen et al. 2002; Tarbell et al. 2004; Kretschmer et al. 2005; Masteller et al. 2006 (Veerapathran et al. 2011; Sagoo et al. 2012a; Landwehr-Kenzel et al. 2014; Hoffmann et al. 2004; Battaglia et al. 2006; Hippen et al. 2011b).

2.2.7. Klinische Relevanz regulatorischer T-Zellen

Natürliche regulatorische T-Zellen sind in der Lage eine Fülle von Immunprozessen im Körper zu modulieren, ohne die allgemeine Immunkompetenz zu unterdrücken (Kasagi et al. 2014). Daher sind sie im Kontext neuer Therapieoptionen z.B. für Organtransplantationen und Stammzelltransplantationen von großer Bedeutung und Interesse.

2.2.7.1. Relevanz von nTreg bei Organtransplantationen

Dass Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften eine Rolle für den Verlauf einer Organtransplantation haben könnten, zeigten bereits Studien in den 1980er Jahren, in denen die

Transfusion allogener Blutzellen im Vorfeld einer Herztransplantation zu einer verlängerten Akzeptanz des Organs führte (Marquet und Heystek 1981). Nach Identifikation einer speziellen Zellfraktion des Immunsystems innerhalb der T-Zellpopulation mit dem Phänotyp CD4+CD25+FoxP3+ wurden in vielen Studien Untersuchungen angestellt, ob eine Korrelation zwischen der Menge natürlicher regulatorischer T-Zellen und dem Verlauf von Organtransplantationen besteht. Sowohl im Tiermodell, als auch durch Auswertung von Patientendaten wird ein Zusammenhang zwischen regulatorischen T-Zellen und einer Abstoßungsreaktion, sowohl akut, als auch chronisch deutlich. Durch die Applikation regulatorischer T-Zellen wird die Abstoßung von transplantierten Herzen (Yuen-Shan Tsang et al. 2009) und Lebern (Pu et al. 2007) teils ohne zusätzliche Immunsuppression verhindert. Tolerierte Hauttransplantate weisen einen erhöhten Anteil an Treg auf und werden durch diese bei Re-Transplantation auf einen neuen Empfänger trotz zusätzlicher Stimulation durch allogene Splenozyten nicht abgestoßen (Graca et al. 2002). Akute Abstoßungsreaktionen sind im Vergleich zu chronischen Abstoßungen ein vergleichsweise geringeres Problem. Essentiell wichtig ist daher auch die Frage, inwieweit Treg in der Lage sind die Spätfolgen nach Transplantation zu beeinflussen. Arteriosklerose ist eine Folge chronischer Abstoßungsreaktionen und führt über die Verdickung der Intima mit resultierend verringertem Lumen der Gefäße im Transplantat zur Ischämie und folgenden Organschäden (Nadig et al. 2010). Die Applikation regulatorischer T-Zellen, sowohl ex vivo expandierter (Nadig et al. 2010) als auch frisch isoliert Treg (Siemeni et al. 2016) konnten in einem xenogenen Gefäßtransplantationsmodell die Wandveränderungen signifikant verringern.

Nicht nur im experimentellen Modell kann der Zusammenhang zwischen regulatorischen T-Zellen und Abstoßungsreaktionen veranschaulicht werden. Auch bei Patienten von Haut- (Bozulic et al. 2011), Lungen- (Meloni et al. 2004a), Leber- (Demirkiran et al. 2006; Li et al. 2008; Sakamoto et al. 2009; Stenard et al. 2009; Li et al. 2006a), Herz- (Dijke et al. 2008) und Nierentransplantation (Salama et al. 2003; Braudeau et al. 2007; Martin et al. 2007; Karczewski et al. 2009; Iwase et al. 2011) weisen akzeptierte Transplantate höhere Mengen an suppressiven Zellen auf, wobei auch das Verhältnis zwischen konventionellen Effektorzellen und Treg einen Einfluss auf das Ergebnis post transplantationem hat (Li et al. 2006a). Bei Lungentransplantationen spielen vor allem die *chronic lung allograft injury* (CLAD) und die das Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS) eine große Rolle und sind limitierend für den Langzeiterfolg der Transplantation (Gregson et al. 2010; Salman et al. 2016). Der Anteil an regulatorischen T-Zellen in der Lavageflüssigkeit und im Blut gilt als prädiktiver Wert für den Verlauf der Erkrankungen, da erkrankte Patienten jeweils eine verringerte Menge an Treg aufweisen (Meloni et al. 2004a; Gregson et al. 2010; Salman et al. 2016). Auch bei Patienten nach Nierentransplantation ist der Anteil an FoxP3+ T-Zellen im Gewebe für die Transplan-

tatfunktion entscheidend und hat neben der Immunsuppression Einfluss auf den klinischen Verlauf (Bestard et al. 2008).

Da Immunsuppressiva, je nach Wirkmechanismus und Applikationsdauer die Langzeittransplantatfunktion mitunter maßgeblich negativ beeinflussen können, wäre idealerweise eine Toleranzinduktion gegenüber dem allogenen Gewebe ohne weitere Immunsuppression wünschenswert (Govender et al. 2014). In diesem idealen Szenario würden die regulatorischen T-Zellen im Transplantat die Abstoßung verhindern. Tatsächlich beschreiben Einzelfallberichte das vollständige Absetzen der Immunsuppression nach Transplantation. Die alloreaktiven T-Zellen wurden gegenüber dem Antigen durch Einfluss der regulatorischen T-Zellen hyporesponsiv und das Transplantat in der Folge nicht abgestoßen (Yoshizawa et al. 2005). Wird dieser Zustand durch Applikation von anti-CD25 monoklonalen Antikörpern aufgehoben, kommt es in der Folge zur Abstoßung des Transplantats (Li et al. 2006a; Li et al. 2006b).

Für den Erfolg einer Organtransplantation scheinen regulatorische T-Zellen also eine entscheidende Rolle zu spielen. Durch die Etablierung von Protokollen zur Expansion von nTreg unter Erhalt ihres suppressiven Phänotyps und ihrer immunmodulatorischen Kapazitäten ist die *ex vivo* Expansion einer großen Menge von nTreg möglich geworden. *In vitro* und *in vivo* verhindern sowohl polyklonal (Issa et al. 2010) als auch allospezifisch (Golshayan et al. 2007; Landwehr-Kenzel et al. 2014) expandierte nTreg die Abstoßung von allogenen Hauttransplantaten. Die Sicherheit dieser applizierten Zellen ist durch mehrere Studien belegt (Brunstein et al. 2011a; Marek-Trzonkowska et al. 2013).

Natürliche regulatorische T-Zellen beeinflussen also den Verlauf nach Transplantation und die Transplantatfunktion maßgeblich, sodass ein gezielter klinischer Einsatz dieser Zellen sinnvoll ist.

2.2.7.2. Relevanz von nTreg bei Stammzelltransplantation

Die Applikation allogener Stammzellen wird zur Therapie von malignen und benignen Erkrankungen des hämopoetischen Systems durchgeführt. Durch die im Transplantat enthaltenen Immunzellen, vor allem T-Zellen kann es in Folge dieser Behandlung zur Entstehung einer *Graft versus Host Disease* (GvHD) kommen (Shlomchik 2007). Regulatorische T-Zellen spielen im Verlauf dieser Erkrankung, ähnlich wie bei Transplantation solider Organe eine Rolle.

2.3. Graft versus Tumor Effekt

Der Term *Graft versus Tumor* beschreibt im Wesentlichen die Indikation allogener Stammzelltransplantation bei malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Dieser besteht in der antileukämischen Wirkung allogener Stammzellen (van Besien et al. 2001). In der Literatur findet man auch häufig den Begriff „*Graft versus Leukemia*“ (GvL) oder „*Graft of malignancies*“ (Childs et al. 1999). Die erste Beschreibung wurde nach Knochenmarkstransplantationen als Zufallsbefund gemacht (Barnes et al. 1956): Tiere, die nach einer Radiotherapie allogenes Knochenmark erhielten, erlitten im Unterschied zu den mit autologen Zellen behandelten Tieren keinen Tumorrückfall, wodurch erstmal ein Graft versus Leukemia Effekt durch allogene Immunzellen angenommen wurde (Barnes et al. 1956). Dieser antileukämische Effekt scheint bei Patienten, die leichte bis milde Abstoßungsreaktionen auf das Transplantat zeigen, längeranhaltend zu sein, als bei Patienten ohne Abstoßung oder nach Transplantation autologer Zellen (Weiden et al. 1979). Durch eine Depletion von T-Zellen im Transplantat wird dieser Effekt verringert (Horowitz et al. 1990). Für die Lyse der Tumorzellen sind vor allem die im Transplantat enthaltenen T-Effektorzellen verantwortlich (Bleakley und Riddell 2004).

2.4. Graft versus Host Disease (GvHD)

Die Graft versus Host Disease (GvHD) ist eine potentiell letal verlaufende Erkrankung, die vor allem nach allogener Stammzelltransplantation auftritt (Copelan 2006; Green und Hind 2016). Sie stellt mit ihrer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate die größte Limitation einer allogenen Stammzelltransplantation dar (Ferrara und Deeg 1991). In selteneren Fällen tritt die Erkrankung auch nach der allogenen Transplantation solider Organe auf (Gulbahce, MD, H. Evin et al. 2003; Kohler et al. 2008; Smith 2010; Rogulj et al. 2012; Green und Hind 2016).

Die im Transplantat enthaltenen Effektorzellen greifen neben malignen Zellen auch gesundes, anhand des MHC-Profiles und von minor Histokompatibilitätsmolekülen als fremd erkanntes Gewebe an (Korngold und Sprent 1978; Hu und Cotliar 2011). Vergleichbar den Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation werden verschiedene Formen der GvHD unterschieden.

2.4.1. Akute Graft versus Host Disease

Eine akute GvHD setzt klassischerweise innerhalb von 100 Tagen nach Stammzelltransplantation ein (Dignan et al. 2012). Dieser Zeitpunkt entspricht in etwa dem Zeitpunkt des *engraftments* der transplantierten Zellen (Ball und Egeler 2008). Persistiert die Erkrankung

oder kommt es zu einem Rezidiv, können akute Krankheitsverläufe auch nach einhundert Tagen auftreten (Salomao et al. 2016). Desweiteren können akute Krankheitsverläufe de novo auch nach Tag 100 (im Durchschnitt 5,5 Monate) in Form einer sog. *late onset* GvHD auftreten (Arora et al. 2016; Salomao et al. 2016). Dies ist besonders bei Patienten mit nicht-myeloablativem Konditionierungsregime möglich (Mielcarek et al. 2003; Gronningsaeter et al. 2017), wobei andere Untersuchungen keinen Einfluss des Konditionierungsregimes festgestellt haben (Arora et al. 2016). Verschiedene Risikofaktoren wie Alter, zugrundeliegende Erkrankung und Konditionierungsregime können die Entstehung einer GvHD begünstigen (Gale 1985; Hahn et al. 2008; Jagasia et al. 2012) Die Inzidenz, mit der eine akute GvHD auftritt, beträgt abhängig vom mismatch zwischen Donor und Empfänger 20%-50% (Ball und Egeler 2008), teils sogar bis zu 80% (Martin et al. 2012).

Die Pathophysiologie der akuten Graft versus Host Disease kann in mehrere Phasen unterteilt werden (Ferrara und Deeg 1991; Ferrara; Ferrara et al. 1999; Reddy und Ferrara 2003; Welniak et al. 2007; Sung und Chao 2013) (Abb.4). Einerseits hat die zugrundeliegende Erkrankung mitunter bereits zu einem massiven Gewebeschaden geführt (Green und Hind 2016). Zum anderen führte die Präkonditionierung (*recipient conditioning*) mittels Radio- und Chemotherapie in der ersten (afferenten) Phase der Erkrankung zur Schädigung des Empfängergewebes mit Zerstörung der natürlichen Hautbarriere und des Darmendothels (Ball und Egeler 2008). Besonders die myeloablative Radiotherapie und vorangegangene Chemotherapie spielen in dieser Phase eine entscheidende Rolle (Hill und Ferrara 2000; Paris et al. 2001; Nagler et al. 2013) und die Wahl des Konditionierungsregimes hat einen direkten Einfluss auf die Entstehung und die Schwere einer Graft versus Host Disease (Mielcarek et al. 2003). Durch die Zerstörung des Endothels im Gastrointestinaltrakt kann es zur Translokation von Erregerprodukten wie LPS in die Zirkulation und folgend mitunter zur Sepsis kommen. Auch die Migration allogener T-Effektorzellen in die Lymphbahnen und in die Zielorgane wird durch eine Radiotherapie „erleichtert“ (Vianello et al. 2013). Durch die resultierende Aktivierung von APCs wie Makrophagen mit anschließender Zytokinproduktion von TNF α , IFN γ und Interleukinen kommt es zur vermehrten Expression von MHC Molekülen und Adhäsionsmolekülen mit anschließender T-Zellantwort. (Ball und Egeler 2008; Salomao et al. 2016). Aktuelle Konditionierungsregimes sind vorwiegend nicht-myeloablativ, um die resultierenden Folgen zu mindern (Childs et al. 1999; Bleakley und Riddell 2004; Buchholz und Ganser 2009), wodurch die Inzidenz für milde (Grad I-II) und schwere GvHD (Grad III-IV) deutlich reduziert werden kann (Gao et al. 2013).

Nach Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen kommt es zur Interaktion der Spender T-Zellen im Transplantat mit den APCs des Empfängers. Dies führt in der zweiten Phase zur Aktivierung der Effektorzellen (Salomao et al. 2016). Die dendritischen Zellen des Empfängers, als wichtigste APCs (Banchereau und Steinman 1998; Shlomchik et al. 1999) werden

durch untergehendes Gewebe, translozierte Bakterienprodukte infolge geschädigten Gewebes nach Konditionierung und Zytokinen wie TNF alpha aktiviert (Sallusto und Lanzavecchia 2002) und führen zur Expansion der allogenen T-Zellen. Die Interaktion von Chemokinerezeptoren und Selektinliganden führt zur Migration der aktivierten T-Zellen aus den sekundären Lymphorganen in das Zielgewebe (Sung und Chao 2013) und in der dritten Phase (Effektor Phase) kommt es durch den resultierenden Zytokinsturm (*cytokine storm*) über TNF alpha und Interleukine wie IL-2, sowie Granzyme und Perforin der zytotoxischen T-Zellen zur Apoptose des Gewebes im Empfänger mit folgend Endorganschäden (Ferrara et al. 1999; Reddy und Ferrara 2003; Ball und Egeler 2008; Salomao et al. 2016).

Phasen der akuten GvHD:

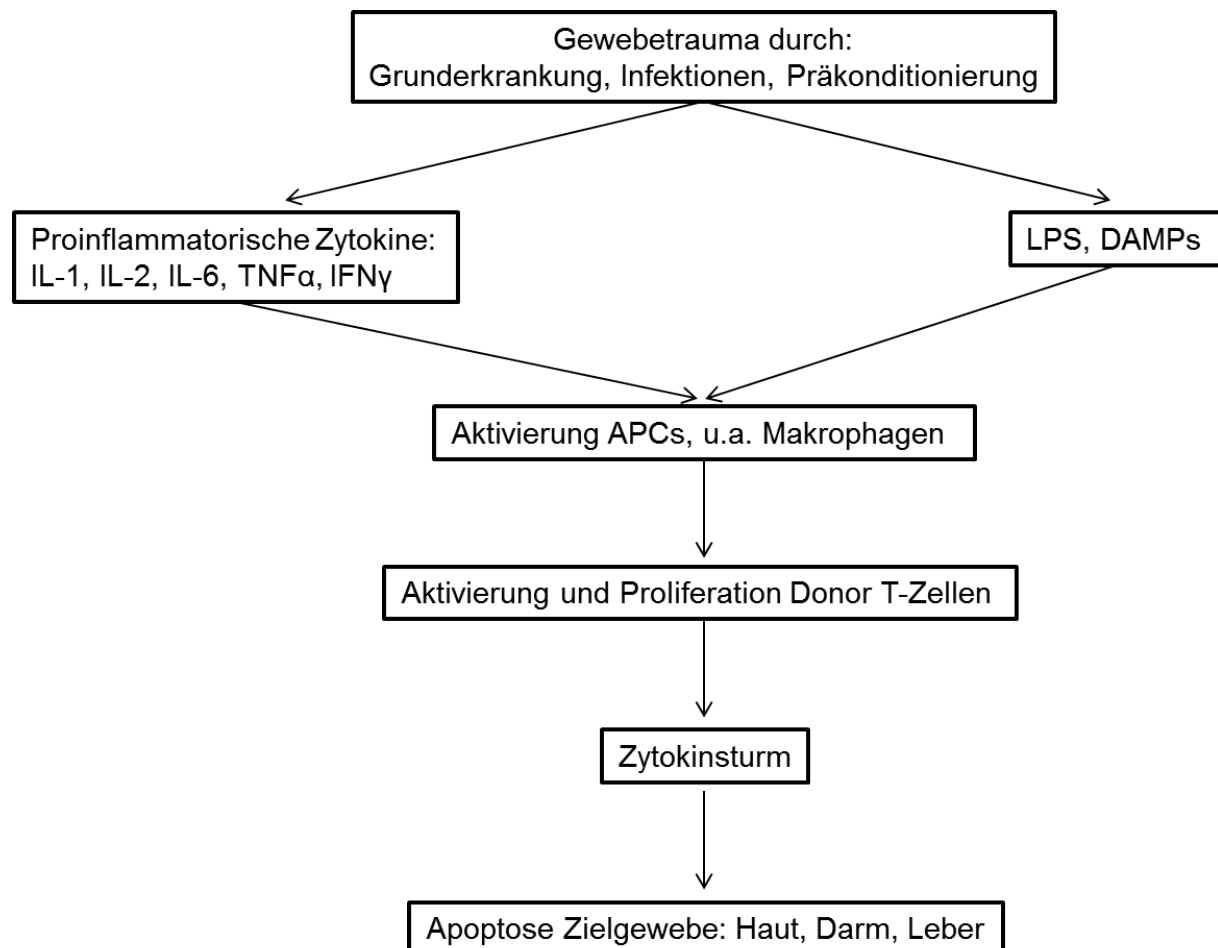


Abb. 4: **Phasen der akuten GvHD:** Pathophysiologie der akuten Graft versus Host in Disease in einzelnen Schritten entsprechend der Beschreibung durch Ferrara et al. (Ferrara et al. 1999) und Salomao et al. (Salomao et al. 2016).

2.4.1.1. Zielgewebe akuter Graft versus Host Disease

Die akute GvHD betrifft Haut, Darm und Leber (Sung und Chao 2013). Diese Gewebe sind wahrscheinlich durch die physiologisch hohe Expression von APCs und damit MHC II das primäre Ziel einer akuten GvHD (Ferrara et al. 1999; Matsukuma et al. 2016). Neben diesen Organen kann die Erkrankung auch die Lunge (Atkinson et al. 1991; Crawford et al. 1993; Workman und Clancy, JR 1994; Cooke et al. 1998; Cooke und Yanik 2004; Bolaños-Meade et al. 2005; Miklos et al. 2008; Xu et al. 2013), das Gehirn (Ma et al. 2002; Panoskaltis-Mortari et al. 2004) und die Nieren (Panoskaltis-Mortari et al. 2004) betreffen.

In der Regel sind akute und chronische Nieren- und Lungenerkrankungen mit assoziierter Dysfunktion allerdings eher Folge von u.a. einer akuten GvHD denn primäres Zielgewebe (Ditschkowski et al. 2013; Nakasone et al. 2013; Kemmner et al. 2016; Gronningsaeter et al. 2017).

Mittels Biolumineszenzbildgebung und Immunfluoreszenzmikroskopie konnte dargestellt werden, dass die allogenen Zellen innerhalb weniger Tage (etwa 72h) Milz, Darm und Lymphknoten, sowie Haut und Leber infiltrieren (Panoskaltis-Mortari et al. 2004; Beilhack et al. 2005). Abhängig vom Grad der Veränderungen wird nach der 1994 *Consensus Conference on Acute GVHD Grading* eine Graduierung der Erkrankung vorgenommen (Przepior-ka et al. 1995), woraus sich der Schweregrad der akuten GvHD ableiten lässt. Je nach Grad der aGvHD kann die Mortalitätsrate über 90% betragen (Dignan et al. 2012). Vor allem der Grad der Darm GvHD beeinflusst den Verlauf der Erkrankung maßgeblich (Green und Hind 2016). Da der Schweregrad aber nicht immer zwangsläufig den weiteren klinischen Verlauf repräsentiert, gibt es mittlerweile verschiedene Biomarker, die die Mortalitätsrate besser vorhersagen können (Levine et al. 2015).

Die Symptome der GvHD sind oft unspezifisch und überschneiden sich mitunter mit anderen Erkrankungen (virale, bakterielle oder Pilzinfektionen) oder Medikamentenreaktionen (Gale 1985; Hu und Cotliar 2011). Es gibt keine für eine GvHD pathognomonischen Veränderungen (Green und Hind 2016). Fast alle Patienten mit einer akuten GvHD Grad II-IV weisen Hautveränderungen auf, gefolgt von Darm- und Leberveränderungen (Arai et al. 2016; Green und Hind 2016). Darm- und Leberveränderungen treten fast nie solitär, sondern fast immer in Kombination, vor allem mit Hautsymptomen auf (Kambham et al. 2014; Arai et al. 2016). Allerdings reduziert eine Beteiligung der Leber das Überleben der Patienten deutlich und 10% sterben noch deutlich vor Tag 100 (Arai et al. 2016). Je nach mismatch zwischen Spender und Transplantempfänger dominieren CD4+ oder CD8+ T-Zellen das Bild der Erkrankung (Shlomchik 2007). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die Art der Immunantwort in den jeweiligen Organen durch unterschiedliche Effektormechanismen mediiert wird (Deeg 2003; Green und Hind 2016).

2.4.1.2. Klassische Therapie akute Graft versus Host Disease

Die Therapie der akuten GvHD besteht in der Applikation von Immunsuppressiva. Das Ziel der Behandlung besteht in der Regulation der unerwünschten Graft versus Host Disease bei minimalem Risiko eines Tumorrückfalls, geringer Inzidenz einer Infektion mit Viren, Bakterien oder Pilzen und möglichst geringen Medikamenten-assoziierten Organschäden (Dignan et al. 2012). Trotz präemptiver Therapie erkranken bis zu 80% an einer akuten GvHD nach allogener Stammzelltransplantation (Martin et al. 2012) und je nach Schwere der Erkrankung gibt es entsprechende Therapieempfehlungen (Dignan et al. 2012). Medikamente, die häufig Anwendung finden sind Ciclosporin A (CsA), Mycophenolat Mofetil (MMF) und Glukokortikoide wie Methylprednisolon (Pred.). Letztgenannte stellen immer noch den Goldstandard der Therapie dar und werden als sog. *first line* Therapie beim Auftreten einer akuten GvHD angewandt (Bacigalupo 2011). Insgesamt sollte die Therapie individuell an den Patienten angepasst werden (McDonald 2016). Trotzdem kann es immer wieder zur Über- oder Untertherapie mit entsprechenden Folgen für den Patienten kommen (Levine et al. 2015).

2.4.1.2.1. Ciclosporin A

Ciclosporin ist ein Immunsuppressivum, das aus dem Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum* gewonnen wird (Wartburg und Traber 1986). Im Körper wird durch die Bindung von Ciclosporin A an Calcineurin die Dephosphorylierung von *nuclear factor activating T-cell* (NF-AT) durch Calcineurin blockiert, wodurch die Gene proinflammatorischer Zytokine wie IL-2 und IFN γ nicht mehr abgelesen werden. Durch das Fehlen von IL-2 wird die Aktivierung und Expansion von T-Zellen gehemmt (Allison 2000).

Ciclosporin A hat allgemein einen inhibitorischen Effekt auf nTreg (Wang et al. 2006; Zeiser et al. 2006; Coenen et al. 2007a; Ma et al. 2009; Lu et al. 2010b; Lim et al. 2010a; Miroux et al. 2012). Durch die Bindung an Calcineurin und der folgenden Unterdrückung der Interleukinsynthese steht das für die Reifung und Expansion der nTreg essentielle IL-2 nicht mehr zur Verfügung, woraus der inhibitorische Effekt abgeleitet wird. Unter Zugabe von exogenem IL-2 kann jedoch auch unter Einfluss von CsA die Proliferation von nTreg stattfinden (Satake et al. 2014). Der inhibitorische Effekt von CsA scheint dosisabhängig zu sein, da mit geringeren therapeutischen Dosen ein positiver Effekt von CsA auf Treg erreicht werden kann (Kawai et al. 2005; Siepert et al. 2012), wobei es zu einem erhöhten Anteil an FoxP3 je Zelle kommt (Fanigliulo et al. 2015).

Vor allem die Langzeitapplikation von Ciclosporin A ist mit einer Vielzahl unerwünschter Wirkungen assoziiert. Dazu zählen Nierenschäden, Hypertension und Leberschäden (Graham 1994; Bennett et al. 1996; Dieterle et al. 1990; de Mattos, Angelo M. et al. 2000), sowie

Mikroangiopathien (Elsallabi et al. 2016), wodurch der Langzeittherapieerfolg von Transplantationen gemindert werden kann. Zudem führt die allgemeine Immunsuppression durch Ciclosporin A zu einem gesteigerten Infektionsrisiko und kann zur Entstehung schwerer viraler und bakterieller Infektionen oder Erkrankungen durch Pilze führen (Sayer et al. 1994).

2.4.1.2.2. Mycophenolat-Mofetil (MMF)

Die immunsuppressive Wirkung von Mycophenolat-Mofetil (MMF) wird durch dessen Ester, der Mycophenolsäure vermittelt. Durch die reversible Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) wird die Synthese des Purinnukleotids Guanosin inhibiert, welches die T- und B-Lymphozyten für ihre Proliferation benötigen (Allison 2000). Anders als andere Zellen können T- und B-Lymphozyten Guanosin nicht über den Wiederverwertungsstoffwechsel benutzen, sondern sind auf die de novo Synthese der Purine angewiesen, wodurch MMF die T-Zellproliferation reversibel hemmt, ohne auf die Zytokinproduktion Einfluss zu nehmen (Allison und Eugui 2000). Ähnlich Ciclosporin A ist der Effekt von MMF auf die Funktion regulatorischer T-Zellen dosisabhängig entweder hemmend oder fördernd. Während hohe Dosen die Funktion einschränken, wird sie durch niedrige Dosen unterstützt (Lim et al. 2010). Bei Langzeitapplikation oder in der Kombination mit 1 α 25-dihydroxyvitamin D3 führt die Gabe von MMF zur Induktion regulatorischer T-Zellen und folgend zur Toleranz gegenüber dem Alloantigen (Gregori et al. 2001; Velthuis et al. 2006). Die unerwünschten Wirkungen von MMF sind vor allem unspezifische gastrointestinale Symptome wie Durchfall und Erbrechen, sowie hämatologische Veränderungen wie Anämie und Thrombozytopenie, wodurch medikamenten-assoziierte unerwünschte Wirkungen mitunter schwierig von krankhaften Veränderungen differenziert werden können (Minagawa et al. 2012; Salomao et al. 2016).

2.4.1.2.3. Glukokortikoide

Glukokortikoide stellen bis heute den Goldstandard und damit die *first line* Therapie in der Behandlung einer Graft versus Host Disease dar (Martin et al. 2012; Wolff et al. 2013). Die immunsuppressiven Eigenschaften von Glukokortikoiden werden über direkte und indirekte Mechanismen vermittelt. Direkt führt die Bindung der Glukokortikoide an den Glukokortikoidrezeptor z.B. zur Bindung an bestimmte Stellen der DNA (sog. *non- Glukokortikoid responsive elements*) und führt zur Inaktivierung von Genen, die für pro-inflammatorische Zytokine codieren (Zen et al. 2011).

Indirekt wird über die Blockade des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) die für eine Immunantwort essentielle Synthese von Zytokinen und Adhensionsmolekülen unterdrückt (Rhen und Cidlowski 2005; Zen et al. 2011). Zusätzlich führen Glukokortikoide über die Bindung an den Glukokortikoidrezeptor in den Mitochondrien zur Apoptose konventioneller T-Zellen (Sionov et al. 2006).

Auf regulatorische T-Zellen haben Glukokortikoide *in vitro* einen proliferationshemmenden Effekt ohne ihre Funktionalität zu beeinflussen (Miroux et al. 2012). *In vivo* kann es sowohl zu reduzierten absoluten und relativen Mengen an Treg kommen (Sbiera et al. 2011), als auch zu einer selektiven Expansion von regulatorischen T-Zellen durch eine Kurzzeittherapie mit Dexamethason (Chen et al. 2006). Klinisch haben Glukokortikoide bei Anwendungen für Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (Azab et al. 2008), Asthma bronchiale (Karagiannidis et al. 2004) und multipler Sklerose (Braithc et al. 2009) einen fördernden Effekt auf Treg, der in einem erhöhten Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ Zellen in den Patienten resultiert, während u.a. die Synthese von IL-2 durch T_H1 Zellen reduziert wird (Zen et al. 2011). Durch Glukokortikoide wird die Expression von FoxP3 mRNA erhöht, wodurch im folgenden mehr Treg generiert werden (Demirkiran et al. 2008). Durch Zusatz von Vitamin D3 und Dexamethason (Barrat et al. 2002) oder Fluticason (Peek et al. 2005) können Treg *in vitro* generiert werden. Bei diesen Zellen handelt es sich wahrscheinlich um Tr1 iTreg (Karagiannidis et al. 2004).

Bei etwa der Hälfte der Patienten wirkt die initiale Therapie mit Steroiden gut. Das Ansprechen auf die Behandlung hängt vor allem vom Schweregrad und den betroffenen Zielorganen ab. Bei milderer Formen ist eine Therapie in der Regel erfolgreicher. Während eine GvHD der Leber oft gut mit Glukokortikoiden kontrolliert werden kann, wird der Therapieerfolg bei Beteiligung des Darms deutlich vermindert (Green und Hind 2016). Bei sog. *low risk GvHD* kann ggf. auch eine topische Therapie mit Steroiden erfolgen, während schwere Formen mitunter trotz Therapieanpassung voranschreiten (McDonald 2016). Die Mortalitätsrate bei sog. non-respondern ist entsprechend hoch (McDonald 2016). Bessert sich eine akute GvHD nicht innerhalb von 7-14 Tagen auf die Glukokortikoidtherapie, spricht man von einer Steroid-refraktären Erkrankung. In diesem Fall werden zusätzliche Medikamente als *second line* Behandlung appliziert (Pavletic und Fowler 2012). Diese sog. Steroid-refraktäre GvHD stellt ein großes Problem dar. Die Erkrankung ist in diesem Fall durch konventionelle Therapie oft nicht mehr kontrollierbar (Pidala und Anasetti 2010). Ohne weitere Behandlungsmöglichkeiten kommt zur Progression der Erkrankung. Glukokortikoide haben, vor allem bei systemischer Langzeitanwendung ein breites Spektrum an unerwünschten Wirkungen. Neben der allgemeinen Immunsuppression können gastro-intestinale Störungen wie Vomitus, Diarrhoe, aber auch Ulzera, ebenso wie Störungen der Glukosehomöostase (Hyperglykämie), Hyperlipidämie, Osteoporose, Stammfettsucht, kardio-vaskuläre Probleme, Pankreatitis und

neurologische Probleme (z.B. Bewusstseinsveränderungen) (Kleiman und Tuckermann 2007; Moghadam-Kia und Werth 2010) auftreten.

Bei allen konventionellen Immunsuppressiva besteht zudem die Gefahr eines Tumorrückfalls, da der GvL- Effekt genauso unterdrückt wird wie eine akute GvHD (Edinger et al. 2003).

2.4.1.3. Klinische Relevanz regulatorischer T-Zellen im Zusammenhang mit GvHD

Die klinische Relevanz regulatorischer T-Zellen im Verlauf einer GvHD konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* dargelegt werden. Versuche im Modell der allogenen Knochenmarkstransplantation bei Mäusen zeigen, dass klinischer Verlauf und Überlebensrate von Treg abhängen (Taylor 2002; Cohen et al. 2002). Die Überlebenszeit der Tiere mit CD25- T-Zell-depletierten Transplantaten war signifikant geringer, als bei Tieren deren Transplantat CD4+CD25+ T-Zellen enthielten. Mehr noch als das reine Vorhandensein von CD4+CD25+ T-Zellen im Transplantat spielt das Verhältnis dieser Zellen im Vergleich zu konventionellen Effektorzellen eine Rolle (Hoffmann et al. 2002). In einem Verhältnis von 1:1 (Treg zu T_{konv}) wird eine GvHD unter Erhalt des GvL sowohl durch frisch isolierte (Edinger et al. 2003), als auch *in vitro* expandierte Treg unterdrückt (Trenado et al. 2003).

Auch Patientendaten weisen auf eine Korrelation zwischen der Menge an regulatorischen T-Zellen im Transplantat und der Entstehung und Schwere einer GvHD hin (Rezvani et al. 2006; Li et al. 2010; Danby et al. 2015). Die Schwere der Erkrankung korreliert invers mit der Menge an FoxP3 mRNA (Miura et al. 2004; Hess 2006) und der Expression an FoxP3. Die Zellen scheinen direkt in die Zielorgane zu migrieren und den Empfänger zu schützen, da Patienten mit einer GvHD des Gastrointestinaltrakts eine deutlich erniedrigte Anzahl an Treg in der Mukosa aufweisen als Patienten ohne Erkrankung (Rieger et al. 2006). Die Treg supprimieren im Zielgewebe Zytokine, Chemokinrezeptoren und *homing* Rezeptoren auf den Effektorzellen und verringern damit die Adhäsion und Migration von CD8+ T-Zellen (Mavin et al. 2012). Zudem unterstützen Treg den Erhalt der Thymus- und Lymphknotenarchitektur nach allogener Stammzelltransplantation. Dadurch wird die Immunrekonstitution des Empfängers post transplantationem schneller erreicht (Trenado et al. 2003; Nguyen et al. 2008; Gaidot et al. 2011; Di Ianni et al. 2011). Dies ist insofern von Bedeutung, da die Patienten nach der Transplantation immunkomprimiert sind und entsprechend anfällig für Infektionen mit opportunistischen Erregern oder einem Tumorerzidiv (Duggleby und Madrigal 2014).

Physiologischerweise zirkulieren nTreg nur zu einem geringen Prozentsatz im peripheren Blut; die Expansion im Vorfeld einer klinischen Anwendung ist somit essentiell. Dabei können die Zellen polyklonal oder Antigen-spezifisch expandiert werden, wobei beide Zellprodukte effektiv vor einer GvHD schützen können (Albert et al. 2005; Föhse et al. 2011). Die Applika-

tion expandierter nTreg ist sicher, nebenwirkungsfrei und führt nicht zu einer erhöhten Infektion mit opportunistischen Erregern oder Viren (Brunstein et al. 2011a; Di Ianni et al. 2011a). Die Therapie mit regulatorischen T-Zellen schützt auch ohne zusätzliche Immunsuppression vor einer GvHD (Di Ianni et al. 2011). Der adoptive Zelltransfer ist jedoch nur dann effizient, wenn die Zellen vor oder zum Zeitpunkt der Stammzelltransplantation werden; bei einer bereits bestehenden akuten GvHD konnten die Zellen bisher keine Verbesserung des Krankheitsbildes bewirken (Trzonkowski et al. 2009).

Chronische GvHD

2.4.1.3.1. Xenogene Modelle zu regulatorischen T-Zellen und GvHD

Xenogene Tiermodelle eignen sich zur Untersuchung humaner Zellen im Vorfeld einer möglichen klinischen Anwendung im Menschen zur Überprüfung auf Effektivität und Sicherheit des Arzneiproduktes.

In vivo konnte so die Effektivität frisch isolierter (Mutis et al. 2006) und polyklonal expandierter Treg zur Abschwächung einer xenogenen GvHD ohne unerwünschte Arzneiwirkungen belegt werden (Cao et al. 2009; Hannon et al. 2014), wobei frisch isolierte nTreg im Vergleich zu expandierten Zellen weniger effizient sind (Wu et al. 2008; Singh et al. 2012).

Im Zusammenhang mit Standardimmunsuppressiva sind polyklonal expandierte nTreg *in vivo* nicht ausreichend untersucht. Für eine etwaige klinische Anwendung ist die Fragestellung bezüglich der Interaktion zwischen medikamentöser und zellbasierter Therapie unerlässlich.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der *in vivo* Effektivität *ex vivo* polyklonal expandierter natürlicher regulatorischer T-Zellen als Monotherapeutikum und vor allem in Kombination mit den Standardimmunsuppressiva Ciclosporin A, Mycophenolat-Mofetil und Methylprednisolon zur Prävention einer induzierten xenogenen Graft versus Host Erkrankung. Zudem sollte der Einfluss der konventionellen Immunsuppression auf den prozentualen Anteil und die suppressive Kapazität von nTreg untersucht werden.

3. Material

Lösungen, Medien und Zusätze für die Zellkultur

<i>Lösungen / Komponente</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Biocoll	Biochrom AG, D-12247 Berlin
DNase I	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-91625 Schnelldorf
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)</i>	PAA Laboratories, A- 4061 Pasching
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-6185 Karlsruhe
<i>FcR blocking reagent, human</i>	Miltenyi Biotec GmbH, D-51429 Bergisch Gladbach
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, D-12247 Berlin
<i>Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)</i>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-91625 Schnelldorf
Humanes AB-Serum	PAA Laboratories, A- 4061 Pasching, Austria
Interleukin-2 (IL-2)	Chiron Behring, D-35041 Marburg
Kollagenase II	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-91625 Schnelldorf
Kollagenase IV	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-91625 Schnelldorf
<i>LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium</i>	PAA Laboratories, A- 4061 Pasching, Austria
Rapamycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-91625 Schnelldorf
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, D-12247 Berlin
X-Vivo™ 15 Zellkulturmedium	Lonza, B-4800 Verviers, Belgium

Kits

Lösungen / Komponente	Bezugsquelle
<i>CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec GmbH, D-51429 Bergisch Gladbach
<i>Treg Expansion Kit: polyclonal beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH, D-51429 Bergisch Gladbach
<i>BD FastImmune Human Regulatory T Cell Function Kit</i>	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg

Kulturmedium zur Expansion regulatorischer T-Zellen

Komponente	Menge
Humanes AB-Serum	5ml (10%)
Interleukin-2	125µl (200U/ml)
Rapamycin 100ng/ml	50µl (1:1000)
Treg Expansion Kit: polyclonal beads	Miltenyi Biotec GmbH, D-51429 Bergisch Gladbach
X-Vivo™ 15 Zellkulturmedium	ad 50ml

Zusammensetzung verwendeter Waschpuffer

MACS-Puffer

Komponente	Menge
EDTA	2nM
Fötale Kälberserum	2,5ml (0,5%)
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	ad 500ml

Waschpuffer Durchflusszytometrie (FACS-Puffer)

Komponente	Menge
Fötales Kälberserum	10ml (2%)
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	ad 500ml

Antikörper

Marker / Antigen	Clone	Fluorochrom	Bezugsquelle
Live / Dead ®	/	Fixable Aqua for 405 nm excitation	Life Technologies GmbH, D-64293 Darmstadt
CD3	UCHT1	APC-Alexa Fluor® 750	Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld
CD3	SK7	PerCP-Cy™5.5	Becton Dickinson, D- 69126 H
CD4	13B8.2	APC	Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld
CD4	RPA-T4	Alexa Fluor ® 700	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg
CD4	SK3	FITC	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg
CD8	B9.11	APC-Alexa Fluor® 700	Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld
CD8	SK1	APC-Cy™7	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg
CD19	J3-119	ECD	Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld
CD25	M-A251	APC	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg
CD25	M-A251	PE	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg
CD25	2A3	PE	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg
CD25	B1.49.9	Pe - CY7	Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld
CD45	J33	Pacific Blue™	Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld

Material

CD45 anti mouse	30-F11	5 PerCP Cy5.5	Biolegend, D- 54341 Fell
CD56	N901	PE	Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld
CD69	L78	PE-Cy™7	Becton Dickinson, D- 69126 H
CD127	R34.34	APC-Alexa Fluor® 700	Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld
CD154	89-76	APC	Becton Dickinson, D- 69126 H
FoxP3	259D/C7	Alexa Fluor® A488	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg
Ki67	B56	PerCP - CY5.5	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg
Interleukin 2	MQ1-17H12	PE	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg
TNF alpha	MAb11	PE – Cy7	Becton Dickinson, D- 69126 Heidelberg
Interferon gamma	4S.B3	Brilliant Violet 421 PB	Biolegend, D- 54341 Fell

Injektionslösungen

Komponente	Bezugsquelle
Ampuwa aqua ad injectabilia	Fresenius Deutschland GmbH, D-61346 Bad Homburg
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	PAA Laboratories, A- 4061 Pasching, Austria
NaCl 0,9% Infusionslösung	Fresenius Deutschland GmbH, D-61346 Bad Homburg
Ketamin: Ursotamin® 10%	Serumwerk Bernburg AG, D-06406 Bernburg
Xylazin: Rompun® 2%	Bayer Animal Health Care, D-51368 Leverkusen

Immunsuppressiva

Komponente	Bezugsquelle
Cyclosporin A: Sandimmun ® 50mg/ml	Novartis Pharma GmbH, D-90327 Nürnberg
Mycophenolatmofetil: CellCept ® 1g/5ml	Roche Pharma AG, D-79639 Grenzach-Wyhlen
Methylprednisolon: Urbason ® soluble 32mg	Sanofi Aventis Deutschland GmbH, D-65926 Frankfurt am Main

Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
96er-Lochplatte	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
24er-Lochplatte	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Brefeldin A	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-91625 Schnelldorf
Erythrozytenlysepuffer	Qiagen GmbH, D-40724 Hilden
Färberöhrchen 1,4 ml	Micronic Europe, Niederlande-8211 AR Lelystad
FoxP3 <i>staining buffer set</i>	eBioscience, D-60528 Frankfurt
FlowClean Cleaning Agent, 500 mL	Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld
Ionomycin 1mg/ml	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-91625 Schnelldorf
Kanülen 26G x $\frac{3}{8}$ "	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Kanülen 27G x $\frac{3}{4}$ "	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Kryoröhrchen 1,8ml	Sarstedt AG & Co, D-51588 Nümbrecht
Petrischale BD Falcon®, Einweg, steril	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-91625 Schnelldorf
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Sarstedt AG & Co, D-51588 Nümbrecht

Material

Rundbodenröhrchen BD Falcon® (FACS-Röhrchen)	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Safe-Lock Gefäße™	Eppendorf AG; D-22339 Hamburg
Schraubdeckelröhrchen BD Falcon® 15ml	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Schraubdeckelröhrchen BD Falcon® 50ml	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Serologische Pipetten	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Skalpell, Einweg, steril	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Japan-531-0075 Osaka
Spritzen 1ml	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Transferpipetten 3,5ml, Einweg	Sarstedt AG & Co, D-51588 Nümbrecht
Zellsieb BD Falcon® Cell Strainer 40µm	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Zellsieb BD Falcon® Cell Strainer 70µm	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg
Zellsieb BD Falcon® Cell Strainer 100µm	Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg

Geräte

Gerät	Bezugsquelle
-80°C Gefriervorrichtung	Liebherr-International Deutschland GmbH D-88400 Biberach an der Riß
Absaugvorrichtung Zellkultur	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, D- 69123 Heidelberg
autoMACS pro Separator	Miltenyi Biotec GmbH, D-51429 Bergisch Gladbach
Bestrahlungsgerät Cs137 Quelle OB29/4	Strahlungstechnik und Strahlungsschutz GmbH, Braunschweig
CASY Model TT Zellzähler	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, D-68305 Mannheim
CO2-Begasungsbrutschrank Heracell® 240	Thermo Fisher Scientific GmbH, D-58239 Schwerte
Durchflusszytometer Navios™ 10/3	Beckman Coulter GmbH, D-47807 Krefeld

Kamera Histologie Olympus DP80	Olympus Deutschland GmbH, D-20097 Hamburg
Kühl-Gefrierkombination Liebherr Premium	Liebherr-International Deutschland GmbH D-88400 Biberach an der Riß
Mikroskop Olympus BH2	Olympus Deutschland GmbH, D-20097 Hamburg
Mikroskop Histologie Olympus BX41	Olympus Deutschland GmbH, D-20097 Hamburg
Neubauer Zählkammer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, D-97922 Lauda Königshofen
Pipette 1-10µl	Eppendorf AG; D-22339 Hamburg
Pipette 10-100µl	Eppendorf AG; D-22339 Hamburg
Pipette 100-1000µl	Eppendorf AG; D-22339 Hamburg
S1 Pipettierhilfe <i>Matrix</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH, D-58239 Schwerte
Sterilwerkbank Kojair Biowizard	Kojair Tech Oy, Fin- 35700 Vilppula, Finland
StrepMan Magnet	IBA GmbH, D-37079 Göttingen
Thermomixer TM R	Thermo Fisher Scientific GmbH, D-58239 Schwerte
Vortex Mixer VM-300	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, D- 69123 Heidelberg
Wasserbad WB10	P-D Industriegesellschaft mbH, D-01159 Dresden
Zentrifuge Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific GmbH, D-58239 Schwerte

Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Formaldehyd 5% gepuffert	Herbeta Arzneimittel, D-12099 Berlin
Trypanblaulösung	Biochrom AG, D-12247 Berlin

Software

Software	Bezugsquelle
Analysesoftware Durchflusszytometrie: <i>FCS Express 4 Flow Cytometry</i>	De Novo Software, Los Angeles, CA 90010
Analysesoftware Durchflusszytometrie: <i>Kaluza Flow Cytometry Analysis Software</i>	Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld
Auswertungsprogramm Statistik: GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA 92037 USA
Tabellenverarbeitung: Excel 2010	Microsoft Corporation, One Microsoft Way Redmond, WA 98052-6399
Imagingsoftware Histologie cellSens Standard	Olympus Deutschland GmbH, D-20097 Hamburg
Literaturverwaltungsprogramm: Citavi 4.4	Swiss Academic Software GmbH, 8820-Ch Wädensweil

Tiere

Für die Versuche wurden adulte männliche und weibliche Balb/c NOD/SCID IL-2Rgamma^{-/-} Mäuse verwendet. Die Tiere stammten aus eigener Nachzucht aus dem Tierversuchsvorhaben TVV 2023. Die Elterntiere wurden über Charles River (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld) bezogen. Der Antrag auf das Versuchsvorhaben trägt die Genehmigungsnummer: G 0483/09. Alle Tiere wurden in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in einem isoliert-ventilierten Käfig (IVC) gehalten. Die Tiere erhielten autoklaviertes Futter in Pelletform und Wasser ad libitum.

4. Methoden

4.1. Zellen

Alle im Experiment verwendeten Zellen zum Zweck der Injektion in die Versuchstiere stammten von gesunden Spendern. Diese wurden im Vorfeld über das Versuchsvorhaben aufgeklärt und waren mit der Verwendung des Materials in diesem Zusammenhang einverstanden.

4.2. Isolation humaner mononukleärer Blutzellen (huPBMCs) aus Vollblut

Die Isolation humaner mononukleärer Zellen aus frischem Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Es wurden zunächst je 20ml Vollblut mit Pufferlösung (*Dulbecco's phosphate buffered saline* (PBS), PAA Laboratories, A- 4061 Pasching) auf ein Gesamtvolumen von 35ml verdünnt und anschließend auf 15ml Trennlösung (Biocoll, Biochrom AG, D-12247 Berlin) in ein 50ml Schraubdeckelröhrchen (Falconröhrchen, Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg) aufgeschichtet. Bei 400 x g wurden die Zellen dann 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert und dabei ihrer Dichte entsprechend aufgetrennt.

Zellen, mit einer höheren Dichte als die der Trennlösung ($\rho = / \geq 1,077\text{g/ml}$), wie etwa Erythrozyten passieren die Lösung, während Lymphozyten sich über ihr ansammeln. Diese als weißer Ring sichtbare Schicht wurde dann mit einer Transferpipette (Sarstedt AG & Co, D-51588 Nümbrecht) abgenommen und in ein frisches 50ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Um Reste von Serum oder Trennlösung zu entfernen, wurden die Zellen im Anschluss auf ein Volumen von 50ml mit PBS aufgefüllt und bei 4°C für 10min bei 200 x g erneut zentrifugiert (*gewaschen*). Im Folgenden wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 500µl PBS resuspendiert. Zellsuspensionen desselben Spenders wurden dann in einem Schraubdeckelröhrchen zusammengeführt und auf ein Gesamtvolumen von 10ml mit PBS aufgefüllt.

Danach wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Dafür wurden einer Probe von 10µl die gleiche Menge (10µl) Trypanblau zugesetzt (Verdünnungsfaktor 2 und beides gut vermischt). Ausgezählt wurden je Probe zwei Eckquadrate.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mit der Formel: Gesamtzellzahl = ((gezählte Zellen / gezählte Quadrate) x Verdünnungsfaktor x 10^4) x Probenvolumen.

Im Anschluss wurde die Zellsuspension erneut herunter zentrifugiert (10 min 4°C, 200 x g) und nach Verwerfen der Überstände erfolgte die Resuspension der Zellen, je nach weiterem Arbeitsschritt mit PBS (bei anschließender Applikation in ein Versuchstier) oder MACS-Puffer (zur Isolation humaner nTreg).

4.3. Isolation CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ „nTreg“ Zellen aus humanen PBMCs

Aus den vorher gewonnenen huPBMCs wurden mit Hilfe des *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kits* (Miltenyi Biotec GmbH, D-51429 Bergisch Gladbach) die natürlichen regulatorischen T-Zellen isoliert.

Dafür wurden die Zellen zunächst auf ein Volumen von 90µl MACS-Puffer / 10⁷ Zellen gebracht und in ein 15ml Falcon überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des CASY-Zellzählers (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, D-68305 Mannheim).

Zur Separation der CD4⁺ Zellen wurden im ersten Schritt 10µl eines Antikörpermix pro 10⁷ Zellen gegeben und die Suspension gut vermenget. Dieser sog. *Cocktail* beinhaltet Biotin-gekoppelte Antikörper gegen CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγδ und CD235a. Nach einer Inkubationszeit von 5min bei 4°C wurden der Probe sog. Anti-Biotin *MicroBeads* in einer Menge von 20µl je 10⁷ Zellen zugesetzt. Diese sind mit mikro-Magnetpartikeln versehen und binden an das Biotin des ersten Antikörpers, wodurch alle CD4⁻ Zellen indirekt magnetisch markiert wurden. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10min bei 4°C im Kühlschrank wurde die Suspension mit 1ml / 10⁷ Zellen MACS-Puffer aufgefüllt und für 10min bei 4°C bei 200xg gewaschen und anschließend das Zellpellet nach Abgießen des Überstandes in 500µl / 10⁸ Zellen resuspendiert. Mit Hilfe des AutoMACS pro Separator (Miltenyi Biotec) wurden die Zellen über eine magnetische Säule (Programm: *depl.05*) automatisch entsprechend in eine markierte (CD4⁻) und eine nicht-markierte Fraktion (CD4⁺) separiert. Nach Abschluss dieses Schritts wurden die CD4⁺ Zellen bei 200xg für 10min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand anschließend abgenommen und das Pellet in 90µl MACS-Puffer / 10⁷ Zellen aufgenommen. Die Angaben für Zellmengen beziehen sich entsprechend Benutzeranleitung des Herstellers auf die Ausgangszellzahl vor Beginn der Isolation.

Zur Isolation der CD25⁺ Fraktion aus der CD4⁺ Population wurden anschließend 10µl *CD25 MicroBeads* je 10⁷ Zellen (entsprechend Ausgangszellzahl) zugesetzt. Somit erfolgte, anders als im ersten Isolationsschritt, eine direkte Markierung der Zielzellen mit magnetisch gekoppelten Antikörpern. Nach 15minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen in insgesamt 2ml MACS-Pufferlösung gewaschen (200 x g, 10 min. bei 4°C). Nach Abnahme des Überstandes wurde, wie im ersten Schritt, das Pellet in 500µl MACSPuffer / 10⁸ Zellen resuspendiert. Die anschließende Positivselektion erfolgte ebenfalls über eine magnetische Säule (AutoMACS pro Separator Miltenyi Biotec, Programm *posseld2*). Nach Abschluss der Separation wurden alle Zellfraktionen im CASY-Zellzähler gezählt, danach mit MACS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 15ml aufgefüllt und anschließend gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und von jeder Zellfraktion wurden Aliquots zur Bestimmung der Reinheit der Isolate abgenommen.

4.4. Phänotypische Charakterisierung der Zellisolate mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Reinheit der Isolate wurde von jeder Zellfraktion jeweils ein Aliquot von $1 \cdot 10^5$ Zellen abgenommen, gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellen wurden extrazellulär mit einer Lebend-Tot-Färbung (Live/Dead) und Antikörpern gegen CD3 (Allophycocyanin (APC)-Alexa Fluor® 750; Clone UCHT1), CD4 (Allophycocyanin (APC); Clone 13B8.2), CD8 (APC-Alexa Fluor® 700; Clone B9.11), CD25 (Phycoerythrin Cyanine 7 (Pe - CY7) Clone B1.49.9) und intrazellulär FoxP3 (Alexa Fluor® A488; Clone 259D/C7) gefärbt.

Dafür wurde das jeweilige Aliquot zunächst in insgesamt 100µl FACS-Puffer in einem Rundbodenröhrchen (FACS-Röhrchen, BD Bioscience) resuspendiert. Die Antikörper für die extrazelluläre Färbung wurden eingebracht und die Zellen für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Um die Zellen auf die intrazelluläre Färbung vorzubereiten wurden sie im Anschluss an die extrazelluläre Färbung mit 500µl Fixierungs/Permeabilisierungspuffer (FoxP3 staining buffer set, eBioscience, San Diego) aufgefüllt und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Probe mit 4ml Permeabilisierungspuffer (FoxP3 staining buffer set, eBioscience, San Diego) aufgefüllt und die Zellen darin für 10min bei 200 x g bei 4°C gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und der Antikörper für das intrazelluläre FoxP3 (Clone 259D/C7) hinzugefügt. Die Zellen wurden erneut für 20 min., bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben mit FACS-Puffer aufgefüllt und gewaschen. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in insgesamt 150µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch (Navios™ 10/3, Beckman Coulter GmbH, D-47807 Krefeld) gemessen. Die Analyse der gemessenen Proben erfolgte mittels Kaluza Flow Cytometry Analysis Software (Beckman Coulter GmbH, D- 47807 Krefeld).

Im Vorwärts-Seitwärts-Scatter (FS-SS Scatter) wurden im ersten Schritt entsprechend der Zellgröße die Lymphozyten *gated*. Aus der Lymphozytenpopulation wurden die lebenden Zellen dargestellt und aus diesen die CD3⁺ aufgetragen. Aus den CD3⁺ T-Zellen wurden dann die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen dargestellt und aus den CD4⁺ Zellen in weiteren Schritten die CD4⁺CD25⁺ und letztlich die CD25⁺FoxP3⁺ (nTreg) dargestellt.

4.5. In vitro Expansion CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen (nTreg)

Eine Variante zur Vervielfältigung natürlicher regulatorischer T-Zellen ist die polyklonale Expansion, bei der die Zellen TCR-spezifisch, aber antigen-unspezifisch quantitativ vermehrt werden.

4.5.1. Polyklonale Expansion humaner nTreg

Die Expansion erfolgte polyklonal mittels magnetischer Partikel, sog. *Expansionbeads* (*Treg Expansion Kit: polyclonal beads*; Miltenyi Biotec GmbH). Diese magnetischen Partikel sind mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 versehen und imitieren damit die Interaktion mit einer antigenpräsentierenden Zelle. Pro well einer 96-loch Platte wurden je $1 \cdot 10^5$ Zellen in 100 μ l Kulturmedium ausplattiert und zunächst über Nacht ruhen gelassen. Am Folgetag wurden die *Beads* im Verhältnis 4:1 (*Beads*:Zellen) pro well zur Kultur gegeben. Bebrütet wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator.

Restimuliert wurde jeweils an Tag 9 (+2). Dazu wurden die Zellen im CASY- Zellzähler gezählt und erneut zu $1 \cdot 10^5$ Zellen / well einer 96-loch Platte oder zu $5 \cdot 10^5$ Zellen / well einer 24-loch Platte neu ausgesät. Die *Beads* wurden im Verhältnis 4:1 (*Beads*:Zelle) hinzugegeben und die Kultur weiter bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Das Medium wurde je nach Farbe, spätestens jedoch zum Zeitpunkt der Restimulation gewechselt. Der Farbumschlag im Medium resultierte aus pH-Wertveränderungen bedingt durch die Nährstoffverwertung. Bei hoher Stoffwechselaktivität schlägt der Indikator von rot nach gelb um. Die *Beads* wurden vor der Verabreichung der Zellen in die Versuchstiere magnetisch entfernt. Dazu wurden die Zellen in einem 15ml Schraubdeckelröhrchen in 10ml Medium für 10 min an einen Magneten (StrepMan Magnet, IBA GmbH, D-37079 Göttingen) gestellt. Die *Beads* lösten sich dabei von den Zellen und wurden in Richtung des Magneten angezogen, während die Zellen in der Lösung verblieben. Die Zellsuspension wurde abgenommen und in ein neues 15ml Schraubdeckelröhrchen überführt und der Vorgang wiederholt. Nach Abnahme der Zellen wurden die regulatorischen T-Zellen anschließend mit PBS gewaschen, um sie vom Medium zu befreien und die Zellen anschließend im CASY-Zellzähler gezählt. Die entsprechende Zellzahl zur Applikation wurde in 100 μ l PBS in einem Safe-Lock Gefäß™ (Eppendorf AG; D-22339 Hamburg) aufgenommen.

4.6. Analyse der suppressiven Kapazität expandierter nTreg (Suppressionassay)

Zur Ermittlung der suppressiven Kapazität der expandierten nTregs wurde ein *Suppressionassay* entsprechend Herstelleranleitung (BD FastImmune Regulatory T-Cell Function Kit, BD Bioscience) exemplarisch an einem Zellprodukt durchgeführt. In eine 96-loch Platte wurden je Loch $5 \cdot 10^5$ humane PBMCs in 100 μ l Nährmedium ausplattiert und in unterschiedlichen Verhältnissen die poliklonal expandierten nTreg in 100 μ l Nährmedium hinzugefügt (PBMCs:nTreg im Verhältnis 1:1, 1:0,5 und 1:0,25). Neben einer Positivkontrolle ohne nTreg wurde eine Kontrolle, welche nur nTreg ohne PBMCs enthielt (Negativkontrolle) mitgeführt. Die jeweiligen Kontrollproben wurden nur mit 100 μ l Nährmedium auf ein Gesamtvolumen

von 200µl aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 30 min im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ ruhen gelassen. Danach wurden 20µl des *activation cocktail*, beinhaltend CD3/CD28 beads, CD154 (APC; Clone 89-76) als Aktivierungsmarker der konventionellen T-Zellen und PBS zu den PBMC/nTreg Proben pipettiert, die Zellen mit dem Agens gut vermengt und für 3 min bei 250 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 7h bei 37°C bei 5% CO₂ im Inkubator ruhen gelassen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei 500 x g wurden die Zellen danach für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach Resuspension in 200µl PBS wurde dieser Schritt wiederholt. Anschließend wurden die Zellen mit Fluorochromen für CD3 (Peridinin chlorophyll Cyanin 5.5 (PerCP Cy-5.5; Clone SK7), CD4 (Fluorescein isothiocyanat; (FITC) Clone SK3), CD25 (Phycoerythrin (PE); Clone 2A3) und CD69 (PE-CyTM7; Clone L78) gefärbt und für 30 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen, um nicht gebundene Antikörper auszuwaschen. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch gemessen, um die suppressive Kapazität der expandierten nTreg zu bestimmen. Zur Analyse wurden im Vorwärts-Seitwärts-Scatter zunächst die Lymphozyten dargestellt. Aus den Lymphozyten wurden im nächsten Schritt die CD25 negativen Zellen gated und aus diesen weiter die CD3+CD4⁺ und CD3+CD4⁻ T-Zellen dargestellt. Die Expression von CD69 und CD154 in den jeweiligen Zellpopulationen (stimuliert vs. unstimuliert mit und ohne nTreg innerhalb der CD3+CD4⁻ bzw. CD3+CD4⁺ T-Zellen) wurden jeweils als Histogramm dargestellt und analysiert (Abb. 5).

Die Berechnung der Suppression erfolgte über folgende Formel:

$$\text{Suppression} = 100 - [(\text{Prozent PBMCs mit Treg} / \text{Prozent PBMCs ohne Treg}) \times 100]$$

Die Messung erfolgte am Navios® Durchflusszytometer (BeckmanCoulter). Ausgewertet wurden die Daten mit FCS Express4 Analysesoftware (De Novo Software, Los Angeles, CA 90010).

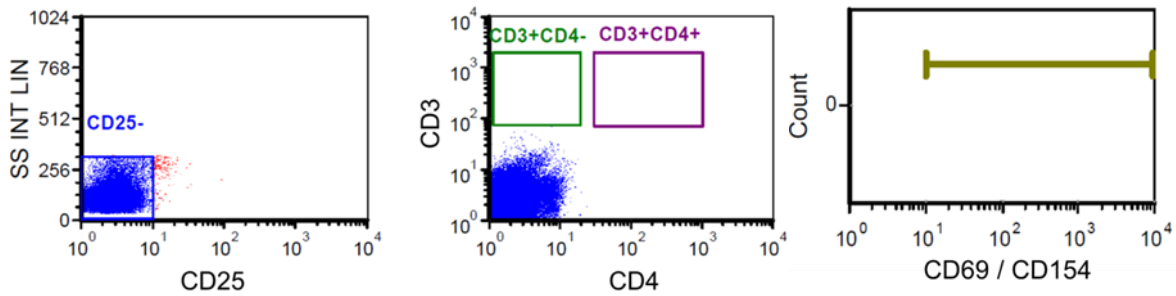


Abb. 5: **Gatingstrategie Suppressionassay:** Aus der Lymphozytenpopulation wurden zunächst CD25- Zellen gated und aus diesen im nächsten Schritt die CD3+ Zellen, unterteilt nach CD4+ und CD4-, dargestellt. Beide Populationen wurden auf die Expression von CD69 und CD154 analysiert.

Die Suppression wurde über die prozentuale Expression von CD69 und CD154 unter Zugabe von nTreg in unterschiedlichen Dosierungen mittels folgender der Formel berechnet:
 Suppression in % = $100 - \left[\left(\frac{\text{Prozent PBMCs mit Treg}}{\text{Prozent PBMCs ohne Treg}} \right) \times 100 \right]$. Als Vergleich diente eine Positivkontrolle (stimulierte PBMCs ohne nTreg) und eine Negativkontrolle (nTreg allein).

4.7. Analyse des Zytokinprofils expandierter nTreg (Zytokinassay)

Zur zusätzlichen Charakterisierung der expandierten nTreg wurde an einem Zellprodukt exemplarisch ein Zytokinassay durchgeführt. Dazu wurden stimulierte, sowie unstimulierte regulatorische T-Zellen auf ihre Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interferon gamma (INF γ) und Interleukin-2 (IL-2) analysiert. Als Positivkontrolle dienten CD4+FoxP3- konventionelle T-Zellen (non-Treg).

Für den Assay wurden die Zellen am Vortag in Kulturmedium ohne Zusatz von IL-2 und Rapamycin gegeben und über Nacht bei 4°C ruhen gelassen. Pro Ansatz wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen verwendet. Die Zellen wurden zunächst in ein FACS-Röhrchen pipettiert und das Volumen mit Kulturmedium ohne IL-2 und Rapamycin auf insgesamt 1ml/Ansatz aufgefüllt. Zu jedem zu stimulierenden Ansatz wurden 2 μ l (2,5 μ g/ml) Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA; Sigma Aldrich Chemie GmbH) und 1 μ l Ionomycin (Sigma Aldrich Chemie GmbH) gegeben. Nach einer Inkubation für 90 min im Inkubator bei 35°C wurde die Stimulation der Zellen durch Zugabe von 2 μ l Brefeldin A (Sigma Aldrich Chemie GmbH) abgestoppt. Anschließend wurden die Proben für weitere 4,5h ruhen gelassen und mit FACS-Puffer aufgefüllt, bei 200 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen, so dass ein Restvolumen von 100 μ l pro Röhrchen verblieb. Die Fluorochrome zur extrazellulären Färbung von CD4 (Alexa Fluor® 700; Clone RPA-T4) und CD25 (APC; Clone M-A251) wurden zu jeder Probe zugefügt und alles für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 500 μ l Fixierungspuffer zugegeben und die Zellen erneut für 30 min bei 4°C im Dunkeln stehen gelassen. Nach Zugabe von 2ml Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen bei 4°C mit 200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Antikörper für FoxP3 (Alexa Fluor® A488; Clone 259D/C7), IL-2 (PE; Clone MQ1-17H12), TNF α (PE-Cy7; Clone MAb11) und Interferon γ (Brilliant Violet

421 Pacific Blue; Clone 4S.B3) zugegeben. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Proben mit FACS-Puffer auf insgesamt 1ml aufgefüllt und gewaschen. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression der Zytokine gemessen. Zunächst wurde aus der Lymphozytenpopulation die CD4+ Fraktion dargestellt und aus dieser die regulatorischen T-Zellen anhand der Expression von CD25 und FoxP3 gated. Die Zytokine wurden aus der nTreg bzw. non-Treg Population jeweils gegeneinander auf den Achsen aufgetragen und gemessen.

Die Messung erfolgte am Navios® Durchflusszytometer (BeckmanCoulter), die Auswertung wurde mittels Kaluza Flow Cytometry Analysis Software durchgeführt.

Tab. 2: **Mastermix für den Zytokinassay zur phänotypischen Analyse expandierter nTreg:** Zur Messung der Zytokine der jeweiligen T-Zellpopulation wurden folgende Marker in der angegebenen Menge verwendet:

Marker	Clone	Fluorochrom	µl
CD4	RPA-T4	APC Alexa700	2
CD25	M-A251	APC	10
FoxP3	259D/C7	AlexFluor 488	10
IL-2	MQ1-17H12	PE	3
TNF alpha	MAb11	PeCy7	3
IFN gamma	4S.B3	Brilliant Violett 421PB	5

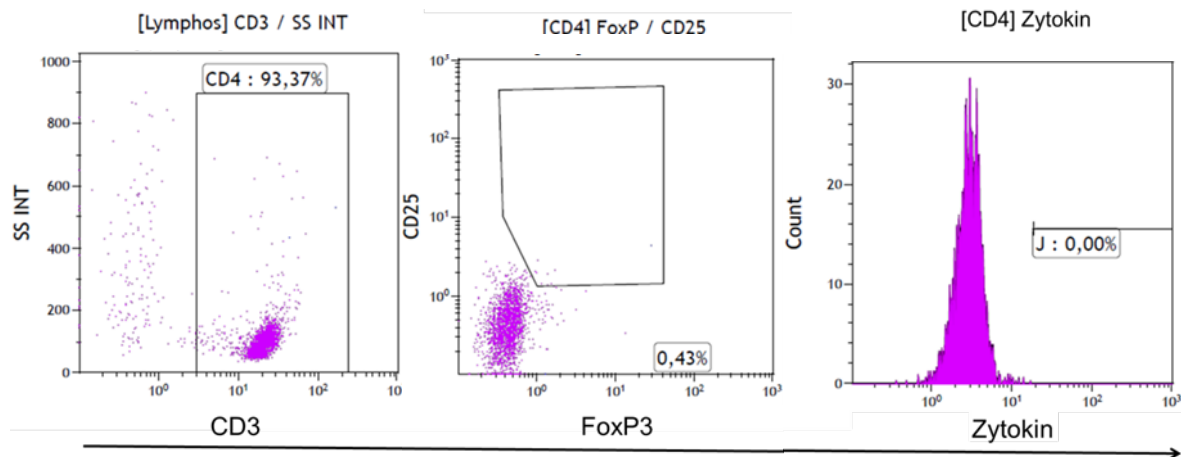


Abb. 6: **Gatingstrategie zur Zytokinanalyse:** Aus den Lymphozyten wurden zuerst die CD4+ T-Zellen dargestellt. Im nächsten Schritt wurde aus diesen die CD25+FoxP3+ (nTreg) Population gated und diese jeweils auf die Expression von IL-2, IFN gamma und TNF alpha einzeln bzw. zusammen (doppelt positive Zellen) gemessen. Die non-Treg wurden mittels Boolean-Gate aus CD4+FoxP3- dargestellt.

4.8. Versuchsablauf allgemein

Adulte männliche und weibliche Balb/c NOD/SCID IL-2Rgamma^{-/-} Mäuse wurden zunächst in Ultrakurznaarkose mit Ketamin (0,08mg/g) und Xylazin (0,012mg/g) mit einer Dosis von 300cGy subletal bestrahlt. Am folgenden Tag (d0) erfolgte die intravenöse (i.v.) Applikation von $3 \cdot 10^6$ frisch isolierten huPBMCs und, je nach Gruppe, von regulatorischen T-Zellen im vorher definierten Verhältnis 2:1, 1:1 oder 1:2 (PBMCs:nTreg) über die laterale Schwanzvene, wobei das insgesamt applizierte Flüssigkeitsvolumen bei jedem Tier immer 300µl betrug. Die Therapie mit Immunsuppressiva erfolgte, beginnend an d+1 täglich bis zum Ende des Versuchs, jedoch maximal bis d+35. Ciclosporin A (CsA; Sandimmun ® 50mg/ml Novartis Pharma GmbH, D-90327 Nürnberg) wurde in einer Dosis von 4mg/kg subkutan (s.c.) im Bereich des Nackens injiziert. Mycophenolatmofetil (MMF; CellCept ® 1g/5ml Roche Pharma AG, D-79639 Grenzach-Wyhlen) wurde in einer Menge von 0,5mg oral (p.os) verabreicht und Methylprednisolon (Pred.; Urbason ® solubile 32mg Sanofi Aventis Deutschland GmbH, D-65926 Frankfurt am Main) wurde intraperitoneal (i.p.) in einer Dosis von 20mg/kg appliziert.

An d+7 wurden max. 200µl Blut aus der lateralen Schwanzvene durch einen mikro-Schnitt mit einem Einwegskalpell entnommen und das Blut auf den prozentualen Anteil humaner Zellen durchflusszytometrisch analysiert, um zu untersuchen, wie viele der Zellen zu diesem Zeitpunkt noch zirkulieren.

Die Tiere wurden täglich zur gleichen Zeit gewogen und auf Veränderungen bezüglich Verhalten, Haltung, Fellbeschaffenheit u.a. hin untersucht. Bei einem Verlust von >20% Körper-

gewicht oder schlechtem klinischen Erscheinungsbild (gebuckelte Haltung, struppiges Fell, Isolation von der Gruppe), spätestens jedoch an d+35 wurden die Mäuse in tiefer Narkose nach intraperitonealer Injektion von Ketamin/Xylazin finalisiert und die Organe, sowie Knochenmark für die Analyse entnommen.

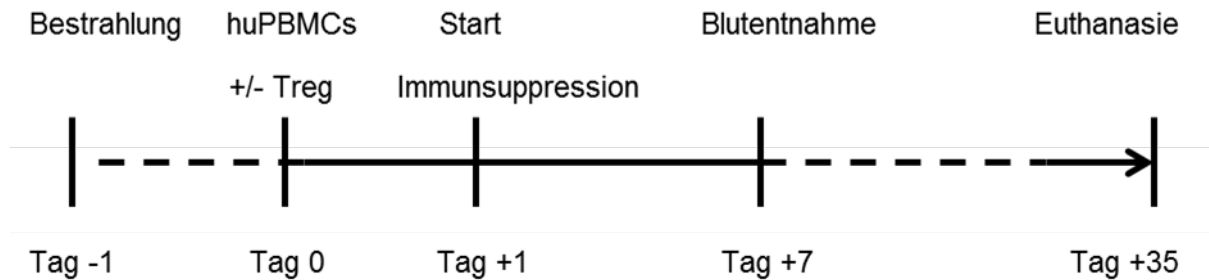


Abb. 7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Vor Applikation der humanen Zellen wurden die Tiere in Ultrakurzarkose mit Ketamin (0,08mg/g) und Xylazin (0,012mg/g) mit 300cGy sublethal bestrahlt (Tag-1). Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6). Zur weiteren Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 ($1,5 \cdot 10^6$) (n=6), 1:1 ($3 \cdot 10^6$) (n=7) oder 1:2 ($6 \cdot 10^6$) (n=5) i.v. verabreicht oder täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken), Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os) oder Methylprednison (20mg/kg i.p.) als Standardimmunsuppression allein (je n=5) oder nach einmaliger Injektion von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg zusammen mit den humanen PBMCs an Tag 0 (CsA/nTreg n=5, MMF/nTreg n=6, Pred./nTreg n=6) bis max. Tag +35 appliziert. An Tag +7 erfolgte einmalig eine Entnahme von max. 200/ μ l Vollblut aus der Schwanzvene.

4.8.1. Versuchsgruppen

In vitro polyklonal expandierte regulatorische T-Zellen sollten zum einen als Monotherapie, zum anderen in Kombination mit Standardimmunsuppressiva auf ihre immunmodulatorischen Kapazitäten in einem systemischen Inflammationsmodell getestet werden.

4.8.1.1. Kontrollgruppen

Um den Erfolg der unterschiedlichen Behandlungskonzepte bewerten zu können, wurden verschiedene Kontrollgruppen geführt.

Eine erste Gruppe waren „naive“ Mäuse (n=3), die als Kontrolle des normalen Gewichtsverlaufs mit etwaigen physiologischen Schwankungen und des normalen Verhaltens und klinischen Erscheinungsbildes mitgeführt wurden. An diesen Tieren wurden, außer die Blutentnahme an Tag +7 keinerlei Behandlungen und Eingriffe vorgenommen.

Eine zweite Gruppe (n=3) wurde ausschließlich an Tag -1 subletal bestrahlt. Es erfolgte im weiteren keine Applikation humaner Zellen oder immunsuppressive Therapie. In dieser Gruppe sollten evtl. strahleninduzierte Schäden mit möglichen klinischen Auswirkungen festgestellt werden. Einer Gruppe von Tieren (n=6) wurden ausschließlich humane PBMCs in einer Dosis von $3 \cdot 10^6$ verabreicht, um eine xenogene GvHD zu induzieren. Diese Gruppe diente als unbehandelte Kontrolle (Positivkontrolle), um sicherzustellen, dass mit der gewählten Zellzahl ein klinisch manifester Krankheitszustand induziert werden kann. Des Weiteren stellten diese Tiere die Bewertungsgrundlage (*baseline*) für einen eventuellen Therapieerfolg durch den adaptiven T-Zelltransfer und die Kombinationstherapie dar. Den Tieren wurden hierfür an Tag null $3 \cdot 10^6$ humane PBMCs in einem Volumen von insgesamt 300µl PBS über die laterale Schwanzvene appliziert.

Weitere Kontrollgruppen (je n=5) wurden nach der Applikation der humanen mononukleären Zellen ab Tag +1 medikamentös mit Standardimmunsuppressiva behandelt, um die Effektivität der nTreg Therapie im Vergleich zur klassischen medikamentösen Behandlung zur Unterdrückung einer Graft versus Host Disease evaluieren zu können (Mindeststandard) und um etwaige medikamenten-assoziierte Organveränderungen (Nephrotoxizität von Ciclosporin A u.a.) oder unerwünschte Arzneiwirkungen (z.B. gastro-intestinale Störungen) klar von krankhaften Veränderungen nach Zelltransfer differenzieren zu können.

Ciclosporin A wurde in einer Dosis von 4mg/kg s.c. im Bereich des Nackens, Mycophenolat Mofetil 0,5mg/Tier per oral und Methylprednisolon 20mg/kg i.p. jeweils einmal täglich verabreicht.

Tab 3.: Übersicht Kontrollgruppen: Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs in die Schwansvene induziert (Kontrolle). Zur weiteren Therapie wurden täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken), Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os) oder Methylprednsiolon (20mg/kg i.p.) als Standardimmunsuppression appliziert. Als Negativkontrolle wurden naive und nur bestrahlte (subletal mit 300cGy) (je n=3) mitgeführt.

Gruppe	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
$3 \cdot 10^6$ huPBMCs	X			X	X	X
Naiv		X				
Bestrahlung			X			
CsA 4mg/kg s.c.				X		
MMF 0,5mg p.os					X	
Pred. 20mg/kg i.p						X

4.8.1.2. Adoptiver Zelltransfer natürlicher regulatorischer T-Zellen als Monotherapie

Zur Evaluierung der mindestens benötigten Menge an regulatorischen T-Zellen zu einer vorher definierten Menge an humanen PBMCs ($3 \cdot 10^6$) zur Attenuierung einer Graft versus Host Disease wurden drei Gruppen gebildet.

Auf Grundlage von Veröffentlichungen zum adoptiven Treg-Transfer in allogenen Mausmodellen (Hoffmann et al. 2002) wurden in einer Gruppe (n=7) die regulatorischen Zellen in gleicher Menge wie die humanen PBMCs verabreicht (Verhältnis 1:1). Zur Überprüfung, ob eine Reduktion regulatorischer T-Zellen um 50% im Verhältnis zu den PBMCs immer noch mit einem zufriedenstellenden klinischen Verlauf einhergeht, wurden einer Gruppe (n=6) PBMCs und Tregs im Verhältnis 2:1 appliziert.

In einer dritten Gruppe (n=5) wurde die zweifache Menge an regulatorischen T-Zellen im Verhältnis zu PBMCs appliziert, um zu evaluieren, ob eine Erhöhung der suppressiven Zellen im Verhältnis zu konventionellen Zellen das klinische Ergebnis noch signifikant verbessern könnte.

Zum Beweis, dass natürliche regulatorische T-Zellen allein nicht in der Lage sind, eine Graft versus Host Disease oder andere Krankheitszustände zu induzieren, wurden einigen Tieren (n=3) nur $3 \cdot 10^6$ expandierte Tregs allein i.v. appliziert.

Allen Tieren wurden dazu am Tag null $3 \cdot 10^6$ humane PBMCs (außer der nTreg Kontrolle) und die entsprechende Menge an polyklonal expandierten natürlichen regulatorischen T-Zellen in einem Volumen von insgesamt 300µl PBS über die laterale Schwanzvene appliziert.

Die expandierten Zellen wurden dazu zunächst aus der Zellkultur gepooled und in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Das Volumen wurde auf insgesamt jeweils 10ml Medium aufgefüllt und die Zellen für 10 min an einen Magneten gestellt, um die magnetischen Beads zu lösen. Die Zellsuspension wurde abgenommen und in ein neues 15ml Schraubdeckelröhrchen überführt und der Vorgang wiederholt. Nach Abnahme der Zellen wurden die regulatorischen T-Zellen mit PBS gewaschen, um sie vom Medium zu befreien und die Zellen dann im CASY-Zellzähler gezählt. Die Zellen wurden im Anschluss in 100µl PBS resuspendiert und die für die Applikation benötigte Menge zu den humanen PBMCs pipettiert. Da je Tier immer ein Gesamtvolumen von 300µl verabreicht wurde, wurden die Zellsuspensionen mit PBS auf das entsprechende Flüssigkeitsvolumen aufgefüllt.

Tab. 4: **Übersicht der Gruppen mit regulatorischen T-Zellen als Montherapeutikum:** Zur weiteren Therapie nach Applikation $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs wurden simultan an Tag 0 einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 ($1,5 \cdot 10^6$), 1:1 ($3 \cdot 10^6$) oder 1:2 ($6 \cdot 10^6$) in einem Gesamtvolumen von $300 \mu\text{l}$ i.v. über die laterale Schwanzvene verabreicht. Zur Sicherheitskontrolle der applizierten nTreg wurden einer Gruppe $3 \cdot 10^6$ nTreg allein verabreicht.

huPBMC: nTreg	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
2:1	X			
1:1		X		
1:2			X	
$3 \cdot 10^6$ nTreg allein				X

4.8.1.3. Effektivität des adoptiven Transfers natürlicher regulatorischer T-Zellen in Kombination mit Standardimmunsuppression

Im Hinblick auf mögliche klinische Anwendungen regulatorischer T-Zellen ist die Evaluierung der Pharmakodynamik im Zusammenspiel mit Standardimmunsuppressiva unerlässlich.

Daher wurden den Tieren in diesen Gruppen zusätzlich zum adoptiven Zelltransfer medikamentöse Immunsuppressiva appliziert. Ciclosporin A wurde in einer Dosis von 4mg/kg s.c. im Bereich des Nackens, Mycophenolat Mofetil $0,5 \text{mg/Tier}$ per oral und Methylprednisolon 20mg/kg i.p. jeweils einmal täglich verabreicht. Die Menge der applizierten nTreg wurde auf $0,5 \cdot 10^6$ Zellen reduziert. Die regulatorischen T-Zellen wurden, wie bei der Monotherapie zusammen mit den humanen PBMCs an Tag 0 in einem Gesamtvolumen von $300 \mu\text{l}$ intravenös über die laterale Schwanzvene verabreicht.

Tabelle 5: **Kombinationstherapie aus $0,5 \cdot 10^6$ regulatorischen T-Zellen und Standard-immunsuppression:** Die Kombination aus Immunsuppression und nTreg (Kombinationstherapie) beinhaltete jeweils die Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs, $0,5 \cdot 10^6$ nTreg und einem der drei Immunsuppressiva (CsA, MMF oder Methylprednisolon)

Gruppe	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
$3 \cdot 10^6$ huPBMCs	X	X	X
$0,5 \cdot 10^6$ nTreg	X	X	X
CsA 4mg/kg s.c.	X		
MMF 0,5mg p.os		X	
Pred. 20mg/kg i.p			X

4.8.2. Monitoring

Die Tiere wurden täglich zur gleichen Zeit (\pm eine Stunde) auf Gewichtsentwicklung und klinische Erscheinung entsprechend der modifizierten Arbeitsanweisung für das Versuchsvorhaben (Tabelle 4) untersucht. Die wichtigsten Parameter zur Beurteilung des Gesundheitszustandes innerhalb dieses Versuches waren neben dem Gewichtsverlauf, Fellstruktur, Haltung, Verhalten und mögliche Anzeichen von Apathie, sowie allgemeine Schwäche, Taumeln oder Umkippen. Bei einem Verlust von $>20\%$ des Ausgangsgewichts oder einem schlechten klinischen Bild wurden die Tiere in tiefer Ketamin/Xylazin Narkose euthanasiert. Der Beobachtungszeitraum endete spätestens an Tag +35.

Tabelle 6: **Modifizierte Arbeitsanweisungen zum Versuchsvorhaben G 0483/09:** Anhand der modifizierten Arbeitsanweisungen wurden klare Maßnahmen definiert, die zu ergreifen waren, wenn die genannten Symptome bei den Tieren im Verlauf der täglichen Untersuchung und der Gewichtskontrolle auftraten.

<u>Anweisungen:</u>	
A	Bei nur einem Symptom der Kategorie A: das Tier täglich (ggf. auch mehrmals) beobachten. Spätestens bei Kombination von zwei oder mehr Symptomen der Kategorie A muss das Tier dem Tierarzt oder dem Projektleiter vorgestellt werden.
B	Bei einem Symptom der Kategorie B: das Tier muss dem Tierarzt vorgestellt werden. Der Projektleiter muss informiert werden. Bei Kombination eines B mit Torkeln, Schmerz, Blässe oder Blut ist das Tier unverzüglich schmerzlos zu töten! (siehe C)
C	Unverzüglich schmerzlos töten! (Der Antragsteller hatte im Antrag detailliert auszuführen, innerhalb welcher Zeitspanne er die unverzügliche Tötung garantieren kann und ggf. wissenschaftlich begründet darzulegen, mit welchen maximalen Verzögerungen zu rechnen ist. Es müssen bereits vor Versuchsbeginn vom Versuchsleiter Absprachen und Vorkehrungen getroffen werden, die es ermöglichen, dass die Tötung <i>unverzüglich zu tötender Tiere</i> tatsächlich unverzüglich erfolgt. Dazu ist entweder das vor Ort mit der Überwachung der Tiere betraute Personal zu bevollmächtigen und zu instruieren oder geeignete Mitarbeiter in Rufbereitschaft zu versetzen.)
Achten Sie auf folgende SYMPTOME und handeln Sie nach den ANWEISUNGEN:	
SYMPTOME	ANWEISUNGEN
1. Beim täglichen Blick in den Käfig	
Tier isoliert sich	A
Struppiges Fell, ungepflegtes Fell, Augentränder, Piloerektion	A
Aufgetriebener Leib	A
Geringfügig verstärkte Atmung	A
Urin u./o. Kot abweichend in Menge, Farbe und Konsistenz (einzeln oder kombiniert)	A
Anhaltende Obstipation	A
Hier bitte selbst alle antragsbezogenen relevanten Symptome der Kategorie A eintragen: • Ikterus	A
Schmerz (Gesichtsausdruck, Haltung gekrümmt oder Leib aufgezogen)	B
Eingesunkene, trübe Augen	B
Blässe (Augen, Ohren, Haut)	B
Blut an Körperöffnungen, blutiger Kot	B
Deutlich verstärkte Atmung / Keuchen	B
Durchfall, wenn schwächend oder andauernd	B
2. Beim Umsetzen	
Verletzungen, Hautveränderungen	A

Tier vermeidet Bewegungen	A
Teilnahmslosigkeit	A
Ruhelosigkeit	A
Lokale Infektion(en)	B
Bauch hart oder gespannt	B
Hautfalten bleiben stehen, Dehydratation	B
Ödembildung	B
Automutilation (z.B. Annagen von Zehen)	B
Lautäußerungen beim Ergreifen	B
Moribund	C
3. Beim Wiegen	
Ungewöhnliche Zunahme	B
10 % Gewichtsdefizit verglichen mit gesunden Tieren des gleichen Stamms und Alters.	B
20 % Gewichtsdefizit verglichen mit gesunden Tieren des gleichen Stamms und Alters.	C

4.9. Analyseverfahren

Zur Überprüfung der Effektivität der angewandten Therapiekonzepte wurden post mortem Organe und Gewebe entnommen und durchflusszytometrisch, sowie histologisch untersucht. Bereits an Tag +7 wurde eine Blutprobe entnommen und die Menge an zirkulierenden humanen Zellen untersucht.

Alle Waschschritte, wenn nicht anders erwähnt erfolgten bei 200 x g für 10 min bei 4°C.

4.9.1. Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen zur Bestimmung der Zellfrequenzen innerhalb der Gewebe wurden am Navios® Durchflusszytometer durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der *Kaluza Flow Cytometry Analysis Software*.

4.9.1.1. Färbeverfahren allgemein

Alle Färbungen wurden mit max. $2 \cdot 10^6$ Zellen in 100µl FACS-Puffer durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst extrazellulär mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker auf den Zellen und einer lebend-tot-Färbung gefärbt und nach Einbringen der Fluorochrome für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 500µl Fixierungs/Permeabilisierungspuffer eingebracht und die Zellen für weitere 30 min bei 4°C im Kühlschrank lichtgeschützt ruhen gelassen. Danach wurden je Probe 4ml Permeabilisierungspuffer eingebracht und die Zellen darin für 10 min bei 200 x g bei 4°C gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die intrazellulären Antikörper eingebracht. Die Zellen wur-

den für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben mit FACS-Puffer aufgefüllt und gewaschen. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in insgesamt 150µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch gemessen.

4.9.1.2. Blutentnahme Tag +7

An Tag +7 erfolgte eine Blutentnahme zur Messung des prozentualen Anteils zirkulierender humaner Zellen in der Peripherie. Die Entnahme erfolgte am wachen, fixierten Tier und das Blut wurde durch einen oberflächlichen Schnitt mit einem Einwegskalpell in die laterale Schwanzvene entnommen. Das Blut wurde frei in ein Eppendorfgefäß tropfen gelassen, wobei die entnommene Menge max. 200µl betrug. Zur Messung der Menge an humanen Zellen erfolgte zunächst die Lyse der Erythrozyten mit 500µl Lysepuffer (Qiagen GmbH, D-40724 Hilden) für 5 min. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und das Pellet nach Absaugen des Überstandes in 100µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden extrazellulär mit einer lebend-tot-Färbung (Live/Dead® Fixable Aqua for 405 nm excitation), sowie Antikörpern gegen humanes CD45 (Pacific Blue™; Clone J33), murines CD45 (5 PerCP Cy5.5; 30-F11), CD3 (APC-Alexa Fluor® 750; UCHT1), CD4 (APC; 13B8.2), CD8 (APC-Alexa Fluor® 700; B9.11) und CD25 (Pe - CY7; B1.49.9) und intrazellulär für FoxP3 (Alexa Fluor® A488; Clone 259D/C7) gefärbt. Anschließend erfolgten die Messung am Durchflusszytometer und die Analyse mittels Analysesoftware.

4.9.1.3. Organentnahme post mortem

In tiefer Xylazin/Ketamin Narkose wurde zunächst die Abdominalhöhle in der Linea alba geöffnet und ca. 1ml Vollblut aus der Vena cava caudalis entnommen. Anschließend wurden die Bauchorgane Milz, Leber, Niere, sowie Dünn- und Dickdarm und nach Öffnung des Zwerchfells die Lungen entnommen. Nach Absetzen der Hintergliedmaßen wurden Femur und Tibia jeweils geöffnet und das Knochenmark mit kaltem PBS herausgespült. Weiterhin wurde ein Hautlappen aus dem Flankenbereich entnommen und das Gehirn nach Öffnung des Craniums vorsichtig entnommen. Teile von Milz, Leber, Lunge und Knochenmark wurden direkt nach der Entnahme aus dem Tierkörper in 10ml Falcon-Schraubdeckelröhrchen mit 4°C kaltem PBS bis zur weiteren Aufbereitung zur durchflusszytometrischen Messung gekühlt. Die restlichen Gewebe wurden unmittelbar nach Entnahme in einem 1,8ml Kryoröhrchen (Sarstedt AG & Co, D-51588 Nümbrecht) mit Formalin 5% fixiert.

4.9.1.3.1. Aufbereitung der Gewebe

Im Vorfeld der durchflusszytometrischen Analyse war eine Bearbeitung der Organe notwendig. Untersucht wurden Leber, Lunge, Knochenmark und Milz.

Um die Immunzellen aus Leber und Lunge zu gewinnen, mussten die Organe durch Zusatz von Kollagenase und DNase zunächst verdaut werden. Dazu wurden die Organe im ersten Schritt grob mit einem Einwegskalpell zerkleinert. Die Lunge wurde in 2ml Serum-freies Medium (VLE RPMI-1640 Medium, Biochrom AG, D-12247 Berlin) in einer Petrischale (BD Falcon®, Becton Dickinson) aufgenommen und mit 5U/ml DNase (Sigma Aldrich Chemie GmbH) und 0,5mg/ml Kollagenase II (Sigma Aldrich Chemie GmbH) versetzt. Bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Organ für 90 min inkubiert. Anschließend wurde die Lunge durch ein Sieb mit Maschengröße 70µm (BD Falcon® Cell Strainer, Becton Dickinson) gedrückt und dann in 10ml PBS gewaschen. Nach Abnehmen des Überstands erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit 2ml Lysepuffer für 5 min. Die Zellen wurden danach erneut mit 10ml PBS gewaschen, der Überstand verworfen und anschließend das Pellet in 5ml FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen gezählt. Die Leber wurde zunächst durch ein Sieb der Maschengröße 100µm (BD Falcon® Cell Strainer, Becton Dickinson) gepresst und danach in 40ml RPMI-Medium + 5% FCS gewaschen. Das Pellet wurde nach Abnahme des Überstands in 10ml kaltem RPMI-Medium aufgenommen. Der Suspension wurden 10U/ml DNase und 100µl (2mg/ml) Kollagenase IV (jeweils Sigma Aldrich Chemie GmbH) zugesetzt. Der enzymatische Verdau erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ über 40 min. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 30ml kaltem, Serum-freiem RPMI Medium abgestoppt. Durch Zentrifugation bei 50 x g für 3 min bei 4°C sedimentierte ein Großteil der Hepatozyten, während die lymphozytären Zellen im Überstand verblieben. Dieser wurde im Anschluss gewonnen und bei 4°C für 10 min bei 200 x g herunterzentrifugiert. Das Pellet mit enthaltenen Immunzellen wurde nach Verwerfen des Überstands in 8ml RPMI-Medium aufgenommen, auf 4ml Trennlösung (LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium, PAA Laboratories, A- 4061 Pasching, Austria) aufgeschichtet und anschließend bei 400 x g für 20 min bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Im Anschluss wurden die PBMCs abgenommen, gewaschen und das Pellet nach Abnehmen des Überstands in 5ml FACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Knochenmark und Milz wurden zunächst jeweils durch ein Sieb mit Maschengröße 40µm (BD Falcon® Cell Strainer, Becton Dickinson) gepresst. Nach Waschen der Zellen in 10ml PBS wurde der Überstand verworfen und die Erythrozyten durch Zusatz von 1-2ml Lysepuffer für 5 min lysiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Pellet in 100µl FACS-Puffer resuspendiert.

Bei der Blutprobe erfolgte, wie an Tag +7, zunächst die Lyse der roten Blutzellen mit 500µl Lysepuffer für 5 min. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und das Pellet nach Absaugen des Überstandes in 100µl FACS-Puffer resuspendiert.

4.9.1.3.2. Färbungen

Je Gewebe wurden zwei Ansätze gefärbt. Im ersten Färbeansatz („Allgemein“; Tab. 7) wurde eine nach Darstellung der lebenden Lymphozyten zwischen murinen und humanen CD45+ Zellen differenziert. Die humanen Leukozyten wurden weiter unterteilt in CD3+ (T-Zellen), CD3-CD19+ (B-Zellen), sowie CD3-CD19-. Aus der CD3-CD19- Population wurde dann die CD56+ (NK-Zellen) dargestellt. Die CD3+ T-Zellen wurden im nächsten Schritt in CD4+ und CD8+ Zellen differenziert (Abb. 8).

Im zweiten Ansatz („nTreg“ Tab. 8) wurden ebenfalls zunächst die lebenden Lymphozyten und aus diesen die im Gewebe enthaltenen CD3+CD4+ T-Zellen weiter unterteilt. Aus den CD4+ Zellen wurden die CD25+FoxP3+ (nTreg) Zellen dargestellt. Die CD4+FoxP3- T-Zellen wurden mittels Boolean-Gate unter non-Treg zusammengefasst. Sowohl nTreg als auch non-Treg wurden auf die Expression von CD127 analysiert. Zusätzlich wurden alle Populationen (CD3+CD4-, CD4+FoxP3- und CD4+CD25+FoxP3+) auf ihre Proliferationsaktivität über die Messung der prozentualen Expression von Ki67 gemessen (Abb. 9).

Zur Färbung wurden max. 2×10^6 Zellen jeweils in 100µl FACS-Puffer aufgenommen und mit 1µl humanem *FcR blocking reagent* (Miltenyi Biotec GmbH) versetzt und 5 min bei 4°C im Dunkeln ruhen gelassen, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden.

Die Zellen wurden zunächst extrazellulär mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker auf den Zellen und einer lebend-tot-Färbung gefärbt und nach Einbringen der Fluorochrome für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 500µl Fixierungs/Permeabilisierungspuffer eingebracht und die Zellen für weitere 30 min bei 4°C im Kühlschrank lichtgeschützt ruhen gelassen. Danach wurden je Probe 4ml Permeabilisierungspuffer eingebracht und die Zellen darin für 10 min bei 200 x g bei 4°C gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die jeweiligen intrazellulären Antikörper eingebracht. Die Zellen wurden für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die Proben mit FACS-Puffer aufgefüllt und gewaschen. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in insgesamt 150µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch gemessen.

Tab. 7: **Mastermix für Färbeansätze:** Die jeweiligen Ansätze zur Messung der in den Geweben enthaltenen Zellpopulationen mit Angabe des Fluorochroms, des Clones und der verwendeten Menge an Antikörper. Der Ansatz „Allgemein“ beinhaltet Marker zur Analyse der Subpopulationen der humanen CD45+ Zellen (NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen und weiter T-Zellsubpopulationen). Im Ansatz „nTreg“ wurden aus CD4+ T-Zellen die regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25+FoxP3+) und CD4+FoxP3- (non-Treg), sowie deren Expression von CD127 dargestellt. Weiterhin wurde die Proliferationsaktivität anhand von Ki67 gemessen.

Panel Organentnahme „Allgemein“

Marker	Clone	Fluorochrom	µl
CD3	UCHT1	APC Alexa750	1
CD4	13B8.2	APC	2
CD8	B9.11	APC Alexa700	2
CD19	J3-119	ECD	1
CD25	B1.49.9	PeCy7	3
CD45	J33	Pacific Blue	1
CD45 mouse	30-F11	PerCP Cy5.5	2
CD56	N901	PE	3
L/D	/	Pacific Orange	1
FoxP3	259D/C7	Alexa Fluor 488	10

Panel Organentnahme „nTreg“

Marker	Clone	Fluorochrom	µl
CD3	UCHT1	APC Alexa750	1
CD4	13B8.2	APC	2
CD25	B1.49.9	PeCy7	3
CD127	R34.34	APC Alexa700	3
L/D	/	Pacific Orange	1
FoxP3	259D/C7	Alexa Fluor 488	10
Ki67	B56	PerCP Cy5.5	1

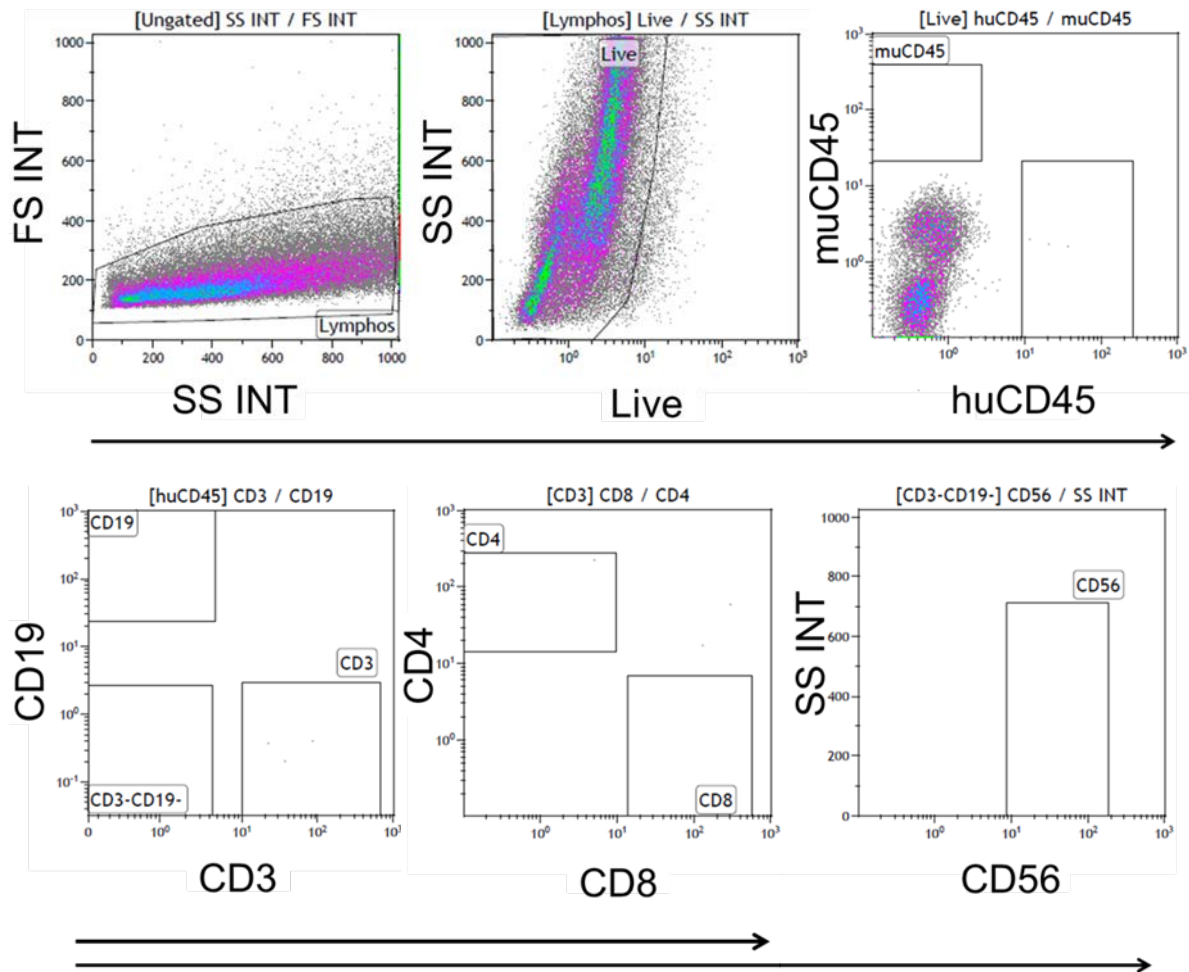


Abb. 8: **Gatingstrategie „Allgemein“ zur Analyse humaner Zellen im Gewebe post mortem:** Zur Analyse der im Gewebe enthaltenen humanen Zellen wurden aus den Lymphozyten zunächst die lebenden Zellen dargestellt. Aus den lebenden Zellen wurden murine CD45+ Zellen gegen humane CD45+ Zellen dargestellt und aus den humanen Leukozyten CD3+ T-Zellen, CD19+ B-Zellen und CD3-CD19- Zellen aufgetragen; aus letzteren wurden die CD56+ NK-Zellen, aus CD3+ Zellen CD4+ und CD8+ T-Zellpopulationen dargestellt.

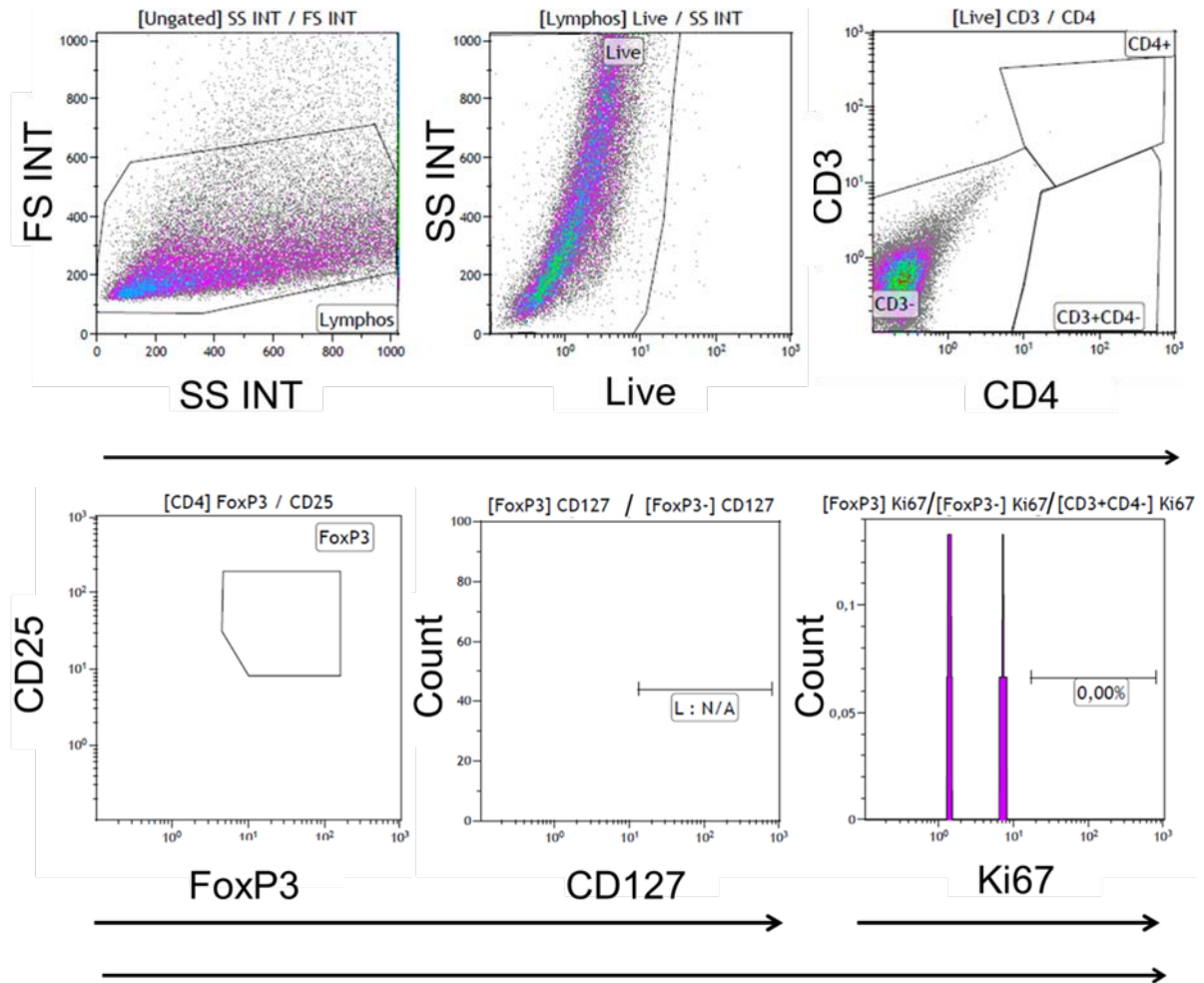


Abb. 9: Gatingstrategie „nTreg“ zur Analyse humaner Zellen im Gewebe post mortem: Zur Analyse der im Subtypen der CD4 Zellen im Gewebe wurden aus den Lymphozyten die lebenden Zellen dargestellt. Aus den lebenden Zellen wurden die CD3+CD4+ Zellen aufgetragen und aus den CD4+ T-Zellen die CD25+FoxP3+ regulatorischen T-Zellen dargestellt. CD4+FoxP3- Zellen (non-Treg) wurden mittels Boolean Gate zusammengeführt. In beiden Populationen wurde die Expression von CD127, sowie Ki67 innerhalb der nTreg, non-Treg und CD3+CD4- Fraktion dargestellt.

4.9.2. Histologie

Analysiert wurden Milz, Dünn- und Dickdarm, Haut, Niere, Gehirn, Lunge und Leber. Für die Hämatoxylin / Eosin (HE) und immunhistochemische humane CD3 Färbung wurden die Organe post mortem direkt mit 5%iger Formaldehydlösung fixiert. Die Bearbeitung der Proben und Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgte im Institut für Veterinärpathologie der Freien Universität Berlin, Robert-von-Ostertag-Straße 15, 14163 Berlin. Die Beurteilung allgemeiner Gewebeschädigung und Infiltration von Lymphozyten der Organe in der HE-Färbung erfolgte semiquantitativ. Es wurde ein Bewertungssystem von null (O; keine Veränderung) bis zu hochgradiger Schädigung und Infiltration (+++) verwendet. Immunhistoche-

misch wurde eine CD3 Färbung für humane T-Zellen vorgenommen, um die Infiltration humaner Immunzellen in den Geweben beurteilen zu können. Es fand dasselbe semiquantitative Bewertungssystem wie bei der Auswertung der HE-Schnitte Anwendung.

Tabelle 9: **Bewertungssystem der histologischen Untersuchung der analysierten Gewebe:** Die Beurteilung bezüglich Infiltration und Inflammation der Gewebe erfolgte mittels eines einfachen Bewertungssystems von 0 (keine Veränderung) bis 3 (hgr. Veränderung).

Histologische Untersuchung	Bewertung
Keine Entzündungszellen und Inflammation	0
ggr. Infiltration und Inflammation	1 (+)
mgr. Infiltration und Inflammation	2 (++)
hgr. Infiltration und Inflammation	3 (+++)

4.9.3. Statistik

Statistisch ausgewertet wurden die Überlebenszeiten der einzelnen Gruppen mittels Kaplan-Meier-Analyse und Log-Rank (Mantel-Cox) Test. Die Überlebenszeiten wurden als Mittelwert (mean) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Varianzanalyse der Gewichtsentwicklung und der Menge an unterschiedlichen Zelltypen in den Organen, sowohl durchflusszytometrisch gemessen, als auch histologisch beurteilt, wurde über eine One-Way-ANOVA Analyse und Tukey's multiple comparison Test durchgeführt. Zur statistischen Analyse der Proliferation von FoxP3 und der Expression Ki67 innerhalb der einzelnen Zellpopulationen mussten mindestens zwanzig Zellen zur Auswertung vorhanden sein. Statistisch signifikant waren Werte mit $P < 0.05$. Die Angabe der Messwerte erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Die Darstellung der Daten erfolgte mit sowohl mit Excel 2010 (Microsoft Corporation, One Microsoft Way Redmond, WA 98052-6399), sowie GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. 7825 Fay Avenue, Suite 230, La Jolla, CA 92037 USA).

Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. 7825 Fay Avenue, Suite 230, La Jolla, CA 92037 USA).

5. Ergebnisse

5.1. Isolation und polyklonale Expansion humaner nTreg unter Erhalt des suppressiven Phänotyps

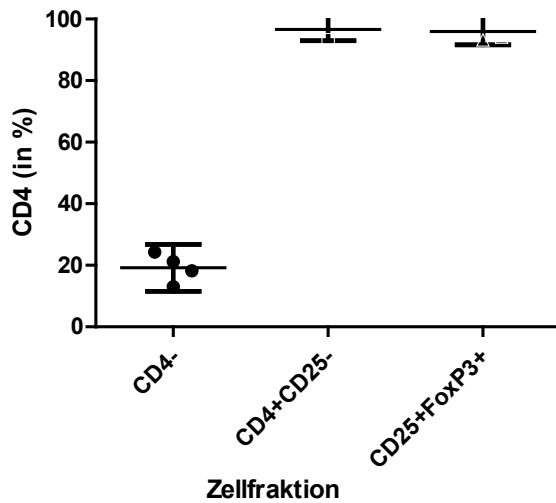
Für eine klinische Anwendung sind die Isolation und Expansion von nTreg unter Erhalt ihrer suppressiven Eigenschaften essentiell. Die Zellen sollen dabei eine hohe Expression an FoxP3 aufweisen und die Immunantwort konventioneller T-Zellen unterdrücken, ohne dabei die allgemeine Immunkompetenz zu unterdrücken. In einem ersten Experiment wurden regulatorische T-Zellen aus humanen PBMCs isoliert und im Anschluss polyklonal expandiert, um eine entsprechend große Zellzahl an nTreg für die *in vivo* Untersuchungen gewinnen zu können.

Im ersten Isolationsschritt (Negativselektion) wurden humane PBMCs in eine CD4⁻ und CD4⁺ Zellfraktion unterteilt. Die CD4⁻ Zellfraktion beinhaltete im Schnitt noch 19% (19,17% ± 4,79%) an CD4⁺ T-Zellen, die bei der Selektion nicht erfasst wurden, während die zweite gewonnene Zellpopulation im Mittel über 95% CD4⁺ T-Zellen beinhaltete (Abb. 10A). Aus der CD4⁺ Zellfraktion wurde im weiteren Schritt über eine Positivselektion die CD4⁺CD25⁺ T-Zellpopulation gewonnen. Die CD4⁺CD25⁻ Zellfraktion beinhaltete im Mittel weniger als 0,1% (0,93% ± 0,16%) CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und im Mittel ergab die Selektion eine im Mittel zu mehr als 75% (76,57% ± 15,35%) reine CD4⁺CD25⁺ T-Zellpopulation (Abb. 10B).

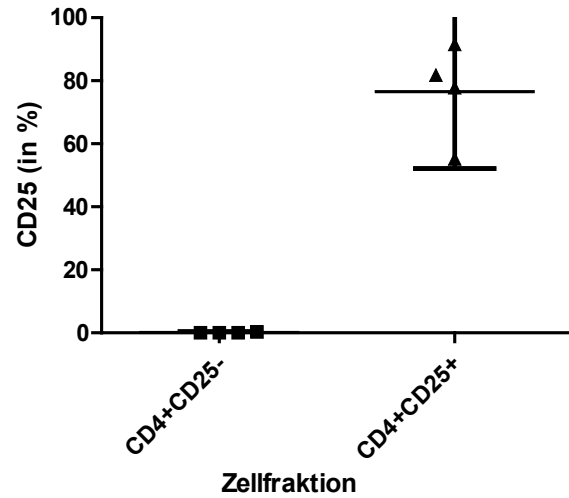
Die gewonnenen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen waren nach Isolation im Durchschnitt zu mehr als 90% (92,31 % ± 1,40%) FoxP3⁺ natürliche regulatorische T-Zellen. Die polyklonale Expansion mittels CD3CD28 beads hatte keinen Einfluss auf den Phänotyp und nach Abschluss der Kultivierung waren im Mittel 93,78% der Zellen CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen. Der prozentuale Expression an FoxP3 änderte sich durch die Expansion im Durchschnitt nicht (Abb. 10C).

Die polyklonale Expansion der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nTreg dauerte im Mittel 14 Tage. Eine Restimulation der Zellen erfolgte an Tag 9 (+2).

A: CD4 T-Zellen nach Negativselektion



B: CD25 T-Zellen nach Positivselektion



C: Anteil FoxP3+ T-Zellen frisch isoliert versus expandierte Zellen

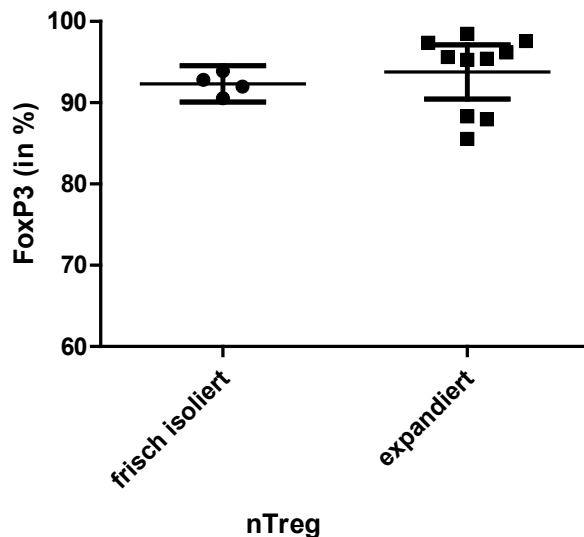
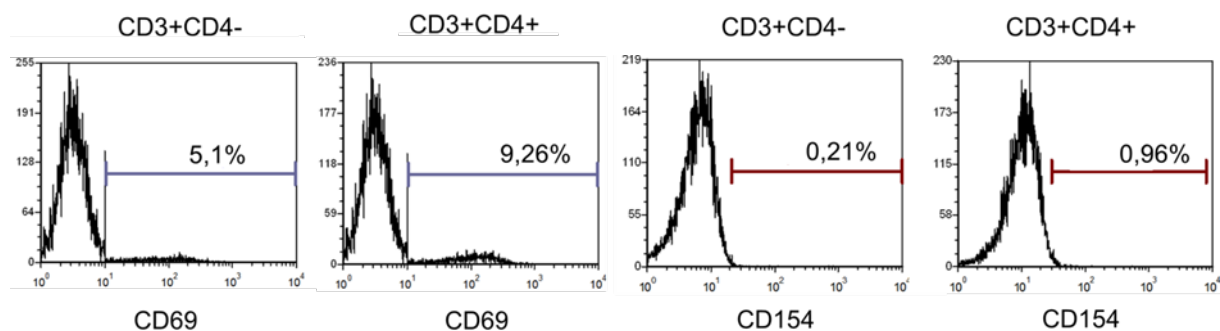


Abb. 10: **Reinheit der isolierten und expandierten Zellprodukte:** Humane PBMCs wurden durch Negativselektion in eine CD4- und CD4+ Zellfraktion unterteilt. CD4+ T-Zellen wurden im nächsten Selektionsschritt (Positivselektion) in eine CD4+CD25- und eine CD4+CD25+ Population unterteilt. Durchflusszytometrische Messung der gewonnenen Zellfraktionen. Aus den Lymphozyten wurden die lebenden Zellen gated und aus diesen die CD3+ T-Zellen dargestellt. Aus den CD3+ Zellen wurden die CD4+ und CD4- Zellen und im Weiteren aus den CD4+ T-Zellen die CD4+CD25+ aufgetragen. Aus den CD4+CD25+ T-Zellen wurden dann die CD4+CD25+FoxP3+ (nTreg) dargestellt. Die polyklonale Expansion erfolgte mit CD3/CD28 magnetischen Partikeln im speziellen Medium mit IL-2 und Rapamycin. Die Zellen wurden nach der Isolation zu $1 \cdot 10^5$ Zellen je well einer 96-Loch Platte in 100 μ l Kulturmedium mit IL-2 und Rapamycin ausplattiert und mit CD3/CD28 magnetischen Partikeln im Verhältnis 4:1 (Partikel:Zellen) expandiert. Die Restimulation der Zellen erfolgte jeweils an Tag 9(+2). Darstellung der Reinheit der isolierten Zellfraktionen für CD4 (A), CD4CD25 (B), sowie Expression von FoxP3 in frisch isolierten und expandierten nTreg. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm 95% CI.

5.2. Die suppressive Kapazität von nTreg auf konventionelle T-Zellen wird durch die polyklonale Expansion nicht vermindert

Um die suppressive Kapazität der expandierten nTreg und damit deren Funktionalität zu messen, wurde für eine expandierte nTreg Population (n=1) ein Suppressionsassay durchgeführt. Konventionelle CD3+ T-Zellen, die keinen exogenen Stimulus erhielten, exprimierten sowohl in der CD3+CD4+ und vor allem in der CD3+CD4- Population nur geringe Mengen CD69 und fast kein CD154 (Abb. 11A). Unter Einfluss natürlicher regulatorischer T-Zellen änderte sich der Phänotyp der Effektorzellen nur gering. Während die Expression von CD154 weiterhin unter 1% in beiden CD3+ T-Zellfraktionen war, wurde CD69 durch die Zugabe der nTreg in beiden CD3+ Zellpopulationen (CD4+ und CD4-) geringfügig hochreguliert (5,1% zu 6,98% bzw. 9,26% zu 21,47%) (Abb. 11B).

A: huPBMCs unstimuliert



B: huPBMCs unstimuliert + nTreg 1:1

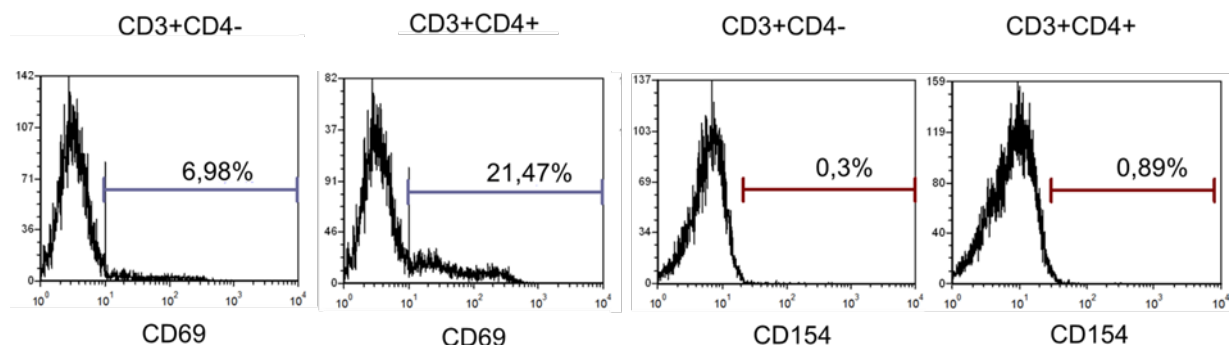
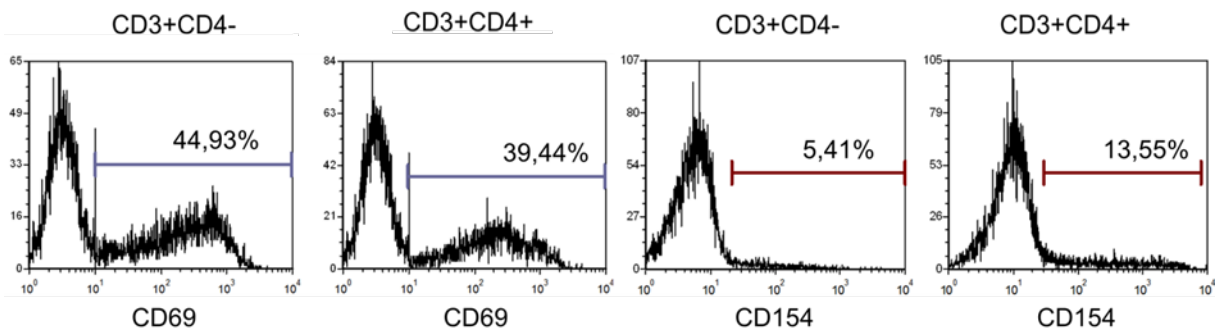


Abb. 11: **Aktivierungsstatus unstimulierter konventioneller T-Zellen:** Analyse des Aktivierungsstatus unstimulierter humaner PBMCs allein (A) und nach Zugabe von nTreg 1:1 (B), gemessen an der Expression von CD69 und CD154 (n=1). Expandierte regulatorische T-Zellen wurden in drei verschiedenen Dosierungen (1:1, 1:2 und 1:4 zu $5 \cdot 10^5$ PBMCs) unstimulierten konventionellen T-Zellen zugesetzt und anschließend die Expression von CD69 und CD154 auf den Effektorzellen gemessen. Aus den Lymphozyten wurden zunächst die CD25 Zellen dargestellt und aus den CD25 negativen Zellen die CD3+CD4+ und CD3+CD4- aufgetragen. Die jeweiligen Populationen wurden anschließend auf die Expression von CD69 und CD154 gated. Darstellung des Phänotyps als Histogramm.

Nach Stimulation der konventionellen T-Zellen mit CD3CD28 Partikeln als artifizielle antigen-präsentierende Zellen wurde vor allem die Expression von CD69 (>39%) und, zu einem geringeren Prozentsatz auch CD154 (5-10%) gesteigert (Abb. 12A). Durch Zugabe von expandierten nTreg konnte die Aktivierung der stimulierten konventionellen T-Zellen, sowohl in der CD3+CD4- als auch in der CD3+CD4+ Zellfraktion dosisabhängig gesenkt werden. Entsprechend wurde eine geringere Expression von CD69 (<37%) und zu einem geringeren Anteil auch CD154 (< 10%) gemessen (Abb. 12B), wobei die Dosis von nTreg zu stimulierten PBMCs 1:1 effektiver war als niedrigere Dosen von 2:1 und 4:1 (PBMCs:Treg) (Abb. 13).

A: huPBMCs stimuliert



B: huPBMCs stimuliert + nTreg 1:1

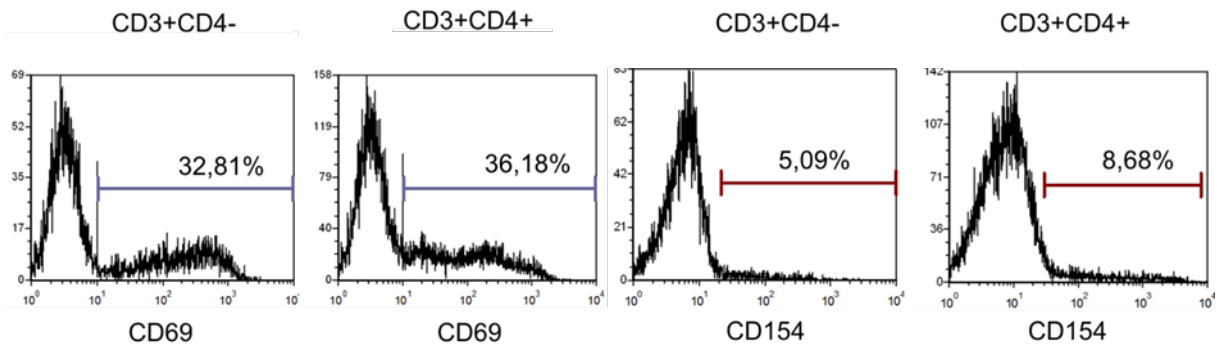
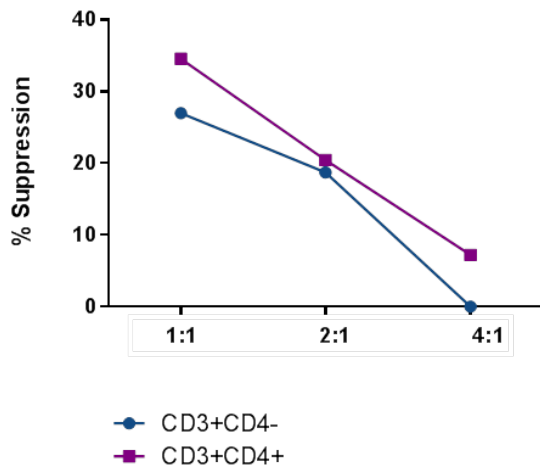


Abb. 12: **Aktivierungsstatus und Suppression stimulierter konventioneller T-Zellen durch polyklonal expandierte nTreg 1:1:** Analyse des Aktivierungsstatus stimulierter humaner PBMCs allein (A) und nach Zugabe von nTreg 1:1 (B), gemessen an der Expression von CD69 und CD154 (n=1). Expandierte regulatorische T-Zellen wurden in drei verschiedenen Dosierungen (1:1, 1:2 und 1:4 zu $5 \cdot 10^5$ PBMCs) stimulierten konventionellen T-Zellen zugesetzt und anschließend die Expression von CD69 und CD154 auf den Effektorzellen gemessen. Aus den Lymphozyten wurden zunächst die CD25 Zellen dargestellt und aus den CD25 negativen Zellen die CD3+CD4+ und CD3+CD4- aufgetragen. Die jeweiligen Populationen wurden anschließend auf die Expression von CD69 und CD154 gated. Darstellung des Phänotyps als Histogramm.

Suppression CD69 unter nTreg



Suppression CD154 unter nTreg

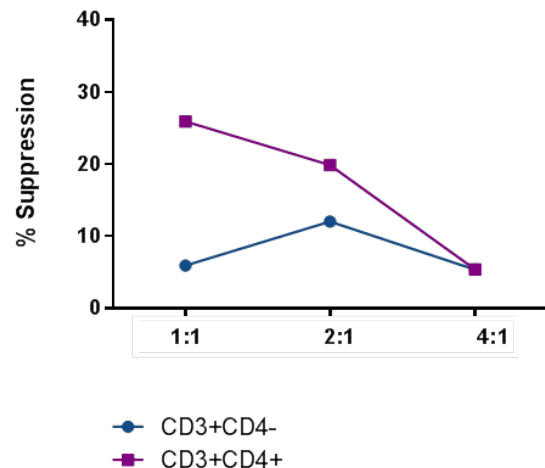


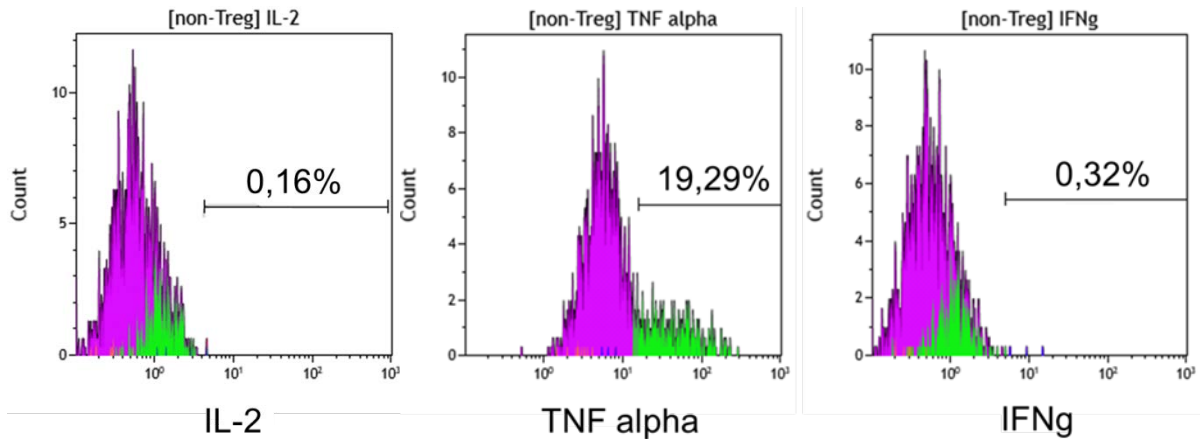
Abb. 13: **Prozentuale Suppression stimulierter konventioneller T-Zellen durch polyklonal expandierte nTreg:** Expandierte regulatorische T-Zellen wurden in drei verschiedenen Dosierungen (1:1, 1:2 und 1:4 zu $5 \cdot 10^5$ PBMCs) stimulierten konventionellen T-Zellen zugesetzt und anschließend die Expression von CD69 und CD154 auf den Effektorzellen gemessen (jeweils $n=1$). Darstellung der Suppression in % gemessen an reduzierter Expression von CD69 und CD154 unter Einfluss regulatorischer T-Zellen.

Die Suppression wurde mittels der Formel $100 - [(Prozent\ PBMCs\ mit\ Treg / Prozent\ PBMCs\ ohne\ Treg) \times 100]$ errechnet und in Prozent dargestellt.

5.3. Polyklonal expandierte nTreg produzieren nach exogener Stimulation keine proinflammatorischen Zytokine

Ein Charakteristikum natürlicher regulatorischer T-Zellen ist, dass sie, im Gegensatz zu Effektorzellen keine proinflammatorischen Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interferon gamma (IFN γ) und Interleukin-2 (IL-2) produzieren. Zur Charakterisierung des expandierten nTreg Zellproduktes und um Rückschluss auf die Reinheit der Zellpopulation ziehen zu können, wurde daher exemplarisch ein Zytokinassay zur Messung der Expression dieser Zytokine durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten konventionelle CD4 $^+$ FoxP3 $^-$ (non-Treg) T-Zellen. Unstimulierte CD4 $^+$ FoxP3 $^-$ (non-Treg) produzierten nur wenig IL-2 (0,16%) und IFN γ (0,32%), während ein vergleichsweise hoher Basalwert an TNF α (19,29%) gemessen wurde (Abb. 14A). Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin wurde die Expression aller proinflammatorischen Zytokine gesteigert. Dabei produzierten konventionelle T-Zellen vor allem TNF α (42,99%) und IFN γ (17,71%), während der prozentuale Anteil an IL-2 vergleichsweise nur gering erhöht wurde (5,63%) (Abb. 14B).

A: non-Treg unstimuliert



B: non_Treg stimuliert

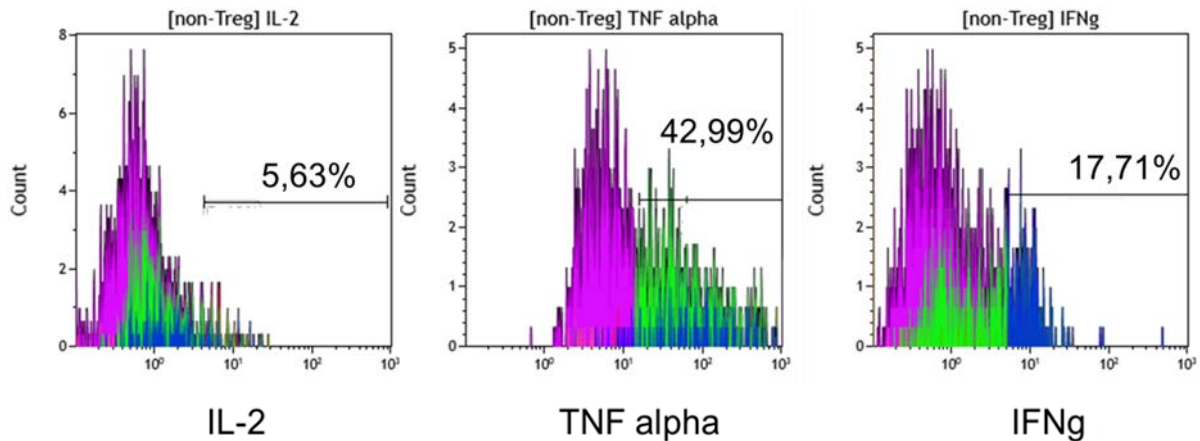
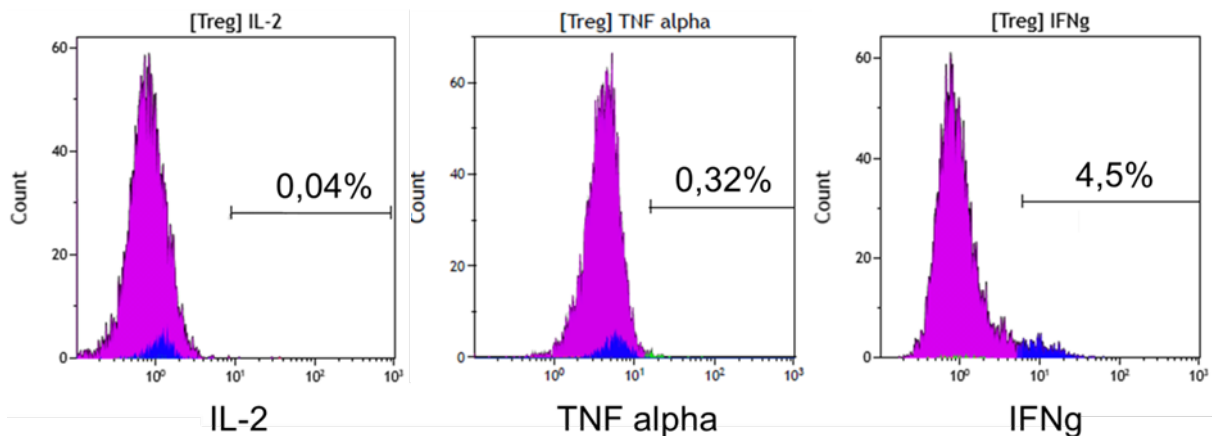


Abb. 14: **Zytokinprofil konventioneller CD4+ FoxP3- (non-Treg) T-Zellen:** Unstimulierte (A) und stimulierte (B) CD4+FoxP3- (non-Treg) konventionelle T-Zellen wurden auf die Menge der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IFN γ und IL-2 untersucht (je n=1). Die Zellen wurden nach einem Tag Ruhe im Inkubator im Medium ohne IL-2 und Rapamycin mit 2 μ l PMA und 1 μ l Ionomycin stimuliert und die Reaktion nach 90 min. mit 2 μ l Brefeldin A abgestoppt. Die Zellen wurden nach einer weiteren Ruhephase von 4,5h extrazellulär für CD4 und CD25, sowie intrazellulär für FoxP3 und die zu untersuchenden Zytokine TNF α , IFN γ und IL-2 gefärbt. Zur Darstellung wurden aus den Lymphozyten die CD4+ und aus diesen die CD25+FoxP3+ T-Zellen gated. Non-Treg wurden mittels Boolean-Gate aus CD4+FoxP3- dargestellt. Die Darstellung der Zytokine in der jeweiligen Zellfraktion erfolgte in Prozent als Histogramm.

Unstimulierte CD4+CD25+FoxP3+ nTreg produzierten kein IL-2 und IFN γ und nur zu einem geringen Anteil TNF α (Abb. 15A). Nach Stimulation mit PMA/Iono wurde die Menge an IL-2 und TNF α erhöht, während die Expression von IFN γ reduziert wurde (4,5% auf 1,97%).

Wie bei konventionellen non-Treg wurde verhältnismäßig besonders die Expression von TNF α gesteigert (0,32% auf 7,36%) (Abb. 15B).

A: nTreg unstimuliert



B: nTreg stimuliert

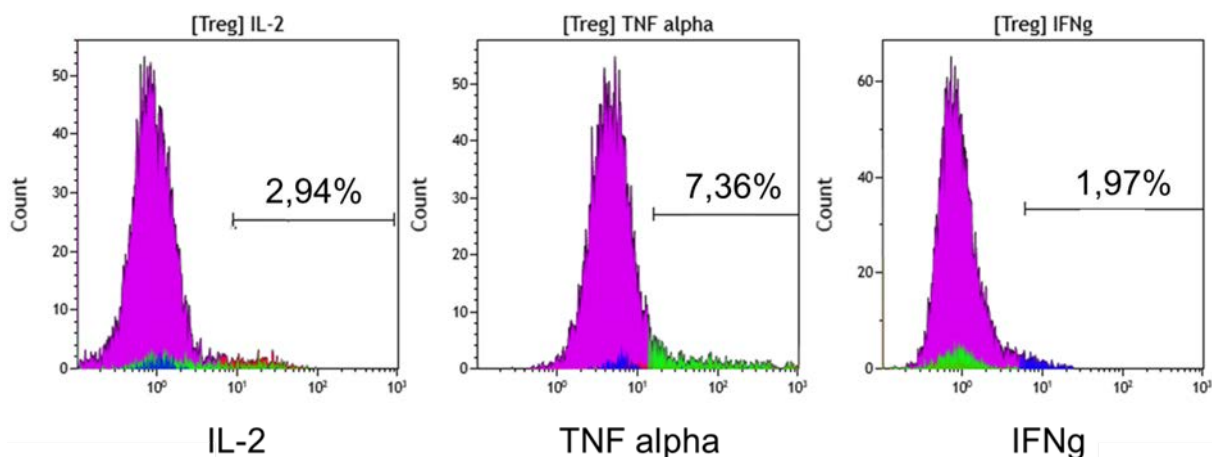


Abb. 15: **Zytokinprofil polyklonal expandierter nTreg:** Unstimulierte (A) und stimulierte (B) nTreg wurden wie konventionelle T-Zellen auf die Menge der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IFN γ und IL-2 untersucht (je n=1). Die Zellen wurden nach einem Tag Ruhe im Inkubator im Medium ohne IL-2 und Rapamycin mit 2 μ l PMA und 1 μ l Ionomycin stimuliert und die Reaktion nach 90 min. mit 2 μ l Brefeldin A abgestoppt. Die Zellen wurden nach einer weiteren Ruhephase von 4,5h extrazellulär für CD3, CD4 und CD25, sowie intrazellulär für FoxP3 und die zu untersuchenden Zytokine TNF α , IFN γ und IL-2 gefärbt. Zur Darstellung wurden aus den Lymphozyten die CD4 $^{+}$ T-Zellen und folgend die CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ nTreg gated. Die Darstellung der Zytokine in der jeweiligen Zellfraktion erfolgte in Prozent als Histogramm.

5.4. Die Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert eine klinisch manifeste, letale xenogene Graft versus Host Disease

Um zu untersuchen, ob eine klinisch manifeste xenogene Graft versus Host Disease mit $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs erreicht werden kann, wurden adulte Balb/c NOD/SCID IL-2R γ $^{-/-}$ Mäuse nach Applikation ohne weitere Therapie untersucht (Kontrolle; n=6).

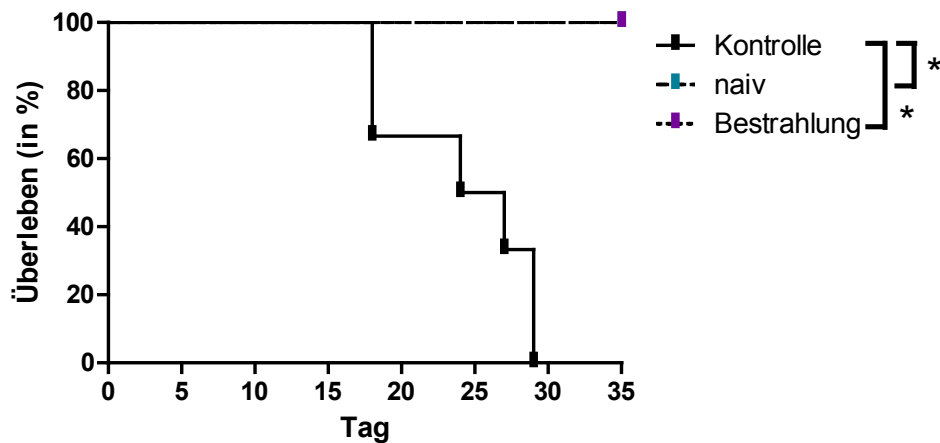
Die erkrankten Tiere überlebten im Mittel 25,5 maimal 28 Tage und mussten alle aufgrund der vorher definierten Endpunkte (Gewichtsverlust >20%, Apathie, struppiges Fell und buckelige Haltung) finalisiert werden. Naive, unbehandelte Kontrolltiere und Tiere, die nur eine subletale Bestrahlung mit 300cGy erhielten überlebten ausnahmslos bis zum Versuchsende an Tag +35 und damit signifikant ($P<0.05$) länger als erkrankte Mäuse (Abb. 16A).

Die erkrankten Tieren verloren im Vergleich zu den naiven, unbehandelten und den nur bestrahlten Tieren kontinuierlich signifikant ($P<0.001$) an Gewicht, während die Verlaufskurven der anderen Mäuse über die Zeit relativ konstant blieben (Abb. 16B).

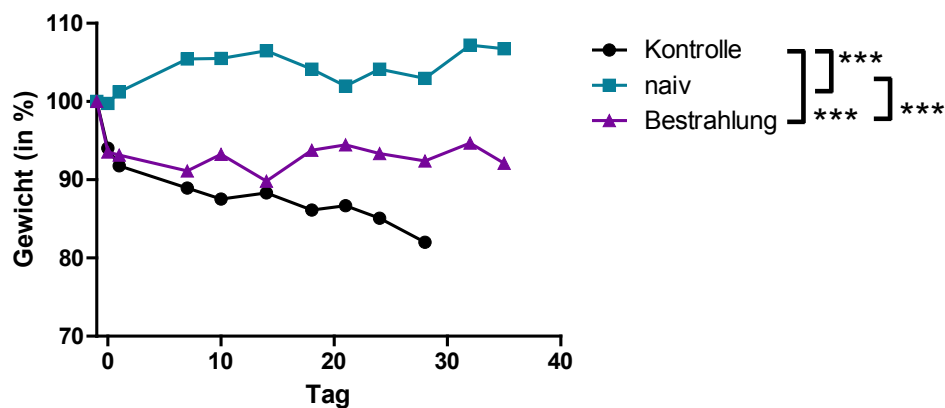
Die Vorbereitung der Tiere auf die Bestrahlung mit 300 cGy wirkte sich nur initial auf das Gewicht aus. Direkt nach der Bestrahlung verloren die Mäuse bis etwa Tag 5 an Gewicht. Im weiteren Verlauf über die Beobachtungszeit konnte das Gewicht jedoch gehalten werden und lag bis zum Versuchsende im Durchschnitt bei über 90% des Ausgangsgewichts. Im Vergleich zu naiven Mäusen war der mittlere Gewichtsverlauf dieser Tiere allerdings signifikant ($P<0.001$) geringer (Abb. 16B). Auf das mittlere Überleben hatte die Bestrahlung keinerlei Einfluss und die Tiere überlebten ausnahmslos bis zum Versuchsende an Tag +35 (Abb. 16A).

Erkrankte Tiere fielen durch ein reduziertes Verhalten, struppiges, teils alopezisches Fell, sowie glasige, tief in der Orbita liegende Augen auf. Die Mäuse waren aufgrund des hohen Gewichtsverlustes teils mager und wirkten eingefallen (Abb.16C).

A Überlebenskurve Kontrolle



B Gewichtsverlauf Kontrolle



C erkrankte Maus Tag+18

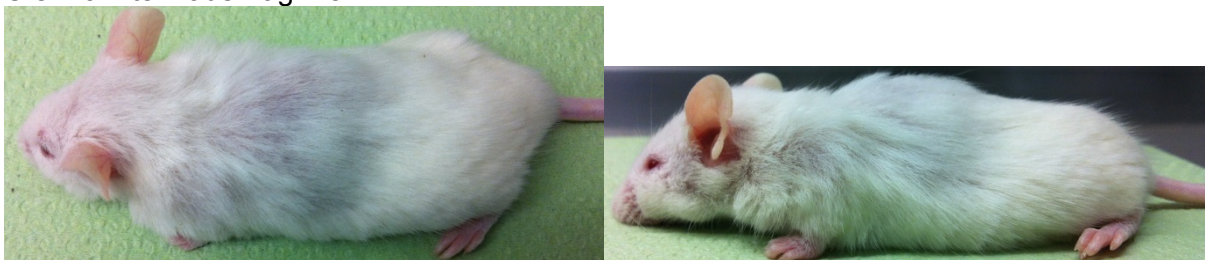


Abb. 16: Überleben, Gewichtsverlauf und klinische Erscheinung der Kontrollgruppen:

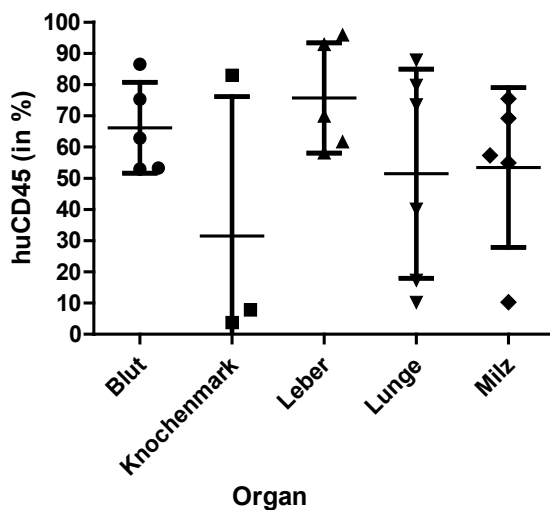
Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle, $n=6$). Als Negativkontrolle wurden naive und nur subletal (300cGy) bestrahlte Tiere (je $n=3$) mitgeführt. Die Tiere wurden täglich ab Tag -1 untersucht und dabei Gewicht und klinischer Zustand (Verhalten, Haltung, Fellstruktur etc.) protokolliert. Gewogen wurde täglich um die gleiche Zeit, um Schwankungen innerhalb des Tagesverlaufs zu vermeiden. Tiere wurden bei einem Gewichtsverlust von $>20\%$ oder schlechtem klinischen Zustand, spätestens an Tag +35 euthanasiert. (A) Darstellung des Überlebens der Kontrolle im Vergleich zur naiven und nur bestrahlten (Bestrahlung) Mäusen als Kaplan-Meier-Kurve; * $P < 0.05$

(B) Gewicht in Prozent im Verlauf über den Beobachtungszeitraum gemessen vom Ausgangsgewicht (100%); Werte für das Gewicht angegeben als Mittelwerte \pm 95% CI; *** $P < 0.001$; Analyse mittels One-Way-ANOVA mit Tukey multiple comparison.

(C): Fotos einer an GvHD-erkrankten Maus am Tag der Organentnahme. Foto aufgenommen an Tag +18 in Narkose mit Ketamin (0,08mg/g) und Xylazin (0,012mg/g).

Die untersuchten Organe wiesen im Durchschnitt hohe bis sehr hohe Anteile an humanen CD45+ Zellen auf (Abb. 17A). In der Blutbahn zirkulierten die Zellen in hoher Menge und im Durchschnitt waren über 60% (66,15% ± 14,58%) der gemessenen Zellen humane CD45+ Leukozyten. Auch die parenchymatösen Organe Leber, Lunge und Milz wurden durch die verabreichten Zellen teils massiv infiltriert, wobei der höchste prozentuale Anteil an CD45+ Zellen in der Leber der erkrankten Tiere gemessen wurde (75,70% ± 17,63%) (Abb. 17A). Bei den humanen Zellen handelte es fast ausschließlich um CD3+ T-Zellen (Abb. 17B). Blut, Leber und Milz konnten nur bei 5 der 6 erkrankten Tiere untersucht werden, da durch den Spontanod einer Maus die Organe bereits in Lyse waren und sich keine Zellen mehr gewinnen liessen. Knochenmark konnte nur bei 3 der 6 Mäuse gewonnen werden. Bei den anderen Tieren lag eine nahezu vollständige Knochenmarksaplasie vor, sodass keine Zellen zur Auswertung gewonnen werden konnten.

A: huCD45 erkrankte Kontrolle



B: CD3 erkrankte Kontrolle

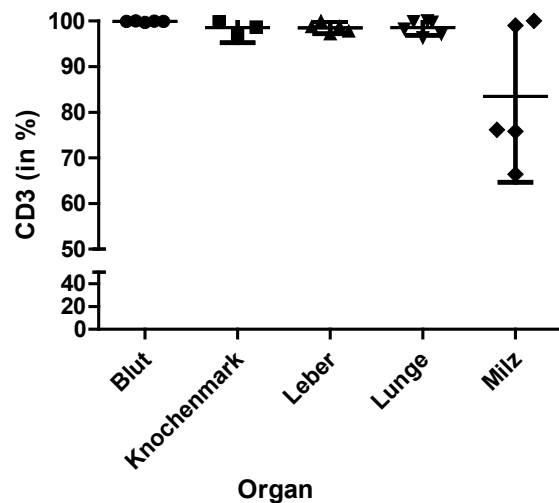


Abb. 17: **Anteil humaner CD45+ und CD3+ Zellen im Gewebe der erkrankten Kontrollgruppe:** Eine xenogene akute Grafit versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle). Anteil an CD45+ (A) und CD3+ (B) Zellen in der erkrankten Kontrollgruppe in Blut, Knochenmark, Leber, Lunge und Milz nach Euthanasie. Nach Aufbereitung und Färbung der Gewebe wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie auf den Anteil an humanen Zellen untersucht. Aus den Lymphozyten wurden dafür zunächst die lebenden Zellen dargestellt und aus diesen im nächsten Schritt der prozentuale Anteil an humanen und murinen CD45+ Zellen aufgetragen. Darstellung der Daten als Mittelwert ± 95% CI; (● n=5, ■ n=3, ▲ n=5, ▼ n=6; ◆ n=5).

5.5. Klassische, zellbasierte und kombinierte Immunsuppression führen zu verlängertem Überleben bei variablem klinischem Erscheinungsbild

Um die angewandten Therapieformen hinsichtlich ihrer Effektivität zur Prävention oder Abschwächung einer akuten Graft versus Host Disease und etwaiger assoziierter unerwünschten Arzneiwirkungen zu untersuchen, wurden Gewichtsverlauf und klinische Erscheinung unter konventioneller Immunsuppression, nach adoptivem Transfer regulatorischer T-Zellen und unter Kombinationstherapie aus Standardimmunsuppression und nTreg ermittelt und verglichen.

Immunsuppressiva wie Ciclosporin A (CsA), Mycophenolat-Mofetil (MMF) und Glukokortikoide wie Methylprednisolon (Pred.) finden routinemäßig Einsatz in der präemptiven Therapie und Behandlung erkrankter Patienten. Neben der gewünschten Regulation der Immunreaktion ist die Therapie, vor allem die Langzeitapplikation mit einer Reihe unerwünschter Arzneimittelwirkungen vergesellschaftet. Diese medikamenten-assoziierten Symptome und Veränderungen sind mitunter nur schwer von klinischen Anzeichen einer akuten Graft versus Host Disease zu unterscheiden. Zur Beurteilung des Therapieerfolges der folgenden Therapieformen (adoptiver Treg-Zelltransfer allein und in Kombination mit Immunsuppressiva) und um medikamenten-assoziierte pathologische Veränderungen und Symptome von einer akuten GvHD differenzieren zu können, wurde je eine Gruppe (n=5 je Gruppe) mit Ciclosporin A, Mycophenolat Mofetil und Methylprednisolon behandelt. Aufgrund des weiten Spektrums an unerwünschten Arzneiwirkungen der etablierten Therapieregimes besteht eine Notwendigkeit zur Erschließung neuer Behandlungskonzepte. Eine mögliche Alternative wäre der Einsatz natürlicher regulatorischer T-Zellen, die in einem festen Verhältnis zu Effektorzellen appliziert werden können. Um zu untersuchen, ob polyklonal expandierte nTreg im Vergleich zur Standardimmunsuppression die Entstehung bzw. den Verlauf und die Schwere der akuten Graft versus Host Disease positiv beeinflussen können, wurden die Zellen in verschiedenen Dosierungen zusammen mit den humanen PBMCs intravenös verabreicht. Für eine klinische Anwendung regulatorischer T-Zellen ist außerdem die Beurteilung ihrer Interaktion mit denen zur Prävention und Therapie einer akuten Graft versus Host Disease zurzeit routinemäßig verwendeten Immunsuppressiva unerlässlich. Daher sollte der Einfluss der Immunsuppressiva auf die regulatorischen T-Zellen *in vivo* untersucht werden. Die Dosen der Immunsuppressiva wurden wie bei der Monotherapie beibehalten, während die Menge der zu applizierenden nTreg auf $0,5 \cdot 10^6$ reduziert wurde.

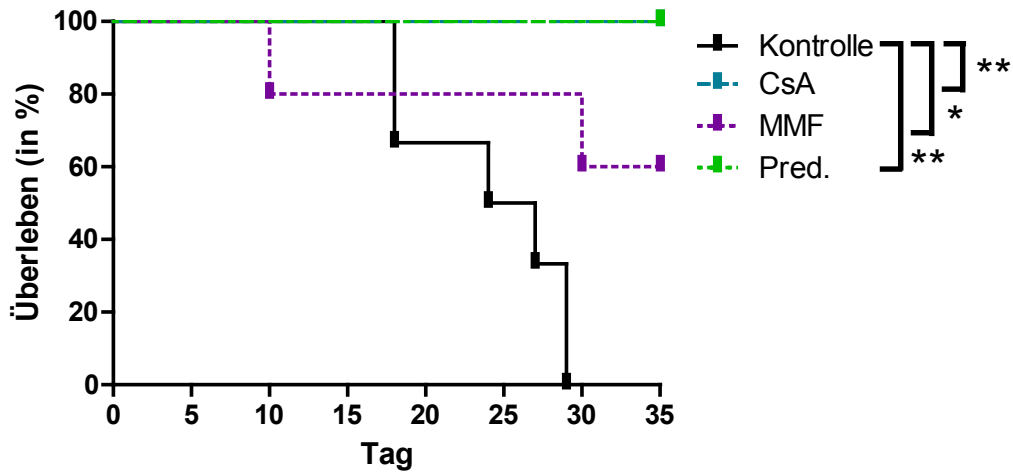
Während erkrankte Tiere im Durchschnitt 25,5 Tage überlebten und alle aufgrund eines Gewichtsverlusts von mehr als 20% und einem sehr schlechten klinischen Erscheinungsbild euthanasiert werden mussten, verlängerte die klassische Immunsuppression mit Ciclosporin A, Mycophenolat-Mofetil und Methylprednisolon das Überleben signifikant ($P < 0.05$ und

$P < 0.01$) (Abb. 18A). Der klinische Verlauf unterschied sich zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen im Mittel jedoch erheblich. Obwohl die Tiere unter der Behandlung mit Ciclosporin A ausnahmslos bis zum Versuchsende überlebten, wiesen einzelne ein relativ niedriges mittleres Gewicht von nur knapp über 80% des Ausgangsgewichts über den Beobachtungszeitraum und im Vergleich zu den anderen Immunsuppressiva reduziertes Verhalten auf. Keines der Tiere war bzgl. des Gewichts oder des klinischen Zustands vergleichbar schlecht mit erkrankten Tieren, sodass eine Euthanasie vor Versuchsende nicht nötig war (Abb. 18B). Auch unter MMF-Behandlung wurde das mittlere Überleben der Tiere insgesamt signifikant verlängert, obwohl zwei Tiere vor Beendigung des Versuchs (Tag +10 und +30) aufgrund massiven Gewichtsverlusts und sehr schlechtem klinischen Zustand (massive, progressiv stärker werdene Diarrhö, Apathie, buckelige Haltung) euthanasiert werden mussten (Abb. 18A). Auch unter MMF lag das mittlere Gewicht über die Zeit, auch bei Tieren mit gutem klinischem Befinden deutlich unter 90% des Ausgangsgewichts (Abb. 18B). Die konventionelle Therapie mit Methylprednisolon erwies sich im Hinblick auf das klinische Bild der Tiere bei der täglichen Untersuchung inkl. Gewichtsverlauf als signifikant überlegen im Vergleich zu CsA und MMF Monotherapie (Abb. 18B). Auch in unter dieser Behandlung überlebten die Tiere ohne Ausnahme bis zum Ende des Versuchszeitraums (Abb. 18A). Während unter konventioneller Immunsuppression alle Gruppen signifikant länger überlebten als erkrankte Tiere, konnten nach adoptivem Transfer regulatorischer T-Zellen nur Dosierungen von nTreg 1:1 und 1:2 das Überleben signifikant verlängern ($P < 0.05$ und $P < 0.01$). Eine geringere Dosis von nTreg 2:1 resultierte nicht in einem signifikant längeren Überleben (29,5 Tage) und fünf von sechs Tieren mussten vor Beendigung des Beobachtungszeitraums euthanasiert werden (Abb. 19A). Auch in den Gruppen mit einer gleichen (nTreg 1:1) oder höheren Dosierung (nTreg 1:2) mussten Tiere vor Tag +35 finalisiert werden (Abb. 19A). Im Vergleich zur erkrankten Kontrolle und der Dosis nTreg 2:1 setzten klinische Symptome in diesen Dosierungen, die eine vorzeitige Tötung der Tiere nötig machten erst gegen Ende des Beobachtungszeitraums ein, während die unbehandelten Kontrolltiere ebenso wie Tiere nach adoptivem Transfer von nTreg 2:1 zum Teil bereits vor Tag +20 aufgrund der definierten Endpunkte ($>20\%$ Gewichtsverlust, buckelige Haltung, Apathie) erlöst werden mussten. Auch die mittleren Gewichtsverläufe über die Zeit variierten zwischen den Tieren unter nTreg Behandlung teils signifikant. Initial nach Beginn des Versuchs fielen alle Gruppen, auch Tiere mit $3 \cdot 10^6$ nTreg allein im mittleren Gewicht ab. Sowohl Tiere unter einer Therapie mit nTreg 1:2, als auch mit nTreg allein konnten im weiteren Verlauf des Experiments im Mittel wieder deutlich an Gewicht auf mehr als 90% zunehmen und lagen damit im Durchschnitt signifikant über dem Gewicht der erkrankten Tiere ($P < 0.001$) und dem der Tiere mit adoptivem nTreg-Transfer 2:1 und 1:1 ($P < 0.001$) (Abb. 19B). Mäuse der Gruppe mit regulatorischen T-Zellen in einer Dosierung von 2:1 und 1:1, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums überleb-

ten (n=1 bei nTreg 2:1; n=3 bei nTreg 1:1), wiesen im Mittel noch ein Gewicht von <85% des Ausgangsgewichts auf, wobei es bereits ab Tag 28 zum kontinuierlichen Abfall des mittleren Gewichtes kam (Abb. 19B). Regulatorische T-Zellen allein hatten nach der intravenösen Applikation keinen Einfluss auf den Gesundheitszustand und die Mäuse überlebten ausnahmslos bis zum Versuchsende (Abb. 19A). Auch das mittlere Gewicht über die Zeit siteg nach einem initialen Abfall ab Tag +5 wieder an und wurde bei weit über 90% des Ausgangsgewichts gehalten (Abb. 19B).

Auch die klinische Erscheinung variierte interindividuell innerhalb der Behandlungsgruppen nach adoptivem nTreg Transfer. Im Mittel ähnelte das Bild der Mäuse unter Therapie mit nTreg 2:1 dem der unbehandelten Kontrolle. Die Mäuse erschienen matt bis apathisch, mit einer gebuckelten Körperhaltung. Die Augen waren glasig und lagen tief in der Orbita. Das Fell war teilweise struppig und nicht glatt anliegend (Abb. 20A). Ein vergleichbares Erscheinungsbild ergab sich auch bei den Tieren mit nTreg 1:1 und 1:2, die vor Beendigung des Versuchszeitraums euthanasiert werden mussten. Tiere, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums überlebten, ohne klinische Anzeichen einer akuten Graft versus Host Disease aufzuweisen, zeigten eine deutlich bessere Konstitution auf. Die Mäuse wirkten munter und wiesen eine gute bis sehr gute Körperkonstitution auf. Die Augen waren klar und das Fell lag dem Körper glatt an (Abb. 20B).

A: Überlebenskurve Immunsuppression



B: Gewichtsverlauf Immunsuppression

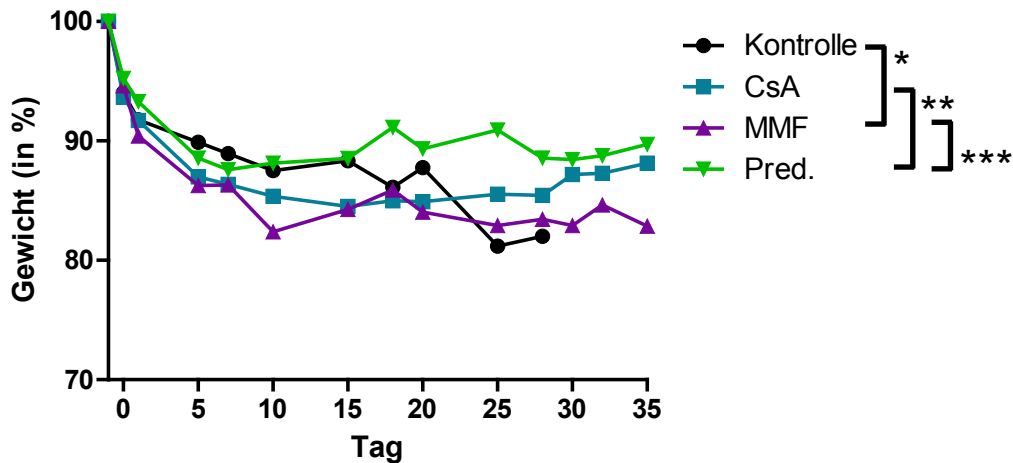
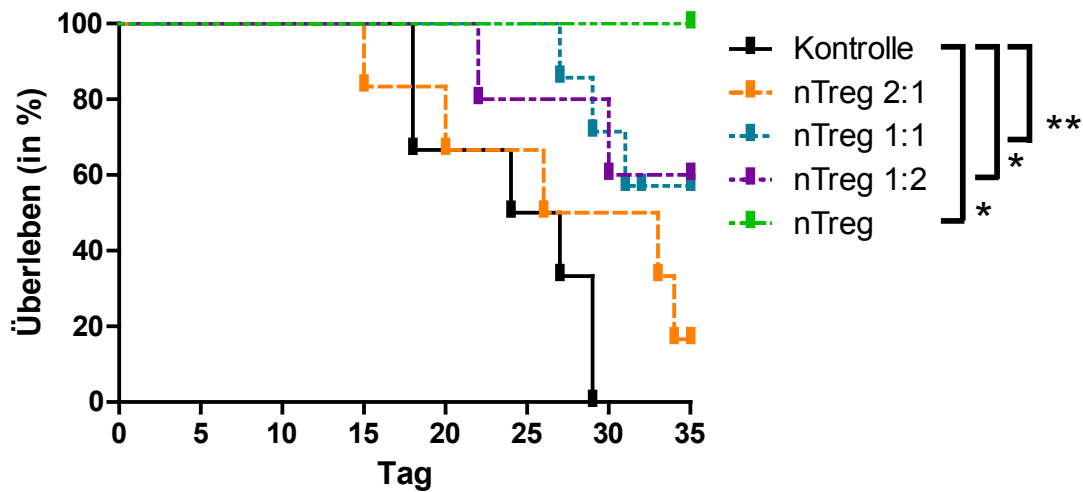


Abb. 18: **Überlebenskurve und Gewichtsverlauf erkrankte Kontrolle im Vergleich klassische Immunsuppression:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs i.v. induziert (Kontrolle n=6). Zur weiteren Therapie wurden täglich ab Tag +1 CsA (4mg/kg s.c.), MMF (0,5mg p.os) oder Pred. (20mg/kg i.p.) als Standardimmunsuppression allein (je n=5) appliziert. Darstellung des mittleren Überlebens im Vergleich unbehandelte Kontrolle zu klassischer Immunsuppression (A) als Kaplan-Meier-Kurve. (B): Darstellung des mittleren Gewichtsverlaufs über die Zeit im Vergleich unbehandelte Kontrolle zu klassischer Immunsuppression; Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, Pred.: Methylprednisolon

A: Überleben Kontrolle / nTreg Therapie



B: Gewichtsverlauf Kontrolle / nTreg Therapie

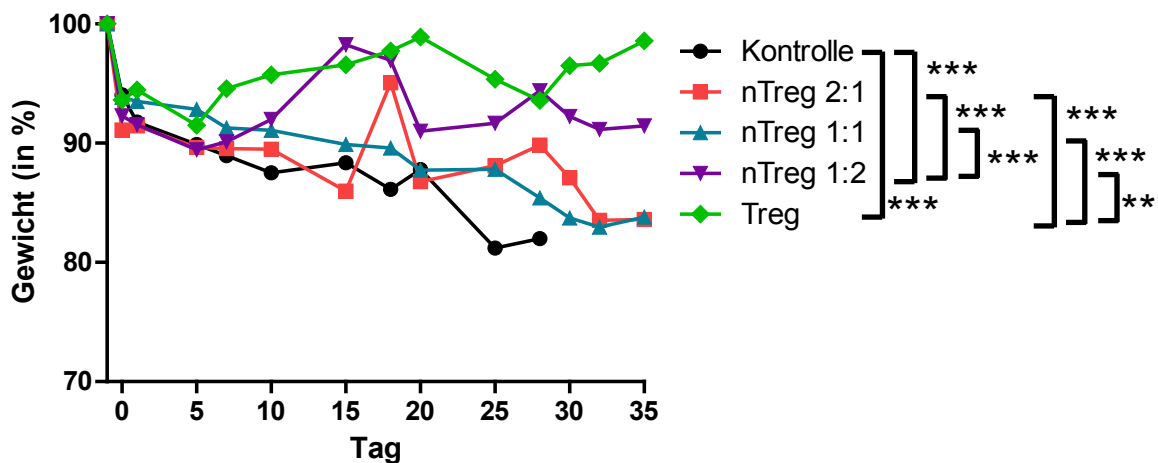
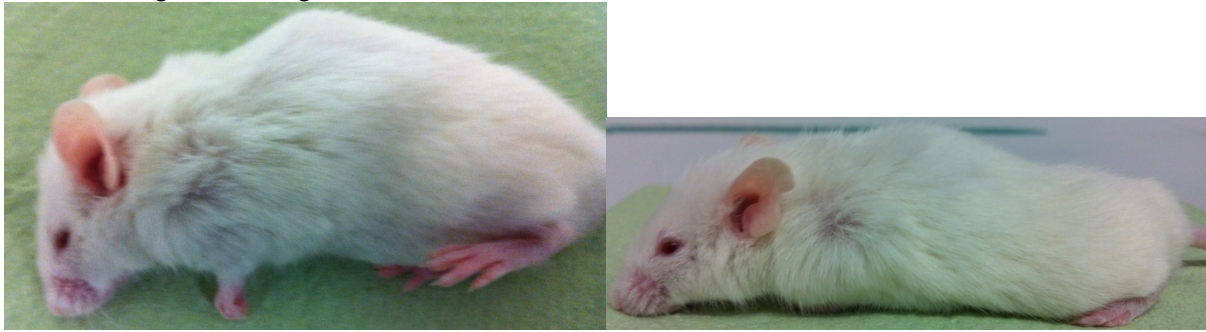


Abb. 19: **Überlebenskurve und Gewichtsverlauf erkrankte Kontrolle im Vergleich zur nTreg Therapie:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs i.v. induziert (Kontrolle n=6). Zur weiteren Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 (n=6), 1:1 (n=7) oder 1:2 (n=5) i.v. verabreicht. Zur Kontrolle auf Sicherheit des Zellproduktes wurden einer Gruppe (n=3) ausschließlich $3 \cdot 10^6$ nTreg i.v. appliziert. Darstellung des mittleren Überlebens im Vergleich unbehandelte Kontrolle zu nTreg Therapie (A) als Kaplan-Meier-Kurve. (B): Darstellung des mittleren Gewichtsverlaufs über die Zeit im Vergleich unbehandelte Kontrolle zu nTreg Therapie; Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Abkürzung: nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

A. Maus Tag +20 nTreg 2:1



B: Maus Tag +35 nTreg 1:2

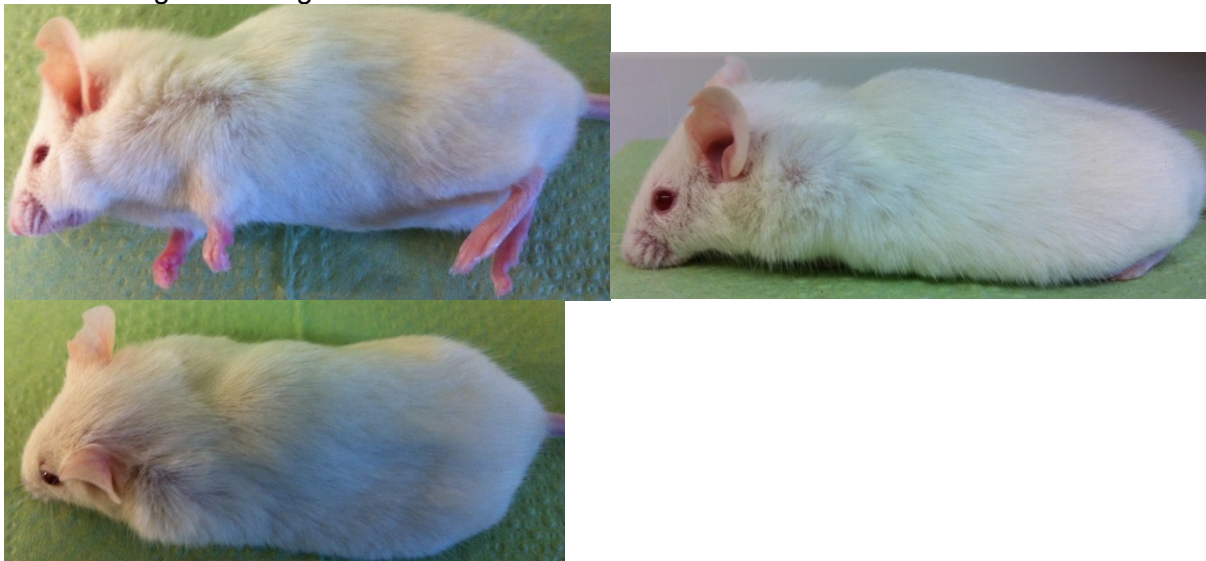


Abb. 20: **Repräsentative Fotos von Mäusen unter nTreg Therapie 2:1 und 1:2:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle $n=6$). Zur weiteren Therapie wurden simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 ($1,5 \cdot 10^6$; $n=6$) (A), 1:1 ($3 \cdot 10^6$; $n=7$) oder 1:2 ($6 \cdot 10^6$; $n=5$) (B) i.v. an Tag 0 verabreicht. Fotos je einer Maus nach Applikation nTreg 2:1 (A) und 1:2 (B). Fotos aufgenommen am Tag der Organentnahme in Narkose mit Ketamin (0,08mg/g) und Xylazin (0,012mg/g).

Im direkten Vergleich zwischen konventioneller Immunsuppression und nTreg-Therapie erwies sich die Behandlung mit nTreg 1:2 ebenfalls als signifikant besser im Hinblick auf den mittleren Gewichtsverlauf. Vor allem im Vergleich zur Therapie mit CsA und MMF war dieser Unterschied sehr deutlich ($P < 0.001$) (Abb. 21), da beide Behandlungsformen mit einer verhältnismäßig schlechten Klinik im Hinblick auf das Gewicht assoziiert waren. Aber auch im Vergleich zur Monotherapie mit Methylprednisolon zeigten Tiere unter nTreg 1:2 Behandlung im Mittel einen signifikant besseren Gewichtsverlauf, wobei dieser Unterschied im Vergleich zu den anderen Immunsuppressiva (CsA und MMF) weniger deutlich war ($P < 0.05$) (Abb. 21). Der verhältnismäßig reduzierte Gewichtsverlauf unter MMF-Behandlung war auch gegenüber den anderen Gruppen unter nTreg Behandlung (nTreg 2:1 und 1:1) signifikant schlechter ($P < 0.001$) (Abb. 21)

Gewichtsverlauf Kontrolle, Immunsuppression und nTreg Therapie

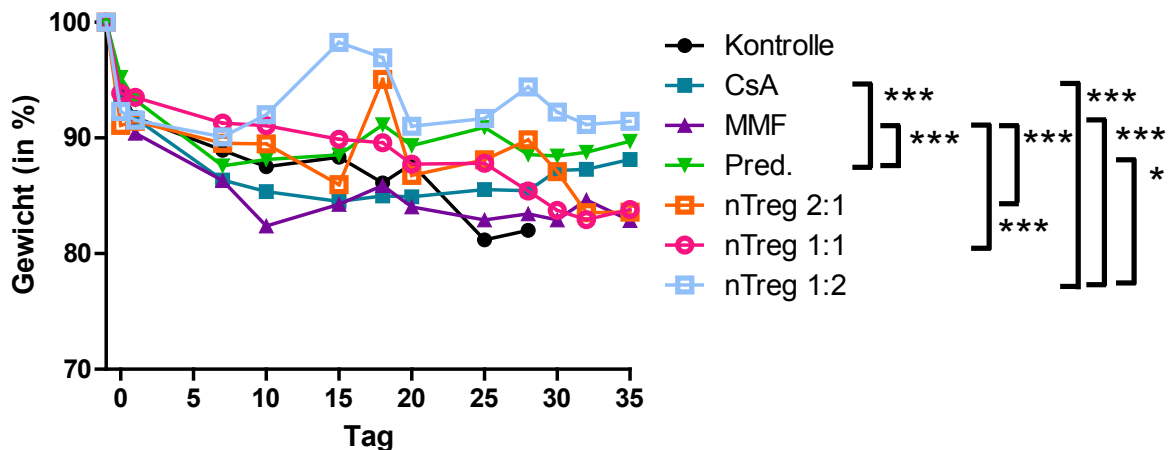


Abb. 21: **Mittlerer Gewichtsverlauf über die Zeit unter nTreg Therapie im Vergleich zur Standardimmunsuppression:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs i.v. induziert (Kontrolle n=6). Zur weiteren Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 (n=6), 1:1 (n=7) oder 1:2 (n=5) i.v. oder täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken), Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os) oder Methylprednison (20mg/kg i.p.) als Standardimmunsuppression (je n=5) appliziert.

Darstellung des mittleren Gewichtsverlaufs über die Zeit im Vergleich unbehandelte Kontrolle zu klassischer Immunsuppression und nTreg Therapie. Werte für das Gewicht angegeben als Mittelwert. Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Signifikanzen für Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle oder innerhalb der nTreg Gruppen sind in dieser Abbildung nicht aufgetragen.

Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

In weiteren Gruppen wurden das Überleben und der klinische Verlauf unter Kombinationstherapie mit klassischer Immunsuppression und $0,5 \cdot 10^6$ nTreg im Vergleich zur erkrankten Kontrolle, sowie der entsprechenden konventionellen Immunsuppression und dem adoptiven Transfer regulatorischer T-Zellen 2:1 untersucht. Die Dosis von nTreg 1:1 und 1:2 wurde mit der Kombinationstherapie nicht verglichen, da diese bereits im Vergleich zur erkrankten Kontrolle signifikant bessere Verläufe aufwiesen.

Wie unter konventioneller Immunsuppression überlebten auch die Tiere unter der entsprechenden Kombinationstherapie signifikant länger (Abb. 22A-C). Die Signifikanzen im Überleben im Vergleich zur erkrankten Kontrolle unterschieden sich unter CsA/nTreg- bzw. MMF/nTreg- Behandlung nicht von denen der entsprechenden Monotherapie (Abb. 22A und B). Im Vergleich zum adoptiven Transfer von nTreg in der Dosis 2:1 war nur die Behandlung mit CsA, sowohl allein, als auch in Kombination signifikant überlegen (P<0.01), während es im Vergleich zur Therapie mit MMF (allein und in Kombination) keine signifikanten Unterschiede gab (Abb. 22A und B).

In der Gruppe mit einer kombinierten Therapie aus Ciclosporin A und regulatorischen T-Zellen überlebten alle Tiere ausnahmslos bis zum Versuchsende, während unter einer Be-

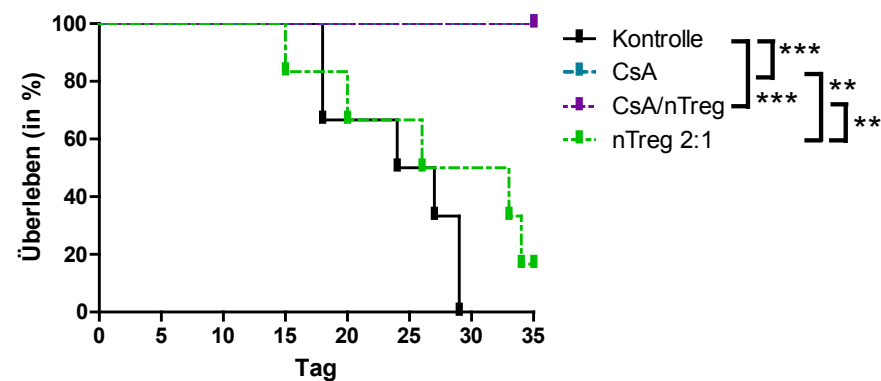
handlung mit MMF/nTreg, wie auch unter Monotherapie zwei Tiere vorzeitig euthanasiert werden mussten (Abb. 22A und B). Der Zeitpunkt, an dem die Tiere finalisiert werden mussten, lag allerdings weiter gegen Ende des Beobachtungszeitraums (Tag +31 und +32), während Tiere unter Standardimmunsuppression mit MMF allein bereits zu einem früheren Zeitpunkt (Tag +10 und +30) getötet werden mussten. Zwischen den beiden Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied ($P=0,8374$) (Abb. 22B).

Ein deutlicher Unterschied ergab sich im Vergleich zwischen der Therapie mit Methylprednisolon als Monotherapie und in Kombination mit regulatorischen T-Zellen. Zwar verbesserte die Kombinationstherapie das mittlere Überleben der Tiere im Vergleich zur erkrankten Kontrolle signifikant ($P<0.05$), jedoch weniger deutlich als die entsprechende konventionelle Therapie ($P<0.01$), da anders als unter Standardimmunsuppression drei von sechs Tieren vor Beendigung des Beobachtungszeitraums euthanasiert werden mussten, während Tiere unter Methylprednisolon allein ausnahmslos bis zum Versuchsende überlebten (Abb. 22C). Im Mittel überlebten die Tiere unter der Behandlung mit Pred./nTreg 33 Tage, wobei zwei Tiere bereits vor Tag +30 euthanasiert werden mussten (Tag +24 und Tag +25) (Abb. 22C).

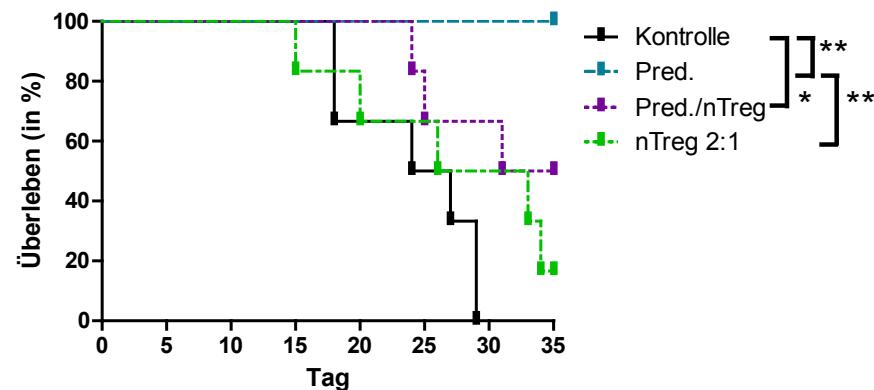
Im Vergleich zur Behandlung mit nTreg in der Dosierung 2:1 ergaben sich für beide Behandlungsformen keine signifikanten Unterschiede und auch im Vergleich der beiden Therapien zueinander war der Unterscheid zwar sehr deutlich, statistisch allerdings nicht signifikant ($P=0.0802$) (Abb. 22C).

Während Ciclosporin A und Mycophenolat-Mofetil als Monotherapie mit einem mäßigen mittleren Gewicht über die Zeit vergesellschaftet waren, konnten die Tiere im Mittel unter der jeweiligen Kombinationstherapie nach dem initialen Gewichtsverlust zu Beginn im weiteren Verlauf wieder an Gewicht zunehmen, wobei dies bei Tieren unter CsA/nTreg bereits ab Tag +5, bei Tieren unter MMF/nTreg Behandlung erst ab Tag +15 der Fall war (Abb. 23A und B). Entsprechend den Gewichtsverläufen war auch der jeweilige klinische Zustand der Tiere deutlich besser als unter der jeweiligen Monotherapie. Die Unterschiede zur jeweiligen klassischen Immunsuppression waren statistisch nicht signifikant (Abb. 23A und B). Die Behandlung mit Methylprednisolon allein resultierte in einem sehr guten mittleren Gewichtsverlauf bei einem sehr guten klinischen Erscheinungsbild. Auch die Kombinationstherapie aus Methylprednisolon und nTreg führte nach dem initialen Gewichtsverlust ab Tag +5 zunächst wieder zu einer leichten Gewichtszunahme, bevor es im Zeitraum Tag +18 bis Tag +25 zu einem Abfall des durchschnittlichen Gewichts kam (Abb. 23C). In diesem Zeitraum mussten zwei der sechs Tiere euthanasiert werden, weshalb es im Mittel zu diesem mittleren Gewichtsverlust kam. Die Tiere, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums überlebten, wiesen einen sehr guten und im Mittel sogar besseren Gewichtsverlauf zum Ende des Versuchszeitraums auf, ohne, dass dieser Unterschied signifikant gewesen wäre (Abb. 23C).

A: Überlebenskurve Kombinationstherapie CsA/nTreg



C: Überlebenskurve Kombinationstherapie Pred./nTreg



B: Überlebenskurve Kombinationstherapie MMF/nTreg

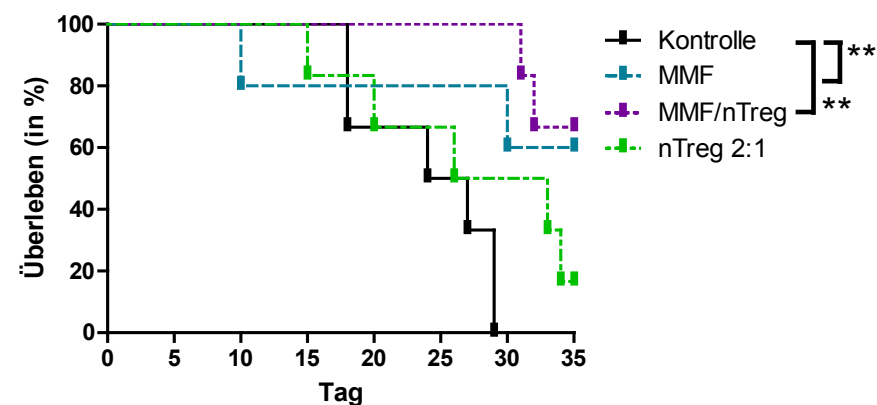
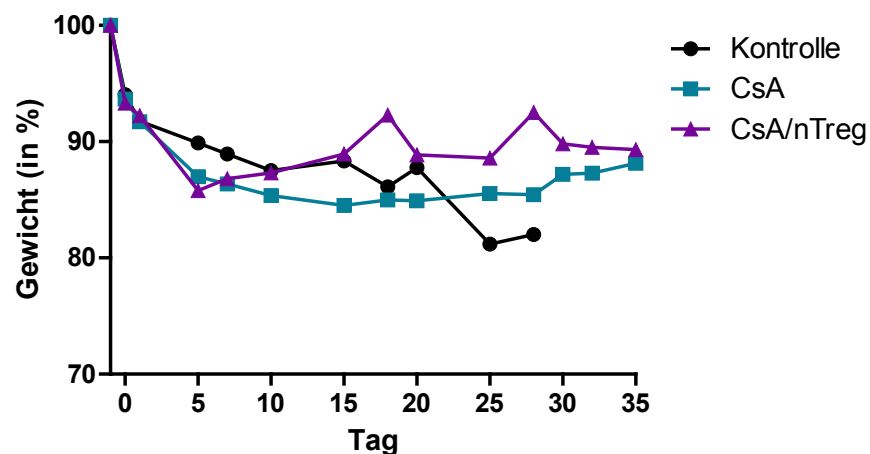
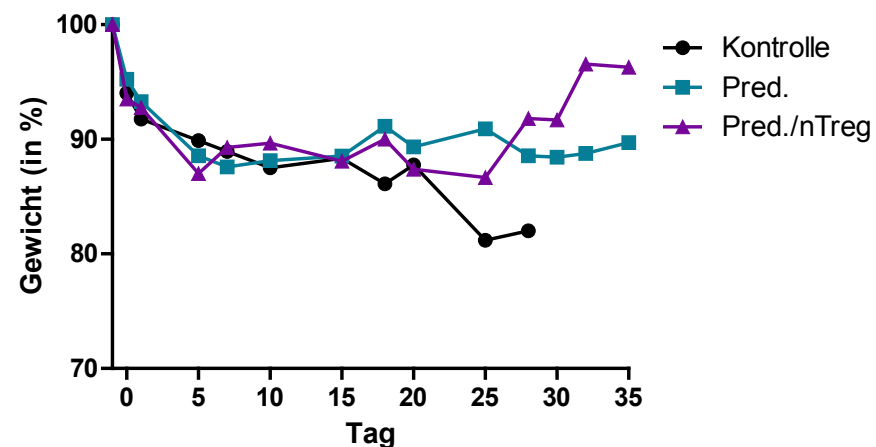


Abb. 22: **Überlebenskurve im Vergleich erkrankte Kontrolle, Standardimmunsuppression, nTreg Therapie und Kombinationstherapie:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle; $n=6$). Zur weiteren Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 ($1,5 \cdot 10^6$) ($n=6$) i.v. verabreicht oder täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken), Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os) oder Methylprednison (20mg/kg i.p.) als Standardimmunsuppression (je $n=5$) allein oder nach Injektion von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 appliziert (CsA/nTreg $n=5$; MMF/nTreg $n=6$; Pred./nTreg $n=6$). Darstellung des mittleren Überlebens im Vergleich unbehandelte Kontrolle zu nTreg Therapie 2:1 und Therapie mit CsA und CsA/nTreg (A), MMF und MMF/nTreg (B) und Pred. und Pred./nTreg (C) als Kaplan-Meier-Kurve. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

A: Gewichtsverlauf Kombinationstherapie CsA/nTreg



C: Gewichtsverlauf Kombinationstherapie Pred./nTreg



B: Gewichtsverlauf Kombinationstherapie MMF/nTreg

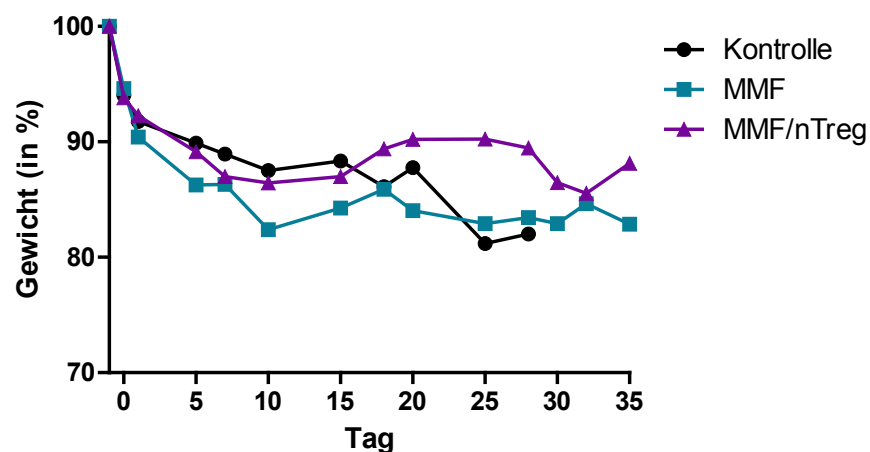


Abb. 23: Mittlerer Gewichtsverlauf im Vergleich erkrankt Kontrolle, Standardimmunsuppression, nTreg Therapie und Kombinationstherapie: Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle; n=6). Zur weiteren Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 ($1,5 \cdot 10^6$) (n=6) i.v. verabreicht oder täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken), Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os) oder Methylprednison (20mg/kg i.p.) als Standardimmunsuppression (je n=5) allein oder nach Injektion von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 appliziert (CsA/nTreg n=5; MMF/nTreg n=6; Pred./nTreg n=6). Darstellung des mittleren Gewichtsverlaufs über die Zeit im Vergleich unbehandelte Kontrolle zu nTreg Therapie 2:1 und Therapie mit CsA und CsA/nTreg (A), MMF und MMF/nTreg (B) und Pred. und Pred./nTreg (C). Werte für das Gewicht angegeben als Mittelwert. Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

Fast alle Therapieoptionen verlängerten das mittlere Überleben der Tiere im Vergleich zu erkrankten Mäusen signifikant bei sehr variablem klinischem Erscheinungsbild. Vor allem die Therapie mit nTreg 1:2 resultierte im Durchschnitt in einem guten bis sehr guten klinischen Verlauf. Auch im Vergleich zur Kombinationstherapie ergaben sich im Hinblick auf das durchschnittliche Gewicht über die Zeit signifikante Unterschiede. Obwohl die Behandlung mit CsA/nTreg der entsprechenden Monotherapie vergleichsweise überlegen war, was das Gewicht und den Allgemeinzustand betrifft, ergab sich im Vergleich zum adoptiven Transfer mit nTreg 1:2 ein signifikanter Unterschied ($P < 0.01$) (Abb. 24). Dieser war allerdings im Vergleich zur Behandlung mit CsA allein ($P < 0.001$) weniger deutlich. Auch die Therapie mit MMF/nTreg bzw. Pred./nTreg war bezüglich des mittleren Gewichtsverlaufs über die Zeit weniger effektiv als die Behandlung mit einer hohen Dosis nTreg (1:2), obwohl die Tiere, die unter Pred./nTreg bis zum Versuchsende überlebten ab Tag +30 ein durchschnittlich besseres Gewicht aufwiesen (Abb. 24).

Gewichtsverlauf Kontrolle, Kombinationstherapie und nTreg Therapie

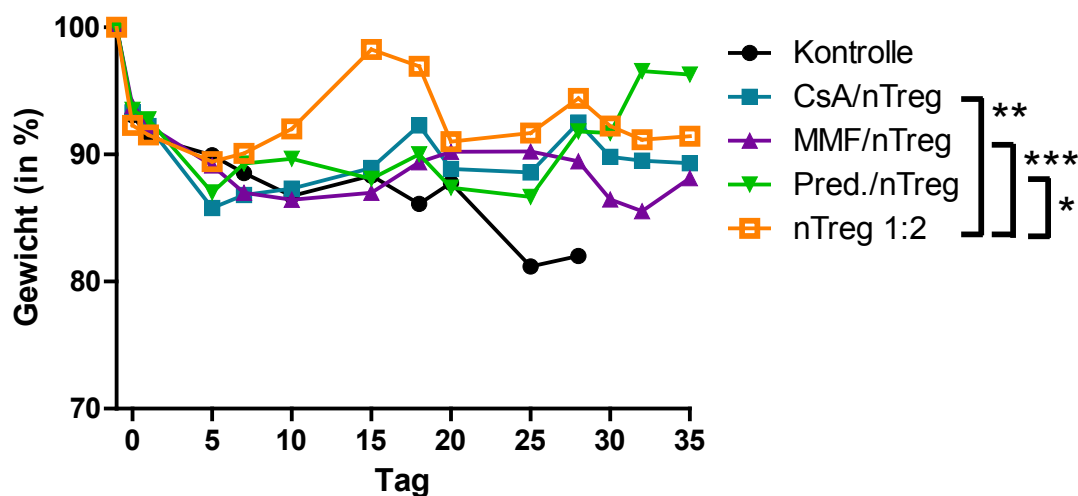


Abb. 24: **Mittlerer Gewichtsverlauf über die Zeit unter Kombinationstherapie im Vergleich zur erkrankten Kontrolle und nTreg Therapie 1:2:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle; $n=6$). Zur weiteren Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in einer Dosierung von $1:2$ ($6 \cdot 10^6$) ($n=5$) i.v. verabreicht oder nach einmaliger Injektion von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg zusammen mit den humanen PBMCs an Tag 0 täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken; $n=5$), Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os; $n=6$) oder Methylprednison (20mg/kg i.p. $n=6$) als Standardimmunsuppression appliziert. Darstellung des mittleren Gewichtsverlaufs unter Kombinationstherapie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zur Therapie mit nTreg 1:2. Aufgetragen ist das Gewicht in Prozent im Verlauf über den Beobachtungszeitraum gemessen vom Ausgangsgewicht (100%); Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

5.6. Der prozentuale Anteil an zirkulierenden CD45+ humanen Zellen hängt vom Zeitpunkt der Blutentnahme ab

Um zu untersuchen in welcher Menge intravenös applizierte PBMCs im Blut zirkulieren und ob die Wahl der immunsuppressiven Therapie Einfluss auf den prozentualen Anteil hat, wurde sowohl an Tag +7 als auch zum Versuchsende jeweils eine Blutprobe genommen und analysiert. An Tag+ 7 wurde das Blut dafür über eine Inzision in die laterale Schwanzvene und am Tag der Organentnahme nach Öffnung der Abdominalhöhle direkt aus der Vena cava caudalis entnommen.

Humane Leukozyten infiltrieren nach intravenöser Applikation schnell sekundäre Lymphorgane, wodurch der prozentuale Anteil an CD45+ Zellen im Blut an Tag +7 in allen Gruppen, sowohl der erkrankten Kontrolle, als auch unter Therapie mit durchschnittlich weniger als 4% sehr gering war (Abb. 25A). Zwischen der erkrankten Kontrolle, klassischer Immunsuppression und Kombinationstherapie gab es keinen Unterschied im mittleren Anteil an humanen Zellen und die prozentuale Menge an CD45+ Zellen betrug in allen Gruppen weniger als ein Prozent (Abb.25A). Nach adoptivem Transfer regulatorischer T-Zellen war der prozentuale Anteil vergleichsweise dazu in allen Dosierungen deutlich erhöht. Vor allem die Dosis von nTreg 2:1 resultierte in einer höheren Menge zirkulierender humaner Leukozyten von durchschnittlich 2,45% ($\pm 1,89\%$) und im Vergleich zu erkrankten Tieren, der Monotherapie mit CsA und der Kombinationstherapie aus Methylprednisolon/nTreg war dieser Unterschied signifikant ($P < 0.05$) (Abb.25A). Auch nach Transfer von nTreg 1:2 zirkulierten an Tag +7 noch durchschnittlich 2% humane CD45 Zellen im Blut, wobei dieser Unterschied im Vergleich zu den anderen Gruppen statistisch nicht signifikant war (Abb. 25A).

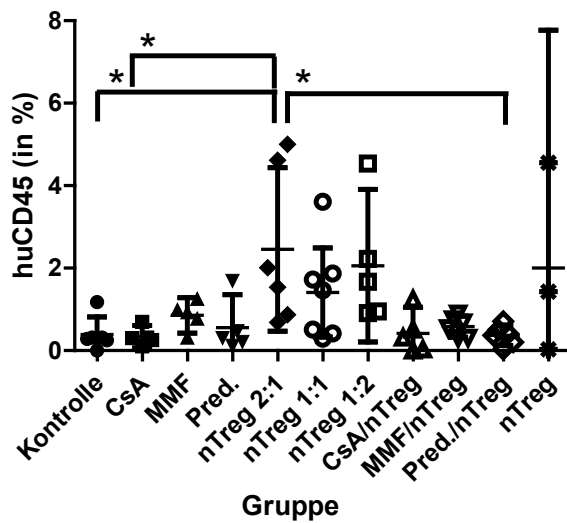
Während an Tag +7 insgesamt sowohl bei Kontrolltieren, als auch bei immunsupprimierten Tieren nur wenige humane Zellen in der Peripherie zirkulierten, war der prozentuale Anteil zum Zeitpunkt der Organentnahme je nach untersuchter Gruppe teils deutlich erhöht (Abb. 25B).

Während erkrankte Kontrolltiere kurz nach Applikation humaner PBMCs noch wenig CD45 Zellen im Blut aufwiesen, zirkulierten nach Entwicklung einer manifesten akuten Graft versus Host Disease hohe bis sehr hohe Mengen an CD45+ Zellen ($66,15\% \pm 14,58\%$) (Abb. 25B). Je nach angewandter Therapie konnte der Anteil an humanen Zellen im Blut deutlich reduziert werden. Vor allem die Behandlung mit Ciclosporin A, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit nTreg resultierte in einem signifikant verringerten prozentualen Anteil an humanen Leukozyten ($P < 0.001$) und im Durchschnitt zirkulierten weniger als zwei Prozent CD45 Zellen im Blut der Tiere (Abb. 25B). Auch die Behandlung mit Methylprednisolon allein, aber nicht in Kombination mit regulatorischen T-Zellen führte zu einer signifikanten Reduzierung an humanen Zellen im Blut ($19\% \pm 26,02\%$; $P < 0.05$) (Abb.

25B). Mycophenolat-Mofetil war von allen Gruppen unter Standardimmunsuppression allein am wenigsten effektiv, um die Zelllast in der Blutbahn zu verringern und im Schnitt lag der prozentuale Anteil an CD45 Zellen bei 25%, wobei vereinzelt auch deutliche höhere Zellmengen gemessen wurden (Abb. 25B). Die Kombinationstherapie aus MMF/nTreg hingegen war im Durchschnitt vergleichbar der Behandlung mit Methylprednisolon/nTreg (Abb. 25B).

Auch der adoptive Transfer regulatorischer T-Zellen resultierte dosisunabhängig im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in einem reduzierten prozentualen Anteil an humanen Zellen (Abb. 25B). Vor allem die Dosis von nTreg 1:2 verringerte die mittlere Zellmenge im Blut zum einen im Vergleich zu erkrankten Tieren, zum anderen auch im Vergleich zur Kombinationstherapie mit MMF/nTreg und Pred./nTreg auf $25,49\% \pm 26,65\%$ (Abb. 25B). Die Dosis von nTreg 1:1 führte zu einer im Durchschnitt vergleichbaren Menge an Zellen wie die Kombination aus MMF/nTreg und Pred./nTreg und im Mittel waren ca. 40% der zirkulierenden Zellen CD45+ humane Leukozyten (Abb. 25B). Von den Gruppen unter nTreg Therapie wurde die höchste Zelllast an humanen Zellen unter einer Dosis von nTreg 2:1 gemessen (Abb. 25B). Im Schnitt lag der prozentuale Anteil bei rund 45% ($44,8\% \pm 33,545$), wobei ein Großteil der Tiere (zwei von vier) teils deutlich mehr CD45 Zellen im Blut aufwies (Abb. 25B). Statistisch signifikant war dieser Unterschied im Vergleich zu den anderen Therapiegruppen jedoch nur im Vergleich zur Behandlung mit Ciclosporin A und CsA/nTreg (Abb. 25B).

A: huCD45 Tag+7



B: huCD45 Versuchsende

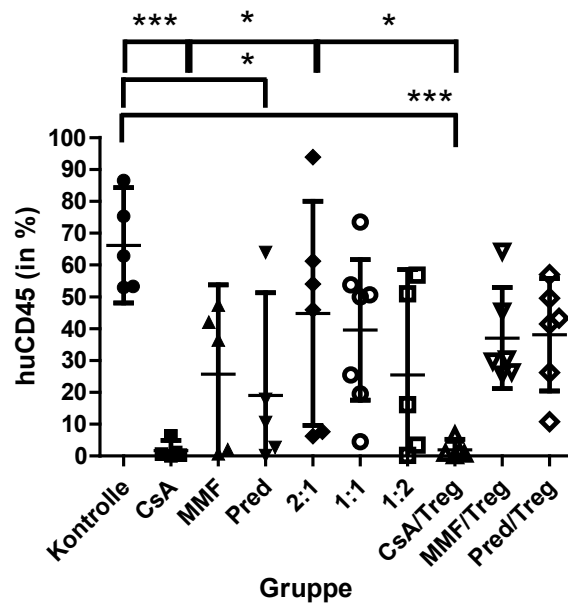


Abb. 25: Anteil an zirkulierenden humanen Zellen im Blut an Tag +7 und zum Versuchsende: Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle; n=6). Zur weiteren Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in einer Dosierung von 2:1 ($1,5 \cdot 10^6$; n=6), 1:1 ($3 \cdot 10^6$; n=7) oder 1:2 ($6 \cdot 10^6$; n=5) i.v. verabreicht oder täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken), Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os) oder Methylprednison (20mg/kg i.p.) als Standardimmunsuppression (je n=5) allein oder nach Injektion von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 appliziert (CsA/nTreg n=5; MMF/nTreg n=6; Pred./nTreg n=6). An Tag +7 wurden allen Tieren durch Inzision in die laterale Schwanzvene max 200 μ l Vollblut entnommen. Zum Versuchsende wurde das Blut nach Öffnung der Abdominalhöhle direkt aus der Vena Cava caudalis entnommen. Zur Beurteilung des Anteils an humanen Zellen im Blut wurden aus den Lymphozyten zunächst die lebenden Zellen dargestellt und aus diesen dann die murinen CD45 gegen die humanen CD45 Zellen gated. Darstellung CD45 im Blut aller Gruppen im Vergleich als Scatter Plot; Daten dargestellt als Mittelwert \pm 95% CI. Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

5.7. Die Infiltration humaner Zellen und die Inflammation der Gewebe wird durch die Wahl der Immunsuppression bestimmt

Eine akute Graft versus Host Disease ist, je nach Schwere der Erkrankung, durch eine massive Infiltration und Inflammation von Haut, Darm und Leber gekennzeichnet. Die Lunge und die Niere zählen nicht zu den primären Zielorganen der Erkrankung, können aber im Einzelfall auch im Verlauf der Erkrankung betroffen sein.

Histologisch wurden daher die klassischen Zielorgane Haut, Darm und Leber, sowie Lunge, Milz und Niere untersucht.

In den Zielorganen Haut und Darm konnte bei erkrankten Tieren keine Infiltration humaner Zellen und auch sonstigen pathologischen Veränderungen festgestellt werden. Die Gewebe wiesen jeweils eine physiologische Gewebsstruktur ohne Anzeichen einer Inflammation auf (Abb. 26A und B).

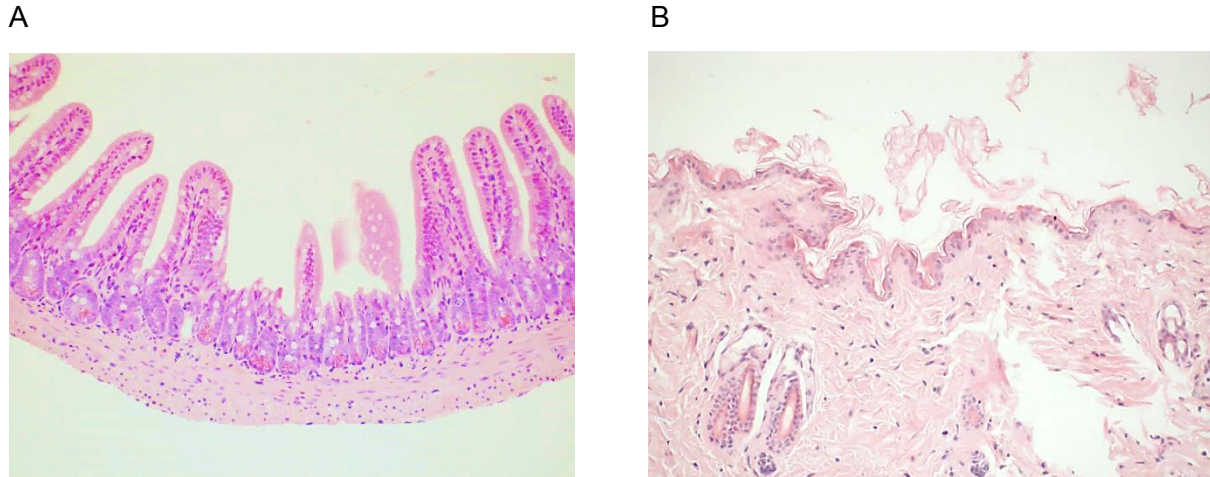


Abb. 26: Infiltration humaner Zellen und Inflammation von Darm und Haut im Verlauf einer xenogenen Graft versus Host Disease: Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle; n=6). Histologische Schnitte von Darm (A) und Haut (B) mit Hämatoxyllin/Eosin (HE) Färbung. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation bei 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 (keine Infiltration und Inflammation) bis (+++) (hgr. Infiltration und Inflammation).

Ein weiteres Hauptzielorgan einer akuten Graft versus Host Disease ist die Leber. Tiere, die nach Applikation der humanen PBMCs keine Therapie erhielten (Kontrolle) wiesen eine mittel- bis hochgradige (++ bis +++) Infiltration der Leber, vor allem periportal und im Bereich der Gallengänge mit einhergehender Inflammation und assoziierter Gewebsdestruktion auf (Abb. 27A und 32). Die konventionelle Immunsuppression resultierte in einer deutlich reduzierten Infiltration mit humanen Zellen (Abb. 32). Vor allem die Behandlung mit Ciclosporin A und Methylprednisolon verringerte die Zelllast mit assoziierter Entzündung und Destruktion im Gewebe signifikant (0 bis +; $P < 0.01$) (Abb. 27B und D, sowie 32). Auch die Monotherapie mit Mycophenolat-Mofetil verringerte die Infiltration und Inflammation der Leber im Vergleich zu erkrankten Tieren auf eine geringgradige Zelllast, allerdings im Vergleich zur Behandlung mit CsA und Pred. weniger effektiv (Abb. 27C und 32).

Der adoptive Transfer regulatorischer T-Zellen resultierte dosisabhängig ebenfalls in einer reduzierten Infiltration und Inflammation der Leber.

Die Applikation von $3 \cdot 10^6$ polyklonal expandierten natürlichen regulatorischen T-Zellen allein initiierte keinen Krankheitszustand und histologisch konnten keine Zellen im Gewebe nach-

gewiesen werden. Zudem ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer Entzündung oder andere pathologische Veränderungen (Abb. 27E).

Der adoptive Transfer einer geringen nTreg Dosis (2:1) resultierte in teils ähnlichen histopathologischen Veränderungen im Vergleich zur erkrankten Kontrolle (Abb. 27F und 32). Unter gleicher (1:1) und höherer (1:2) nTreg Dosis wurde die Zelllast mit humanen Zellen im Lebergewebe und die Inflammation mit Veränderung der Gewebsstruktur teils deutlich auf eine gering- bis mittelgradige Infiltration (+ bis ++) reduziert (Abb. 27G und H, sowie Abb. 32). Die Unterschiede im Anteil an humanen Zellen im Gewebe waren im Vergleich zur erkrankten Kontrolle und der Dosierungen untereinander statistisch nicht signifikant (Abb. 32). Im Vergleich zur konventionellen Immunsuppression ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Zelllast nur zwischen der Therapie mit Methylprednisolon und nTreg 2:1 Behandlung ($P < 0.05$) (Abb. 32).

Auch unter der Kombinationstherapie aus klassischer Immunsuppression und einer einmaligen, geringen Dosis natürlicher Treg ($0,5 \cdot 10^6$) wurden die Infiltration der Leber mit humanen T-Zellen und die Inflammation des Gewebes jeweils reduziert (Abb. 32). Vor allem die Behandlung mit Ciclosporin A und regulatorischen T-Zellen verringerte äquivalent zur Monotherapie mit CsA die Zelllast und die assoziierte Entzündung im Vergleich zur erkrankten Kontrolle signifikant ($P < 0.01$) (Abb. 27I). Anders als die entsprechende Standardimmunsuppression reduzierten die Kombinationstherapie aus MMF/nTreg und Pred./nTreg die Infiltration und Inflammation des Gewebes weniger effektiv (+ bis ++) und im Mittel glich die Zelllast der unter Behandlung mit nTreg 1:1 und 1:2 (Abb. 27J-K und 32). Zwischen der Kombinationstherapie und dem Transfer regulatorischer T-Zellen in allen Dosierungen gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 32).

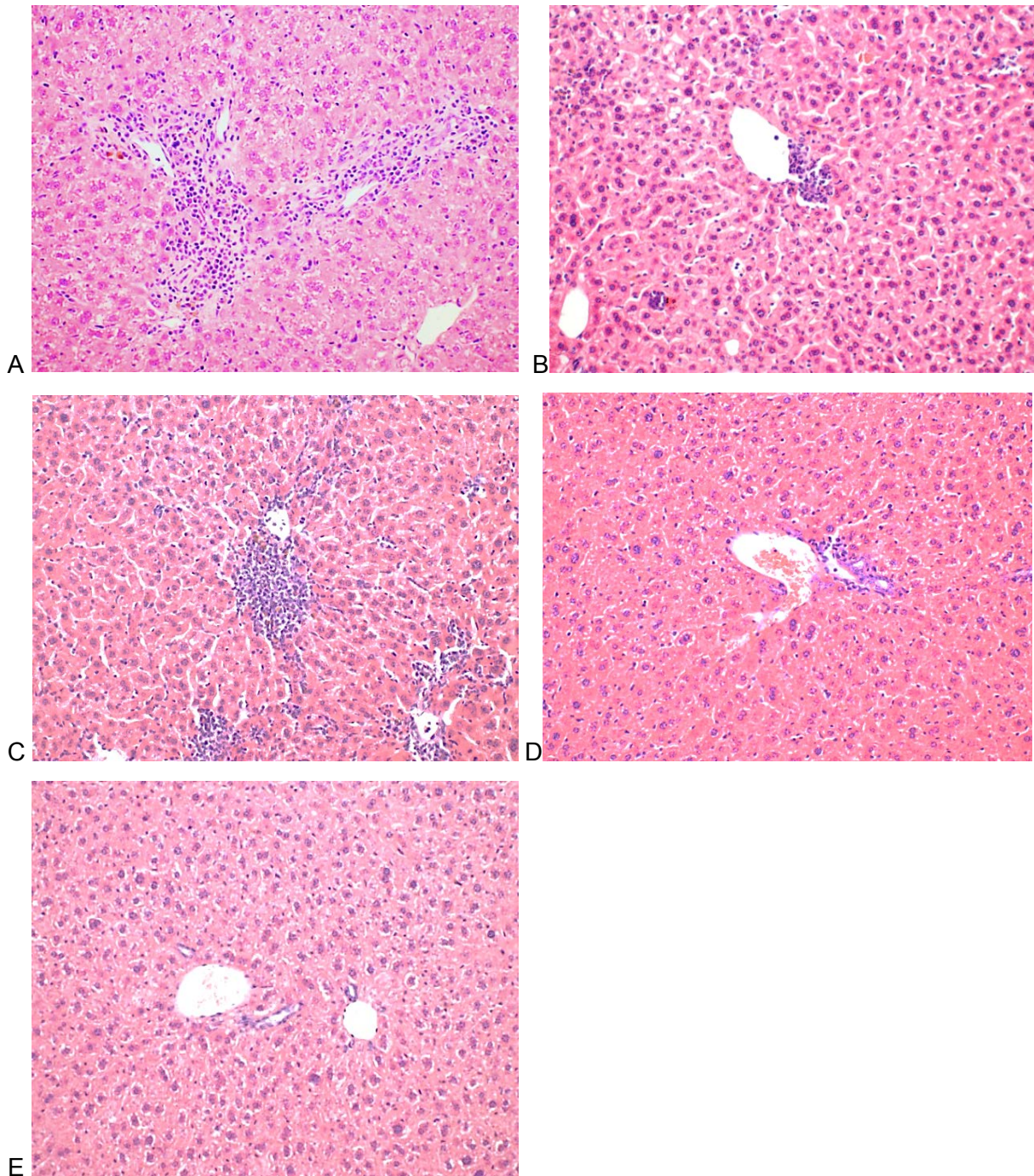


Abb. 27A - E: **Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Leber:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle $n=6$) (A). Zur Therapie wurden als Standardimmunsuppression täglich ab Tag +1 (B) CsA (4mg/kg s.c.), (C) MMF (0,5mg p.os) oder (D) Pred. (20mg/kg i.p.) (je $n=5$) appliziert. Zur Kontrolle auf Sicherheit des Zellproduktes wurden einer Gruppe ($n=3$) ausschließlich $3 \cdot 10^6$ nTreg i.v. appliziert (E). Zur Monotherapie mit nTreg wurden einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 ($n=6$), 1:1 ($n=7$) oder 1:2 ($n=5$) i.v. an Tag 0 mit den humanen PBMCs i.v. verabreicht. Die Kombinationstherapie umfasste die Applikation von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 zusammen mit der konventionellen Immunsuppression mit CsA ($n=5$), MMF ($n=6$) und Pred. ($n=6$) in gleicher Dosierung und Darreichungsform wird unter Standardimmunsuppression ab Tag +1. Histologische Schnitte der Leber vergleichend mit Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation bei 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 (keine Infiltration und Inflammation) bis (+++) (hgr. Infiltration und Inflammation).

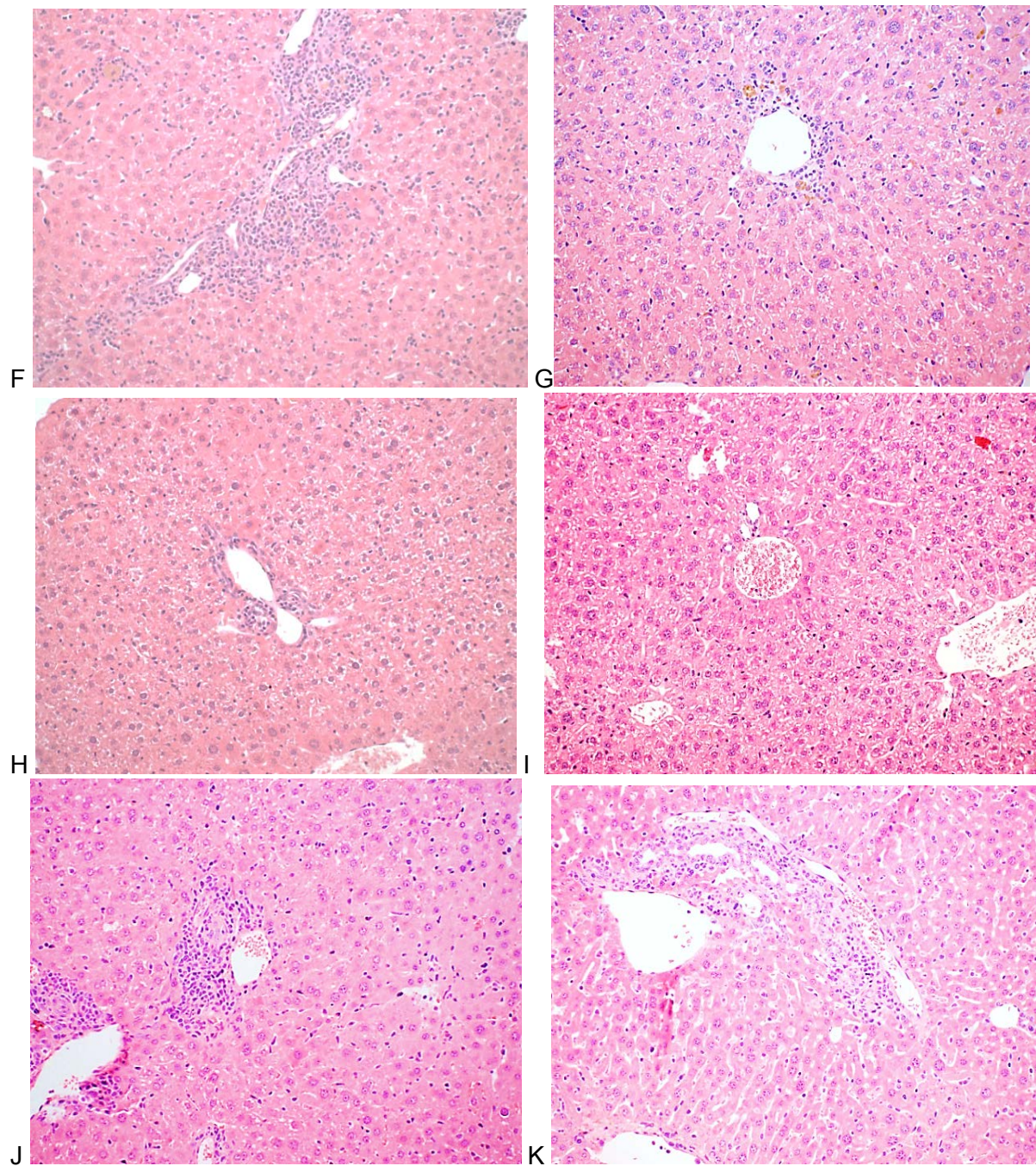


Abb. 27F - K: **Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Leber:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6). Zur Therapie wurden als Standardimmunsuppression täglich ab Tag +1 CsA (4mg/kg s.c.), MMF (0,5mg p.os) oder Pred. (20mg/kg i.p.) (je n=5) appliziert. Zur Kontrolle auf Sicherheit des Zellproduktes wurden einer Gruppe (n=3) ausschließlich $3 \cdot 10^6$ nTreg i.v. appliziert. Zur Monotherapie mit nTreg wurden einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 (n=6) (F), 1:1 (n=7) (G) oder 1:2 (n=5) (H) i.v. an Tag 0 mit den humanen PBMCs i.v. verabreicht. Die Kombinationstherapie umfasste die Applikation von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 zusammen mit der konventionellen Immunsuppression mit CsA (n=5) (I), MMF (n=6) (J) und Pred. (n=6) (K) in gleicher Dosierung und Darreichungsform wird unter Standardimmunsuppression ab Tag +1. Histologische Schnitte der Leber vergleichend mit Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation bei 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 (keine Infiltration und Inflammation) bis (+++) (hgr. Infiltration und Inflammation).

Ein Tier unter MMF-Behandlung wies histopathologisch eine akute, fokale, eitrig- abszedierende, teils nekrotische Hepatitis auf (Abb. 28A). Die übrigen Leberlappen wiesen keine pathologischen Veränderungen auf, die auf das Vorliegen einer akuten Graft versus Host Disease oder anderer Erkrankungen schließen ließen (Abb. 28B).

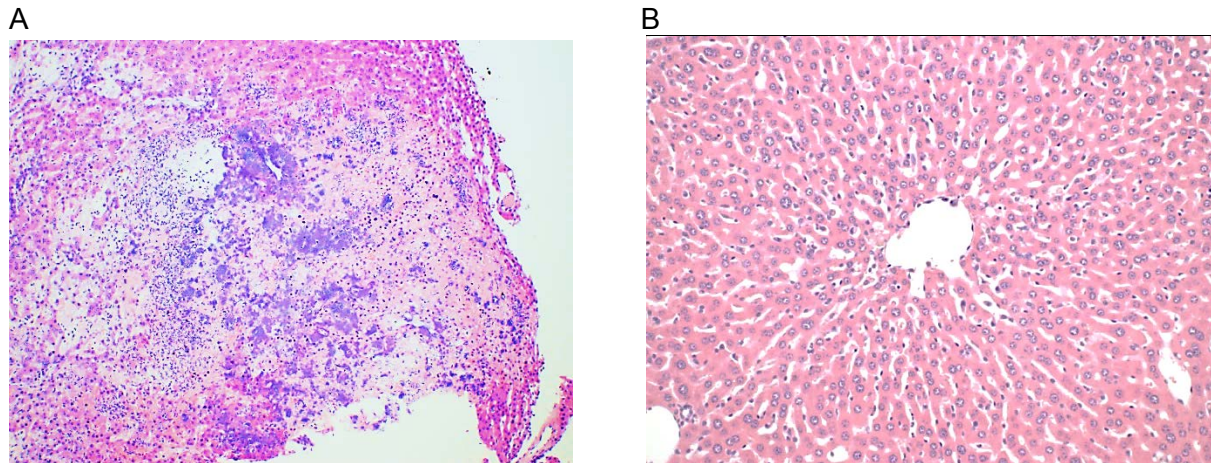


Abb. 28: Infiltration humaner Zellen und Inflammation von Leber einer Maus unter Monotherapie mit Mycophenolat Mofetil: Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6). Zur weiteren Therapie wurden täglich ab Tag +1 Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os) als Standardimmunsuppression allein (n=5) appliziert. Histologische Schnitte der Leber einer Maus unter Therapie mit MMF mit Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation bei 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 (keine Infiltration und Inflammation) bis (+++) (hgr. Infiltration und Inflammation).

Die Lunge stellt klassischerweise kein Hauptzielorgan einer akuten Graft versus Host Disease dar. Erkrankte Tiere wiesen jedoch eine hohe bis sehr hohe Infiltration (++ bis +++) mit humanen Zellen perivaskulär, sowie peribronchial und –alveolär mit einhergehender Schädigung des Alveolarepithels auf (Abb. 29A). Die Therapie mit Ciclosporin A als Monotherapie reduzierte die Zelllast im Gewebe signifikant (0 bis +; $P < 0.001$) und resultierte in weniger Inflammation mit weniger Gewebsdestruktion (Abb. 29B und 32). Auch unter Behandlung mit Mycophenolat Mofetil und Methylprednisolon konnten die Infiltration humaner Zellen und die assoziierte Entzündung im Vergleich zur erkrankten Kontrolle verringert werden (im Durchschnitt + bis maximal ++) (Abb. 29C und D), wobei dieser Unterschied im Vergleich zur Monotherapie mit CsA jedoch weniger deutlich und statistisch nicht signifikant war (Abb. 32).

Der adoptive Transfer natürlicher regulatorischer T-Zellen reduzierte dosisabhängig die Infiltration der Lunge mit humanen Zellen (Abb. 32). Wie auch in der Lunge konnten nach Transfer von $3 \cdot 10^6$ nTreg allein keine humanen Zellen im Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 29E).

Während eine geringere Dosis von nTreg (2:1) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer vergleichbaren Zelllast im Gewebe führte (++ bis +++), resultierte die Behandlung mit einer Dosis von nTreg 1:1 und deutlicher von nTreg 1:2 in einer reduzierten Infiltration und Inflammation des Gewebes (durchschnittlich + bis ++) (Abb. 29F - H). Im Vergleich zu erkrankten Tieren waren die Unterschiede statistisch jeweils nicht signifikant (Abb. 32). Im Vergleich zur klassischen Immunsuppression ergab sich nur im Vergleich zur Therapie mit Ciclosporin A ein statistisch signifikanter Unterschied. Die Behandlung mit CsA führte im Vergleich zum Zelltransfer mit nTreg 2:1 und 1:1, nicht aber mit nTreg 1:2 zu einer verringerten Infiltration und Inflammation des Gewebes ($P < 0.01$ und $P < 0.001$) (Abb. 32). Auch die Therapie mit MMF und Methylprednisolon resultierte im Vergleich zum adoptiven Zelltransfer in allen Dosierungen in einer reduzierten Infiltration und Inflammation des Gewebes, ohne, dass der Unterschied statistisch signifikant war (Abb. 32)

Vergleichbar mit der Standardimmunsuppression reduzierte die Kombinationstherapie die Zelllast im Gewebe und die assoziierte Inflammation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 32). Dabei erwies sich die Kombination aus CsA/nTreg als effektivste Therapie, da die Zellinfiltration, wie unter klassischer Immunsuppression auf ein Minimum gesenkt (0 bis +) wurde, während die Kombination aus MMF/nTreg bzw. Pred./nTreg zu einer insgesamt mittelgradigen (++) Zelllast in der Lunge führte (Abb. 29I – K, Abb. 32). Im Vergleich zur erkrankten Kontrolle reduzierte die Kombinationstherapie die Infiltration mit humanen Zellen deutlich, wobei der Unterschied nur im Vergleich zur Behandlung mit CsA/nTreg signifikant war ($P < 0.001$) (Abb. 32).

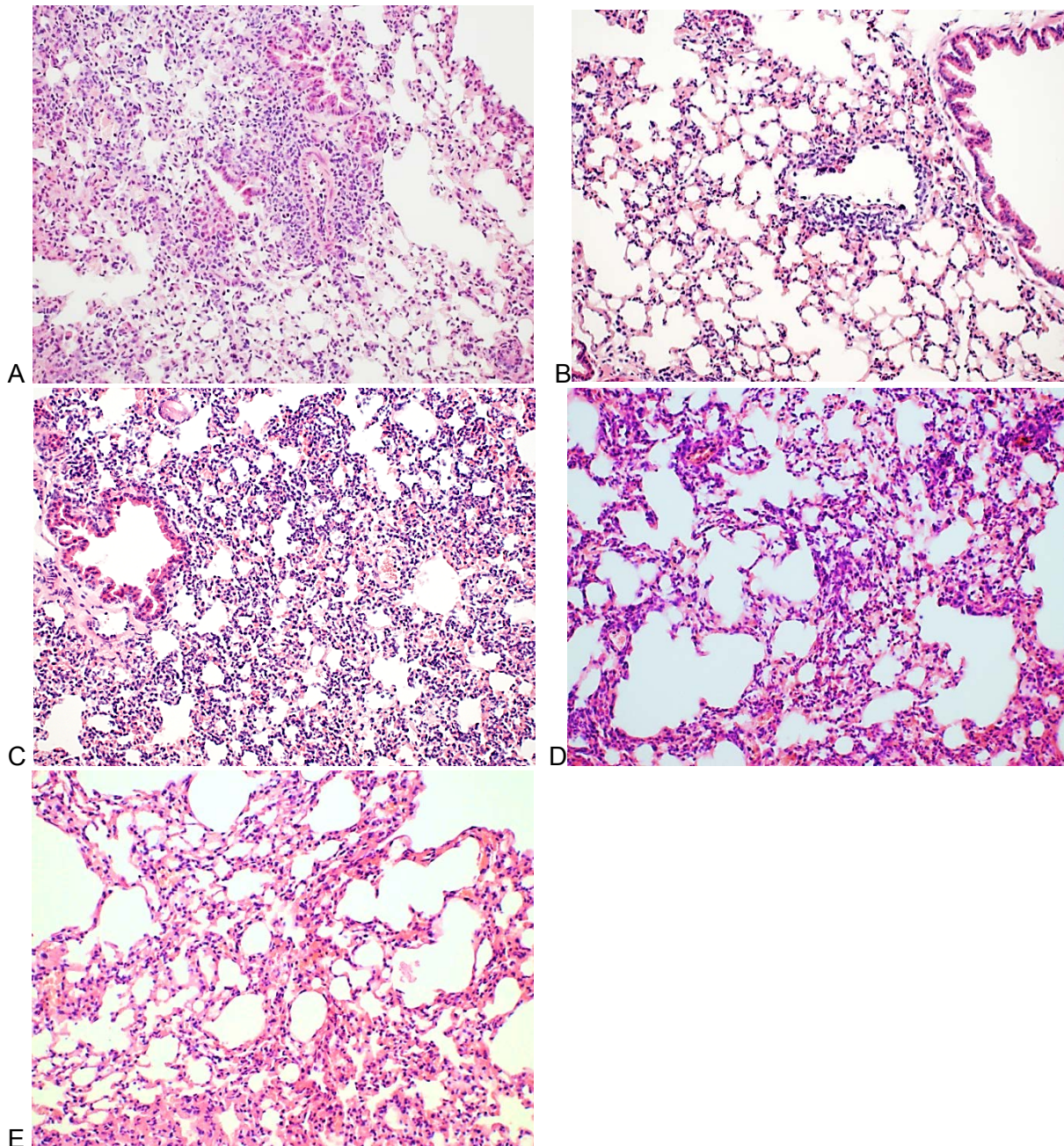


Abb. 29A - E: **Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Lunge:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6) (A). Zur Therapie wurden als Standardimmunsuppression täglich ab Tag +1 (B) CsA (4mg/kg s.c.), (C) MMF (0,5mg p.os) oder (D) Pred. (20mg/kg i.p.) (je n=5) appliziert. Zur Kontrolle auf Sicherheit des Zellproduktes wurden einer Gruppe (n=3) ausschließlich $3 \cdot 10^6$ nTreg i.v. appliziert (E). Zur Monotherapie mit nTreg wurden einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 (n=6), 1:1 (n=7) oder 1:2 (n=5) i.v. an Tag 0 mit den humanen PBMCs i.v. verabreicht. Die Kombinationstherapie umfasste die Applikation von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 zusammen mit der konventionellen Immunsuppression mit CsA (n=5), MMF (n=6) und Pred. (n=6) in gleicher Dosierung und Darreichungsform wird unter Standardimmunsuppression ab Tag +1. Histologische Schnitte der Leber vergleichend mit Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation bei 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 (keine Infiltration und Inflammation) bis (+++) (hgr. Infiltration und Inflammation).

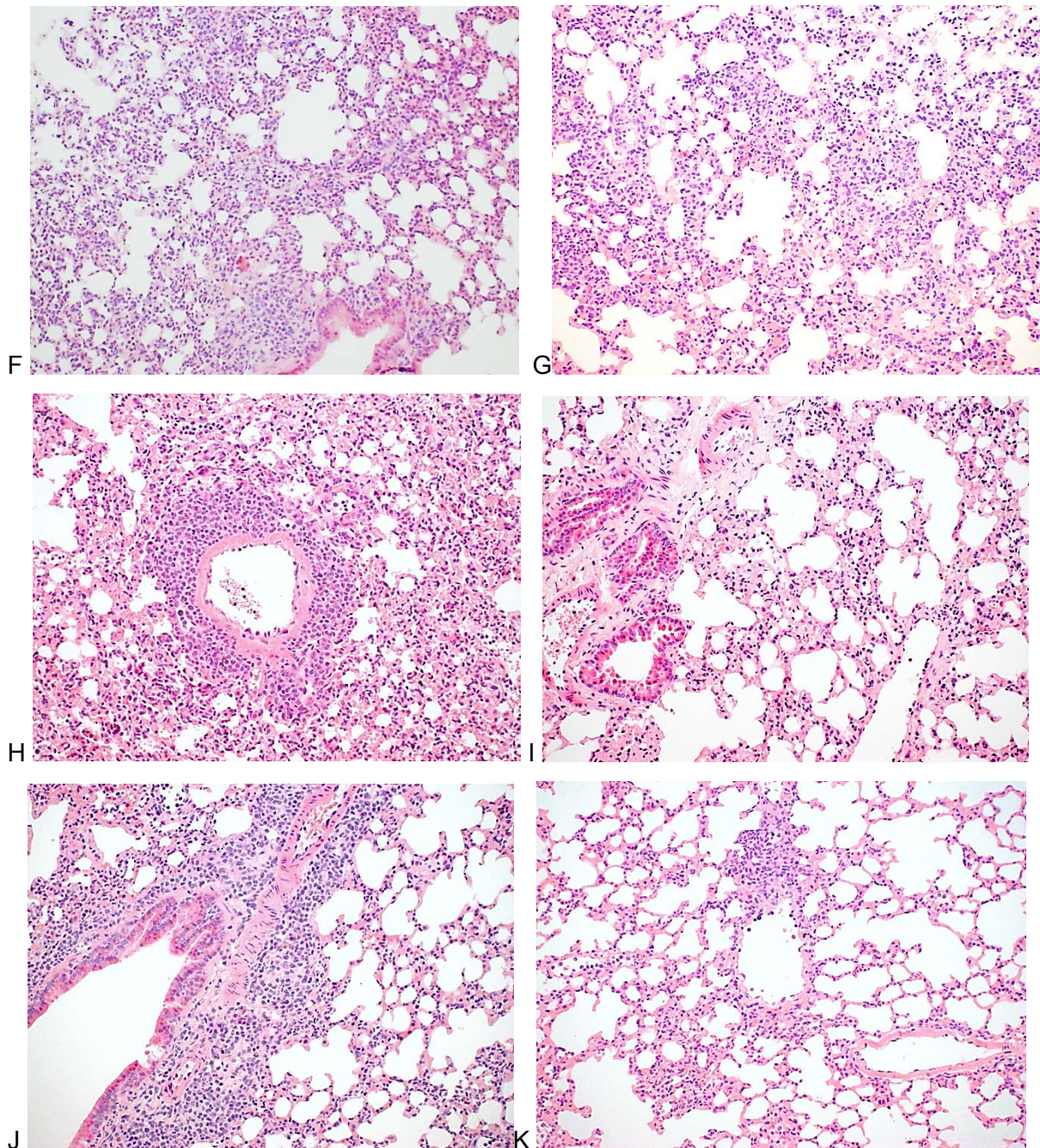


Abb. 29F - K: **Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Lunge:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6). Zur Therapie wurden als Standardimmunsuppression täglich ab Tag +1 CsA (4mg/kg s.c.), MMF (0,5mg p.os) oder Pred. (20mg/kg i.p.) (je n=5) appliziert. Zur Kontrolle auf Sicherheit des Zellproduktes wurden einer Gruppe (n=3) ausschließlich $3 \cdot 10^6$ nTreg i.v. appliziert. Zur Monotherapie mit nTreg wurden einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 (n=6) (F), 1:1 (n=7) (G) oder 1:2 (n=5) (H) i.v. an Tag 0 mit den humanen PBMCs i.v. verabreicht. Die Kombinationstherapie umfasste die Applikation von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 zusammen mit der konventionellen Immunsuppression mit CsA (n=5) (I), MMF (n=6) (J) und Pred. (n=6) (K) in gleicher Dosierung und Darreichungsform wird unter Standardimmunsuppression ab Tag +1. Histologische Schnitte der Leber vergleichend mit Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation bei 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 (keine Infiltration und Inflammation) bis (+++) (hgr. Infiltration und Inflammation).

Die Milz als sekundäres Immunorgan wies bei erkrankten Tieren eine hohe Infiltration mit humanen Zellen auf (++ bis +++) (Abb. 30A). Die konventionelle Immunsuppression reduzierte die Zelllast im Gewebe deutlich (Abb. 32). Vor allem unter Therapie mit Ciclosporin A wurden keine humanen Zellen in der Milz nachgewiesen und auch die Behandlung mit Methylprednisolon verringerte die Infiltration humaner Zellen effektiv (0 bis +) (Abb. 30A und C). Zu erkrankten Tieren ergab sich allerdings nur im Vergleich zur Therapie mit CsA ein statistisch signifikanter Unterschied ($P < 0.001$) (Abb. 32). Sowohl unter Therapie mit Ciclosporin A, als auch unter Behandlung mit Methylprednisolon wiesen die Organe vereinzelt Anzeichen einer extramedullären Hämatopoese auf (Abb. 30B und C). Wie in den anderen Organen reduzierte die Monotherapie mit MMF die Infiltration auch in der Milz weniger effektiv als die Therapie mit CsA und Pred., und die Gewebe wiesen eine gering- bis mittelgradige (+ bis ++) Mengen an humanen Zellen auf. (Abb. 32) Insgesamt war die Milz bei vielen Tieren unter klassischer Immuntherapie bei der Organentnahme nur sehr klein.

Der adoptive Transfer regulatorischer T-Zellen resultierte dosisabhängig in einer reduzierten Zelllast in der Milz (Abb 32). Während die Infiltration mit humanen Zellen unter einer Dosis von nTreg 2:1 und 1:1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Durchschnitt vergleichbar war (++ bis +++)), wurde sie unter einer höheren Dosis (nTreg 1:2) im Mittel reduziert (+ bis ++) (Abb. 30D - F und 32). Da die Zelllast unter einer Dosis mit nTreg 2:1 und 1:1 vergleichbar der erkrankter Tiere war, ergab sich im Vergleich zur klassischen Immunsuppression mit CsA jeweils ein signifikanter Unterschied, da unter dieser Therapie in den Schnittbildern keine humane Zellen im Gewebe nachgewiesen wurden ($P < 0.01$ und $P < 0.001$) (Abb. 32). Der Vergleich zu den anderen konventionellen Immuntherapien mit MMF und Methylprednisolon ergab keinen signifikanten Unterschied. (Abb. 32). Die Applikation von nTreg $3 \cdot 10^6$ allein initiierte keinerlei Immunreaktion. Die Milz der Tiere war nur rudimentär vorhanden und das Gewebe wurde vollständig für die durchflusszytometrischen Untersuchungen verwendet.

Die Kombinationstherapie reduzierte die Infiltration des Gewebes im Vergleich zu erkrankten Kontrolltieren ebenfalls (Abb. 32). Äquivalent zur Monotherapie resultierte auch die Therapie aus CsA und regulatorischen T-Zellen in einer signifikanten Verringerung der Zellmenge in der Milz ($P < 0.05$), während MMF/nTreg und Pred./nTreg im Vergleich zu entsprechenden konventionellen Therapie weniger effektiv waren und die Zellinfiltration für beide Therapien im Durchschnitt mittelgradig (++) war (Abb. 30G – I und 32). Im Vergleich zum Transfer regulatorischer T-Zellen war nur die Behandlung mit CsA/nTreg zu nTreg 1:1 signifikant effektiver die Zellinfiltration zu vermindern ($P < 0.05$), während es im Vergleich zu den anderen Dosierungen bzw. Kombinationstherapien keine signifikanten Unterschiede gab (Abb 32). Wie unter klassischer Immunsuppression mit Ciclosporin A fand auch in der Milz unter CsA/nTreg Behandlung zum Teil eine deutliche Hämatopoese statt (Abb. 30G).

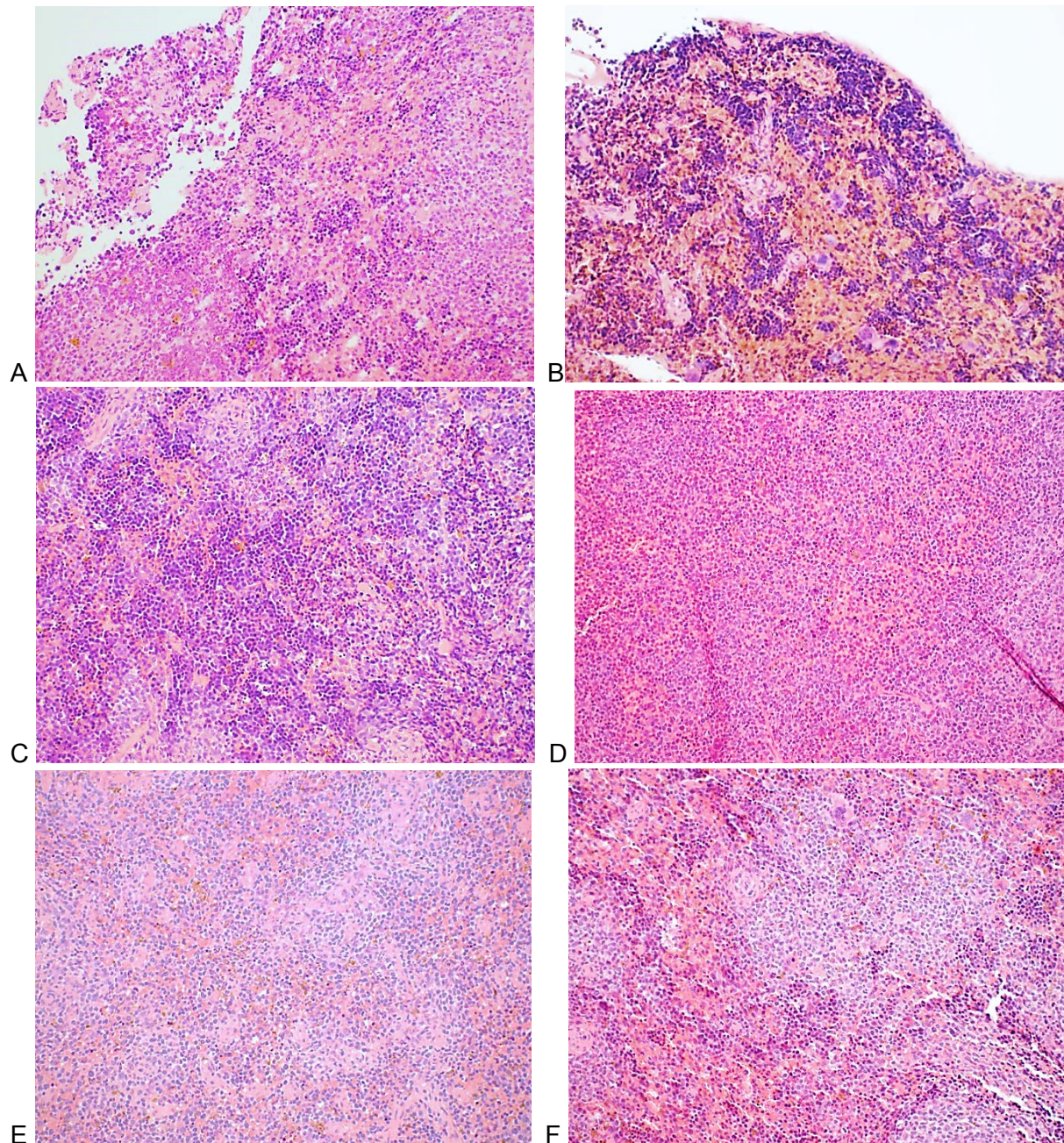


Abb. 30A - F: **Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Milz:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle $n=6$) (A). Zur Therapie wurden entweder täglich ab Tag +1 (B) CsA (4mg/kg s.c.), MMF (0,5mg p.os) oder (C) Pred. (20mg/kg i.p.) (je $n=5$) als Standardimmunsuppression oder zur Monotherapie mit nTreg einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 ($n=6$) (D), 1:1 ($n=7$) (E) oder 1:2 ($n=5$) (F) i.v. an Tag 0 mit den humanen PBMCs i.v. verabreicht. Zur Kontrolle auf Sicherheit des Zellproduktes wurden einer Gruppe ($n=3$) ausschließlich $3 \cdot 10^6$ nTreg i.v. appliziert. Die Kombinationstherapie umfasste die Applikation von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 zusammen mit der konventionellen Immunsuppression mit CsA ($n=5$) (G), MMF ($n=6$) (H) und Pred. ($n=6$) (I) in gleicher Dosierung und Darreichungsform wird unter Standardimmunsuppression ab Tag +1. Histologische Schnitte der Milz vergleichend mit Hämatoxyllin/Eosin (HE) Färbung. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation bei 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 (keine Infiltration und Inflammation) bis (+++) (hgr. Infiltration und Inflammation).

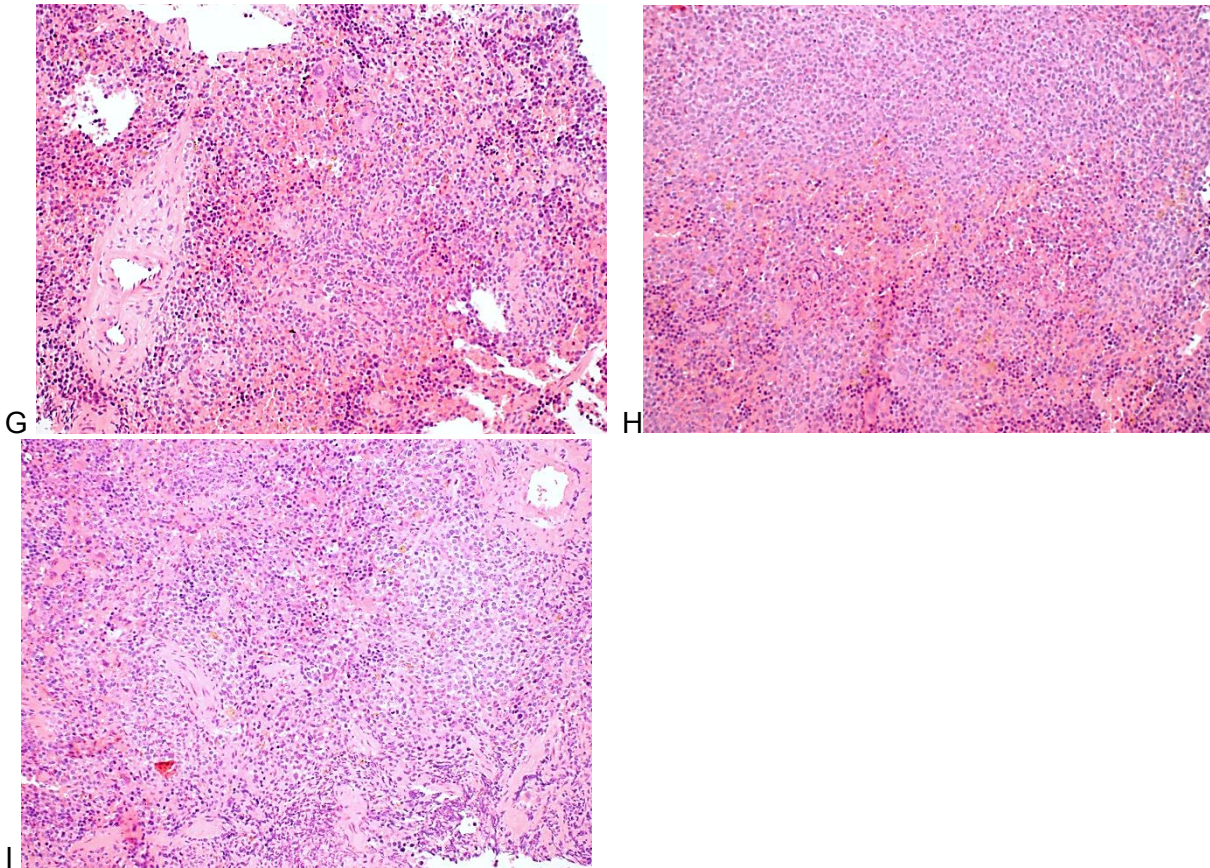


Abb. 30G - I: **Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Milz:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6). Zur Therapie wurden entweder täglich ab Tag +1 CsA (4mg/kg s.c.), MMF (0,5mg p.os) oder Pred. (20mg/kg i.p.) (je n=5) als Standardimmunsuppression oder zur Monotherapie mit nTreg einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 (n=6), 1:1 (n=7) oder 1:2 (n=5) i.v. an Tag 0 mit den humanen PBMCs i.v. verabreicht. Zur Kontrolle auf Sicherheit des Zellproduktes wurden einer Gruppe (n=3) ausschließlich $3 \cdot 10^6$ nTreg i.v. appliziert. Die Kombinationstherapie umfasste die Applikation von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 zusammen mit der konventionellen Immunsuppression mit CsA (n=5) (G), MMF (n=6) (H) und Pred. (n=6) (I) in gleicher Dosierung und Darreichungsform wird unter Standardimmunsuppression ab Tag +1.

Histologische Schnitte der Milz vergleichend mit Hämatoxyllin/Eosin (HE) Färbung. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation bei 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 (keine Infiltration und Inflammation) bis (+++) (hgr. Infiltration und Inflammation).

Auch die Niere stellt, wie die Lunge, kein klassisches Zielorgan einer akuten Graft versus Host Disease dar.

Erkrankte Tiere wiesen allerdings durchschnittlich eine mittel- bis teils hochgradige Infiltration der Niere (+ bis +++) peritubulär und perivaskulär auf (Abb. 31A und 32).

Die konventionelle Immunsuppression mit CsA, MMF und Methylprednisolon verringerte die mittlere Zelllast im Gewebe jeweils deutlich (0 bis +), ohne dass dieser Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Behandlung signifikant war (Abb. 31B – D, sowie 32). Auch zwischen den Therapien ergaben sich nur marginale Unterschiede und jede Behandlung

erwies sich als vergleichbar effektiv (Abb. 31B – D, sowie 32). Da Ciclosporin A unerwünscht eine nephrotoxische Wirkung besitzt, die durchaus klinische Relevanz hat, wurden die Nieren weiterhin auf Anzeichen einer beginnenden interstitiellen Fibrose, Vaskulopathie und Tubulopathien untersucht. Bis auf die ggr. Infiltration mit humanen Zellen perivaskulär bei zwei von fünf Tieren konnten keine weiteren Anzeichen pathologischer Gewebsveränderungen gefunden werden (Abb 31B).

Der adoptive Transfer regulatorischer T-Zellen resultierte unabhängig von der Dosis im Durchschnitt in einer mittelgradigen Zellinfiltration in der Niere (Abb. 32). Die Applikation von 3×10^6 regulatorischen T-Zellen führte zu keinen histopathologisch nachweisbaren strukturellen Veränderungen der Niere und, wie in den anderen Organen, waren keine humanen Zellen nachweisbar (Abb. 31E). Im Vergleich zu erkrankten Kontrolltieren ergab sich unter Monotherapie mit nTreg in allen Dosierungen nur eine marginal verringerte Zelllast und auch zwischen den Dosierungen waren die Unterschiede in der Infiltration mit humanen Zellen nur geringfügig (Abb. 31F – H). Während sowohl bei erkrankten Tieren, als auch unter einer Dosis von nTreg 2:1 und 1:1 vereinzelt eine hochgradige (+++) Zellmenge gemessen wurde, war die Zelllast unter nTreg 1:2 nie mehr als mittelgradig (++) (Abb. 32). Im Vergleich zur Standard-immunsuppression war der Anteil an infiltrierten humanen Zellen und Inflammation in der Niere unter Behandlung mit regulatorischen T-Zellen in jeder Dosierung deutlich höher, ohne dass dieser Unterschied signifikant war (Abb. 32).

Auch die Kombinationstherapie aus klassischer Immunsuppression und regulatorischen T-Zellen resultierte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in einer reduzierten Infiltration des Nierenparenchyms mit humanen Zellen. Vor allem die Behandlung mit CsA/nTreg erwies sich als sehr effektiv, da unter dieser Therapie keine humanen Immunzellen nachgewiesen wurden (Abb. 31I und 32). Der Unterschied zu erkrankten Tieren war, anders als unter konventioneller Therapie mit CsA, statistisch signifikant ($P < 0.05$) und auch im Vergleich zur Zelltherapie mit nTreg 2:1 und 1:1 wurde die Zelllast in der Niere signifikant verringert ($P < 0.05$) (Abb. 32). Wie unter Monotherapie mit Ciclosporin A ergaben sich auch unter Kombinationstherapie keine histopathologischen Anzeichen auf eine interstitielle Fibrose, Vaskulopathie oder Tubulopathie (Abb. 31I und 32).

Die Behandlung aus MMF/nTreg bzw. Pred./nTreg resultierte in einer durchschnittlich geringgradigen (+) Infiltration mit humanen Zellen (Abb. 31J-K). Die Kombinationstherapie war im Vergleich zur entsprechenden Standardimmunsuppression somit weniger effektiv, die Zelllast im Gewebe zu verringern, während im Vergleich zur nTreg-Therapie in allen Dosierungen die Infiltration mit humanen Zellen deutlich reduziert war, ohne dass der Unterschied statistisch signifikant war (Abb. 32). Auch zwischen der Therapie mit Mycophenolat-Mofetil und nTreg und der Behandlung Methylprednisolon/nTreg ergaben sich nur marginale Unterschiede (Abb 32).

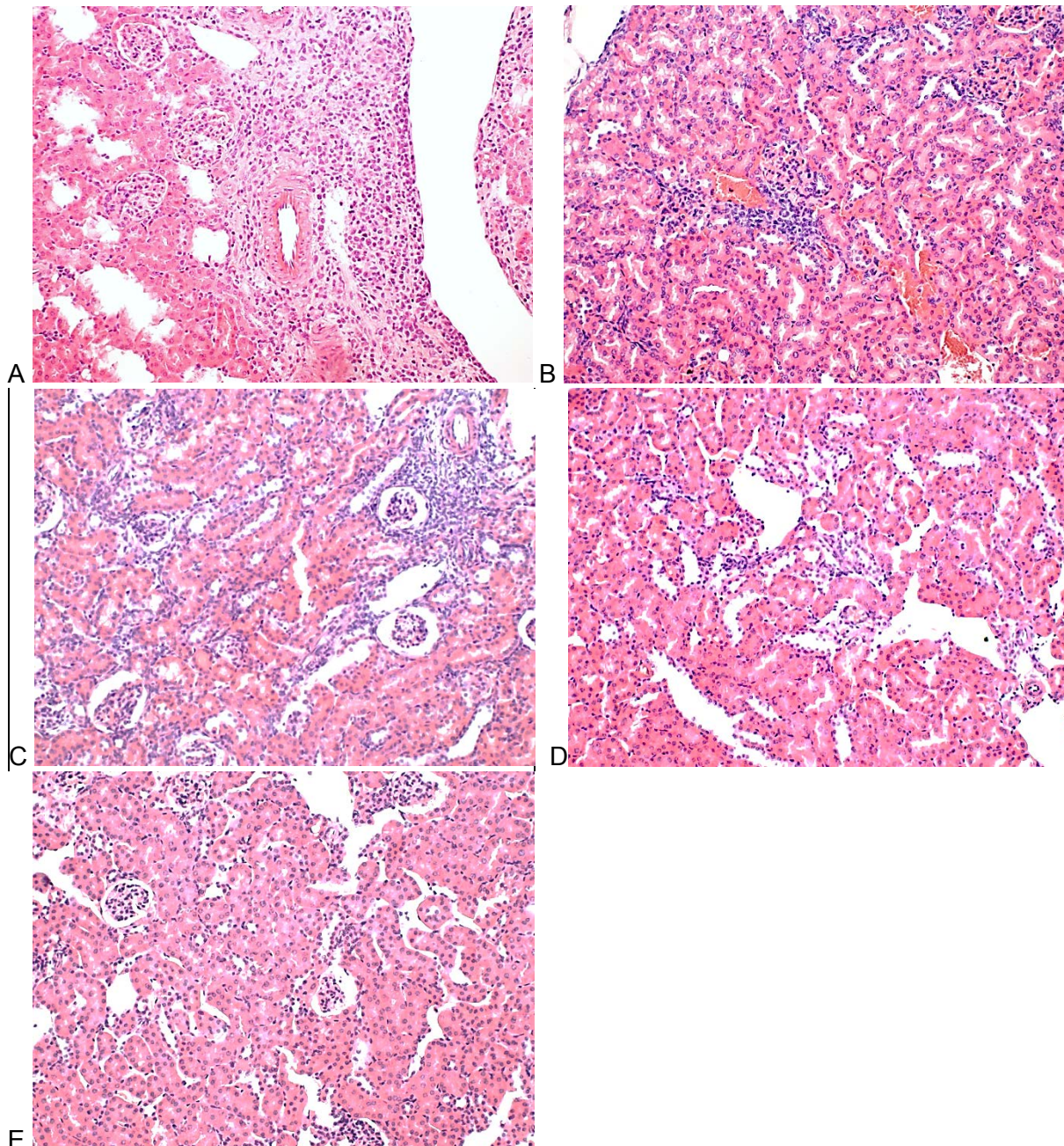


Abb. 31A - E: Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Niere:

Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6) (A). Zur Therapie wurden als Standardimmunsuppression täglich ab Tag +1 (B) CsA (4mg/kg s.c.), (C) MMF (0,5mg p.os) oder (D) Pred. (20mg/kg i.p.) (je n=5) appliziert. Zur Kontrolle auf Sicherheit des Zellproduktes wurden einer Gruppe (n=3) ausschließlich $3 \cdot 10^6$ nTreg i.v. appliziert (E). Zur Monotherapie mit nTreg wurden einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 (n=6), 1:1 (n=7) oder 1:2 (n=5) i.v. an Tag 0 mit den humanen PBMCs i.v. verabreicht. Die Kombinationstherapie umfasste die Applikation von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 zusammen mit der konventionellen Immunsuppression mit CsA (n=5), MMF (n=6) und Pred. (n=6) in gleicher Dosierung und Darreichungsform wird unter Standardimmunsuppression ab Tag +1.

Histologische Schnitte der Leber vergleichend mit Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation bei 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 (keine Infiltration und Inflammation) bis (+++) (hgr. Infiltration und Inflammation).

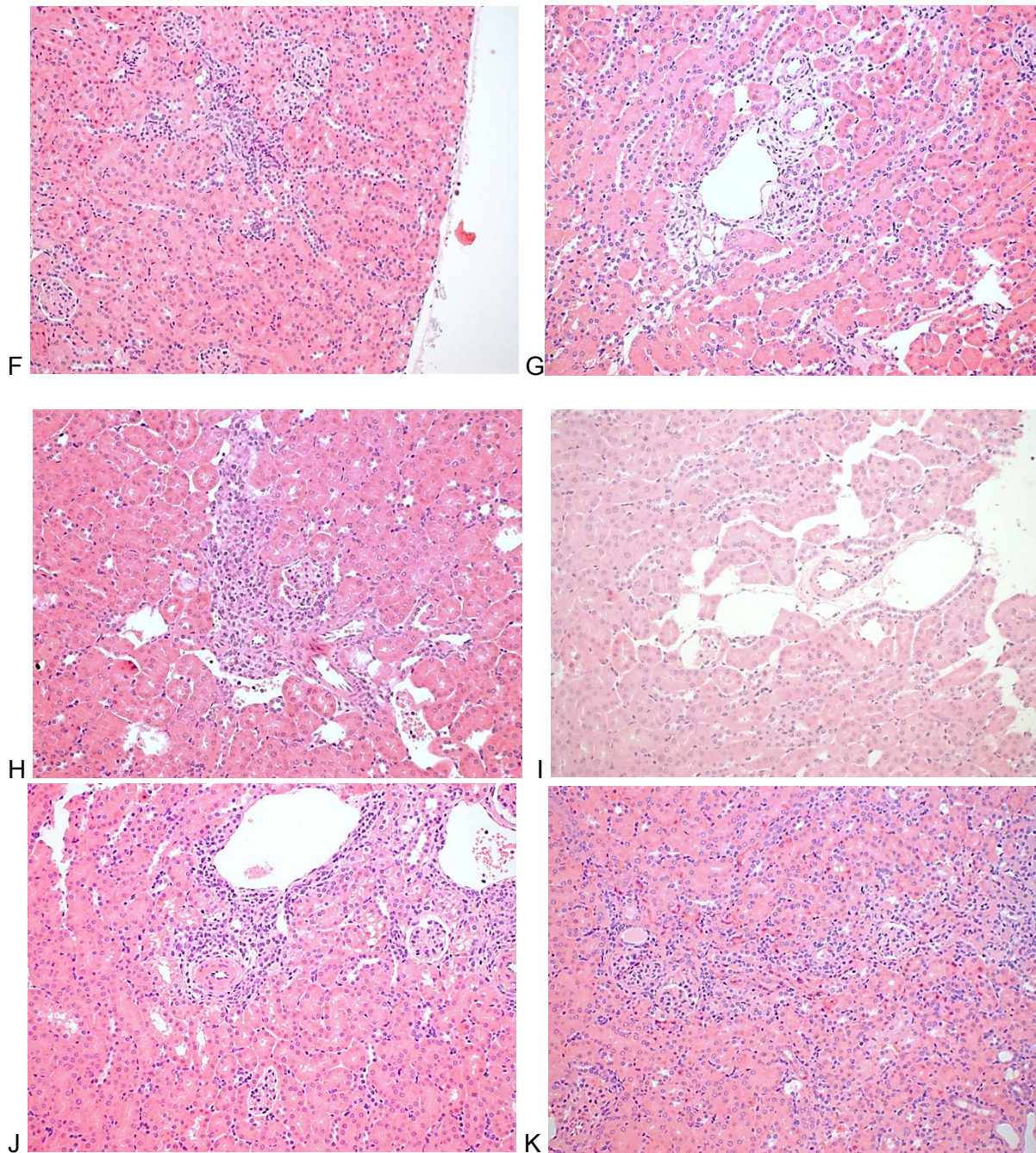


Abb. 31F - K: Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Niere:

Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6). Zur Therapie wurden als Standardimmunsuppression täglich ab Tag +1 CsA (4mg/kg s.c.), MMF (0,5mg p.os) oder Pred. (20mg/kg i.p.) (je n=5) appliziert. Zur Kontrolle auf Sicherheit des Zellproduktes wurden einer Gruppe (n=3) ausschließlich $3 \cdot 10^6$ nTreg i.v. appliziert. Zur Monotherapie mit nTreg wurden einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 (n=6) (F), 1:1 (n=7) (G) oder 1:2 (n=5) (H) i.v. an Tag 0 mit den humanen PBMCs i.v. verabreicht. Die Kombinationstherapie umfasste die Applikation von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 zusammen mit der konventionellen Immunsuppression mit CsA (n=5) (I), MMF (n=6) (J) und Pred. (n=6) (K) in gleicher Dosierung und Darreichungsform wird unter Standardimmunsuppression ab Tag +1. Histologische Schnitte der Leber vergleichend mit Hämatoxyllin/Eosin (HE) Färbung. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation bei 20-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 (keine Infiltration und Inflammation) bis (+++) (hgr. Infiltration und Inflammation).

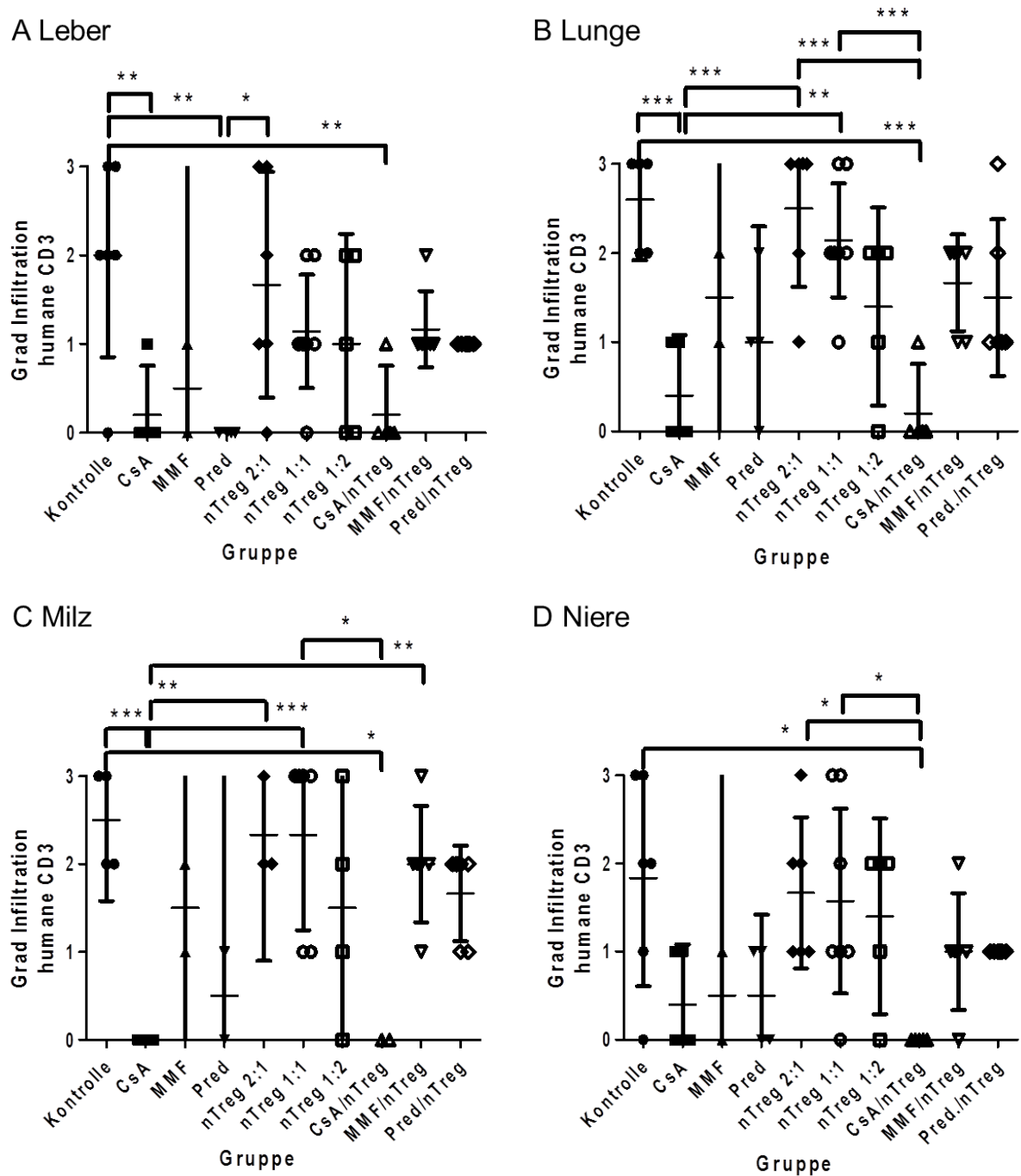


Abb. 32: **Übersicht der Zellinfiltration humaner Lymphozyten (CD3) im Gewebe:** Eine xenogene akute GvHD wurde durch i.v. Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6). Zur Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 (n=6), 1:1 (n=7) oder 1:2 (n=5) i.v. verabreicht oder täglich ab Tag +1 CsA (4mg/kg s.c), MMF (0,5mg p.os) oder Pred. (20mg/kg i.p.) als Standardimmunsuppression allein (je n=5) oder nach einmaliger Injektion von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg an Tag 0 (CsA/nTreg n=5, MMF/nTreg und Pred./nTreg n=6) appliziert. Darstellung des Anteils an humanen CD3+ T-Zellen in Leber (A), Lunge (B), Milz (C) und Niere (D) im Vergleich erkrankte Kontrolle, klassische Immunsuppression, nTreg Therapie allein und Kombinationstherapie als Mittelwert \pm 95% CI. Beurteilung der Zellinfiltration und Inflammation unter Verwendung eines Scoring-Systems von 0 bis +++. Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

5.8. Die Infiltration der Gewebe mit humanen CD45+ Zellen ist abhängig von der Wahl der Immunsuppression

Um die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen besser und objektiver quantifizieren zu können, wurden Leber, Lunge und Milz, sowie zusätzlich Knochenmark auch durchflusszytometrisch auf die Infiltration humaner CD45+ Zellen untersucht.

Humane CD45 Zellen infiltrierten bei erkrankten Kontrolltieren teils massiv die untersuchten Organe. Vor allem die Leber der erkrankten Tiere wies jeweils, wie auch histologisch hohe Mengen an humanen Zellen auf ($75,70\% \pm 17,63\%$), aber auch in Lunge und Milz wurden im Durchschnitt hohe Konzentrationen von mehr als 50% an CD45 Zellen gemessen, während das Knochenmark nur bei einem von drei Tieren mit mehr als 80% ($82,93\%$) an humanen Zellen infiltriert war (Abb. 33 und 34).

Abhängig von der Wahl der immunsuppressiven Therapie wurde der prozentuale Anteil an CD45+ Zellen in den Geweben reduziert.

Im Knochenmark konnte der Anteil an humanen Leukozyten unter konventioneller Therapie jeweils signifikant ($P < 0.05$) auf unter 10% reduziert werden, wobei die Behandlung mit Ciclosporin A besonders effektiv war und die Menge an CD45 auf unter ein Prozent verringert wurde (Abb. 33A). Auch der adoptive Transfer regulatorischer T-Zellen reduzierte den prozentualen Anteil dosisunabhängig deutlich auf durchschnittlich jeweils 8-9%, wobei es zwischen den Dosierung jeweils nur marginale Unterschiede gab und auch im Vergleich zur erkrankten Kontrolle war der Unterschied nicht signifikant war (Abb. 33B). Wie unter Standardimmunsuppression wurde der Anteil an CD45 Zellen auch unter Kombinationstherapie deutlich vermindert (Abb. 33B). Auch hier erwies sich, wie unter konventioneller Therapie, die Behandlung mit CsA und regulatorischen T-Zellen als besonders effektiv und die Menge an humanen Zellen wurde signifikant ($P < 0.05$) auf durchschnittlich 2,3% ($2,28\% \pm 1,61\%$) reduziert, während der mittlere Anteil unter MMF/nTreg und Pred./nTreg im Vergleich dazu erhöht und mit Mittel dem adoptiven Transfer von nTreg vergleichbar war (MMF/nTreg: $10,61\% \pm 2,84\%$; Pred./nTreg: $8,63\% \pm 3,87\%$) (Abb. 33B). Zwischen den einzelnen Therapieformen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 33B).

Die Leber, als Hauptzielorgan einer akuten Graft versus Host Disease wurde bei erkrankten Tieren massiv mit humanen Zellen infiltriert (Abb. 33C). Die Therapie mit Ciclosporin A reduzierte den Anteil an CD45 Zellen im Gewebe signifikant auf durchschnittlich 4,6% ($P < 0.001$), während nach Behandlung mit MMF und Methylprednisolon im Mittel über 34% humane Zellen in der Leber gemessen wurden (Abb. 33C). Der Unterschied im Vergleich zur erkrankten Kontrolle war statistisch nicht signifikant, da in beiden Gruppen vereinzelt auch deutlich mehr Zellen die Leber infiltrierten (Abb. 33C). So war der prozentuale Anteil unter MMF-Behandlung bei einem Tier mit 88,93% und unter Glukokortikoid-Therapie mit 66,12% noch

deutlich erhöht und die Therapie in diesen Fällen entsprechend weniger effektiv, als die Immunsuppression mit CsA unter der der höchste prozentuale Anteil bei 19,24% lag. (Abb. 33C).

Die prozentuale Menge an CD45+ Zellen wurde unter Therapie mit regulatorischen T-Zellen nicht verringert (Abb. 33D). Unter einer Behandlung mit nTreg 2:1 war der durchschnittliche Anteil an Zellen mit 85,9% vergleichsweise zu erkrankten Tieren sogar erhöht, während die Menge unter Therapie mit nTreg 1:1 und 1:2 im Mittel vergleichbar war (Abb. 33D). Im Vergleich zur konventionellen Therapie ergab sich damit teilweise ein statistisch signifikanter Unterschied ($P < 0.001$ CsA zu nTreg 2:1, 1:1 und 1:2; $P < 0.01$ MMF zu nTreg 2:1; $P < 0.05$ MMF zu nTreg 1:1, Pred. zu nTreg 2:1 und 1:1) (Abb. 33D).

Die Kombinationstherapie aus Ciclosporin A und nTreg reduzierte die Infiltration humaner Zellen in das Gewebe signifikant ($P < 0.01$). Sie war mit einem durchschnittlichen Anteil von 20% an der gesamten Zellpopulation vergleichbar der Behandlung mit Ciclosporin A als Monotherapie. Die Behandlung aus MMF/nTreg und Pred./nTreg resultierte nicht in einer Verringerung an CD45 Zellen in der Leber (Abb. 33D). Unter der Kombinationstherapie mit Mycophenolat-Mofetil war der prozentuale Anteil an humanen Zellen mit durchschnittlich 86% ($86,11\% \pm 8,38\%$) im Vergleich zu erkrankten sogar erhöht, während er mit Methylprednisolon/nTreg Behandlung im Mittel vergleichbar war ($74,83\% \pm 30,22\%$) (Abb. 33D). Im Vergleich zur entsprechenden Standardimmunsuppression ergab sich bei der Behandlung mit Ciclosporin A und Methylprednisolon kein statistisch signifikanter Unterschied, während unter MMF/nTreg statistisch signifikant mehr humane Zellen die Leber infiltrierten als unter der Monotherapie ($P < 0.01$).

In der Lunge wurden histologisch je nach Therapieform unterschiedlich hohe Grade der Infiltration mit humanen Zellen festgestellt. Auch durchflusszytometrisch variierte der prozentuale Anteil an humanen Zellen je nach angewandter Therapie im Vergleich zu erkrankten Tieren und zwischen den Behandlungsformen teils signifikant. Während erkrankte Tiere im Durchschnitt über 50% ($51,42\% \pm 33,5\%$) humane Zellen im Gewebe aufwiesen verringerte die Therapie mit Ciclosporin A, wie auch in Knochenmark und Leber den prozentualen Anteil an CD45 Zellen im Vergleich dazu signifikant ($P < 0.05$) auf maximal 10,62%, während unter Behandlung mit Mycophenolat-Mofetil vergleichbare Mengen ($51,26\% \pm 33,5\%$) an CD45 gemessen wurden (Abb. 34A). Entsprechend war der Unterschied in der Menge an humanen Zellen unter Therapie mit CsA auch im Vergleich zur Behandlung mit MMF signifikant ($P < 0.05$) (Abb. 34A). Methylprednisolon reduzierte die Infiltration mit humanen Zellen in der Lunge auf $34,45\% \pm 21,32\%$ und war damit effektiver als die konventionelle Behandlung mit MMF, aber weniger effektiv als CsA, wobei diese Unterschiede jeweils nicht statistisch signifikant waren (Abb. 34A).

Wie in der Leber resultierte auch in der Lunge der adoptive Transfer regulatorischer T-Zellen dosisabhängig in einem vergleichbaren oder sogar erhöhten prozentualen Anteil an CD45 im Gewebe (Abb. 34B). Sowohl die Dosis nTreg 2:1 als auch 1:1 erhöhten den Anteil humaner Zellen im Gewebe (nTreg 2:1 $68,71\% \pm 12,32\%$; nTreg 1:1 $73,88 \pm 9,54\%$), während die Dosis von nTreg 1:2 im Mittel in einem vergleichbaren Anteil an Zellen ($49,38\% \pm 33,21\%$) resultierte (Abb. 34B). Im Vergleich zur Standardimmunsuppression ergab sich nur im Vergleich zur Therapie mit CsA ein statistisch signifikanter Unterschied, der vor allem im Vergleich zur Behandlung mit nTreg 2:1 und 1:1 sehr deutlich ($P < 0.001$) war, während nTreg 1:2 Therapie und CsA Behandlung vergleichsweise weniger stark divergierten ($P < 0.05$). Im Vergleich zur Therapie mit MMF und Methylprednisolon ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die Kombinationstherapie resultierte, abhängig vom verwendeten Immunsuppressivum in unterschiedlichen prozentualen Anteilen an CD45 Zellen in der Lunge. Während Ciclosporin A und nTreg die Infiltration mit humanen Zellen in der Lunge im Vergleich zu erkrankten Tieren signifikant auf durchschnittlich ($10,28\% \pm 11,99\%$) reduzieren konnten, führte sowohl die Kombinationstherapie aus Mycophenolat-Mofetil und regulatorischen T-Zellen als auch Methylprednisolon und nTreg zu erhöhten prozentualen Mengen an CD45. Während unter Pred./nTreg im Mittel $61,23\% \pm 12,64\%$ humane Zellen die Lunge infiltrierten, waren es unter MMF/nTreg Behandlung sogar $70,67\% \pm 6,56\%$. Damit war, wie auch unter konventioneller Immunsuppression die Behandlung mit Ciclosporin A und nTreg am effektivsten, um die Zelllast im Gewebe zu reduzieren und der Unterschied im Vergleich zur Therapie mit MMF/nTreg ($P < 0.001$) bzw. Pred./nTreg ($P < 0.01$) war jeweils statistisch signifikant (Abb. 34B).

Im Vergleich zur jeweiligen klassischen Immunsuppression ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zur Therapie mit natürlichen regulatorischen T-Zellen als Monotherapie war ebenfalls nur die Behandlung mit CsA/nTreg signifikant effektiver, die Infiltration mit CD45 Zellen in die Lunge zu verringern ($P < 0.01$ nTreg 1:1 und 1:2; $P < 0.001$ nTreg 2:1) (Abb. 34B).

Die Milz als sekundäres Immunorgan wies histologisch im Durchschnitt einen mittelgradigen Gehalt an humanen Zellen auf. Auch durchflusszytometrisch lag der prozentuale Anteil von CD45 im Gewebe bei durchschnittlich 53%, wobei nur bei einem Tier deutlich geringere Mengen gemessen wurden ($10,29\%$) (Abb. 34C). Die Therapie mit Ciclosporin A verringerte die Infiltration humaner Zellen sehr effektiv auf im Mittel $5,83\% (\pm 2,6\%)$, während die Behandlung mit Mycophenolat-Mofetil und Methylprednisolon die Menge vergleichsweise weniger reduzierten. Unter Therapie mit MMF lag der durchschnittliche Anteil an CD45 Zellen bei 37%, unter Monotherapie mit Pred. bei 27%. Entsprechend war im Vergleich zur unbehandel-

ten Kontrolle nur die Applikation von CsA statistisch signifikant effektiver ($P < 0.05$), die Infiltration der Milz mit Lymphozyten zu verringern (Abb. 34C).

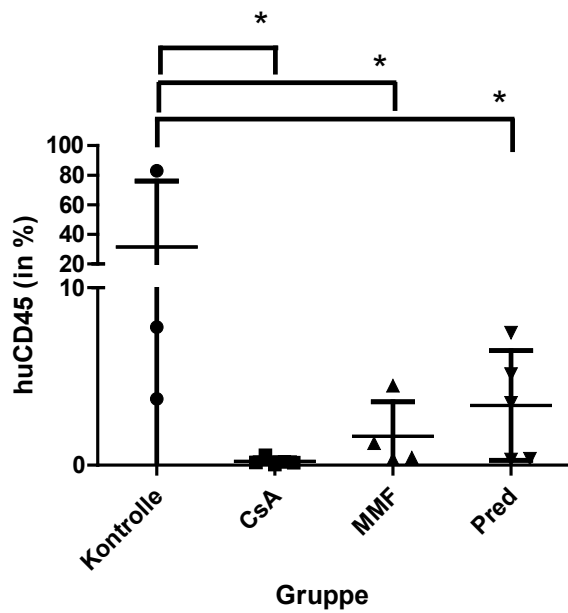
Der Transfer regulatorischer T-Zellen resultierte abhängig von der applizierten Dosis in einem nur geringfügig verminderten Anteil an humanen Zellen (Abb. 34D). Nur unter einer Dosierung von nTreg 1:2 wurde die Infiltration von CD45+ Zellen ins Gewebe im Durchschnitt auf $47,47\% \pm 34,60\%$ verringert, während die Dosierungen von nTreg 1:1 und vor allem 2:1 im Vergleich zur erkrankten Kontrolle in einem erhöhten Anteil an humanen Zellen im Gewebe führte ($61,06\%$ bzw. $69,64\%$) (Abb. 34D). Der Unterschied zwischen den jeweiligen Dosierungen war statistisch nicht signifikant (Abb. 34D). Im Vergleich zur Standardimmunsuppression war die Behandlung mit Ciclosporin A im Vergleich zu allen Dosierungen mit nTreg und bei einer Dosis von nTreg 2:1 auch die Therapie mit Methylprednisolon signifikant effektiver, die Menge an humanen Zellen in der Milz zu reduzieren ($P < 0.001$ nTreg 2:1 und 1:1 vs. CsA; $P < 0.05$ nTreg 1:2 vs. CsA und Pred.).

Wie auch in der Leber und der Lunge wurde die Infiltration an humanen CD45 Zellen in der Milz unter Kombinationstherapie abhängig vom applizierten Immunsuppressivum beeinflusst. Während eine Kombination aus Ciclosporin A und nTreg den prozentualen Anteil im Vergleich zu erkrankten Tieren verringern konnte ($14,37\% \pm 16,76\%$), resultierte die Therapie mit MMF/nTreg bzw. Pred./nTreg wie in der Lunge in einer gesteigerten Infiltration mit CD45 Zellen. In beiden Gruppen lag der prozentuale Anteil an humanen Zellen in der Milz bei rund 70% (Abb. 34D). Statistisch signifikant differierte die Zellmenge nur im Vergleich zwischen CsA/nTreg zu MMF/nTreg ($P < 0.01$), sowie CsA/nTreg zu Pred./nTreg ($P < 0.001$), während der Unterschied der erkrankten Kontrolle verglichen mit CsA/nTreg zwar deutlich, aber statistisch nicht signifikant war (Abb. 34D).

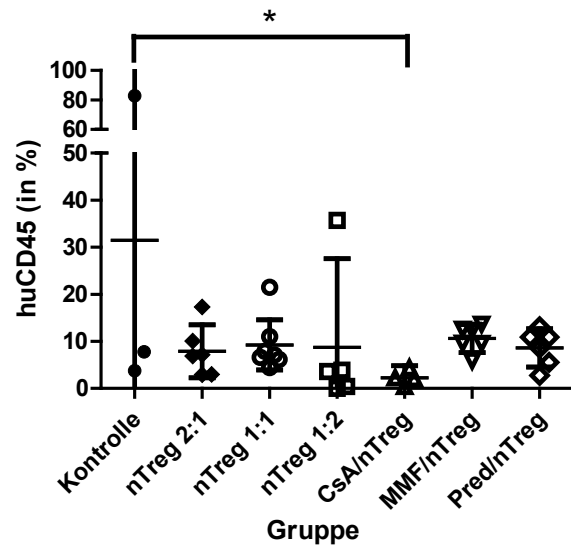
Im Vergleich zur entsprechenden klassischen Immunsuppression war nur der Unterschied zwischen der Therapie mit Methylprednisolon als Monotherapie zur Kombinationstherapie statistisch signifikant ($P < 0.05$), da die konventionelle Behandlung die Infiltration humaner CD45 Zellen effektiv reduzierte, während eine Therapie aus Methylprednisolon und nTreg die Zelllast im Gewebe deutlich erhöhte.

Der durchflusszytometrisch gemessene prozentuale Anteil an humanen CD45 Zellen korrelierte in allen Organen weitestgehend mit den histopathologischen Untersuchungsergebnissen.

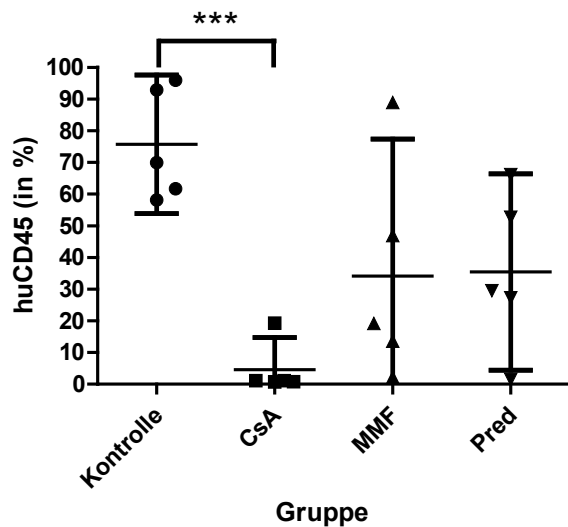
A: Knochenmark



B: Knochenmark



C: Leber



D: Leber

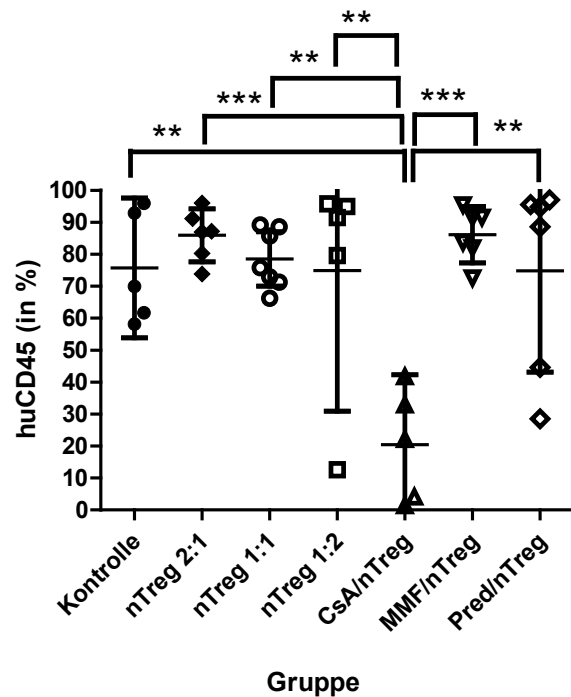
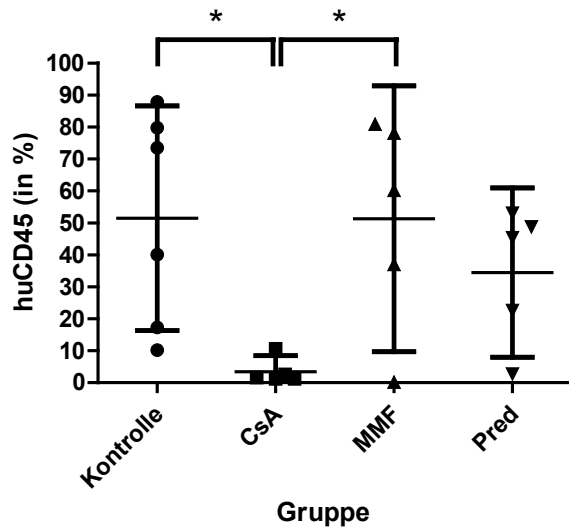
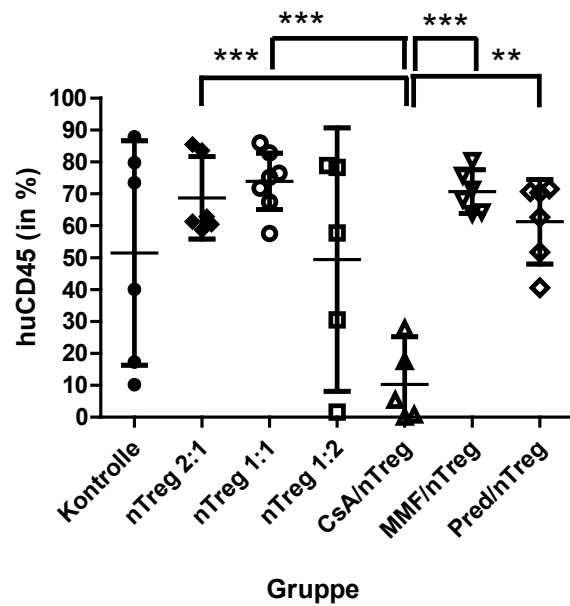


Abb. 33: **Prozentualer Anteil an humanen CD45 Zellen in Knochenmark und Leber:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle). Zur weiteren Therapie wurden täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken), Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os) oder Methylprednisolon (20mg/kg i.p.) (je n=5) als Standardimmunsuppression appliziert. Nach Organentnahme post mortem wurden die Organe aufgereinigt und für humanes CD45 gefärbt. Darstellung des Anteils an humanen CD45+ Zellen in Prozent in Knochenmark (A), Leber, (B), Lunge (C) und Milz (D) im Vergleich zwischen unbehandelter Kontrolle und Standardimmunsuppression. Angabe der Daten als Mittelwert \pm 95% CI. Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, Pred.: Methylprednisolon, nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

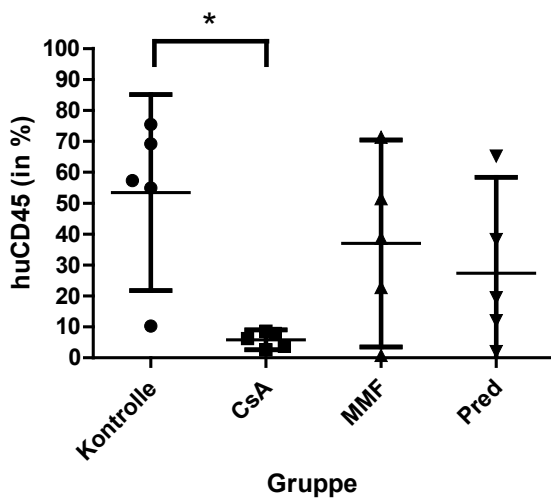
A: Lunge



B: Lunge



C: Milz



D: Milz

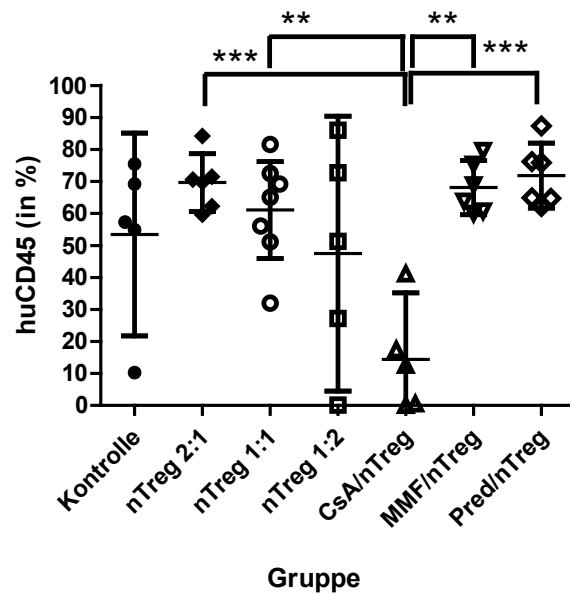


Abb. 34: **Prozentualer Anteil an humanen CD45 Zellen in Lunge und Milz:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle). Zur weiteren Therapie wurden täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken), Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os) oder Prednison (20mg/kg i.p.) (je n=5) als Standardimmunsuppression appliziert. Nach Organentnahme post mortem wurden die Organe aufgereinigt und für humanes CD45 gefärbt. Darstellung des Anteils an humanen CD45+ Zellen in Prozent in Knochenmark (A), Leber, (B), Lunge (C) und Milz (D) im Vergleich zwischen unbehandelter Kontrolle und Standardimmunsuppression. Angabe der Daten als Mittelwert \pm 95% CI. Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, Pred.: Methylprednisolon, nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

5.9. Der prozentuale Anteil an FoxP3+ T-Zellen im Gewebe hängt von der Wahl der Immunsuppression ab

Da die Expression von FoxP3 den Verlauf und die Schwere einer akuten Graft versus Host Disease maßgeblich beeinflusst, wurde in den entnommenen Geweben die Menge an CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen bestimmt. Um zu vergleichen welchen Einfluss die jeweilige Therapie eventuell auf die Proliferation von regulatorischen T-Zellen haben könnte, wurde auch bei allen behandelten Tieren der prozentuale Anteil an FoxP3 in den Organen gemessen und untereinander verglichen.

Insgesamt war die Menge an regulatorischen T-Zellen bei erkrankten Tieren in allen Geweben sehr gering.

Im Knochenmark lag der prozentuale Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen bei der erkrankten Kontrolle im Durchschnitt bei ca. 2% ($2,17 \pm 2,49\%$) (Abb. 35A).

Die konventionelle Immunsuppression erhöhte die Menge an regulatorischen T-Zellen im Knochenmark im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Vor allem unter der Behandlung mit Ciclosporin A proliferierten die Zellen teils deutlich, sodass im Mittel 10% ($10,59 \pm 10,71\%$) der Zellen im Gewebe CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen waren. Auch unter Behandlung mit Mycophenolat-Mofetil und Methylprednisolon wurde der prozentuale Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen gesteigert, wobei dieser Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weniger deutlich war, als unter Therapie mit CsA (MMF $6,56\% \pm 7,23$; Pred. $4,03\% \pm 1,72$) (Abb. 35A).

Die Proliferation der FoxP3+ T-Zellen nach adoptivem Transfer der regulatorischen T-Zellen variierte je nach applizierter Dosis. Besonders unter einer Dosis von nTreg 2:1 lag der prozentuale Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ durchschnittlich bei rund 16% ($15,97 \pm 7,3\%$) und auch die Applikation von nTreg 1:2 resultierte in einer verhältnismäßig hohen Menge ($15,97\% \pm 9,24\%$) an FoxP3+ T-Zellen im Knochenmark (Abb. 35A). Auch eine Dosis von nTreg 1:1 führte zu einem im Vergleich zu erkrankten Kontrolltieren erhöhten prozentualen Anteil an regulatorischen T-Zellen im Gewebe von durchschnittlich vier Prozent. Dieser Unterschied war aber vergleichsweise zu den anderen Dosierungen entsprechend geringer (Abb. 35A).

Auch die Kombinationstherapie resultierte im Vergleich zur erkrankten Kontrolle in einem Anstieg an FoxP3+ regulatorischen T-Zellen innerhalb der CD4+ T-Zellpopulation. Während die Behandlung mit Ciclosporin A und nTreg, sowie Mycophenolat-Mofetil und nTreg zu einem mittleren prozentualen Anteil von etwa 8% regulatorischen T-Zellen führte, wurde vor allem durch die Therapie mit Methylprednisolon und nTreg die Proliferation CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen im Mittel auf 15,9% ($15,9\% \pm 7,04\%$) gesteigert (Abb. 35A). Zwischen den einzelnen Therapieformen gab es zwar teils deutliche Unterschiede im pro-

zentualen Anteil an regulatorischen T-Zellen, aber diese waren statistisch nicht signifikant (Abb. 35A).

In der Leber, als Hauptzielorgan einer akuten GvHD war der durchschnittliche Anteil an FoxP3⁺ Zellen innerhalb der CD4 Zellfraktion verschwindend gering und lag durchschnittlich bei einem Prozent (Abb. 35B). Die Behandlung, sowohl mit Ciclosporin A allein, als auch in Kombination resultierte in einer signifikant gesteigerten Proliferation regulatorischer T-Zellen. Der offenbar synergistische Effekt von CsA und nTreg führte zu einem mittleren prozentualen Anteil von 18% an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen in der Leber, wobei vereinzelt sogar noch höhere Mengen in beiden Gruppen gemessen wurden (Abb. 35B). Der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle war deutlich signifikant ($P < 0.01$), aber auch im Vergleich zu allen anderen Therapieformen, außer Methylprednisolon als Monotherapie war der Anteil an regulatorischen T-Zellen unter CsA bzw. CsA/nTreg signifikant erhöht und beide Therapien damit sehr effektiv, die Proliferation von Treg positiv zu beeinflussen (Abb. 35B). Diese FoxP3⁺ T-Zellen exprimierten kein oder nur zu einem geringen Maße (weniger als 12%) CD127 (Abb. 36).

Auch die Behandlung mit Mycophenolat-Mofetil führte zu einem etwas erhöhten Anteil an FoxP3⁺ T-Zellen, der im Mittel etwa bei drei Prozent lag (Abb. 35B). Deutlicher als unter Behandlung mit MMF wurde der mittlere prozentuale Anteil an regulatorischen T-Zellen allerdings unter einer Therapie mit Methylprednisolon gesteigert und im Durchschnitt waren 10% der CD4⁺ T-Zellen FoxP3⁺ Treg (Abb. 35B). Damit war die Monotherapie ebenfalls effektiv, die Proliferation regulatorischer T-Zellen zu steigern, wenn auch der Unterschied zur erkrankten Kontrolle und zu den anderen Therapieformen statistisch nicht signifikant war (Abb. 35B). Obwohl durch den adoptiven Transfer direkt eine fixe Anzahl regulatorischer T-Zellen appliziert wurde, konnten diese offenbar nicht deutlich proliferieren und somit war der prozentuale Anteil an FoxP3⁺ Treg in der Leber im Mittel nicht deutlich erhöht. Durchschnittlich lag der Anteil an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen unter Therapie mit nTreg 2:1 bei 2% und war unter Therapie mit nTreg 1:1 ($3,66\% \pm 4,26\%$) und nTreg 1:2 ($4,68\% \pm 3,71\%$) nur geringfügig erhöht (Abb. 35B). Im Vergleich zur Monotherapie mit Mycophenolat-Mofetil war die Kombinationstherapie aus MMF/nTreg etwas effektiver, den Anteil regulatorischer T-Zellen im Gewebe etwas zu erhöhen ($3,82\% \pm 4,24\%$), während die Kombinationstherapie aus Pred./nTreg im Vergleich zur Behandlung mit Methylprednisolon allein zu einem schlechteren Ergebnis führte (Abb. 35B). Unter Therapie aus Methylprednisolon und regulatorischen T-Zellen reduzierte sich der prozentuale Anteil an FoxP3⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellfraktion auf durchschnittlich 3,8%, ohne dass dieser Unterschied statistisch signifikant war (Abb. 35B).

Auch in der Lunge war der prozentuale Anteil an regulatorischen T-Zellen bei erkrankten Tieren nur gering und lag durchschnittlich bei 1,89% und maximal 4,5% (Abb. 35C). Auch

hier proliferierten regulatorische T-Zellen unter Einfluss von Ciclosporin A gut und es wurden bis zu 7,82% ($5,14\% \pm 2,81\%$) FoxP3+ T-Zellen innerhalb der CD4+ Zellpopulation gemessen (Abb. 35C). Die Behandlung mit Mycophenolat-Mofetil resultierte, anders als in Knochenmark und Leber im Vergleich zur erkrankten Kontrolle in der Lunge in einer verringerten Menge an CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen ($1,08\% \pm 1,08\%$) und bei den meisten Tieren (3 von 4) wurden weniger als ein Prozent regulatorische T-Zellen im Gewebe gemessen (Abb. 35C).

Methylprednisolon konnte die Zellmenge im Vergleich zu erkrankten Tieren etwas steigern und im Mittel waren etwas mehr als drei Prozent ($3,37\% \pm 2,41\%$) FoxP3+ T-Zellen (Abb. 35C). Wie in den anderen Organen war somit die Therapie mit Ciclosporin A von den verwendeten Immunsuppressiva am effektivsten, die Proliferation regulatorischer T-Zellen zu unterstützen, ohne dass der Unterschied im prozentualen Anteil im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle oder den anderen Immunsuppressiva signifikant war (Abb. 35C).

Nach adoptivem Transfer regulatorischer T-Zellen lag der Anteil an FoxP3+ Zellen innerhalb der CD4+ T-Zellen in der Lunge dosisunabhängig über dem prozentualen Anteil der erkrankten Kontrolltiere. Dabei wurde die höchste Menge mit durchschnittlich 5% unter einer Behandlung mit nTreg 1:2 gemessen, während unter geringeren Dosierungen im Mittel lediglich drei Prozent CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen waren (Abb. 35C). Im Vergleich zur Standardimmunsuppression war die Behandlung mit nTreg 1:2 damit äquivalent der Therapie mit Ciclosporin A, während die niedrigeren Dosierungen im Durchschnitt mit der Behandlung mit Methylprednisolon vergleichbar waren (Abb. 35C).

Die Kombinationstherapie resultierte jeweils in einem erhöhten prozentualen Anteil an FoxP3+ T-Zellen. Vor allem unter Therapie mit Ciclosporin A und nTreg proliferierten die regulatorischen T-Zellen deutlich, was einen möglichen synergistischen Effekt von CsA und nTreg unterstreicht. Mindestens 5,27% der CD4+ T-Zellen waren Fox3+ Treg, womit schon der niedrigste gemessene Anteil an diesen Zellen unter CsA/nTreg Behandlung über der durchschnittlichen Menge an regulatorischen T-Zellen unter konventioneller Therapie und adoptivem Zelltransfer lag (Abb. 35C). Im Vergleich zur erkrankten Kontrolle, sowie der Therapie mit MMF, sowohl allein als auch in Kombination mit nTreg und dem adoptiven Transfer von nTreg 2:1 war der Unterschied in der Menge an regulatorischen T-Zellen in der Lunge signifikant erhöht ($P < 0,05$) (Abb. 35C). Entsprechend war in der Lunge die Therapie mit Ciclosporin A und nTreg die effektivste Behandlungsform was die Proliferation bzw. Menge regulatorischer T-Zellen im Gewebe betrifft. Anders, als die Monotherapie mit Mycophenolat-Mofetil resultierte die Behandlung mit MMF/nTreg in einem durchschnittlich erhöhten Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen ($2,51\% \pm 1,69\%$) in der Lunge im Vergleich zur erkrankten Kontrolle und war damit bezüglich des Einflusses auf regulatorische T-Zellen der klassischen Immunsuppression überlegen (Abb. 35C).

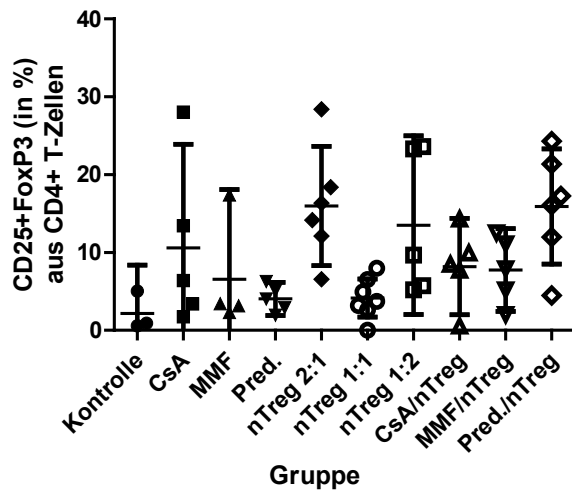
Die Kombinationstherapie aus Methylprednisolon und nTreg führte zu einem im Mittel vergleichbaren prozentualen Anteil an FoxP3+ T-Zellen und war damit äquivalent der entsprechenden Monotherapie (Abb. 35C).

Wie in allen anderen Geweben war der Anteil an FoxP3+ regulatorischen T-Zellen bei unbehandelten Tieren auch in der Milz vergleichsweise gering ($1,66\% \pm 1,64\%$) (Abb. 35D). Die klassische Immuntherapie resultierte unabhängig vom Immunsuppressivum in einer erhöhten Expression von FoxP3 in den CD4+ T-Zellen auf durchschnittlich 7-8%, wobei sich zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen im Mittel nur marginale Unterschiede ergaben (Abb. 35D).

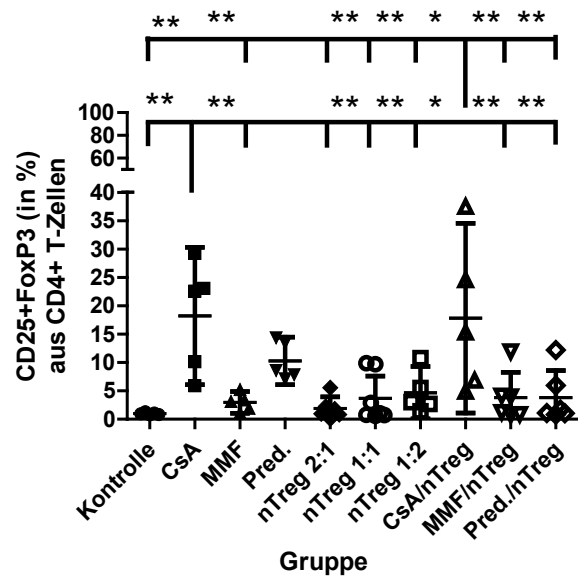
Die Monotherapie mit regulatorischen T-Zellen führte dosisunabhängig ebenfalls zu einem gesteigerten prozentualen Anteil an FoxP3+ Treg im Gewebe von bis zu rund 9%, wobei die höchste Menge unter einer Therapie mit nTreg 1:1 ($8,79\% \pm 3,96\%$) und der geringste unter der Dosis von nTreg 2:1 ($7,07\% \pm 5,82\%$) gemessen wurde, wodurch die Unterschied in der Proliferation der Zellen im Gewebe im Mittel marginal war (Abb. 35D). Wie in Leber und Lunge wurde durch den positiven Einfluss von Ciclosporin A auf regulatorische T-Zellen auch in der Milz der höchste prozentuale Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen unter einer Kombinationstherapie aus CsA/nTreg gemessen. Im Durchschnitt waren 12% ($12,57\% \pm 7,6\%$; Mean \pm SD) der CD4+ T-Zellen FoxP3+ Treg, wohingegen der mittlere prozentuale Anteil unter Kombinationstherapie aus MMF/nTreg bzw. Methylprednisolon und nTreg jeweils bei 3% und damit im Mittel zwar ebenfalls über der Menge an Treg der erkrankten Kontrolle lag, aber weniger effektiv war als die Behandlung mit CsA/nTreg (Abb. 35D).

Keiner der Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bzw. innerhalb der Therapiegruppen war statistisch signifikant (Abb. 35D).

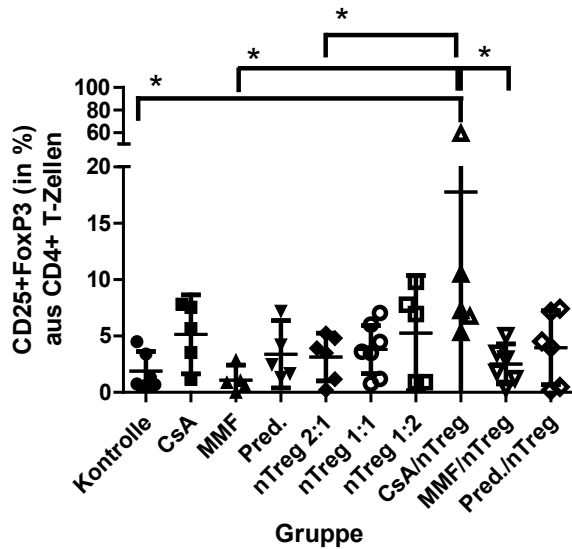
A: Knochenmark



B: Leber



C: Lunge



D: Milz

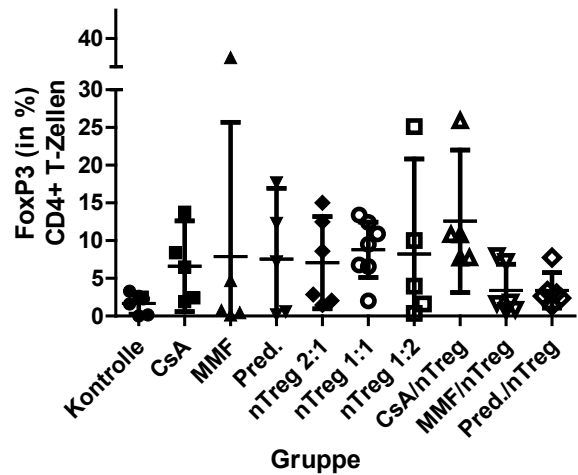


Abb. 35: **Prozentualer Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischen T-Zellen im Gewebe:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6). Zur weiteren Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 ($1,5 \cdot 10^6$) (n=6), 1:1 ($3 \cdot 10^6$) (n=7) oder 1:2 ($6 \cdot 10^6$) (n=5) i.v. verabreicht oder täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken), Mycophenolat Mofetil (0,5mg p.os) oder Methylprednison (20mg/kg i.p.) als Standardimmunsuppression allein (je n=5) oder nach einmaliger Injektion von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg zusammen mit den humanen PBMCs an Tag 0 (CsA/nTreg n=5, MMF/nTreg n=6, Pred./nTreg n=6) appliziert. Darstellung des Anteils an CD25+FoxP3+ Zellen aus der CD4+ T-Zellpopulation in Prozent in Knochenmark (A), Leber (B), Lunge (C) und Milz (D) im Vergleich zwischen unbehandelter Kontrolle, klassischer Immunsuppression, nTreg Therapie allein in verschiedenen Dosierungen oder Kombinationstherapie von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg und Standardimmunsuppression. Angabe der Daten als Mittelwert \pm 95% CI. Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

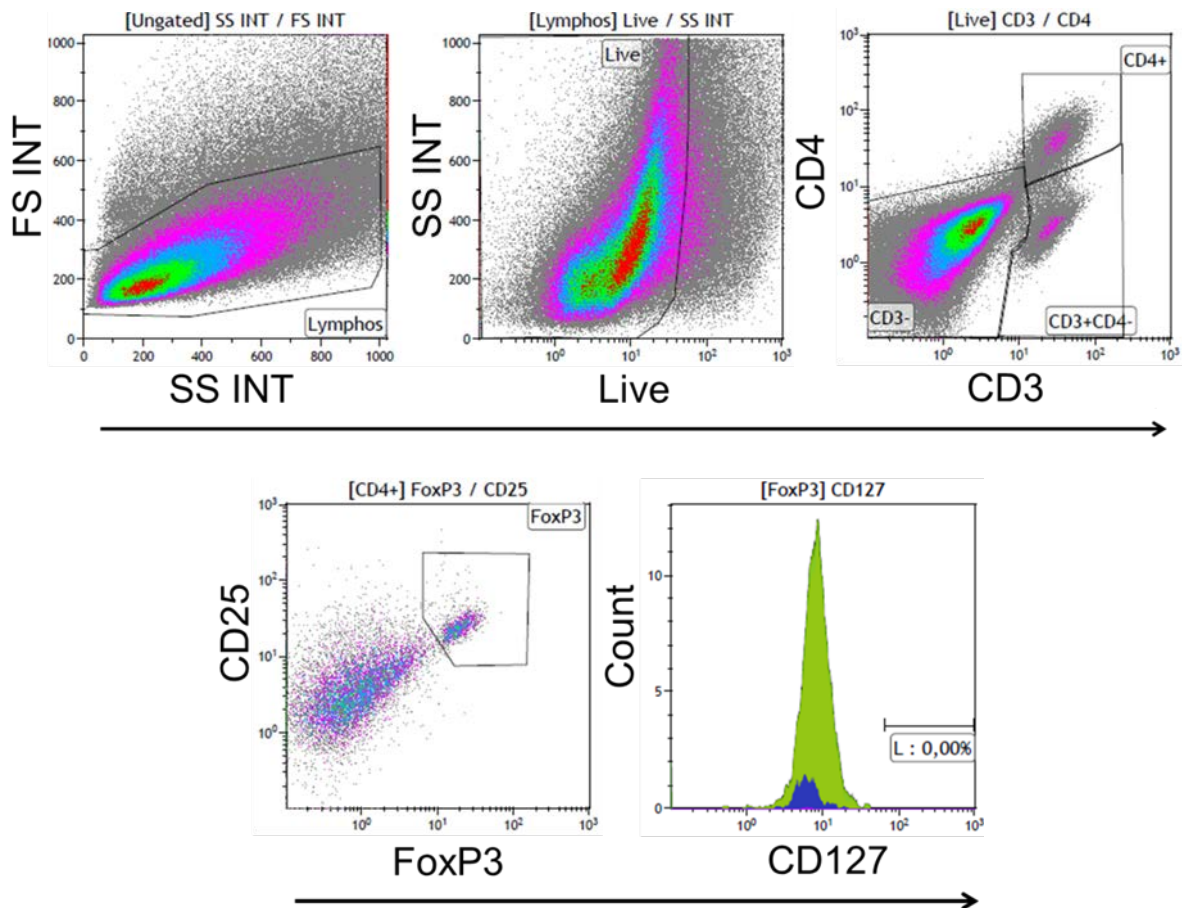
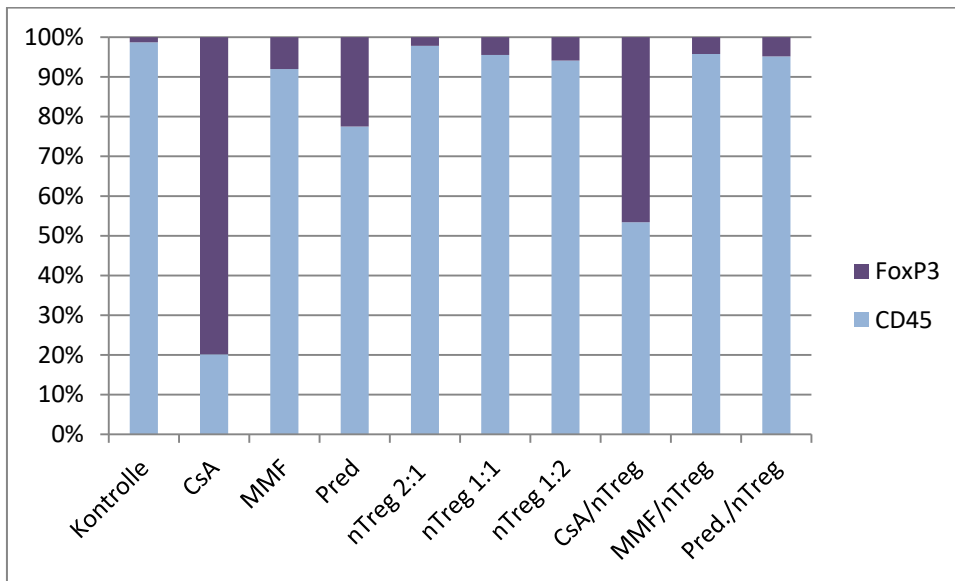


Abb. 36: **FoxP3 Expression in der Leber unter Standardimmunsuppression mit CsA:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch intravenöse Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs induziert (Kontrolle n=6). Zur weiteren Therapie wurde täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg s.c. in den Nacken) als Standardimmunsuppression allein (n=5) appliziert. FACS-Plots der Leber unter Therapie mit Ciclosporin A allein. Aus den Lymphozyten wurden zunächst die lebenden Zellen und weiter die CD3+CD4+ T-Zellen dargestellt. Aus den CD4+ T-Zellen wurde dann CD25 gegen FoxP3 aufgetragen und die CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischen T-Zellen dargestellt. Die FoxP3+ Zellen wurden weiter auf die Expression von CD127 dargestellt.

Entsprechend des hohen Anteils an FoxP3+ regulatorischen T-Zellen, vor allem in Leber und Lunge unter Therapie mit Ciclosporin A allein und in Kombination ergab sich ein Verhältnis von 0,25 unter CsA bzw. 0,9 unter CsA/nTreg von CD45 Zellen zu Treg in der Leber und 0,66 CsA bzw. 0,61 CsA/nTreg von CD45 Zellen zu Treg in der Lunge (Abb. 37A und B). Während bei erkrankten Tieren das Verhältnis von CD45 zu FoxP3 > 9 sowohl in Leber und Lunge lag (Abb. 37A und B), konnte nur die Monotherapie mit Prednisolon das Zellverhältnis in der Leber auf 3,55 reduzieren (Abb. 37A). Alle weiteren Therapieoptionen resultierten in einem der erkrankten Kontrolle vergleichbaren Verhältnis der Zellen zueinander von ≥ 9 , sowohl in der Leber, als auch in der Lunge (Abb. 37A und B).

A: Verhältnis CD45/FoxP3 Leber



B: Verhältnis CD45/FoxP3 Lunge

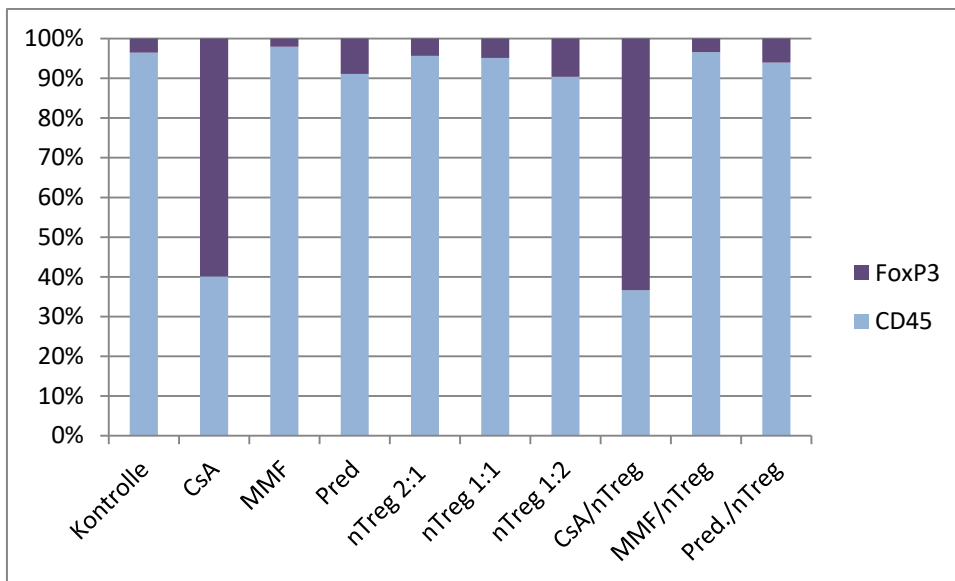


Abb. 37: **Verhältnis CD45 zu FoxP3 in Leber und Lunge:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs i.v. induziert (Kontrolle n=6). Zur weiteren Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 ($1,5 \cdot 10^6$) (n=6), 1:1 ($3 \cdot 10^6$) (n=7) oder 1:2 ($6 \cdot 10^6$) (n=5) i.v. verabreicht oder täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg), Mycophenolat Mofetil (0,5mg) oder Methylprednison (20mg/kg) als Standardimmunsuppression allein (je n=5) oder nach einmaliger Injektion von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg zusammen mit den humanen PBMCs an Tag 0 (CsA/nTreg n=5, MMF/nTreg n=6, Pred./nTreg n=6) appliziert.

Darstellung des Verhältnisses CD45 zu FoxP3 in Leber (A) und Lunge (B) im Vergleich unbehandelte Kontrolle, klassische Immunsuppression, nTreg Therapie allein oder Kombinationstherapie von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg und Standardimmunsuppression.

Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

5.10. Die Wahl der Immunsuppression beeinflusst die Proliferation CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischer T-Zellen

Um zu untersuchen, inwieweit die Wahl der immunsuppressiven Therapie das Proliferationsverhalten der CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) beeinflusst, wurde die Expression von Ki67 innerhalb der T-Zellpopulation gemessen.

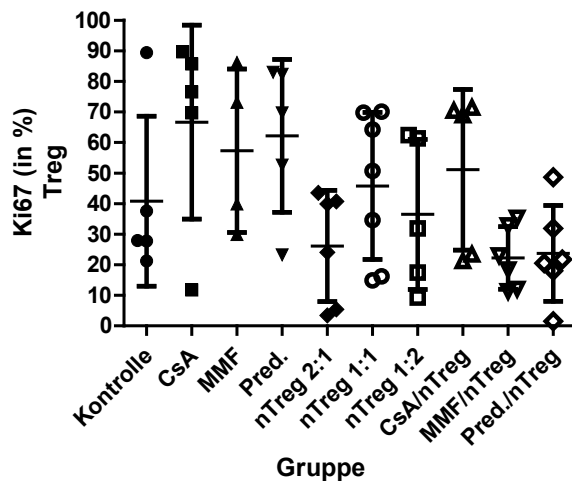
Statistisch ausgewertet wurde die Expression von Ki67 nur in Leber und Lunge, da im Knochenmark und in der Milz vereinzelt zu wenig Zellen (<20) zur Analyse zur Verfügung standen und die Werte entsprechend nicht in die Analyse mit einbezogen wurden.

Unbehandelte, erkrankte Tiere exprimierten nur wenig FoxP3 innerhalb der CD4+ T-Zellpopulation in allen untersuchten Geweben. Die Zellen zeigten in Leber und Lunge eine teils deutliche Proliferationsaktivität, gemessen an der Expression von Ki67 (Abb. 38A und B). Im Durchschnitt lag der prozentuale Anteil an Ki67+ regulatorischen T-Zellen in der Leber bei ca. 40% (40,79% ± 27,79%), wobei der weitaus größte Teil der CD4+ T-Zellen in dieser Gruppe eine geringere Proliferationsaktivität aufwies (Abb. 38A).

Abhängig von der Wahl der immunsuppressiven Therapie wurde das Proliferationsverhalten der regulatorischen T-Zellen im Gewebe beeinflusst. In der Leber proliferierten CD4+CD25+FoxP3+ T-Zellen unter Monotherapie mit konventioneller Immunsuppression, vor allem mit Ciclosporin A deutlich (66,67% ± 31,69%)(Abb. 38A). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war dieser Unterschied allerdings nicht signifikant (Abb. 38A). Der adoptive Transfer regulatorischer T-Zellen resultierte in allen Dosierungen in der Leber in nur geringer Expression von FoxP3 und Proliferationsaktivität dieser Zellen variierte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dosisabhängig. Während unter einer Dosis von nTreg 2:1 nur etwa 26% (26,16 ± 18,18%) der Zellen Ki67 exprimierten, proliferierten FoxP3+ Zellen unter einer Dosis von nTreg 1:2 und vor allem 1:1 im Mittel deutlich (36,47% ± 24,58% bzw. 45,79% ± 24,09%) (Abb. 38A). Im Vergleich zur konventionellen Immunsuppression proliferierten die Zellen unter Monotherapie mit nTreg in allen Dosierungen im Mittel allerdings deutlich weniger, ohne dass dieser Unterschied signifikant war (Abb. 38A). Ebenso wie unter Standardimmunsuppression proliferierten FoxP3+ T-Zellen unter Kombinationstherapie aus Ciclosporin A und $0,5 \cdot 10^6$ nTreg im Durchschnitt stärker als bei erkrankten, unbehandelten Tieren, ohne dass dieser Unterschied statistisch signifikant war und die regulatorischen T-Zellen exprimierten im Durchschnitt etwas mehr als 50% Ki67 (51,09% ± 26,29%) (Abb. 38A). Die Kombinationstherapie aus MMF/nTreg und Methylprednison/nTreg resultierte hingegen in einer vergleichsweise zur unbehandelten Kontrolle und zur entsprechenden konventionellen Immunsuppression reduzierten Expression von Ki67 (im Durchschnitt je etwa 20%), wobei dieser Unterschied nicht signifikant war (Abb. 38A).

Auch in der Lunge proliferierten FoxP3⁺ T-Zellen der unbehandelten Kontrolle zum Teil deutlich und durchschnittlich exprimierten mehr als 18% der Zellen Ki67 (Abb. 38B). Die konventionelle Immunsuppression resultierte in einer vergleichsweise dazu reduzierten Proliferationsaktivität. Durchschnittlich nur etwa 11% der Zellen ($11,56\% \pm 5,11\%$) unter Therapie mit Ciclosporin A und nur etwa 3% der FoxP3⁺ T-Zellen unter Behandlung mit MMF bzw. Methylprednisolon exprimierten Ki67 (Abb. 38B). Auch nach adoptivem Transfer natürlicher regulatorischer T-Zellen in unterschiedlichen Dosierungen wiesen die Zellen eine vergleichsweise zu erkrankten Tieren im Durchschnitt geringere Proliferationsaktivität auf (Abb. 38B). Vor allem unter einer Dosis von nTreg 1:2 exprimierten die CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen nur zu ca. 5% ($5,3\% \pm 3,89\%$) Ki67, während die stärkste Proliferationsaktivität, wie auch in der Leber unter einer Dosis von nTreg 1:1 gemessen wurde ($15,88\% \pm 13,24\%$) (Abb. 38B). Auch die Kombinatiosstherapie, vor allem mit CsA/nTreg und Methylprednisolon/nTreg resultierte im Durchschnitt in einer verringerten prozentualen Expression von Ki67 innerhalb der FoxP3⁺ T-Zellfraktion. Unter einer Behandlung mit CsA/nTreg proliferierten im Mittel nur etwa 5%, unter Therapie mit Methylprednisolon/nTreg rund 10% der regulatorischen T-Zellen (Abb. 38B). Unter der Therapie mit MMF/nTreg exprimierten FoxP3⁺ T-Zellen vereinzelt mehr Ki67 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und durchschnittlich mehr als unter Kombinationstherapie mit anderen Immunsuppressiva ($15,75\% \pm 17,55\%$) (Abb. 38B). Die prozentualen Unterschiede in der Expression von Ki67 der einzelnen Therapieformen untereinander und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle waren statistisch nicht signifikant (Abb. 38B).

A: Ki67 Leber



B: Ki67 Lunge

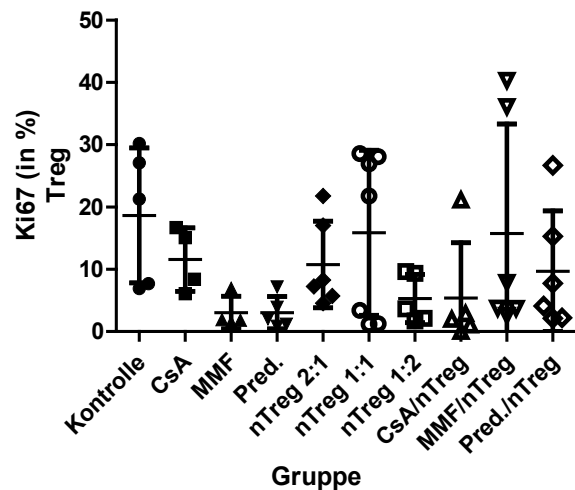


Abb. 38: **Prozentualer Anteil an Ki67 innerhalb der CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) T-Zellen unter Therapie im Vergleich zur erkrankten Kontrolle:** Eine xenogene akute Graft versus Host Disease wurde durch Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs i.v. induziert (Kontrolle n=6). Zur weiteren Therapie wurden entweder simultan einmalig polyklonal expandierte nTreg in den Dosierungen 2:1 ($1,5 \cdot 10^6$) (n=6), 1:1 ($3 \cdot 10^6$) (n=7) oder 1:2 ($6 \cdot 10^6$) (n=5) i.v. verabreicht oder täglich ab Tag +1 Ciclosporin A (4mg/kg), Mycophenolat Mofetil (0,5mg) oder Methylprednison (20mg/kg) als Standardimmunsuppression allein (je n=5) oder nach einmaliger Injektion von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg zusammen mit den humanen PBMCs an Tag 0 (CsA/nTreg n=5, MMF/nTreg n=6, Pred./nTreg n=6) appliziert.

Darstellung des Anteils an Ki67+ Zellen innerhalb der CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) T-Zellpopulation in Leber (A) und Lunge (B) im Vergleich unbehandelte Kontrolle, klassische Immunsuppression, nTreg Therapie allein oder Kombinationstherapie von $0,5 \cdot 10^6$ nTreg und Standardimmunsuppression.

Angabe der Daten als Mittelwert \pm 95% CI. Analyse One-Way-ANOVA und Tukey multiple comparison Test; * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Abkürzung: CsA: Ciclosporin A, MMF: Mycophenolat Mofetil, nTreg: natürliche regulatorische T-Zellen

6. Diskussion

Der Erfolg einer allogenen Stammzelltransplantation wird maßgeblich durch akute und noch weit mehr durch chronische GvHD limitiert (Arora et al. 2016; Grube et al. 2016). Trotz intensiver Forschung und Weiterentwicklung der medikamentösen Therapie gehen diese Erkrankungen mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate einher. Immunsuppressiva wie Ciclosporin A, Mycophenolat-Mofetil und Glukokortikoide wie z.B. Methylprednisolon werden zur präemptiven, sowie als *first* und *second line* Behandlung eingesetzt. Diese Medikamente können Patienten mitunter nur unzureichend vor schweren GvHD Formen schützen (McDonald 2016). Weiterhin sind sie, vor allem bei Langzeitapplikation selbst mit unerwünschten Komplikationen assoziiert, sodass klinisch eine Medikamenten-assoziierte Dysfunktion der Organe einer GvHD ähneln kann (Gale 1985; Hu und Cotliar 2011; Green und Hind 2016). Zu den betroffenen Organen zählen vor allem die Niere, Leber, Darm und Lunge (Dieterle et al. 1990; Bennett et al. 1996; de Mattos, Angelo M. et al. 2000; Kambham et al. 2014; Kemmner et al. 2016; Arai et al. 2016; Elsallabi et al. 2016). Zudem setzen Immunsuppressiva die allgemeine Immunkompetenz des Patienten herunter. In der Folge kann es zu schweren Infektionen mit Bakterien, Viren oder Pilzen kommen (Sayer et al. 1994; Orlicka et al. 2013). Neben einem Tumorrückfall kann es zudem *de novo* zur Entstehung sekundärer Tumorerkrankungen im Gewebe durch onkogene Viren wie Herpesviren, vor allem Epstein-Barr-Virus, Hepatitisviren und Papillomaviren kommen (Buell et al. 2005; Lowe et al. 2007; Piselli et al. 2014). Die *post transplant lymphoproliferativ disorders* (PTLD) ist neben Hauttumoren der häufigste Tumor nach Transplantation und ist häufig assoziiert mit einer Epstein-Barr-Virus Infektion (LaCasce 2006).

Die Immunsuppression stellt in aller Regel eine lebenslange Behandlung dar. Aufgrund der Fülle an unerwünschten Arzneiwirkungen ist die Erschließung neuer Therapieoptionen unerlässlich. Regulatorische T-Zellen sind im Körper für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase verantwortlich. Sie regulieren Immunprozesse und schützen den Organismus so vor Autoimmunerkrankungen und überschießenden Immunreaktionen (Sakaguchi et al. 1995; Wildin et al. 2001; Lahl et al. 2007; Rudensky 2011). Durch diese positiven Eigenschaften stellen sie eine potentielle Ergänzung der konventionellen Immunsuppression dar.

Regulatorische T-Zellen als adjuvante Therapie im Tiermodell

Aufgrund ihrer immunmodulatorischen Kapazitäten wurden regulatorische T-Zellen in vielen Tiermodellen zur Untersuchung ihres Einflusses auf GvHD untersucht.

Experimente im allogenen Mausmodell konnten gezielt zeigen, dass das Überleben und der klinische Verlauf einer akuten GvHD durch CD4+CD25+ T-Zellen positiv beeinflusst werden.

Fehlen diese Zellen, steigen Morbiditäts- und Mortalitätsrate der Versuchstiere deutlich (Taylor et al. 2001; Cohen et al. 2002; Hoffmann et al. 2002; Taylor 2002). Entscheidend dabei ist, dass die Treg trotz Verminderung der Schwere der GvHD den GvL nicht negativ beeinflussen (Edinger et al. 2003). Entscheidender als akute Abstoßungsreaktionen sind chronische Veränderungen, da diese durch die teils irreversiblen Organveränderungen allgemein schwieriger zu therapieren sind (Govender et al. 2014; Grube et al. 2016). Die genaue Pathogenese der chronischen GvHD ist nicht vollständig geklärt. Sie gleicht, anders als die akute Form mit ihrem Zytokinsturm und der assoziierten Apoptose des Zielgewebes eher einer Autoimmunerkrankung in der B-Zellen und die von Plasmazellen produzierten Antikörper eine zentrale Rolle zu spielen scheinen (Min 2011). Durch die Applikation regulatorischer T-Zellen kann experimentell die Konzentration an Immunglobulin reduziert werden. Zusätzlich wird die Inzidenz einer Glomerulopathie durch Immunkomplexablagerungen vermindert (Sagoo et al. 2012b).

Im Zusammenhang mit Immunsuppressiva wird die Menge regulatorischer T-Zellen abhängig von der Wahl, der Dosis und der Applikationsdauer des Medikaments beeinflusst. Untersuchungen im allogenen Nierentransplantationsmodell der Ratte zeigen, dass eine Kurzzeittherapie mit Ciclosporin A und applizierten regulatorischen T-Zellen den klinischen Verlauf, gemessen an Überleben, Proliferation der allogenen T-Zellen und Produktion von allogenen Plasmazellen teils signifikant verbessern konnte (Siepert et al. 2012).

Diese Untersuchungen gaben Anlass auch andere zur Prävention einer Abstoßungsreaktion standardmäßig verwendeten Immunsuppressiva hinsichtlich ihres Einfluss auf *ex vivo* expandierte nTreg im Tiermodell zu untersuchen. Dazu wurden adulte NOD/SCID Il-2Rgamma^{-/-} Mäuse verwendet. Dieser Stamm ermöglicht im Vergleich zu anderen immundefizienten Mausstämmen eine schnellere und effektivere Infiltration der humanen Zellen in das Gewebe, wobei interindividuelle Unterschiede möglich sind (King et al. 2008; Ali et al. 2012).

Genetisch zeichnet sich der gewählte Tierstamm durch ein Fehlen von B-, T- und NK-Zellen, sowie verminderter Funktion von Makrophagen und dendritischen Zellen aus, wodurch im Vorfeld der Transplantation keine Chemotherapie oder letale Bestrahlung zur Depletion der Immunzellen des Empfängers nötig war.

Isolation und Expansion regulatorischer T-Zellen zur klinischen Anwendung

Regulatorische T-Zellen zirkulieren nur zu einem geringen Prozentsatz im Blut (Le und Chao 2007). Vor einer klinischen Anwendung ist daher eine Expansion der Zellen obligat. Die Kulturbedingungen sollen dabei keinen negativen Einfluss auf den Phänotyp und damit die suppressive Kapazität der Zellen haben. Das Produkt sollte zudem keine Kontamination mit konventionellen T-Zellen aufweisen.

Die Isolation der nTreg resultierte in einer sehr reinen CD4+CD25+FoxP3+ Population. Die Kultivierung mit Rapamycin und IL-2 und die Restimulierung an Tag +9 hatte keine negativen Auswirkungen auf den Phänotyp. Die Zellen wiesen sowohl vor als auch nach der Expansion einen sehr hohen Anteil an FoxP3 auf. Die Zellen produzierten keine proinflammatorischen Zytokine und konnten die Aktivierung von Effektorzellen *in vitro* dosiabhängig sehr gut supprimieren. Anstatt die Zellen allo-spezifisch zu expandieren, erfolgte die Vermehrung der Treg polyklonal, um eine möglichst große Menge an naiven (CD45RA+) nTreg im Zellprodukt zu haben. In einer Studie von Arroyo Hornero et al. (2017) sind CD45RA+ (naive) Treg in der TSDR stabiler demethyliert als CD45RA- Gedächtniszellen. Nach Stimulation *in vitro* verlieren Gedächtnis – Treg ihren Demethylierungsstatus und als Folge wird die Expression von FoxP3 verringert (Hoffmann et al. 2009; Schmidl et al. 2011). Auf die Suppressionskapazität der expandierten Zellen hat dies allerdings keinen signifikanten Einfluss (Ukena et al. 2011a; Arroyo Hornero et al. 2017).

Ein weiterer Marker zur Differenzierung regulatorischer T-Zellen ist CD127. Obwohl es für diesen Marker ein Produkt in GMP Qualität gibt (Peters et al. 2008), sind Zellausbeute nach Isolation und Expansionsrate im Vergleich zur gesamten CD4+CD25+ T-Zellfraktion deutlich geringer (Ukena et al. 2011a). Zudem sind die Zellen nach Expansion effektiver die Proliferation auch hoher Mengen konventioneller T-Zellen zu supprimieren als CD4+CD25+CD127-sortierte Zellen (Ukena et al. 2011a). Für klinische Zwecke ist dieser Aspekt durchaus relevant.

Für eine klinische Anwendung ist das Zusammenspiel regulatorischer T-Zellen und Immunsuppressiva von großer Bedeutung. Dem Kulturmedium wurde zur Expansion der Zellen Rapamycin zugesetzt. Rapamycin fördert die Expansion von Treg, während es die Proliferation von Effektorzellen hemmt (Battaglia et al. 2005). Dieser Effekt wird auch *in vivo* unter Therapie mit Rapamycin deutlich (Battaglia et al. 2006). Im Vergleich zur Therapie mit Calcineurininhibitoren führt die Behandlung zu einem erhöhten Anteil an FoxP3+ Treg, während die Zellen durch Calcineurininhibitoren gehemmt werden (Zhao et al. 2013; Gallon et al. 2015). In Kombination mit Mycophenolat-Mofetil führt die Therapie mit Rapamycin zu einer schnellen Immunrekonstitution, einer erhöhten Anzahl an Treg und damit verringerter GvHD (Peccatori et al. 2015). Rapamycin führt sowohl im Blut, den peripheren Lymphknoten, aber auch im Transplantat selbst zu einem erhöhten Anteil an regulatorischen T-Zellen (Wang et al. 2013). Calcineurininhibitoren wie Ciclosporin A wird ein inhibitorischer Effekt auf Treg nachgesagt (Baan et al. 2005; Wang et al. 2006; Zeiser et al. 2006; Coenen et al. 2007; Ma et al. 2009; Lu et al. 2010; Lim et al. 2010; Miroux et al. 2012), was auf den Einfluss auf die IL-2 Synthese zurückgeführt wird (Wood und Sakaguchi 2003; Kang et al. 2007a). Nur wenige Studien zeigen, dass Ciclosporin A die Anzahl an Treg nicht vermindert, sondern die Expansion in Teilen sogar unterstützt (Meloni et al. 2006). Der positive Effekt von CsA auf die Proliferation

der Treg ist dosisabhängig (Kawai et al. 2005; Brandt et al. 2009), wobei dieser Effekt im Vergleich zur Therapie mit z.B. Rapamycin weniger deutlich ist (Ruggenti et al. 2007; Al-Wedaie et al. 2015). Auch die Applikation von Mycophenolat-Mofetil führt zu unterschiedlichen Ergebnissen im Hinblick auf den Einfluss auf regulatorische T-Zellen.

Patienten, die von Calcineurininhibitoren auf MMF umgestellt werden, weisen innerhalb von 6 Monaten eine erhöhte Anzahl an Treg auf (Demirkiran et al. 2009). Zusätzlich kann MMF die negativen Effekte von CsA auf Treg ausbalancieren, während Glukokortikoide dies nicht können (Miroux et al. 2012). Andere Studien weisen jedoch auf eine reduzierte Menge an Treg im transplantierten Gewebe unter MMF-Therapie hin. Gewebeschäden im Transplantat können im Tiermodell in der Folge nicht adäquat repariert werden (Gandolfo et al. 2010). Auch der Effekt von Glukokortikoiden auf regulatorische T-Zellen ist je nach Studie unterschiedlich. *In vitro* wird ein proliferationshemmender Effekt beschrieben (Miroux et al. 2012). *In vivo* kann es unter Therapie mit Steroiden zu reduzierten absoluten und relativen Mengen an Treg kommen (Sbiera et al. 2011; Olsen et al. 2015). Durch eine Kurzzeittherapie mit Dexamethason allein (Chen et al. 2006) oder in Kombination mit IL-2 (Xie et al. 2009) oder unter Behandlung mit Methylprednisolon (Braith et al. 2009) kann es zur selektiven Expansion von Treg kommen. Klinisch haben Glukokortikoide bei Anwendungen für Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (Azab et al. 2008), Asthma bronchiale (Karagiannidis et al. 2004) und multipler Sklerose (Braith et al. 2009) einen fördernden Effekt auf Treg, der in einem erhöhten Anteil an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen in den Patienten resultiert, während u.a. die Synthese von IL-2 durch T_H1 Zellen reduziert wird (Zen et al. 2011). Dabei werden vor allem CD45RA⁻ Gedächtnis-Treg expandiert (Seissler et al. 2012). Allgemein wird durch Glukokortikoide die Expression von FoxP3 mRNA erhöht, wodurch im folgenden mehr Treg generiert werden (Demirkiran et al. 2008). Durch die Möglichkeit die Treg *in vitro* durch Zusatz von Vitamin D3 und Dexamethason (Barrat et al. 2002) oder Fluticason (Peek et al. 2005) zu generieren, handelt es sich bei diesen Zellen wahrscheinlich um Tr1 iTreg (Karagiannidis et al. 2004).

Aufgrund der divergierenden Literatur war eine Untersuchung der Wechselwirkungen von Immunsuppression und regulatorischen T-Zellen wichtig.

Klinischer Verlauf unter adjuvanter Therapie mit nTreg

Der klinische Verlauf nach adoptivem Transfer regulatorischer T-Zellen differierte je nach Treg Dosis oder angewandter Immunsuppression teils signifikant.

Während eine Dosis von nTreg 2:1 das Leben nicht signifikant verlängern konnte, resultierte die Behandlung mit nTreg 1:1 und 1:2 das Überleben signifikant. Das Gewicht, als einzig objektiver Parameter war trotz längeren Überlebens nur unter einer Dosierung von nTreg 1:2

signifikant besser. Der klinische Verlauf mit nTreg 2:1 ähnelte dem Verlauf der erkrankten Kontrolltiere. Die Applikation von $3 \cdot 10^6$ nTreg allein hatte keinerlei negativen Einfluss auf Überleben und klinischen Verlauf. Histologisch ergaben sich keine Hinweise auf Entzündung oder Infiltration humaner Zellen in die Gewebe.

In weiteren allogenen und xenogenen Tiermodellen förderte die Applikation frischer und expandierter Treg das Überleben der Tiere nach Stammzelltransplantation (Hoffmann et al. 2002; Taylor 2002; Edinger et al. 2003; Trenado et al. 2003; Mutis et al. 2006; Cao et al. 2009; Hannon et al. 2014). Dabei sind expandierte Treg effektiver als frisch isolierte (Wu et al. 2008; Singh et al. 2012).

Wichtig für einen erfolgreichen adoptiven Transfer regulatorischer T-Zellen ist der Zeitpunkt der Applikation. Werden die Zellen einige Tage vor Transplantation der Stammzellen infundiert, überlebt ein Großteil der Patienten ohne zusätzliche Immunsuppression (Di Ianni et al. 2011a). Die Zellen fördern eine schnelle Immunrestitution und CMV-Erkrankungen werden deutlich vermindert (Di Ianni et al. 2011a). Bei einer bereits eingesetzten und progressiv verlaufenden akuten GvHD können die Zellen die Symptome nicht mehr mindern und die Erkrankung schreitet weiter fort (Trzonkowski et al. 2009).

Effektorzellen migrieren nach Transplantation sehr schnell zum Ort der Inflammation. Wenn die Entzündung des Gewebes bereits vorangeschritten ist, wird das Verhältnis von Treg / Effektorzellen zu Gunsten der letzteren verschoben. In einem inflammatorischen Milieu spielen Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ eine große Rolle. Diese können die Funktion von Treg mindern (Nie et al. 2013). Ohne Entzündung wird hingegen die Prägung und Proliferation von Treg gefördert. Um das Verhältnis von Treg zu Effektorzellen positiv zu beeinflussen müssen Treg mindestens um den Zeitpunkt der Transplantation appliziert werden (Govender et al. 2014).

Durch die zeitgleiche Applikation von Treg und Effektorzellen nehmen die Zellen in der frühen Phase der Immunantwort, der Prägungsphase (*priming* Phase) Einfluss auf die Effektorzellen, während die Effektivität bei späterem Zelltransfer, zum Zeitpunkt der Effektorphase, deutlich gemindert wird (Mavin et al. 2012). Repetitive Gaben bringen im Vergleich zur Einzelapplikation keinen Vorteil (Brunstein et al. 2011b).

Für eine Monotherapie mit nTreg müssen hohe Zellmengen generiert werden (mindestens $3 \cdot 10^6$ Treg/kg) (Brunstein et al. 2011b). Diese Zellmengen *ex vivo* zu generieren ist schwierig und eine Alternative zur Monotherapie ist die Kombinationstherapie aus nTreg und Immunsuppression, um die Zellen *in vivo* zu expandieren.

Der Einfluss der Immunsuppressiva Ciclosporin A, Mycophenolat-Mofetil und Methylprednisolon differiert zwischen den einzelnen Studien.

In dieser Arbeit überlebten Tiere unter Monotherapie mit CsA und Methylprednisolon ausnahmslos bis zum Versuchsende. Die Behandlung mit MMF resultierte in der vorzeitigen Euthanasie von zwei der fünf Tiere aufgrund massiven Gewichtsverlusts von mehr als 20%.

Eines der Tiere entwickelte außerdem massive gastrointestinale Symptome (Anorexie und Diarrhö). Das klinische Erscheinungsbild und der mittlere Gewichtsverlauf über die Zeit waren unter Behandlung mit Methylprednisolon sehr gut. Tiere unter CsA Therapie wiesen hingegen im Mittel ein verringertes mittleres Gewicht und einen vergleichsweise mäßigen klinischen Allgemeinzustand auf. Die Kombinationstherapie führte dagegen zu einem deutlich besseren Erscheinungsbild und Gewicht über die Zeit. Die Behandlung resultierte vor allem in Leber und Lunge, weniger in Knochenmark und Milz in einer deutlich erhöhten Zahl an FoxP3+ Treg. Die Proliferation der Treg wurde durch CsA nicht negativ beeinflusst.

Der Einfluss von Ciclosporin A wird vorwiegend als inhibitorisch beschrieben. Daneben gibt es auch Untersuchungen die einen fördernden Effekt von CsA auf nTreg *in vivo* beschreiben (Meloni et al. 2006). Dabei scheinen regulatorische T-Zellen im Vergleich zu konventionellen T-Zellen resistenter gegen die Wirkung von Ciclosporin A zu sein (Ruppert et al. 2015).

Weitere *in vivo* Untersuchungen zeigen außerdem, dass die immunsuppressive Therapie mit CsA im Vergleich zu Rapamycin keinen negativen Einfluss auf *ex vivo* expandierte applizierte Treg hat (Brunstein et al. 2011b).

Während klinische Erscheinung, mittleres Gewicht und Anteil an FoxP3+ T-Zellen unter Kombinationstherapie mit CsA im Vergleich zur Monotherapie verbessert werden konnten, resultierte die Kombinationsbehandlung aus Pred. und nTreg in einer deutlichen Verschlechterung des Verlaufs im Vergleich zur Monotherapie mit Methylprednisolon. Drei Tiere verstarben, zwei davon um den Zeitpunkt herum, an dem auch unbehandelte, erkrankte Tiere euthanasiert wurden. Vor allem in der Leber wurde der prozentuale Anteil an FoxP3+ T-Zellen im Vergleich zur Monotherapie deutlich reduziert. Das Verhältnis von CD45 zu FoxP3+ Zellen wurde unter Kombinationstherapie verschlechtert. Zudem wurde die Proliferation von Treg in der Leber durch die Behandlung Pred./nTreg im Vergleich zur Monotherapie deutlich reduziert. Die Leber ist eines der Hauptzielorgane einer akuten GvHD. Das Ausmaß der Leberbeteiligung im Verlauf der Erkrankung bestimmt maßgeblich den klinischen Verlauf (Arai et al. 2016). Die Effekte von Steroiden auf Treg sind je nach Studie unterschiedlich beschrieben.

Generell wird durch Glukokortikoide die Proliferation durch Hochregulation von CD25 auf Treg und durch vermehrte Expression von FoxP3 mRNA gesteigert, während sowohl Th1 als auch Th2 Zellen vermehrt in Apoptose übergehen (Demirkiran et al. 2008; Zen et al. 2011). Patienten, die aufgrund von Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematoides o.a. unter Glukokortikoidtherapie stehen wiesen erhöhte Konzentration an Treg im Blut auf (Suárez et al. 2006; Azab et al. 2008; Braitch et al. 2009). Dabei scheint es sich bei diesen Zellen um Tr1 iTreg zu handeln (Karagiannidis et al. 2004), da diese *in vitro* unter Zusatz von Vitamin D3 und Dexamethason (Barrat et al. 2002) oder Fluticason (Peek et al. 2005) generiert werden können. Wenn der positive Effekt von Glukokortikoiden vor allem in der de

novo Generierung regulatorischer T-Zellen aus non-Treg bestehen, sind dendritische Zellen essentiell. Sie können Treg aus konventionellen T-Zellen durch die Produktion von IL-10 induzieren (Franchimont 2004). Allerdings zeigen auch andere Untersuchungen, dass es *in vivo* unter Therapie mit Steroiden zu reduzierten absoluten und relativen Mengen an Treg kommt (Sbiera et al. 2011; Olsen et al. 2015).

Unklar bleibt, warum die Kombinationstherapie zu diesem schlechten klinischen Verlauf und der reduzierten Menge an Treg im Gewebe führte. Für klinische Anwendungen ist dieses Ergebnis allerdings sehr wichtig. Ebenso wichtig ist die Beobachtung, dass Ciclosporin A, sowohl allein, als auch in Kombination mit nTreg einen proliferationsfördernden Effekt hat, der klinisch für eine endogene Expansion der Zellen genutzt werden kann.

Hauptzielorgane, klinischer Verlauf und therapeutische Bedeutung bei GvHD

Als Hauptzielorgane einer akuten GvHD gelten Haut, Darm und Leber (Sung und Chao 2013).

Tiere, die nach Transfer von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs an einer akuten GvHD erkrankten wiesen eine hochgradige Infiltration der Leber mit humanen Zellen auf. Die Beteiligung der Leber war maßgeblich am Verlauf der Erkrankung beteiligt. Je höher der pathologische Bewertungsscore, desto schwerer die Erkrankung. Dabei waren die Veränderungen vor allem durch Infiltration humaner Zellen periportal und im Bereich der Gallengänge gekennzeichnet. Die Beteiligung der Leber bestimmt maßgeblich den Verlauf und die Überlebensrate. Die Prognose bei einer Beteiligung der Leber für den Patienten ist schlechter (Arai et al. 2016). Im Zuge einer akuten GvHD ist die Leber fast nie allein betroffen. Sie ist fast immer assoziiert mit Darm- und mehr noch mit Hautveränderungen (Kambham et al. 2014; McDonald 2016). Die Leber kann auch bei einer chronischen GvHD, besonders bei schweren Formen betroffen sein (Arora et al. 2016; Grube et al. 2016; Salomao et al. 2016). Eine akute Leber-GvHD ist ein Risikofaktor für eine folgende chronische Erkrankung und der Übergang ist mitunter fließend (Kambham et al. 2014; Arai et al. 2016). Differentialdiagnostisch müssen Viruserkrankungen mit Hepatitis, Tumorerkrankungen, das sinusoidale Obstruktionssyndrom und Eisenüberladung bei klinischen Anzeichen einer Lebererkrankung in Betracht gezogen werden (Kim et al. 2000; Matsukuma et al. 2016; Salomao et al. 2016). Risikofaktoren, die eine Leber GvHD begünstigen sind vor allem Hepatitis Antikörper und bereits bestehende Organdysfunktionen (Arai et al. 2016).

Zur sicheren Diagnosestellung dient eine Leberbiopsie. Bei einer akuten GvHD sind vor allem die Gallengänge betroffen. Seltener finden sich periportale oder lobuläre Infiltrationen mit Lymphozyten. Bei fortschreitender Erkrankung kann im weiteren auch eine Fibrose des Gewebes diagnostiziert werden (Matsukuma et al. 2016; Salomao et al. 2016). Die Therapie

muss beim Vorliegen einer akuten GvHD der Leber entsprechend angepasst werden, um weitere hepatotoxische Einflüsse durch Medikamente möglichst zu reduzieren (McDonald 2016). Regulatorische T-Zellen mit bestimmten Chemokinrezeptoren wie CXCR3 können selektiv in bestimmte Organe migrieren (Ukena et al. 2011b). Bei Applikation dieser organ-spezifischen Treg können der Verlauf und die histopathologischen Veränderungen in der Leber verbessert werden (Hasegawa et al. 2008).

Klassischerweise sind auch Haut und Darm von einer akuten GvHD betroffen. Vor allem Veränderungen der Haut werden beim Großteil der Patienten festgestellt (Arai et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit konnten in beiden Geweben keinerlei pathologische Veränderungen festgestellt werden. Sowohl die subletale Bestrahlung, als auch der genetische Hintergrund der Versuchstiere kann zu dieser veränderten Pathologie beigetragen haben. Der verwendete Tierstamm zeichnet sich durch einen Mangel an B-Zellen und eine verringerte Funktion dendritischer Zellen aus. Diese Zellen sind als APCs essentiell zur Initiierung der Erkrankung (Shlomchik et al. 1999; Clark und Chakraverty 2002; Stenger et al. 2012). Auch nicht-Antigenpräsentierende Zellen, wie die Peyer'schen Platten im Darm, die bei diesem Stamm hypoplastisch sind, sind für die Entstehung einer akuten GvHD wichtig (Koyama et al. 2012) und die Depletion von APCs kann die Pathologie einer akuten GvHD beeinflussen (Zhang et al. 2002).

Die Milz als sekundäres Immunorgan wies bei erkrankten Tieren in unseren Experimenten eine hohe bis sehr hohe Infiltration mit humanen Zellen auf. Für die Milz ist keine spezielle Pathologie im Zuge einer akuten GvHD beschrieben. Frühe Untersuchungen haben histologisch keinen signifikanten Unterschied in der Lymphozyteninfiltration bei Patienten mit GvHD im Vergleich zu gesunden Patienten nach Knochenmarkstransplantation festgestellt (Dilly und Sloane 1988). Nach Präkonditionierung nimmt die Zellularität in der Milz zunächst ab. Nach drei Wochen regeneriert sich das Gewebe und weist individuell unterschiedlich hohe Mengen an Lymphozyten in der weißen Pulpa auf. Die rote Pulpa kann deutliche Anzeichen extramedullärer Hämatopoese aufweisen (Al-Hashmi et al. 2011). Allgemein scheint der Einfluss der Milz im Hinblick auf Morbidität und Mortalität der Erkrankung keinen signifikanten Einfluss zu haben (Clouthier et al. 2002). Auch bei einer GvHD nach Organtransplantation ist der Einfluss der Milz auf die Erkrankung nicht eindeutig geklärt (Green und Hind 2016). Auch die Lunge erkrankter Tiere war teils massiv mit humanen Lymphozyten infiltriert. Vor allem perivaskulär und peribronchial, aber auch im Bereich der Alveolen konnten deutliche Veränderungen gesehen werden. Die jeweilige Therapie mit Immunsuppressiva, allein oder in Kombination mit nTreg, sowie die Monotherapie mit nTreg 1:1 und 1:2 konnte das histopathologische Bild im Durchschnitt deutlich verbessern. Die histologischen Befunde entsprechen denen anderer Untersuchungen in xenogenen GvHD Modellen (Hahn et al. 2015).

Die Lunge stellt kein klassisches Zielorgan einer akuten GvHD dar. Trotzdem treten in den ersten 100 Tagen nach Stammzelltransplantation infektiöse und nicht-infektiöse Erkrankungen der Lunge als Folge der Transplantation auf. Dazu zählen neben bakteriellen, viralen und Pilzinfektionen auch das *engraftment syndrome*, alveoläre Hämorrhagien und das idiopathische Pneumoniesyndrom (IPS) (Soubani und Pandya 2010). In der späten Phase (+100 Tage post Tx) spielt vor allem das Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS) eine Rolle. Dabei handelt es sich um eine chronische Entzündung mit folgender Fibrose der Bronchen, welche sich klinisch in einer Atemwegsobstruktion mit verminderter Lungenfunktion darstellt (Nakasone et al. 2013). Akute, sowie vor allem chronische GvHD sind ein Risikofaktor für die Entstehung der Erkrankung (Ditschkowski et al. 2013; Ugai et al. 2015). Im Durchschnitt tritt die BOS 6-12 Monate nach Transplantation auf und betrifft 2-25% der Patienten (Nakasone et al. 2013; Kambham et al. 2014). Die BOS wird als klinische Manifestation einer pulmonalen chronischen GvHD eingestuft (Gronningsaeter et al. 2017).

Durch chronische Inflammation des Gewebes und schlussendlicher Fibrose des Bronchialepithels ist die Erkrankung irreversibel und entsprechend schlecht sind der Therapieerfolg und die Prognose (Ditschkowski et al. 2013; Gronningsaeter et al. 2017).

Wie bei anderen Geweben hängt auch bei der Lunge das Ausmaß der Veränderungen von regulatorischen T-Zellen ab (Salman et al. 2016; Siemeni et al. 2016; Meloni et al. 2004b). Neue Therapieoptionen zur Behandlung refraktärer GvHD nutzen den positiven Effekt von Treg zur Behandlung von BOS. Eine Möglichkeit ist vor allem die extrakorporale Photopherese. Durch die Bestrahlung der Zellen mit UV-A Strahlen wird die Proliferation von Treg gefördert (Brownback et al. 2016). Die Lungenfunktion der betroffenen Patienten stabilisiert oder die Lungenveränderungen sogar rückgängig gemacht werden (Brownback et al. 2016; Del Fante und Perotti 2017). Auch Medikamente, die zur Behandlung anderer obstruktiver Lungenerkrankungen eingesetzt werden, haben einen positiven Einfluss auf Treg. Roflumilast, ein Phosphodiesterasehemmer wird zur Therapie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*; COPD). Neben seinen antiinflammatorischen und antifibrotischen Eigenschaften fördert es auch die Proliferation von Treg im Gewebe (Kim et al. 2016). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich durch die Kombination der verschiedenen Therapieoptionen der Langzeiterfolg nach Transplantation im Hinblick auf die Lungenfunktion verbessern lässt.

Die Nieren erkrankter Tiere waren ebenfalls zum Teil deutlich mit humanen Zellen infiltriert. Die Infiltration war vor allem perivaskulär und peritubulär, aber auch um die Glomeruli konzentriert. Je nach Behandlungsform konnte die Zellmenge im Gewebe im Durchschnitt deutlich reduziert werden. Unter der Behandlung mit Ciclosporin A gab während des Beobachtungszeitraums keinen histopathologischen Hinweis auf Vasculopathien, interstitielle Fibrose oder Tubulopathien. Calcineurininhibitoren vermitteln ihren nephrotoxischen Effekt direkt und

indirekt. Direkt wird der Effekt durch die Vasokonstriktion an den Arteriolen der Niere vermittelt. Es kommt zur Hypoperfusion des Gewebes und damit zum Nierenschaden (Lanese und Conger 1993; Krishnappa et al. 2016; Kemmner et al. 2016).

Indirekt wird der Effekt durch Mikroangiopathien hervorgerufen, die wiederum durch CsA Therapie entstehen können (Elsallabi et al. 2016; Krishnappa et al. 2016).

Klassischerweise stellt die Niere kein primäres Zielorgan einer akuten GvHD dar.

Im allogenen Stammzelltransplantationsmodell der Ratte konnte jedoch an Tag +28 eine Beteiligung der Niere im Verlauf der akuten GvHD nachweisen. Histologisch waren die Veränderungen in einer vermehrten Infiltration mononukleärer Zellen im Interstitium bis hinein in das peritubuläre Gewebe (Higo et al. 2014). Auch einzelne Fallberichte von Patienten belegen Nierenveränderungen im Zusammenhang mit akuter GvHD (Homma et al. 2005). Trotz dieser Untersuchungen gilt weiterhin die Auffassung, dass eine akute GvHD keine direkten Nierenschäden hervorruft (Higo et al. 2014). Sie stellt jedoch einen Risikofaktor für akute und chronische Nierenerkrankungen dar (Mori et al. 2012). Andere Faktoren, die die Entstehung einer akuten Niereninsuffizienz begünstigen sind Sepsis, die Applikation nephrotoxischer Medikamente wie Calcineurininhibitoren, Tumorlysesyndrom, thrombotische Mikroangiopathien und Toxizität durch die Infusion des Stammzelltransplantats (Kogon und Hingorani 2010; Krishnappa et al. 2016; Elsallabi et al. 2016). Die Inzidenz einer akuten Niereninsuffizienz nach Stammzelltransplantation liegt bei bis zu 70% (Kogon und Hingorani 2010). Die Therapie richtet sich nach der zugrundeliegenden Ursache der Erkrankung (Krishnappa et al. 2016).

Auch chronische Nierenerkrankungen sind im Zusammenhang mit GvHD möglich. Hierbei spielt vor allem die chronische GvHD und die Verminderung der Immunsuppression eine prädominante Rolle. Durch Glomerulopathien kann es zur Entstehung eines nephrotischen Syndroms kommen (Brukamp et al. 2006; Hiramatsu et al. 2016).

Schlussfolgerung und Ausblicke für die Zukunft

Xenogene Transplantationsmodelle eignen sich zur Untersuchung medizinischer Fragestellungen. Als Limitation von Tiermodellen ist aber immer die Tatsache anzuführen, dass ein experimentelles Modell, vor allem mit genetisch veränderten Tieren in einer nicht-immunogenen Umgebung, nie alle Aspekte komplexer immunologischer Vorgänge im humanen System berücksichtigen und widerspiegeln kann.

Nichts desto trotz ist das hier verwendete System mit NOD/SCID II-2Rgamma^{-/-} Mäusen ist belastbares Modell, um neue, erweiterte Therapieoptionen zur Behandlung einer akuten GvHD zu untersuchen.

Mit einer geringen Menge an humanen PBMCs konnte bei den Versuchstieren eine klinisch manifeste GvHD induziert werden. Auch wenn weder Haut, noch Darm mit humanen Zellen infiltriert waren und histologisch keinerlei Anzeichen auf eine Inflammation vorlagen, spiegelten die anderen Organe (Leber, Lunge, Milz und Niere) typische Veränderungen der Erkrankung wider. Dabei waren vor allem die Infiltration und Inflammation der Leber assoziiert mit klinischem Verlauf und Überleben der Tiere. Dies steht im Einklang mit Patientendaten, die eine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer akuten GvHD der Leber und dem Überleben beschreiben (Arai et al. 2016). Vor allem der Anteil an FoxP3⁺ Treg im Gewebe hat einen Einfluss auf den klinischen Verlauf und das Überleben. Dies beweist, dass regulatorische T-Zellen maßgeblich am Verlauf nach Zelltransplantation beteiligt sind.

Die Menge an regulatorischen T-Zellen im Gewebe wird u.a. durch die Wahl der Immunsuppression beeinflusst. Vor allem die Behandlung mit Ciclosporin A, allein und in Kombination resultierte in einer signifikant erhöhten Menge an Treg im Lebergewebe. Dies unterstreicht, dass CsA nicht ausschließlich, wie in der Literatur vorwiegend angegeben, inhibitorische, sondern vielmehr synergistische Effekte mit Treg besitzt. Diese Ergebnisse sind es wert weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine eventuell klinische Anwendung durchzuführen. Hingegen führt die Kombinationstherapie aus Methylprednisolon und nTreg zu einem schlechteren Verlauf als unter Monotherapie. Einige Tiere entwickelten unter Therapie Symptome einer akuten GvHD. Für eine klinische Anwendung ist diese Kombination nach den vorliegenden Daten nicht geeignet.

Für zukünftige Untersuchungen sollten weitere Immunsuppressiva wie Rapamycin für eine Kombinationstherapie mit nTreg in Betracht gezogen werden. Rapamycin fördert dosisabhängig sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation regulatorischer T-Zellen (Battaglia et al. 2005; Battaglia et al. 2006). Dies ist ein sehr guter Ansatzpunkt um die Monotherapie mit einer adjuvanten Treg Therapie zu kombinieren.

Auch der Einsatz von IL-2 kann zur endogenen Expansion von Treg in Betracht gezogen werden. IL-2 führt zur Proliferation von ICOS⁺ Treg (Sim et al. 2014). Diese Zellen sind eine spezielle Unterpopulation regulatorischer T-Zellen und sind *in vitro* auch in einer geringeren Dosis im Vergleich zu Effektorzellen sehr suppressiv (Ukena et al. 2011a).

Regulatorische T-Zellen besitzen eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren. Je nach Expression wird darüber die Migration in das Gewebe ermöglicht (Wei et al. 2006; Campbell und Koch 2011). Es gibt damit also organspezifische Treg. Für eine klinische Anwendung, besonders im Zusammenhang mit der Transplantation solider Organe kann dies eventuell therapeutisch genutzt werden (McDonald-Hyman et al. 2016). Auch im Zusammenhang mit GvHD kann dies von Bedeutung sein. So spielt die Expression der Chemokinrezeptoren CCR5, CXCR3, CCR3, CXCR6 und CCR1 eine wichtige Rolle. Die Expression dieser Rezeptoren ermöglicht Treg die Migration in entzündetes Gewebe. Bei Patienten, bei den diese

Rezeptoren auf den Treg herunterreguliert sind, kommt es vergleichsweise zu schwereren GvHD Verläufen, durch z.B. die verminderte Menge an FoxP3+ T-Zellen in der Darmmukosa (Ukena et al. 2011b). Die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren wird durch die Expansion der Zellen eventuell gemindert (Chakraborty et al. 2012), wobei auch die Wahl des Kulturmediums entscheidend ist (Velaga et al. 2017). Hingegen führt die endogene Expansion der Treg unter IL-2 Therapie nicht zur Verminderung der Expression der Chemokinrezeptoren. Die Migration der Zellen wird damit nicht negativ beeinflusst (Jeffery et al. 2017).

Die Kombination der verschiedenen Therapieansätze kann den klinischen Verlauf und das Überleben der Patienten zukünftig eventuell deutlich verbessern.

Trotz wichtiger neuer Erkenntnisse bleiben einige Fragen unbeantwortet. Es ist unklar, warum die Kombinationstherapie mit Methylprednisolon und nTreg sich bzgl. des klinischen Verlaufs, des Überlebens und der Menge an FoxP3+ T-Zellen in der Leber so deutlich von der Monotherapie unterscheidet.

Es ist auch nicht geklärt, warum weder die Haut noch der Darm Anzeichen einer akuten GvHD aufwies. Beim Patienten weist ein Großteil der Patienten Hautsymptome bei einer akuten GvHD auf (Arai et al. 2016). Für die Kernaussagen dieser Arbeit spielt dieser Aspekt aber sicherlich eine untergeordnete Rolle. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen sind sicher, dass der Transfer regulatorischer T-Zellen risikofrei ist und eine Therapie mit Ciclosporin A, sowohl allein, aber vor allem in Kombination mit nTreg zur Proliferation FoxP3+ T-Zellen, vor allem in der Leber führt, während die Kombinationstherapie aus Glukokortikoiden und nTreg den klinischen Verlauf maßgeblich negativ beeinflusst.

Die Therapie mit regulatorischen T-Zellen im Zusammenhang mit Stammzelltransplantation hat bereits bei einigen Patienten kleinerer Studien positive Effekte für Patienten erzielen können. Da die Monotherapie mit nTreg aufgrund der hohen benötigten Zellzahl eher nicht standardmäßig Einzug in die klinische Behandlung halten wird, richtet sich der Fokus vor allem auf die Kombination mit anderen Medikamenten. Diese sollen die Proliferation der Zellen *in vivo* nicht hemmen, sondern im Idealfall die endogene Expansion der Zellen fördern. Wie dieses Ziel eventuell erreicht werden kann, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Tierzahl, sowie einem längeren Beobachtungszeitraum sind dafür notwendig. Auch sollte die Kombination unterschiedlicher Immunsuppressiva im Zusammenspiel mit regulatorischen T-Zellen untersucht werden, da viele Patienten mit mehr als einem Medikament behandelt werden.

7. Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen als adjuvante Therapie der akuten Graft versus Host Erkrankung im xenogenen Maus-Modell

Allogene Stammzelltransplantationen werden zur Therapie maligner und nicht-maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems genutzt. Die Zahl der Transplantationen ist über die letzten Jahre kontinuierlich gestiegen. Trotz intensiver Forschung und Weiterentwicklung sind akute und chronische Abstoßungsreaktionen weiterhin maßgeblich für den Erfolg einer Stammzelltransplantation limitierend. Die klassische Immunsuppression kann Patienten oft nur unzureichend vor der Erkrankung schützen. Zudem ist die Behandlung mit einer Reihe unerwünschter Wirkungen verbunden.

Regulatorische T-Zellen sind natürliche Immunmodulatoren. Sowohl in experimentellen wie auch klinischen Untersuchungen konnte der Zusammenhang zwischen regulatorischen T-Zellen und dem klinischen Verlauf nach Stammzelltransplantation und Transplantation solider Organe gezeigt werden. Für eine eventuelle klinische Anwendung ist neben der Etablierung von Expansionsprotokollen unter GMP-Bedingungen, auch die Untersuchung auf das Zusammenspiel mit konventionellen Immunsuppressiva unerlässlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Applikation von $3 \cdot 10^6$ humanen PBMCs in NOD/SCID II-2Rgamma^{-/-} Mäusen an Tag 0 eine xenogene akute GvHD induziert. Zur weiteren Therapie wurden ab Tag +1 Ciclosporin A, Mycophenolat-Mofetil oder Methylprednisolon sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit $0,5 \cdot 10^6$ polyklonal expandierten nTreg appliziert. Zusätzlich wurden nTreg in verschiedenen Dosierungen ($1,5 \cdot 10^6$, $3 \cdot 10^6$ und $6 \cdot 10^6$) zusammen an Tag 0 mit den humanen PBMCs als Monotherapie ohne zusätzliche Immunsuppression appliziert. Post mortem wurden die Gewebe auf die Infiltration humaner Zellen und den Anteil an FoxP3⁺ Treg untersucht. Histologisch wurden die Organe auf Infiltration und Inflammation untersucht.

Die Behandlung mit Treg als Monotherapie resultierte unter einer Dosis von 1:1 und 1:2 ($3 \cdot 10^6$ und $6 \cdot 10^6$), nicht aber 2:1 ($1,5 \cdot 10^6$) in einer Verbesserung der Überlebensdauer und der klinischen Erscheinung. Überraschenderweise resultierte vor allem die Behandlung mit Ciclosporin A und nTreg in einem verbesserten klinischen Verlauf und verlängerten Überleben. Vor allem in der Leber führte die Therapie zu einem erhöhten Anteil FoxP3⁺ Treg bei einer jedoch insgesamt verringerten Gesamtmenge humaner Zellen im Gewebe. Interessanterweise resultierte die Kombinationstherapie aus Pred./nTreg im Vergleich zur Monotherapie bei einigen Tieren in schnellem Gewichtsverlust, schlechtem klinischen Befinden und reduziertem Anteil an FoxP3⁺ Treg im Gewebe.

Schlussfolgernd führten sowohl die Monotherapie mit nTreg 1:1 und 1:2, nicht aber 2:1 zu einem verlängerten Überleben der Tiere im Vergleich zur erkrankten Kontrolle. Anders, als bisher immer wieder gezeigt, resultierte die Behandlung mit Ciclosporin A, vor allem in Kombination mit nTreg nicht in einer Inhibition der regulatorischen Zellen, sondern in einem erhöhten Anteil FoxP3+ Treg im Gewebe, vor allem in der Leber. Die Ergebnisse legen damit vielmehr einen synergistischen, proliferationssteigernden Effekt von CsA auf Treg nahe. Die Therapie mit MMF, ebenso wie die Kombinationstherapie aus Methylprednisolon und nTreg konnten hingegen nicht ausreichend vor einer akuten GvHD schützen.

8. Summary

Regulatory T-cells as an adjuvant therapy for treatment of acute Graft versus Host Disease in a xenogeneic mouse model

Transplantation of allogeneic stem cells is a curative therapy for malignant and non-malignant disease of the hematopoietic system. The number of transplantations increased continuously over the last years. Despite intensive research and developments in that field acute and chronic rejection remain major limitations for successful stem cell transplantation. Classical immunosuppression is often insufficient to protect patients from disease. Furthermore, the therapy itself is accompanied with several undesired side effects.

Regulatory t-cells are natural immunomodulators. Experimental studies, as well as patient data show a connection between regulatory t-cells and the outcome of stem cell and solid organ transplantation. For possible clinical application, establishing of GMP-grade isolation and expansion protocols as well as the analysis of the interplay of Treg with conventional immunosuppressants is inevitable.

In the present study, xenogeneic acute GvHD was induced by application of $3 \cdot 10^6$ humane PBMCs into NOD/SCID II-2Rgamma $\gamma^{-/-}$ mice on day 0. Further therapy included application of cyclosporine a, mycophenolate-mofetil or methylprednisolone, alone or in combination with $0.5 \cdot 10^6$ polyclonal expanded nTreg, from day +1 on. Additionally, nTreg were injected in different dosages ($1,5 \cdot 10^6$, $3 \cdot 10^6$ und $6 \cdot 10^6$) on day 0 together with the PBMCs as monotherapy without further immunosuppression. Post mortem, tissues were analyzed for infiltration of humane cells and the amount of FoxP3+ Treg. The organs were analyzed for infiltration and inflammation histologically. Therapy with nTreg alone resulted in prolonged survival and increased clinical appearance only with effector cells / nTreg ratio 1:1 and 1:2, but not 2:1. Surprisingly, especially the treatment with CsA plus nTreg resulted in an increased clinical extending and prolonged overall survival. Especially the liver showed an increased number of FoxP3+ Treg with decreased overall cell numbers of humane cells at the same time. Interestingly, the treatment with methylprednisolone plus nTreg resulted in fast deterioration in some animals, marked by fast weight loss and a reduced number of FoxP3+ Treg within the tissue. This picture differed a lot from what could be observed in mice under therapy with methylprednisolone only.

In conclusion, treatment with regulatory t-cells in a ratio 1:1 and 1:2, but not 2:1 compared to diseased animals. Different from what was mostly shown, the treatment with CsA, especially in the combination with nTreg did not inhibit the regulatory cells. Instead it resulted in an increased amount of FoxP3+ Treg within the tissue, especially in the liver. These results show much more a synergistic, proliferation promoting effect of cyclosporine a on Treg. On the

other hand the treatment with MMF, as well as the combination of methylprednisolone and nTreg could not sufficiently protect from an acute GvHD.

9. Literaturverzeichnis

- Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen Recognition and Innate Immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Alarcón, Balbino; Mestre, David; Martínez-Martín, Nuria (2011): The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? In: *Immunology* 133 (4), S. 420–425. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03458.x.
- Albert, Michael H.; Liu, Yan; Anasetti, Claudio; Yu, Xue-Zhong (2005): Antigen-dependent suppression of alloresponses by Foxp3-induced regulatory T cells in transplantation. In: *Eur J Immunol* 35 (9), S. 2598–2607. DOI: 10.1002/eji.200526077.
- Alexander, Christian; Rietschel, Ernst Th. (2001): Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. In: *Journal of Endotoxin Research* 7 (3), S. 167–202. DOI: 10.1177/09680519010070030101.
- Al-Hashmi, Sulaiman; Hassan, Zuzana; Sadeghi, Behnam; Rozell, Björn; Hassan, Moustapha (2011): Dynamics of early histopathological changes in GVHD after busulphan/cyclophosphamide conditioning regimen. In: *Int J Clin Exp Pathol* 4 (6), S. 596–605.
- Ali, Niwa; Flutter, Barry; Sanchez Rodriguez, Robert; Sharif-Paghaleh, Ehsan; Barber, Linda D.; Lombardi, Giovanna; Nestle, Frank O. (2012): Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R γ null mice display a T-effector memory phenotype. In: *PloS one* 7 (8), S. e44219. DOI: 10.1371/journal.pone.0044219.
- Allison, A. C.; Eugui, E. M. (2000): Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. In: *Immunopharmacology* 47 (2-3), S. 85–118.
- Allison, Anthony C. (2000): Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. In: *Immunopharmacology* 47 (2-3), S. 63–83. DOI: 10.1016/S0162-3109(00)00186-7.
- Almeida, Afonso R M; Legrand, Nicolas; Papiernik, Martine; Freitas, Antonio A. (2002): Homeostasis of peripheral CD4 $^{+}$ T cells: IL-2R α and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4 $^{+}$ T cell numbers. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (9), S. 4850–4860.
- Al-Wedaie, Fatima; Farid, Eman; Tabbara, Khaled; El-Agroudy, Amgad E.; Al-Ghareeb, Sumaya M. (2015): T-regulatory cells in chronic rejection versus stable grafts. In: *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* 13 Suppl 1, S. 170–176.
- Annacker, O.; Pimenta-Araujo, R.; Burlen-Defranoux, O.; Barbosa, T. C.; Cumano, A.; Bandeira, A. (2001): CD25 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. In: *J Immunol* 166 (5), S. 3008–3018.
- Annacker, Oliver; Asseman, Chrystelle; Read, Simon; Powrie, Fiona (2003): Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis. In: *Journal of autoimmunity* 20 (4), S. 277–279. DOI: 10.1016/S0896-8411(03)00045-3.
- Anne O'Garra; Lawrence Steinman; Koenraad Gijbels (1997): CD4 $^{+}$ T-cell subsets in autoimmunity. In: *Current Opinion in Immunology* 9 (6), S. 872–883. DOI: 10.1016/S0952-7915(97)80192-6.
- Appay, Victor (2004): The physiological role of cytotoxic CD4 $^{+}$ T-cells: the holy grail? In: *Clinical and Experimental Immunology* 138 (1), S. 10–13. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2004.02605.x.
- Appay, Victor; Zaunders, John J.; Papagno, Laura; Sutton, Julian; Jaramillo, Angel; Waters, Anele et al. (2002): Characterization of CD4 $^{+}$ CTLs ex vivo. In: *J Immunol* 168 (11), S. 5954–5958.

- Arai, Y.; Kanda, J.; Nakasone, H.; Kondo, T.; Uchida, N.; Fukuda, T. et al. (2016): Risk factors and prognosis of hepatic acute GvHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. In: *Bone marrow transplantation* 51 (1), S. 96–102. DOI: 10.1038/bmt.2015.205.
- Archbold, Julia K.; Ely, Lauren K.; Kjer-Nielsen, Lars; Burrows, Scott R.; Rossjohn, Jamie; McCluskey, James; Macdonald, Whitney A. (2008): T cell allorecognition and MHC restriction--A case of Jekyll and Hyde? In: *Molecular immunology* 45 (3), S. 583–598. DOI: 10.1016/j.molimm.2006.05.018.
- Arora, Mukta; Cutler, Corey S.; Jagasia, Madan H.; Pidala, Joseph; Chai, Xiaoyu; Martin, Paul J. et al. (2016): Late Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 22 (3), S. 449–455. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.10.018.
- Arroyo Hornero, Rebeca; Betts, Gareth J.; Sawitzki, Birgit; Vogt, Katrin; Harden, Paul N.; Wood, Kathryn J. (2017): CD45RA Distinguishes CD4+CD25+CD127-/low TSDR Demethylated Regulatory T Cell Subpopulations With Differential Stability and Susceptibility to Tacrolimus-Mediated Inhibition of Suppression. In: *Transplantation* 101 (2), S. 302–309. DOI: 10.1097/TP.0000000000001278.
- Atkinson, K.; Turner, J.; Biggs, J. C.; Dodds, A.; Concannon, A. (1991): An acute pulmonary syndrome possibly representing acute graft-versus-host disease involving the lung interstitium. In: *Bone Marrow Transplant* 8 (3), S. 231–234.
- Attridge, Kesley; Walker, Lucy S K (2014): Homeostasis and function of regulatory T cells (Tregs) in vivo: lessons from TCR-transgenic Tregs. In: *Immunological reviews* 259 (1), S. 23–39. DOI: 10.1111/imr.12165.
- Azab, N. A.; Bassyouni, I. H.; Emad, Y.; Abd El-Wahab, G A; Hamdy, G.; Mashahit, M. A. (2008): CD4+CD25+ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 127 (2), S. 151–157. DOI: 10.1016/j.clim.2007.12.010.
- Azuma, M.; Ito, D.; Yagita, H.; Okumura, K.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L.; Somoza, C. (1993): B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. In: *Nature* 366 (6450), S. 76–79. DOI: 10.1038/366076a0.
- Baan, Carla C.; van der Mast, Barbara J; Klepper, Mariska; Mol, Wendy M.; Peeters, Annetiek M. A.; Korevaar, Sander S. et al. (2005): Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. In: *Transplantation* 80 (1), S. 110–117.
- Bacigalupo, Andrea (2011): Acute graft-versus-host disease. In: *Immunotherapy* 3 (12), S. 1419–1422. DOI: 10.2217/IMT.11.133.
- Ball, L. M.; Egeler, R. M. (2008): Acute GvHD: pathogenesis and classification. In: *Bone marrow transplantation* 41 Suppl 2, S. S58–64. DOI: 10.1038/bmt.2008.56.
- Banchereau, J.; Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392, S. 245–252. DOI: 10.1038/32588.
- Barnes, D W H; Corp, M. J.; Loutit, J. F.; Neal, F. E. (1956): Treatment of Murine Leukaemia with X Rays and Homologous Bone Marrow. In: *Br Med J* 2 (4993), S. 626–627.
- Baron, Udo; Floess, Stefan; Wiczorek, Georg; Baumann, Katrin; Grützkau, Andreas; Dong, Jun et al. (2007): DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. In: *Eur. J. Immunol.* 37 (9), S. 2378–2389. DOI: 10.1002/eji.200737594.
- Barrat, Franck J.; Cua, Daniel J.; Boonstra, André; Richards, David F.; Crain, Chad; Savelkoul, Huub F. et al. (2002): In Vitro Generation of Interleukin 10⁺ and Th2-

- inducing Cytokines. In: *Journal of Experimental Medicine* 195 (5), S. 603–616. DOI: 10.1084/jem.20011629.
- Battaglia, M.; Stabilini, A.; Migliavacca, B.; Horejs-Hoeck, J.; Kaupper, T.; Roncarolo, M.-G. (2006): Rapamycin Promotes Expansion of Functional CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells of Both Healthy Subjects and Type 1 Diabetic Patients. In: *The Journal of Immunology* 177 (12), S. 8338–8347. DOI: 10.4049/jimmunol.177.12.8338.
- Battaglia, Manuela; GIANFRANI, CARMEN; GREGORI, SILVIA; RONCAROLOA, MARIA-GRAZIA (2004): IL-10-Producing T Regulatory Type 1 Cells and Oral Tolerance. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1029 (1), S. 142–153. DOI: 10.1196/annals.1309.031.
- Battaglia, Manuela; Stabilini, Angela; Roncarolo, Maria-Grazia (2005): Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. In: *Blood* 105 (12), S. 4743–4748. DOI: 10.1182/blood-2004-10-3932.
- Beilhack, Andreas; Schulz, Stephan; Baker, Jeanette; Beilhack, Georg F.; Wieland, Courtney B.; Herman, Edward I. et al. (2005): In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. In: *Blood* 106 (3), S. 1113–1122. DOI: 10.1182/blood-2005-02-0509.
- Benichou, Gilles; Yamada, Yohei; Yun, Seok-Hyun; Lin, Charles; Fray, Michael; Tocco, Georges (2011): Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. In: *Immunotherapy* 3 (6), S. 757–770. DOI: 10.2217/imt.11.2.
- Bennett, W. M.; DeMattos, A.; Meyer, M. M.; Andoh, T.; Barry, J. M. (1996): Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. In: *Kidney Int* 50 (4), S. 1089–1100.
- Benoist, Christophe; Mathis, Diane (2012): Treg cells, life history, and diversity. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (9), S. a007021. DOI: 10.1101/cshperspect.a007021.
- Bestard, Oriol; Cruzado, Josep M.; Rama, Ines; Torras, Joan; Goma, Montse; Seron, Daniel et al. (2008): Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19 (10), S. 2020–2026. DOI: 10.1681/ASN.2007111174.
- Bilate, Angelina M.; Lafaille, Juan J. (2012): Induced CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells in Immune Tolerance. In: *Annu. Rev. Immunol.* 30 (1), S. 733–758. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075043.
- Bleakley, Marie; Riddell, Stanley R. (2004): Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (5), S. 371–380. DOI: 10.1038/nrc1365.
- Bluestone, Jeffrey A.; Abbas, Abul K. (2003): Natural versus adaptive regulatory T cells. In: *Nat Rev Immunol* 3 (3), S. 253–257. DOI: 10.1038/nri1032.
- Bolaños-Meade, Javier; Ioffe, Olga; Hey, Jamie C.; Vogelsang, Georgia B.; Akpek, Görgün (2005): Lymphocytic pneumonitis as the manifestation of acute graft-versus-host disease of the lung. In: *American journal of hematology* 79 (2), S. 132–135. DOI: 10.1002/ajh.20315.
- Bozulic, Larry D.; Wen, Yujie; Xu, Hong; Ildstad, Suzanne T. (2011): Evidence that FoxP3+ regulatory T cells may play a role in promoting long-term acceptance of composite tissue allotransplants. In: *Transplantation* 91 (8), S. 908–915. DOI: 10.1097/TP.0b013e31820fafb4.
- Braitich, M.; Harikrishnan, S.; Robins, R. A.; Nichols, C.; Fahey, A. J.; Showe, L.; Constantinescu, C. S. (2009): Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. In: *Acta neurologica Scandinavica* 119 (4), S. 239–245. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2008.01090.x.

- Brandt, C.; Pavlovic, V.; Radbruch, A.; Worm, M.; Baumgrass, R. (2009): Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis. In: *Allergy* 64 (11), S. 1588–1596. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2009.02054.x.
- Braudeau, Cécile; Racape, Maud; Giral, Magali; Louis, Stéphanie; Moreau, Anne; Berthelot, Laureline et al. (2007): Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. In: *Transplant International* 20 (10), S. 845–855. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2007.00537.x.
- Broere, Femke; Apasov, Sergei G.; Sitkovsky, Michail V.; van Eden, Willem: A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity.
- Broere, Femke; Apasov, Sergei G.; Sitkovsky, Michail V.; van Eden, Willem (2011): A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity. In: *Principles of immunopharmacology*: Springer, S. 15–27.
- Brownback, Kyle R.; Simpson, Steven Q.; Pitts, Lucas R.; Polineni, Deepika; McGuirk, Joseph P.; Ganguly, Siddhartha et al. (2016): Effect of extracorporeal photopheresis on lung function decline for severe bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic stem cell transplantation. In: *Journal of clinical apheresis* 31 (4), S. 347–352. DOI: 10.1002/jca.21404.
- Brukamp, Kirsten; Doyle, Alden M.; Bloom, Roy D.; Bunin, Nancy; Tomaszewski, John E.; Cizman, Borut (2006): Nephrotic syndrome after hematopoietic cell transplantation: do glomerular lesions represent renal graft-versus-host disease? In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 1 (4), S. 685–694. DOI: 10.2215/CJN.00380705.
- Brunstein, Claudio G.; Miller, Jeffrey S.; Cao, Qing; McKenna, David H.; Hippen, Keli L.; Curtsinger, Julie et al. (2011a): Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. In: *Blood* 117 (3), S. 1061–1070. DOI: 10.1182/blood-2010-07-293795.
- Brunstein, Claudio G.; Miller, Jeffrey S.; Cao, Qing; McKenna, David H.; Hippen, Keli L.; Curtsinger, Julie et al. (2011b): Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. In: *Blood* 117 (3), S. 1061–1070. DOI: 10.1182/blood-2010-07-293795.
- Buchholz, S.; Ganser, A. (2009): Hämatopoetische Stammzelltransplantation. Indikationen, Grundlagen und Ausblick. In: *Der Internist* 50 (5), S. 572–580. DOI: 10.1007/s00108-008-2273-y.
- Buell, Joseph F.; Gross, Thomas G.; Woodle, E. Steve (2005): Malignancy after transplantation. In: *Transplantation* 80 (2 Suppl), S. S254-64.
- Call, Matthew E.; Wucherpfennig, Kai W. (2004): THE T CELL RECEPTOR: Critical Role of the Membrane Environment in Receptor Assembly and Function. In: *Annu. Rev. Immunol.* 23 (1), S. 101–125. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115625.
- Campbell, Daniel J.; Koch, Meghan A. (2011): Phenotypic and functional specialization of FOXP3(+) regulatory T cells. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (2), S. 119–130. DOI: 10.1038/nri2916.
- Cao, Tinghua; Soto, Allis; Zhou, Wei; Wang, Weihong; Eck, Steven; Walker, Mindi et al. (2009): Ex vivo expanded human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells prevent lethal xenogenic graft versus host disease (GVHD). In: *Cell Immunol* 258 (1), S. 65–71. DOI: 10.1016/j.cellimm.2009.03.013.
- Caramalho, Íris; Nunes-Cabaço, Helena; Foxall, Russell B.; Sousa, Ana E. (2015): Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 395. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00395.
- Carpentier, A.; Conti, F.; Stenard, F.; Aoudjehane, L.; Miroux, C.; Podevin, P. et al. (2009): Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of*

Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 9 (9), S. 2102–2112. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02743.x.

Carrier, Yijun; Yuan, Jing; Kuchroo, Vijay K.; Weiner, Howard L. (2007): Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. In: *J Immunol* 178 (1), S. 179–185.

Cederbom, L.; Hall, H.; Ivars, F. (2000): CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. In: *Eur J Immunol* 30 (6), S. 1538–1543. DOI: 10.1002/1521-4141(200006)30:6<1538::AID-IMMU1538>3.0.CO;2-X.

Chai, Jian-Guo; Coe, David; Chen, Daxin; Simpson, Elizabeth; Dyson, Julian; Scott, Diane (2008): In Vitro Expansion Improves In Vivo Regulation by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. In: *The Journal of Immunology* 180 (2), S. 858–869. DOI: 10.4049/jimmunol.180.2.858.

Chakraborty, Rikhia; Rooney, Cliona; Dotti, Gianpietro; Savoldo, Barbara (2012): Changes in Chemokine Receptor Expression of Regulatory T Cells after Ex Vivo Culture. In: *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 35 (4), S. 329–336. DOI: 10.1097/CJI.0b013e318255adcc.

Chen, Qian; Kim, Yong Chan; Laurence, Arian; Punkosdy, George A.; Shevach, Ethan M. (2011): IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo. In: *J Immunol* 186 (11), S. 6329–6337. DOI: 10.4049/jimmunol.1100061.

Chen, WanJun; Jin, Wenwen; Hardegen, Neil; Lei, Ke-Jian; Li, Li; Marinos, Nancy et al. (2003): Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. In: *The Journal of experimental medicine* 198 (12), S. 1875–1886. DOI: 10.1084/jem.20030152.

Chen, Xin; Oppenheim, Joost J.; Winkler-Pickett, Robin T.; Ortaldo, John R.; Howard, O. M. Zack (2006): Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3+CD4+CD25+ T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. In: *European journal of immunology* 36 (8), S. 2139–2149. DOI: 10.1002/eji.200635873.

Cheng, Guoyan; Yu, Aixin; Dee, Michael J.; Malek, Thomas R. (2013): IL-2R signaling is essential for functional maturation of regulatory T cells during thymic development. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (4), S. 1567–1575. DOI: 10.4049/jimmunol.1201218.

Childs, R.; Clave, E.; Contentin, N.; Jayasekera, D.; Hensel, N.; Leitman, S. et al. (1999): Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. In: *Blood* 94 (9), S. 3234–3241.

Chowdary Venigalla, Ram Kumar; Guttikonda, Padmaja Jayathi; Eckstein, Volker; Ho, Anthony D.; Sertel, Serkan; Lorenz, Hanns-Martin; Tretter, Theresa (2012): Identification of a human Th1-like IFN γ -secreting Treg subtype deriving from effector T cells. In: *Journal of autoimmunity* 39 (4), S. 377–387. DOI: 10.1016/j.jaut.2012.06.004.

Chujo, Daisuke; Nguyen, Thien-Son; Foucat, Emile; Blankenship, Derek; Banchereau, Jacques; Nepom, Gerald T. et al. (2015): Adult-onset type 1 diabetes patients display decreased IGRP-specific Tr1 cells in blood. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 161 (2), S. 270–277. DOI: 10.1016/j.clim.2015.08.014.

Clark, Fiona J.; Chakraverty, Ronjon (2002): Role of Dendritic Cells in Graft-Versus-Host Disease. In: *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 11 (4), S. 601–616. DOI: 10.1089/15258160260194758.

Clouthier, Shawn G.; Ferrara, James L M; Teshima, Takanori (2002): Graft-versus-host disease in the absence of the spleen after allogeneic bone marrow transplantation. In: *Transplantation* 73 (10), S. 1679–1681.

- Coenen, J J A; Koenen, H J P M; van Rijssen, E.; Kasran, A.; Boon, L.; Hilbrands, L. B.; Joosten, I. (2007): Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells. In: *Bone marrow transplantation* 39 (9), S. 537–545. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705628.
- Cohen, J. L.; Trenado, A.; Vasey, D.; Klatzmann, D.; Salomon, B. L. (2002): CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells: New Therapeutics for Graft-Versus-Host Disease. In: *Journal of Experimental Medicine* 196 (3), S. 401–406. DOI: 10.1084/jem.20020090.
- Cooke, K. R.; Krenger, W.; Hill, G.; Martin, T. R.; Kobzik, L.; Brewer, J. et al. (1998): Host reactive donor T cells are associated with lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation. In: *Blood* 92 (7), S. 2571–2580.
- Cooke, K. R.; Yanik, G. (2004): Acute lung injury after allogeneic stem cell transplantation: is the lung a target of acute graft-versus-host disease? In: *Bone marrow transplantation* 34 (9), S. 753–765. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704629.
- Coombes, Janine L.; Siddiqui, Karima R. R.; Arancibia-Cárcamo, Carolina V.; Hall, Jason; Sun, Cheng-Ming; Belkaid, Yasmine; Powrie, Fiona (2007): A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (8), S. 1757–1764. DOI: 10.1084/jem.20070590.
- Copelan, Edward A. (2006): Hematopoietic stem-cell transplantation. In: *N Engl J Med* 354 (17), S. 1813–1826. DOI: 10.1056/NEJMra052638.
- Cottrez, Françoise; Groux, Herve (2004): Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. In: *Transplantation* 77 (1 Suppl), S. S12-5. DOI: 10.1097/01.TP.0000106471.23410.32.
- Crawford, S. W.; Longton, G.; Storb, R. (1993): Acute graft-versus-host disease and the risks for idiopathic pneumonia after marrow transplantation for severe aplastic anemia. In: *Bone Marrow Transplant* 12 (3), S. 225–231.
- Curotto de Lafaille, Maria A; Kutchukhidze, Nino; Shen, Shiqian; Ding, Yi; Yee, Herman; Lafaille, Juan J. (2008): Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. In: *Immunity* 29 (1), S. 114–126. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.05.010.
- Curotto de Lafaille, Maria A; Lafaille, Juan J. (2009): Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? In: *Immunity* 30 (5), S. 626–635. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.05.002.
- Danby, R. D.; Zhang, W.; Medd, P.; Littlewood, T. J.; Peniket, A.; Rocha, V.; Roberts, D. J. (2015): High proportions of regulatory T cells in PBSC grafts predict improved survival after allogeneic haematopoietic SCT. In: *Bone marrow transplantation*. DOI: 10.1038/bmt.2015.215.
- Davis, Mark M.; Bjorkman, Pamela J. (1988): T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. In: *Nature* 334 (6181), S. 395–402. DOI: 10.1038/334395a0.
- D'Cruz, Louise M.; Klein, Ludger (2005): Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. In: *Nature immunology* 6 (11), S. 1152–1159. DOI: 10.1038/ni1264.
- de Mattos, Angelo M.; Olyaei, Ali J.; Bennett, William M. (2000): Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: Long-term consequences and challenges for the future. In: *American Journal of Kidney Diseases* 35 (2), S. 333–346. DOI: 10.1016/S0272-6386(00)70348-9.
- Deeg, H. Joachim (2003): New strategies for prevention and treatment of graft-versus-host disease and for induction of graft-versus-leukemia effects. In: *International journal of hematology* 77 (1), S. 15–21.

- Del Fante, Claudia; Perotti, Cesare (2017): Extracorporeal photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after allogeneic stem cell transplant: An emerging therapeutic approach? In: *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. DOI: 10.1016/j.transci.2016.12.010.
- Demirkiran, Ahmet; Hendriks, Thijs K.; Baan, Carla C.; van der Laan, Luc J. W. (2008): Impact of Immunosuppressive Drugs on CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells: Does In Vitro Evidence Translate to the Clinical Setting? In: *Transplantation* 85 (6), S. 783–789. DOI: 10.1097/TP.0b013e318166910b.
- Demirkiran, Ahmet; Kok, Alice; Kwekkeboom, Jaap; Kusters, Johannes G.; Metselaar, Herold J.; Tilanus, Hugo W.; van der Laan, Luc J W (2006): Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. In: *Liver Transpl* 12 (2), S. 277–284. DOI: 10.1002/lt.20612.
- Demirkiran, Ahmet; Sewgobind, Varsha D K D; van der Weijde, Joyce; Kok, Alice; Baan, Carla C.; Kwekkeboom, Jaap et al. (2009): Conversion from calcineurin inhibitor to mycophenolate mofetil-based immunosuppression changes the frequency and phenotype of CD4+FOXP3+ regulatory T cells. In: *Transplantation* 87 (7), S. 1062–1068. DOI: 10.1097/TP.0b013e31819d2032.
- Dempsey, P. W.; Vaidya, S. A.; Cheng, G. (2003): The art of war: Innate and adaptive immune responses. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60 (12), S. 2604–2621. DOI: 10.1007/s00018-003-3180-y.
- Deo, Sudha S.; Mistry, Kejal J.; Kakade, Amol M.; Niphadkar, Pramod V. (2010): Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. In: *Lung India : Official Organ of Indian Chest Society* 27 (2), S. 66–71. DOI: 10.4103/0970-2113.63609.
- Di Ianni, Mauro; Falzetti, Franca; Carotti, Alessandra; Terenzi, Adelmo; Castellino, Flora; Bonifacio, Elisabetta et al. (2011a): Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. In: *Blood* 117 (14), S. 3921–3928. DOI: 10.1182/blood-2010-10-311894.
- Di Ianni, Mauro; Falzetti, Franca; Carotti, Alessandra; Terenzi, Adelmo; Del Papa, Beatrice; Perruccio, Katia et al. (2011b): Immunoselection and clinical use of T regulatory cells in HLA-haploidentical stem cell transplantation. In: *Best practice & research. Clinical haematology* 24 (3), S. 459–466. DOI: 10.1016/j.beha.2011.05.005.
- Dieckmann, D.; Plottner, H.; Berchtold, S.; Berger, T.; Schuler, G. (2001): Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. In: *J Exp Med* 193 (11), S. 1303–1310.
- Dieckmann, Detlef; Bruett, Cord Henrik; Ploettner, Heidi; Lutz, Manfred Bernhard; Schuler, Gerold (2002): Human CD4+CD25+ Regulatory, Contact-dependent T Cells Induce Interleukin 10-producing, Contact-independent Type 1-like Regulatory T Cells. In: *The Journal of experimental medicine* 196 (2), S. 247–253. DOI: 10.1084/jem.20020642.
- Dieterle, A.; Gratwohl, A.; Nizze, H.; Huser, B.; Mihatsch, M. J.; Thiel, G. et al. (1990): Chronic cyclosporine-associated nephrotoxicity in bone marrow transplant patients. In: *Transplantation* 49 (6), S. 1093–1100.
- Dignan, Fiona L.; Clark, Andrew; Amrolia, Persis; Cornish, Jacqueline; Jackson, Graham; Mahendra, Prem et al. (2012): Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. In: *British journal of haematology* 158 (1), S. 30–45. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09129.x.
- Dijke, I.E.a; Caliskan, K.b; Korevaar, S.S.a; Maat, A.P.W.M.c; Zondervan, P.E.d; Balk, A.H.M.M.b et al. (2008): FOXP3 mRNA expression analysis in the peripheral blood and allograft of heart transplant patients. In: *Transplant immunology* 18 (3), S. 250–254. DOI: 10.1016/j.trim.2007.08.001.

- Dilly, S. A.; Sloane, J. P. (1988): Enlargement of the human spleen in graft-versus-host disease. In: *Transplantation* 45 (4), S. 741–743.
- Ditschkowski, M.; Elmaagacli, A. H.; Koldehoff, M.; Gromke, T.; Trenscher, R.; Beelen, D. W. (2013): Bronchiolitis obliterans after allogeneic hematopoietic SCT: further insight—new perspectives? In: *Bone marrow transplantation* 48 (9), S. 1224–1229. DOI: 10.1038/bmt.2013.17.
- Dons, Eefje M.; Raimondi, Giorgio; Cooper, David K. C.; Thomson, Angus W. (2012): Induced Regulatory T cells: Mechanisms of Conversion and Suppressive Potential. In: *Human Immunology* 73 (4), S. 328–334. DOI: 10.1016/j.humimm.2011.12.011.
- Duggleby, Richard Charles; Madrigal, J. Alejandro (2014): Methods of detection of immune reconstitution and T regulatory cells by flow cytometry. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1109, S. 159–186. DOI: 10.1007/978-1-4614-9437-9_10.
- Earle, K. E.; Tang, Q.; Zhou, X.; Liu, W.; Zhu, S.; Bonyhadi, M. L.; Bluestone, J. A. (2005): In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 115 (1), S. 3–9. DOI: 10.1016/j.clim.2005.02.017.
- Edinger, Matthias; Hoffmann, Petra; Ermann, Joerg; Drago, Kathryn; Fathman, C. Garrison; Strober, Samuel; Negrin, Robert S. (2003): CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. In: *Nature medicine* 9 (9), S. 1144–1150. DOI: 10.1038/nm915.
- Elsallabi, Osama; Bhatt, Vijaya Raj; Dhakal, Prajwal; Foster, Kirk W.; Tendulkar, Ketki K. (2016): Hematopoietic Stem Cell Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathy. In: *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 22 (1), S. 12–20. DOI: 10.1177/1076029615598221.
- Fanigliulo, Daniela; Lazzerini, Pietro Enea; Capecchi, Pier Leopoldo; Ulivieri, Cristina; Baldari, Cosima Tatiana; Laghi-Pasini, Franco (2015): Clinically-relevant cyclosporin and rapamycin concentrations enhance regulatory T cell function to a similar extent but with different mechanisms: an in-vitro study in healthy humans. In: *International immunopharmacology* 24 (2), S. 276–284. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.12.021.
- Faria, Ana M C; Weiner, Howard L. (2005): Oral tolerance. In: *Immunological reviews* 206, S. 232–259. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00280.x.
- Felix, Nathan J.; Allen, Paul M. (2007): Specificity of T-cell alloreactivity. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (12), S. 942–953. DOI: 10.1038/nri2200.
- Ferrara, J. L.; Deeg, H. J. (1991): Graft-versus-host disease. In: *N Engl J Med* 324 (10), S. 667–674. DOI: 10.1056/NEJM199103073241005.
- Ferrara, J. L.; Levy, R.; Chao, N. J. (1999): Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. In: *Biol Blood Marrow Transplant* 5 (6), S. 347–356.
- Ferrara, James L.M.: Pathogenic mechanisms of Acute Graft versus Host Disease. In: *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 24, S. 228–234. Online verfügbar unter http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842002000300010&nrm=iso.
- Floess, Stefan; Freyer, Jennifer; Siewert, Christiane; Baron, Udo; Olek, Sven; Polansky, Julia et al. (2007): Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. In: *PLoS Biol* 5 (2), S. e38. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050038.
- Föhse, Lisa; Suffner, Janine; Suhre, Karsten; Wahl, Benjamin; Lindner, Cornelia; Lee, Chun-Wei et al. (2011): High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells. In: *European journal of immunology* 41 (11), S. 3101–3113. DOI: 10.1002/eji.201141986.

- Fontenot, Jason D.; Rasmussen, Jeffrey P.; Gavin, Marc A.; Rudensky, Alexander Y. (2005a): A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. In: *Nature immunology* 6 (11), S. 1142–1151. DOI: 10.1038/ni1263.
- Fontenot, Jason D.; Rasmussen, Jeffrey P.; Gavin, Marc A.; Rudensky, Alexander Y. (2005b): A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. In: *Nature immunology* 6 (11), S. 1142–1151. DOI: 10.1038/ni1263.
- Franchimont, D. (2004): Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1024, S. 124–137. DOI: 10.1196/annals.1321.009.
- Fu, Shuang; Zhang, Nan; Yopp, Adam C.; Chen, Dongmei; Mao, Minwei; Chen, Dan et al. (2004): TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4 (10), S. 1614–1627. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2004.00566.x.
- Gaidot, Aline; Landau, Dan Avi; Martin, Gaëlle Hélène; Bonduelle, Olivia; Grinberg-Bleyer, Yenkel; Matheoud, Diana et al. (2011): Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplantation coadministered with regulatory T cells for GVHD prevention. In: *Blood* 117 (10), S. 2975–2983. DOI: 10.1182/blood-2010-08-299974.
- Gale, R. P. (1985): Graft-versus-host disease. In: *Immunol Rev* 88, S. 193–214.
- Gallon, Lorenzo; Traitanon, Opas; Yu, Yuming; Shi, Bo; Leventhal, Joseph R.; Miller, Joshua et al. (2015): Differential Effects of Calcineurin and Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors on Alloreactive Th1, Th17, and Regulatory T Cells. In: *Transplantation* 99 (9), S. 1774–1784. DOI: 10.1097/TP.0000000000000717.
- Game, David S.; Lechler, Robert I. (2002): Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. In: *Transplant immunology* 10 (2-3), S. 101–108.
- Gandolfo, Maria Teresa; Jang, Hye Ryoung; Bagnasco, Serena M.; Ko, Gang-Jee; Agreda, Patricia; Soloski, Mark J. et al. (2010): Mycophenolate mofetil modifies kidney tubular injury and Foxp3+ regulatory T cell trafficking during recovery from experimental ischemia–reperfusion. In: *Transplant immunology* 23 (1–2), S. 45–52. DOI: 10.1016/j.trim.2010.04.002.
- Gao, Li; Gao, Lei; Gong, Yi; Zhang, Cheng; Chen, Xing-Hua; Zhang, Xi (2013): Reduced-intensity conditioning therapy with fludarabine, idarubicin, busulfan and cytarabine for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. In: *Leukemia research* 37 (11), S. 1482–1487. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.08.016.
- Godfrey, Wayne R.; Ge, Ying G.; Spoden, Darrin J.; Levine, Bruce L.; June, Carl H.; Blazar, Bruce R.; Porter, Stephen B. (2004): In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. In: *Blood* 104 (2), S. 453–461. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0151.
- Golshayan, Dela; Jiang, Shuiping; Tsang, Julia; Garin, Marina I.; Mottet, Christian; Lechler, Robert I. (2007): In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. In: *Blood* 109 (2), S. 827–835. DOI: 10.1182/blood-2006-05-025460.
- Gondek, David C.; Lu, Li-Fan; Quezada, Sergio A.; Sakaguchi, Shimon; Noelle, Randolph J. (2005): Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. In: *The Journal of Immunology* 174 (4), S. 1783–1786. DOI: 10.4049/jimmunol.174.4.1783.

- Govender, Lerisa; Pascual, Manuel; Golshayan, Dela (2014): Potential and limitations of regulatory T-cell therapy in solid organ transplantation. In: *Expert review of clinical immunology* 10 (9), S. 1197–1212. DOI: 10.1586/1744666X.2014.943191.
- Graca, Luis; Cobbold, Stephen P.; Waldmann, Herman (2002): Identification of Regulatory T Cells in Tolerated Allografts. In: *The Journal of experimental medicine* 195 (12), S. 1641–1646. DOI: 10.1084/jem.20012097.
- Graham, R. M. (1994): Cyclosporine: mechanisms of action and toxicity. In: *Cleve Clin J Med* 61 (4), S. 308–313.
- Gray, David (1993): Immunological Memory. In: *Annu. Rev. Immunol.* 11 (1), S. 49–77. DOI: 10.1146/annurev.iy.11.040193.000405.
- Green, Thomas; Hind, Jonathan (2016): Graft-versus-host disease in paediatric solid organ transplantation: A review of the literature. In: *Pediatric Transplantation* 20 (5), S. 607–618. DOI: 10.1111/petr.12721.
- Gregori, S.; Casorati, M.; Amuchastegui, S.; Smiroldo, S.; Davalli, A. M.; Adorini, L. (2001): Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. In: *J Immunol* 167 (4), S. 1945–1953.
- Gregson, Aric L.; Hoji, Aki; Palchevskiy, Vyacheslav; Hu, Scott; Weigt, S. Samuel; Liao, Eileen et al. (2010): Protection against bronchiolitis obliterans syndrome is associated with allograft CCR7+ CD45RA- T regulatory cells. In: *PLoS one* 5 (6), S. e11354. DOI: 10.1371/journal.pone.0011354.
- Gronningsaeter, Ida Sofie; Tsykunova, Galina; Lilleeng, Kyrre; Ahmed, Aymen Bushra; Bruserud, Oystein; Reikvam, Hakon (2017): Bronchiolitis obliterans syndrome in adults after allogeneic stem cell transplantation—pathophysiology, diagnostics and treatment. In: *Expert review of clinical immunology*, S. 1–17. DOI: 10.1080/1744666X.2017.1279053.
- Grossman, William J.; Verbsky, James W.; Tollefsen, Benjamin L.; Kemper, Claudia; Atkinson, John P.; Ley, Timothy J. (2004): Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. In: *Blood* 104 (9), S. 2840–2848. DOI: 10.1182/blood-2004-03-0859.
- Groux, H.; O'Garra, A.; Bigler, M.; Rouleau, M.; Antonenko, S.; de Vries, J E; Roncarolo, M. G. (1997): A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. In: *Nature* 389 (6652), S. 737–742. DOI: 10.1038/39614.
- Grube, Matthias; Holler, Ernst; Weber, Daniela; Holler, Barbara; Herr, Wolfgang; Wolff, Daniel (2016): Risk Factors and Outcome of Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation—Results from a Single-Center Observational Study. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 22 (10), S. 1781–1791. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.06.020.
- Guermonprez, Pierre; Valladeau, Jenny; Zitvogel, Laurence; Thery, Clotilde; Amigorena, Sebastian (2002): ANTIGEN PRESENTATION AND T CELL STIMULATION BY DENDRITIC CELLS. In: *Annu. Rev. Immunol.* 20 (1), S. 621–667. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828.
- Gulbahce, MD, H. Evin; Brown, PhD, FACMG, Charlotte A.; Wick, PhD, Myra; Segall, PhD, Miriam; Jessurun, MD, Jose (2003): Graft-vs-Host Disease After Solid Organ Transplant. In: *American Journal of Clinical Pathology* 119 (4), S. 568–573. DOI: 10.1309/395BX683QFN6CJBC.
- Hahn, Susanne A.; Bellinghausen, Iris; Trinschek, Bettina; Becker, Christian (2015): Translating Treg Therapy in Humanized Mice. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 623. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00623.
- Hahn, Theresa; McCarthy, Philip L.; Zhang, Mei-Jie; Wang, Dan; Arora, Mukta; Frangoul, Haydar et al. (2008): Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte

- antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (35), S. 5728–5734. DOI: 10.1200/JCO.2008.17.6545.
- Hannon, Muriel; Lechanteur, Chantal; Lucas, Sophie; Somja, Joan; Seidel, Laurence; Belle, Ludovic et al. (2014): Infusion of clinical-grade enriched regulatory T cells delays experimental xenogeneic graft-versus-host disease. In: *Transfusion* 54 (2), S. 353–363. DOI: 10.1111/trf.12279.
- Harty, John T.; Tvinnereim, Amy R.; White, Douglas W. (2000): CD8+ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection. In: *Annu. Rev. Immunol.* 18 (1), S. 275–308. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.275.
- Hasegawa, H.; Inoue, A.; Kohno, M.; Lei, J.; Miyazaki, T.; Yoshie, O. et al. (2008): Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver, lung and intestinal damages in a murine acute GVHD model. In: *Gene therapy* 15 (3), S. 171–182. DOI: 10.1038/sj.gt.3303051.
- Hawrylowicz, C. M.; O'Garra, A. (2005): Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. In: *Nat Rev Immunol* 5 (4), S. 271–283. DOI: 10.1038/nri1589.
- Hennecke, Jens; Wiley, Don C. (2001): T Cell Receptor–MHC Interactions up Close. In: *Cell* 104 (1), S. 1–4. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00185-4.
- Hess, Allan D. (2006): Modulation of graft-versus-host disease: role of regulatory T lymphocytes. In: *Biol Blood Marrow Transplant* 12 (1 Suppl 2), S. 13–21. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.11.002.
- Higo, Seiichiro; Shimizu, Akira; Masuda, Yukinari; Nagasaka, Shinya; Kajimoto, Yusuke; Kanzaki, Go et al. (2014): Acute graft-versus-host disease of the kidney in allogeneic rat bone marrow transplantation. In: *PloS one* 9 (12), S. e115399. DOI: 10.1371/journal.pone.0115399.
- Hill, G. R.; Ferrara, J. L. (2000): 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. In: *Blood* 95 (9), S. 2754–2759.
- Hippen, K. L.; Merkel, S. C.; Schirm, D. K.; Nelson, C.; Tennis, N. C.; Riley, J. L. et al. (2011a): Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11 (6), S. 1148–1157. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03558.x.
- Hippen, Keli L.; Merkel, Sarah C.; Schirm, Dawn K.; Sieben, Christine M.; Sumstad, Darin; Kadidlo, Diane M. et al. (2011b): Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity. In: *Sci Transl Med* 3 (83), S. 83ra41. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001809.
- Hiramatsu, Rikako; Ubara, Yoshifumi; Sawa, Naoki; Hasegawa, Eiko; Kawada, Masahiro; Imafuku, Aya et al. (2016): Clinicopathological analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation–related membranous glomerulonephritis. In: *Human pathology* 50, S. 187–194. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.12.005.
- Hodges, E.; Krishna, M. T.; Pickard, C.; Smith, J. L. (2002): Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. In: *Journal of Clinical Pathology* 56 (1), S. 1–11. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1769865/>.
- Hoffmann, P.; Ermann, J.; Edinger, M.; Fathman, C. G.; Strober, S. (2002): Donor-type CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. In: *Journal of Experimental Medicine* 196 (3), S. 389–399. DOI: 10.1084/jem.20020399.

- Hoffmann, Petra; Boeld, Tina J.; Eder, Ruediger; Huehn, Jochen; Floess, Stefan; Wieczorek, Georg et al. (2009): Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. In: *European journal of immunology* 39 (4), S. 1088–1097. DOI: 10.1002/eji.200838904.
- Hoffmann, Petra; Eder, Ruediger; Kunz-Schughart, Leoni A.; Andreesen, Reinhard; Edinger, Matthias (2004): Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. In: *Blood* 104 (3), S. 895–903. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0086.
- Homma, C. I.; Kami, M.; Masuo, S.; Sakiyama, M.; Kojima, R.; Hori, A. et al. (2005): Graft-versus-host disease of the kidney after rapid tapering of cyclosporin following reduced intensity hematopoietic stem cell transplantation. In: *Bone Marrow Transplant* 35 (9), S. 929–930. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1704896>.
- Horowitz, M. M.; Gale, R. P.; Sondel, P. M.; Goldman, J. M.; Kersey, J.; Kolb, H. J. et al. (1990): Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. In: *Blood* 75 (3), S. 555–562.
- Hsieh, Chyi-Song; Lee, Hyang-Mi; Lio, Chan-Wang J. (2012): Selection of regulatory T cells in the thymus. In: *Nat Rev Immunol* 12 (3), S. 157–167. DOI: 10.1038/nri3155.
- Hu, Stephanie W.; Cotliar, Jonathan (2011): Acute graft-versus-host disease following hematopoietic stem-cell transplantation. In: *Dermatol Ther* 24 (4), S. 411–423. DOI: 10.1111/j.1529-8019.2011.01436.x.
- Huang, Z.; Vafai, A.; Lee, J.; Mahalingam, R.; Hayward, A. R. (1992): Specific lysis of targets expressing varicella-zoster virus gpl or gpIV by CD4+ human T-cell clones. In: *J Virol* 66 (5), S. 2664–2669.
- Huehn, Jochen; Polansky, Julia K.; Hamann, Alf (2009): Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? In: *Nat Rev Immunol* 9 (2), S. 83–89. DOI: 10.1038/nri2474.
- Huppa, Johannes B.; Davis, Mark M. (2003): T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. In: *Nat Rev Immunol* 3 (12), S. 973–983. DOI: 10.1038/nri1245.
- Ingulli, Elizabeth (2008): Mechanism of cellular rejection in transplantation. In: *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)* 25 (1), S. 61–74. DOI: 10.1007/s00467-008-1020-x.
- Issa, Fadi; Hester, Joanna; Goto, Ryoichi; Nadig, Satish N.; Goodacre, Tim E.; Wood, Kathryn (2010): Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model. In: *Transplantation* 90 (12), S. 1321–1327. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181ff8772.
- Iwase, Hayato; Kobayashi, Takaaki; Kodera, Yasuhiro; Miwa, Yuko; Kuzuya, Takafumi; Iwasaki, Kenta et al. (2011): Clinical significance of regulatory T-cell-related gene expression in peripheral blood after renal transplantation. In: *Transplantation* 91 (2), S. 191–198. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181ffb4.
- Jagasia, Madan; Arora, Mukta; Flowers, Mary E D; Chao, Nelson J.; McCarthy, Philip L.; Cutler, Corey S. et al. (2012): Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. In: *Blood* 119 (1), S. 296–307. DOI: 10.1182/blood-2011-06-364265.
- Jeffery, Hannah C.; Jeffery, Louisa E.; Lutz, Philipp; Corrigan, Margaret; Webb, Gwilym J.; Hirschfield, Gideon M. et al. (2017): Low dose interleukin-2 promotes STAT5 phosphorylation, Treg survival and CTLA-4 dependent function in autoimmune liver diseases. In: *Clinical and Experimental Immunology*. DOI: 10.1111/cei.12940.
- Jonuleit, H.; Schmitt, E.; Stassen, M.; Tuettenberg, A.; Knop, J.; Enk, A. H. (2001): Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. In: *J Exp Med* 193 (11), S. 1285–1294.

Jonuleit, Helmut; Schmitt, Edgar (2003): The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. In: *J Immunol* 171 (12), S. 6323–6327.

Jonuleit, Helmut; Schmitt, Edgar; Kakirman, Hacer; Stassen, Michael; Knop, Jürgen; Enk, Alexander H. (2002): Infectious Tolerance: Human CD25+ Regulatory T Cells Convey Suppressor Activity to Conventional CD4+ T Helper Cells. In: *The Journal of experimental medicine* 196 (2), S. 255–260. DOI: 10.1084/jem.20020394.

Jordan, M. S.; Boesteanu, A.; Reed, A. J.; Petrone, A. L.; Holenbeck, A. E.; Lerman, M. A. et al. (2001): Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. In: *Nat Immunol* 2 (4), S. 301–306. DOI: 10.1038/86302.

Josefowicz, Steven Z.; Lu, Li-Fan; Rudensky, Alexander Y. (2012): Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. In: *Annu. Rev. Immunol.* 30 (1), S. 531–564. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.

Kambham, Neeraja; Higgins, John P.; Sundram, Uma; Troxell, Megan L. (2014): Hematopoietic stem cell transplantation: graft versus host disease and pathology of gastrointestinal tract, liver, and lung. In: *Advances in anatomic pathology* 21 (5), S. 301–320. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000032.

Kang, H. G.; Zhang, D.; Degauque, N.; Mariat, C.; Alexopoulos, S.; Zheng, X. X. (2007a): Effects of cyclosporine on transplant tolerance: the role of IL-2. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7 (8), S. 1907–1916. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2007.01881.x.

Kang, S. M.; Tang, Q.; Bluestone, J. A. (2007b): CD4+CD25+ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7 (6), S. 1457–1463. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2007.01829.x.

Karagiannidis, Christian; Akdis, Mubeccel; Holopainen, Paivi; Woolley, Niina J.; Hense, Gabriele; Ruckert, Beate et al. (2004): Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 114 (6), S. 1425–1433. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.07.014.

Karczewski, M.; Karczewski, J.; Kostrzewa, A.; Wiktorowicz, K.; Glyda, M. (2009): The Role of Foxp3+ Regulatory T Cells in Kidney Transplantation. In: *Transplantation proceedings* 41 (5), S. 1527–1529. DOI: 10.1016/j.transproceed.2009.03.065.

Kasagi, Shimpei; Zhang, Pin; Che, Li; Abbatiello, Brittany; Maruyama, Takashi; Nakatsukasa, Hiroko et al. (2014): In Vivo–Generated Antigen–Specific Regulatory T Cells Treat Autoimmunity Without Compromising Antibacterial Immune Response. In: *Science translational medicine* 6 (241), S. 241ra78. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008895.

Kawai, Masaru; Kitade, Hiroaki; Mathieu, Chantal; Waer, Mark; Pirenne, Jacques (2005): Inhibitory and Stimulatory Effects of Cyclosporine A on the Development of Regulatory T Cells In Vivo. In: *Transplantation* 79 (9), S. 1073–1077. DOI: 10.1097/01.TP.0000153505.73700.32.

Kemmner, Stephan; Verbeek, Mareike; Heemann, Uwe (2016): Renal dysfunction following bone marrow transplantation. In: *Journal of nephrology*. DOI: 10.1007/s40620-016-0345-y.

Kim, B. K.; Chung, K. W.; Sun, H. S.; Suh, J. G.; Min, W. S.; Kang, C. S. et al. (2000): Liver disease during the first post-transplant year in bone marrow transplantation recipients: retrospective study. In: *Bone marrow transplantation* 26 (2), S. 193–197. DOI: 10.1038/sj.bmt.1702453.

Kim, Sei Won; Lim, Ji Young; Rhee, Chin Kook; Kim, Ji Hye; Park, Chan Kwon; Kim, Tae Jung et al. (2016): Effect of roflumilast, novel phosphodiesterase-4 inhibitor, on lung chronic graft-versus-host disease in mice. In: *Experimental hematology* 44 (5), S. 332–341.e4. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.02.002.

- Kim, Yong Chan; Bhairavabhotla, Ravikiran; Yoon, Jeongheon; Golding, Amit; Thornton, Angela M.; Tran, Dat Q.; Shevach, Ethan M. (2012): Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion. In: *Blood* 119 (12), S. 2810–2818. DOI: 10.1182/blood-2011-09-377895.
- King, Marie; Pearson, Todd; Shultz, Leonard D.; Leif, Jean; Bottino, Rita; Trucco, Massimo et al. (2008): A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 126 (3), S. 303–314. DOI: 10.1016/j.clim.2007.11.001.
- Kleiman, Anna; Tuckermann, Jan P. (2007): Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: Lessons from conditional knockout mice. In: *Glucocorticoid Receptor Action and Selective Glucocorticoid Receptor Agonists (SEGRAs)* 275 (1–2), S. 98–108. DOI: 10.1016/j.mce.2007.05.009.
- Klein, Ludger; Kyewski, Bruno; Allen, Paul M.; Hogquist, Kristin A. (2014): Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). In: *Nat Rev Immunol* 14 (6), S. 377–391. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/nri3667>.
- Kogon, Amy; Hingorani, Sangeeta (2010): Acute kidney injury in hematopoietic cell transplantation. In: *Seminars in nephrology* 30 (6), S. 615–626. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2010.09.009.
- Kohler, Sven; Pascher, Andreas; Junge, Guido; Sauer, Igor M.; Nagy, Marion; Schonemann, Constanze et al. (2008): Graft versus host disease after liver transplantation - a single center experience and review of literature. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 21 (5), S. 441–451. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2007.00625.x.
- Kolar, Paula; Knieke, Karin; Hegel, J Kolja E; Quandt, Dagmar; Burmester, Gerd-R; Hoff, Holger; Brunner-Weinzierl, Monika C. (2009): CTLA-4 (CD152) controls homeostasis and suppressive capacity of regulatory T cells in mice. In: *Arthritis Rheum* 60 (1), S. 123–132. DOI: 10.1002/art.24181.
- Korngold, R.; Sprent, J. (1978): Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. In: *J Exp Med* 148 (6), S. 1687–1698.
- Koyama, Motoko; Kuns, Rachel D.; Olver, Stuart D.; Raffelt, Neil C.; Wilson, Yana A.; Don, Alistair L J et al. (2012): Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. In: *Nature medicine* 18 (1), S. 135–142. DOI: 10.1038/nm.2597.
- Kretschmer, Karsten; Apostolou, Irina; Hawiger, Daniel; Khazaie, Khashayarsha; Nussenzweig, Michel C.; Boehmer, Harald von (2005): Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. In: *Nat Immunol* 6 (12), S. 1219–1227. DOI: 10.1038/ni1265.
- Krishnappa, Vinod; Gupta, Mohit; Manu, Gurusidda; Kwatra, Shivani; Owusu, Osei-Tutu; Raina, Rupesh (2016): Acute Kidney Injury in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Review. In: *International journal of nephrology* 2016, S. 5163789. DOI: 10.1155/2016/5163789.
- Krummel, M. F.; Allison, J. P. (1995): CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. In: *J Exp Med* 182 (2), S. 459–465.
- LaCasce, Ann S. (2006): Post-transplant lymphoproliferative disorders. In: *The oncologist* 11 (6), S. 674–680. DOI: 10.1634/theoncologist.11-6-674.
- Lahl, Katharina; Loddenkemper, Christoph; Drouin, Cathy; Freyer, Jennifer; Arnason, Jon; Eberl, Gerard et al. (2007): Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. In: *J Exp Med* 204 (1), S. 57–63. DOI: 10.1084/jem.20061852.

- Landwehr-Kenzel, S.; Issa, F.; Luu, S-H; Schmuck, M.; Lei, H.; Zobel, A. et al. (2014): Novel GMP-compatible protocol employing an allogeneic B cell bank for clonal expansion of allo-specific natural regulatory T cells. In: *Am J Transplant* 14 (3), S. 594–606. DOI: 10.1111/ajt.12629.
- Lanese, D. M.; Conger, J. D. (1993): Effects of endothelin receptor antagonist on cyclosporine-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles. In: *The Journal of clinical investigation* 91 (5), S. 2144–2149. DOI: 10.1172/JCI116440.
- Lathrop, Stephanie K.; Santacruz, Nicole A.; Pham, Dominic; Luo, Jingqin; Hsieh, Chyi-Song (2008): Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population. In: *The Journal of experimental medicine* 205 (13), S. 3105–3117. DOI: 10.1084/jem.20081359.
- Le, N. T.; Chao, N. (2007): Regulating regulatory T cells. In: *Bone marrow transplantation* 39 (1), S. 1–9. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705529;
- Lenschow, Deborah J.; Walunas, Theresa L.; Bluestone, Jeffrey A. (1996): CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. In: *Annu. Rev. Immunol.* 14 (1), S. 233–258. DOI: 10.1146/annurev.immunol.14.1.233.
- Leventhal, Daniel S.; Gilmore, Dana C.; Berger, Julian M.; Nishi, Saki; Lee, Victoria; Malchow, Sven et al. (2016): Dendritic Cells Coordinate the Development and Homeostasis of Organ-Specific Regulatory T Cells. In: *Immunity* 44 (4), S. 847–859. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.01.025.
- Levine, John E.; Braun, Thomas M.; Harris, Andrew C.; Holler, Ernst; Taylor, Austin; Miller, Holly et al. (2015): A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study. In: *The Lancet. Haematology* 2 (1), S. e21-9. DOI: 10.1016/S2352-3026(14)00035-0.
- Lewkowich, Ian P.; Herman, Nancy S.; Schleifer, Kathleen W.; Dance, Matthew P.; Chen, Brian L.; Dienger, Krista M. et al. (2005): CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (11), S. 1549–1561. DOI: 10.1084/jem.20051506.
- Li, Qing; Zhai, Zhimin; Xu, Xiucan; Shen, Yuanyuan; Zhang, Aimei; Sun, Zimin et al. (2010): Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. In: *Leukemia research* 34 (9), S. 1158–1168. DOI: 10.1016/j.leukres.2010.03.017.
- Li, W.; Carper, K.; Liang, Y.; Zheng, X. X.; Kuhr, C. S.; Reyes, J. D. et al. (2006a): Anti-CD25 mAb Administration Prevents Spontaneous Liver Transplant Tolerance. In: *Transplantation proceedings* 38 (10), S. 3207–3208. DOI: 10.1016/j.transproceed.2006.10.094.
- Li, W.; Carper, K.; Zheng, X. X.; Kuhr, C. S.; Reyes, J. D.; Liang, Y. et al. (2006b): The role of Foxp3+ regulatory T cells in liver transplant tolerance. In: *Transplantation proceedings* 38 (10), S. 3205–3206. DOI: 10.1016/j.transproceed.2006.10.093.
- Li, Ying; Zhao, Xiangdong; Cheng, Donghua; Haga, Hironori; Tsuruyama, Tatsuaki; Wood, Kathryn et al. (2008): The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. In: *Transplantation* 86 (12), S. 1837–1843. DOI: 10.1097/TP.0b013e31818fbc4.
- Lim, Dong-Gyun; Koo, Sun-Kyung; Park, Youn-Hee; Kim, Youngji; Kim, Hye-Mi; Park, Chan-Sik et al. (2010): Impact of immunosuppressants on the therapeutic efficacy of in vitro-expanded CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in allotransplantation. In: *Transplantation* 89 (8), S. 928–936. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181d3c9d4.
- Linsley, P. S.; Brady, W.; Urnes, M.; Grosmaire, L. S.; Damle, N. K.; Ledbetter, J. A. (1991): CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. In: *J Exp Med* 174 (3), S. 561–569.

- Liu, Weihong; Putnam, Amy L.; Xu-Yu, Zhou; Szot, Gregory L.; Lee, Michael R.; Zhu, Shirley et al. (2006): CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. In: *J Exp Med* 203 (7), S. 1701–1711. DOI: 10.1084/jem.20060772.
- Lowe, Thomas; Bhatia, Smita; Somlo, George (2007): Second malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 13 (10), S. 1121–1134. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.07.002.
- Lu, L.; Qian, X. F.; Rao, J. H.; Wang, X. H.; Zheng, S. G.; Zhang, F. (2010): Rapamycin promotes the expansion of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells after liver transplantation. In: *Transplantation proceedings* 42 (5), S. 1755–1757. DOI: 10.1016/j.transproceed.2009.10.008.
- Ma, Anlun; Qi, Shijie; Wang, Ziyang; Massicotte, Eric; Dupuis, Martine; Daloz, Pierre; Chen, Huifang (2009): Combined therapy of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with low-dose sirolimus, but not calcineurin inhibitors, preserves suppressive function of regulatory T cells and prolongs allograft survival in mice. In: *International immunopharmacology* 9 (5), S. 553–563. DOI: 10.1016/j.intimp.2009.01.033.
- Ma, M.; Barnes, G.; Pulliam, J.; Jezek, D.; Baumann, R. J.; Berger, J. R. (2002): CNS angiitis in graft vs host disease. In: *Neurology* 59 (12), S. 1994–1997.
- Mahnke, Yolanda D.; Brodie, Tess M.; Sallusto, Federica; Roederer, Mario; Lugli, Enrico (2013): The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. In: *European journal of immunology* 43 (11), S. 2797–2809. DOI: 10.1002/eji.201343751.
- Malek, Thomas R.; Yu, Aixin; Vincek, Vladimir; Scibelli, Paul; Kong, Lin (2002): CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the non-redundant function of IL-2. In: *Immunity* 17 (2), S. 167–178.
- Marek-Trzonkowska, Natalia; Mysliwec, Malgorzata; Siebert, Janusz; Trzonkowski, Piotr (2013): Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes. In: *Pediatric diabetes* 14 (5), S. 322–332. DOI: 10.1111/pedi.12029.
- Marquet, R. L.; Heystek, G. A. (1981): Induction of suppressor cells by donor-specific blood transfusions and heart transplantation in rats. In: *Transplantation* 31 (4), S. 272–274.
- Marshall, Nikki B.; Swain, Susan L. (2011): Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, S. 954602. DOI: 10.1155/2011/954602.
- Martin, L.a; de la Vega, M.F.a; Bocrine, O.b; Harzallah, A.b; Justrabo, E.a; Rifle, G.b; Mousson, C.b (2007): Detection of Foxp3+ Cells on Biopsies of Kidney Transplants With Early Acute Rejection. In: *Transplantation proceedings* 39 (8), S. 2586–2588. DOI: 10.1016/j.transproceed.2007.08.037.
- Martin, Paul J.; Rizzo, J. Douglas; Wingard, John R.; Ballen, Karen; Curtin, Peter T.; Cutler, Corey et al. (2012): First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 18 (8), S. 1150–1163. DOI: 10.1016/j.bbmt.2012.04.005.
- Masteller, Emma L.; Tang, Qizhi; Bluestone, Jeffrey A. (2006): Antigen-specific regulatory T cells—ex vivo expansion and therapeutic potential. In: *Seminars in immunology* 18 (2), S. 103–110. DOI: 10.1016/j.smim.2006.01.004.
- Matsukuma, Karen E.; Wei, Dongguang; Sun, Kai; Ramsamooj, Rajendra; Chen, Mingyi (2016): Diagnosis and differential diagnosis of hepatic graft versus host disease (GVHD). In: *Journal of gastrointestinal oncology* 7 (Suppl 1), S. S21-31. DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.036.
- Mavin, Emily; Ahmed, Shaheda S.; O'Boyle, Graeme; Turner, Brie; Douglass, Stephen; Norden, Jean et al. (2012): Regulatory T cells inhibit CD8(+) T-cell tissue invasion in human skin

graft-versus-host reactions. In: *Transplantation* 94 (5), S. 456–464. DOI: 10.1097/TP.0b013e31826205d6.

McDonald, George B. (2016): How I treat acute graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract and the liver. In: *Blood* 127 (12), S. 1544–1550. DOI: 10.1182/blood-2015-10-612747.

McDonald-Hyman, Cameron; Flynn, Ryan; Panoskaltis-Mortari, Angela; Peterson, Nicholas; MacDonald, Kelli P A; Hill, Geoffrey R. et al. (2016): Therapeutic regulatory T-cell adoptive transfer ameliorates established murine chronic GVHD in a CXCR5-dependent manner. In: *Blood* 128 (7), S. 1013–1017. DOI: 10.1182/blood-2016-05-715896.

Meloni, F.; Morosini, M.; Solari, N.; Bini, F.; Vitulo, P.; Arbustini, E. et al. (2006): Peripheral CD4+ CD25+ Treg cell expansion in lung transplant recipients is not affected by calcineurin inhibitors. In: *International immunopharmacology* 6 (13-14), S. 2002–2010. DOI: 10.1016/j.intimp.2006.07.019.

Meloni, Federica; Vitulo, Patrizio; Bianco, Alessia Marone; Paschetto, Enrica; Morosini, Monica; Cascina, Alessandro et al. (2004a): Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. In: *Transplantation* 77 (5), S. 762–766.

Meloni, Federica; Vitulo, Patrizio; Bianco, Alessia Marone; Paschetto, Enrica; Morosini, Monica; Cascina, Alessandro et al. (2004b): Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. In: *Transplantation* 77 (5), S. 762–766. Online verfügbar unter http://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2004/03150/Regulatory_CD4_CD25__T_cells_in_the_peripheral.23.aspx.

Meuer, S. C.; Cooper, D. A.; Hodgdon, J. C.; Hussey, R. E.; Fitzgerald, K. A.; Schlossman, S. F.; Reinherz, E. L. (1983): Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes. In: *Science* 222 (4629), S. 1239–1242.

Mielcarek, Marco; Martin, Paul J.; Leisenring, Wendy; Flowers, Mary E D; Maloney, David G.; Sandmaier, Brenda M. et al. (2003): Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. In: *Blood* 102 (2), S. 756–762. DOI: 10.1182/blood-2002-08-2628.

Miklos, Sandra; Mueller, Gunnar; Chang, Yayi; Schubert, Thomas E O; Holler, Ernst; Hildebrandt, Gerhard C. (2008): Pulmonary function changes in experimental graft-versus-host disease of the lung. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 14 (9), S. 1004–1016. DOI: 10.1016/j.bbmt.2008.06.015.

Min, Chang-Ki (2011): The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease: the unveiling of an enigma. In: *The Korean Journal of Hematology* 46 (2), S. 80–87. DOI: 10.5045/kjh.2011.46.2.80.

Minagawa, Kentaro; Yamamori, Motohiro; Katayama, Yoshio; Matsui, Toshimitsu (2012): Mycophenolate mofetil: fully utilizing its benefits for GvHD prophylaxis. In: *International journal of hematology* 96 (1), S. 10–25. DOI: 10.1007/s12185-012-1086-x.

Miroux, C.; Morales, O.; Ouaguia, L.; Aoudjehane, L.; Boleslawski, E.; Pancré, V. et al. (2012): Corticosteroids do not reverse the inhibitory effect of cyclosporine on regulatory T-cell activity in contrast to mycophenolate mofetil. In: *Transplantation proceedings* 44 (9), S. 2834–2839. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.09.091.

Misra, Namita; Bayry, Jagadeesh; Lacroix-Desmazes, Sebastien; Kazatchkine, Michel D.; Kaveri, Srinivasa V. (2004): Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (8), S. 4676–4680.

- Miura, Yuji; Thoburn, Christopher J.; Bright, Emilie C.; Phelps, Michele L.; Shin, Tahiro; Matsui, Elizabeth C. et al. (2004): Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. In: *Blood* 104 (7), S. 2187–2193. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1040.
- Miyara, Makoto; Sakaguchi, Shimon (2007): Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. In: *Trends in molecular medicine* 13 (3), S. 108–116. DOI: 10.1016/j.molmed.2007.01.003.
- Mogensen, Trine H. (2009): Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. In: *Clinical Microbiology Reviews* 22 (2), S. 240–273. DOI: 10.1128/CMR.00046-08.
- Moghadam-Kia, Siamak; Werth, Victoria P. (2010): Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects. In: *International journal of dermatology* 49 (3), S. 239–248. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2009.04322.x.
- Mori, Jinichi; Ohashi, Kazuteru; Yamaguchi, Takuhiro; Ando, Minoru; Hirashima, Yuka; Kobayashi, Takeshi et al. (2012): Risk assessment for acute kidney injury after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation based on Acute Kidney Injury Network criteria. In: *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 51 (16), S. 2105–2110.
- Mutis, Tuna; van Rijn, Rozemarijn S; Simonetti, Elles R.; Aarts-Riemens, Tineke; Emmelot, Maarten E.; van Bloois, Louis et al. (2006): Human regulatory T cells control xenogeneic graft-versus-host disease induced by autologous T cells in RAG2-/-gammac-/- immunodeficient mice. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (18), S. 5520–5525. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0035.
- Nadig, Satish N.; Wieckiewicz, Joanna; Wu, Douglas C.; Warnecke, Gregor; Zhang, Wei; Luo, Shiqiao et al. (2010): In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. In: *Nature medicine* 16 (7), S. 809–813. DOI: 10.1038/nm.2154.
- Nagler, Arnon; Rocha, Vanderson; Labopin, Myriam; Unal, Ali; Ben Othman, Tarek; Campos, Antonio et al. (2013): Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for acute myeloid leukemia in remission: comparison of intravenous busulfan plus cyclophosphamide (Cy) versus total-body irradiation plus Cy as conditioning regimen--a report from the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation. In: *J Clin Oncol* 31 (28), S. 3549–3556. DOI: 10.1200/JCO.2013.48.8114.
- Nakasone, Hideki; Kanda, Junya; Yano, Shingo; Atsuta, Yoshiko; Ago, Hiroatsu; Fukuda, Takahiro et al. (2013): A case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 26 (6), S. 631–639. DOI: 10.1111/tri.12093.
- Neefjes, Jacques; Jongema, Marlieke L. M.; Paul, Petra; Bakke, Oddmund (2011): Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. In: *Nat Rev Immunol* 11 (12), S. 823–836. DOI: 10.1038/nri3084.
- Nguyen, Vu H.; Shashidhar, Sumana; Chang, Daisy S.; Ho, Lena; Kambham, Neeraja; Bachmann, Michael et al. (2008): The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. In: *Blood* 111 (2), S. 945–953. DOI: 10.1182/blood-2007-07-103895.
- Nie, Hong; Zheng, Yingxia; Li, Runsheng; Guo, Taylor B.; He, Dongyi; Fang, Lei et al. (2013): Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. In: *Nat Med* 19 (3), S. 322–328. DOI: 10.1038/nm.3085.
- Nikolich-Zugich, Janko; Slifka, Mark K.; Messaoudi, Ilhem (2004): The many important facets of T-cell repertoire diversity. In: *Nat Rev Immunol* 4 (2), S. 123–132. DOI: 10.1038/nri1292.

- Norris, P. J.; Sumaroka, M.; Brander, C.; Moffett, H. F.; Boswell, S. L.; Nguyen, T. et al. (2001): Multiple effector functions mediated by human immunodeficiency virus-specific CD4(+) T-cell clones. In: *J Virol* 75 (20), S. 9771–9779. DOI: 10.1128/JVI.75.20.9771-9779.2001.
- O'Garra, Anne; Arai, Naoko (2000): The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. In: *Trends in Cell Biology* 10 (12), S. 542–550. DOI: 10.1016/S0962-8924(00)01856-0.
- O'Gorman, William E.; Dooms, Hans; Thorne, Steve H.; Kuswanto, Wilson F.; Simonds, Erin F.; Krutzik, Peter O. et al. (2009): The Initial Phase of an Immune Response Functions to Activate Regulatory T Cells. In: *The Journal of Immunology* 183 (1), S. 332–339. DOI: 10.4049/jimmunol.0900691.
- Ohkura, Naganari; Kitagawa, Yohko; Sakaguchi, Shimon (2013): Development and Maintenance of Regulatory T cells. In: *Immunity* 38 (3), S. 414–423. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.03.002.
- Ohnmacht, Caspar; Pullner, Andrea; King, Susan B. S.; Drexler, Ingo; Meier, Stefanie; Brouckers, Thomas; Voehringer, David (2009): Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (3), S. 549–559. DOI: 10.1084/jem.20082394.
- Olsen, P. C.; Kitoko, J. Z.; Ferreira, T. P.; de-Azevedo, C. T.; Arantes, A. C.; Martins, Mu A. (2015): Glucocorticoids decrease Treg cell numbers in lungs of allergic mice. In: *European journal of pharmacology* 747, S. 52–58. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.11.034.
- Orlicka, Katarzyna; Barnes, Eleanor; Culver, Emma L. (2013): Prevention of infection caused by immunosuppressive drugs in gastroenterology. In: *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 4 (4), S. 167–185. DOI: 10.1177/2040622313485275.
- Paczesny, S.; Hanauer, D.; Sun, Y.; Reddy, P. (2010): New perspectives on the biology of acute GVHD. In: *Bone marrow transplantation* 45 (1), S. 1–11. DOI: 10.1038/bmt.2009.328;
- Pandiyani, Pushpa; Zheng, Lixin; Ishihara, Satoru; Reed, Jennifer; Lenardo, Michael J. (2007): CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. In: *Nat Immunol* 8 (12), S. 1353–1362. DOI: 10.1038/ni1536.
- Panoskaltis-Mortari, Angela; Price, Andrew; Hermanson, John R.; Taras, Elizabeth; Lees, Chris; Serody, Jonathan S.; Blazar, Bruce R. (2004): In vivo imaging of graft-versus-host-disease in mice. In: *Blood* 103 (9), S. 3590–3598. DOI: 10.1182/blood-2003-08-2827.
- Paris, F.; Fuks, Z.; Kang, A.; Capodiceci, P.; Juan, G.; Ehleiter, D. et al. (2001): Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. In: *Science* 293 (5528), S. 293–297. DOI: 10.1126/science.1060191.
- Passweg, J. R.; Baldomero, H.; Bader, P.; Bonini, C.; Cesaro, S.; Dreger, P. et al. (2016): Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. In: *Bone marrow transplantation* 51 (6), S. 786–792. DOI: 10.1038/bmt.2016.20.
- Pavletic, Steven Z.; Fowler, Daniel H. (2012): Are we making progress in GVHD prophylaxis and treatment? In: *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2012, S. 251–264. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.251.
- Peccatori, J.; Forcina, A.; Clerici, D.; Crocchiolo, R.; Vago, L.; Stanghellini, M T L et al. (2015): Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis promotes the in vivo expansion of regulatory T cells and permits peripheral blood stem cell transplantation from haploidentical donors. In: *Leukemia* 29 (2), S. 396–405. DOI: 10.1038/leu.2014.180.
- Peek, Emma J.; Richards, David F.; Faith, Alexander; Lavender, Paul; Lee, Tak H.; Corrigan, Christopher J.; Hawrylowicz, Catherine M. (2005): Interleukin-10–Secreting “Regulatory” T Cells Induced by Glucocorticoids and β 2-Agonists. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 33 (1), S. 105–111. DOI: 10.1165/rcmb.2005-0100OC.

- Penhale, W. J.; Farmer, Anne; Mckenna, R. P.; Irvine, W. J. (1973): Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. In: *Clin Exp Immunol* 15 (2), S. 225–236.
- Peters, Jorieke H.; Preijers, Frank W.; Woestenenk, Rob; Hilbrands, Luuk B.; Koenen, Hans J. P. M.; Joosten, Irma (2008): Clinical Grade Treg: GMP Isolation, Improvement of Purity by CD127^{pos} Depletion, Treg Expansion, and Treg Cryopreservation. In: *PLoS ONE* 3 (9), S. e3161 EP -. DOI: 10.1371/journal.pone.0003161.
- Pidala, Joseph; Anasetti, Claudio (2010): Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 16 (11), S. 1504–1518. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.01.007.
- Piselli, Pierluca; Verdirosi, Diana; Cimaglia, Claudia; Busnach, Ghil; Fratino, Lucia; Ettore, Giuseppe Maria et al. (2014): Epidemiology of de novo malignancies after solid-organ transplantation: immunosuppression, infection and other risk factors. In: *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 28 (8), S. 1251–1265. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2014.08.007.
- Polansky, Julia K.; Kretschmer, Karsten; Freyer, Jennifer; Floess, Stefan; Garbe, Annette; Baron, Udo et al. (2008): DNA methylation controls Foxp3 gene expression. In: *European journal of immunology* 38 (6), S. 1654–1663. DOI: 10.1002/eji.200838105.
- Porakishvili, Nino; Kardava, Lela; Jewell, Andrew P.; Yong, Kwee; Glennie, Martin J.; Akbar, Arne; Lydyard, Peter M. (2004): Cytotoxic CD4+ T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via a perforin-mediated pathway. In: *Haematologica* 89 (4), S. 435–443.
- Przepiorka, D.; Weisdorf, D.; Martin, P.; Klingemann, H. G.; Beatty, P.; Hows, J.; Thomas, E. D. (1995): 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. In: *Bone Marrow Transplant* 15 (6), S. 825–828.
- Pu, Li-Yong; Wang, Xue-Hao; Zhang, Feng; Li, Xiang-Cheng; Yao, Ai-Hua; Yu, Yue et al. (2007): Adoptive transfusion of ex vivo donor alloantigen-stimulated CD4(+)CD25(+) regulatory T cells ameliorates rejection of DA-to-Lewis rat liver transplantation. In: *Surgery* 142 (1), S. 67–73. DOI: 10.1016/j.surg.2007.02.014.
- Reddy, Pavan; Ferrara, James L.M (2003): Immunobiology of acute graft-versus-host disease. In: *Blood Reviews* 17 (4), S. 187–194. DOI: 10.1016/S0268-960X(03)00009-2.
- Rezvani, Katayoun; Mielke, Stephan; Ahmadzadeh, Mojgan; Kilical, Yasemin; Savani, Bipin N.; Zeilah, Josette et al. (2006): High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. In: *Blood* 108 (4), S. 1291–1297. DOI: 10.1182/blood-2006-02-003996.
- Rhen, Turk; Cidlowski, John A. (2005): Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. In: *N Engl J Med* 353 (16), S. 1711–1723. DOI: 10.1056/NEJMra050541.
- Rieger, Kathrin; Loddenkemper, Christoph; Maul, Jochem; Fietz, Thomas; Wolff, Daniel; Terpe, Harald et al. (2006): Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. In: *Blood* 107 (4), S. 1717–1723. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2529.
- Rogulj, Inga; Deeg, Joachim; Lee, Stephanie (2012): Acute graft versus host disease after orthotopic liver transplantation. In: *Journal of Hematology & Oncology* 5 (1), S. 50. DOI: 10.1186/1756-8722-5-50.
- Romagnani, Sergio (2000): T-cell subsets (Th1 versus Th2). In: *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 85 (1), S. 9–21. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)62426-X.
- Rudensky, Alexander Y. (2011): Regulatory T cells and Foxp3. In: *Immunological reviews* 241 (1), S. 260–268. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x.

- Ruggenenti, Piero; Perico, Norberto; Gotti, Eliana; Cravedi, Paolo; D'Agati, Vivette; Gagliardini, Elena et al. (2007): Sirolimus Versus Cyclosporine Therapy Increases Circulating Regulatory T Cells, But Does Not Protect Renal Transplant Patients Given Alemtuzumab Induction From Chronic Allograft Injury. In: *Transplantation* 84 (8), S. 956–964. DOI: 10.1097/01.tp.0000284808.28353.2c.
- Ruppert, Shannon M.; Falk, Ben A.; Long, S. Alice; Bollyky, Paul L. (2015): Regulatory T Cells Resist Cyclosporine-Induced Cell Death via CD44-Mediated Signaling Pathways. In: *International Journal of Cell Biology* 2015, S. 614297. DOI: 10.1155/2015/614297.
- Sagoo, Pervinder; Ratnasothy, Kulachelvy; Tsang, Yuen; Barber, Linda D.; Noble, Alistair; Lechler, Robert I.; Lombardi, Giovanna (2012a): Alloantigen-specific regulatory T cells prevent experimental chronic graft-versus-host disease by simultaneous control of allo- and autoreactivity. In: *European journal of immunology* 42 (12), S. 3322–3333. DOI: 10.1002/eji.201242770.
- Sagoo, Pervinder; Ratnasothy, Kulachelvy; Tsang, Yuen; Barber, Linda D.; Noble, Alistair; Lechler, Robert I.; Lombardi, Giovanna (2012b): Alloantigen-specific regulatory T cells prevent experimental chronic graft-versus-host disease by simultaneous control of allo- and autoreactivity. In: *European journal of immunology* 42 (12), S. 3322–3333. DOI: 10.1002/eji.201242770.
- Sakaguchi, S. (2000): Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. In: *Cell* 101 (5), S. 455–458.
- Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M.; Toda, M. (1995): 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. In: *J Immunol* 155 (3), S. 1151–1164.
- Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Sakihama, T.; Itoh, M. et al. (2001): Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. In: *Immunological reviews* 182, S. 18–32.
- Sakaguchi, Shimon (2004): Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. In: *Annual review of immunology* 22, S. 531–562. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122.
- Sakaguchi, Shimon; Wing, Kajsja; Onishi, Yasushi; Prieto-Martin, Paz; Yamaguchi, Tomoyuki (2009): Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? In: *International immunology* 21 (10), S. 1105–1111. DOI: 10.1093/intimm/dxp095.
- Sakaguchi, Shimon; Yamaguchi, Tomoyuki; Nomura, Takashi; Ono, Masahiro (2008): Regulatory T cells and immune tolerance. In: *Cell* 133 (5), S. 775–787. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009.
- Sakamoto, R.a; Asonuma, K.a; Ramirez, M.E.Z.b; Yoshimoto, K.a; Nishimori, A.a; Inomata, Y.a (2009): Forkhead box P3 (FOXP3) mRNA expression immediately after living-donor liver transplant. In: *Experimental and Clinical Transplantation* 7 (1), S. 8–12. Online verfügbar unter <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67649222381&partnerID=40&md5=5be02bde126e90f488c00c6381dde5d4>.
- Salama, Alan D.; Najafian, Nader; Clarkson, Michael R.; Harmon, William E.; Sayegh, Mohamed H. (2003): Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. In: *J Am Soc Nephrol* 14 (6), S. 1643–1651.
- Sallusto, Federica; Lanzavecchia, Antonio (2002): The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. In: *Arthritis Res* 4 (Suppl 3), S. S127-S132. DOI: 10.1186/ar567.
- Salman, J.; Ius, F.; Knoefel, A-K; Sommer, W.; Siemieni, Th; Kuehn, C. et al. (2016): Association of Higher CD4+ CD25high CD127low, FoxP3+, and IL-2+ T Cell Frequencies Early

- After Lung Transplantation With Less Chronic Lung Allograft Dysfunction at Two Years. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. DOI: 10.1111/ajt.14148.
- Salomao, Marcela; Dorritie, Kathleen; Mapara, Markus Y.; Sepulveda, Antonia (2016): Histopathology of Graft-vs-Host Disease of Gastrointestinal Tract and Liver: An Update. In: *American Journal of Clinical Pathology* 145 (5), S. 591–603. DOI: 10.1093/ajcp/aqw050.
- Salomon, B.; Lenschow, D. J.; Rhee, L.; Ashourian, N.; Singh, B.; Sharpe, A.; Bluestone, J. A. (2000): B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. In: *Immunity* 12 (4), S. 431–440.
- Sarkar, Debalina; Biswas, Moanaro; Liao, Gongxian; Seay, Howard R.; Perrin, George Q.; Markusic, David M. et al. (2014): Ex vivo expanded autologous polyclonal regulatory T cells suppress inhibitor formation in hemophilia. In: *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* 1, S. 14030 EP -. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/mtm.2014.30>.
- Satake, Atsushi; Schmidt, Amanda M.; Nomura, Shosaku; Kambayashi, Taku (2014): Inhibition of calcineurin abrogates while inhibition of mTOR promotes regulatory T cell expansion and graft-versus-host disease protection by IL-2 in allogeneic bone marrow transplantation. In: *PLoS one* 9 (3), S. e92888. DOI: 10.1371/journal.pone.0092888.
- Sayer, H. G.; Longton, G.; Bowden, R.; Pepe, M.; Storb, R. (1994): Increased risk of infection in marrow transplant patients receiving methylprednisolone for graft-versus-host disease prevention. In: *Blood* 84 (4), S. 1328–1332.
- Sbiera, Silviu; Dexneit, Thomas; Reichardt, Sybille D.; Michel, Kai D.; van den Brandt, Jens; Schmall, Sebastian et al. (2011): Influence of short-term glucocorticoid therapy on regulatory T cells in vivo. In: *PLoS one* 6 (9), S. e24345. DOI: 10.1371/journal.pone.0024345.
- Scheffold, Alexander; Murphy, Kenneth M.; Hofer, Thomas (2007): Competition for cytokines: Treg cells take all. In: *Nat Immunol* 8 (12), S. 1285–1287. DOI: 10.1038/ni1207-1285.
- Schmidl, Christian; Hansmann, Leo; Andreesen, Reinhard; Edinger, Matthias; Hoffmann, Petra; Rehli, Michael (2011): Epigenetic reprogramming of the RORC locus during in vitro expansion is a distinctive feature of human memory but not naive Treg. In: *European journal of immunology* 41 (5), S. 1491–1498. DOI: 10.1002/eji.201041067.
- Schmidt, Angelika; Oberle, Nina; Krammer, Peter H. (2012): Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 51. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00051.
- Seddiki, Nabila; Santner-Nanan, Brigitte; Martinson, Jeff; Zaunders, John; Sasson, Sarah; Landay, Alan et al. (2006): Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (7), S. 1693–1700. DOI: 10.1084/jem.20060468.
- Seissler, Nicole; Schmitt, Edgar; Hug, Friederike; Sommerer, Claudia; Zeier, Martin; Schaefer, Matthias; Steinborn, Andrea (2012): Methylprednisolone treatment increases the proportion of the highly suppressive HLA-DR(+)-Treg-cells in transplanted patients. In: *Transplant immunology* 27 (4), S. 157–161. DOI: 10.1016/j.trim.2012.09.003.
- Sergio Romagnani (2000): T-cell subsets (Th1 versus Th2). In: *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 85 (1), S. 9–21. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)62426-X.
- Setoguchi, Ruka; Hori, Shohei; Takahashi, Takeshi; Sakaguchi, Shimon (2005): Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. In: *The Journal of experimental medicine* 201 (5), S. 723–735. DOI: 10.1084/jem.20041982.
- Sharpe, Arlene H.; Freeman, Gordon J. (2002): The B7-CD28 superfamily. In: *Nat Rev Immunol* 2 (2), S. 116–126. DOI: 10.1038/nri727.

- Shevach, E. M.; McHugh, R. S.; Piccirillo, C. A.; Thornton, A. M. (2001): Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. In: *Immunol Rev* 182, S. 58–67.
- Shevach, Ethan M. (2009): Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. In: *Immunity* 30 (5), S. 636–645. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.04.010.
- Shlomchik, W. D.; Couzens, M. S.; Tang, C. B.; McNiff, J.; Robert, M. E.; Liu, J. et al. (1999): Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. In: *Science* 285 (5426), S. 412–415.
- Shlomchik, Warren D. (2007): Graft-versus-host disease. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (5), S. 340–352. DOI: 10.1038/nri2000.
- Siemeni, T.; Knofel, A-K; Madrahimov, N.; Sommer, W.; Avsar, M.; Salman, J. et al. (2016): In Vivo Development of Transplant Arteriosclerosis in Humanized Mice Reflects Alloantigen Recognition and Peripheral Treg Phenotype of Lung Transplant Recipients. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 16 (11), S. 3150–3162. DOI: 10.1111/ajt.13905.
- Siepert, A.; Ahrlich, S.; Vogt, K.; Appelt, C.; Stanko, K.; Köhl, A. et al. (2012): Permanent CN1 Treatment for Prevention of Renal Allograft Rejection in Sensitized Hosts Can Be Replaced by Regulatory T Cells. In: *American Journal of Transplantation* 12 (9), S. 2384–2394. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04143.x.
- Sim, Geok Choo; Martin-Orozco, Natalia; Jin, Lei; Yang, Yan; Wu, Sheng; Washington, Edwina et al. (2014): IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (1), S. 99–110. DOI: 10.1172/JCI46266.
- Singh, Avneesh K.; Seavey, Caleb N.; Horvath, Keith A.; Mohiuddin, Muhammad M. (2012): Ex-vivo expanded baboon CD4+ CD25 Hi Treg cells suppress baboon anti-pig T and B cell immune response. In: *Xenotransplantation* 19 (2), S. 102–111. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2012.00697.x.
- Sionov, Ronit Vogt; Cohen, Orly; Kfir, Shlomit; Zilberman, Yael; Yefenof, Eitan (2006): Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (1), S. 189–201. DOI: 10.1084/jem.20050433.
- Smith, Eileen P. (2010): Hematologic disorders after solid organ transplantation. In: *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2010, S. 281–286. DOI: 10.1182/asheducation-2010.1.281.
- Smith-Garvin, Jennifer E.; Koretzky, Gary A.; Jordan, Martha S. (2009): T cell activation. In: *Annu Rev Immunol* 27, S. 591–619. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
- Sojka, Dorothy K.; Hughson, Angela; Fowell, Deborah J. (2009): CTLA-4 is required by CD4+CD25+ Treg to control CD4+ T-cell lymphopenia-induced proliferation. In: *Eur J Immunol* 39 (6), S. 1544–1551. DOI: 10.1002/eji.200838603.
- Soubani, Ayman O.; Pandya, Chirag M. (2010): The spectrum of noninfectious pulmonary complications following hematopoietic stem cell transplantation. In: *Hematology/oncology and stem cell therapy* 3 (3), S. 143–157.
- Starr, Timothy K.; Jameson, Stephen C.; Hogquist, Kristin A. (2003): POSITIVE AND NEGATIVE SELECTION OF T CELLS. In: *Annu. Rev. Immunol.* 21 (1), S. 139–176. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107.
- Stenard, Fabien; Nguyen, Christine; Cox, Ken; Kambham, Neeraja; Umetsu, Dale T.; Krams, Sheri M. et al. (2009): Decreases in circulating CD4+CD25hiFOXP3+ cells and increases in intragraft FOXP3+ cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients. In: *Pediatric Transplantation* 13 (1), S. 70–80. DOI: 10.1111/j.1399-3046.2008.00917.x.

- Stenger, Elizabeth O.; Turnquist, H eth R.; Mapara, Markus Y.; Thomson, Angus W. (2012): Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. In: *Blood* 119 (22), S. 5088–5103. DOI: 10.1182/blood-2011-11-364091.
- Suárez, A.; López, P.; Gómez, J.; Gutiérrez, C. (2006): Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. In: *Annals of the Rheumatic Diseases* 65 (11), S. 1512–1517. DOI: 10.1136/ard.2005.049924.
- Suffner, Janine; Hochweller, Kristin; Kuhnle, Marie-Cristine; Li, Xingrui; Kroczek, Richard A.; Garbi, Natalio; Hammerling, Gunter J. (2010): Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3+ regulatory T cells in Foxp3.LuciDTR mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (4), S. 1810–1820. DOI: 10.4049/jimmunol.0902420.
- Sung, Anthony D.; Chao, Nelson J. (2013): Acute graft-versus-host disease: are we close to bringing the bench to the bedside? In: *Best Pract Res Clin Haematol* 26 (3), S. 285–292. DOI: 10.1016/j.beha.2013.10.009.
- Suto, Akira; Nakajima, Hiroshi; Ikeda, Kei; Kubo, Shuichi; Nakayama, Toshinori; Taniguchi, Masaru et al. (2002): CD4(+)CD25(+) T-cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms. In: *Blood* 99 (2), S. 555–560.
- Tadokoro, Carlos E.; Shakhar, Guy; Shen, Shiqian; Ding, Yi; Lino, Andreia C.; Maraver, Antonio et al. (2006): Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (3), S. 505–511. DOI: 10.1084/jem.20050783.
- Takahashi, T.; Kuniyasu, Y.; Toda, M.; Sakaguchi, N.; Itoh, M.; Iwata, M. et al. (1998): Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. In: *Int Immunol* 10 (12), S. 1969–1980.
- Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2009): Innate immunity to virus infection. In: *Immunological reviews* 227 (1), S. 75–86. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x.
- Tang, Qizhi; Adams, Jason Y.; Tooley, Aaron J.; Bi, Mingying; Fife, Brian T.; Serra, Pau et al. (2006): Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. In: *Nat Immunol* 7 (1), S. 83–92. DOI: 10.1038/ni1289.
- Tang, Qizhi; Henriksen, Kammi J.; Boden, Elisa K.; Tooley, Aaron J.; Ye, Jianqin; Subudhi, Sumit K. et al. (2003): Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. In: *J Immunol* 171 (7), S. 3348–3352.
- Tarbell, Kristin V.; Yamazaki, Sayuri; Olson, Kara; Toy, Priscilla; Steinman, Ralph M. (2004): CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. In: *The Journal of experimental medicine* 199 (11), S. 1467–1477. DOI: 10.1084/jem.20040180.
- Tawara, Isao; Shlomchik, Warren D.; Jones, Angela; Zou, Weiping; Nieves, Evelyn; Liu, Chen et al. (2010): A crucial role for host APCs in the induction of donor CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated suppression of experimental graft-versus-host disease. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (7), S. 3866–3872. DOI: 10.4049/jimmunol.1001625.
- Taylor, P. A. (2002): The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. In: *Blood* 99 (10), S. 3493–3499. DOI: 10.1182/blood.V99.10.3493.
- Taylor, Patricia A.; Noelle, Randolph J.; Blazar, Bruce R. (2001): Cd4(+)Cd25(+) Immune Regulatory Cells Are Required for Induction of Tolerance to Alloantigen via Costimulatory Blockade. In: *The Journal of experimental medicine* 193 (11), S. 1311–1318. Online verfugbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193378/>.

- Thornton, A. M.; Shevach, E. M. (1998): CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. In: *J Exp Med* 188 (2), S. 287–296.
- Toker, Aras; Engelbert, Dirk; Garg, Garima; Polansky, Julia K.; Floess, Stefan; Miyao, Takahisa et al. (2013): Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (7), S. 3180–3188. DOI: 10.4049/jimmunol.1203473.
- Trenado, Aurélie; Charlotte, Frédéric; Fisson, Sylvain; Yagello, Micael; Klatzmann, David; Salomon, Benoît L.; Cohen, José L. (2003): Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. In: *J. Clin. Invest.* 112 (11), S. 1688–1696. DOI: 10.1172/JCI200317702.
- Trzonkowski, Piotr; Bieniaszewska, Maria; Juscinska, Jolanta; Dobyszuk, Anita; Krzystyniak, Adam; Marek, Natalia et al. (2009): First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. In: *Clin Immunol* 133 (1), S. 22–26. DOI: 10.1016/j.clim.2009.06.001.
- Ugai, Tomotaka; Hamamoto, Kohei; Kimura, Shun-ichi; Akahoshi, Yu; Nakano, Hirofumi; Harada, Naonori et al. (2015): A retrospective analysis of computed tomography findings in patients with pulmonary complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *European journal of radiology* 84 (12), S. 2663–2670. DOI: 10.1016/j.ejrad.2015.08.020.
- Ukena, Sya N.; Hopting, Matthias; Velaga, Sarvari; Ivanyi, Philipp; Grosse, Jens; Baron, Udo et al. (2011a): Isolation strategies of regulatory T cells for clinical trials: phenotype, function, stability, and expansion capacity. In: *Experimental hematology* 39 (12), S. 1152–1160. DOI: 10.1016/j.exphem.2011.08.010.
- Ukena, Sya N.; Velaga, Sarvari; Geffers, Robert; Grosse, Jens; Baron, Udo; Buchholz, Stefanie et al. (2011b): Human regulatory T cells in allogeneic stem cell transplantation. In: *Blood* 118 (13), S. e82-92. DOI: 10.1182/blood-2011-05-352708.
- van Besien, K.; Keralavarma, B.; Devine, S.; Stock, W. (2001): Allogeneic and autologous transplantation for chronic lymphocytic leukemia. In: *Leukemia* 15 (9), S. 1317–1325.
- Veerapathran, Anandharaman; Pidala, Joseph; Beato, Francisca; Yu, Xue-Zhong; Anasetti, Claudio (2011): Ex vivo expansion of human Tregs specific for alloantigens presented directly or indirectly. In: *Blood* 118 (20), S. 5671–5680. DOI: 10.1182/blood-2011-02-337097.
- Velaga, Sarvari; Alter, Christina; Dringenberg, Ulrike; Thiesler, Christina T.; Kuhs, Sandra; Olek, Sven et al. (2017): Clinical-grade regulatory T cells: Comparative analysis of large-scale expansion conditions. In: *Experimental hematology* 45, S. 27-35.e1. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.09.008.
- Velthuis, J. H. L.; Mol, W. M.; Weimar, W.; Baan, C. C. (2006): CD4+ CD25bright+ Regulatory T Cells Can Mediate Donor Nonreactivity in Long-Term Immunosuppressed Kidney Allograft Patients. In: *American Journal of Transplantation* 6 (12), S. 2955–2964. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01566.x.
- Vendetti, Silvia; Davidson, Todd S.; Veglia, Filippo; Riccomi, Antonella; Negri, Donatella R. M.; Lindstedt, Ragnar et al. (2010): Polyclonal Treg cells enhance the activity of a mucosal adjuvant. In: *Immunol Cell Biol* 88 (7), S. 698–706. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2010.76>.
- Vianello, Fabrizio; Cannella, Laura; Coe, David; Chai, Jian-Guo; Golshayan, Dela; Marelli-Berg, Federica M.; Dazzi, Francesco (2013): Enhanced and aberrant T cell trafficking following total body irradiation: a gateway to graft-versus-host disease? In: *British journal of haematology* 162 (6), S. 808–818. DOI: 10.1111/bjh.12472.

- Vignali, Dario A A (2012): Mechanisms of T(reg) Suppression: Still a Long Way to Go. In: *Frontiers in immunology* 3. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00191.
- Vollmar, Angelika; Dinger, Theodor; Zündorf, Ilse (2013): Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe ; mit 216 Tabellen. 2., völlig neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verlagsges.
- Walunas, T. L.; Bakker, C. Y.; Bluestone, J. A. (1996): CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. In: *J Exp Med* 183 (6), S. 2541–2550.
- Wang, Hongjun; Zhao, Liang; Sun, Zuyue; Sun, Liguang; Zhang, Baojun; Zhao, Yong (2006): A Potential Side Effect of Cyclosporin A: Inhibition of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Mice. In: *Transplantation* 82 (11). Online verfügbar unter http://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2006/12150/A_Potential_Side_Effect_of_Cyclosporin_A_19.aspx.
- Wang, Xin; Wang, Wentao; Xu, Jianjiang; Hong, Jiayu; Le, Qihua (2013): Pretreatment of rapamycin before allogeneic corneal transplant promotes graft survival through increasing CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. In: *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* 11 (1), S. 56–62. DOI: 10.6002/ect.2012.0025.
- Wartburg, A. von; Traber, R. (1986): Chemistry of the natural cyclosporin metabolites. In: *Progress in allergy* 38, S. 28–45.
- Wei, Shuang; Kryczek, Ilona; Zou, Weiping (2006): Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. In: *Blood* 108 (2), S. 426–431. DOI: 10.1182/blood-2006-01-0177.
- Weiden, P. L.; Flournoy, N.; Thomas, E. D.; Prentice, R.; Fefer, A.; Buckner, C. D.; Storb, R. (1979): Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. In: *N Engl J Med* 300 (19), S. 1068–1073. DOI: 10.1056/NEJM197905103001902.
- Weiner, H. L. (2001): Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. In: *Immunol Rev* 182, S. 207–214.
- Welniak, Lisbeth A.; Blazar, Bruce R.; Murphy, William J. (2007): Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *Annual review of immunology* 25, S. 139–170. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141606.
- Wildin, R. S.; Ramsdell, F.; Peake, J.; Faravelli, F.; Casanova, J. L.; Buist, N. et al. (2001): X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. In: *Nat Genet* 27 (1), S. 18–20. DOI: 10.1038/83707.
- Wolff, Daniel; Ayuk, Francis; Elmaagacli, Ahmet; Bertz, Hartmut; Lawitschka, Anita; Schleuning, Michael et al. (2013): 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. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 19 (5), S. 767–776. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.01.018.
- Wood, Kathryn J.; Sakaguchi, Shimon (2003): Regulatory T cells in transplantation tolerance. In: *Nat Rev Immunol* 3 (3), S. 199–210. DOI: 10.1038/nri1027.
- Workman, D. L.; Clancy, J., JR (1994): Interstitial pneumonitis and lymphocytic bronchiolitis/bronchitis as a direct result of acute lethal graft-versus-host disease duplicate the histopathology of lung allograft rejection. In: *Transplantation* 58 (2), S. 207–213.
- Wu, Jingjing; Yi, Shounan; Ouyang, Li; Jimenez, Elvira; Simond, Denbigh; Wang, Wei et al. (2008): In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells are potent suppressors of T-cell-mediated xenogeneic responses. In: *Transplantation* 85 (12), S. 1841–1848. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181734793.

- Wynn, Thomas A. (2015): Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. In: *Nat Rev Immunol* 15 (5), S. 271–282. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/nri3831>.
- Xie, Yanhui; Wu, Min; Song, Runhua; Ma, Jiexian; Shi, Yi; Qin, Wenming; Jin, Youxin (2009): A glucocorticoid amplifies IL-2-induced selective expansion of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in vivo and suppresses graft-versus-host disease after allogeneic lymphocyte transplantation. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica* 41 (9), S. 781–791.
- Xu, Lauren; Drachenberg, Cinthia; Tavora, Fabio; Burke, Allen (2013): Histologic findings in lung biopsies in patients with suspected graft-versus-host disease. In: *Human pathology* 44 (7), S. 1233–1240. DOI: 10.1016/j.humpath.2012.11.012.
- Yagi, Haruhiko; Nomura, Takashi; Nakamura, Kyoko; Yamazaki, Sayuri; Kitawaki, Toshio; Hori, Shohei et al. (2004): Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. In: *Int Immunol* 16 (11), S. 1643–1656. DOI: 10.1093/intimm/dxh165.
- Yamazaki, Sayuri; Bonito, Anthony J.; Spisek, Radek; Dhodapkar, Madhav; Inaba, Kayo; Steinman, Ralph M. (2007): Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- β for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3- precursors. In: *Blood* 110 (13), S. 4293–4302. DOI: 10.1182/blood-2007-05-088831.
- Yoshizawa, A.; Ito, A.; Li, Y.; Koshiba, T.; Sakaguchi, S.; Wood, K. J.; Tanaka, K. (2005): The roles of CD25+CD4+ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. In: *Transplantation proceedings* 37 (1), S. 37–39. DOI: 10.1016/j.transproceed.2004.12.259.
- Yuen-Shan Tsang, Julia; Tanriver, Yakup; Jiang, Shuiping; Leung, Eva; Ratnasothy, Kulachelvy; Lombardi, Giovanna; Lechler, Robert (2009): Indefinite mouse heart allograft survival in recipient treated with CD4+CD25+ regulatory T cells with indirect allospecificity and short term immunosuppression. In: *Transplant immunology* 21 (4), S. 203–209. DOI: 10.1016/j.trim.2009.05.003.
- Zeiser, Robert; Nguyen, Vu H.; Beilhack, Andreas; Buess, Martin; Schulz, Stephan; Baker, Jeanette et al. (2006): Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. In: *Blood* 108 (1), S. 390–399. DOI: 10.1182/blood-2006-01-0329.
- Zen, Margherita; Canova, Mariagrazia; Campana, Carla; Bettio, Silvano; Nalotto, Linda; Rampudda, Mariaelisa et al. (2011): The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. In: *Autoimmun Rev* 10 (6), S. 305–310. DOI: 10.1016/j.autrev.2010.11.009.
- Zhang, Yi; Shlomchik, Warren D.; Joe, Gerard; Louboutin, Jean-Pierre; Zhu, Jiang; Rivera, Adam et al. (2002): APCs in the liver and spleen recruit activated allogeneic CD8+ T cells to elicit hepatic graft-versus-host disease. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (12), S. 7111–7118.
- Zhao, T.; Yang, C.; Qiu, Y.; Xue, Y.; Zhao, Z.; Song, D. et al. (2013): Comparison of regulatory T cells and FoxP3-positive T-cell subsets in the peripheral blood of renal transplant recipients with sirolimus versus cyclosporine: a preliminary study. In: *Transplantation proceedings* 45 (1), S. 148–152. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.06.067.
- Zheng, Song Guo; Gray, J. Dixon; Ohtsuka, Kazuo; Yamagiwa, Satoshi; Horwitz, David A. (2002): Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. In: *J Immunol* 169 (8), S. 4183–4189.
- Zhu, Jinfang; Paul, William E. (2008): CD4 T cells: fates, functions, and faults. In: *Blood* 112 (5), S. 1557–1569. DOI: 10.1182/blood-2008-05-078154.
- Zorn, Emmanuel; Nelson, Erik A.; Mohseni, Mehrdad; Porcheray, Fabrice; Kim, Haesook; Litsa, Despina et al. (2006): IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regula-

tory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. In: *Blood* 108 (5), S. 1571–1579. DOI: 10.1182/blood-2006-02-004747.

Zou, Tao; Caton, Andrew J.; Koretzky, Gary A.; Kambayashi, Taku (2010): Dendritic Cells Induce Regulatory T Cell Proliferation through Antigen-Dependent and -Independent Interactions. In: *The Journal of Immunology*. DOI: 10.4049/jimmunol.0903740.

10. Anhang

10.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: T-Zellselektion im Thymus

Abb. 2: T-Zellantwort und T-Zellpopulationen nach Oberflächenmolekül CD4 und CD8

Abb. 3: Direkte und indirekte T-Zellvermittelte Abstoßungsreaktion

Abb. 4: Phasen der akuten GvHD

Abb. 5: Gatingstrategie Suppressionassay

Abb. 6: Gatingstrategie zur Zytokinanalyse

Abb. 7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Abb. 8: Gatingstrategie „Allgemein“ zur Analyse humaner Zellen
im Gewebe post mortem

Abb. 9: Gatingstrategie „nTreg“ zur Analyse humaner Zellen im Gewebe post mortem

Abb. 10: Reinheit der isolierten und expandierten Zellprodukte

Abb. 11: Aktivierungsstatus unstimulierter konventioneller T-Zellen

Abb. 12: Aktivierungsstatus und Suppression stimulierter konventioneller T-Zellen
durch polyklonal expandierte nTreg 1:1

Abb. 13: Prozentuale Suppression stimulierter konventioneller T-Zellen
durch polyklonal expandierte nTreg

Abb. 14: Zytokinprofil konventioneller CD4⁺ FoxP3⁻ (non-Treg) T-Zellen

Abb. 15: Zytokinprofil polyklonal expandierter nTreg

Abb. 16: Überleben, Gewichtsverlauf und klinische Erscheinung der Kontrollgruppen

Abb. 17: Anteil humaner CD45⁺ und CD3⁺ Zellen im Gewebe der
erkrankten Kontrollgruppe

Abb. 18: Überlebenskurve und Gewichtsverlauf erkrankte Kontrolle im Vergleich
klassische Immunsuppression

Abb. 19: Überlebenskurve und Gewichtsverlauf erkrankte Kontrolle im Vergleich
zur nTreg Therapie

Abb. 20: Repräsentative Fotos von Mäusen unter nTreg Therapie 2:1 und 1:2

Abb. 21: Mittlerer Gewichtsverlauf über die Zeit unter nTreg Therapie im Vergleich
zur Standardimmunsuppression

Abb. 22: Überlebenskurve im Vergleich erkrankte Kontrolle, Standardimmunsuppression,
nTreg Therapie und Kombinationstherapie

Abb. 23: Mittlerer Gewichtsverlauf im Vergleich erkrankt Kontrolle,
Standardimmunsuppression, nTreg Therapie und Kombinationstherapie

- Abb. 24: Mittlerer Gewichtsverlauf über die Zeit unter Kombinationstherapie im Vergleich zur erkrankten Kontrolle und nTreg Therapie 1:2
- Abb. 25: Anteil an zirkulierenden humanen Zellen im Blut an Tag +7 und zum Versuchsende
- Abb. 26: Infiltration humaner Zellen und Inflammation von Darm und Haut im Verlauf einer xenogenen Graft versus Host Disease
- Abb. 27: Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Leber
- Abb. 28: Infiltration humaner Zellen und Inflammation von Leber einer Maus unter Monotherapie mit Mycophenolat Mofetil
- Abb. 29: Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Lunge
- Abb. 30: Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Milz
- Abb. 31: Infiltration humaner Zellen und Inflammation der Niere
- Abb. 32: Übersicht der Zellinfiltration humaner Lymphozyten (CD3) im Gewebe
- Abb. 33: Prozentualer Anteil an humanen CD45 Zellen in Knochenmark und Leber
- Abb. 34: Prozentualer Anteil an humanen CD45 Zellen in Lunge und Milz
- Abb. 35: Prozentualer Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischen T-Zellen im Gewebe
- Abb. 36: FoxP3 Expression in der Leber unter Standardimmunsuppression mit CsA
- Abb. 37: Verhältnis CD45 zu FoxP3 in Leber und Lunge
- Abb. 38: Prozentualer Anteil an Ki67 innerhalb der CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) T-Zellen unter Therapie im Vergleich zur erkrankten Kontrolle

10.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterscheidung natürlicher und induzierter regulatorischer T-Zellen

Tab. 2: Mastermix für den Zytokinassay zur phänotypischen Analyse expandierter nTreg

Tab. 3: Übersicht Kontrollgruppen

Tab. 4: Übersicht der Gruppen mit regulatorischen T-Zellen als Montherapeutikum

Tab. 5: Kombinationstherapie aus $0,5 \cdot 10^6$ regulatorischen T-Zellen und Standardimmunsuppression

Tab. 6: Modifizierte Arbeitsanweisungen zum Versuchsvorhaben G 0483/09

Tab. 7: *Mastermix* für Färbeansätze

Tab. 8: Bewertungssystem der histologischen Untersuchung der analysierten Gewebe

11. Danksagung

In erster Linie möchte ich Frau Prof. Dr. Petra Reinke für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit zur Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe danken. Prof. Dr. Robert Klopffleisch danke ich für die immerwährende Unterstützung, Aufmunterung und konstruktive Kritik während all der Jahre, sowie für all die viele Hilfe bei der Erstellung dieser Dissertation. Weiterhin danke ich ihm für die Hilfe bei der Anfertigung und Auswertung der histologischen Schnittbilder. Prof. Dr. Leo Brunnberg danke ich dafür, dass er mir während all der Jahre immer genügend und großzügig Freiraum gegeben hat, um diese Doktorarbeit erstellen zu können. Ich möchte ihm außerdem herzlich für all seinen Einsatz und die Bemühungen danken, die den Abschluss der Arbeit maßgeblich mitbestimmt haben. Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Isabela Schmitt-Knosalla. Sie hat mich behutsam und geduldig in die tierexperimentelle Arbeit eingeführt und mit mir zusammen die ersten Versuche an den Mäusen durchgeführt. Weiterhin danke ich ihr für all die lieben und aufmunternden Worte, die die eine oder andere Träne sicher getrocknet haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nie möglich gewesen.

Zudem möchte ich auch besonders Dr. Sybille Landwehr-Kenzel danken, die mich in jeder nur denkbaren Art und Weise unterstützt hat und mich immer ermuntert hat, nicht aufzugeben. Sie hat mich geduldig in die Laborarbeit eingewiesen und mir bei allen Fragen, Sorgen und Nöten immer zur Seite gestanden und mich auch nach meiner Zeit im Labor weiter unterstützt. Sie hat wie kein zweiter geholfen, das Projekt „Dissertation“ zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen. Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der AG Reinke, die mich nach besten Kräften während all der Zeit am BCRT unterstützt und mir immer sehr geholfen haben. Besonderer Dank gilt dabei Anne Forke, für die Hilfe mit den Zellkulturen, Assays und dass sie meine vielen Emails mit all den Fragen immer beantwortet hat. Weiterhin danke ich Maik Stein, Si-Hong Luu, Henrike Führer, Sabine Brösel und Carola Beier.

Den Schwestern der Nierentransplantationsambulanz, sowie Anett Sefrin und besonders Cordula Giesler möchte ich ebenfalls für ihre stete Herzlichkeit, Hilfe, Unterstützung und den vielen Kaffee danken.

Ein weiterer Dank geht an meine Kolleginnen und Kollegen aus der Kleintierklinik der Freien Universität Berlin, dafür, dass sie die ein oder andere schwere Stunde durch ihre Freundschaft, ein Lächeln oder eine Urarmung wieder sonnig gemacht haben.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meinem Onkel Bertram, möchte ich einfach für alles danken. Sie sind immer für mich da und fangen mich auf, wenn ich das Gefühl habe, nicht mehr weiterzuwissen. Sie sind mein Fels und ohne sie wäre nichts von allem möglich gewesen. Zusätzlich möchte ich allen meinen Freunden für ihre Unterstützung und Liebe danken, allen voran Dr. Sandra-Maria Wienhold, die immer ein offenes Ohr für mich hat und mich in jeder Situation unterstützt und mich immer ermutigt hat, nicht aufzugeben.

12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe

Berlin, 22.03.2018

Anne Zobel



9 783863 879044
mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-904-4