

Aus dem Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

*Ex vivo* expandierte regulatorische T-Zellen als adjuvante  
Therapieoption bei chronischer Graft-versus-Host-Erkrankung

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Leonie Carolin Müller-Jensen**  
**aus Hamburg**

Datum der Promotion: 13.12.2019

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>6</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1. <i>Das Immunsystem</i> .....	10
1.1.1. Das angeborene Immunsystem .....	10
1.1.2. Das adaptive Immunsystem .....	11
1.1.2.1. T-Zellen .....	11
1.1.2.1.1. Regulatorische T-Zellen .....	13
1.1.2.1.1.1. nT <sub>reg</sub> -Defizienzen in der klinischen Immunologie .....	19
1.2. <i>Allogene Stammzelltransplantation und Graft-versus-Host-Erkrankung</i> .....	22
1.2.1. Die akute Graft-versus-Host-Erkrankung .....	24
1.2.2. Die chronische Graft-versus-Host-Erkrankung.....	25
1.2.2.1. Pathogenese der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung.....	27
1.2.2.2. Zelluläre Biomarker der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung.....	29
1.2.2.3. Therapie der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung.....	30
1.2.2.4. Pädiatrische Besonderheiten der HSCT und chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung...	32
1.3. <i>Adoptiver Zelltransfer von regulatorischen T-Zellen</i> .....	32
1.4. <i>Technische Verfahren zur Herstellung von nT<sub>reg</sub>-Produkten</i> .....	36
1.5. <i>Ziel dieser Arbeit</i> .....	38
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>39</b>
2.1. <i>Material</i> .....	39
2.1.1. Blutprodukte .....	39
2.1.1.1. Gesunde Probanden .....	39
2.1.1.2. G-CSF mobilisierte Stammzellspender .....	39
2.1.1.3. Patienten .....	39
2.1.2. Equipment und Geräte .....	40
2.1.3. Medien, Puffer und Lösungen .....	41
2.1.4. Chemikalien und Reagenzien .....	41
2.1.5. Beads, Isolations- und Stimulationskits .....	42
2.1.6. Antikörper .....	42
2.2. <i>Methoden</i> .....	42
2.2.1. PBMC Isolation.....	42
2.2.2. Zellzählung .....	43
2.2.2.1. Zellzahlbestimmung durch den CASY® Cell Counter .....	43
2.2.2.2. Zellzahlbestimmung durch Trypanblaufärbung .....	44
2.2.3. Isolation von natürlichen regulatorischen T-Zellen.....	44
2.2.3.1. CD8 Depletion .....	45
2.2.3.2. CD25 Anreicherung.....	45
2.2.4. <i>In vitro</i> Expansion von polyklonalen natürlichen regulatorischen T-Zellen.....	46
2.2.4.1. Stimulation.....	46
2.2.4.2. Restimulation und optische Kontrolle .....	47
2.2.4.3. Zellernte und Beaddepletion .....	48
2.2.5. Durchflusszytometrie.....	49
2.2.5.1. Phänotypische Charakterisierung .....	49
2.2.5.2. CD154/CD137 Messung .....	51

2.2.5.3. Proliferationsassay .....	53
2.2.5.4. Dura Clone Messungen.....	55
2.2.6. Klinisches Follow-Up nach nT <sub>reg</sub> -ACT .....	61
2.2.7. Graphische Auswertung .....	61
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
3.1. Charakterisierung des nT <sub>reg</sub> -Zellprodukts.....	62
3.1.1. Expansion von nT <sub>reg</sub> -Produkten mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation .....	62
3.1.2. Phänotyp von nT <sub>reg</sub> -Produkten mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation .....	64
3.1.3. Funktionalität von nT <sub>reg</sub> -Produkten mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation.....	67
3.1.4. CD154/CD137 Phänotyp frisch isolierter und polyklonal expandierter nT <sub>regs</sub> .....	71
3.2. nT <sub>reg</sub> -ACT bei pädiatrischen cGVHD-Patienten.....	77
3.2.1. Epikrise.....	78
3.2.1.1. Patient 1 .....	78
3.2.1.2. Patient 2 .....	79
3.2.2. Klinischer Verlauf nach nT <sub>reg</sub> -ACT.....	80
3.2.2.1. Patient 1 .....	80
3.2.2.2. Patient 2 .....	84
3.2.3. Klinische Chemie und Hämatologie nach nT <sub>reg</sub> -ACT.....	84
3.2.3.1. Patient 1 .....	84
3.2.3.2. Patient 2 .....	85
3.2.4. Immunologische Veränderungen nach nT <sub>reg</sub> -ACT.....	87
3.2.4.1. Patient 1 .....	88
3.2.4.2. Patient 2 .....	94
3.2.5. Zusammenfassung: nT <sub>reg</sub> -ACTs bei pädiatrischer cGVHD .....	98
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>100</b>
4.1. Herstellung von nT <sub>reg</sub> -Zellprodukten für die klinische Anwendung.....	100
4.2. Qualitätsbewertung von nT <sub>reg</sub> -Zellprodukten .....	103
4.3. Sicherheit und Wirksamkeit von nT <sub>reg</sub> -ACTs in der Transplantationsmedizin .....	105
4.4. Immunologische Effekte von nT <sub>reg</sub> -ACTs bei cGVHD-Patienten .....	109
4.4.1. Veränderungen des angeborenen Immunsystems .....	109
4.4.2. Veränderungen des adaptiven Immunsystems .....	111
4.4.2.1. Veränderungen des T-Zellkompartiments .....	111
4.4.2.2. Veränderungen des B-Zellkompartiments.....	114
4.5. Ausblick: Zukünftige Anwendung von nT <sub>reg</sub> -ACTs.....	115
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>141</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>142</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>143</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> T-Zell-Entwicklung.....	13
<b>Abbildung 2.</b> Entwicklung von nT <sub>reg</sub> s und iT <sub>reg</sub> s.....	15
<b>Abbildung 3.</b> Suppressionsmechanismen von nT <sub>reg</sub> s.....	17
<b>Abbildung 4.</b> Pathophysiologische Prozesse bei der Entstehung der cGVHD.....	28
<b>Abbildung 5.</b> Gatingstrategie des Basis Phänotyp-Panels.....	57
<b>Abbildung 6.</b> Gatingstrategie des B-Zell-Panels.....	58
<b>Abbildung 7.</b> Gatingstrategie des T-Zell-Panels.....	59
<b>Abbildung 8.</b> Gatingstrategie des DC-Panels.....	60
<b>Abbildung 9.</b> Gatingstrategie des TCR-Panels.....	60
<b>Abbildung 10.</b> Gatingstrategie des T <sub>reg</sub> -Panels.....	61
<b>Abbildung 11.</b> Experimentelles Vorgehen zur Charakterisierung von nT <sub>reg</sub> -Zellprodukten.....	62
<b>Abbildung 12.</b> Expansion von nT <sub>reg</sub> -Kulturen mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation.....	64
<b>Abbildung 13.</b> Phänotypische Charakterisierung zur Bestimmung der Produktreinheit.....	66
<b>Abbildung 14.</b> Phänotypische Charakterisierung polyklonal expandierter nT <sub>reg</sub> s mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation.....	67
<b>Abbildung 15.</b> Dosisabhängige Suppression von T <sub>conv</sub> durch polyklonal expandierte nT <sub>reg</sub> s.....	70
<b>Abbildung 16.</b> Suppression von T <sub>conv</sub> durch nT <sub>reg</sub> s mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation.....	70
<b>Abbildung 17.</b> CD154/CD137 Phänotyp frisch isolierter und polyklonal expandierter nT <sub>reg</sub> s.....	72
<b>Abbildung 18.</b> Frisch isolierte und polyklonal expandierte nT <sub>reg</sub> s zeigen eine unterschiedliche Expression der Aktivierungsmarker CD154 und CD137.....	74
<b>Abbildung 19.</b> Zytokinproduktion einzelner CD154/CD137 Subpopulationen.....	76
<b>Abbildung 20.</b> Klinische Entwicklung und cGVHD-Evaluation von Patient 1.....	82
<b>Abbildung 21.</b> Fotodokumentation der klinischen Entwicklung von Patient 1.....	83
<b>Abbildung 22.</b> Patient 1: Zytokinprofil nach nT <sub>reg</sub> -ACT.....	85
<b>Abbildung 23.</b> Patient 2: Klinische Chemie, Hämatologie und Zytokinprofil nach nT <sub>reg</sub> -ACT.....	87
<b>Abbildung 24.</b> Patient 1: Darstellung immunologischer Zellveränderungen nach nT <sub>reg</sub> -ACT.....	93
<b>Abbildung 25.</b> Patient 2: Darstellung immunologischer Zellveränderungen nach nT <sub>reg</sub> -ACT.....	98
<b>Abbildung 26.</b> Entstehung alloreaktiver B-Zellen bei cGVHD.....	114

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1.</b>	Charakteristische Marker regulatorischer T-Zellen.....	16
<b>Tabelle 2.</b>	Klinische Zeichen und Symptome der cGVHD.....	26
<b>Tabelle 3.</b>	Potentielle zelluläre Biomarker für die Diagnose einer cGVHD.....	29
<b>Tabelle 4.</b>	Medikamente und Behandlungen in der Zweitlinientherapie der cGVHD.....	31
<b>Tabelle 5.</b>	Publizierte Studien zum nT <sub>reg</sub> -ACT in der Transplantationsmedizin.....	34
<b>Tabelle 6.</b>	Laufende und nicht publizierte Studien zum nT <sub>reg</sub> -ACT in der Transplantationsmedizin.....	35
<b>Tabelle 7.</b>	Liste des benötigten Equipments und der verwendeten Geräte.....	40
<b>Tabelle 8.</b>	Liste der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen.....	41
<b>Tabelle 9.</b>	Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	41
<b>Tabelle 10.</b>	Liste der verwendeten Beads, Isolations- und Stimulationskits.....	42
<b>Tabelle 11.</b>	Liste der verwendeten Antikörper.....	42
<b>Tabelle 12.</b>	Antikörper für die Oberflächenfärbung (Phänotypische Charakterisierung).....	50
<b>Tabelle 13.</b>	Antikörper für die intrazelluläre Färbung (Phänotypische Charakterisierung).....	51
<b>Tabelle 14.</b>	Antikörper für die Oberflächenfärbung (CD154/CD137 Messung).....	52
<b>Tabelle 15.</b>	Antikörper für die intrazelluläre Färbung (CD154/CD137 Messung).....	52
<b>Tabelle 16.</b>	Pipettierschema des Proliferationsassays.....	54
<b>Tabelle 17.</b>	Antikörper für die Oberflächenfärbung (Proliferationsassay).....	54
<b>Tabelle 18.</b>	Antikörper der Dura Clone Röhrchen.....	55
<b>Tabelle 19.</b>	Klinische Follow-Up-Zeitpunkte von Patient 1.....	80
<b>Tabelle 20.</b>	Klinische Follow-Up-Zeitpunkte von Patient 2.....	84
<b>Tabelle 21.</b>	Übersicht der immunologischen Begleituntersuchungen.....	87

**Abkürzungen**

ACT	<i>Adoptive Cell Transfer</i>
aGVHD	<i>Acute Graft versus Host Disease</i>
Allo-	Allogen
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4
cGVHD	<i>Chronic Graft versus Host Disease</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FoxP3	Forkhead Box 3
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GMP	<i>Good manufacturing practice</i>
GVHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
GVL	<i>Graft versus Leukemia</i>
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell transplantation</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Int.	Intermediär
iT <sub>reg</sub>	Induzierte regulatorische T-Zelle
IU	<i>International unit</i>
i.v.	Intravenös
KM	Komplettmedium
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nT <sub>reg</sub>	Natürliche regulatorische T-Zelle
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PMA	Phorbol-12-Myrystat-13-Acetat
pT <sub>reg</sub>	Periphere regulatorische T-Zelle
RIC	<i>Reduced Intensity Conditioning</i>
RT	Raumtemperatur
Stim	Stimuliert
T <sub>conv</sub>	<i>T cell, conventional</i>
TCR	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TSDR	Treg-spezifische Demethylierungsregion
TEMRA	<i>Terminally differentiated effector memory</i>
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
TRM	<i>Transplant-related mortality</i>
tT <sub>reg</sub>	Thymode regulatorische T-Zelle
Tx	Transplantation
UG	Ungefärbt
Unstim, US	Unstimuliert
Z. B.	Zum Beispiel

## Zusammenfassung

*Einleitung:* Die chronische Graft-versus-Host-Krankheit (cGVHD) ist eine Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation (allo-HSCT), die mit hoher Morbidität und Mortalität einhergeht. Die gegenwärtig verfügbaren Medikamente sind nicht nur mit ausgeprägten Nebenwirkungen verbunden, sondern oftmals unzureichend wirksam. Ein neuer und vielversprechender Behandlungsansatz besteht in dem adoptiven Zelltransfer natürlicher regulatorischer T-Zellen (nT<sub>reg</sub>-ACT). Durch die Eigenschaft von nT<sub>reg</sub>s, konventionelle T-Zellen (T<sub>conv</sub>) zu supprimieren, könnte ihr adoptiver Transfer positive Effekte auf die immunologische Dysregulation der cGVHD erzielen. Erste klinische Studien deuteten bereits einen sicheren und effektiven Einsatz von nT<sub>reg</sub>-ACTs an, dennoch bestehen weiterhin Herausforderungen in der Produktherstellung und Daten zu pädiatrischen Patienten sind fehlend. Ziel dieser Arbeit war es daher, die weitere Charakterisierung von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten zu erarbeiten und nT<sub>reg</sub>-ACTs als adjuvante Therapieoption bei pädiatrischer cGVHD zu evaluieren.

*Methodik:* Zwei Kinder mit schwerer cGVHD wurden im Rahmen eines individuellen Heilversuchs mit  $3,0 \times 10^6$  nT<sub>reg</sub>s/kg behandelt. Nach Zelltransfer wurde an definierten Follow-Up-Zeitpunkten der klinische cGVHD-Status erhoben und 71 verschiedene Immunzelltypen im peripheren Blut durchflusszytometrisch analysiert. Zusätzlich wurden nT<sub>reg</sub>s aus unbehandelten und G-CSF mobilisierten Stammzellspendern magnetisoliert und polyklonal expandiert. Neben dem Expansionsverhalten wurde durch Färbung von CD4, CD25, FoxP3, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, CD154 und CD137 die nT<sub>reg</sub>-Produktreinheit und CD154/CD137-Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Die Suppressionskapazität der nT<sub>reg</sub>s wurde durch Nutzung CFSE-basierter Proliferationsassays ermittelt.

*Ergebnisse:* Die Zellkulturexperimente zeigten, dass sich durch dreiwöchige Expansion mit IL-2, Rapamycin und wiederholter Beadstimulation Expansionsraten von bis zu ~100.000-fach erzielen lassen. Die Zellprodukte zeigten eine hohe Reinheit und eine deutliche T<sub>conv</sub>-Suppression *in vitro*. Der Vergleich von unbehandelten und G-CSF stimulierten nT<sub>reg</sub>-Linien ergab eine ähnliche Zellexpansion und Produktreinheit. Weitere Experimente zeigten, dass CD137 keinen geeigneten Selektionsmarker für polyklonale nT<sub>reg</sub>s darstellt.

Der klinische Einsatz von nT<sub>reg</sub>-ACTs erwies sich als gut verträglich und führte zu keiner quantitativen Beeinträchtigung der angeborenen Immunität. Nach dem Zelltransfer konnte entweder eine klinische Stabilisierung oder eine deutliche, langfristige Verbesserung der cGVHD erzielt werden. Die immunologischen Begleituntersuchungen zeigten nicht nur einen nT<sub>reg</sub>-Anstieg *in vivo*, sondern auch erstmalig eine Zunahme von naiven B- und T-Lymphozyten nach nT<sub>reg</sub>-ACT.

*Schlussfolgerung:* Diese Arbeit zeigt, dass sich nT<sub>reg</sub>-Produkte mit hoher Reinheit und suffizienter Funktionalität herstellen lassen. Die klinische Anwendung erwies sich als gut verträglich und zeigte neben einer Reduktion der cGVHD-Aktivität auch eine verbesserte lymphozytäre Rekonstitution sowie einen nachhaltigen Anstieg von nT<sub>regs</sub> *in vivo*. Nun sind große systematische Studien nötig, um künftig die breite und evidenzbasierte Anwendung von nT<sub>reg</sub>-ACTs in der Behandlung der (pädiatrischen) cGVHD zu ermöglichen.



**Abstract**

*Introduction:* Chronic Graft-versus-Host-Disease (cGVHD) is a severe complication after allogeneic stem cell transplantation (allo-HSCT) and associated with a high morbidity and mortality rate. The efficacy of currently available drugs is limited and frequently related with significant adverse effects. A new and promising therapeutic approach is the adoptive cell transfer of natural regulatory T cells (nT<sub>reg</sub>-ACT). Due to the ability of nT<sub>reg</sub>s to suppress activated conventional T cells (T<sub>conv</sub>), their adoptive transfer could achieve positive effects on immune dysregulation in cGVHD. First clinical data already implied safety and efficacy of nT<sub>reg</sub>-therapy, yet challenges remain with respect to cell manufacturing and data from pediatric patients are lacking entirely. Thus, this work aims at establishing an advanced characterization of nT<sub>reg</sub>-products and evaluating nT<sub>reg</sub>-ACTs as an adjuvant therapy in pediatric cGVHD.

*Methods:* As a case of compassionate care, two children with severe cGVHD received treatment with  $3.0 \times 10^6$  nT<sub>reg</sub>s/kg. After cell transfer the clinical cGVHD status was assessed and 71 different immune cell subsets analyzed via flow cytometry at specific follow-up-timepoints. Additionally, nT<sub>reg</sub>s from untreated and G-CSF-mobilized donors were immunomagnetically isolated and polyclonally expanded. Apart from its cell expansion, the product's purity and CD154/CD137 phenotype were assessed via staining of CD4, CD25, FoxP3, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, CD154 and CD137 and flow cytometry. nT<sub>reg</sub>s' suppressive capacity was obtained via CFSE-based proliferation assays.

*Results:* The experiments showed that three-week cell culture with IL-2, rapamycin and repeated bead stimulation achieved up to ~100.000-fold expansion. The cells showed high purity and distinct T<sub>conv</sub> suppression *in vitro*. Comparing untreated and G-CSF-stimulated nT<sub>reg</sub>s showed equal cell expansion and purity. Further experiments revealed that CD137 represents no feasible selection marker for polyclonal nT<sub>reg</sub>s.

The clinical application of nT<sub>reg</sub>-ACTs was well-tolerated and did not provoke a quantitative impairment of the innate immunity. After nT<sub>reg</sub>-ACT, either a short-term clinical stabilization or a significant, long-term improvement of cGVHD could be achieved. Immunological follow-ups showed not only an increase of nT<sub>reg</sub>s *in vivo*, but also, for the first time, an enhanced engraftment of both, the Naïve B- and T-cell compartment, after nT<sub>reg</sub>-ACT.

*Conclusion:* This work shows that nT<sub>reg</sub> products of high purity and sufficient function can be manufactured. Clinical application showed good tolerability and revealed, apart from a reduction of cGVHD activity, an improved lymphoid reconstitution as well as a long-term increase of nT<sub>reg</sub>s *in vivo*. Now systematic studies are required to enable the broad and evidence-based implementation of nT<sub>reg</sub>-ACTs in the treatment of (pediatric) cGVHD.

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Immunsystem

Die menschliche Abwehr gegenüber äußeren Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten wird durch zwei miteinander interagierende Systeme organisiert<sup>1</sup>. Zum einen gibt es eine Reihe phylogenetisch älterer Mechanismen, die man unter dem Begriff der angeborenen Immunität zusammenfasst; demgegenüber steht das adaptive Immunsystem, zu dem vor allem B- und T-Lymphozyten gehören<sup>1</sup>.

#### 1.1.1. Das angeborene Immunsystem

Zum angeborenen Immunsystem zählen zunächst die intakte Haut sowie Schleimhäute des Respirations-, des Urogenital- und des Gastrointestinaltrakts, die als Schutzbarrieren das Eindringen von Pathogenen verhindern<sup>2,3</sup>. Körpereigene Sekrete wie Tränenflüssigkeit und Speichel enthalten zudem Substanzen wie z. B. Lysozym und Defensine, die antibiotische Wirkung besitzen<sup>3</sup>. Sobald ein Pathogen diese chemischen und physikalischen Barrieren überwunden hat, treten zellvermittelte Mechanismen in Kraft<sup>1,4</sup>. So gibt es beispielsweise Plasmaproteine wie das C-reaktive Protein (*CRP*), das Mannose-bindende Protein (*MBP*) oder Faktoren des sogenannten Komplementsystems, die an Pathogene binden können und sie für Granulozyten und Monozyten markieren<sup>4</sup>. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit der Phagozytose; sie können Mikroorganismen aktiv internalisieren und in sauren Zellorganellen, den Lysosomen, abtöten<sup>5</sup>. Alternativ können Granulozyten und Monozyten mikrobielle Erreger auch ohne die Hilfe von Plasmaproteinen über sogenannte *pattern recognition receptors (PRRs)* erkennen, welche an Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular pattern, PAMPs*) binden<sup>2</sup>. Die Erkennung solcher PAMPs durch PRRs kann neben der Phagozytose auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine, die Aktivierung anderer Immunzellen und die Ausbildung von *neutrophil-extrazellulär traps (NETs)* bewirken<sup>2,6</sup>. Weitere Effektoren der angeborenen Immunität sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die tumor- oder virusinfizierte Zellen erkennen und abtöten können, sowie Dendritische Zellen (*dendritic cells, DCs*), die zusammen mit Monozyten und Granulozyten zu den Antigen präsentierenden Zellen (*APCs*) gehören<sup>1,4</sup>. Indem DCs auf ihrer Oberfläche Antigene präsentieren und damit T-Lymphozyten aktivieren, stellen sie ein entscheidendes Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar<sup>8</sup>.

Da das angeborene Immunsystem nicht von der Vermehrung pathogenspezifischer Immunzellen abhängig ist, stellt es eine effiziente und vor allem schnelle Form der Abwehr dar<sup>1,4</sup>. Diese wird durch Mechanismen des adaptiven Immunsystems ergänzt, welche erregerspezifische Immunantworten ermöglichen<sup>1,4</sup>.

### 1.1.2. Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist phylogenetisch jünger und gliedert sich in eine zelluläre und eine humorale Komponente<sup>1</sup>. Es zeichnet sich durch die Fähigkeit eines „immunologischen Gedächtnisses“ in Form von Gedächtnis-Zellen sowie eine große Vielfalt an hochvariablen Erkennungsstrukturen aus<sup>1</sup>. Nach erfolgtem Erstkontakt mit einem Antigen erliegen nicht sämtliche erregerspezifische B- und T-Effektorzellen dem sogenannten „programmierten Zelltod“, sondern einige persistieren als Gedächtniszellen und ermöglichen so, im Falle einer Reinfektion, eine hochspezifische Antigenbindung und damit die rasche Erregereliminierung<sup>9</sup>. Durch Mechanismen der somatischen Rekombination (Rekombination der V(D)J-Gensegmente des B- bzw. T-Zellrezeptors), klonalen Expansion und Selektion erreichen B- und T-Lymphozyten eine Rezeptordiversität von theoretisch über  $1 \times 10^{11}$  bzw.  $1 \times 10^{13}$ <sup>10,11</sup>.

Die humorale Immunantwort wird vor allem durch B-Lymphozyten vermittelt<sup>1</sup>. Diese differenzieren nach Erkennung eines nativen Antigens durch den B-Zell-Rezeptor (BCR) und folgender Aktivierung durch CD4+ T-Helferzellen in den sekundären Lymphorganen zu Plasmazellen<sup>12</sup>. Plasmazellen produzieren zunächst Immunglobuline vom IgM-Isotyp, können jedoch durch den sogenannten „Klassenwechsel“ in den Keimzentren der Lymphknoten auch einen Isotypenwechsel zu IgG, IgA oder IgE vollziehen<sup>13</sup>. Immunglobuline binden an ihr spezifisches Antigen und können dadurch den Erreger neutralisieren, für Phagozyten opsonieren oder das Komplementsystem aktivieren<sup>9</sup>.

Die zelluläre Immunantwort erfolgt hingegen T-Zell-vermittelt und kann, anders als die Antikörper-vermittelte Abwehr, auch intrazelluläre Pathogene, wie z. B. Viren, erkennen und bekämpfen<sup>1</sup>.

#### 1.1.2.1. T-Zellen

Effektorfunktionen von T-Zellen sind äußerst divers und bedingen die vereinfachte Einteilung des Zellkompartiments in CD8+ und CD4+ T-Zellen<sup>1</sup>. CD8+ zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T-lymphocytes*, *CTLs*) sind vor allem durch Apoptoseinduktion in infizierten Zellen für die Bekämpfung intrazellulärer Bakterien und Viren zuständig<sup>14</sup>. CD4+ T-Zellen differenzieren je nach Zytokinprofil zunächst in verschiedene Subpopulationen<sup>9</sup>. Sämtliche dieser CD4+ Subtypen bewirken die Aktivierung definierter Zielzellen, um die Beseitigung von Pathogenen zu erzielen, mit Ausnahme von den regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ s), die vielmehr eine Unterdrückung als eine Aktivierung der T-Zellantwort bewirken<sup>1,14</sup>.

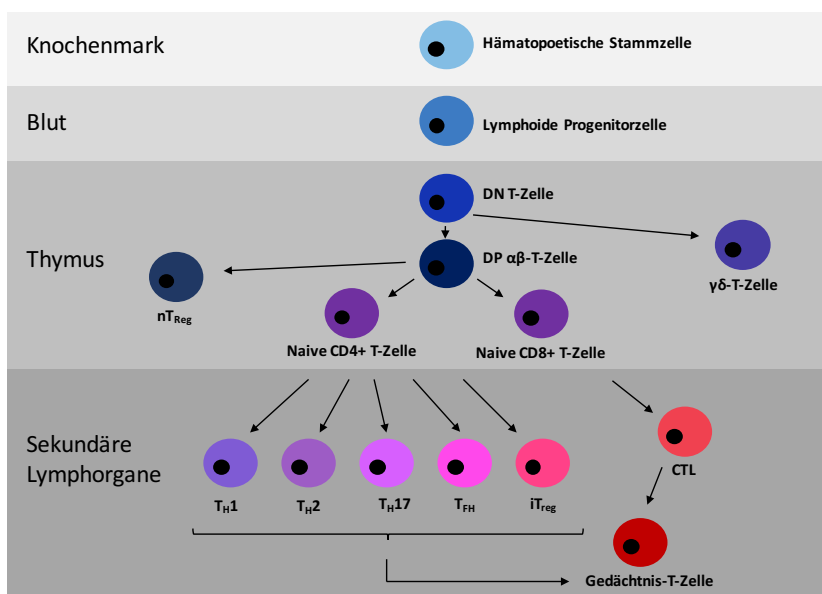
Die Entwicklung aller T-Zelltypen beginnt im Knochenmark mit hämatopoetischen Stammzellen, aus denen durch asymmetrische Zellteilung lymphoide Progenitorzellen entstehen

(Abbildung 1)<sup>1,14</sup>. Daraus reifen Vorläufer-T-Zellen, die in den Thymus migrieren und dort über eine CD4-CD8- doppelt-negative Vorstufe zu  $\alpha\beta+$  oder  $\gamma\delta+$  T-Zellen differenzieren<sup>15</sup>.  $\alpha\beta+$  und  $\gamma\delta+$  T-Zellen unterscheiden sich in der Struktur ihres T-Zellrezeptors (*T cell receptor, TCR*), der als Proteinkomplex in der Zellmembran verankert ist und aus zwei Untereinheiten (meist den Polypeptidketten  $\alpha$  und  $\beta$ , in 5 - 10%  $\gamma$  und  $\delta$ ) zusammengesetzt ist<sup>1,14</sup>. Die dominante  $\alpha\beta+$  T-Zellpopulation vollzieht im Thymuskortex genetische Umlagerungen, die die Expression eines Prä-T-Zell-Rezeptors sowie der Korezeptoren CD4 und CD8 ermöglichen<sup>15</sup>. Diese doppelt-positiven (CD4+CD8+) Thymozyten durchlaufen anschließend einen Selektionsprozess, bei dem der Oberflächenphänotyp sowie die künftige Funktion der reifen T-Zelle festgelegt werden<sup>15</sup>. Im Rahmen der positiven Selektion erhalten nur T-Zellen ein Überlebenssignal, die von Thymusepithelzellen präsentierte, körpereigene MHC-Moleküle erkennen können („*death by neglect*“)<sup>16</sup>. MHC-Moleküle sind Proteine, die von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplex' codiert werden und für die Erkennung von Fremd- und Selbstantigenen wichtig sind<sup>17</sup>. Beim Menschen wird der MHC als HLA-System (*Human Leukocyte Antigen*) bezeichnet. Es gibt Klasse I und Klasse II MHC-Moleküle<sup>17</sup>. Erstere werden von fast allen Körperzellen, den sogenannten nicht-professionellen APCs, exprimiert<sup>9</sup>. Wenn eine doppelt-positive T-Zelle während der positiven Selektion MHC-I-Moleküle erkennt, induziert dies die Differenzierung in einfach-positive CD8+ T-Zellen<sup>14,17</sup>. Die Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle ist dagegen professionellen APCs vorbehalten. Binden doppelt-positive T-Zellen im Thymus an MHC-II-Moleküle, so reifen daraus CD4+ T-Zellen (Abbildung 1)<sup>14,17</sup>.

Im Anschluss an die positive Selektion erfolgt die negative Selektion, bei der professionelle APCs und medulläre Stromazellen des Thymus unter der Kontrolle des AIRE-Gens körpereigene, gewebespezifische Proteine über MHC-Moleküle präsentieren<sup>16</sup>. Eine hohe Affinität zu eigenen Peptid-MHC-Komplexen induziert Apoptose, sodass die Generierung autoreaktiver T-Zellen und deren Freigabe in die Peripherie verhindert wird<sup>16</sup>. Alternativ zu der Deletion autoreaktiver T-Zellen kann jedoch auch, bei einer Selbstantigenbindung intermediärer bis hoher Avidität, die Induktion von  $T_{reg}$ s erfolgen<sup>18,19</sup>. Insgesamt führen die Prozesse der positiven und negativen Selektion zur Differenzierung funktioneller, selbsttoleranter T-Zellen, weshalb man diese Mechanismen auch unter dem Begriff der zentralen Toleranz zusammenfasst<sup>1,14</sup>.

Reife T-Zellen gelangen in das periphere Blut und können dort über die variable (V) Domäne des TCRs MHC-gebundene Antigene spezifisch binden<sup>20</sup>. Die Antigenerkennung bewirkt eine T-Zellaktivierung, der die klonale Expansion und die Differenzierung in Effektorzellen, auch konventionelle T-Zellen ( $T_{conv}$ ) genannt, folgen<sup>20</sup>. Hierzu sind zusätzliche kostimulatorische Signale, wie z. B. die Bindung von CD80/CD86 an CD28 nötig<sup>20</sup>. Aktivierte CD4+ T-Zellen differenzieren in  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ ,  $T_{FH}$  und  $T_{reg}$ -Zellen, einige reifen auch zu Gedächtnis-T-Zellen

(Abbildung 1)<sup>1,14</sup>. T<sub>H</sub>1-Zellen unterstützen infizierte Makrophagen bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene, dagegen helfen T<sub>H</sub>2-Zellen bei der Kontrolle von Parasiten, vor allem Würmern, indem sie eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen aktivieren und bei B-Zellen einen Immunglobulin-Klassenwechsel hervorrufen<sup>21</sup>. T<sub>H</sub>17-Zellen unterstützen neutrophile Granulozyten bei der Elimination extrazellulärer Bakterien und Pilze, sie werden außerdem mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen (z. B. Psoriasis) in Verbindung gebracht<sup>22,23</sup>. Die kürzlich entdeckte Population der T<sub>FH</sub>-Zellen ist auf B-Zell-Hilfe in Form von Aktivierung, Induktion somatischer Hypermutation und Differenzierung zu Plasmazellen spezialisiert<sup>22</sup>. T<sub>reg</sub>s haben wiederum eine regulatorische Funktion und stellen immunologisch die Gegenspieler der proinflammatorischen T<sub>conv</sub> dar<sup>14,24</sup>.



**Abbildung 1. T-Zell-Entwicklung.**

Die T-Zell-Entwicklung erfolgt in den primären (Knochenmark und Thymus) und sekundären Lymphorganen. Aus der hämatopoetischen Stammzelle reifen, über mehrere Zwischenstufen, CD4+ und CD8+ T-Zellen heran, die nach Aktivierung in weitere Subtypen differenzieren. DN = doppelt-negativ; DP = doppelt-positiv; nT<sub>reg</sub> = Natürliche regulatorische T-Zelle, T<sub>H</sub> = T-Helferzelle; T<sub>FH</sub> = Follikuläre T-Helferzelle; iT<sub>reg</sub> = Induzierte regulatorische T-Zelle; CTL = Zytotoxische T-Zelle. Vereinfacht nach Purnama, Camous und Larbi (2013).<sup>14</sup>

### 1.1.2.1.1. Regulatorische T-Zellen

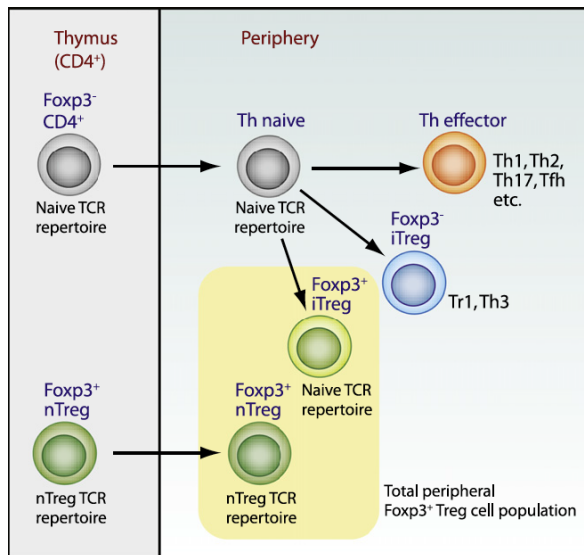
In den frühen 1970er Jahren beschrieben Gershon und Kondo erstmalig die Existenz sogenannter Suppressor-Zellen, die in der Lage waren die Immunantwort anderer T-Zellpopulationen zu unterdrücken<sup>25</sup>. Die Erkenntnis, dass eine postnatale Thymektomie bei Mäusen zu Autoimmunerkrankungen (z. B. Atrophie der Ovarien) führt, unterstützte diese Hypothese und weckte das Interesse vieler Wissenschaftler<sup>26</sup>. In den Folgejahren entdeckte man unter anderem, dass Mutationen im Gen des Transkriptionsfaktors FoxP3

(*Forkhead box P3*) im Mausmodell ein letales lymphoproliferatives Erkrankungsbild, genannt „scurfy“, hervorrufen, während beim Menschen eine X-chromosomal vermittelte Autoimmunkrankheit mit Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie (= IPEX) entsteht<sup>27-30</sup>. Dieses erstmalig 1982 beschriebene Krankheitsbild tritt vorwiegend bei Jungen auf und äußert sich bereits im Säuglingsalter durch starke Diarrhoe, eine ekzematöse Dermatitis, endokrine Störungen wie z. B. Typ-1-Diabetes, Nahrungsmittelallergien und verschiedene Zytopenien<sup>28,29,31,32</sup>. Unbehandelt sterben die Patienten meist innerhalb der ersten Lebensjahre<sup>28,29,31</sup>. Durch immunsuppressive Therapien, z. B. mit Rapamycin, und die Durchführung von allogenen Stammzelltransplantationen konnten die Überlebenschancen jedoch deutlich verbessert werden<sup>33</sup>. Sakaguchi *et al.* zeigten 1995, dass es sich bei den entdeckten Suppressor-Zellen um CD4+CD25+ T-Zellen handelt<sup>34</sup>. Die Identifikation von CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors) als Oberflächenmarker von T<sub>reg</sub>s erlaubte erstmalig die Isolation lebender Zellen und ermöglichte dadurch genauere phänotypische und funktionelle Untersuchungen<sup>35,36</sup>. 2003 wurde von mehreren Arbeitsgruppen die Schlüsselrolle von FoxP3 für die Funktionalität und Entwicklung von T<sub>reg</sub>s sowie dessen Bedeutung als erster T<sub>reg</sub>-spezifischer Marker identifiziert<sup>37,38</sup>.

Heute werden primär zwei verschiedene Formen von FoxP3+ T<sub>reg</sub>s unterschieden (Abbildung 2). Zum einen gibt es die natürlichen, im Thymus generierten regulatorischen T-Zellen (tT<sub>reg</sub>s oder nT<sub>reg</sub>s), die ca. 1 - 5% der mononukleären Zellen des peripheren Blutes ausmachen<sup>39,40</sup>. nT<sub>reg</sub>s entwickeln sich im Thymus während der negativen Selektion, bei der Thymusepithelzellen und professionelle APCs körpereigene Antigene über MHC-I und MHC-II-Moleküle präsentieren<sup>41,42</sup>. Sie zeigen dabei eine intermediäre bis hohe Affinität bei der Erkennung von Selbstantigenen<sup>18</sup>. Diese Selbstantigenbindung führt nicht zum Zelltod, wie bei T<sub>conv</sub>, sondern induziert über eine maximale TCR- sowie CD28-vermittelte Kostimulation die Expression von FoxP3<sup>18,43</sup>. Welche Einflussfaktoren die Entwicklung von Progenitorzellen zu nT<sub>reg</sub>s bedingen, ist bis heute unzureichend geklärt. Bekannt ist, dass neben einem intakten AIRE-Gen die Zytokine IL-2 und IL-15 wichtige Faktoren für die Entwicklung und das Überleben von nT<sub>reg</sub>s darstellen<sup>44,45</sup>.

Zum anderen gibt es die peripheren regulatorischen T-Zellen (pT<sub>reg</sub>s), vielfach auch als induzierte T<sub>reg</sub>s (iT<sub>reg</sub>s) bezeichnet, die sich unter dem Einfluss von Antigenstimulation, TGF- $\beta$ , IL-2 und IL-10 sowie der Abwesenheit des proinflammatorischen Zytokins IL-6 aus naiven oder Gedächtnis-T<sub>conv</sub> entwickeln. Anders als bei nT<sub>reg</sub>s ist die Entstehung unabhängig von CD28-vermittelter Kostimulation<sup>43</sup>. Auch wenn pT<sub>reg</sub>s und iT<sub>reg</sub>s häufig synonym verwendet werden, existiert ebenfalls Literatur, in der iT<sub>reg</sub>s als *in vitro* generierte FoxP3+ T<sub>reg</sub>s definiert und damit von pT<sub>reg</sub>s abgegrenzt werden<sup>42</sup>. Ob sich pT<sub>reg</sub>s und iT<sub>reg</sub>s in ihren suppressiven Eigenschaften und der Stabilität ihrer FoxP3-Expression unterscheiden, ist bisher umstritten<sup>46-48</sup>. Wichtig ist an dieser Stelle, dass pT<sub>reg</sub>s bzw. iT<sub>reg</sub>s nicht mit Tr1-Zellen, welche vor allem das

antiinflammatorische Zytokin IL-10 produzieren, und Th3-Zellen, welche TGF- $\beta$  bilden, verwechselt werden<sup>49,50</sup>. Im Gegensatz zu T<sub>reg</sub>s exprimieren Tr1- und Th3-Zellen kein FoxP3, wodurch sie Zellen mit regulatorischer Funktion, aber keine T<sub>reg</sub>s im engeren Sinne sind (Abbildung 2)<sup>49,50</sup>.



**Abbildung 2. Entwicklung von nT<sub>reg</sub>s und iT<sub>reg</sub>s.**

nT<sub>reg</sub>s entstehen bereits im Thymus, iT<sub>reg</sub>s (vielfach auch als pT<sub>reg</sub>s bezeichnet) entwickeln sich in der Peripherie aus naiven T<sub>conv</sub>. Tr1- und Th3-Zellen sind FoxP3<sup>-</sup> Zellen mit regulatorischen Eigenschaften. Nach Curroto de Lafaille und Lafaille (2009).<sup>50</sup>

In den letzten Jahren wurde erheblicher Forschungsaufwand bezüglich weiterer phänotypischer Charakterisierungen und Differenzierungsmöglichkeiten zwischen nT<sub>reg</sub>s und pT<sub>reg</sub>s betrieben. Obwohl inzwischen eine transiente Expression von FoxP3 auch für T-Zellen ohne regulatorische Eigenschaften beschrieben wurde, ist der Transkriptionsfaktor aufgrund seiner hohen Spezifität bis heute der bedeutendste T<sub>reg</sub>-Marker (Tabelle 1)<sup>31,51-55</sup>. Die klare Unterscheidung von nT<sub>reg</sub>s und pT<sub>reg</sub>s ist zum derzeitigen Kenntnisstand einzig durch die Untersuchung des Genlokus TSDR (*Treg-specific demethylated region*), einer nicht-kodierenden Sequenz innerhalb des FoxP3-Genlokus, möglich<sup>56,57</sup>. Während der TSDR bei nT<sub>reg</sub>s vollständig demethyliert ist, liegt er bei pT<sub>reg</sub>s und T<sub>conv</sub> methyliert vor<sup>56,57</sup>. Da sowohl für die Untersuchung des Methylierungsstatus als auch für die intrazelluläre Färbung von FoxP3 eine Zellyse bzw. eine DNA-Extraktion nötig sind, ist die Isolation lebender nT<sub>reg</sub>s bzw. pT<sub>reg</sub>s anhand dieser T<sub>reg</sub>-Marker bisher nicht möglich.

**Tabelle 1. Charakteristische Marker regulatorischer T-Zellen.**

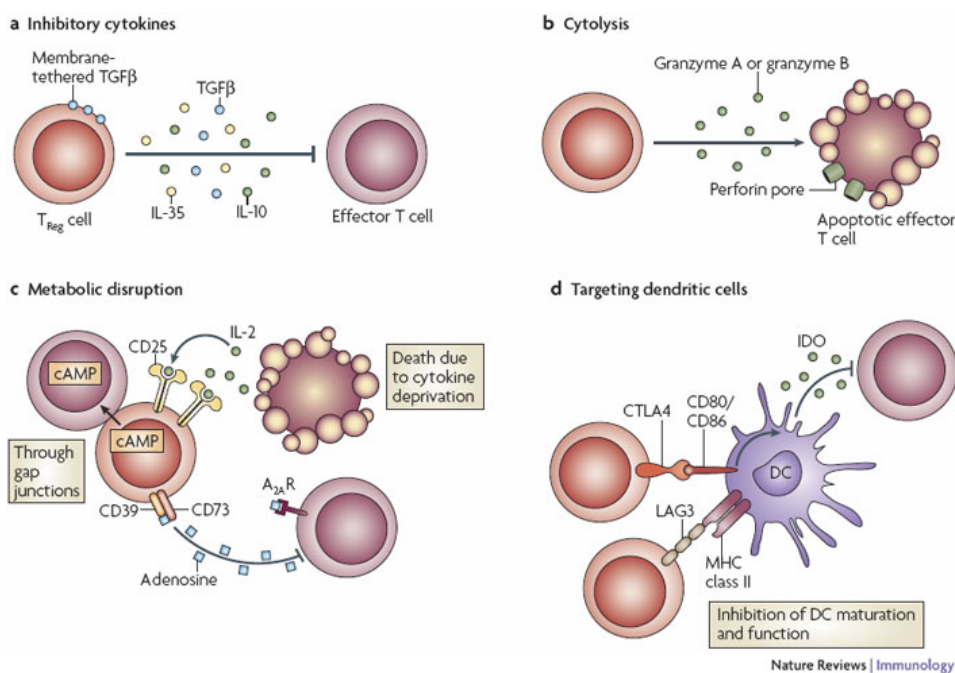
TNFRF = Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptorfamilie, LAG3 = Lymphozyten-Aktivierungsgen 3, ICOS = Induzierbarer T-Zell-Kostimulator, PD-1 = Programmierter Tod-1, GARP = Glykoprotein A dominante Wiederholungen, GITR = Glukokortikoid-induziertes, TNFR-Familie verwandtes Gen. \*Nur Evidenz für murine T<sub>reg</sub>s vorliegend.

Marker	Funktion	Expression
CD4 <sup>25</sup>	Korezeptor von CD3	T <sub>reg</sub> S, T-Helferzellen
CD25 <sup>35,36</sup>	α-Kette des IL-2 Rezeptors	T <sub>reg</sub> S, aktivierte T <sub>conv</sub>
FoxP3 <sup>37,38,54,58,59</sup>	Transkriptionsfaktor	T <sub>reg</sub> S, nicht-regulatorische CD4+ T-Zellen
CD127low <sup>55,60</sup>	α-Kette des IL-7 Rezeptors	Niedrige Expression auf T <sub>reg</sub> S sowie aktivierten CD4+ T <sub>conv</sub> ; aktivierte T <sub>reg</sub> S zeigen jedoch CD127+ Phänotyp
CD39 <sup>40,52</sup>	Ektonukleotidase (spaltet ATP und ADP in Adenosin und cAMP)	T <sub>reg</sub> S, aktivierte T <sub>conv</sub> , B-Zellen, DCs
CD73 <sup>40</sup>	Ektonukleotidase (spaltet ATP und ADP in Adenosin und cAMP)	T <sub>reg</sub> S, aktivierte T <sub>conv</sub> , B-Zellen, DCs
CD137 / 4-1BB <sup>61,62</sup>	Proinflammatorisches Immuncheckpointmolekül der TNFR-Familie, kostimulatorisches Molekül für NK-Zellen sowie CD4+ und CD8+ T-Zellen	T <sub>reg</sub> S, aktivierte CD8+ T <sub>conv</sub>
CTLA-4 <sup>39,63</sup>	Ligand von CD80/CD86, antiinflammatorisches Immuncheckpointmolekül	T <sub>reg</sub> S, aktivierte CD4+ T <sub>conv</sub>
Neuropilin-1 <sup>64-66</sup>	Membranrezeptor, DC-Interaktion	T <sub>reg</sub> S, Neurone, Endothelzellen
Granzyme B <sup>62,67</sup>	Serinprotease, zytolytisches Protein	T <sub>reg</sub> S, CD8+ T <sub>conv</sub> , NK-Zellen
Perforin <sup>62,67</sup>	Zytolytisches Protein	T <sub>reg</sub> S, CD8+ T <sub>conv</sub> , NK-Zellen
LAG-3 <sup>62,68</sup> *	Antiinflammatorisches Immuncheckpointmolekül, CD4-Analogen, inhibiert DCs	T <sub>reg</sub> S, aktivierte T <sub>conv</sub> , NK-Zellen, B-Zellen, Plasmazytoide DCs
CD103 <sup>39</sup> *	Integrin αEβ7, wichtig für Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte	T <sub>reg</sub> S, intraepitheliale T-Zellen
GITR <sup>39,62</sup>	Proinflammatorisches Immuncheckpointmolekül der TNFR-Familie, kostimulatorisches Molekül für CD4+ und CD8+ T-Zellen	T <sub>reg</sub> S, aktivierte T <sub>conv</sub>
CD134 / OX40 <sup>39,62</sup>	Proinflammatorisches Immuncheckpointmolekül der TNFR-Familie	T <sub>reg</sub> S, naive und aktivierte T <sub>conv</sub> ,
Galectin-1 <sup>69</sup>	Antiinflammatorisches Signalmolekül	T <sub>reg</sub> S, CD4+ CD25dim T-Zellen
Helios <sup>48,66,70</sup>	Transkriptionsfaktor der Ikarus Familie	T <sub>reg</sub> S, Vorläufer-T-Zellen im Thymus, CD4+ FoxP3- T-Zellen
CD278 / ICOS <sup>39,71</sup>	Proinflammatorisches Immuncheckpointmolekül, funktionell verwandt mit CD28	T <sub>reg</sub> S, aktivierte CD4+ T <sub>conv</sub>
CD279 / PD-1 <sup>39,72,73</sup>	Antiinflammatorisches Immuncheckpointmolekül, Apoptoseinduktion in T <sub>conv</sub> , Apoptoseinhibition in T <sub>reg</sub>	T <sub>reg</sub> S, aktivierte T <sub>conv</sub>
GARP <sup>74,75</sup>	Transmembranprotein, bindet TGF-β	Aktivierte T <sub>reg</sub> S, Mesenchymale Stammzellen, Thrombozyten, hepatische Stellatzellen

Die genauen Mechanismen, mit denen T<sub>reg</sub>S Selbst- und Fremdtoleranz vermitteln und autoreaktive T<sub>conv</sub> supprimieren, sind noch unzureichend geklärt<sup>24</sup>. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist zudem unklar, inwiefern sich nT<sub>reg</sub>S und pT<sub>reg</sub>S funktionell unterscheiden,



sodass eine klare Zuordnung der Suppressionsmechanismen zu  $nT_{reg}$ s bzw.  $pT_{reg}$ s bisher nur bedingt möglich ist<sup>24</sup>. *In vivo* und *in vitro*-Versuche zeigten teilweise konträre Ergebnisse und die Datenlage impliziert, dass je nach Zytokinmilieu, Gewebe und Zielzelltyp unterschiedliche Suppressionsmechanismen prädominieren<sup>24,43,76,77</sup>. Dennoch scheint die Suppressionsfähigkeit von  $pT_{reg}$ s auf Zytokin-vermittelten Mechanismen zu beruhen, während die  $T_{conv}$ -Suppression von  $nT_{reg}$ s sowohl durch Zytokinsekretion als auch zellkontaktabhängig erfolgt<sup>35,43</sup>. Vereinfacht lassen sich für  $nT_{reg}$ s vier übergeordnete Suppressionsmechanismen identifizieren: (1) Hemmung durch immunsuppressive Zytokine, (2) Hemmung durch Zytolyse von  $T_{conv}$ , (3) Hemmung durch metabolische Verknappung und (4) Hemmung durch Beeinflussung von APCs (Abbildung 3)<sup>24,78</sup>.



**Abbildung 3. Suppressionsmechanismen von  $nT_{reg}$ s.**

$nT_{reg}$ s vermitteln immunologische Suppression über vier grundlegende Mechanismen: (a) Die Sekretion inhibitorischer Zytokine (b) Die Zytolyse von  $T_{conv}$  (c) Metabolische Verknappung und (d) die Beeinflussung von APCs wie z. B. DCs. Aus Vignali, Collison und Workman (2008).<sup>24</sup>

Die Mediatoren IL-10 und TGF- $\beta$  spielen eine wichtige Rolle bei der Zytokin-vermittelten  $T_{conv}$ -Suppression durch  $nT_{reg}$ s<sup>24,77</sup>. Mausmodelle zu allergischen und inflammatorischen Erkrankungen wie z. B. Asthma bronchiale konnten zeigen, dass diese Zytokine die Krankheitsentstehung  $nT_{reg}$ -vermittelt verhindern können<sup>79-83</sup>. Kontrovers diskutiert wird jedoch, ob das antiinflammatorische IL-10 dabei von  $nT_{reg}$ s selbst gebildet und sezerniert wird oder ob es vielmehr aus  $T_{conv}$  oder DCs stammt und lediglich die Aktivierung anderer  $nT_{reg}$ -Suppressionsmechanismen hervorruft<sup>49,79</sup>. Im Bezug auf TGF- $\beta$  ist bekannt, dass CD4+CD25+ Zellen mit Hilfe von Membran-gebundenem TGF- $\beta$  die CD8+  $T_{conv}$ -vermittelte

Zerstörung der  $\beta$ -Inseln im Pankreas und damit die Entstehung von Diabetes mellitus Typ I verhindern<sup>84</sup>. Auf der anderen Seite haben Versuche mit TGF- $\beta$ -Rezeptor-defizienten Mäusen die Notwendigkeit dieses Signalmoleküls für die Funktionalität von CD4+CD25+ Zellen nicht bestätigen können<sup>85</sup>. Ein weiteres Zytokin, welches mit nT<sub>reg</sub>-Funktionalität in Zusammenhang gebracht wird, ist IL-35<sup>86</sup>. Schaltet man eine Untereinheit dieses heterodimeren Zytokins aus, kommt es zum Funktionsverlust von IL-35 und eine starke Einschränkung der Suppressionsfähigkeit von nT<sub>reg</sub>S entsteht<sup>86</sup>. Durch die exogene Zugabe von IL-35 konnte in Experimenten wiederum eine vollständige Wiederherstellung der nT<sub>reg</sub>-Funktionalität erzielt werden<sup>86</sup>. Inwiefern IL-10, TGF- $\beta$  und IL-35 miteinander interagieren und ob es noch weitere Zytokine gibt, über die nT<sub>reg</sub>S Suppression vermitteln, bleibt zu klären.

Ein weiterer Mechanismus, über den nT<sub>reg</sub>S T<sub>conv</sub>, aber auch B- und NK-Zellen supprimieren, ist die Zytolyse<sup>24,87</sup>. Dabei kommt es, Zellkontakt-vermittelt sowie über die Freisetzung von Perforin und Granzymen, zur Zellmembranperforation und Apoptoseinduktion von Zielzellen<sup>88</sup>. Für nT<sub>reg</sub>S ist sowohl die Expression von Perforin als auch von Granzym B beschrieben worden<sup>89-91</sup>. Cao *et al.* zeigten, dass Granzym B und Perforin vor allem an der nT<sub>reg</sub>-vermittelten Unterdrückung von Tumorantworten durch T<sub>conv</sub> und NK-Zellen beteiligt sind<sup>67</sup>. Des Weiteren wurde die Expression der Apoptose-induzierenden Proteine Galectin-1 und TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) mit adäquater nT<sub>reg</sub>-Funktionalität assoziiert<sup>69,92</sup>. Sowohl das Ausschalten des TRAIL-DR5 (*Death Receptor 5*)-Signalwegs als auch das von Galectin-1 führten zu einer eingeschränkten Suppressionsfähigkeit<sup>69,92</sup>.

nT<sub>reg</sub>S können ihre Suppression auch über die Störung des Metabolismus von Zielzellen vermitteln<sup>24</sup>. Als erster Mechanismus wurde die CD25-abhängige IL-2-Verknappung beschrieben, die bis heute kontrovers diskutiert wird<sup>24</sup>. Bekannt ist, dass IL-2 entweder, mit niedriger Affinität, an den dimerischen IL-2-Rezeptor (bestehend aus CD122 und CD132) bindet oder, mit hoher Affinität, an die trimere Isoform, die zusätzlich CD25 enthält<sup>93,94</sup>. Da IL-2 ein wichtiges Zytokin für die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von T- und B-Zellen ist, führt die konstitutiv hohe CD25-Expression von nT<sub>reg</sub>S über eine IL-2-Verarmung zu einer metabolischen Deprivation aller Zellen, die eine weniger hohe Affinität zu dem Zytokin besitzen<sup>24,78,95</sup>. Andere Daten zeigen jedoch auch, dass nT<sub>reg</sub>S von IL-2<sup>-/-</sup>- bzw. CD25<sup>-/-</sup>-Mäusen eine adäquate T<sub>conv</sub>-Suppression *in vitro* zeigen und somit das Fehlen der IL-2-Depletion allein zu keiner signifikanten Funktionseinschränkung von nT<sub>reg</sub>S führt<sup>96,97</sup>. Zwei weitere Mediatoren, die eine Suppression von T<sub>conv</sub> und DCs bewirken, sind CD39 und CD73<sup>24,78,87</sup>. Diese auf der Oberfläche von nT<sub>reg</sub>S stark exprimierten Ektoenzyme hydrolysieren ATP oder ADP zu cAMP und Adenosin, welche als Signalmoleküle verschiedene Prozesse initiieren. Beispielsweise bindet Adenosin auf der Oberfläche von T<sub>conv</sub> an den Adenosin-Rezeptor 2A (A<sub>2A</sub>R) und bewirkt

dort eine Hemmung der Zellproliferation, eine Inhibition der IL-6-Expression und eine verstärkte TGF- $\beta$ -Expression, welche wiederum die Entstehung von pT<sub>reg</sub>S begünstigt. Des Weiteren inhibiert Adenosin die Reifung von DCs, was zu einer geringeren Aktivierung von T<sub>conv</sub> führt. Als dritten Mechanismus gelangt cAMP über sogenannte gap junctions in T<sub>conv</sub> und bewirkt dort eine Inhibition der IL-2-Synthese und Zellproliferation<sup>24,52,98,99</sup>.

Schließlich können nT<sub>reg</sub>S ihre inhibitorische Wirkung nicht nur über die direkte Interaktion mit T<sub>conv</sub> vermitteln, sondern beeinflussen zudem die Funktionalität von APCs (vor allem DCs), welche für die Aktivierung von T<sub>conv</sub> essentiell sind<sup>24</sup>. Ein charakteristisches immunsupprimierendes Molekül ist CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein4*)<sup>63,78,100</sup>. Es handelt sich dabei um ein CD28-Analogon, das an CD80 oder CD86 auf APCs bindet und damit die Kostimulation durch CD80/CD86-CD28-Interaktion verhindert<sup>100–102</sup>. Zudem bewirkt die Bindung von CTLA-4 an DCs eine verminderte Expression von CD80 und CD86 sowie die Induktion des Enzyms IDO (*Indolamin-2,3-Dioxygenase*), welches die Zellproliferation von T<sub>conv</sub> hemmt<sup>100–102</sup>. Interessanterweise begünstigt die Expression von IDO außerdem die Induktion von pT<sub>reg</sub>S<sup>103</sup>. Weitere Moleküle, die indirekt zur T<sub>conv</sub>-Suppression beitragen, sind LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*), TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) und Neuropilin-1<sup>24,64,68,104,105</sup>. LAG-3 ist ein CD4-Analogon und Mausstudien konnten zeigen, dass Anti-LAG-3-Antikörper die Suppressionsfähigkeit von nT<sub>reg</sub>S *in vitro* vollständig inhibieren<sup>62,68</sup>. TIGIT ist ein Rezeptor, der unter anderem von nT<sub>reg</sub>S exprimiert wird und durch Bindung des Poliovirus Rezeptors (PVR) an DCs die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 initiiert<sup>104</sup>. Neuropilin-1 wiederum bewirkt, bei Fehlen proinflammatorischer Stimuli, dass iDCs bevorzugt an nT<sub>reg</sub>S statt T<sub>conv</sub> binden und sich die nT<sub>reg</sub>-iDC-Interaktionszeit verlängert<sup>105</sup>. Dadurch kommt es anstelle einer T<sub>conv</sub>-Aktivierung zu einer Inhibition der Immunantwort<sup>105</sup>.

#### 1.1.2.1.1.1. nT<sub>reg</sub>-Defizienzen in der klinischen Immunologie

Die Kenntnis der Mechanismen, über die nT<sub>reg</sub>S die Suppression von T<sub>conv</sub> vermitteln, führt heute auch zu einem besseren Verständnis bestimmter Krankheitsbilder. Neben dem IPEX-Krankheitsbild als Maximalform der nT<sub>reg</sub>-Defizienz gibt es eine Reihe von weiteren, zum Teil IPEX-ähnlichen, Erkrankungen, bei denen eine quantitative oder funktionelle nT<sub>reg</sub>-Defizienz bzw. Störungen der TCR-Signaltransduktion in nT<sub>reg</sub>S vorliegen<sup>29,106</sup>.

Zu den genetischen nT<sub>reg</sub>-Defekten gehören neben dem IPEX-Syndrom vorrangig die CD25-Defizienz, die STAT5B-Defizienz sowie IPEX-ähnliche Syndrome<sup>107</sup>. Alle diese hereditären Krankheitsbilder führen beim Menschen zu einer ausgeprägten Immundysregulation, die sowohl mit einer Infektneigung als auch mit Autoimmunerkrankungen einhergeht<sup>107,108</sup>. Die CD25-Defizienz wurde erstmalig 1997 bei einem Jungen beschrieben, der

an chronischen Virusinfektionen, Gedeihstörungen, Hepatosplenomegalie und lymphozytären Infiltraten in Lunge, Leber und Darm litt<sup>109</sup>. Während die Infektneigung auf eine eingeschränkte T<sub>conv</sub>-Proliferation zurückgeführt wurde, zeigte eine Symptombesserung nach immunsuppressiver Behandlung, dass die inflammatorischen Veränderungen Ausdruck von Autoimmunität waren<sup>109</sup>. Die STAT5B-Defizienz geht mit einer Wachstumsretardierung und, ähnlich wie bei der CD25-Defizienz, rezidivierenden bakteriellen und viralen Infekten, Ekzemen, Thyreoiditis und chronischer Diarrhoe einher<sup>107,108</sup>. Aus einer Mausstudie von Burchill *et al.* ist bekannt, dass STAT5B die Differenzierung von Vorläufer-T<sub>reg</sub>s zu nT<sub>reg</sub>s im Thymus unterstützt<sup>110</sup>. Immunologische Untersuchungen von STAT5B-Patienten ergaben eine geringe FoxP3-Expression sowie eine verminderte T<sub>conv</sub>-Suppression von nT<sub>reg</sub>s; allerdings zeigten einige Patienten auch quantitativ normwertige nT<sub>reg</sub>s<sup>108,111</sup>. Bei anderen Patienten mit IPEX-ähnlichen Krankheitserscheinungen fanden sich durch *Whole Exome Sequencing* (WES) Mutationen im CTLA-4-Gen und LRBA-Gen (*LPS-responsive and beige-like anchor*)<sup>112,113</sup>. Sowohl CTLA-4- als auch LRBA-defiziente Patienten zeigten, neben den klinischen Zeichen einer immunologischen Dysregulation, eine herabgesetzte Expression von FoxP3 und CD25 in CD4+ T-Zellen sowie eine verminderte nT<sub>reg</sub>-Funktionalität *in vitro*<sup>112,113</sup>. Interessanterweise reguliert LRBA die Expression von CTLA-4, was die ähnliche Symptomatik bei Mutationen dieser Gene erklärt<sup>112,113</sup>. Tatsächlich führt die Therapie mit dem CTLA-4-bindenden Fusionsprotein Abatacept zu einer signifikanten klinischen Besserung bei LRBA-defizienten Patienten<sup>114</sup>.

Weitere funktionelle nT<sub>reg</sub>-Defizienzen entstehen durch Mutationen der Gene AIRE und XIAP<sup>107,115</sup>. Die AIRE-Defizienz wird auch APECED-Syndrom (*autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis and ectodermal dystrophy syndrome*) oder APS Typ 1 (*autoimmune pluriglandular syndrome Typ 1*) genannt. Der *autoimmune regulator* (AIRE) bewirkt im Thymus die Präsentation körpereigener, organspezifischer Antigene und trägt damit entscheidend zur Entwicklung der zentralen Toleranz bei<sup>116</sup>. Das APECED-Syndrom ist durch eine Trias aus mukokutaner Candidiasis, Hypoparathyreoidismus und einem Morbus Addison charakterisiert und die Patienten zeigen, anders als AIRE<sup>-/-</sup> Mäuse, eine verminderte Expression von FoxP3 und eine eingeschränkte T<sub>conv</sub>-Suppression *in vitro*<sup>107,117</sup>. Auch das XIAP-Syndrom (= XLP2-Syndrom) geht mit einer eingeschränkten nT<sub>reg</sub>-Funktion und FoxP3-Stabilität einher. Das klinische Bild besteht vor allem aus einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, Hepatosplenomegalie und hämophagozytischer Lymphohistiozytose, die meist durch EBV-Infektionen ausgelöst wird<sup>107,118</sup>. XIAP ist ein antiapoptotisches Protein dessen Verlust zu einer verstärkten Apoptose von Lymphozyten und einer verminderten Expression von SOCS1 führt<sup>118,119</sup>. Hsieh *et al.* zeigten, dass SOCS1 wiederum eine bedeutsame Rolle für die Stabilität

von FoxP3 spielt, sodass der SOCS1-Verlust einen Aspekt der nT<sub>reg</sub>-Defizienz bei XIAP-Patienten erklärt<sup>119</sup>.

Auch Störungen der TCR-Signaltransduktion können mit einer nT<sub>reg</sub>-Defizienz einhergehen. Bindet ein Antigen an den TCR-Rezeptor, kommt es intrazellulär zu einer Bindung von Effektor-kinasen, z. B. Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*), ZAP70 (*ζ-chain-associated protein of 70 kDa*), ITK (*IL-2-inducible T cell kinase*) und MST1 (*mammalian sterile 20-like protein 1*), die über mehrere Phosphorylierungsschritte unterschiedliche Signalkaskaden und damit eine Veränderung der Gentranskription auslösen können<sup>120–124</sup>. Mutationen in den Genen von Lck, ZAP70, Itk und MST1 führen zum klinischen Bild eines kombinierten Immundefekts mit Zeichen der Immundefizienz und gleichzeitigem Vorliegen von Autoimmunerkrankungen (z. B. retinaler Vaskulitis, Thyreoiditis, chronischer Diarrhoe, idiopathischer thrombozytopenischer Purpura, autoimmunhämolytischer Anämie), was auf eine Funktionsstörung von nT<sub>reg</sub>S hindeuten kann<sup>107,125,126</sup>. Tatsächlich zeigten Studien mit Itk<sup>-/-</sup> bzw. Lck<sup>-/-</sup> Mäusen eine eingeschränkte T<sub>conv</sub>-Suppression von nT<sub>reg</sub>S und für MST1<sup>-/-</sup> Mäuse ließ sich eine verringerte FoxP3-Expression nachweisen<sup>121,122,127</sup>. Für die ZAP70-Defizienz wurde in humanen Thymuspräparaten eine reduzierte Anzahl von nT<sub>reg</sub>S gezeigt<sup>128</sup>. Blutuntersuchungen von ZAP70-defizienten Patienten ergaben ferner eine verringerte Expression von TGF-β und CTLA-4, was möglicherweise eine eingeschränkte nT<sub>reg</sub>-Funktion *in vivo* begünstigt<sup>120</sup>. Das *stromal interaction molecule 1* (Stim1) wird ebenfalls, über einige Zwischenschritte, durch Bindung eines Antigens an den TCR aktiviert<sup>129</sup>. Stim1 bewirkt die Öffnung des Calciumkanals CRAC (*calcium release-activated calcium channel protein 1*), wodurch schließlich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) hervorgerufen wird<sup>129</sup>. Da NFAT in nT<sub>reg</sub>S die Expression von FoxP3 induziert, führen sowohl Genmutationen von Stim1 als auch von ORAI1, welches für den CRAC-Kanal kodiert, zu Autoimmunerkrankungen<sup>129</sup>. Stim1- und ORAI1-defiziente Patienten zeigen, neben einer ausgeprägten Immundefizienz mit Infektneigung, auch eine autoimmun vermittelte Anämie und Thrombozytopenie sowie Ekzeme<sup>115,130</sup>. Picard *et al.* konnten bei einem Patienten mit Stim1-Defizienz stark erniedrigte nT<sub>reg</sub>-Zahlen nachweisen, während Fuchs *et al.* quantitativ normwertige nT<sub>reg</sub>S fanden, diese jedoch einen abnormalen Phänotyp mit reduzierter Expression von CD25 und CD39 aufwiesen<sup>115,130</sup>.

Weitere Krankheitsbilder, die mit einer nT<sub>reg</sub>-Defizienz assoziiert werden, sind das variable Immundefektsyndrom (CVID, *common variable immunodeficiency*), das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) und autosomal-dominant vererbte Hyper-IgE-Syndrome (AD-HIES)<sup>131–133</sup>. CVID ist ein angeborener Immundefekt, der vor allem durch den Mangel von Immunglobulinen und einer dadurch bedingten Infektneigung charakterisiert ist<sup>132,134</sup>. Einige Studien zeigten bei CVID-Patienten jedoch auch eine quantitative und funktionelle

Einschränkung von  $nT_{regS}$ , welche klinisch häufig mit Autoimmunerscheinungen einherging<sup>132,134</sup>. Das WAS basiert auf einem X-chromosomal vererbten Defekt des Wiskott-Aldrich-Syndrom-Gens und geht mit der Trias Ekzem, Thrombozytopenie und rezidivierenden Infekten einher<sup>131</sup>. Bei einigen WAS-Patienten liegen zusätzlich Autoimmunerscheinungen (z. B. Vaskulitis, Arthritis, Colitis) vor, was auf einen möglichen Einfluss von  $nT_{regS}$  bei der Entstehung von WAS hindeuten kann<sup>131,135</sup>. Marangoni *et al.* zeigten, dass WAS-Patienten zwar keine verringerte  $nT_{reg}$ -Zahl aufweisen, die Suppression von  $T_{conv}$  durch  $nT_{regS}$  *in vitro* jedoch stark eingeschränkt ist<sup>135</sup>. Das AD-HIES umfasst eine heterogene Gruppe angeborener Immundefekte, die zum Teil durch die Mutation von STAT3 verursacht werden<sup>133</sup>. Klinisch zeigt sich ein variables Bild mit rezidivierenden Hautabszessen, pulmonalen Infekten, Ekzemen, Zahnanomalien und atopischer Dermatitis<sup>136</sup>. Immunologische Untersuchungen zeigten, dass die IL-10- bzw. DC-vermittelte Generation von  $iT_{regS}$  bei Patienten mit AD-HIES gestört ist<sup>136</sup>. Daher wird vor allem für die inflammatorischen Hautveränderungen bei AD-HIES eine Rolle von  $iT_{regS}$  vermutet<sup>133,136</sup>.

Die Funktion von  $nT_{regS}$  steht somit im engen Zusammenhang mit einer Reihe von primären Immundefekten, deren gemeinsames Merkmal das gleichzeitige Vorliegen von Autoimmunität und Immundefizienz ist. Möglicherweise könnte die Bestimmung von  $nT_{regS}$  künftig einen geeigneten Verlaufsparemeter für die Behandlung der genannten Krankheitsbilder darstellen<sup>133</sup>. Durch die weitere Erforschung von  $nT_{regS}$  und  $nT_{reg}$ -basierten Therapien lassen sich außerdem weitere Erkenntnisse über die Pathophysiologie und mögliche Behandlungsansätze seltener Erkrankungen gewinnen.

## 1.2. Allogene Stammzelltransplantation und Graft-versus-Host-Erkrankung

Die Stammzelltransplantation (*hematopoietic stem cell transplantation, HSCT*) ist für eine Reihe maligner und nicht-maligner Erkrankungen die einzige kurative Therapieoption<sup>137</sup>. Hierbei werden hämatopoetische Stammzellen eines Spenders in einen Empfänger transferiert<sup>138</sup>. Grundsätzlich unterscheidet man dabei zwischen der autologen und allogenen HSCT (allo-HSCT). Bei ersterer stammen die Stammzellen vom Patienten selbst, bei letzterer werden sie von einem Fremdspender gewonnen<sup>138</sup>. Die Nutzung alternativer Stammzellquellen und verbesserte Konditionierungsregime haben in den letzten Jahren sowohl die Verfügbarkeit als auch die Verträglichkeit der allo-HSCT verbessern können<sup>138-140</sup>. Allein in Europa wurden 2012 14.165 allo-HSCTs (42% aller HSCTs) durchgeführt, von denen 1.757 (12.4%) eine nicht-maligne Indikation hatten<sup>141</sup>.

Für die Durchführung einer allo-HSCT ist zunächst die Suche eines kompatiblen Stammzellspenders und damit die Bestimmung der Leukozytenantigene, die HLA-Typisierung,

entscheidend<sup>142</sup>. Dabei werden die MHC-Loci der Klasse I (HLA-A, -B, C) und der Klasse II (HLA-DRB1 und -DQB1) untersucht und auf die Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger überprüft<sup>142-144</sup>. Liegt eine vollständige Kompatibilität der HLA-Gene vor (9/10 oder 10/10 HLA-ident) und sind Spender und Empfänger verwandt, bezeichnet man dies als passenden Familienspender (*matched related donor, MRD*)<sup>138</sup>. Davon abzugrenzen sind Stammzellspenden von passenden oder partiell unpassenden Fremdspendern (*Matched-Unrelated Donor, MUD, bzw. partially HLA-mismatched unrelated donor, MMURD*), von HLA-haploidentischen Familienspendern (*mismatched-related donor, MMRD*) und die Nutzung von Nabelschnurblut (*umbilical chord blood, UCB*) als Stammzellquelle<sup>138,143</sup>.

Wurde ein geeigneter Spender gefunden, erfolgt die Stammzellgewinnung, für die es unterschiedliche Methoden gibt. Zum einen können Stammzellen durch die Aspiration von rotem Knochenmark isoliert und übertragen werden (*bone marrow transplantation, BMT*)<sup>145</sup>. Zum anderen kann auch eine periphere Blutstammzellspende (*peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT*) durchgeführt werden<sup>145,146</sup>. Diese Methode erfordert die Mobilisation von CD34+ Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut des Spenders, was durch die 5-tägige, subkutane Applikation des rekombinanten, humanen Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (*recombinant human granulocyte-colony stimulating factor, rhG-CSF*) erzielt wird<sup>147</sup>. Durch Leukapherese können die Stammzellen anschließend aus dem Spenderblut isoliert und in den Empfänger infundiert werden<sup>148</sup>. Welche der beiden Gewinnungsmethoden überlegen ist, wird kontrovers diskutiert<sup>145,149-151</sup>. Der PBSCT wird ein zügigeres Engraftment nach Transplantation (v.a. für neutrophile Granulozyten und Thrombozyten), aber auch ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Graft-versus-Host-Erkrankung zugeschrieben<sup>145,150</sup>. Bezüglich des Gesamtüberlebens zeigte eine Metaanalyse von Holtick *et al.* keine Unterschiede zwischen BMT und PBSCT<sup>149</sup>. Dennoch sind weitere Studien nötig, um vor allem die Langzeitmorbidität und -mortalität nach PBSCT zu untersuchen.

Unabhängig von der Stammzellquelle und -gewinnung ist vor der allo-HSCT grundsätzlich eine Konditionierung, bestehend aus Chemotherapie oder kombinierter Radiochemotherapie, erforderlich<sup>138</sup>. Dadurch wird nicht nur die Zerstörung gegebenenfalls verbliebener Tumorzellen bewirkt, sondern auch eine Nische im Knochenmark geschaffen, sodass die transplantierten Stammzellen anwachsen können<sup>138</sup>. Je nach Indikation und Bedeutung des Transplantat-gegen-Tumor-Effekts (*graft-versus-leukemia-effect, GVL*) sind hochdosierte myeloablative und nicht-myeloablative Protokolle sowie Regime mit reduzierter Intensität (*reduced intensity regimen, RIC*) verfügbar<sup>152,153</sup>.

Trotz großer Fortschritte in der individualisierten Auswahl der Stammzellquelle und des Konditionierungsregimes, ist die breite klinische Anwendung der allo-HSCT, vor allem bei nicht-malignen Grunderkrankungen, durch das hohe Maß an Morbidität und transplantationsassoziiertes Mortalität (*transplant-related mortality, TRM*) limitiert<sup>143,154</sup>. Je nach Grunderkrankung und HLA-Übereinstimmung schwanken die Mortalitätsraten am Tag 100 post-HSCT zwischen 7% und 27%<sup>138</sup>. Das Langzeitüberleben nach allo-HSCT beträgt 10 Jahre nach Transplantation 80.4% und 15 Jahre post-HSCT 76.3%<sup>154</sup>.

Ursächlich für die hohe TRM ist vor allem die Graft-versus-Host-Erkrankung (*graft-versus-host-disease, GVHD*), die als häufige und schwere Komplikation der allo-HSCT mit einer Inzidenz von 40% (bei MRD-HSCTs) bis 60% (bei MUD- oder MMURD-HSCTs) auftritt<sup>155,156</sup>. Grundsätzlich können zwei Formen der GVHD unterschieden werden: die akute GVHD (*aGVHD*), die sich nach der klassischen Definition < Tag 100 post-HSCT manifestiert, und die chronische (*cGVHD*), welche > Tag 100 post-HSCT auftritt<sup>157,158</sup>. Anzumerken ist jedoch, dass eine ausschließlich zeitlich definierte Unterscheidung der beiden Formen häufig unzureichend ist, da charakteristische Symptome der aGVHD auch nach Tag 100 und *vice versa* auftreten können<sup>158,159</sup>.

### 1.2.1. Die akute Graft-versus-Host-Erkrankung

Die aGVHD manifestiert sich vor allem in drei Organen; der Haut, der Leber und dem Gastrointestinaltrakt<sup>159-161</sup>. Klinisch äußert sie sich durch Dermatitis, makulopapulöse Exantheme, Abdominalschmerz, Übelkeit und Erbrechen, Diarrhoe sowie Zeichen der Leberinsuffizienz<sup>157,159</sup>. Je nach Ausprägung dieser Symptome wird die aGVHD in Grad I-IV eingeteilt<sup>162</sup>. Die Erkrankung tritt mit einer Inzidenz von 35-50% nach HSCT auf und wird durch verschiedene Risikofaktoren beeinflusst: Während unvollständige HLA-Übereinstimmung, myeloablative Konditionierungsregime, hohes Spender- und Empfängeralter und Geschlechterunterschiede (v.a. weibliche Spenderin und männlicher Empfänger) zu einem erhöhten aGVHD-Risiko führen, ist dies bei MRD- und MURD-HSCTs, RICs, CD3+ depletierten Transplantaten, GVHD-Prophylaxe und UCB als Stammzellquelle reduziert<sup>156,157</sup>. Beispielsweise konnte die Nutzung nicht-myeloablativer Konditionierungsregime bei Patienten nach MURD-PBSCT die aGVHD-Inzidenz um ca. 10% senken (von durchschnittlich 59% auf ca. 49%)<sup>156</sup>.

Pathophysiologisch lässt sich die Entstehung der aGVHD vereinfacht in drei verschiedene Phasen gliedern: (1) die Initialphase, (2) die Aktivierungsphase und (3) die Effektorphase<sup>160,163</sup>. Die Initialphase zeichnet sich durch die Ausbildung eines inflammatorischen Milieus aus<sup>158,163</sup>. Durch konditionierungsbedingte Gewebeschäden im Empfängerorganismus kommt es zu der



Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ <sup>164</sup>. Diese initiieren in der Aktivierungsphase die Interaktion von APCs mit Spender-T-Zellen, was konsekutiv eine T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung zu Th1-Zellen bewirkt<sup>158,163</sup>. Th1-Zellen zeichnen sich durch die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  aus und aktivieren darüber weitere Immunzellen wie B-Zellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und andere T-Zellen<sup>21</sup>. Schließlich folgt die Effektorphase, in welcher Spender-T-Zellen in den Empfängerzellen über Fas-FasL-Interaktion und Zytolyse Apoptose induzieren und die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  vermitteln. Ferner tragen neutrophile Granulozyten über ROS-medierte Gewebeerstörung zu der Effektorphase bei<sup>165</sup>.

Durch die Prophylaxe und Therapie der aGVHD versucht man, die verschiedenen Krankheitsphasen zu durchbrechen und ihre gegenseitige Verstärkung zu verhindern<sup>157,159</sup>. Eine prophylaktische T-Zelldepletion kann sowohl *in vitro*, durch magnetische CD34+ Anreicherung oder CD3+/CD19+ Depletion, als auch *in vivo*, durch die medikamentöse Gabe von Antithymozytenglobulin (*Anti-thymocyte globulin, ATG*) oder dem monoklonalen CD52+ Antikörper Alemtuzumab, erfolgen<sup>166</sup>. Des Weiteren ist die prophylaktische Gabe von Cyclosporin A (*CSA*) oder Tacrolimus in Kombination mit Methotrexat (*MTX*) oder Mycophenolat Mofetil (*MMF*) weit verbreitet<sup>157,167</sup>. Die Therapie der aGVHD richtet sich nach der Schwere der Erkrankung. Ab einem Grad  $\geq$  II wird die Gabe von 2.0-2.5 mg/kg/Tag Methylprednisolon empfohlen<sup>157,168</sup>. Bei steroidrefraktärer aGVHD wird eine Therapieeskalation angestrebt, die die Gabe von Substanzen wie z. B. Sirolimus, Pentostatin oder Infliximab sowie die Durchführung einer extrakorporalen Photopherese (*extracorporeal photopheresis, ECP*) beinhalten kann<sup>167,168</sup>. Darüber hinaus sind supportive Maßnahmen wie Infektionsprophylaxe, adäquate Schmerztherapie, Flüssigkeitssubstitution und Hautpflege von großer Bedeutung<sup>157</sup>. Das Langzeitüberleben bei aGVHD hängt vor allem von dem Erkrankungsgrad und dem Therapieansprechen ab und schwankt zwischen 5% (bei Grad IV) und 80% (bei Grad I-II)<sup>157</sup>.

Neben der aGVHD sind als weitere Komplikationen der allo-HSCT Infektionen, Virusreaktivierungen, Transplantatversagen (*graft failure, GF*), gonadale Dysfunktion, die venöse okklusive Leberkrankheit (*veno-occlusive disease, VOD*) sowie andere Organdysfunktionen, maligne Rezidive und sekundäre Malignome zu nennen<sup>169-171</sup>. Viele dieser Erkrankungen stehen in engem Zusammenhang mit der GVHD oder werden durch sie begünstigt<sup>170</sup>.

### 1.2.2. Die chronische Graft-versus-Host-Erkrankung

Während die frühe TRM durch die Einführung von RIC und die verbesserte Behandlung von Infektionen in den letzten Jahren abgenommen hat, konnte nur wenig Fortschritt in der

Reduktion der späten TRM verzeichnet werden<sup>153,172</sup>. Grund dafür ist vor allem die anhaltend hohe Inzidenz von 25-80% sowie die schwierige Therapie der cGVHD<sup>172,173</sup>. Die cGVHD zeichnet sich, im Gegensatz zur aGVHD, durch ein sehr heterogenes, polymorphes Erscheinungsbild aus. Am häufigsten betroffen sind Haut, Hautanhangsgebilde, orale Schleimhaut, Augen, Lunge, Leber und Gastrointestinaltrakt; grundsätzlich kann die Erkrankung jedoch jedes Organ betreffen (Tabelle 2)<sup>172-174</sup>.

**Tabelle 2. Klinische Zeichen und Symptome der cGVHD.**

ALT = Alanin-Aminotransferase; AP = Alkalische Phosphatase; Ges. Bili = Gesamtbilirubin; Th-CT = Computertomographie des Thorax. Verändert nach Jagasia, Greinix, Arora *et al.* (2015).<sup>174</sup>

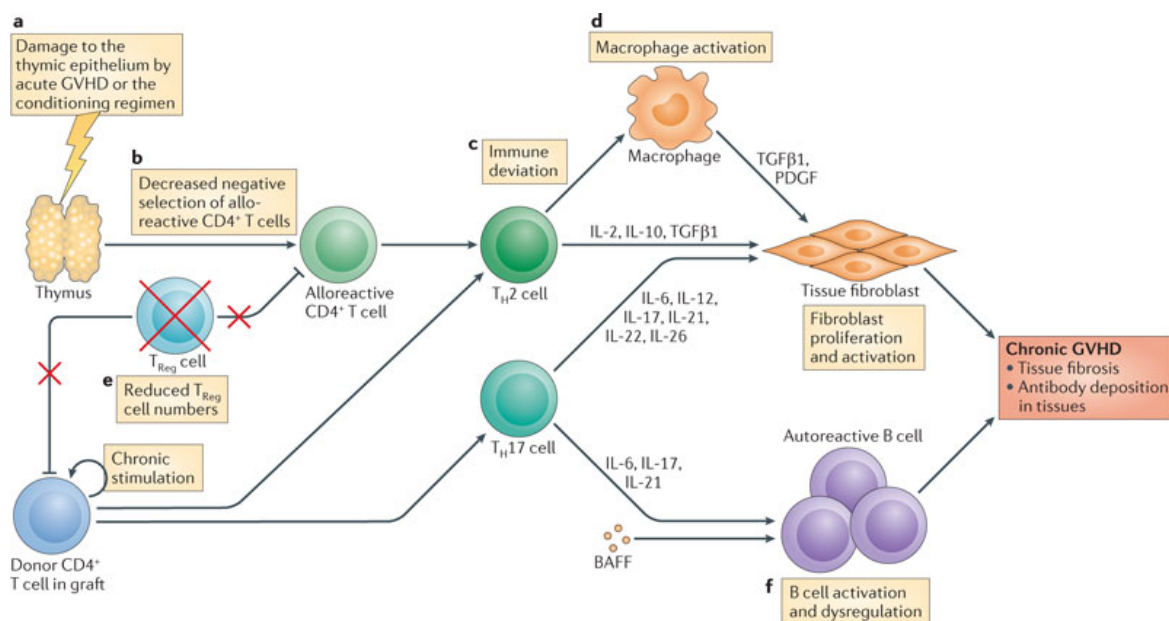
Organ	diagnostisch (pathognomisch für cGVHD)	charakteristisch (nicht-pathognomisch für cGVHD)	verbreitet (charakteristisch für aGVHD <u>und</u> cGVHD)
Haut	Poikilodermie, Lichen planus-ähnliche und sklerotische Veränderungen, Morphea	Depigmentation, Papulosquamöse Veränderungen	Erythem, makulopapulöses Exanthem, Pruritus
Nägel Behaarung		Dystrophie, Onycholyse Alopezie, Verlust der Körperbehaarung, Schuppung	
Mund	Lichen planus-ähnliche Veränderungen	Mukozelen, Pseudomembranen, Schleimhautatrophie, Ulzera, Mundtrockenheit	Gingivitis, Mukositis, Erythem, Schmerzen
Augen		(Kerato-)konjunktivitis, Sicca-Syndrom	
Genitale	Lichen planus- oder Lichen sklerosus-ähnliche Veränderungen ♀ Labienverklebung, Vernarbungen ♂ Vorhaut- + Harnröhrenverengung	Erosionen, Fissuren, Ulzerationen	
GI-Trakt	Ösophagusstrikturen, Web-Stenosen		Anorexie, Übelkeit, Diarrhoe, Gedeihstörungen
Leber			Ges. Bili, ALT und AP > 2x des oberen Referenzwerts
Lunge	Bronchiolitis obliterans	„Air trapping“ und Bronchiektasen im Th-CT	
Muskeln/ Gelenke	Fasziitis, Gelenkkontrakturen	(Poly-)Myositis	

In den letzten Jahren wurden einige Fortschritte in der Diagnostik und dem pathophysiologischen Verständnis der cGVHD erzielt<sup>172,173</sup>. Durch das NIH-finanzierte cGVHD-Konsensus-Projekt („*National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease*“) wurde die klassische Definition der cGVHD reformiert und diagnostische (Tabelle 2) sowie therapeutische Maßnahmen spezifiziert<sup>174</sup>. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen der progressiven cGVHD (*progressive cGVHD*), die direkt aus einer aGVHD entsteht, einer cGVHD nach krankheitsfreiem Intervall (*quiescent cGVHD*) und einer cGVHD ohne vorangegangener aGVHD

(*de novo* cGVHD)<sup>175</sup>. Zudem gibt es heute neben diesen klassischen cGVHD-Formen (cGVHD-spezifische Symptome nach Tag 100 post-HSCT) zusätzlich die sogenannte überlappende cGVHD (*overlap cGVHD*), bei der sowohl Zeichen der cGVHD als auch der aGVHD vorliegen. Ähnlich wie die aGVHD wird auch das Auftreten einer cGVHD durch HLA-Disparität, hohes Spender- und Empfängeralter, einen hohen T-Zellanteil im Transplantat, und Geschlechterunterschiede (v.a. weibliche Spenderin und männlicher Empfänger) begünstigt<sup>172</sup>. Der wichtigste Risikofaktor ist jedoch eine vorangegangene aGVHD<sup>172</sup>. Inwiefern die Stammzellquelle (PBSCs vs. BM) und das Konditionierungsregime das Auftreten einer cGVHD beeinflussen, wird kontrovers diskutiert<sup>150,151,153,176</sup>.

### 1.2.2.1. Pathogenese der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung

Pathophysiologisch ist die cGVHD durch ein hochkomplexes Zusammenspiel verschiedener Immunprozesse charakterisiert, die vor allem B- und T-Zellen umfassen<sup>172</sup>. Trotz der Entwicklung neuer Mausmodelle, liegt bis heute kein vollständiges Verständnis der cGVHD vor und weitere Forschung ist nötig, um zielgerichtete Therapie- und Präventionsansätze weiterzuentwickeln<sup>172,175,177</sup>. Fest steht, dass es sich, anders als ursprünglich angenommen, nicht um eine ausschließlich Th2-vermittelte Erkrankung handelt<sup>172,178–181</sup>. Aktuell werden folgende vier pathogenetische Mechanismen der cGVHD beschrieben: (1) Thymusdestruktion und Verlust der zentralen Toleranz, (2) T<sub>reg</sub>-Defizienz und Verlust der peripheren Toleranz, (3) Störung der B-Zell-Homöostase und Autoantikörperformation, (4) fibrotische Veränderungen (Abbildung 4)<sup>172,175,177</sup>.



**Abbildung 4. Pathophysiologische Prozesse bei der Entstehung der cGVHD.**

Zum derzeitigen Kenntnisstand bestehen mindestens vier Mechanismen, die zu der Entstehung der cGVHD beitragen: Zunächst kommt es durch konditionierungsbedingte und/oder aGVHD-bedingte Gewebeschäden im Thymus zu einer Störung der zentralen Toleranz (a+b). Durch defiziente  $T_{reg}$ s kommt es zudem zu einem Verlust der peripheren Toleranz (e), was das Persistieren alloreaktiver T-Zellen zur Folge hat. Diese können dann zu Th2, Th17 oder Th1-Zellen (nicht abgebildet) differenzieren (c) und über Zytokinsekretion die Aktivierung von Makrophagen (d), Fibroblasten und allo- bzw. autoreaktiven B-Zellen vermitteln, was schließlich zu einer Gewebeerstörung und Organfibrose führt. Aus Blazar, Murphy und Abedi (2012).<sup>158</sup>

Durch konditionierungs- und aGVHD-bedingte Schädigung der Thymusepithelzellen kommt es zu einer Störung der zentralen Toleranz<sup>175,182</sup>. Die Prozesse der positiven und negativen Selektion verlaufen fehlerhaft und alloreaktive T-Zellen gelangen in die Peripherie, wo sie auf ihre Alloantigene treffen und cGVHD-typische Manifestationen hervorrufen<sup>183,184</sup>. Im Mausmodell wurde hierzu gezeigt, dass der Schutz des Thymus durch Applikation von FGF7 (*fibroblast growth factor 7*) bzw. die Behandlung mit HGF (*hepatocyte growth factor*) die Entstehung einer cGVHD verhindern kann<sup>184,185</sup>.

Gelangen alloreaktive T-Zellen in die Peripherie, sorgen im gesunden Organismus Mechanismen der peripheren Toleranz für eine Verhinderung von Auto- bzw. Alloimmunität. Eine essentielle Rolle spielen dabei die Suppressionsmechanismen von  $nT_{reg}$ s. Zahlreiche Studien zeigten eine quantitative  $nT_{reg}$ -Defizienz bei Patienten mit cGVHD<sup>186–189</sup>. Vor allem mukosale und naive  $nT_{reg}$ s sind nach HSCT vermindert und es liegt insgesamt eine erhöhte  $nT_{reg}$ -Suszeptibilität gegenüber  $T_{conv}$ -vermittelter Apoptoseinduktion vor<sup>188,189</sup>. Inwiefern diese Beobachtungen die Entwicklung und das Ausmaß der cGVHD bedingen, ist bisher unklar<sup>172,175</sup>. Präklinische und erste klinische Studien suggerieren jedoch, dass sowohl die *in vivo* Induktion von  $nT_{reg}$ s als auch deren *ex vivo* Expansion mit nachfolgendem adoptiven Zelltransfer (*adoptive cell transfer, ACT*) zu einer Verhinderung bzw. klinischen Besserung der cGVHD führen kann<sup>190–195</sup>.

B-Zellen tragen über verschiedene Mechanismen zu der Entstehung der cGVHD bei<sup>172,178,179,196</sup>. Beispielsweise wurden in Patienten mit cGVHD sowohl auto- als auch alloreaktive Antikörper nachgewiesen<sup>172,196</sup>. Erstere richten sich gegen nicht-polymorphe Autoantigene, wie z. B. den *Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)*, und induzieren bei Antigenbindung die Akkumulation von ROS sowie die Bildung von Typ-1-Kollagen<sup>172,175</sup>. Man vermutet daher, dass B-Zellen unter anderem für die bei der cGVHD beobachteten fibrotischen Prozesse verantwortlich sind<sup>172</sup>. Dass B-Zellen eine bedeutsame Rolle bei der Entstehung der cGVHD spielen, wird nicht zuletzt dadurch deutlich, dass die Gabe von Rituximab (monoklonaler Antikörper gegen den B-Zell-Marker CD20) bei > 50% der cGVHD-Patienten zu einem klinischen Ansprechen führt<sup>180</sup>.

### 1.2.2.2. Zelluläre Biomarker der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung

Ein Ansatz, neue Erkenntnisse bezüglich der Pathophysiologie der cGVHD zu gewinnen, besteht in der Identifikation von Biomarkern<sup>197,198</sup>. Die NIH (*National Institutes of Health*) definiert Biomarker als Merkmale, die objektiv messbar sind und sich als Indikator für natürliche biologische Prozesse, pathologische Prozesse oder das Therapieansprechen eignen<sup>197,198</sup>. Sie sind nicht nur von diagnostischer und prognostischer Bedeutung, sondern können auch zu der Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen<sup>186,197</sup>.

Trotz intensiver Forschungsarbeit konnten bisher nur wenige potentielle Marker für das Vorliegen einer cGVHD, den Erkrankungsschweregrad, das Erkrankungsrisiko oder das Therapieansprechen identifiziert werden<sup>186,197</sup>. Die Bestimmung von genetischen Merkmalen (z. B. HLA-Disparität und nicht-HLA-Genpolymorphismen) erlaubt vor allem Aussagen über das Erkrankungsrisiko, einige Immunzellpopulationen weisen hingegen charakteristische Befunde bei manifester cGVHD auf (Tabelle 3)<sup>178,181,186–188,197,199</sup>. Da zum Teil jedoch kontroverse Erkenntnisse vorliegen und bisher keiner der Marker für die klinische Anwendung etabliert werden konnte, sind große klinische Studien notwendig, um die Verlässlichkeit, Spezifität und Eignung dieser potentiellen Biomarker zu validieren<sup>178,181,186–188,197,199</sup>.

#### Tabelle 3. Potentielle zelluläre Biomarker für die Diagnose einer cGVHD.

↑ = erhöhte Zellzahlen, ↓ = erniedrigte Zellzahlen. Als Referenzen sind Patienten ohne bzw. mit inaktiver cGVHD nach allo-HSCT oder gesunde Probanden gewählt. Verändert nach Pidala, Sarwal und Roedder *et al.*<sup>186</sup> (2014) sowie Rozmus und Schulz<sup>197</sup> (2011).

Zelltyp	Phänotyp	Befund bei cGVHD
T-Zellen, gesamt	CD3+	↑
T <sub>reg</sub> S	CD3+ CD4+ CD25+ FoxP3+	↓
Th17-Zellen	CD3+ CD4+ IL17+	↑
TEMRA CD8+ Zellen	CD3+ CD8+ CCR7- CD45RA+	↑
Naive CD8+ Zellen	CD3+ CD8+ CCR7+ CD45RA+	↓
CD4+ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen	CD3+ CD4+ CCR7+ CD62L <sup>low</sup>	↑
NK-T-Zellen	CD3+ CD56+	↓
NK-Zellen	CD16+ CD56+	↓
pDCs	LIN- HLA-DR+ CD123+	Wenn ↑, dann erhöhtes Risiko für cGVHD
Monozyten	CD45+ CD14+	↑
Eosinophile Granulozyten		↑
B-Zellen, gesamt	CD19+	↓
Gedächtnis-B-Zellen, gesamt	CD19+ CD27+	↓
IgM Gedächtnis-B-Zellen	CD19+ CD27+ IgM+	↓
Klassen-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen	CD19+ CD27+ IgM-	↓
Nicht-Klassen-gewechselte Gedächtnis-B-Zellen	CD19+ CD27+ IgD+	↓
Naive B-Zellen	CD19+ IgD+ CD38 <sup>low</sup> CD27-	↓
Plasmablasten	CD19+ IgD <sup>low</sup> CD38 <sup>high</sup> CD27+	↑
Unreife CD21 <sup>low</sup> B-Zellen	CD19+ CD21 <sup>low</sup>	↑
TLR-9+ B-Zellen	CD19+ TLR-9+	↑

### 1.2.2.3. Therapie der chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung

Die Therapie der cGVHD gliedert sich in verschiedene Säulen und je nach Erkrankungsschwere (mild, moderat, schwer) kommen unterschiedliche Therapieansätze zum Einsatz. Grundsätzlich sind supportive Maßnahmen, eine enge klinische Überwachung und eine interdisziplinäre Patientenbetreuung für den Therapieerfolg unverzichtbar<sup>200–202</sup>. Die milde cGVHD (keine Lungenbeteiligung,  $\leq 2$  leichte Organbeteiligungen) kann durch topische oder systemische immunsuppressive Therapieansätze behandelt werden<sup>200–202</sup>. Für die lokale Anwendung sind beispielsweise topische Steroide (z. B. Budesonid, Dexamethason, Clobetasol), Tacrolimus oder PUVA-Photochemotherapien geeignet<sup>201,203–205</sup>. Moderate ( $\geq 3$  leichte bis moderate Organbeteiligungen, keine bis leichte Lungenbeteiligung) und schwere ( $\geq 3$  Organbeteiligungen, mind. eine davon schwer, moderate oder schwere Lungenbeteiligung) Formen der cGVHD werden hingegen stets mit systemischer Immunsuppression therapiert<sup>200–202</sup>. Dabei wird vor allem bei der schweren cGVHD eine primäre Kombinationstherapie mit Prednisolon + Cyclosporin A oder Prednisolon + Tacrolimus empfohlen<sup>201,202,205–208</sup>. Glukokortikoide (wie z. B. Prednisolon) sind somit bis heute in der Erstlinientherapie der cGVHD von zentraler Bedeutung<sup>200,201,209</sup>. Die Langzeitbehandlung mit Steroiden führt jedoch zu schweren Nebenwirkungen wie z. B. dem Cushing-Syndrom oder Osteolysen, weshalb systemische Glukokortikoid-Monotherapien heutzutage zunehmend vermieden werden<sup>201,209,210</sup>.

Trotz intensiver immunsuppressiver Therapie benötigen 50-60% aller Patienten mit cGVHD innerhalb von zwei Jahren nach Diagnosestellung eine Zweitlinientherapie<sup>209,211</sup>. Häufig wird dann von einer steroidrefraktären cGVHD gesprochen<sup>201,209</sup>. Es sind eine Reihe verschiedener Medikamente und Behandlungen für die Zweitlinientherapie der cGVHD verfügbar (Tabelle 4), jedoch fehlen evidenzbasierte Empfehlungen für die optimale, individualisierte Auswahl eines Wirkstoffs<sup>200,201,209</sup>.

**Tabelle 4. Medikamente und Behandlungen in der Zweitlinientherapie der cGVHD.**

ECP = Extrakorporale Photopherese, MSC = Mesenchymale Stammzellen, MMF = Mycophenolat-Mofetil, CNI = Calcineurin-Inhibitor, MTX = Methotrexat, t.a. = thorakoabdominal. Verändert nach Inamoto und Flowers (2011).<sup>212</sup> Ergänzt um Trzonkowski, Dukat-Mazurek und Bieniaszewska *et al.* (2009)<sup>190</sup>, Theil, Tuve und Oelschlägel *et al.* (2015)<sup>191</sup>, Zeiser, Burchert und Lengerke *et al.* (2015)<sup>213</sup>, Miklos, Cutler und Arora *et al.* (2017)<sup>214</sup> und Herrera, Kim und Bindra *et al.* (2014)<sup>215</sup>.

Medikament / Behandlung	Angriffspunkt	Ansprechrate in %	Überleben in %
ECP	T-Zellen, DCs	65-70	70-78 (nach 1J)
Rituximab	B-Zellen (CD20)	66-86	72 (nach 1J)
Imatinib	TGF- $\beta$ , PDGF	22-79	75-84 (nach 1.5J)
Pentostatin	T- und B-Lymphozyten	53-56	34-60 (nach 1-3J)
MSC	multidimensional	50-74	78 (nach 2J)
MMF	T- und B-Lymphozyten	26-64	67-96 (nach 1J)
mTor-Inhibitoren	T-Zellen	76	72 (nach 3J)
IL-2	T <sub>reg</sub> S	52-61 <sup>216</sup>	unbekannt
CNI	T-Zellen	Gesamtansprechen dieser Therapien: 20-82	
Methylprednisolon, hochdosiert	multidimensional		
MTX	T- und B-Lymphozyten		
Thalidomid	unbekannt		
Hydroxychloroquin	unbekannt		
Clofazimin	unbekannt		
Bestrahlung (t.a.)	multidimensional		
Alefacept	T-Zellen		
Infliximab	TNF- $\alpha$		
nT <sub>reg</sub> -ACT <sup>190,191</sup>	multidimensional	40-100	60
Ruxolitinib <sup>213</sup>	Januskinase-1 und -2	85.4	97.4 (nach 6M)
Ibrutinib <sup>214</sup>	Bruton-Tyrosinkinase	64	unbekannt
Bortezomib <sup>215</sup>	Proteasom	80	73 (nach 2J)

Die Wirkmechanismen der Zweitlinien-Therapeutika sind vielfältig und neue Erkenntnisse lassen die Zahl unterschiedlicher Substanzen steigen<sup>200</sup>. Während Antimetabolite wie MTX, Pentostatin und MMF sowohl die Proliferation von B- als auch von T-Zellen inhibieren, wirken mTor-Inhibitoren wie Sirolimus und Calcineurin-Inhibitoren wie CSA und Tacrolimus vor allem auf T-Zellen<sup>217-220</sup>. Monoklonale Antikörper wirken noch spezifischer, z. B. durch Bindung an B-Zellen (Rituximab) bzw. TNF- $\alpha$  (Infliximab) oder die gezielte Blockade des JAK-STAT-Signalwegs (Ruxolitinib)<sup>200,213,217</sup>. Auch nicht-pharmakologische Behandlungen wie ECP, die Infusion von MSCs und Bestrahlungstherapien werden durchgeführt<sup>202,221,222</sup>. Der Großteil dieser Therapieansätze zeichnet sich durch ein hohes Maß an Toxizität aus<sup>173,200,212,217</sup>. Nebenwirkungen wie Infektionen, Zytopenien, Hyperlipidämie, Wundheilungsstörungen und Organdysfunktionen können eine weitere Verschlechterung der cGVHD bewirken und reduzieren die allgemeine Lebensqualität<sup>173,212,217</sup>. Dies ist, neben der umstrittenen Effektivität der verfügbaren cGVHD-Zweitlinien-Therapeutika, ein Grund weshalb die Prognose der cGVHD mit einer durchschnittlichen Therapiedauer von 28 Monaten und einer Mortalität von ca. 40% nach 7 Jahren sehr schlecht ausfällt<sup>223</sup>. Unklar ist außerdem, ob mit den beschriebenen Therapieoptionen eine langfristige Vermittlung von immunologischer Selbsttoleranz erzielt

werden kann, welche das erfolgreiche Absetzen sämtlicher immunsupprimierender Medikamente ermöglichen würde<sup>200,209</sup>. Genau dies ist jedoch die Anforderung an eine optimale Therapie der cGVHD: Es soll nicht nur eine klinische Besserung und eine Reduktion der Krankheitsaktivität erreicht, sondern vor allem das immunologische Gleichgewicht zwischen regulatorischen und proinflammatorischen Zellen wiederhergestellt werden. Therapiebedingte Toxizität und Immundefizienz gilt es hingegen zu minimieren<sup>200,209</sup>. Somit besteht der Bedarf, weitere therapeutische Ansätze zu explorieren, um die Mortalität und Morbidität der cGVHD zu senken und den Betroffenen effektive und verträgliche Behandlungsoptionen anbieten zu können.

#### **1.2.2.4. Pädiatrische Besonderheiten der HSCT und chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung**

Pädiatrische HSCT- und cGVHD-Patienten weisen einige Unterschiede im Vergleich zu Erwachsenen auf. Zunächst wird die allo-HSCT mit einem Anteil von 79% an der Gesamtzahl durchgeführter HSCTs bei Kindern deutlich häufiger durchgeführt als bei Erwachsenen<sup>141</sup>. Auch die Indikationen weisen ein anderes Spektrum auf; angeborene Immundefekte (*primary immunodeficiencies, PIDs*), Knochenmarksversagen (*bone marrow failure, BMF*) und Hämoglobinopathien sind bei Kindern zunehmende Indikationen für die Durchführung einer allo-HSCT<sup>141</sup>. Im Bezug auf die Stammzellquelle findet UCB in der Pädiatrie breitere Anwendung als bei Erwachsenen<sup>224</sup>. Grund dafür ist vor allem die begrenzte Zellzahl pro UCB-Einheit, welche für Erwachsene häufig nicht ausreichend ist<sup>224</sup>.

Das Auftreten der cGVHD ist bei Kindern mit einer 3-Jahres-Wahrscheinlichkeit von 19-33% niedriger als bei erwachsenen Patienten, dennoch führt auch hier der vermehrte Einsatz von MUD- und MMUD-Spendern und die Zunahme von HSCT-Indikationen zu einer steigenden Inzidenz<sup>225,226</sup>. Da häufig das Knochenwachstum, die Reifung einiger Organe und die psychosoziale Entwicklung noch nicht abgeschlossen sind, zeichnen sich pädiatrische Patienten ferner durch besondere Vulnerabilität gegenüber Medikamententoxizität und Spätfolgen der Konditionierungstherapie aus<sup>227,228</sup>. Besonders die dauerhafte Verabreichung von Glukokortikoiden als Therapie der cGVHD führt bei Kindern zu erheblichen Langzeitschäden wie anhaltendem Wachstumsmangel und Osteopenie<sup>210,229</sup>. Folglich ist in der Pädiatrie die Identifikation neuer, effektiver und nebenwirkungsarmer Ansätze zur erfolgreichen Behandlung der cGVHD von besonderer Bedeutung.

### **1.3. Adoptiver Zelltransfer von regulatorischen T-Zellen**

Einen neuen Ansatz in der Behandlung der cGVHD stellt der adoptive Zelltransfer von regulatorischen T-Zellen (nT<sub>reg</sub>-ACT) dar. Taylor *et al.* zeigten 2002 erstmalig in einem GVHD-Mausmodell, dass



aktivierte, *ex vivo* expandierte CD4+CD25+ Zellen die Entstehung einer GVHD-Erkrankung potent verhindern<sup>230</sup>. Zunächst beschrieb die Arbeitsgruppe, dass sämtliche BALB/c SCID-Mäuse, denen allogene, CD25 depletierte T-Zellen infundiert wurden, GVHD-Symptome entwickelten und innerhalb von 7 Tagen verstarben<sup>230</sup>. Von Mäusen, die gleichzeitig CD25 depletierte und CD4+CD25+ T-Zellen in einem Verhältnis von 2:1 erhielten, überlebten jedoch 5/6 und vier der überlebenden Mäuse zeigten keinerlei GVHD-Symptome<sup>230</sup>. Eine Arbeit von Edinger *et al.* ergab ferner, dass die Applikation von nT<sub>reg</sub>s nach HSCT zu keiner erhöhten Rate maligner Rezidive führt<sup>231</sup>. nT<sub>reg</sub>s konnten GVHD-Erscheinungen verhindern, ohne dabei den GVL-Effekt zu beeinflussen<sup>231</sup>. Interessanterweise zeigten Nguyen *et al.*, dass der adoptive Transfer von nT<sub>reg</sub>s auch eine verbesserte lymphozytäre Rekonstitution nach HSCT bewirkt<sup>232</sup>. Um zu testen, ob dies mit einer stärkeren Immunität gegenüber Pathogenen einhergeht, wurden sämtliche Mäuse nach HSCT mit murinem Cytomegalie-Virus infiziert<sup>232</sup>. Tatsächlich zeigten daraufhin Mäuse, die mit nT<sub>reg</sub>s und T<sub>conv</sub> behandelt wurden, ein längeres Überleben und eine niedrigere Viruslast als Mäuse, die nur T<sub>conv</sub> erhielten<sup>232</sup>.

Auf Grundlage dieser präklinischen Daten wurde die klinische Anwendung von nT<sub>reg</sub>-ACTs bereits in einigen Fallberichten und Phase I Studien erprobt (Tabelle 5)<sup>190–192,233–235</sup>. Trzonkowski *et al.* waren die Ersten, die zwei GVHD-Patienten mit allogenen, *ex vivo* expandierten nT<sub>reg</sub>s behandelten<sup>190</sup>. Ein Patient zeigte daraufhin einen Rückgang der Krankheitsaktivität, welcher die Reduktion der immunsuppressiven Therapie ermöglichte, bei dem zweiten Patienten kam es zu einer temporären Symptomstabilisierung<sup>190</sup>. Es folgten weitere Arbeiten, die nT<sub>reg</sub>-ACTs als therapeutischen und präventiven Ansatz bei aGVHD bzw. cGVHD untersuchten<sup>191,192,235–238</sup>. Insgesamt erwies sich der Transfer von nT<sub>reg</sub>s als gut verträglich und die Mehrheit der Patienten zeigte im Verlauf keine Häufung schwerer Infektionen<sup>191,192,235–238</sup>. Bei präventiver nT<sub>reg</sub>-Applikation konnte zudem eine geringere GVHD-Inzidenz im Vergleich zu Kontrollen beobachtet werden<sup>192,236</sup>. Theil *et al.* konnten in einem therapeutischen Ansatz, ähnlich wie Trzonkowski *et al.*, entweder eine Symptombesserung oder eine klinische Stabilisierung der Patienten erzielen<sup>191</sup>. Im Bereich der Organtransplantation wurden bisher 22 Patienten mit nT<sub>reg</sub>s behandelt, davon 10 nach Leber- und 12 nach Nierentransplantation<sup>234,239,240</sup>. Auch hier ergaben die Ergebnisse eine sichere Zellapplikation und keiner der Patienten zeigte gehäufte Infektionen, Malignome oder ein Transplantatversagen nach nT<sub>reg</sub>-ACT<sup>234,239,240</sup>.

Diese Daten sprechen für eine gute Verträglichkeit und Wirksamkeit von nT<sub>reg</sub>-Produkten. Zahlreiche Studien sind aktuell fortlaufend und werden weitere Erkenntnisse zur Effektivität und Sicherheit von T<sub>reg</sub>-ACTs liefern (Tabelle 6)<sup>241,242</sup>. Neben den klinischen Effekten ist hierbei auch die Untersuchung immunologischer Veränderungen nach nT<sub>reg</sub>-Applikation wichtig. Theil *et al.* analysierten diesbezüglich den Verlauf von CD4+ und CD8+ T-Zellen nach nT<sub>reg</sub>-ACT<sup>191</sup>.

Mathew *et al.* untersuchten zusätzlich NK-Zellen sowie naive und Gedächtnis-B-Zellen<sup>239</sup>. Eine langfristige immunologische Überwachung nach nT<sub>reg</sub>-Applikation (> 12 Monate) sowie die systematische Untersuchung spezifischer B- und T-Zell-Populationen wurde bisher jedoch nicht durchgeführt.

**Tabelle 5. Publierte Studien zum nT<sub>reg</sub>-ACT in der Transplantationsmedizin.**

Übersicht der publizierten Studien zum adoptiven Zelltransfer regulatorischer T-Zellen zwischen Januar 2009 und Juli 2018. Die Literaturrecherche erfolgte über PubMed, als Suchbegriffe wurden „Regulatory t cells AND transplant AND adoptive transfer“ sowie „T<sub>reg</sub> AND transplant AND adoptive transfer“ eingegeben. Neben der systematischen Suche wurden einzelne Studien ergänzend selektiert. IS = Immunsuppression

Studie / Arbeitsgruppe	Indikation	Zellprodukt	Kommentar	Jahr
Trzonkowski <i>et al.</i> <sup>190</sup>	aGVHD und cGVHD (therapeutisch)	Allogene, <i>ex vivo</i> expandierte nT <sub>reg</sub> S	- n=2 <u>cGVHD:</u> - Symptomlinderung - Reduktion der IS <u>aGVHD:</u> - Temporäre Symptomstabilisierung - Letales Multiorganversagen an Tag +112 (nach HSCT)	2009
Edinger <i>et al.</i> <sup>237</sup>	GVHD (Prävention)	Allogene, frisch isolierte nT <sub>reg</sub> S	- n=9 - Gute Verträglichkeit - Kein Auftreten von GVHD - Keine Erkrankungsrückfälle - Keine opportunistischen Infektionen	2011
Brunstein <i>et al.</i> <sup>192</sup>	aGVHD (Prävention)	<i>Ex vivo</i> expandierte, polyklonale nT <sub>reg</sub> S aus UCB	- n=23 - Gute Verträglichkeit - Niedrigere Inzidenz von Grad II-IV aGVHD im Vergleich zu Kontrollen (43% vs. 61%)	2011
Di Ianni <i>et al.</i> <sup>195</sup>	aGVHD (Prävention)	Allogene, frisch isolierte nT <sub>reg</sub> S	- n=28 - Gute Verträglichkeit - 26/28 mit vollständigem Engraftment - 2/26 mit ≥ Grad II aGVHD - Keine cGVHD - Adäquate T- und B-Zell-Rekonstitution - 1-Jahres-Follow-Up: 12/26 krankheitsfrei	2011
Martelli <i>et al.</i> <sup>238</sup>	aGVHD (Prävention)	Allogene, frisch isolierte nT <sub>reg</sub> S	- n=43 (24/43 bereits durch Di Ianni <i>et al.</i> publiziert) - 41/43 mit vollständigem Engraftment - 6/43 mit ≥ Grad II aGVHD - 3/43 an aGVHD verstorben - 1/43 mit cGVHD	2014
Theil <i>et al.</i> <sup>191</sup>	cGVHD (therapeutisch)	Allogene, <i>ex vivo</i> expandierte, polyklonale nT <sub>reg</sub> S	- n=5 - 2/5 mit Symptombesserung der cGVHD - 3/5 mit stabiler cGVHD - 4/5 mit Dosisreduktion der IS - 2/5 mit Malignom nach nT <sub>reg</sub> -ACT - 3/5 mit Sepsis nach nT <sub>reg</sub> -ACT	2015
Todo <i>et al.</i> <sup>234</sup>	Lebertransplantation	<i>Ex vivo</i> expandiertes, nT <sub>reg</sub> -Zellprodukt	- n=10 - Gute Verträglichkeit - 7/10 ohne IS - 3/10 mit milder akuter Abstoßung	2016

**Tabelle 5. Publierte Studien zum nT<sub>reg</sub>-ACT in der Transplantationsmedizin. (Fortsetzung)**

Studie / Arbeitsgruppe	Indikation	Zellprodukt	Kommentar	Jahr
Brunstein <i>et al.</i> <sup>236</sup>	aGVHD (Prävention)	<i>Ex vivo</i> expandierte, polyklonale nT <sub>reg</sub> S aus UCB	- n=11 - Gute Verträglichkeit bei nT <sub>reg</sub> -Dosis von max. 100 x 10 <sup>6</sup> / kg - Niedrigere Inzidenz von aGVHD Grad II-III - Niedrigere Inzidenz von cGVHD	2016
Chandran <i>et al.</i> <sup>240</sup>	Nieren-transplantation	Autologe, <i>ex vivo</i> expandierte, polyklonale nT <sub>reg</sub> S	- n=3 - Gute Verträglichkeit bei nT <sub>reg</sub> -Dosis von max. 364 x 10 <sup>6</sup> - Keine Infektionen oder Malignome im Follow-Up (1 J. nach nT <sub>reg</sub> -Gabe) - Stabile Transplantatfunktion - nT <sub>reg</sub> S für 4 Wochen <i>in vivo</i> detektierbar	2017
Mathew <i>et al.</i> <sup>239</sup>	Nieren-transplantation	Autologe, <i>ex vivo</i> expandierte, polyklonale nT <sub>reg</sub> S	- n=9 - Gute Verträglichkeit bei nT <sub>reg</sub> -Dosis von max. 5 x 10 <sup>9</sup> - Keine opportunistischen Infektionen - 100% Transplantatüberleben nach 2 J. - Nachhaltiger nT <sub>reg</sub> -Anstieg <i>in vivo</i>	2018

**Tabelle 6. Laufende und nicht publizierte Studien zum nT<sub>reg</sub>-ACT in der Transplantationsmedizin.**

Übersicht der fortlaufenden Studien zum adoptiven Zelltransfer regulatorischer T-Zellen zwischen Januar 2009 und Juli 2018. Die Literaturrecherche erfolgte über [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), als Suchbegriffe wurde „Regulatory t cells AND transplantation“ und für die durchgeführte Intervention „T<sub>reg</sub> or regulatory t cell“ eingegeben.

Studie / Arbeitsgruppe	Indikation	Zellprodukt	Studien-ID	Status
The „ONE“ Study <sup>241</sup>	Nieren-transplantation	1. <i>Ex vivo</i> expandierte, polyklonale nT <sub>reg</sub> S, 2. Alloreaktive nT <sub>reg</sub> S (darT <sub>reg</sub> S)	NCT02091232 NCT02244801 NCT02371434 NCT02129881	fortlaufend
The “ThRil” trial <sup>242</sup>	Leber-transplantation	Autologe, <i>ex vivo</i> expandierte, polyklonale nT <sub>reg</sub> S	NCT02166177	fortlaufend
Baron <i>et al.</i>	cGVHD (therapeutisch)	Allogene, frisch isolierte nT <sub>reg</sub> S	NCT01903473	fortlaufend
Skaro <i>et al.</i>	Nieren-transplantation	<i>Ex vivo</i> expandierte nT <sub>reg</sub> S	NCT02145325	fortlaufend
Arpinati <i>et al.</i>	cGVHD (therapeutisch)	Allogene, frisch isolierte nT <sub>reg</sub> S	NCT02749084	fortlaufend
Lacerda <i>et al.</i>	cGVHD (therapeutisch)	Allogene, frisch isolierte nT <sub>reg</sub> S	NCT02385019	fortlaufend
Koreth <i>et al.</i>	cGVHD (therapeutisch)	nT <sub>reg</sub> -angereichertes Zellprodukt + low-dose IL-2	NCT01937468	fortlaufend
Johnston <i>et al.</i>	cGVHD (therapeutisch)	Allogene nT <sub>reg</sub> S	NCT01911039	fortlaufend
Pidala <i>et al.</i>	aGVHD (Prävention, präemptiv)	Allogene, <i>ex vivo</i> expandierte, alloreaktive nT <sub>reg</sub> S	NCT01795573	fortlaufend
Lu <i>et al.</i>	Leber-transplantation	<i>Ex vivo</i> expandierte nT <sub>reg</sub> S	NCT01624077	fortlaufend
TASK Trial	Nieren-transplantation	1. Autologe, <i>ex vivo</i> expandierte, polyklonale nT <sub>reg</sub> S 2. Alloreaktive nT <sub>reg</sub> S	NCT02088931 NCT02711826	fortlaufend

**Tabelle 6. Laufende und unpublizierte Studien zum nT<sub>reg</sub>-ACT in der Transplantationsmedizin. (Fortsetzung)**

Studie / Arbeitsgruppe	Indikation	Zellprodukt	Studien-ID	Status
deLTa Trial	Leber-transplantation	Autologe, alloreaktive nT <sub>reg</sub> S (darT <sub>reg</sub> S)	NCT02188719	fortlaufend
Macmillian <i>et al.</i>	aGVHD + cGVHD (Prävention)	iT <sub>reg</sub> S	NCT01634217	fortlaufend
ARTEMIS Trial	Leber-transplantation	Autologe, <i>ex vivo</i> expandierte, alloreaktive nT <sub>reg</sub> S (darT <sub>reg</sub> S)	NCT02474199	fortlaufend
Gedaly <i>et al.</i>	Nieren-transplantation	Autologe, <i>ex vivo</i> expandierte nT <sub>reg</sub> S	NCT03284242	fortlaufend
Markmann <i>et al.</i>	Leber-transplantation	Autologe alloreaktive nT <sub>reg</sub> S	NCT03577431	fortlaufend
Shapiro <i>et al.</i>	Diabetes mellitus Typ 1	Autologe, <i>ex vivo</i> expandierte, polyklonale nT <sub>reg</sub> S	NCT03444064	fortlaufend
Kaabak & Bykovskaja <i>et al.</i>	Nieren-transplantation	Autologe, <i>ex vivo</i> expandierte nT <sub>reg</sub> S	NCT01446484	fortlaufend
Brunstein & Macmillian <i>et al.</i>	aGVHD + cGVHD (Prävention)	UCB-nT <sub>reg</sub> S	NCT00602693	vollendet, unpubliziert
Meyer <i>et al.</i>	aGVHD-Prävention nach HSCT	Allogene, frisch isolierte nT <sub>reg</sub> S	NCT01050764	vollendet, unpubliziert

#### 1.4. Technische Verfahren zur Herstellung von nT<sub>reg</sub>-Produkten

Um die breite klinische Anwendung von nT<sub>reg</sub>-ACTs zu ermöglichen, ist die Entwicklung standardisierter und validierter Protokolle zur Herstellung von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten nötig. Grundsätzlich sind hierbei folgende Prozesse essentiell: (1) Zellisolation, (2) Zellexpansion und (3) Qualitätsprüfung.

Die Isolation von nT<sub>reg</sub>S kann durchflusszytometrisch oder durch magnetische Zellisolation aus peripherem Blut, Leukapheresat oder UCB erfolgen<sup>243–246</sup>. In Europa ist nur die Magnetisolation zur klinischen Anwendung zugelassen; durchflusszytometrische Verfahren erfüllen bisher nicht die Anforderungen der „Guten Herstellungspraxis“ (*Good Manufacturing Practice, GMP*) der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA)<sup>247</sup>. Große Anwendung findet das MACS-System von Miltenyi Biotec, bei dem Zellen mit Antikörper-gekoppelten Magnetpartikeln inkubiert werden und die markierte Zellpopulation anschließend mit Hilfe einer Magnetsäule von den unmarkierten Zellen getrennt wird<sup>245,248</sup>. Das Gerät RoboSep von der Firma STEMCELL ist ein weiteres, automatisches System, dass für die magnetische Isolation von nT<sub>reg</sub>S genutzt wird<sup>244</sup>. Da die Selektion lebender Zellen anhand der intrazellulären Färbung von FoxP3 nicht möglich ist, wird vor allem CD25 als nT<sub>reg</sub>-Marker eingesetzt<sup>235,244,245</sup>. Die Anwendung weiterer

Magnetbeads (z. B. CD19 und CD8) erlaubt eine Depletion von B- und CD8+ T-Zellen, wodurch der Anteil CD4+CD25+ nT<sub>reg</sub>s erhöht werden kann<sup>235,243,245,249</sup>.

Neben der Isolationstechnik ist auch der Isolationszeitpunkt für die Durchführung von nT<sub>reg</sub>-ACTs bedeutsam, da bisher keine suffizienten Methoden zur Kryokonservierung von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten verfügbar sind<sup>249,250</sup>. Die zeitgleiche Isolation von nT<sub>reg</sub>s und Stammzellen aus dem peripheren Blut G-CSF mobilisierter Spender könnte eine präventive nT<sub>reg</sub>-Applikation vor dem Auftreten einer GVHD ermöglichen. Ukena *et al.* führten hierzu eine erste Studie durch und zeigten für nT<sub>reg</sub>-Zellprodukte aus G-CSF mobilisiertem Blut eine hohe Reinheit und eine gute T<sub>conv</sub>-Suppression *in vitro*<sup>251</sup>. Da die nT<sub>reg</sub>-Isolation nicht unter GMP-Bedingungen erfolgte, sind jedoch weitere Studien nötig, um die Eignung von G-CSF mobilisiertem Blut als alternative nT<sub>reg</sub>-Quelle weiter zu evaluieren.

Aufgrund des geringen Anteils von nT<sub>reg</sub>s im peripheren Blut, ist meist eine *ex vivo* Expansion der isolierten Zellen nötig, um adäquate nT<sub>reg</sub>-Dosierungen für die klinische Applikation zu erzielen. Die häufigste Anwendung finden hierbei polyklonale Expansionsprotokolle, die nT<sub>reg</sub>s in Anwesenheit von CD3/CD28-ummantelten Beads und IL-2 kultivieren<sup>190-192</sup>. Die Zugabe von Rapamycin bewirkt zusätzlich die selektive Proliferation von nT<sub>reg</sub>s, ohne dabei die Expansion kontaminierender T<sub>conv</sub> zu stimulieren<sup>252,253</sup>. Trotz etablierter Herstellungsprotokolle sind die Expansionsraten jedoch sehr variabel; bei Pahwa *et al.* lag die nT<sub>reg</sub>-Expansion bei durchschnittlich 60-fach, während sie bei Hoffmann *et al.* und Brunstein *et al.* bei 13.000-fach bzw. 211-fach lag<sup>192,244,248</sup>. Dies stellt ein Problem dar, da für die breite Anwendung von nT<sub>reg</sub>-ACTs stabile Expansionsraten nötig sind.

Nach der Zellexpansion wird die Qualität des Zellprodukts überprüft. nT<sub>reg</sub>-Produkte sollten dabei vor allem vier Charakteristika aufweisen: (1) Eine stabile Expression von CD25<sup>high</sup> und FoxP3, (2) eine potente Suppression von T<sub>conv</sub> *in vitro*, (3) keine Expression proinflammatorischer Zytokine und (4) die Abwesenheit T<sub>conv</sub>-spezifischer Oberflächenmarker<sup>244</sup>. Zur Überprüfung dieser Eigenschaften bestehen bisher jedoch weder einheitliche, standardisierte Untersuchungsmethoden noch allgemein festgelegte Grenzwerte, was die Gesamtbeurteilung von nT<sub>reg</sub>-Produkten sowie den Vergleich unterschiedlicher Studienergebnisse erschwert.

Die Herstellung antigenspezifischer nT<sub>reg</sub>-Zellprodukte stellt eine attraktive Alternative zu polyklonalen nT<sub>reg</sub>s dar. Durch ihre selektive T<sub>conv</sub>-Suppression könnten potentielle, durch unselektive Immunsuppression verursachte Nebenwirkungen minimiert und eine gezieltere Wirkung *in vivo* erreicht werden<sup>247,254</sup>. Sagoo *et al.* und Landwehr-Kenzel *et al.* zeigten im Mausmodell, dass alloreaktive bzw. antigenspezifische nT<sub>reg</sub>s die Abstoßung allogener Hauttransplantate potenter verhindern als polyklonale nT<sub>reg</sub>s<sup>255,256</sup>. Auch Tu *et al.* konnten für

alloreaktive nT<sub>reg</sub>S eine stärkere Wirksamkeit im Vergleich zu polyklonalen nT<sub>reg</sub>S nachweisen<sup>257</sup>. Auf der anderen Seite ist die Häufigkeit antigenspezifischer nT<sub>reg</sub>S im peripheren Blut noch geringer als die von unselektiven nT<sub>reg</sub>S, was die Herstellung antigenspezifischer nT<sub>reg</sub>-Produkte deutlich erschwert. Ein neuerer Ansatz zur Isolation antigenspezifischer nT<sub>reg</sub>S basiert auf der spezifischen Expression der Aktivierungsmarker CD154 und CD137<sup>258,259</sup>. Schoenbrunn *et al.* zeigten, dass alloreaktive nT<sub>reg</sub>S nach 6h *in vitro* Stimulation einen CD154-/CD137+ Phänotyp präsentieren, während T<sub>conv</sub> entweder ein doppelt-positives oder CD154+/CD137- Expressionsmuster aufweisen<sup>61</sup>. Ferner ergab eine jüngste Studie von Nowak *et al.*, dass nT<sub>reg</sub>S auch nach *in vitro* Expansion einen CD154-/CD137+ Phänotyp beibehalten, was eine weitere Anreicherung von nT<sub>reg</sub>S bzw. die Depletion kontaminierender T<sub>conv</sub> nach Zellexpansion ermöglichen könnte<sup>259</sup>.

### 1.5. Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist, eine weitere phänotypische und funktionelle Charakterisierung von nT<sub>reg</sub>-basierten Zellprodukten zu erarbeiten und die Effektivität, Verträglichkeit und Durchführbarkeit von nT<sub>reg</sub>-ACTs in der Behandlung der pädiatrischen cGVHD zu evaluieren.

Darauf basierend werden in dieser Arbeit folgende Fragestellungen behandelt:

- (1) Durch welche Eigenschaften werden nT<sub>reg</sub>-Zellprodukte charakterisiert und wie können die bestehenden technischen Herausforderungen in der Herstellung dieser Produkte überwunden werden?
- (2) Inwiefern beeinflusst die G-CSF-Mobilisation von Stammzell- bzw. nT<sub>reg</sub>-Spendern das Expansionsverhalten, den Phänotyp und die Funktionalität von nT<sub>reg</sub>S?
- (3) Welchen Einfluss hat der nT<sub>reg</sub>-ACT bei pädiatrischen cGVHD-Patienten auf die Krankheitsaktivität (insbesondere inflammatorische Haut- und Schleimhautveränderungen), die klinische Chemie, das T- und B-Zellkompartiment und die angeborene Immunität?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Blutprodukte**

Die Blutprodukte wurden bei Raumtemperatur (RT) gelagert und innerhalb von 24h nach Blutentnahme verarbeitet. Eine Genehmigung der Ethikkommission der Charité Berlin lag für sämtliche Blutentnahmen vor.

##### **2.1.1.1. Gesunde Probanden**

Von gesunden Probanden wurden nach mündlicher Aufklärung und anschließender Einverständniserklärung jeweils zwei Vollblutproben (1 x 100,00 ml und 1 x 50,00 ml) in Lithium-Heparin-Röhrchen gewonnen.

##### **2.1.1.2. G-CSF mobilisierte Stammzellspender**

Für die Blutprodukte der mit G-CSF mobilisierten Stammzellspendern wurde eine Kooperation mit dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm (IKT) initiiert. Dort wurde den Stammzellspendern, nach schriftlicher Einwilligung, entweder 27,00 ml Vollblut vor G-CSF-Mobilisation (= Transportkontrolle) oder nach erfolgter G-CSF-Mobilisation entnommen und anschließend innerhalb von 12h versandt. Für sämtliche Blutproben lagen Ethikvoten der Ethikkommission Berlin und der Ethikkommission Ulm vor.

##### **2.1.1.3. Patienten**

Im Rahmen der klinischen und immunologischen Verlaufskontrollen der mit nT<sub>regs</sub> behandelten Patienten wurden zu definierten Follow-Up-Zeitpunkten unterschiedliche Volumina Vollblut in EDTA-Röhrchen abgenommen (Abschnitt 3.2.2).

## 2.1.2. Equipment und Geräte

Tabelle 7. Liste des benötigten Equipments und der verwendeten Geräte.

Equipment und Geräte	Firma	Stadt
Durchflusszytometer, NAVIOS™	Beckman Coulter	Brea, USA
Durchflusssortierer, Aria™ II	BD	Franklin Lakes, USA
Quadro MACS™ Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Octo MACS™ Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
LD-Säulen	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MS-Säulen	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
96-Lochplatten	BD	Franklin Lakes, USA
24-Lochplatten	Corning	Corning, USA
FACS Rundbodenröhrchen, 5 ml, mit Deckel	BD	Franklin Lakes, USA
Zentrifugenröhrchen Falcon (15 ml und 50 ml)	BD	Franklin Lakes, USA
Eppendorf-Röhrchen (1.5 und 2.0 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Transferringpipette	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml und 25 ml)	BD	Franklin Lakes, USA
Pipetboy Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences AG	Zizers, Schweiz
Pipetten (10µl, 100µl und 1000µl)	Gilson	Middleton, USA
Pipettenspitzen bis 10µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen bis 100µl	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen bis 1000µl	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
IM T <sub>reg</sub> panel Tube DuraClone 1	Beckman Coulter	Brea, USA
IM T <sub>reg</sub> panel Tube DuraClone 2	Beckman Coulter	Brea, USA
IM Phenotyping Basis Tube DuraClone	Beckman Coulter	Brea, USA
IM TCR Tube DuraClone	Beckman Coulter	Brea, USA
IM T cell subset Tube DuraClone	Beckman Coulter	Brea, USA
IM B cell DuraClone	Beckman Coulter	Brea, USA
CASY® Cell Counter	Omni Life Science	Bremen, Deutschland
NanoDrop Mikrovolumen- Spektralphotometer	ThermoFisher	Waltham, USA
Mikroskop	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
CO <sup>2</sup> Inkubator	ThermoFisher	Waltham, USA
Sterilwerkbank (Laminar Flow)	ThermoFisher	Waltham, USA
Zentrifuge	ThermoFisher	Waltham, USA
Vortex-Gerät	IKA	Staufen, Deutschland
Kühlschrank	Gram	Giesen-Hasede, Deutschland
Einfrigergerät	Consarctic	Schoellkrippen, Deutschland
Stickstofftank	Consarctic	Schoellkrippen, Deutschland
Kaluza® Flow Analysis Software	Beckman Coulter	Brea, USA
GraphPad Prism 7	GraphPad Software	La Jolla, USA
Microsoft Excel	Microsoft	Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft	Redmond, USA



### 2.1.3. Medien, Puffer und Lösungen

**Tabelle 8. Liste der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen.**

Medium, Puffer oder Lösung	Beschreibung
nT <sub>reg</sub> -KM	nT <sub>reg</sub> Komplettmedium: 45 ml X-Vivo 15 Medium + 15 mg/l Phenolrot 5 ml 100% FBS 50 µl Rapamycin (100µM) 125 µl IL-2 (200.000 IE/ml)
2x nT <sub>reg</sub> -KM	2x nT <sub>reg</sub> -KM: 40 ml X-Vivo 15 Medium + 15 mg/l Phenolrot 10 ml 100% FBS 100 µl Rapamycin (91 µg/ml) 250 µl IL-2 (200.000 IE/ml)
Stimulationsfreies Medium	45 ml X-Vivo 15 Medium + 15 mg/l Phenolrot 5 ml 100% FBS
Kryomedium	3 ml FBS 1.5 ml 33,3% DMSO
MACS-Puffer	PBS-Puffer mit 0.5% FBS
Permeabilisierungspuffer	5 ml 10x Permeabilisierungspuffer (Ebioscience) 45 ml Ampuwa
FoxP3 FixPerm Puffer	15 ml Fixation/Permeabilization Diluent (Ebioscience) 5 ml Fixation/Permeabilization Concentrate (Ebioscience)
1x Versa Lyse Fix Lösung	15 ml Versa Lyse™ (Beckman Coulter) 375 µl IOTest® 3 Fixative Solution (10x) (Beckman Coulter)
1x PerFix-nc Puffer 1	gebrauchsfertig
1x PerFix-nc Puffer 2	gebrauchsfertig
1x PerFix-nc Puffer 3	350 µl PerFix-nc Buffer 3 (10x) 3.15 ml Ampuwa
Ampuwa	Fresenius Kabi
PBS	Merck Millipore

### 2.1.4. Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 9. Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.**

Chemikalie oder Reagenz	Firma	Stadt
Brefeldin A	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
DMSO 99.9%, CryoSure DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH	Steinbach, Deutschland
DMSO 33.3%	Charité-Apotheke	Berlin, Deutschland
99,9% Ethanol	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
FBS	Biochrom	Berlin, Deutschland
Phorbol-12-Myrystat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Rapamycin	Charité-Apotheke	Berlin, Deutschland
Trypanblau	Biochrom	Berlin, Deutschland
0.5% Phenolrot	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

### 2.1.5. Beads, Isolations- und Stimulationskits

Tabelle 10. Liste der verwendeten Beads, Isolations- und Stimulationskits.

Name des Kits	Firma	Stadt
T <sub>reg</sub> Suppression Inspector	MiltenyiBiotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS® GMPExpAct T <sub>reg</sub> Kit	MiltenyiBiotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Human CD25 Micro Beads	MiltenyiBiotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Human CD8 Micro Beads	MiltenyiBiotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, for 405 nm excitation	Invitrogen / ThermoFisher	Waltham, USA
Flow Check Beads	Beckman Coulter	Brea, USA
Flow Set Beads	Beckman Coulter	Brea, USA
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN	Venlo, Niederlande

### 2.1.6. Antikörper

Tabelle 11. Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper (Klon)	Konjugat	Firma	Stadt
CD3 (UCHT1)	Pacific Blue	Beckman Coulter	Brea, USA
CD3 (UCHT1)	PE-CF594	BD	Franklin Lakes, USA
CD3 (UCHT1)	APC A750	Beckman Coulter	Brea, USA
CD3 (OKT3)	BV650	BioLegend	San Diego, USA
CD4 (SK3 and SK4)	FITC	BD	Franklin Lakes, USA
CD4 (13B8.2)	PE	Beckman Coulter	Brea, USA
CD4 (13B8.2)	APC	Beckman Coulter	Brea, USA
CD4 (OKT.4)	BV650	BioLegend	San Diego, USA
CD4 (OKT.4)	PerCP-Cy5.5	BioLegend	San Diego, USA
CD8 (RPA-T8)	BV570	BioLegend	San Diego, USA
CD8 (B9.11)	APC-Alexa Fluor® 700	Beckman Coulter	Brea, USA
CD25 (B1.49.9)	PC7	Beckman Coulter	Brea, USA
CD25 (2A3)	PE	BD	Franklin Lakes, USA
CD45RA (2H4LDH11LDB9)	ECD	Beckman Coulter	Brea, USA
CD127 (R34.34)	APC-Alexa Fluor® 700	Beckman Coulter	Brea, USA
CD137 (4B4-1)	PC7	BioLegend	San Diego, USA
CD154 (TRAP-1)	APC	BD	Franklin Lakes, USA
FoxP3 (259D/C7)	FITC	BD	Franklin Lakes, USA
IFN-γ (4S.B3)	APC eFluor780	Ebioscience / ThermoFisher	Waltham, USA
IL-2 (MQ1-17H12)	APC	BD	Franklin Lakes, USA
IL-2 (5344.111)	PE-CF594	BD	Franklin Lakes, USA
TNF-α (MAb11)	A700	BD	Franklin Lakes, USA

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. PBMC Isolation

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und Blutplasma getrennt. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter der sterilen Werkbank. Hierfür wurde zunächst das ungekühlte, frische ( $\leq 24$  h nach Blutentnahme) Li-Heparin-Blut in mehrere 50 ml-Röhrchen 1:1

mit PBS verdünnt, sodass pro Röhrchen ein Volumen von 35 ml (17.5 ml Blut + 17.5 ml PBS) vorlag. Anschließend wurden mit einer serologischen Pipette 12.5 ml Biocoll (Biochrom, Dichte 1,077 g/ml) aufgenommen und damit das verdünnte Blut vorsichtig unterschichtet. Das unterschichtete Blut wurde anschließend bei 400 x g, RT, einer Beschleunigung von 3 und einer Bremse von 2 für 20 Minuten zentrifugiert. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte von Erythrozyten, Granulozyten, PBMCs und des Blutplasmas ergibt sich eine Auftrennung, in der die PBMCs als weißer Ring zwischen dem Blutplasma (oberste Schicht) und dem Biocoll (dritte Schicht) vorliegen. Mit Hilfe einer Transferpipette wurden die PBMCs in ein sauberes 50 ml-Röhrchen transferiert (max. 20 ml pro Röhrchen). Die Zellsuspension wurde mit PBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und zweimal gewaschen (300 x g, 4°C, Bremse 9, Beschleunigung 9, 10 min). Zwischen den beiden Waschschrritten wurden die PBMCs eines Spenders in einem 50 ml-Röhrchen zusammengeführt, anschließend erfolgte eine Zellzählung mit dem CASY® Cell Counter.

### 2.2.2. Zellzählung

#### 2.2.2.1. Zellzahlbestimmung durch den CASY® Cell Counter

Sämtliche Zellzählungen im Rahmen der Zellkultur und  $nT_{reg}$ -Isolation sowie die Zellzahlbestimmungen für die FACS-Messungen bei der phänotypischen Charakterisierung und der CD154/CD137 Messung erfolgten mit Hilfe des CASY® Cell Counters. Es handelt sich dabei um ein elektronisches Zellzählgerät, welches durch die Detektion von elektrischen Widerstandsänderungen auf die Zellzahl und Zellgrößenverteilung der über eine Kapillare eingesogenen Zellsuspension rückschließen kann. Da avitale Zellen und Zelltrümmer aufgrund einer durchlässigen Zellmembran kleinere Widerstandsänderungen verursachen als vitale Zellen, kann zudem eine Aussage über den Anteil lebender Zellen innerhalb der Zellsuspension getroffen werden.

Zunächst wurde für jede zu zählende Probe ein CASY Cup beschriftet und mit 10 ml frisch filtriertem CASY Ton, einer reinen Elektrolytlösung, gefüllt. Vor der Messung wurden drei Reinigungszyklen und eine Leerwertmessung zur Ermittlung von Hintergrundsignalen durchgeführt. Dieser sollte nicht mehr als 200 Zählungen / ml betragen. Lag der Wert höher, wurden erneut Reinigungszyklen durchgeführt bis sich der Leerwert im gewünschten Bereich befand. Anschließend wurde das angelegte Setup „PBMC /  $nT_{reg}$ “ ausgewählt (Zur Erstellung eines Setups siehe Betriebsanleitung des Herstellers). In die vorbereiteten CASY Cups wurden nun 10  $\mu$ L der zu messenden Zellsuspension pipettiert, die Cups wurden mit dem Deckel verschlossen und 8-mal invertiert. Nach Abnahme des Deckels wurde das CASY Cup unter die Messkapillare gestellt und eine Messung ausgelöst. Mit Hilfe der Cursortaste wurde der

gewünschte Messbereich ausgewählt bzw. zwischen der vitalen und avitalen Population individuell unterschieden. Die ermittelten Werte für die Zellzahl / ml und den Anteil vitaler Zellen innerhalb der Zellsuspension wurden an den Computer weitergeleitet und ausgedruckt. Sollte eine weitere Zellzahlbestimmung erfolgen, wurden vorher erneut drei Reinigungszyklen sowie eine Leerwertmessung durchgeführt. Im Rahmen der Qualitätssicherung wurde mindestens einmal wöchentlich eine Reinigung des Geräts mit CASY Clean durchgeführt.

### 2.2.2.2. Zellzahlbestimmung durch Trypanblaufärbung

Ausschließlich die Zellzahlen für den Proliferationsassay wurden durch Zellzählungen in der Neubauer Zählkammer mittels Trypanblaufärbung ermittelt. Hierbei wurde ein sauberes Deckglässchen auf die befeuchteten Stege der Zählkammer gepresst und das Vorhandensein Newton'scher Ringe (Hell-Dunkel-Zonen, welche am Luftspalt zwischen zwei reflektierenden, nahezu parallelen Oberflächen entstehen) geprüft. Anschließend wurden 20 µL der zu zählenden Zellsuspension mit 20 µL 0.5% Trypanblau versetzt, mit einer Pipette resuspendiert und 10 µL der gefärbten Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. In der Zählkammer wurden bei einer 10-fachen Vergrößerung die Zellen innerhalb vier großer Quadranten gezählt. Um Doppelzählungen zu vermeiden, wurden Zellen, die an oder auf den Begrenzungslinien der Quadranten lagen, nur an zwei der vier Begrenzungslinien gezählt. Da der Farbstoff Trypanblau avitale Zellen penetriert, stellen sich diese Zellen blau dar. Lebende Zellen, die aufgrund einer intakten Zellmembran für den Farbstoff impermeabel sind, erscheinen hingegen als ungefärbt bzw. transparent.

Für die Berechnung der Zellzahl vitaler Zellen wurde folgende Rechenanleitung angewendet:

- a)  $\sum$  der Gesamtzellzahl aus 4 Quadranten / 4 = Mittelwert der Zellzahl / Quadrant
- b) Mittelwert x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10000 = Zellzahl / ml
- c) Zellzahl / ml x Gesamtvolumen der Zellsuspension = Gesamtzellzahl

Die obigen Berechnungen beruhen auf folgender Formel:

$$\text{Zellen pro } 1 \mu\text{l Zellsuspension} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}}$$

### 2.2.3. Isolation von natürlichen regulatorischen T-Zellen

nT<sub>regs</sub> wurden aus 50-100 ml Li-Heparin Blut gewonnen. Hierfür erfolgte zunächst eine PBMC Isolation, anschließend wurden über eine zweischrittige, magnetische Zellseparation

CD8-CD25+ nT<sub>reg</sub>s aufgereinigt. Das methodische Vorgehen entspricht den Miltenyi-Protokollen zu CD8 und CD25 MicroBeads.

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter der sterilen Werkbank. Der vorbereitete MACS-Puffer, die LD- bzw. MS-Säulen sowie der Quadro- und Octa-MACS™ Separator wurden bei 2-8°C vorgekühlt. Waschschritte erfolgten stets bei 300 x g, einer Beschleunigung von 9, einer Bremse von 9, für 10 Minuten.

### **2.2.3.1. CD8 Depletion**

Nach dem zweiten Waschschritt der PBMC Isolation wurden die Zellen in 80 µL pro 10<sup>7</sup> Zellen MACS-Puffer resuspendiert. Es wurden 20 µL CD8 MicroBeads pro 10<sup>7</sup> Zellen hinzupipettiert. Das Zell-Bead-Gemisch wurde für 5 Sekunden durchmischt und für 15 Minuten bei 2-8°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen gewaschen und der Überstand abpipettiert. Das Zellpellet wurde mit 500 µL MACS-Puffer pro 1.25 x 10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert. Nun wurde pro 5 x 10<sup>8</sup> Zellen eine LD-Säule in das magnetische Feld des Quadro-MACS™ Separators eingebracht und diese mit 2 ml MACS-Puffer equilibriert. Die Spüllösung wurde mit einem 15 ml-Röhrchen aufgefangen und verworfen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule pipettiert und die unmarkierten CD8- Zellen durch frische, beschriftete 15 ml-Röhrchen aufgefangen. Nach Durchlaufen der Zellsuspension wurde die Säule mit 2 x 2 ml MACS-Puffer nachgespült. Hierbei war darauf zu achten, dass die zweiten 2 ml erst auf die Säule pipettiert wurden, sobald die ersten 2 ml vollständig durchgelaufen waren. Für die Proliferationsassays musste auch die CD8+ markierte Zellfraktion gewonnen werden. Hierfür wurde die LD-Säule aus dem Magnetfeld gebracht und auf ein weiteres beschriftetes 15 ml-Röhrchen platziert. Es wurden 3 ml MACS-Puffer auf die Säule pipettiert und mit dem Stopfen der LD-Säule vorsichtig durchgedrückt, sodass die CD8+ Zellfraktion herausgespült wurde. Die CD8+ Zellen wurden bei 2-8 °C für maximal 2 h gelagert.

### **2.2.3.2. CD25 Anreicherung**

Die gewonnenen CD8- Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 90 µL MACS-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 10 µL CD25 MicroBeads pro 10<sup>7</sup> Zellen hinzupipettiert. Als Referenz wurde (der Empfehlung des Herstellers entsprechend) die ursprüngliche Zellzahl vor nT<sub>reg</sub>-Isolation verwendet. Das Zell-Bead-Gemisch wurde für 5 Sekunden durchmischt und für 15 Minuten bei 2-8°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 15 ml MACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 500 µL MACS-Puffer pro 1 x 10<sup>8</sup> Zellen aufgenommen. Nun wurden pro 2 x 10<sup>8</sup> Zellen zwei MS-Säulen in das magnetische Feld des Octa-MACS™ Separators eingebracht und mit jeweils 500 µL MACS-Puffer equilibriert. Die Spüllösung wurde

von 15 ml-Röhrchen aufgefangen und verworfen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule pipettiert und die unmarkierten CD8-CD25<sup>-</sup> Zellen durch frische, beschriftete 15 ml-Röhrchen aufgefangen. Nach Durchlaufen der Zellsuspension wurde die Säule mit 3 x 500 µL MACS-Puffer nachgespült. Auch hier war darauf zu achten, dass die zweiten 500 µL erst auf die Säule pipettiert wurden, sobald die ersten 500 µL vollständig durchgelaufen waren. Zur Gewinnung der markierten CD8-CD25<sup>+</sup> Zellen wurde die MS-Säule aus dem Magnetfeld gebracht und auf ein weiteres beschriftetes 15 ml-Röhrchen platziert. Es wurde 1 ml MACS-Puffer auf die Säule pipettiert und mit dem Stopfen der MS-Säule vorsichtig durchgedrückt, sodass die CD8-CD25<sup>+</sup> Zellfraktion herausgespült wurde. Um die Reinheit der isolierten nT<sub>reg</sub>S zu erhöhen, wurde die CD8-CD25<sup>+</sup> Zellsuspension in 500 µL-Schritten auf eine weitere MS-Säule pipettiert, die vorbereitend bereits mit MACS-Puffer gespült wurde. Dem beschriebenen Vorgehen entsprechend, wurde auch diese Säule 3x nachgespült und die intermediäre CD8-CD25<sup>int</sup> Zellfraktion aufgefangen. Schließlich wurde die zweite MS-Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die zweifach positiv markierten CD8-CD25<sup>+</sup> Zellen mit 1 ml MACS-Puffer und dem Stopfen aus der Säule herausgespült. Nach der CD8 Depletion und der CD25 Anreicherung erhielt man somit vier Zellfraktionen: CD8<sup>+</sup> Zellen, CD8-CD25<sup>-</sup> Zellen, CD8-CD25<sup>int</sup> Zellen und CD8-CD25<sup>+</sup> nT<sub>reg</sub>S.

Die nT<sub>reg</sub>S wurden für die Zellkultur in nT<sub>reg</sub>-KM aufgenommen und in 96-Loch-Platten ausgesät. Die CD8<sup>-</sup> Zellfraktionen (CD8-CD25<sup>-</sup> und CD8-CD25<sup>int</sup>) wurden zusammengeführt und entsprechend des Miltenyi-Protokolls auf den Oberflächenmarker CD4 sortiert. Anschließend wurden die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Isolate mit Hilfe des Einfriergeräts kryokonserviert und die übrigen Zellen verworfen.

### **2.2.4. *In vitro* Expansion von polyklonalen natürlichen regulatorischen T-Zellen**

Die isolierten und für die Zellkultur bereitgestellten CD8-CD25<sup>+</sup> nT<sub>reg</sub>S wurden auf  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml nT<sub>reg</sub>-KM eingestellt. Anschließend wurden jeweils 100 µL der Zellsuspension pro Loch in einer 96-Lochplatte ausgesät. Die Randlöcher der Platte wurden mit jeweils 200 µL PBS gefüllt, um die Evaporation des Mediums zu minimieren. Die ausplattierten Zellen ruhten vor der Stimulation für 12-36h im Inkubationsschrank, um eine Apoptose-Induktion durch Überaktivierung zu verhindern. Insgesamt wurden die Zellen mindestens 20 und maximal 38 Tage kultiviert.

#### **2.2.4.1. Stimulation**

An Tag 1, nachdem die Zellen über Nacht geruht hatten, erfolgte die initiale Stimulation mit CD3/CD28-ummantelten GMPEXACT T<sub>reg</sub> Beads in einem Verhältnis von 4 Beads pro Zelle. Die Ermittlung des benötigten Bead-Volumens ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{Benötigtes Bead-Volumen } (\mu\text{L}) = \frac{(\text{Gesamtzellzahl } nT_{\text{regS}}) \times 4}{0.2 \times 10^6 / \mu\text{L} \text{ (Konzentration der Beadsuspension)}}$$

Das Bead-Volumen wurde zu 100  $\mu\text{L}$   $nT_{\text{reg}}$ -KM pro Loch, pipettiert und die Bead-Suspension für 5 Sekunden gut durchmischt. Lag das Bead-Volumen bei  $> 100 \mu\text{L}$ , wurde entsprechend weniger  $nT_{\text{reg}}$ -KM in die Bead-Suspension pipettiert. Jeweils 100  $\mu\text{L}$  des Bead-Ansatzes wurden zu den 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension pipettiert, sodass pro Loch ein Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{L}$  vorlag. Jedes Loch wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut resuspendiert. Anschließend erfolgte eine manipulationsfreie Phase von 7 ( $\pm 2$ ) Tagen.

#### 2.2.4.2. Restimulation und optische Kontrolle

An Tag 8 ( $\pm 2$ ) wurde die erste Restimulation durchgeführt. Zunächst wurden anhand des Farbumschlags des Mediums (makroskopische Kontrolle) sowie anhand der Identifikation von Proliferationshaufen und der Abwesenheit von Kontaminationen (mikroskopische Kontrolle) das Wachstum und die Reinheit der Kultur bewertet. Anschließend erfolgte eine Zellzahlbestimmung, wofür ein „Zählloch“ ausgewählt, resuspendiert, und dessen Volumen bestimmt wurde. Die Zellzahl für das repräsentative Zählloch wurde berechnet und mit der Anzahl an Löchern, in denen  $nT_{\text{regS}}$  kultiviert wurden, multipliziert. Mit Hilfe der Gesamtzellzahl konnte das benötigte Volumen an CD3/CD28-ummantelten GMPEXACT  $T_{\text{reg}}$  Beads bestimmt werden. Anders als bei der initialen Stimulation wurde in einem Verhältnis von 1 Bead pro Zelle restimuliert. Das Bead-Volumen wurde, wie bei der initialen Stimulation, zu 100  $\mu\text{L}$   $nT_{\text{reg}}$ -KM pro Loch pipettiert. Die Bead-Suspension wurde für 5 Sekunden gut durchmischt und in die einzelnen Löcher pipettiert. Zudem wurde entsprechend der errechneten Zellzahl und dem Format der Kulturplatte folgender Algorithmus auf die Zellkultur angewandt:

##### I. Zellkultur in 96-Lochplatte

###### I.a) Zellzahl pro Loch $< 3 \times 10^5$

Es wurden 100  $\mu\text{L}$  Medium aus jedem nicht resuspendierten Loch entnommen, die Zellen mit 100  $\mu\text{L}$  Bead-Suspension (Beads plus  $2x nT_{\text{reg}}$ -KM) restimuliert und anschließend resuspendiert.

###### I.b) Zellzahl pro Loch $\geq 3 \times 10^5$ , Gesamtzellzahl $< 8 \times 10^6$

Die Zellen wurden auf der 96-Lochplatte mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch ausplattiert (Teilungsfaktor = Zellzahl pro Loch /  $2 \times 10^5$ ). Anschließend erfolgten eine Restimulation durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Bead-Suspension (Beads plus  $nT_{\text{reg}}$ -KM) je Loch

und eine Resuspension. Das Kulturvolumen pro Loch betrug 200  $\mu\text{l}$ .

*I.c) Zellzahl pro Loch  $\geq 3 \times 10^5$ , Gesamtzellzahl  $> 8 \times 10^6$*

Die Zellen wurden auf Grund der hohen Gesamtzellzahl auf eine 24-Lochplatte überführt. Hierfür wurden die Zellen à 6 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Loch ausgesät. (Teilungsfaktor = Zellzahl pro Loch / 6 x 10<sup>5</sup>). Anschließend erfolgte eine Restimulation durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Bead-Suspension (Beads plus nT<sub>reg</sub>-KM) pro Loch und eine Resuspension. Das Kulturvolumen pro Loch betrug 2000  $\mu\text{l}$ .

## **II. Zellkultur in 24-Lochplatte**

*II.a) Zellzahl pro Loch  $< 4 \times 10^6$*

Es wurde, je nach Volumen pro Loch, so viel KM aus jedem nicht resuspendierten Loch entnommen, dass ein Restvolumen von 500  $\mu\text{l}$  pro Loch verblieb. Anschließend wurden 1400  $\mu\text{l}$  frisches nT<sub>reg</sub>-KM zugeführt und die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  Bead-Suspension (Beads plus nT<sub>reg</sub>-KM) pro Loch restimuliert. Jedes Loch wurde mit der Transferpipette durch mehrfaches Pipettieren resuspendiert. Das Kulturvolumen pro Loch betrug 2000  $\mu\text{l}$ .

*II.b) Zellzahl pro Loch  $\geq 4 \times 10^6$*

Die Zellen wurden auf der 24-Lochplatte erneut mit einer Zellzahl von 6 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Loch (Teilungsfaktor = Zellzahl pro Loch / 6 x 10<sup>5</sup>) ausplattiert. Das Volumen je Loch wurde auf 1900  $\mu\text{l}$  mit nT<sub>reg</sub>-KM aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Restimulation durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Bead-Suspension (Beads plus nT<sub>reg</sub>-KM) pro Loch und eine Resuspension. Das Kulturvolumen pro Loch betrug 2000  $\mu\text{l}$ .

*II.c) Zellzahl pro Loch  $\geq 4 \times 10^6$  (ab Tag 21)*

Die Zellen wurden auf der 24-Lochplatte mit einer Zellzahl von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen ausplattiert. Das Volumen pro Loch wurde auf 1900  $\mu\text{l}$  mit nT<sub>reg</sub>-KM aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Restimulation durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Bead-Suspension (Beads plus nT<sub>reg</sub>-KM) pro Loch und eine Resuspension. Das Kulturvolumen pro Loch betrug 2000  $\mu\text{l}$ .

Im Verlauf der Expansion wurden Zellzahlbestimmungen und Restimulationen an jedem dritten Tag ( $\pm 1$ ) durchgeführt. Insgesamt wurden pro Zelllinie mindestens 4 und maximal 10 Restimulationen durchgeführt.

### **2.2.4.3. Zellernte und Beaddepletion**

Frühestens an Tag 20 und spätestens an Tag 37 wurden die kultivierten nT<sub>reg</sub>s aus den Kulturplatten entnommen. Zunächst fand eine Zellzählung statt, um die finale Zellzahl zum Erntezeitpunkt zu bestimmen, anschließend wurde jedes Loch mit der Transferpipette durch



mehrmaliges Pipettieren resuspendiert und die Suspension in ein oder mehrere 50 ml-Röhrchen überführt. Die leeren Löcher wurden mit 1 ml PBS je 6 Löcher gespült und diese Suspension in ein weiteres 50 ml-Röhrchen pipettiert. Alle Röhrchen wurden 2x gewaschen (300 x g, 4°C, Bremse 9, Beschleunigung 9, 10 min) und die Zellen eines Spenders zusammengeführt. Die Zellpellets wurden in 1 ml PBS je  $1 \times 10^8$  Zellen resuspendiert.

Pro  $1 \times 10^8$  nT<sub>regs</sub> wurde eine LD-Säule in den Quadro-MACS<sup>TM</sup> Separator eingebracht und mit 2 x 2 ml kaltem PBS equilibriert. Das Eluat wurde verworfen. Es wurden neue, beschriftete 15 ml-Röhrchen unter den Säulen platziert und die Zellsuspension (max.  $1 \times 10^8$  Zellen) auf die Säulen pipettiert. Sobald das Zellgemisch durchgelaufen war, wurde die Säule mit 2 x 2 ml PBS nachgespült. Die aufgefangenen, beaddepletierten nT<sub>regs</sub> wurden gewaschen und anschließend ein weiteres Mal gezählt. Der Zellverlust durch die Beadabreicherung lag regulär bei 40-70%. Bevor weitere Experimente und Analysen der kultivierten nT<sub>regs</sub> durchgeführt wurden, ruhten die Zellen über Nacht für 12-36 h in stimulationsfreiem Medium.

### 2.2.5. Durchflusszytometrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene durchflusszytometrische Protokolle angewendet:

- a) Phänotypische Charakterisierung
- b) CD154/CD137-Sortierung
- c) Proliferationsassay
- d) Dura Clone Messungen

#### 2.2.5.1. Phänotypische Charakterisierung

Zur Qualitätskontrolle der expandierten nT<sub>regs</sub> wurde eine phänotypische Charakterisierung durchgeführt, um mögliche Verunreinigungen durch T<sub>conv</sub> zu identifizieren. Hierfür wurde zum einen der prozentuale Anteil der nT<sub>regs</sub> an der Gesamtzellpopulation und zum anderen die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2, welche ausschließlich von T<sub>conv</sub> gebildet werden, untersucht. Als Positivkontrolle wurden, wenn möglich, PBMCs des gleichen Spenders mitgeführt. Bei den G-CSF mobilisierten Zelllinien war dies nicht möglich, weshalb in diesen Fällen PBMCs von Fremdspendern als Positivkontrolle genutzt wurden.

Nachdem die zu analysierenden nT<sub>regs</sub> und PBMCs für 12-24h bei 37°C und 5.0% CO<sub>2</sub> in stimulationsfreiem Medium geruht hatten, wurden pro Zelllinie zunächst vier Ansätze à 0.5 ml Zellsuspension bereitgestellt:

- a) nT<sub>reg</sub> stim
- b) nT<sub>reg</sub> unstim
- c) PBMC stim
- d) PBMC unstim

Die „stim“-Ansätze wurden jeweils mit 2 µL PMA-Lösung der Konzentration 5 µg / ml sowie 3.35 µL Ionomycin-Lösung der Konzentration 2.5 µg / ml stimuliert. Um einen Effekt der Lösungsmittel auf die Zellsuspension auszuschließen, wurden in die „unstim“-Ansätze je 2 µL Ethanol-Lösung (Verdünnung: 1:400) und 3.35 µL 99.9% DMSO pipettiert. Die Ansätze wurden mit Hilfe des Vortex-Geräts durchmischt und bei 37°C und 5.0% CO<sub>2</sub> für 1.5 h inkubiert. Anschließend wurde je 1 µL Brefeldin A der Konzentration 10 µg / ml pro Ansatz hinzugegeben und für weitere 4.5h inkubiert. Nach der Stimulation wurden alle Ansätze zweimal gewaschen (300 x g, 4°C, Bremse 9, Beschleunigung 9, 10 min), gezählt und auf eine Zellzahl von 5 x 10<sup>6</sup> / ml eingestellt. Pro Linie wurden 8 neue FACS-Röhrchen bereitgestellt, beschriftet und mit 100 µL der entsprechenden Zellsuspension (nT<sub>reg</sub> bzw. PBMCs und „stim“ bzw. „unstim“) befüllt:

- a) nT<sub>reg</sub> stim gefärbt
- b) nT<sub>reg</sub> stim ungefärbt
- c) nT<sub>reg</sub> unstim gefärbt
- d) nT<sub>reg</sub> unstim ungefärbt
- e) PBMC stim gefärbt
- f) PBMC stim ungefärbt
- g) PBMC unstim gefärbt
- h) PBMC unstim ungefärbt

Anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung (Tabelle 12). Je nach Anzahl der zu färbenden Ansätze wurde eine Antikörper-Stammlösung hergestellt und davon jeweils 3.5 µL in die „gefärbt“-FACS-Röhrchen pipettiert. Nach einer Resuspension wurden sämtliche Ansätze für 30 min bei 2-8°C im Dunkeln inkubiert.

**Tabelle 12. Antikörper für die Oberflächenfärbung (Phänotypische Charakterisierung).**

Antikörper	Menge pro Ansatz
CD25 PC7	1.0 µL
CD45RA ECD	2.0 µL
Live/Dead 405nm	0.5 µL
<b>Gesamt</b>	<b>3.5 µL pro Ansatz</b>

Die intrazelluläre Färbung erfolgte entsprechend dem FoxP3-Protokoll von eBioscience. Nach 30 min Inkubation wurden 500 µL des angesetzten FixPerm Puffers (2-8°C) zu jedem Ansatz

gegeben und für weitere 30 min bei 2-8°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit je 2 ml des hergestellten PermPuffers pro Ansatz gewaschen und die Überstände bis auf ein Färbevolumen von 100 µL abgenommen. Im Anschluss wurden die Antikörper der intrazellulären Färbung hinzugegeben (Tabelle 13). Es wurde, entsprechend der Anzahl zu färbender Ansätze, eine Antikörper-Stammlösung hergestellt, davon jeweils 42.5 µL in jedes „gefärbt“-FACS-Röhrchen pipettiert und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde einmal mit 3 ml PermPuffer pro Ansatz gewaschen, die Überstände wurden bis auf 400 µL Messvolumen abgenommen und die Proben bis zur Messung bei 2-8°C im Dunkeln gelagert.

**Tabelle 13. Antikörper für die intrazelluläre Färbung (Phänotypische Charakterisierung).**

Antikörper	Menge pro Ansatz
FoxP3 FITC	20.0 µL
CD4 PE	15.0 µL
CD3 Pacific Blue	6.0 µL
TNF-α A700	0.5 µL
IFN-γ APC eFluor780	0.5 µL
IL-2 APC	0.5 µL
<b>Gesamt</b>	<b>42.5 µL pro Ansatz</b>

Die Messung erfolgte am Navios™ Durchflusszytometer. Die Analyse und das Gating der gemessenen Proben erfolgten mit Hilfe der KALUZA-Software. Zunächst wurden durch die Auftragung des Vorwärtsstreulichts und der Flugzeit (*time of flight*, TOF) die Dubletten und durch Live/Dead-Färbung die avitalen Zellen aussortiert. Anschließend wurden mittels Vorwärts-Seitwärts-Streulicht die Leukozyten und durch Auftragung von CD4 gegen CD3 die CD4+ T-Zellen abgegrenzt. Der Anteil CD4+CD25+FoxP3+ nT<sub>reg</sub>S wurde sowohl aus dem CD4+ Zellkompartiment als auch aus der Lymphozytenpopulation ermittelt. In einem letzten Schritt wurden die nT<sub>reg</sub>S in CD45RA+ nT<sub>reg</sub>S und CD45RA- nT<sub>reg</sub>S untergliedert. Sowohl für nT<sub>reg</sub>S als auch für die Lymphozyten-Population wurde zudem die Produktion der Zytokine TNF-α, IFN-γ und IL-2 in Histogrammen dargestellt. Sämtliche Gates wurden anhand der unstimulierten und ungefärbten Kontrollen ausgerichtet. Für eine detaillierte Darstellung der Gatingstrategie siehe Abschnitt 3.1.2., Abbildung 13.

### 2.2.5.2. CD154/CD137 Messung

Im Rahmen einer weiteren Charakterisierung frisch isolierter (= vor polyklonaler Expansion) und polyklonal expandierter nT<sub>reg</sub>S wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD154 und CD137 bestimmt. Dadurch entstanden die folgenden vier nT<sub>reg</sub>-Subpopulationen, die individuell auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine untersucht wurden: Doppelt-positive

CD154+/CD137+ nT<sub>reg</sub>S, CD154-/CD137+ nT<sub>reg</sub>S, CD154+/CD137- nT<sub>reg</sub>S und doppelt-negative CD154-/CD137- nT<sub>reg</sub>S.

Das Färbeprotokoll orientierte sich an dem Protokoll der phänotypischen Charakterisierung (Abschnitt 2.2.5.1.). Allerdings wurden sowohl für die Oberflächen- (Tabelle 14) als auch für die intrazelluläre Färbung (Tabelle 15) andere Antikörper verwendet. Das Protokoll unterschied sich zudem in folgenden Punkten von dem Protokoll der phänotypischen Charakterisierung: (1) Dem Stimulationsvolumen, welches aufgrund der höheren Zellzahl (5-10 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Ansatz) 1 ml statt 0.5 ml betrug, (2) dem stimulierenden Agens, da nicht mit PMA/Ionomycin sondern mit CD3/CD28-ummantelten GMPExpACT T<sub>reg</sub> Beads (0.5 bis 1 Bead pro Zelle) stimuliert wurde, (3) der Brefeldin A-Gabe (1.5 µL statt 1 µL, nach 2 h statt 1.5h) und (4) dem finalen Messvolumen (300 µL statt 400 µL). Als Kontrollen wurden PBMCs bzw. die nicht-nT<sub>reg</sub>-Fraktionen der Magnetsortierung (Zusammenführung aus CD8+ Zellen, CD8-CD25- Zellen und CD8-CD25<sup>int</sup> Zellen) sowie ungefärbte und unstimulierte Proben mitgeführt.

**Tabelle 14. Antikörper für die Oberflächenfärbung (CD154/CD137 Messung).**

Antikörper	Menge pro Ansatz
CD25 PC7	1.0 µL
Live/Dead 405nm	0.5 µL
<b>Gesamt</b>	<b>1.5 µL pro Ansatz</b>

**Tabelle 15. Antikörper für die intrazelluläre Färbung (CD154/CD137 Messung).**

Antikörper	Menge pro Ansatz
FoxP3 FITC	20.0 µL
CD4 BV650	1.5 µL
CD3 Pacific Blue	6.0 µL
CD154 APC	5.0 µL
CD137 PC7	2.0 µL
TNF-α A700	0.5 µL
IFN-γ APC eFluor780	0.5 µL
IL-2 PE-C594	2.0 µL
<b>Gesamt</b>	<b>37.5 µL</b>

Nach der Färbung wurden die Zellen an dem Aria<sup>TM</sup> II Durchflusszytometer gemessen. Die Analyse und das Gating der gemessenen Proben erfolgten mit Hilfe der KALUZA-Software. Dabei wurden zunächst, mittels Vorwärtsstreulicht, TOF und Live/Dead-Farbstoff, die Dubletten und avitalen Zellen ausgegrenzt. Anschließend wurden durch das Vorwärts-Seitwärts-Streulicht und die CD3-Färbung die Lymphozyten und dann die T-Zell-Population abgegrenzt. Durch Auftragung von CD4, CD25 und FoxP3 konnte zwischen einer nT<sub>reg</sub>-Population und einer nicht-nT<sub>reg</sub>-Population differenziert werden. Beide Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer CD154/CD137-Expression in vier Subpopulationen eingeteilt: Doppelt-positive,

doppelt-negative, CD154-CD137+ und CD154+CD137- nT<sub>reg</sub>S bzw. nicht-nT<sub>reg</sub>S. Für jede Fraktion wurde die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bestimmt. Lag die Zahl durchflusszytometrisch erfasster Zellen bei <1000, wurde die Zytokinproduktion als „nicht detektiert“ (n.d.) gewertet. Sämtliche Gates wurden anhand der unstimulierten und ungefärbten Kontrollen ausgerichtet. Für eine detaillierte Darstellung der Gatingstrategie siehe Abschnitt 3.1.4., Abbildung 17.

### 2.2.5.3. Proliferationsassay

Zur Quantifizierung der Funktionalität expandierter nT<sub>reg</sub>S wurden autologe CD4+ und CD8+ T-Zellen mit dem Zellfarbstoff CFSE gefärbt und in unterschiedlichen Verhältnissen mit nT<sub>reg</sub>S kultiviert. CFSE ist ein Zellfarbstoff, der die Zellmembran penetriert und intrazelluläre Proteine bindet<sup>260</sup>. Findet eine Zellteilung statt, wird jeweils die Hälfte des proteingebundenen CFSEs an eine Tochterzelle gegeben, sodass das CFSE-Signal mit der Anzahl der Zellteilungen konsekutiv abnimmt. Dieser Prozess ist durchflusszytometrisch als sogenannte „Proliferationsbanden“ sichtbar. Da nT<sub>reg</sub>S die Proliferation von T<sub>conv</sub> hemmen, kann über den Prozentsatz proliferierender Zellen bzw. die Morphologie der Proliferationsbanden eine Aussage über die Suppressionsfähigkeit der nT<sub>reg</sub>S getroffen werden.

Die dafür notwendigen autologen CD4+ und CD8+ T<sub>conv</sub> wurden bereits am Tag der nT<sub>reg</sub>-Isolation aufgereinigt, in Kryomedium aufgenommen, und mit Hilfe eines Einfriergeräts kryokonserviert. Für den Proliferationsassay wurden die eingefrorenen Zellen aufgetaut und ruhten über Nacht in stimulationsfreiem Medium, bevor sie gezählt und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  / ml eingestellt wurden. Die Zellzählungen erfolgten mit der Neubauer Zählkammer. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt. 1  $\mu$ L CFSE wurde hinzugegeben und unter regelmäßigem Durchmischen für 3 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Hinzupipettieren von 10 ml kaltem (2-8°C) FBS abgebrochen und die Probe für 1 min inkubiert. Das Röhrchen wurde mit stimulationsfreiem Medium auf 50 ml aufgefüllt und für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt. Aufgrund von durchschnittlich hohen Zellverlusten bei dem Färbevorgang wurden die T<sub>conv</sub> erneut gezählt und auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  / ml eingestellt. Die Zellzahl der nT<sub>reg</sub>S wurde ebenfalls ermittelt und auf  $5 \times 10^5$  / ml eingestellt. T<sub>conv</sub> und nT<sub>reg</sub>S wurden in folgenden Verhältnissen für 96h ( $\pm$  10h) in einer 96-Loch-Platte kultiviert: 1:1, 2:1, 5:1, 10:1 und 20:1 (Tabelle 16). Der T<sub>conv</sub>-Anteil bestand stets aus 50% CD4+ und 50% CD8+ T<sub>conv</sub>. Drei Negativkontrollen (nur nT<sub>reg</sub>S, nur unstimulierte nT<sub>reg</sub>S und unstimulierte CD8+ und CD4+ T<sub>conv</sub>), eine Positivkontrolle (stimulierte CD8+ und CD4+ T<sub>conv</sub> = 1:0) und entsprechende ungefärbte Kontrollen wurden mitgeführt, um bei der Auswertung die Gates korrekt ausrichten zu können. Zu den „stim“-Ansätzen wurden je nach Gesamtzellzahl pro Loch gewaschene, CD3/CD28-gecoatete nT<sub>reg</sub> Suppression Inspector

Beads in einem Verhältnis von 1 Bead pro Zelle pipettiert. Sämtliche Ansätze lagen als Duplikate vor.

**Tabelle 16. Pipettierschema des Proliferationsassays.**

US = unstimuliert, UG = ungefärbt

<b>CD4+ / CD8+ 1:0</b>	100 µL CD4+ / 100 µL CD8+ 10 µL Beads
<b>nur nT<sub>reg</sub>S 0:1</b>	100 µL nT <sub>reg</sub> S 100 µL Medium 5 µL Beads
<b>CD4+ / CD8+ zu nT<sub>reg</sub>S 1:1</b>	50 µL CD4+ / 50 µL CD8+ 100 µL nT <sub>reg</sub> S 10 µL Beads
<b>CD4+ / CD8+ zu nT<sub>reg</sub>S 2:1</b>	50 µL CD4+ / 50 µL CD8+ 50 µL nT <sub>reg</sub> S 50 µL Medium 7.5 µL Beads
<b>CD4+ / CD8+ zu nT<sub>reg</sub>S 5:1</b>	50 µL CD4+ / 50 µL CD8+ 20 µL nT <sub>reg</sub> S 80 µL Medium 6 µL Beads
<b>CD4+ / CD8+ zu nT<sub>reg</sub>S 10:1</b>	50 µL CD4+ / 50 µL CD8+ 10 µL nT <sub>reg</sub> S 90 µL Medium 5.5 µL Beads
<b>CD4+ / CD8+ zu nT<sub>reg</sub>S 20:1</b>	50 µL CD4+ / 50 µL CD8+ 5 µL T <sub>reg</sub> S 95 µL Medium 5.25 µL Beads
<b>CD4+ / CD8+ US</b>	100 µL CD4+ / 100 µL CD8+
<b>nur nT<sub>reg</sub>S US</b>	100 µL T <sub>reg</sub> S 100 µL Medium
<b>CD4+ / CD8+ UG</b>	100 µL CD4+ / 100 µL CD8+ 10 µL Beads
<b>nur nT<sub>reg</sub>S UG</b>	100 µL T <sub>reg</sub> S 100 µL Medium 5.0 µL Beads

Nach 4 Tagen ( $\pm$  10h) Inkubation wurden sämtliche Ansätze resuspendiert und die Duplikate in vorbereiteten FACS-Röhrchen zusammengeführt. Anschließend wurden die Proben mit PBS gewaschen und die zu färbenden Ansätze mit 9 µL der vorbereiteten Antikörper-Stammlösung gefärbt (Tabelle 17).

**Tabelle 17. Antikörper für die Oberflächenfärbung (Proliferationsassay).**

<b>Antikörper</b>	<b>Menge pro Ansatz</b>
CD4 APC	4.0 µL
CD3 APC A750	4.0 µL
CD8 APC-Alexa Fluor® 700	0.5 µL
Live/Dead	0.5 µL
<b>Gesamt</b>	<b>9.0 µL pro Ansatz</b>

Nach 15 min Inkubation bei 2-8°C im Dunkeln wurden die Zellen erneut gewaschen und bis zur Messung im Kühlschrank gelagert. Diese wurde an dem Navios™ Durchflusszytometer durchgeführt. Das Gating und die Auswertung der gemessenen Proben erfolgten mit Hilfe der KALUZA-Software. Hierbei wurden zunächst, mittels Vorwärtsstreulicht, TOF und Live/Dead-Farbstoff, die Dubletten und avitalen Zellen ausgegrenzt. Anschließend konnten durch das Vorwärts-Seitwärts-Streulicht und die CD3-Färbung die Lymphozyten- und T-Zell-Population identifiziert werden. Durch die Auftragung von CD4 und CD8 gegen CFSE konnte der Anteil proliferierender T<sub>conv</sub> ermittelt werden. Die Gates wurden anhand der Positiv- (stimulierte T<sub>conv</sub> ohne nT<sub>reg</sub>) und Negativkontrollen (unstimulierte T<sub>conv</sub>, unstimulierte nT<sub>reg</sub>) sowie anhand der ungefärbten Proben ausgerichtet. Für eine detaillierte Darstellung der Gatingstrategie siehe Abschnitt 3.1.3., Abbildung 15. Zur Berechnung der maximalen Suppressionskapazität wurde folgende Formel angewandt:  $\left(1 - \frac{(1:1\text{-Wert})}{(1:0\text{-Wert})}\right) \times 100$ .

#### 2.2.5.4. Dura Clone Messungen

Für das Immunmonitoring der mit nT<sub>reg</sub>s behandelten Patienten wurden Dura Clone Röhren verwendet. Es handelt sich um gebrauchsfertige FACS-Röhren, die eine standardisierte Menge getrockneter Antikörper enthalten. Es wurden 6 verschiedene FACS-Panels verwendet (Tabelle 18). Die Färbeprotokolle entsprachen den Empfehlungen des Herstellers.

##### Tabelle 18. Antikörper der Dura Clone Röhren.

Für das Immunmonitoring der Patienten wurden 6 verschiedene FACS-Panels verwendet, welche Antikörper gegen unterschiedliche Oberflächen- und intrazelluläre Marker enthielten. Diese Antikörper, an verschiedene Fluochrome gekoppelt, lagen getrocknet in gebrauchsfertigen FACS-Röhren vor.  
\* zusätzlich hinzugefügte Antikörper

Panels (Tube)	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	A647	A700	APC-A700	APC-A750	Pacific Blue	KrO
DuraClone IM Phenotyping Basic	CD16	CD56	CD19	-	CD14	CD4		CD8		CD3		CD45
Dura Clone IM B Cell	IgD	CD21	CD19	-	CD27	CD24				CD38	IgM	CD45
Dura Clone IM T Cell	CD45RA	CCR7	CD28	PD-1	CD27	CD4		CD8		CD3	CD57	CD45
Dura Clone IM DC	CD16	Lineage	-	CD1c	CD11c	Clec9A			CD123		HLA-DR	CD45
Dura Clone IM TCR	TCRγδ	TCRαβ	HLA-DR	-	TCRVδ1	CD4		CD8		CD3	TCRVδ2	CD45
Dura Clone IM T <sub>reg</sub>	CD45RA	CD25	-	CD39	CD4		FoxP3		CD127*	CD3	Helios	CD45

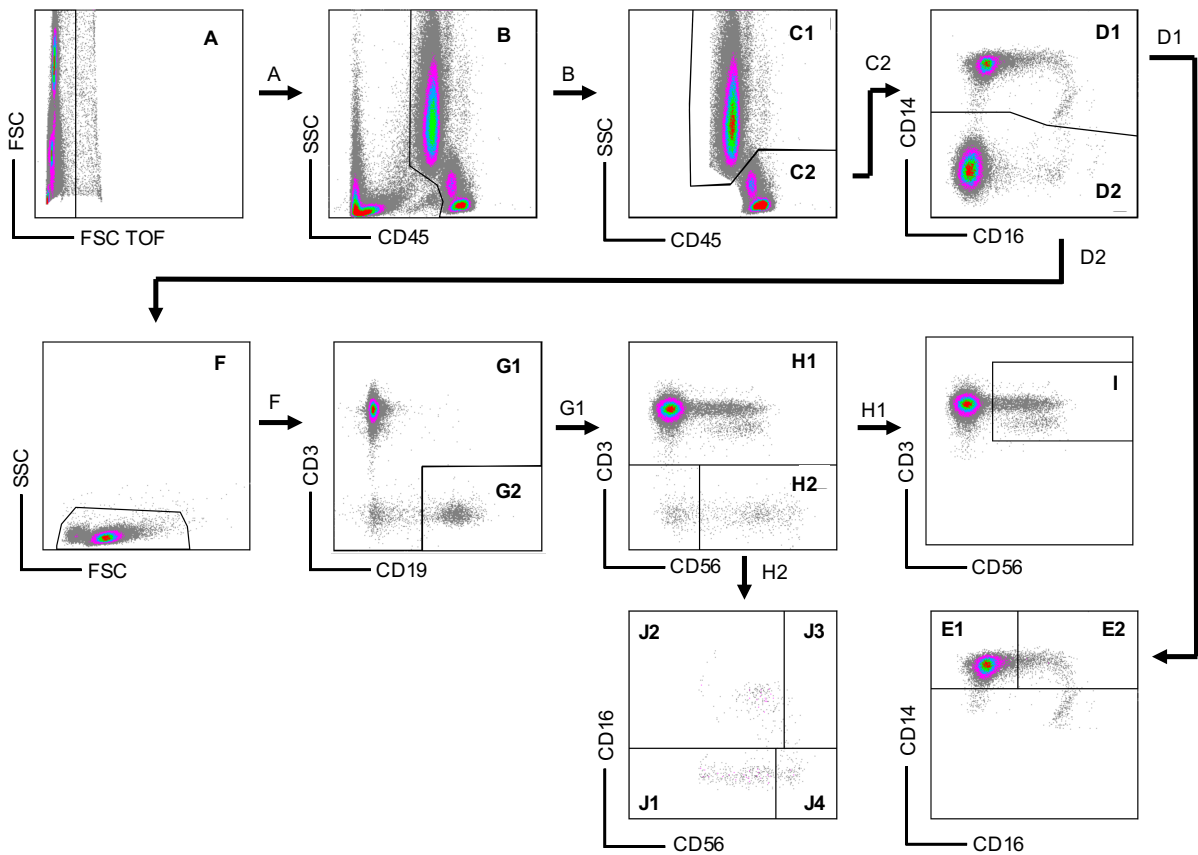
In das jeweilige Dura Clone Röhren wurde Vollblut für das Basis Phänotyp- (100 µL), B Zell- (100 µL, vorher 2 x gewaschen), T Zell- (100 µL), TCR- (100 µL) und DC-Panel (200 µL) pipettiert. Nach gutem Durchmischen wurden alle Proben für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 3 ml der angesetzten Versa-Lyse hinzugegeben, die Suspension durchmischt, und alle Ansätze für weitere 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Röhrrchen für 5 min bei 200 x g zentrifugiert, die Überstände abgenommen und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Die Überstände wurden bis auf ein Messvolumen von 400 µL abgenommen. Die Proben wurden bis zur Messung bei 2-8°C im Dunkeln gelagert.

Die Färbung für das T<sub>reg</sub>-Panel erfolgte nach einem anderen Protokoll. Da sowohl eine Oberflächen- als auch eine intrazelluläre Färbung durchgeführt wurde, gab es zwei verschiedene Dura Clone T<sub>reg</sub>-Röhrrchen (Röhrrchen 1 und 2). Zunächst wurden 10 µL des zusätzlichen CD127 APC-A700 Antikörpers in das Dura Clone T<sub>reg</sub>-Röhrrchen 1 pipettiert. Anschließend wurden 50 µL EDTA-Vollblut hinzugegeben, die Suspension gut durchmischt und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Der Ansatz wurde mit PBS gewaschen (5 min, 500 x g) und das Zellpellet in 50 µL 100% FBS resuspendiert. Zur Fixierung wurden 5 µL PerFix-nc Puffer 1 hinzupipettiert, die Probe gut durchmischt und für 15 min erneut bei RT im Dunkeln inkubiert. Als nächstes wurden die Zellen durch Zugabe von 400 µL PerFix-nc Puffer 2 permeabilisiert. Der Röhrrcheninhalt wurde gut durchmischt und anschließend vollständig in das T<sub>reg</sub>-Röhrrchen 2 transferiert. Dies wurde erneut durchmischt und für 60 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 3 ml PBS hinzugefügt, die Probe für weitere 5 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden 3 ml des angesetzten PerFix nc Puffer 3 hinzugegeben und erneut gewaschen. Wie bei den anderen Dura Clone Röhrrchen wurde ein Messvolumen von 400 µL zurückbehalten und die Probe bis zur Messung bei 2-8°C im Dunkeln gelagert.

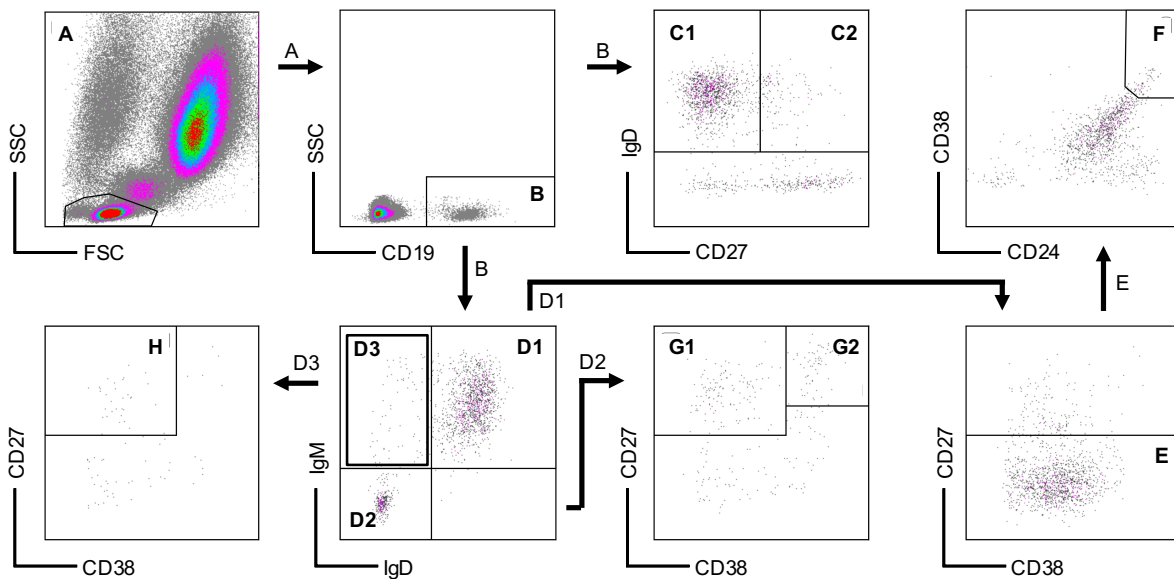
Die Messung sämtlicher Dura Clone Panels wurde am Navios™ Durchflusszytometer durchgeführt. Das Gating und die Auswertung der Experimente erfolgten mit der KALUZA-Software (Abbildung 5-10). Die Gatingstrategien wurden weitgehend von der „ONE Study“ übernommen<sup>261</sup>. In den ersten beiden Schritten wurden stets die Dubletten ausgegrenzt und die Leukozytenpopulation identifiziert (Abbildung 5).





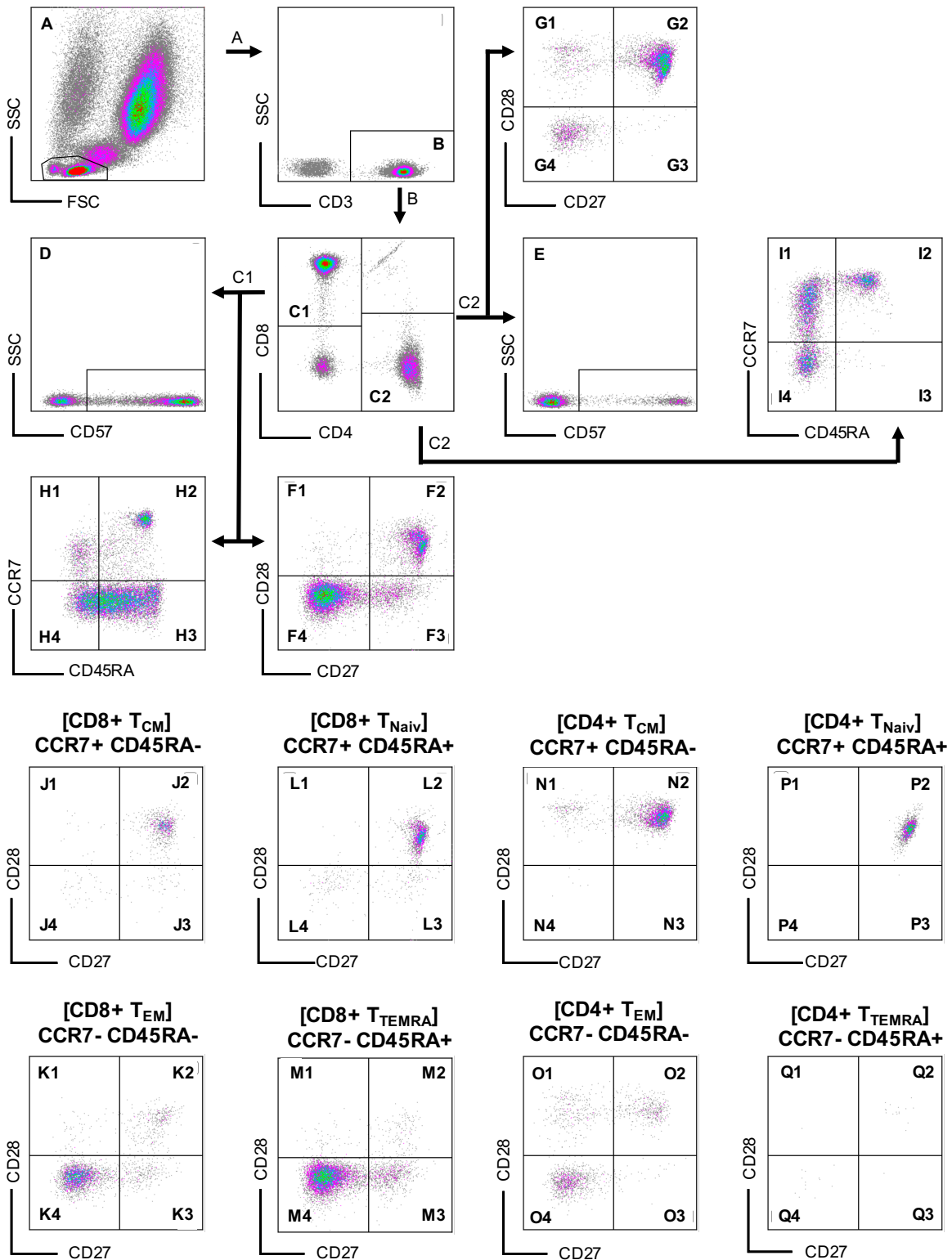
**Abbildung 5. Gatingstrategie des Basis Phänotyp-Panels.**

Nach Ausgrenzung der Dubletten (A) und Identifikation der Leukozyten-Population mittels CD45 (B) wurden durch das Signal im Seitwärts-Streulicht zunächst die Granulozyten (C1) von den Leukozyten ohne Granulozyten (C2) differenziert. Als nächstes wurden von den Leukozyten ohne Granulozyten mittels CD14 und CD16 die Monozyten abgegrenzt (D1) und weiter in CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> (E1) und CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> (E2) Monozyten charakterisiert. Aus den Leukozyten ohne Granulozyten und Monozyten (D2) wurde im Vorwärts-Seitwärts-Streulicht die Lymphozyten-Population dargestellt (F), von denen anschließend mittels CD19 die Lymphozyten ohne B-Zellen (G1) und die B-Zellen (G2) dargestellt wurden. Von Letzteren wurden mittels CD3 die T-Zellen (H1) und mittels CD56 die NK-Zellen (H2) abgebildet. Von den T-Zellen wurden mittels CD56 die NK-T-Zellen unterschieden (I). Zudem wurden die NK-Zellen entsprechend ihrer Expression von CD16 weiter in CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> NK-Zellen (J1), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK-Zellen (J2), CD56<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> NK-Zellen (J3) und CD56<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> NK-Zellen (J4) untergliedert.



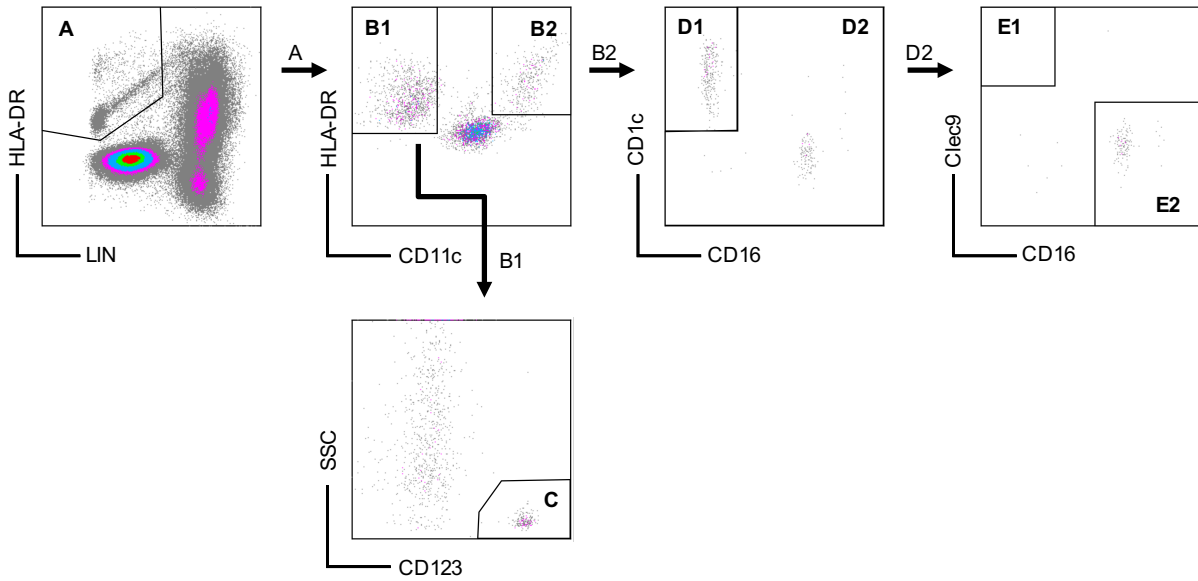
**Abbildung 6. Gatingstrategie des B-Zell-Panels.**

Zunächst wurden anhand des Vorwärts-Seitwärts-Streulichts die Lymphozyten aus der Leukozyten-Population selektiert (A). Davon ließen sich, durch das Auftragen von CD19, die B-Zellen abgrenzen (B), die anschließend durch verschiedene Marker weiter untergliedert wurden. Als erstes konnte durch die Expression von IgD und CD27 zwischen naiven B-Zellen (C1) und Marginalzonen-B-Zellen (C2) unterschieden werden. Zudem wurde IgD gegen IgM aufgetragen wodurch die Populationen IgM<sup>+</sup> (D1), IgM-IgD<sup>-</sup> (D2) und IgM+IgD<sup>+</sup> (D3) B-Zellen dargestellt wurden. Von den IgM<sup>+</sup> B-Zellen wurden die IgM+CD27<sup>-</sup> B-Zellen (E) und von diesen wiederum die transitionalen B-Zellen dargestellt (F) differenziert. Die IgD-IgM<sup>-</sup> B-Zellen wurden ebenfalls weiter unterteilt; von ihnen wurden mittels CD27 und CD38 die klassengewechselten B-Zellen (G1) und die Plasmablasten (G2) differenziert. Schließlich wurden, ebenfalls mittels CD27 und CD38, von den IgD<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup> B-Zellen die Nicht-klassengewechselten B-Zellen (H) abgebildet.



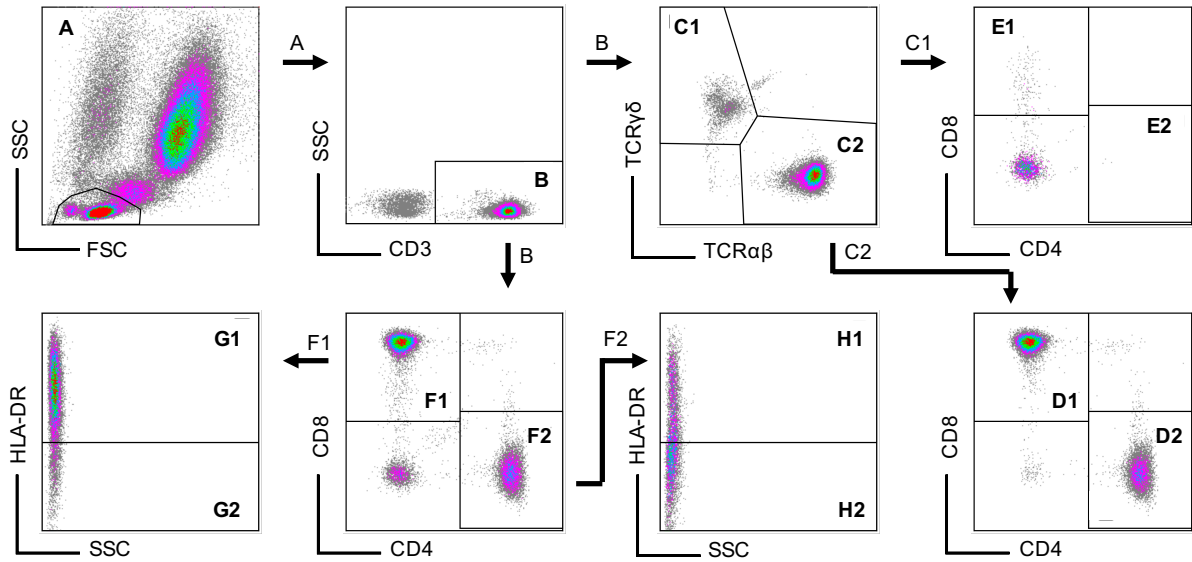
**Abbildung 7. Gatingstrategie des T-Zell-Panels.**

Zunächst wurden die Lymphozyten (A), und die CD3+ T-Zellen (B) abgegrenzt. Anschließend fand die Auftrennung in CD8+ (C1) und CD4+ T-Zellen (C2) statt. Diese beiden Populationen wurden jeweils dreifach aufgegliedert: 1. In CD8+ CD57+ (D) und CD4+ CD57+ T-Zellen (E) 2. Nach der Expression von CD27 und CD28 in je vier Subpopulationen für CD8+ (F1-4) und CD4+ T-Zellen (G1-4) und 3. Nach der Expression von CCR7 und CD45RA in CD8+ zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>CM</sub>; H1), CD8+ naive T-Zellen (T<sub>Naiv</sub>; H2), CD8+ TEMRA T-Zellen (T<sub>TEMRA</sub>; H3) und CD8+ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>EM</sub>; H4); für CD4+ T-Zellen respektiv (I1-4). Für diese Subpopulationen wurde zusätzlich, je für das CD8+ (J, K, L, M) und CD4+ T-Zellkompartiment (N, O, P, Q), die Expression von CD27 und CD28 aufgetragen.



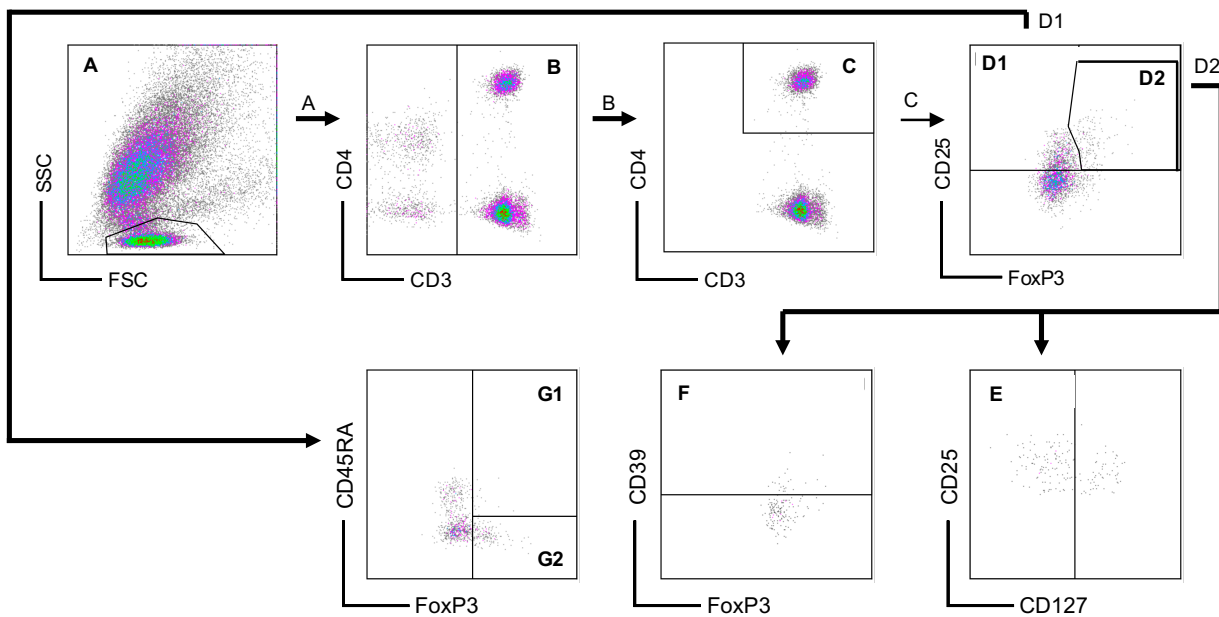
**Abbildung 8. Gatingstrategie des DC-Panels.**

Von den Leukozyten wurden zunächst durch Auftragung von LIN und HLA-DR die LIN-HLA-DR+ DCs abgegrenzt (A). Diese wurden entsprechend ihrer Expression von CD11c in CD11c- DCs (B1) und mDCs (B2) untergliedert. Durch ein weiteres Punktdiagramm konnte aus den CD11c- DCs die CD123+ pDCs dargestellt werden (C). Aus den mDCs wiederum konnte mit Hilfe der Marker CD1c und CD16 eine mDC1-Population (D1) und eine nicht-mDC1-Population (D2) herausgestellt werden. Letztere wurde schließlich mittels Clec9 in mDC2 (E1) und CD16+ mDCs (E2) unterteilt.



**Abbildung 9. Gatingstrategie des TCR-Panels.**

Nachdem von den Leukozyten erst die Lymphozyten (A) und anschließend die T-Zellen (B) angegrenzt wurden, erfolgte die Differenzierung zwischen  $\gamma\delta$ + (C1) und  $\alpha\beta$ + (C2) T-Zellen mit Hilfe gleichnamiger Marker. Sowohl für die  $\alpha\beta$ + Subpopulation (D1, D2) als auch für die  $\gamma\delta$ + T-Zellen (E1, E2) wurde die Expression der Marker CD4 und CD8 aufgetragen. Außerdem wurden von den T-Zellen direkt die CD8+ (F1) und CD4+ T-Zellen (F2) abgegrenzt und anschließend bezüglich ihrer HLA-DR Expression dargestellt, sodass zwischen den Subpopulationen CD8+HLA-DR+ (G1), CD8+HLA-DR- (G2), CD4+HLA-DR+ (H1) und CD4+HLA-DR- (H2) unterschieden werden konnte.



**Abbildung 10. Gatingstrategie des T<sub>reg</sub>-Panels.**

Aus der Leukozyten-Population wurden als erstes die Lymphozyten (A) und anschließend, mit Hilfe der Marker CD3 und CD4, erst die T-Zellen (B) und folgend die CD4+ T-Zellen (C) differenziert. Von diesen wurden die CD25<sup>high</sup>CD4+ T-Zellen (D1) und mittels FoxP3 zudem die nT<sub>reg</sub>-Population (D2) abgegrenzt. Von Letzterer wurde in einem weiteren Schritt sowohl die CD127 Expression (E) als auch CD39 Expression (F) aufgetragen. Ferner wurden die CD25<sup>high</sup>CD4+ T-Zellen durch Darstellung von FoxP3 und CD45RA in naive nT<sub>reg</sub>S (G1) und CD45RA- nT<sub>reg</sub>S (G2) untergliedert.

### 2.2.6. Klinisches Follow-Up nach nT<sub>reg</sub>-ACT

Zur klinischen und immunologischen Überwachung nach nT<sub>reg</sub>-ACT wurden Follow-Up-Untersuchungen in Abständen von maximal sechs Wochen angestrebt. Anfangs wurden die Patienten engmaschiger überwacht, später in Intervallen von 4 - 6 Wochen. Bei jeder Vorstellung fand ein Patientengespräch, eine klinische Untersuchung, eine Entnahme von ca. 15 ml Vollblut und eine Beurteilung der cGVHD mit Hilfe von standardisierten cGVHD-Evaluationsbögen statt. Bei Patient 1 wurde zusätzlich der Status von Haut und Schleimhäuten fotodokumentiert.

### 2.2.7. Graphische Auswertung

Die Daten sämtlicher Experimente wurden mit Hilfe der Analyse-Software KALUZA ausgewertet und in Microsoft Excel tabellarisch strukturiert. Schließlich wurden die Daten mittels GraphPad Prism 7 und Microsoft PowerPoint in graphische Darstellungen konvertiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung des nT<sub>reg</sub>-Zellprodukts

Für die klinische Anwendung nT<sub>reg</sub>-basierter Zelltherapien ist die Herstellung reiner und möglichst homogener Zellprodukte notwendig. Dafür bedarf es standardisierter Prozesse zur Qualitätssicherung und Kontrolle des (1) Zellwachstums, (2) Zellproduktphänotyps sowie (3) der Zellfunktionalität. Im Rahmen dieser Arbeit sind sowohl etablierte als auch neue Analysemethoden zur Anwendung gekommen, um die Charakterisierung benannter Produkteigenschaften zu verbessern. Zusätzlich wird der Einfluss des Arzneistoffs G-CSF auf nT<sub>reg</sub>-Zellprodukte untersucht. Ziel ist hierbei, die Eignung von G-CSF mobilisiertem Vollblut als alternative nT<sub>reg</sub>-Quelle zu bewerten. Abbildung 11 gibt einen Überblick über das experimentelle Vorgehen.

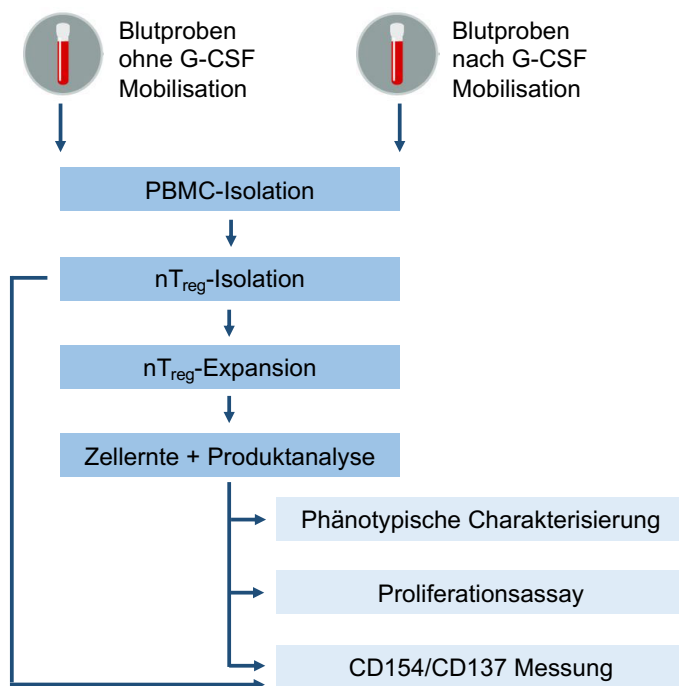


Abbildung 11. Experimentelles Vorgehen zur Charakterisierung von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten.

##### 3.1.1. Expansion von nT<sub>reg</sub>-Produkten mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation

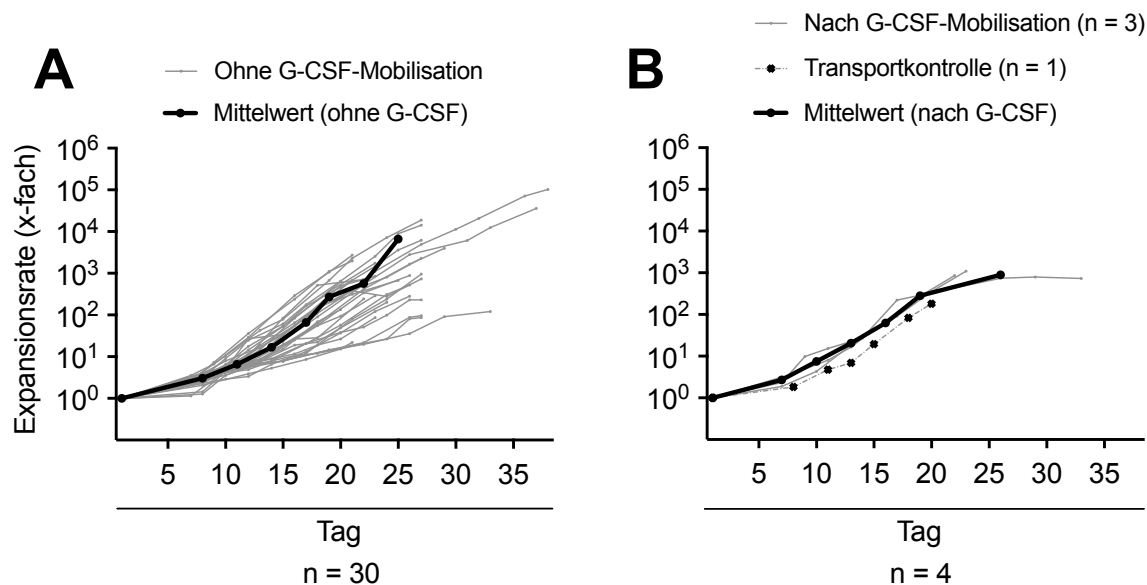
Für die klinische Anwendung von nT<sub>reg</sub>-ACTs werden ausreichende sowie berechenbare Expansionsraten benötigt. Aus diesem Grund stellt die Analyse der Zellkulturexpansionsraten ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung des Zellprodukts dar. Um herauszufinden, ob die Applikation von G-CSF vor nT<sub>reg</sub>-Isolation das spätere Zellwachstum beeinflusst, wurden nT<sub>reg</sub>-Linien mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation des Spenders miteinander

verglichen. Insgesamt wurden  $n=30$   $nT_{reg}$ -Linien von gesunden Spendern ohne G-CSF-Mobilisation und  $n=3$   $nT_{reg}$ -Linien nach vorausgehender G-CSF-Mobilisation kultiviert. Da sämtliche G-CSF mobilisierte Proben über circa 600 km vom Abnahme- zum Isolationsort transportiert werden mussten, wurde eine weitere, nicht G-CSF mobilisierte Probe als Transportkontrolle ( $n=1$ ) mitgeführt.

Durchschnittlich wurden aus 100 ml nicht G-CSF mobilisiertem Vollblut  $1,3 \times 10^6$   $nT_{reg}$ s isoliert. Für die  $nT_{reg}$ -Isolation nach G-CSF-Mobilisation standen pro Zelllinie nur ca. 27 ml Vollblut zur Verfügung, woraus im Mittel  $1,1 \times 10^6$   $nT_{reg}$ s isoliert wurden. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Blutvolumina wurde somit aus G-CSF mobilisiertem im Vergleich zu unbehandeltem Vollblut die 3-fache  $nT_{reg}$ -Zellzahl gewonnen.

Sowohl die  $nT_{reg}$ -Linien nach G-CSF-Mobilisation als auch die unbehandelten  $nT_{reg}$ s wurden im Mittel für  $26 (\pm 6$  vs.  $\pm 5$ , respektiv) Tage kultiviert und während dieses Zeitraums  $6 (\pm 1)$ -mal restimuliert. Nach 7 Tagen ( $\pm 1$ ) zeigte die nicht G-CSF mobilisierte Gruppe im Mittel eine 3-fache (Abbildung 12; A) und die G-CSF mobilisierte Gruppe eine 2.7-fache Expansion (Abbildung 12; B). Nach 19 Tagen war die Zellzahl der nicht mobilisierten Gruppe um das 270-fache und die mobilisierte Gruppe um das 280-fache angestiegen. Die Expansionsraten der beiden Gruppen verhielten sich somit in den ersten drei Zellkulturwochen weitgehend gleich.

Am Tag der Zellernte (min. Tag 20, max. Tag 33) zeigte die nicht mobilisierte Gruppe jedoch eine deutlich größere Streuung im Vergleich zur G-CSF mobilisierten Gruppe: In Ersterer reichte die Expansionsrate von 86-fach (Zellernte an Tag 23) bis 102.000-fach (Zellernte an Tag 38) und betrug im Mittel 6618-fach (Durchschnittlicher Erntetag: Tag 25), in der G-CSF mobilisierten Gruppe lag die Wachstumsrate zwischen 728-fach (Zellernte an Tag 33) und 1096-fach (Zellernte an Tag 23) mit einem Mittelwert von 895-fach (Durchschnittlicher Erntetag: Tag 26). Die Transportkontrolle zeigte - mit einer Expansionsrate von 180-fach am Tag der Zellernte (Tag 20) - ein deutlich niedrigeres Wachstum im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen.



**Abbildung 12. Expansion von  $nT_{reg}$ -Kulturen mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation.**

Zu jedem Restimulationszeitpunkt sowie am Erntetag wurde die Zellzahl der  $nT_{reg}$ -Kulturen mit Hilfe des Casy Cell Counters bestimmt und dokumentiert. Anschließend wurden die x-fachen Expansionsraten der  $nT_{reg}$ -Zellkulturen ohne G-CSF-Mobilisation (A) und nach G-CSF-Mobilisation (B) berechnet und das durchschnittliche Zellwachstum ergänzend aufgetragen.

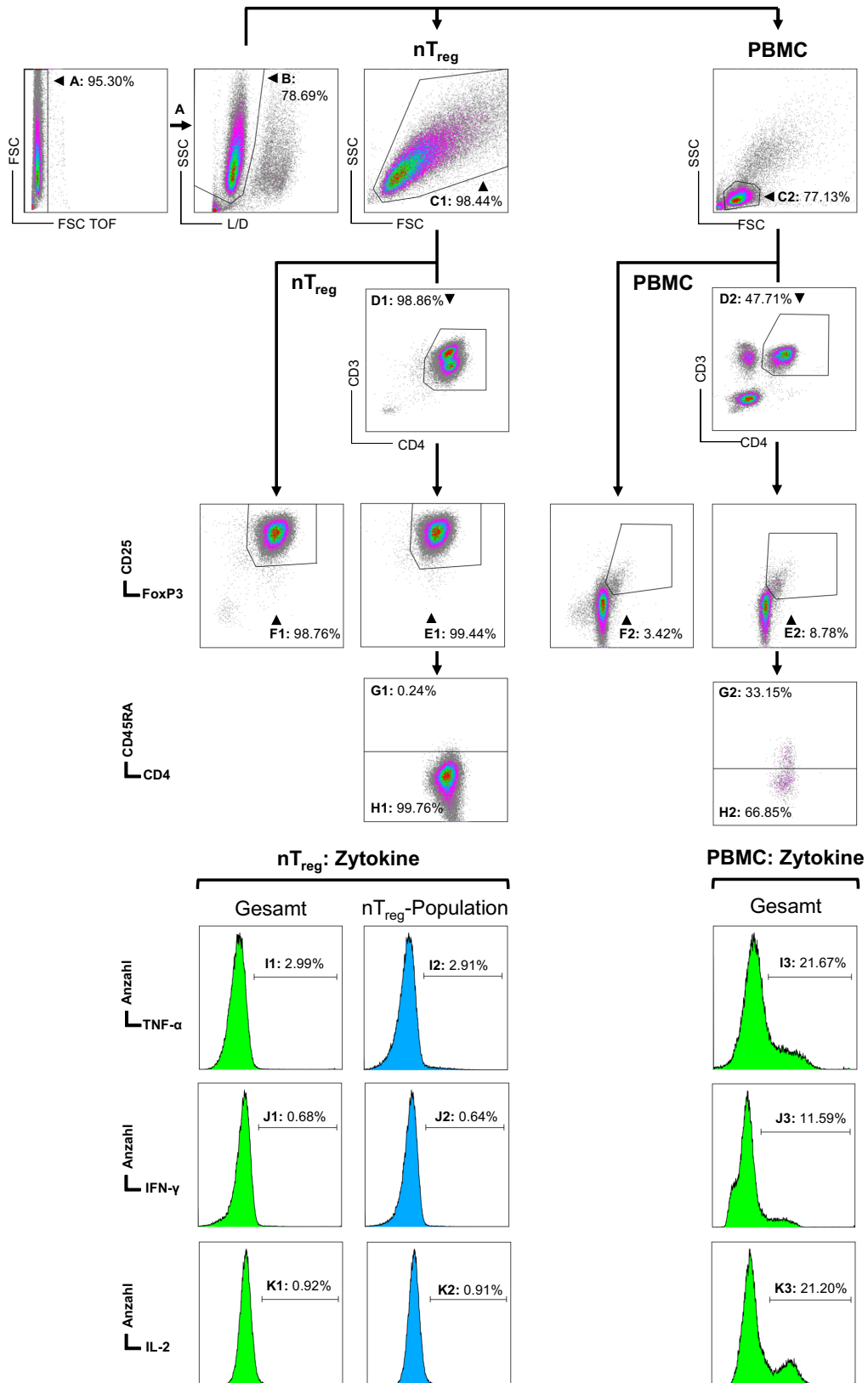
### 3.1.2. Phänotyp von $nT_{reg}$ -Produkten mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation

Nach polyklonaler Expansion der  $nT_{reg}$ -Zelllinien wurde eine durchflusszytometrische Messung zur phänotypischen Charakterisierung des  $nT_{reg}$ -Zellprodukts durchgeführt (Abbildung 13). Als Positivkontrollen der Zytokinproduktion wurden  $T_{conv}$  enthaltende PBMCs des gleichen Spenders oder, da im Falle der G-CSF mobilisierten  $nT_{reg}$ -Linien nicht anders möglich, eines Fremdspenders mitgeführt.

Bei der Analyse wurden zunächst die Dubletten (Abbildung 13; A) aussortiert und die vitalen Zellen (Abbildung 13; B) sowie die Lymphozytenpopulation (Abbildung 13; C) identifiziert. Anschließend wurden durch Auftragung von CD3 und CD4 die  $CD4^+$  T-Zellen selektiert, deren Anteil im  $nT_{reg}$ -Produkt bei bis zu 98,86% (Abbildung 13; D1) lag, während die PBMCs (Kontrolle) nur einen  $CD4^+$  T-Zellanteil von ca. 48% aufwiesen (Abbildung 13; D2). Der prozentuale Anteil von  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$   $nT_{reg}$ s an der Gesamtzellpopulation ist für die Beurteilung der Produktreinheit besonders wichtig. Er lag nach polyklonaler Expansion bei bis zu 98,76% (Abbildung 13; F1). Die  $nT_{reg}$ s im Zellprodukt zeigten zu nahezu 100% einen  $CD45^+$  Phänotyp (Abbildung 13; H1). Der  $nT_{reg}$ -Anteil der PBMCs war mit ca. 3,4% (Abbildung 13; F2) deutlich geringer, wohingegen der Anteil naiver  $CD45^+$   $nT_{reg}$ s mit etwa 33% signifikant höher lag als im  $nT_{reg}$ -Produkt (Abbildung 13; G2). Zur weiteren Qualitätsprüfung wurden die proinflammatorischen Zytokine  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  und  $IL-2$  bestimmt, welche von  $T_{conv}$ , nicht aber von  $nT_{reg}$ s, gebildet werden. Während die PBMCs nach 6h Stimulation hohe Werte für  $TNF-\alpha$



(>20 %), IFN- $\gamma$  (>10 %) und IL-2 (>20 %) zeigten (Abbildung 13; I3, J3, K3), fanden sich im nT<sub>reg</sub>-Zellprodukt kaum zytokinproduzierende Zellen (Abbildung 13; I1, J1, K1). Die Abbildung 14 zeigt eine Ergebnisübersicht sämtlicher Messungen.

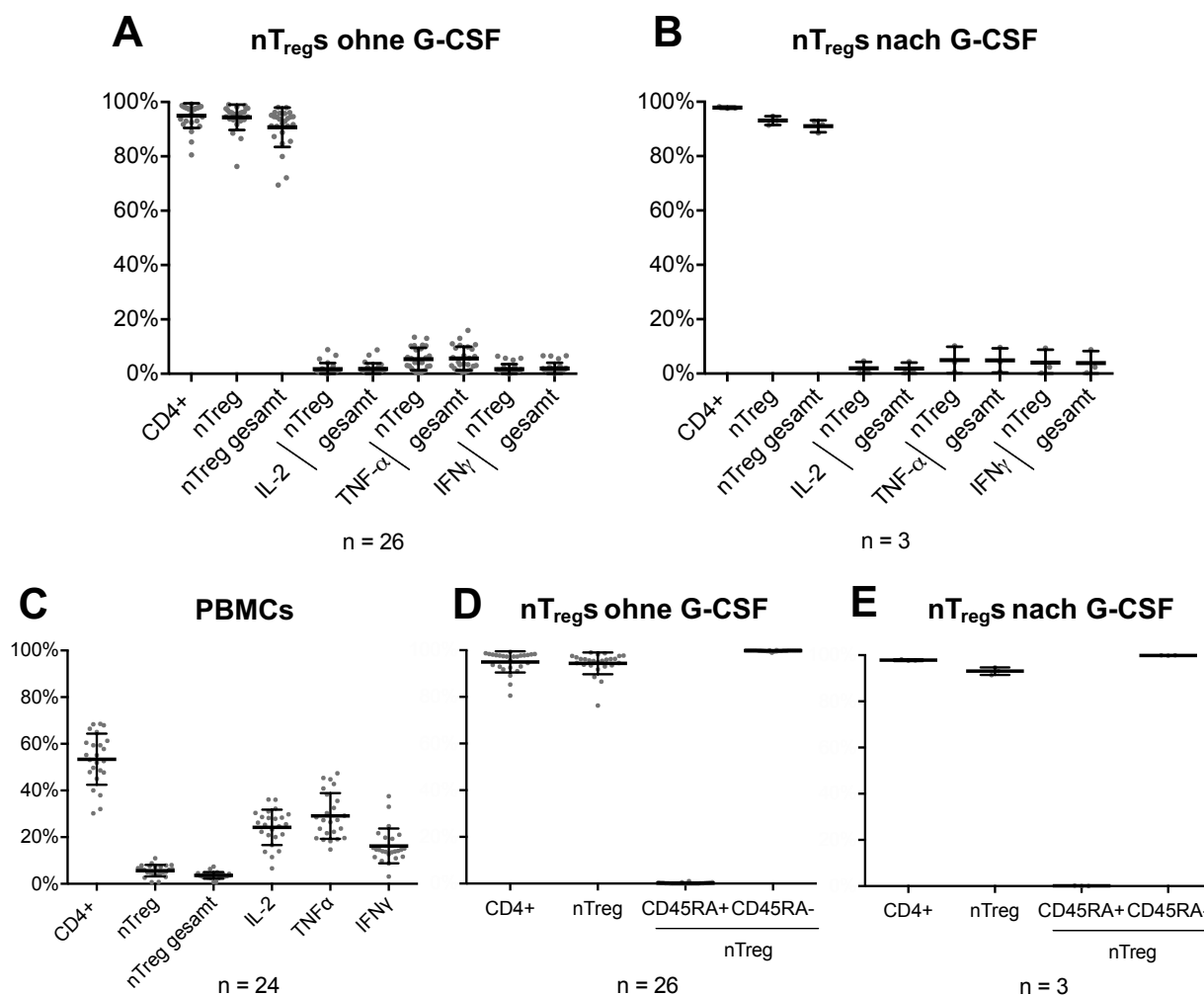


**Abbildung 13. Phänotypische Charakterisierung zur Bestimmung der Produktreinheit.**

Nach 26 ( $\pm$  5) Tagen Zellkultur erfolgte die phänotypische Charakterisierung zur Beurteilung der Produktreinheit. Nach Zellernte und Beaddepletion wurden nicht G-CSF mobilisierte nT<sub>reg</sub>s und nT<sub>reg</sub>s nach G-CSF-Mobilisation über Nacht geruht. Am Folgetag wurden die nT<sub>reg</sub>s für 6h mit PMA/Ionomycin stimuliert und für Live/Dead, CD3, CD4, CD25, CD45RA, FoxP3, TNF- $\alpha$ , IL-2 und IFN- $\gamma$  gefärbt. PBMCs wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Messung wurde am Navios™ Durchflusszytometer durchgeführt. Das Gating erfolgte anhand unstimulierter und ungefärbter Kontrollen. Abgebildet sind die Ergebnisse einer repräsentativen nicht G-CSF mobilisierten nT<sub>reg</sub>-Linie.

Um herauszufinden, ob das periphere Blut G-CSF mobilisierter Stammzellspender eine geeignete Quelle für die Herstellung von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten darstellt, wurde zudem der Phänotyp von nT<sub>reg</sub>-Linien mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation miteinander verglichen (Abbildung 14). In beiden Gruppen lag der durchschnittliche Anteil der CD4+ Zellen sowie der nT<sub>reg</sub>-Anteil an den CD4+ Zellen bei > 90% (Abbildung 14; A, B). Tatsächlich lag der Anteil von nT<sub>reg</sub>s an der Gesamtzellpopulation sowohl in der G-CSF mobilisierten Gruppe als auch in der Gruppe ohne G-CSF-Mobilisation bei einem Mittelwert von exakt 91%. Der durchschnittliche Anteil zytokinbildender Zellen lag in beiden Gruppen für sämtliche Zytokine bei <6% (Abbildung 14; A, B). Die PBMC Messungen wiesen dagegen Mittelwerte von >20 % für TNF- $\alpha$  und IL-2 sowie >15% für IFN- $\gamma$  auf (Abbildung 14; C). Schließlich wurde für beide nT<sub>reg</sub>-Gruppen das Verhältnis von naiven CD45RA+ nT<sub>reg</sub>s zu CD45RA- nT<sub>reg</sub>s nach polyklonaler Expansion untersucht (Abbildung 14; D, E). Die Zellprodukte beider Gruppen bestanden ausschließlich aus CD45RA- nT<sub>reg</sub>s.

Zusammengefasst zeigt der Vergleich von nT<sub>reg</sub>-Linien mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation somit keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Produktreinheit und des nT<sub>reg</sub>-Phänotyps.



**Abbildung 14. Phänotypische Charakterisierung polyklonal expandierter  $nT_{reg}S$  mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation.**

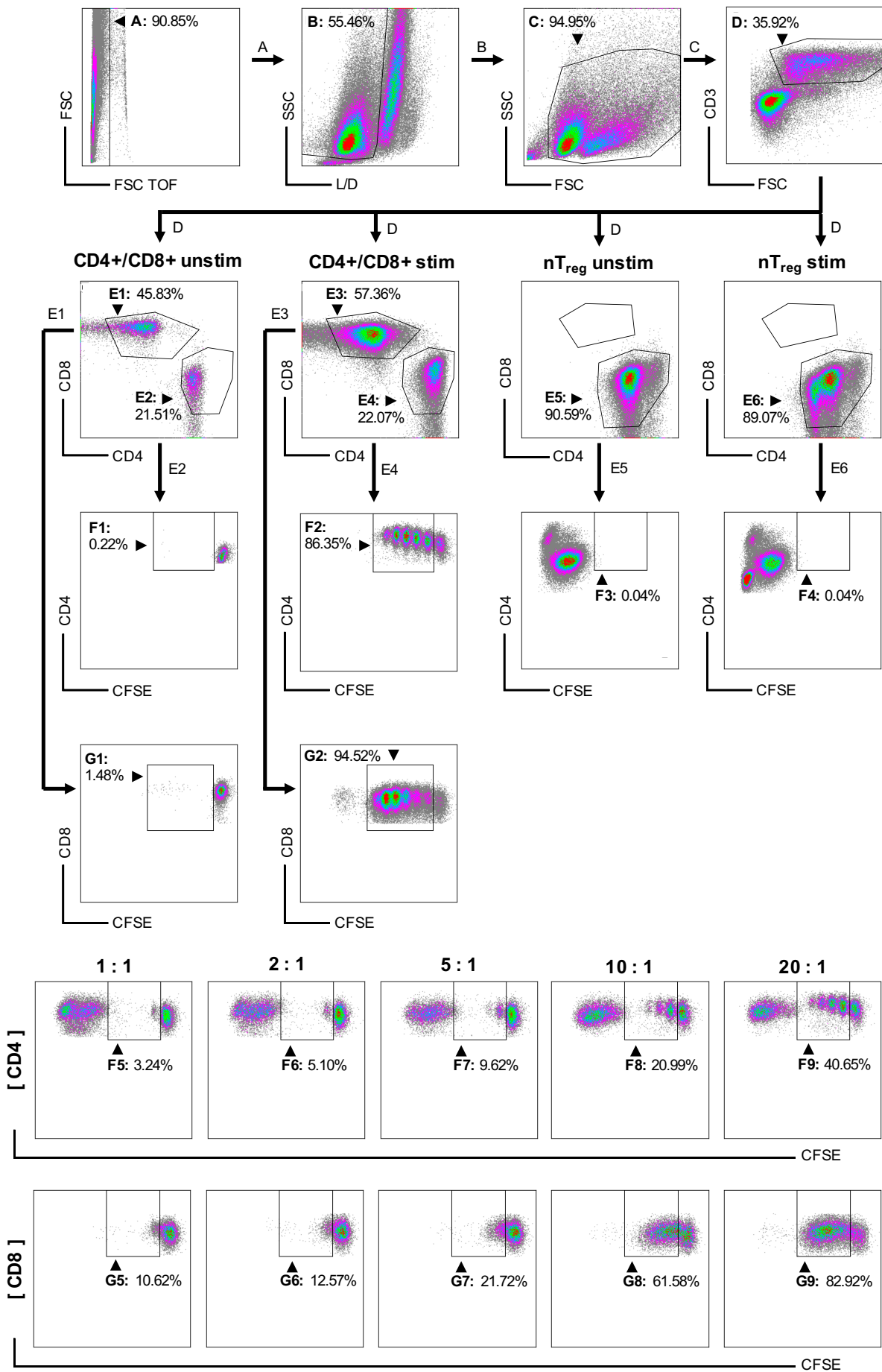
Für die phänotypische Charakterisierung polyklonal expandierter  $nT_{reg}S$  erfolgten durchflusszytometrische Messungen am Navios Durchflusszytometer. Expandierte  $nT_{reg}S$  ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation (A, D), expandierte  $nT_{reg}S$  nach vorausgehender G-CSF-Mobilisation (B, E) und PBMCs (C) wurden für 6h mit PMA/Ionomycin stimuliert und für Live/Dead, CD3, CD4, CD25, CD45RA, FoxP3, TNF- $\alpha$ , IL-2 und IFN- $\gamma$  gefärbt.

### 3.1.3. Funktionalität von $nT_{reg}$ -Produkten mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation

Die Funktionalität von  $nT_{reg}S$  ist vor allem durch die Suppression von  $T_{conv}$  charakterisiert. Dadurch können beispielsweise überschießende Immunreaktionen verhindert werden. Aus diesem Grund ist neben der phänotypischen Charakterisierung die Untersuchung der suppressiven Kapazität des Zellprodukts wichtig. Hierfür wurde ein CFSE-basierter Proliferationsassay angewandt, bei dem expandierte  $nT_{reg}S$  mit CD4+ und CD8+  $T_{conv}$  für 4 Tage kokultiviert werden (Abschnitt 2.2.5.3). Die einzelnen Ansätze enthielten unterschiedliche Anteile von  $T_{conv}$  und  $nT_{reg}S$  (1:1, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1). Nach der Inkubation wurde für jedes

$T_{conv}:nT_{reg}$ -Verhältnis der Anteil proliferierender  $T_{conv}$  durchflusszytometrisch bestimmt und auf einen dosisabhängigen Effekt der  $nT_{regs}$  auf die  $T_{conv}$ -Proliferation untersucht (Abbildung 15).

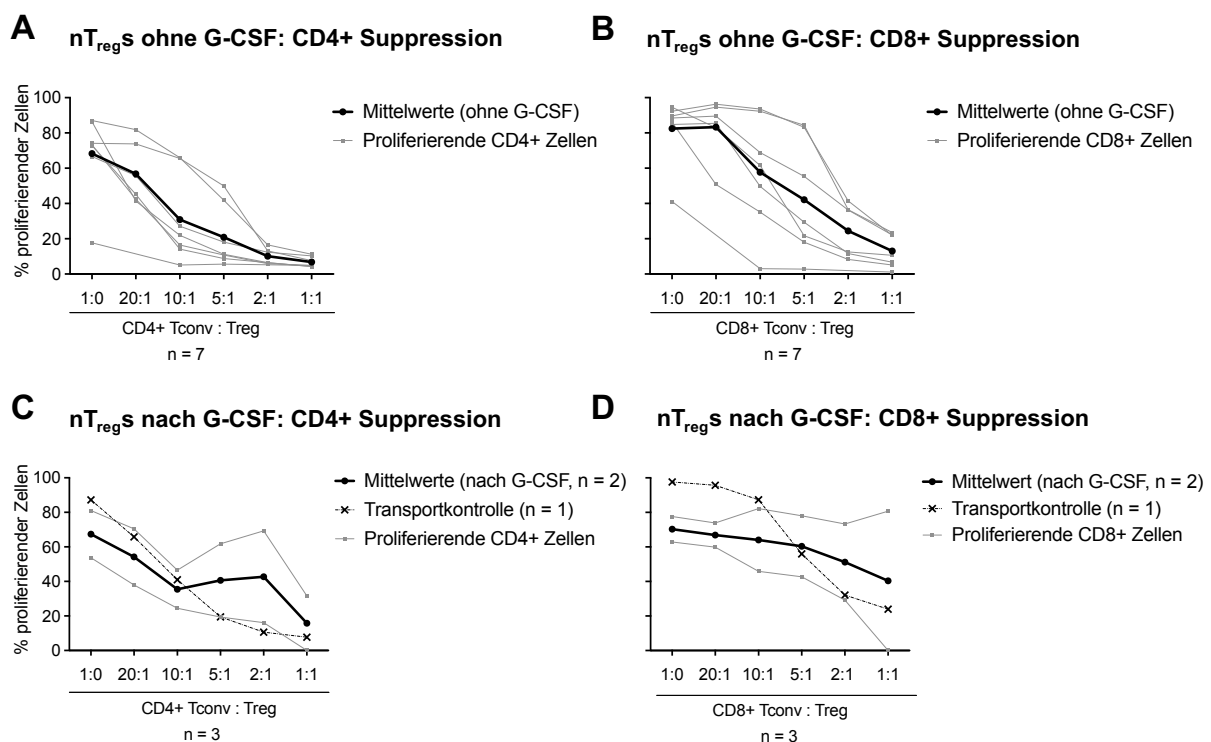
Für die Analyse wurden zunächst die Dubletten und avitalen Zellen aussortiert (Abbildung 15; A, B) und die Leukozytenpopulation und die  $CD3+$  T-Zellen identifiziert (Abbildung 15; C, D). Anschließend erfolgte die Differenzierung in  $CD4+$  und  $CD8+$  T-Zellen (Abbildung 15; E1-E6). Während die unstimulierten  $T_{conv}$  kaum proliferierende Zellen aufwiesen (Abbildung 15; F1, G1), lag der Anteil proliferierender  $T_{conv}$  nach Stimulation bei bis 86.35 % für  $CD4+$  und bis 94.52 % für  $CD8+$  (Abbildung 15; F2, G2). Bei Betrachtung der  $nT_{reg}$ -Verdünnungsreihen für  $CD4+$  (Abbildung 15; F5-9) und  $CD8+$   $T_{conv}$  (Abbildung 15; G5-9) wird die dosisabhängige Suppression der  $T_{conv}$ -Proliferation durch  $nT_{regs}$  deutlich: Bei einem  $T_{conv}:nT_{reg}$ -Verhältnis von 20:1 proliferierten noch 40.65% der  $CD4+$   $T_{conv}$  und 82.92% der  $CD8+$   $T_{conv}$  (Abbildung 15; F9, G9). Bei einem 1:1-Verhältnis war der Anteil proliferierender Zellen hingegen auf 10.62% ( $CD8+$ ) bzw. 3.24% ( $CD4+$ ) reduziert (Abbildung 15, F5, G5). Ferner zeigen die Ergebnisse eine erhöhte Empfindlichkeit der  $CD4+$   $T_{conv}$  im Vergleich zu den  $CD8+$   $T_{conv}$  gegenüber der  $nT_{reg}$ -Suppression. Bereits geringe Mengen von  $nT_{regs}$  (20:1-Verhältnis) reichten aus, um die  $CD4+$   $T_{conv}$ -Proliferation um > 50 % des Ausgangswertes (1:0-Verhältnis) zu verringern (Abbildung 15; F9 und F2).



**Abbildung 15. Dosisabhängige Suppression von  $T_{conv}$  durch polyklonal expandierte  $nT_{reg}$ s.**

Die Beurteilung der  $nT_{reg}$ -Funktionalität nach polyklonaler Expansion erfolgte über die Durchführung eines Proliferationsassays. Hierfür wurden expandierte  $nT_{reg}$ s mit CFSE gefärbten, autologen  $CD4+$  und  $CD8+$   $T_{conv}$  in aufsteigenden Konzentrationen kokultiviert. Zur Stimulation der  $T_{conv}$ -Proliferation wurden  $CD3/CD28$ -ummantelte  $T_{reg}$  Suppression Inspector Beads hinzugefügt. Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet, gewaschen, für Live/Dead,  $CD3$ ,  $CD4$  und  $CD8$  gefärbt und am Navios™ Durchflusszytometer gemessen. Analysiert wurde die  $nT_{reg}$ -vermittelte Proliferationsinhibition von  $T_{conv}$  in aufsteigenden  $T_{conv}$ : $nT_{reg}$ -Verhältnissen (1:1, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1). Für die Ausrichtung der Gates wurden unstimulierte und ungefärbte Kontrollen mitgeführt. Abgebildet sind die Ergebnisse einer repräsentativen nicht G-CSF mobilisierten  $nT_{reg}$ -Linie. Stim = stimuliert. Unstim = unstimuliert. 20:1 = 20 Teile  $T_{conv}$  zu 1 Teil  $nT_{reg}$ .

Die gesamten Ergebnisse der durchgeführten Proliferationsassays sind in Abbildung 16 aufgeführt. Die  $nT_{reg}$ -Zellprodukte ohne vorausgehende G-CSF-Mobilisation des  $nT_{reg}$ -Spenders zeigten eine maximale Suppressionskapazität von durchschnittlich 90,1 % für  $CD4+$   $T_{conv}$  und 83,1 % für  $CD8+$   $T_{conv}$  (Für die Berechnung der maximalen Suppressionskapazität siehe Abschnitt 2.2.5.3). In Zusammenschau aller Experimente konnte für die nicht G-CSF mobilisierten  $nT_{reg}$ -Linien eine Dosisabhängigkeit der  $T_{conv}$ -Suppression durch  $nT_{reg}$ s gezeigt werden (Abbildung 16; A, B).

**Abbildung 16. Suppression von  $T_{conv}$  durch  $nT_{reg}$ s mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation.**

Expandierte  $nT_{reg}$ s mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation wurden mit CFSE gefärbten, autologen  $CD4+$  und  $CD8+$   $T_{conv}$  in aufsteigenden Konzentrationen kokultiviert. Nach 4 Tagen Inkubation in Anwesenheit von  $CD3/CD28$ -ummantelte  $T_{reg}$  Suppression Inspector Beads wurden die Zellen geerntet, gewaschen, für Live/Dead,  $CD3$ ,  $CD4$  und  $CD8$  gefärbt und am Navios™ Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Proliferation von  $CD4+$   $T_{conv}$  (A, C) und  $CD8+$   $T_{conv}$  (B, D) in Abhängigkeit unterschiedlicher  $T_{conv}$ : $nT_{reg}$ -Verhältnisse. Unterschieden wurde hierbei zwischen Experimenten mit  $nT_{reg}$ s

ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation (A, B) und mit  $nT_{reg}S$ , die aus G-CSF mobilisiertem Blut isoliert wurden (C, D). Eine nicht G-CSF mobilisierte Transportkontrolle wurde ergänzend mitgeführt.

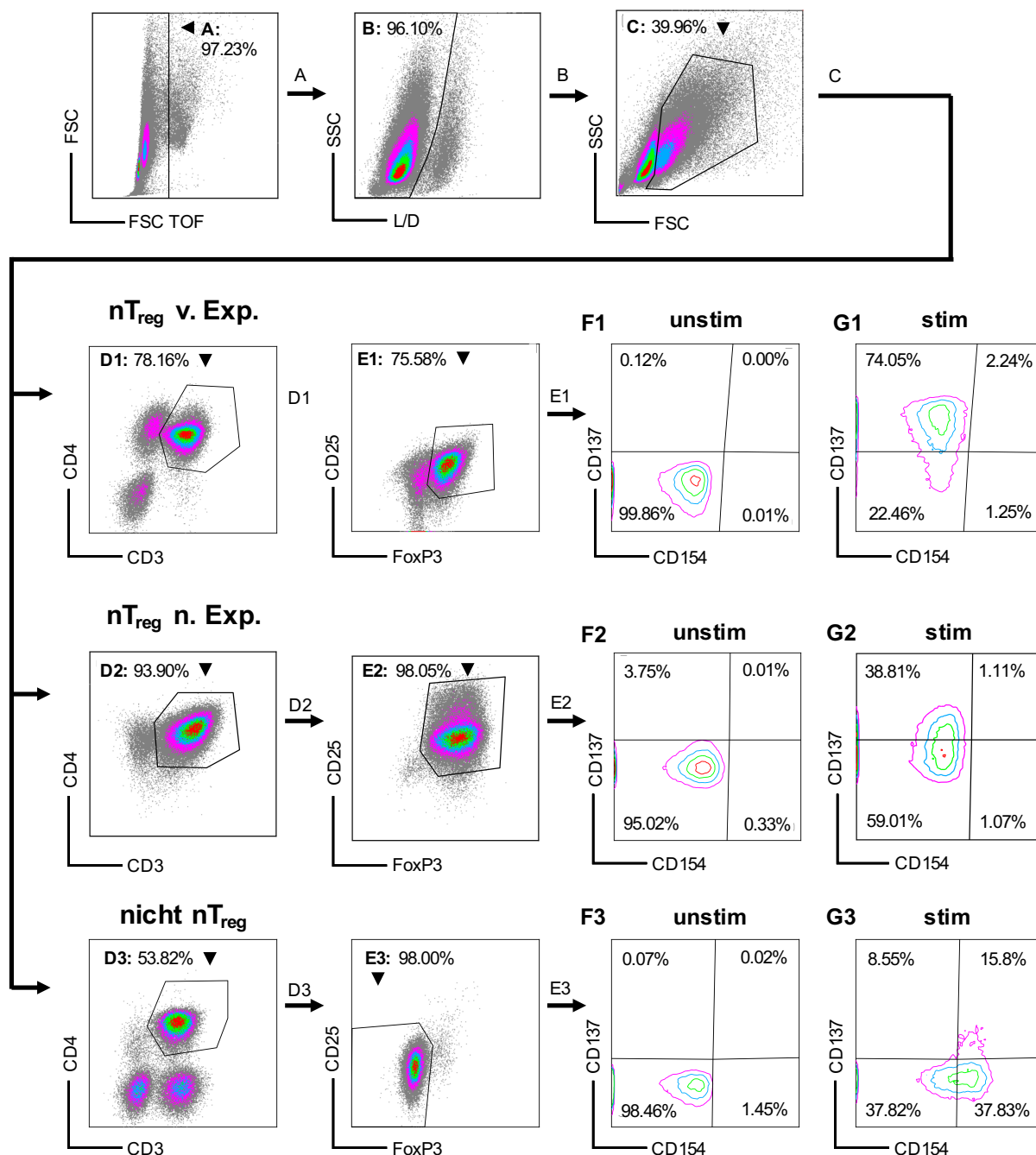
Wie zuvor beschrieben, hatte die Nutzung G-CSF mobilisierten Blutes als  $nT_{reg}$ -Quelle keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum oder den Phänotyp des Zellprodukts. Hinsichtlich der Funktionalität von  $nT_{reg}S$  aus dem Blut G-CSF mobilisierter Spender zeigten die Ergebnisse der Proliferationsassays eine geringfügig eingeschränkte  $T_{conv}$ -Suppression. Die maximale Suppressionskapazität betrug im Durchschnitt 76.54 % für  $CD4+ T_{conv}$  und 42.57 % für  $CD8+ T_{conv}$  (Abbildung 16; C, D). Bei Betrachtung der einzelnen Zelllinien fällt zudem auf, dass jeweils nur eine  $nT_{reg}$ -Linie eine deutliche,  $nT_{reg}$ -abhängige  $CD4+$  bzw.  $CD8+$  Suppression aufwies. Es handelte sich in beiden Fällen um die G-CSF Linie 2. Die andere Zelllinie zeigte im Bezug auf  $CD4+ T_{conv}$  (Abbildung 16; C) zwar eine Inhibition, diese verhielt sich jedoch nicht proportional zur  $nT_{reg}$ -Dosis. Eine  $CD8+$  Suppression blieb bei dieser  $nT_{reg}$ -Linie aus (Abbildung 16; D). Für die nicht G-CSF mobilisierte Transportkontrolle ließ sich, wie für die anderen nicht G-CSF mobilisierten  $nT_{reg}$ -Linien, eine signifikante Suppression der  $T_{conv}$ -Proliferation beobachten (Abbildung 16; C, D). Somit zeigen  $nT_{reg}$ -Produkte aus dem Blut G-CSF vorbehandelter Spender eine adäquate Zellexpansion *in vitro* sowie eine gute Produktreinheit. Der Probentransport hatte auf die Zellfunktionalität keine negativen Auswirkungen. Der Proliferationsassay einer G-CSF Linie ergab eine eingeschränkte Suppressionskapazität, wobei nicht auszuschließen ist, dass diese technisch bedingt war.

#### 3.1.4. CD154/CD137 Phänotyp frisch isolierter und polyklonal expandierter $nT_{reg}S$

Neuere Daten zeigen, dass sich antigenspezifische  $nT_{reg}S$  durch einen charakteristischen Phänotyp der Aktivierungsmarker  $CD154$  (=  $CD40L$ ) und  $CD137$  (=  $4-1BB$ ) auszeichnen<sup>61</sup>. Im Gegensatz zu aktivierten  $T_{conv}$  zeigen sie ein  $CD154-/CD137+$  Expressionsmuster, welches die direkte Isolation antigenspezifischer  $nT_{reg}S$  aus MLR-Kulturen erlaubt<sup>61</sup>.

Zum derzeitigen Kenntnisstand ist jedoch unklar, welchen Phänotyp magnetsortierte, polyklonale, *ex vivo* expandierte  $nT_{reg}S$  hinsichtlich der Aktivierungsmarker  $CD154$  und  $CD137$  zeigen und ob  $CD137$  einen geeigneten Isolationsmarker für GMP-konforme  $nT_{reg}$ -Zellprodukte darstellt. Aus diesem Grund wurde das  $CD154/CD137$ -Expressionsmuster von frisch magnetsortierten  $CD8-CD25+ nT_{reg}S$  sowie polyklonal expandierten  $nT_{reg}S$  mit und ohne vorausgehender G-CSF-Mobilisation am Aria™ II Durchflusszytometer bestimmt (Abbildung 17). Als Kontrollen wurden  $T_{conv}$  (aus PBMCs oder den nicht- $nT_{reg}$ -Fraktionen nach Zellisolation) und unstimulierte sowie ungefärbte Proben mitgeführt. Bei der Analyse wurden zunächst die Dubletten und avitalen Zellen aussortiert (Abbildung 17; A, B). Anschließend wurde die Leukozytenpopulation identifiziert (Abbildung 17; C) und davon die  $CD4+$  T-Zellen

(Abbildung 17; D1-3) bzw. die  $nT_{reg}$ s (Abbildung 17; E1-3) differenziert. Letztere wurden entsprechend ihrer Expression von CD154 und CD137 untergliedert (Abbildung 17; F1-3, G1-3).



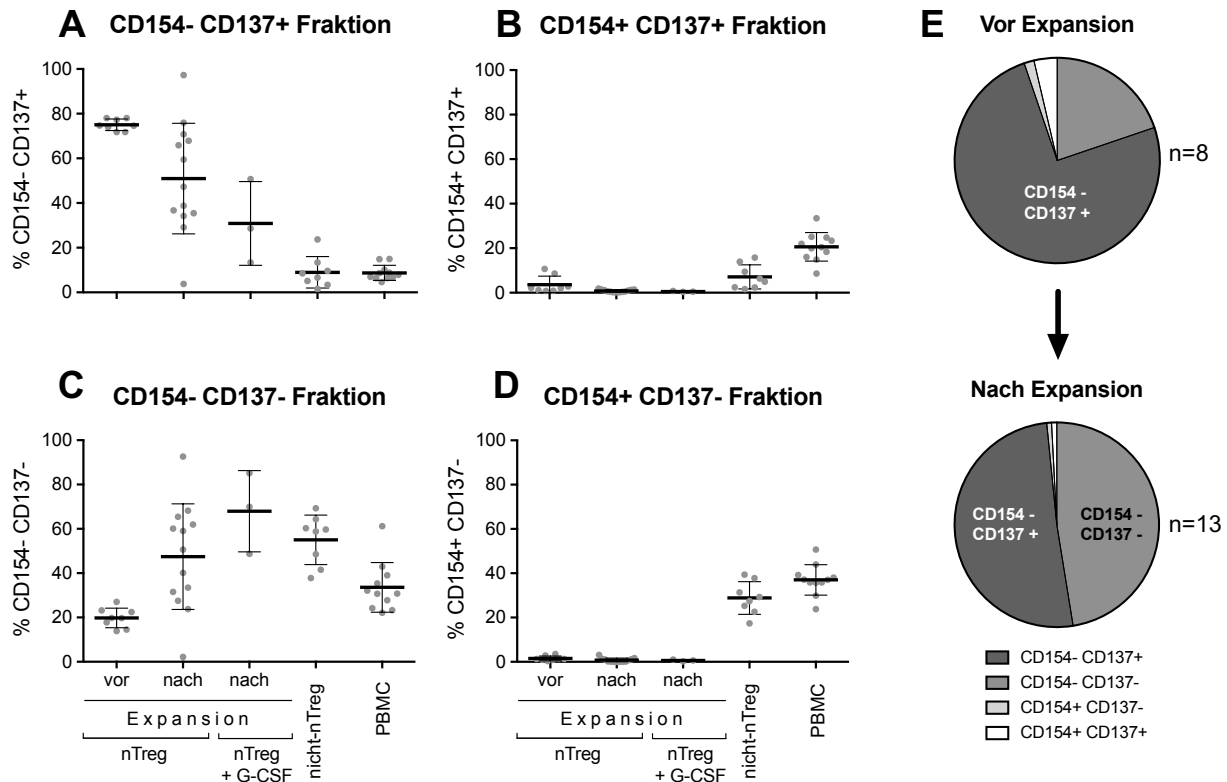
**Abbildung 17. CD154/CD137 Phänotyp frisch isolierter und polyklonal expandierter  $nT_{reg}$ s.**

Pro Ansatz wurden  $5-10 \times 10^6$  frisch isolierte bzw. polyklonal expandierte  $nT_{reg}$ s mit CD3/CD28-ummantelten GMPEXACT  $T_{reg}$  Beads für 6h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für Live/Dead, CD25, CD3, CD4, FoxP3, CD154, CD137, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 gefärbt. Die Messungen erfolgten am Aria™ II Durchflusszytometer. PBMCs bzw. die nicht- $nT_{reg}$ -Fraktionen der Magnetisolation wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Abgebildet sind die Ergebnisse einer repräsentativen nicht G-CSF mobilisierten  $nT_{reg}$ -Linie sowie die einer nicht- $nT_{reg}$ -Probe. V. Exp. = vor polyklonaler Expansion; n. Exp. = nach polyklonaler Expansion.



Die Ergebnisse zeigten sowohl für frisch isolierte als auch für polyklonal expandierte  $nT_{reg}$ s einen CD154- Phänotyp (Abbildung 17; G1, G2). Die CD154 Expression von CD4+  $T_{conv}$  aus PBMCs bzw. nicht- $nT_{reg}$ -Fraktionen lag hingegen deutlich höher (Abbildung 17; G3). Abgesehen von den doppelt-negativen Zellen war der überwiegende Anteil der CD4+  $T_{conv}$  CD154+/CD137-. Frisch isolierte  $nT_{reg}$ s (= vor Expansion) zeigten dagegen eine starke CD137 Expression und damit einen klaren CD154-/CD137+ Phänotyp (Abbildung 17; G1). Im Vergleich war die Expression von CD137 bei dem polyklonal expandierten  $nT_{reg}$ -Zellprodukt deutlich geringer (Abbildung 17; G2).

Die Darstellung der einzelnen Experimente (Abbildung 18; A-D) zeigt für  $nT_{reg}$ s vor polyklonaler Expansion einen mittleren Anteil CD154-/CD137+ Zellen von ca. 75% (Abbildung 18; A). Nach polyklonaler Expression lag der Anteil von  $nT_{reg}$ s mit CD154-/CD137+ Phänotyp hingegen bei durchschnittlich 51% (Abbildung 18; A). Somit war der überwiegende Anteil expandierter  $nT_{reg}$ s weiterhin CD154-/CD137+, jedoch zeigte sich hierbei eine deutliche Heterogenität hinsichtlich der CD137 Expression: Während der Phänotyp frisch isolierter  $nT_{reg}$ s eine geringe Streuung aufwies, lagen die Standardabweichungen der expandierten  $nT_{reg}$ s bei 23.9% für die CD154-/CD137- Fraktion (Abbildung 18; C) und bei 24.7% für die CD154-/CD137+ Fraktion (Abbildung 18; A). Für das polyklonal expandierte  $nT_{reg}$ -Produkt ließ sich somit kein eindeutiges Expressionsmuster charakterisieren. Deutlich wurde jedoch, dass die polyklonale Expansion der  $nT_{reg}$ s zu einem Verlust der CD137 Expression führte (Abbildung 18; E), die  $nT_{reg}$ s hierdurch aber keine  $T_{conv}$ -Effektoreigenschaften wie z. B. die Expression von CD154 entwickelten (Abbildung 18; B, D). PBMCs und die nicht- $nT_{reg}$ -Isolationsfraktionen zeigten im Vergleich einen doppelt-positiven Phänotyp bei 21% bzw. 7% der Zellen (Abbildung 18; B) sowie einen Anteil CD154+/CD137- Zellen von 37% bzw. 30% (Abbildung 18; D). Der Anteil CD154-/CD137+ Zellen war erwartungsgemäß deutlich geringer als bei den  $nT_{reg}$ s (Abbildung 18; A).



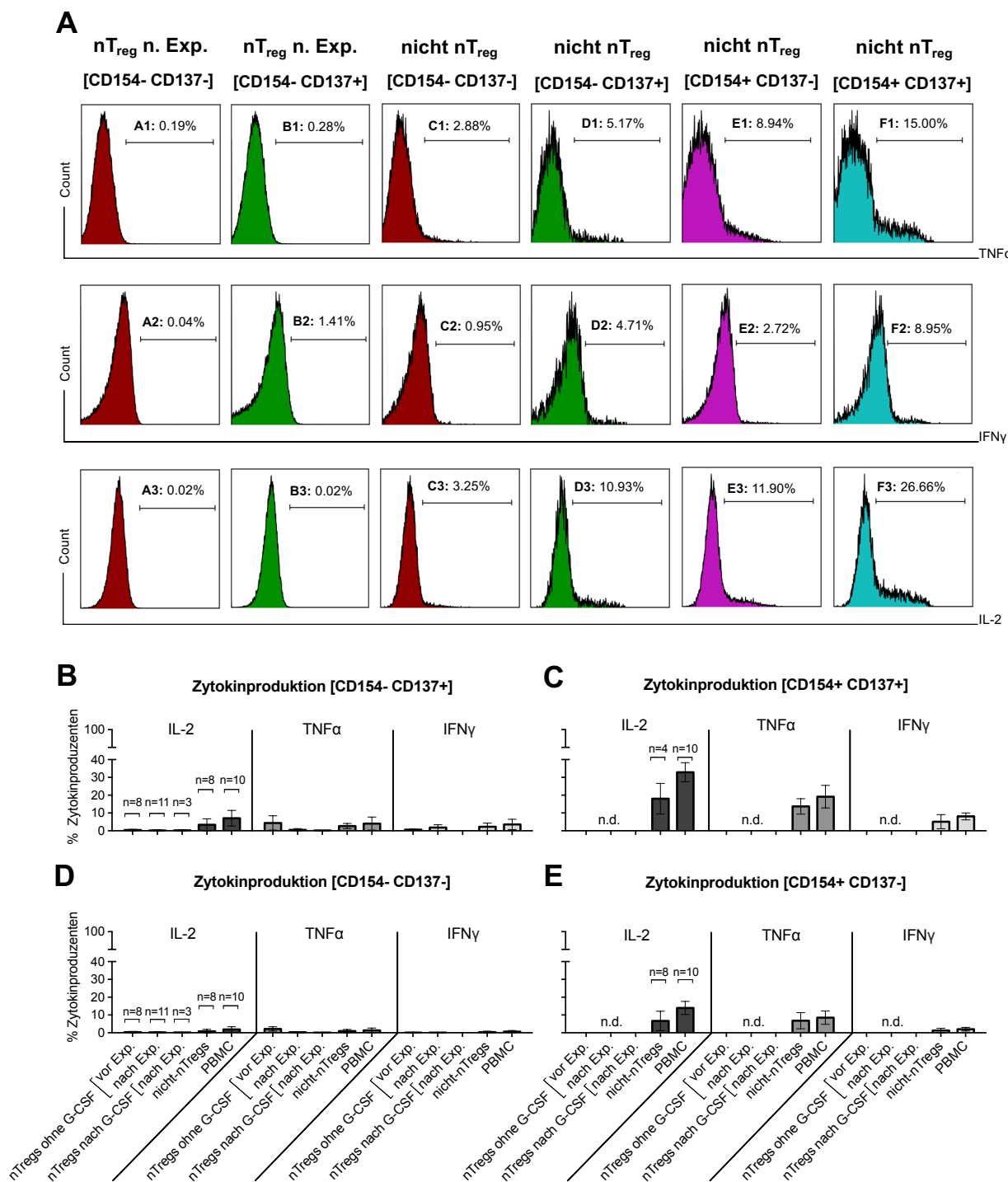
**Abbildung 18. Frisch isolierte und polyklonal expandierte nT<sub>reg</sub>s zeigen eine unterschiedliche Expression der Aktivierungsmarker CD154 und CD137.**

Nach 6h *in vitro* Stimulation mit CD3/CD28-ummantelten GMPEXPACT T<sub>reg</sub> Beads wurden frisch isolierte nT<sub>reg</sub>s (vor Expansion), polyklonal expandierte nT<sub>reg</sub>s ohne G-CSF-Mobilisation und polyklonal expandierte nT<sub>reg</sub>s nach G-CSF-Mobilisation gewaschen und für Live/Dead, CD25, CD3, CD4, FoxP3, CD154, CD137, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 gefärbt. Die Messungen erfolgten am Aria™ II Durchflusszytometer. PBMCs bzw. die nicht-nT<sub>reg</sub>-Fraktionen der Magnetisolation wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Für jede Zellpopulation entstanden vier Fraktionen: CD154-/CD137+ (A), CD154+/CD137+ (B), CD154-/CD137- (C) und CD154+/CD137- Zellen (D). Deutlich wurde eine relative Abnahme CD137 exprimierender nT<sub>reg</sub>s im Verlauf der polyklonalen Expansion (E). Vor Exp. = vor Expansion; nach Exp. = nach Expansion.

Auch für die polyklonal expandierten nT<sub>reg</sub>-Linien aus G-CSF mobilisiertem Vollblut wurde der CD154/CD137 Phänotyp ermittelt (Abbildung 19; A-D). Ähnlich wie die nT<sub>reg</sub>s ohne vorausgehende G-CSF-Mobilisation exprimierten sie kein CD154 und zeigten eine sehr heterogene CD137 Expression. Der durchschnittliche Anteil CD154-/CD137+ Zellen lag bei 30.9 % ( $\pm$  18.8) und war damit deutlich geringer im Vergleich zu nT<sub>reg</sub>s ohne G-CSF-Mobilisation.

Die Bildung von Effektorzytokinen stellt ein Hauptmerkmal aktivierter T<sub>conv</sub> dar. Um die einzelnen CD154/CD137 Fraktionen auf T<sub>conv</sub>-Eigenschaften zu untersuchen, wurde nach 6h Beadstimulation *in vitro* die Produktion von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 für sämtliche Zellfraktionen

ermittelt (Abbildung 19; A). Weder für frisch isolierte, noch für *ex vivo* expandierte nT<sub>reg</sub>s ließ sich hierbei eine wesentliche Zytokinproduktion beobachten (Abbildung 19; B, D). Auch nT<sub>reg</sub>-Zellprodukte aus dem Blut G-CSF mobilisierter Spender zeigten keine zytokinproduzierenden Zellen. Interessanterweise war diese Beobachtung unabhängig von der CD137 Expression: Weder CD154-/CD137+ noch CD154-/CD137- nT<sub>reg</sub>s zeigten eine deutliche Bildung von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 (Abbildung 19; B, D). Die Zytokine der CD154+ nT<sub>reg</sub>-Fraktionen waren aufgrund der geringen Anzahl durchflusszytometrisch erfasster Zellen nicht detektierbar (= n.d.) (Abbildung 19; C, E). Um valide Ergebnisse zu erzielen, wurde die Zytokinproduktion ausschließlich für Fraktionen mit > 1000 erfassten Zellen dargestellt. Bei den PBMCs bzw. nicht-nT<sub>reg</sub>s war die Expression von CD154 mit einem höheren Anteil zytokinproduzierender Zellen assoziiert: Doppelt-positive T<sub>conv</sub> (aus nicht-nT<sub>reg</sub>s bzw. PBMCs) zeigten hierbei die größte Zytokinproduktion (Abbildung 19; C), gefolgt von der CD154+/CD137-Fraktion (Abbildung 19; E). Für die CD154- T<sub>conv</sub>-Fraktionen ließ sich hingegen nur eine geringe Produktion der Effektorzytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 feststellen (Abbildung 19; B, D).



**Abbildung 19. Zytokinproduktion einzelner CD154/CD137 Subpopulationen.**

Nach 6h *in vitro* Stimulation mit CD3/CD28-ummantelten GMPEXPACT T<sub>reg</sub> Beads wurden frisch isolierte und polyklonal expandierte nT<sub>reg</sub>s gewaschen und für Live/Dead, CD25, CD3, CD4, FoxP3, CD154, CD137, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 gefärbt. Die Messungen erfolgten am Aria™ II Durchflusszytometer. PBMCs bzw. die nicht-nT<sub>reg</sub>-Fraktionen der Magnetisolierung wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Zytokinproduktion der CD154+ nT<sub>reg</sub>-Populationen ist aufgrund der geringen durchflusszytometrisch erfassten Zellzahl (<1000) nicht dargestellt bzw. als nicht detektiert (n.d.) gekennzeichnet. Abgebildet sind die durchflusszytometrischen Analysen einer repräsentativen, nicht G-CSF mobilisierten nT<sub>reg</sub>-Linie (A; A1-3, B1-3) und einer nicht-nT<sub>reg</sub>-Probe (A; C1-3, D1-3, E1-3, F1-3) sowie die Zytokinproduktion der einzelnen CD154/CD137 Subpopulationen: CD154-/CD137+ (B), CD154+/CD137+ (C), CD154-/CD137- (D) und CD154+/CD137- (E) Subpopulationen. Vor Exp. = vor Expansion; nach Exp. = nach Expansion.

Zusammenfassend lassen sich folgende Beobachtungen ableiten:

- (1) Weder frisch isolierte nT<sub>reg</sub>s noch polyklonal expandierte nT<sub>reg</sub>-Zellprodukte zeigten nach 6h *in vitro* Stimulation Merkmale aktivierter T<sub>conv</sub> (Produktion von Effektorzytokinen, Expression von CD154).
- (2) Die vorausgehende G-CSF-Mobilisation von nT<sub>reg</sub>-Spendern hatte keinen Einfluss auf den CD154/CD137-Phänotyp oder die Zytokinproduktion des nT<sub>reg</sub>-Zellprodukts.
- (3) Frisch isolierte und polyklonal expandierte nT<sub>reg</sub>s unterschieden sich hinsichtlich der Expression von CD137. Die polyklonale Expansion von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten führte zu einem relativen Verlust der Expression von CD137, wohingegen die Expression von CD154 nicht modulierbar war.
- (4) Der geringere Anteil CD137+ nT<sub>reg</sub>s im polyklonalen Zellprodukt ging nicht mit einer Einschränkung der Produktreinheit oder -funktionalität einher.

### 3.2. nT<sub>reg</sub>-ACT bei pädiatrischen cGVHD-Patienten

Zwei pädiatrische Patienten wurden im Rahmen eines individuellen Heilversuchs mit nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten behandelt. Individuelle Heilversuche bezeichnen die Anwendung neuer, nicht zugelassener Therapien, wie z. B. nT<sub>reg</sub>-ACTs, bei kritisch erkrankten Patienten. Die hier vorgestellten Patienten litten an einer schweren cGVHD, die trotz Ausschöpfung sämtlicher Therapieoptionen keine Besserung fand, sodass die Anwendung eines individuellen Heilversuchs in Frage kam.

Folgende, für einen individuellen Heilversuch erforderliche, Voraussetzungen waren bei beiden Patienten erfüllt: (1) Die individuelle Nutzen-Risiko-Abwägung ergab in beiden Fällen die ärztliche Schlussfolgerung, dass für den kritisch erkrankten Patienten der Nutzen die potentiellen Risiken überwiegt, (2) die Eltern wurden ausführlich über mögliche Folgen des nT<sub>reg</sub>-ACTs aufgeklärt und es wurde dargelegt, dass es sich bei der Durchführung von nT<sub>reg</sub>-ACTs um eine nicht zugelassene Behandlung handelt, deren Erfolgsaussichten nur eingeschränkt zu beurteilen sind, (3) die schriftliche Einwilligung der Sorgeberechtigten wurde bei beiden Patienten eingeholt. Die notwendigen technischen und regulatorischen Bedingungen für die klinische Anwendung von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten waren zudem erfüllt.

Das alleinige Ziel von individuellen Heilversuchen ist die Heilung bzw. die nachhaltige klinische Besserung des Patienten, sie dienen nicht dem wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn. Dennoch ist die wissenschaftliche Begleitung und präzise Dokumentation des Einzelfalls von großer

Bedeutung, um neue Erkenntnisse für nachfolgende cGVHD-Patienten zu erlangen. Nach der individuellen Entscheidung der Eltern für einen Heilversuch wurde bei beiden Patienten einer intensiven Nachsorge und der wissenschaftlichen Nutzung gewonnener Daten zugestimmt.

### 3.2.1. Epikrise

#### 3.2.1.1. Patient 1

Bei Patient 1 handelt es sich um einen zum Zeitpunkt des nT<sub>reg</sub>-ACTs 8-jährigen Jungen afghanischen Ursprungs, der im Alter von 3 Jahren - nach langjähriger Transfusionstherapie aufgrund einer Beta-Thalassämie major - ein Stammzelltransplantat von einem 10/10-HLA-identen MRD-Spender erhielt. Die Konditionierungstherapie bestand aus Busulfan (oral, 14 mg/kg), Cyclophosphamid (i.v., 200 mg/kg) und ATG-Fresenius (i.v., 60 mg/kg). Nach allo-HSCT zeigte der Patient eine hämatopoetische Rekonstitution mit verzögerter Thrombopoese: Die Rekonstitution der Leukozyten (> 1000 /  $\mu$ l), Lymphozyten (> 100 /  $\mu$ l) und Granulozyten (> 500 /  $\mu$ l) war an Tag 18 post-HSCT abgeschlossen, die Thrombozyten stiegen jedoch bis zur Entlassung (Tag +78 post-HSCT) nicht auf > 100.000 /  $\mu$ l an. Der Spenderchimärismus war an Tag +27 für sämtliche Zellfraktionen komplett, an Tag +62 und +76 bot er jedoch einen geringen Empfängeranteil in der CD34+ Fraktion (94% Chimärismus).

Trotz leitliniengerechter GVHD-Prophylaxe (CSA, MTX, ATG) entwickelte der Junge eine akute GVHD, die unter immunsuppressiver Therapie mit CSA und Prednisolon (zunächst 2 mg/kg/Tag i.v., später 10 mg/Tag p.o.) zu einer chronischen GVHD Grad IV fortschritt. Die Haut und Hautanhangsgebilde stellten zunächst die Hauptmanifestation der Erkrankung dar, aber auch die gastrointestinalen Schleimhäute waren von einer cGVHD-assoziierten Mukositis betroffen. Chronische Schmerzen, eine erschwerte Nahrungsaufnahme, Kontrakturen der Fingergelenke, Trockenheit und Brennen der Augen und nicht zuletzt die krankheitsbedingte Stigmatisierung führten zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität.

Der Patient erhielt Erst-, Zweit- und Drittlinientherapie. Auch eine experimentelle Behandlung mit subkutanen IL-2-Applikationen wurde durchgeführt, nachdem Koreth *et al.* hierzu vielversprechende Ergebnisse publiziert hatten<sup>262</sup>. Keine der Therapien konnte eine signifikante Verbesserung der klinischen Symptomatik erzielen. Der Patient entwickelte schwere Komplikationen, unter anderem einen arteriellen Hypertonus sowie zwei Episoden einer schweren Sepsis. Aufgrund mangelnder therapeutischer Alternativen wurde 20 Monate post-HSCT der experimentelle Ansatz eines nT<sub>reg</sub>-ACTs mit den Eltern des Patienten diskutiert. Diese äußerten den Wunsch, weitere Therapieoptionen auszuschöpfen, und stimmten daher dem Vorschlag eines individuellen Heilversuchs zu. Folglich wurden vom initialen Stammzellspender 50 ml Blut entnommen, nT<sub>reg</sub>s durch CD8-CD25+ Magnetseparation mittels

CliniMACS isoliert und für 23 Tage kultiviert. Anschließend wurde dem Patienten das Zellprodukt an Tag +639 post-HSCT in einer Dosis von  $3.0 \times 10^6$  nT<sub>reg</sub>s / kg i.v. appliziert (Insgesamt  $66 \times 10^6$  Zellen bei einem Gewicht von 22.0 kg).

### 3.2.1.2. Patient 2

Bei Patient 2 handelt es sich um einen zum Zeitpunkt des nT<sub>reg</sub>-ACTs 10-jährigen kaukasischen Jungen, bei dem im Alter von einem Jahr die Diagnose einer septischen Granulomatose (X-CGD) durch *de novo* Mutation des CYBB-Gens (Ins603A, Y201 → Stop) gestellt wurde. Im Alter von 8 Jahren erhielt er eine allogene Knochenmarksspende von einem 9/10-HLA-identen, unverwandten Spender. Zunächst zeigte der Junge eine zeitgerechte hämatopoetische Rekonstitution mit komplettem Spenderchimärismus. An Tag +10 post-HSCT entwickelte der Patient jedoch eine akute GVHD Grad I mit Manifestation der Haut. Trotz immunsuppressiver Therapie kam es zu einem Übergang der akuten GVHD in eine chronische GVHD Grad IV mit Manifestationen der Haut Grad II, des Gastrointestinaltrakts Grad IV und der Leber Grad III. Bei klinischem Progress 8 Monate nach HSCT zeigte der Patient zunehmende Bauchschmerzen, Gewichtsverlust, Durchfälle, Kontrakturen der Hüft-, Schulter- und Fußgelenke sowie eine schuppige, trockene Haut. Im Verlauf kam es unter einer intensivierten immunsuppressiven Therapie zudem wiederholt zu infektiösen Komplikationen mit mikrobiologischem Nachweis von *Candida glabrata*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Aspergillus fumigatus*, BK-Viren und Adenoviren. Computertomographisch zeigten sich pulmonal atypische Infiltrate, die sich mit einer pulmonalen Aspergillose vereinbaren ließen. Die antiinfektiöse Therapie konnte vor dem Hintergrund einer chronischen Leber- und Nierentoxizität und des Allgemeinzustandes des Patienten nur unter engmaschiger Nutzen-Risiko-Abwägung durchgeführt werden. Zur Therapie der cGVHD erhielt der Patient im Verlauf CSA, MMF, Prednisolon (max. 5 mg/kg/d), MTX, Budenosid und 5 Zyklen extrakorporale Photopherese. Bei zunehmender Verschlechterung der intestinalen cGVHD-Manifestationen erfolgte die Gabe von mesenchymalen Stammzellen (MSC) im Rahmen eines individuellen Heilversuchs (Tag +378). Im Verlauf zeigte der Patient eine insuffiziente Knochenmarksfunktion, sodass bei ausbleibender Stabilisierung an Tag +531 ein Stammzellboost mit CD34-selektierten Stammzellen des initialen Spenders durchgeführt wurde. Bei weiterhin kritischem Zustand des Patienten und anhaltend hoher cGVHD-Aktivität wurde schließlich der adoptive nT<sub>reg</sub>-ACT als individueller Heilversuch geplant und durchgeführt. An Tag +603 post-HSCT erhielt der Patient  $3.0 \times 10^6$  expandierte nT<sub>reg</sub>s / kg (Insgesamt  $78 \times 10^6$  Zellen bei einem Gewicht von 26.0 kg) als Zellprodukt vom initialen Stammzellspender.

### 3.2.2. Klinischer Verlauf nach nT<sub>reg</sub>-ACT

#### 3.2.2.1. Patient 1

Im zeitlichen Verlauf nach der nT<sub>reg</sub>-Zellgabe wurde der Patient 1 engmaschig ambulant überwacht (Tabelle 19). Es erfolgten regelmäßige Verlaufskontrollen, bei denen neben hämatologischen, laborchemischen und immunologischen Veränderungen vor allem der klinische Status evaluiert wurde.

**Tabelle 19. Klinische Follow-Up-Zeitpunkte von Patient 1.**

Follow-Up	Woche nach nT <sub>reg</sub> -ACT
01	0
02	2
03	2
04	4
05	9
06	14
07	16
08	18
09	23
10	31
11	35
12	41
13	46
14	51
15	57
16	62
17	66

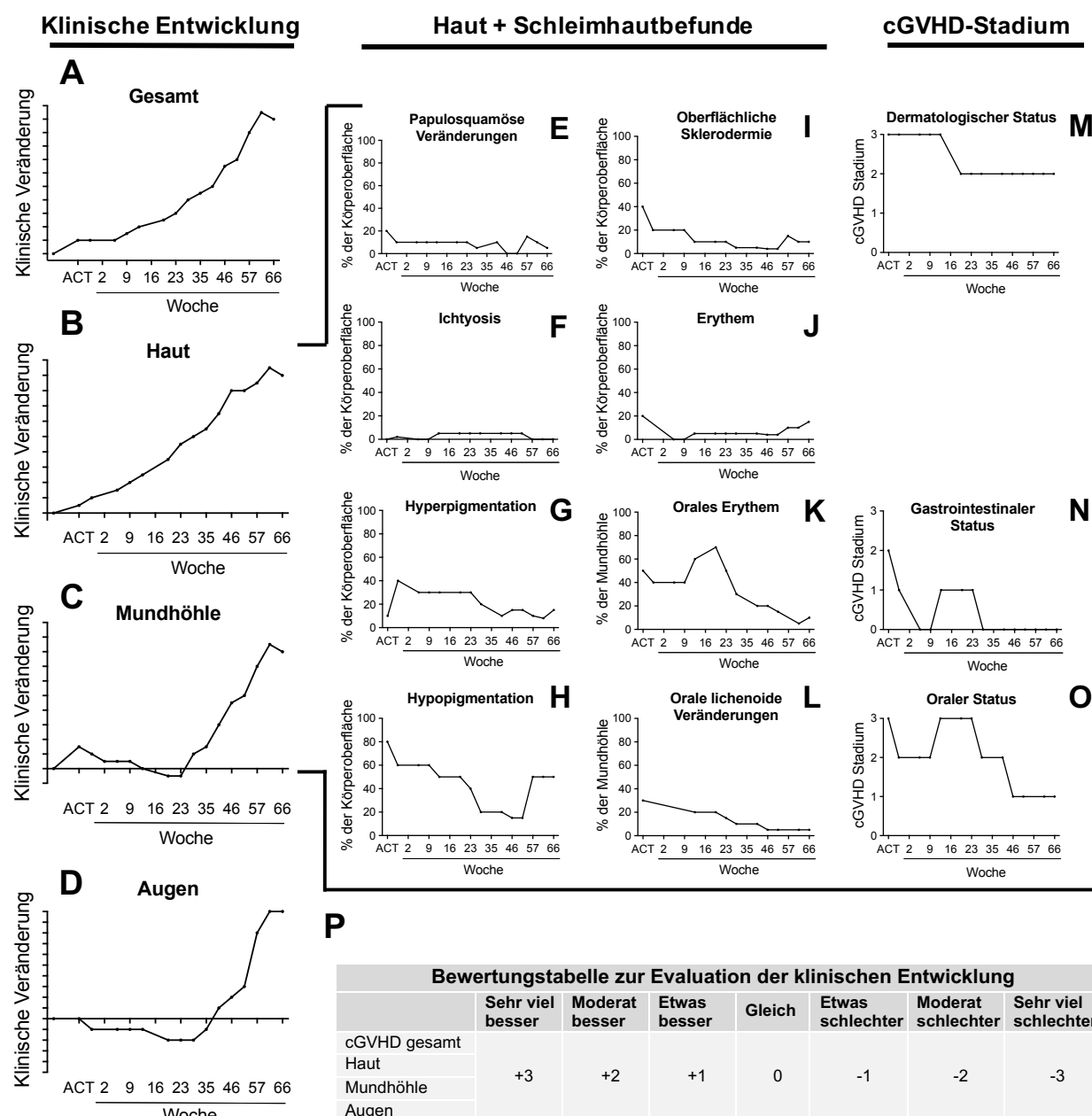
Die klinische Evaluation der cGVHD erfolgte anhand standardisierter Bewertungsbögen, die sich auf das Anamnesegespräch und die klinische Untersuchung stützten. Konkret wurde (1) die klinische Veränderung zum letzten Patientenkontakt anhand einer standardisierten Bewertungstabelle (Abbildung 20; A-D, P), (2) der prozentuale Anteil pathologisch veränderter Haut und Schleimhaut (Abbildung 20; E-L) und (3) organbezogen das definierte cGVHD-Stadium<sup>174</sup> (Abbildung 20; M-O) erhoben.

Die Ergebnisse der klinischen Evaluation zeigen neben einer deutlichen Verbesserung der entzündlichen Veränderungen von Haut (Abbildung 20; B), Mundhöhle (Abbildung 20; C) und Augen (Abbildung 20; D) vor allem positive Effekte auf den Gesamtzustand des Patienten nach nT<sub>reg</sub>-ACT (Abbildung 20; A). Bei näherer Betrachtung der Haut- und Schleimhautbefunde wird deutlich, dass sich der Anteil der pathologisch veränderten Körperoberfläche für sämtliche Hauterscheinungen reduzierte (Abbildung 20; E-L). Dies spiegelt sich auch in einer Herabstufung der cGVHD-Stadien wieder: Während der Patient vor dem nT<sub>reg</sub>-ACT für zwei Manifestationsorte in das Stadium 3 (Abbildung 20; M, O) und gastrointestinal in das Stadium 2



(Abbildung 20; N) einzuordnen war, zeigte er nach 66 Wochen ein Stadium 2 (Haut), ein Stadium 1 (Mundhöhle) und ein Stadium 0 (GI-Trakt). Insgesamt ließ sich somit eine partielle Verbesserung chronischer Haut- und Schleimhautveränderungen beobachten, die sich in einer Herabstufung des cGVHD-Stadiums äußerte (Abbildung 20; M, O), während akut entzündliche Hauterscheinungen besonders stark zurückgingen (Abbildung 20; B, C).

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass sich der Patient in Woche 16 nach nT<sub>reg</sub>-ACT mit Bauchschmerzen vorstellte und stationär aufgenommen wurde. Im Verlauf ergab sich der Verdacht einer beginnenden bakteriellen Infektion, die antibiotisch behandelt wurde. Nach fünf Tagen zeigte der Patient eine klinische Besserung und konnte entlassen werden. Weitere Infektionen oder unerwünschte Ereignisse kamen nicht vor.



**Abbildung 20. Klinische Entwicklung und cGVHD-Evaluation von Patient 1.**

Die klinische Entwicklung wurde anhand standardisierter cGVHD-Evaluationsbögen erhoben. Dabei wurde zunächst bezüglich des Gesamtzustands (A), der Haut (B), der Mundhöhle (C) und der Augen (D) die klinische Veränderung zum letzten Patientenkontakt bewertet. Hierfür wurden Punkte anhand einer Bewertungstabelle vergeben (P) und so die abgebildeten Verlaufskurven erstellt. Zur Beurteilung von Haut und Schleimhäuten wurde für die einzelnen pathologischen Veränderungen der prozentuale Anteil der betroffenen Körperoberfläche angegeben (E-L). Für die verschiedenen Manifestationen fand ferner eine Einordnung in das vorliegende cGVHD-Stadium statt (M-O).

Zur Veranschaulichung der klinischen Entwicklung wurde ferner eine Fotodokumentation durchgeführt (Abbildung 21). Diese zeigt die klinische Verbesserung von Patient 1 im zeitlichen Verlauf: Die Haut wurde heller und weicher, pergamentartige und ichtiöse Veränderungen bildeten sich zurück und sogar die Gelenkkontraktionen der Hände zeigten eine sichtbare Verbesserung.



**Abbildung 21. Fotodokumentation der klinischen Entwicklung von Patient 1.**

Zu jeder Follow-Up Untersuchung wurden mit Hilfe einer Canon EOS 750D Kamera Fotoaufnahmen von Gesicht, Rücken, Bauch, Beinen und Händen angefertigt. Dargestellt sind die Aufnahmen von vier repräsentativen Follow-Up-Untersuchungen im chronologischen Verlauf. Woche 0 = Zeitpunkt des nT<sub>reg</sub>-ACTs.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der klinische Verlauf des Patienten eine erhebliche Besserung der cGVHD-Symptome zeigte und es insgesamt zu einer Steigerung des subjektiven Wohlbefindens kam; die Eltern berichteten von weniger Schmerzen, einer verbesserten Nahrungsaufnahme sowie einer deutlichen Steigerung der Vitalität und Freizeitaktivität. Die tägliche Prednisolondosis konnte von 10 mg (0.45 mg/kg) vor nT<sub>reg</sub>-ACT auf 5 mg (0.22 mg/kg)

gesenkt werden. Mögliche Unverträglichkeitsreaktionen durch den nT<sub>reg</sub>-ACT wurden weder direkt nach der Zellgabe noch im weiteren Verlauf beobachtet.

### 3.2.2.2. Patient 2

Zusätzlich zu der intensiven stationären Betreuung wurde auch Patient 2 im zeitlichen Verlauf nach nT<sub>reg</sub>-ACT engmaschig klinisch und immunologisch überwacht (Tabelle 20).

**Tabelle 20. Klinische Follow-Up-Zeitpunkte von Patient 2.**

Follow-Up	Woche nach nT <sub>reg</sub> -ACT
01	0
02	1
03	3
04	5

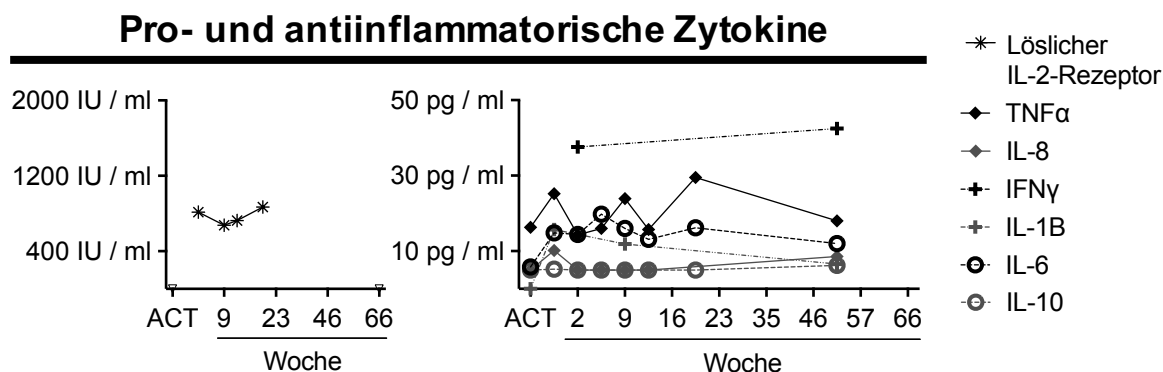
Nach einer komplikationslosen Zellapplikation an Tag +603 nach HSCT zeigte der Patient eine klinische Stabilisierung der cGVHD, die eine Reduzierung der täglichen Steroiddosis von max. 20 mg (0.77 mg/kg) auf min. 10 mg (0.38 mg/kg) erlaubte. Auch kam es zu einer Steigerung der Mobilität, die dem Patienten ein stundenweises Verlassen der Station ermöglichte. Ein CT der Lunge an Tag 19 nach nT<sub>reg</sub>-ACT (Tag +622 nach HSCT) zeigte im Verlauf rückläufige, bilaterale Milchglasveränderungen und Infiltrate. Vier Wochen nach nT<sub>reg</sub>-ACT kam es jedoch zu einem raschen Anstieg der Infektionsparameter sowie einer Verschlechterung der respiratorischen Situation, einem erneuten Fieberanstieg und einer Zunahme der cGVHD-Aktivität. Auf Grund der chronischen Leber- und Nierenschädigung war eine Therapieeskalation nur eingeschränkt möglich. Im Rahmen eines akuten Ereignisses, das am ehesten als fulminante Lungenblutung mit konsekutiver respiratorischer Insuffizienz auf dem Boden der vorbekannten pulmonalen Aspergillose interpretiert werden kann, verstarb der Patient an Tag 35 nach nT<sub>reg</sub>-ACT (Tag +683 nach HSCT). Eine Obduktion wurde von den Eltern des Patienten abgelehnt.

### 3.2.3. Klinische Chemie und Hämatologie nach nT<sub>reg</sub>-ACT

#### 3.2.3.1. Patient 1

Zusätzlich zu der klinischen cGVHD-Evaluation erfolgte die Bestimmung proinflammatorischer (Löslicher IL-2-Rezeptor, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-1B, IL-8) und antientzündlicher (IL-10) Zytokine sowie die Überwachung wichtiger Laborparameter (Hb, CRP, Albumin, Transaminasen, GGT, Thrombozyten, Kreatinin, Harnstoff). Die Zytokinmessungen zeigten einen stabilen Verlauf und damit keine Hinweise auf einen Zytokinsturm nach nT<sub>reg</sub>-ACT (Abbildung 22). Da sich die

weiteren Laborparameter stabil und bis auf wenige Einzelwerte normwertig verhielten, wurde auf die graphische Darstellung dieser Daten der Übersicht halber verzichtet.



**Abbildung 22. Patient 1: Zytokinprofil nach nT<sub>reg</sub>-ACT.**

An den einzelnen Follow-Up-Zeitpunkten wurden proinflammatorische (Löslicher IL-2-Rezeptor, TNF $\alpha$ , IL-8, IFN $\gamma$ , IL-1B, IL-6) und antiinflammatorische (IL-10) Zytokine im Blutplasma bestimmt.

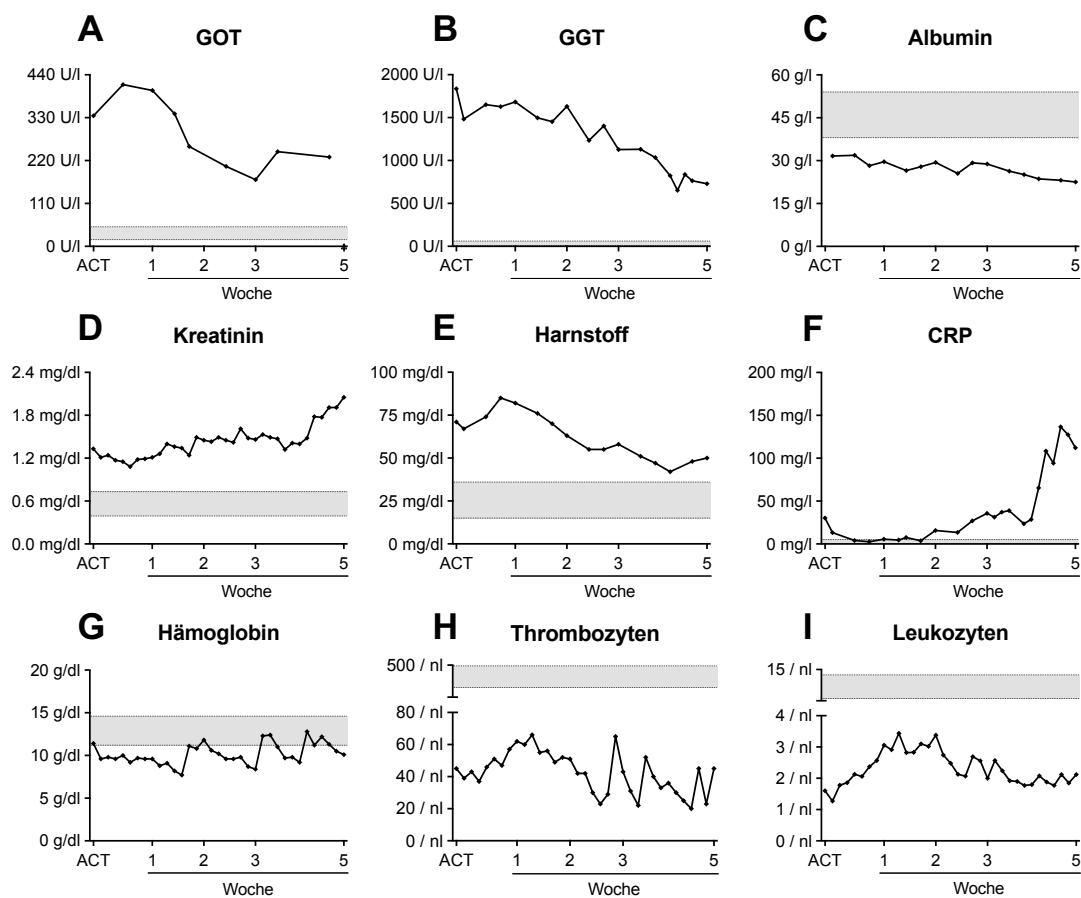
### 3.2.3.2. Patient 2

Bei Patient 2 zeigte sich zum Zeitpunkt des nT<sub>reg</sub>-ACTs eine chronische Organschädigung, die teilweise als cGVHD-Aktivität und teilweise als toxisch bedingt zu interpretieren war und mit einer deutlichen Erhöhung der Nierenretentionsparameter (Serum-Kreatinin, Harnstoff), der GOT und der GGT einherging. Nach nT<sub>reg</sub>-ACT kam es zu einem deutlichen Rückgang der GOT und GGT um bis zu 60% des Ausgangswertes (Abbildung 23; A, B). Das Albumin zeigte einen stabilen bis leicht abfallenden Verlauf (Abbildung 23; C). Während das Kreatinin moderat anstieg, fielen die Harnstoffwerte um ca. 30% ab (Abbildung 23; D, E). Die Knochenmarksfunktion blieb auch nach adoptivem nT<sub>reg</sub>-Transfer insuffizient und der Patient benötigte wiederholt Erythrozyten- und Thrombozytentransfusionen, was sich anhand des fluktuierenden Kurvenverlaufs der Hb- und Thrombozytenkonzentration nachvollziehen lässt (Abbildung 23; H, I). Bei deutlicher Leukopenie zeigte sich nach nT<sub>reg</sub>-ACT zunächst ein leichter Anstieg der Leukozyten (Abbildung 23; I), der sich ab Woche 2 bei einem Wert um 2 / nl stabilisierte. Die Bestimmung der proinflammatorischen (Löslicher IL-2-Rezeptor, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-8) und antientzündlichen (IL-10) Zytokine ergab, ähnlich wie bei Patient 1, einen stabilen Verlauf und damit keine Hinweise für das Vorliegen eines Zytokinsturms nach nT<sub>reg</sub>-ACT (Abbildung 23; J).

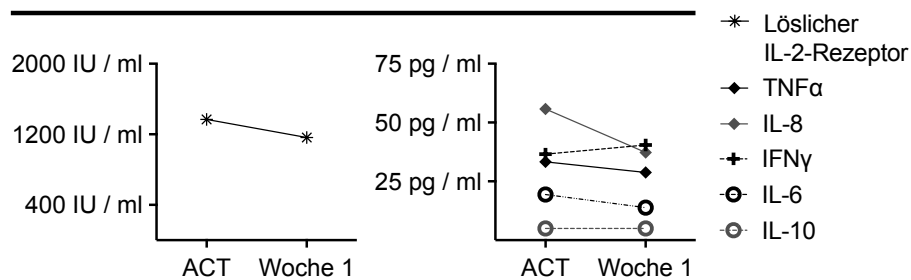
Das CRP zeigte zwei Wochen nach nT<sub>reg</sub>-ACT zunächst einen leichten, ab der vierten Woche dann einen rapiden Anstieg (Abbildung 23; F), der klinisch mit erneutem Auftreten von Fieber und einer Verschlechterung der respiratorischen Situation einherging. Das Aspergillus-Antigen im Serum war ab Tag -16 vor nT<sub>reg</sub>-ACT mit einem Index von 0.6 - 1.2 konstant nachweisbar

(Daten nicht dargestellt). Im Respirationstrakt wurden im gleichen Zeitraum *Klebsiella pneumoniae* und *Candida glabrata* nachgewiesen. An Tag 28 nach nT<sub>reg</sub>-ACT war *Staph. epidermidis* in der Blutkultur angewachsen. Trotz Eskalation der antibiotischen und antimykotischen Therapie, die durch die Organvorschädigung limitiert war, konnte eine Stabilisierung des klinischen Zustandes mit Fiebrerrückgang und CRP-Abfall nicht erreicht werden.

### Laborparameter



### J Pro- und antiinflammatorische Zytokine



**Abbildung 23. Patient 2: Klinische Chemie, Hämatologie und Zytokinprofil nach nT<sub>reg</sub>-ACT.**

Folgende Laborparameter wurden im zeitlichen Verlauf nach nT<sub>reg</sub>-ACT dargestellt: GOT, GGT und Albumin zur Beurteilung der Leberschädigung (A-C), die Nierenretentionswerte Kreatinin (D) und Harnstoff (E), CRP als Entzündungsmarker (F), sowie die Hämoglobinkonzentration (G), die Thrombozyten- (H) und Leukozytenzahl (I) als Parameter der allgemeinen Hämatologie. Ferner wurden die pro- und antiinflammatorischen Zytokine löslicher IL-2-Rezeptor, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-8 und IL-10 am Tag der Zellgabe sowie eine Woche nach nT<sub>reg</sub>-ACT bestimmt (J). Die altersspezifischen Referenzbereiche erscheinen grau unterlegt.

**3.2.4. Immunologische Veränderungen nach nT<sub>reg</sub>-ACT**

Für beide Patienten wurden zu jedem Follow-Up-Zeitpunkt FACS-Analysen als immunologische Begleituntersuchungen durchgeführt. Diese bestanden aus der Bestimmung 71 verschiedener Zelltypen (Tabelle 21). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden für die Auswertung nur die schwarz markierten Zelltypen betrachtet.

**Tabelle 21. Übersicht der immunologischen Begleituntersuchungen.**

Im Rahmen der immunologischen Überwachung nach nT<sub>reg</sub>-ACT wurden sechs verschiedene DuraClone-Panels am Navios™ Durchflusszytometer gemessen und so der Verlauf von 71 Zelltypen untersucht. Die Messergebnisse der grau gekennzeichneten Zelltypen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Zelltyp	Gating
Granulozyten	CD45+
Monozyten	CD45+ CD14+
CD14 <sup>high</sup> CD16- Monozyten	CD45+ CD14 <sup>high</sup> CD16-
CD14 <sup>high</sup> CD16+ Monozyten	CD45+ CD14 <sup>high</sup> CD16+
Plasmazytoide DCs (pDCs)	CD45+ LIN- HLA-DR+ CD11c- CD123+ BDCA2+
Myeloische DCs (mDCs)	CD45+ LIN- HLA-DR+ CD11c+
CD16+ DCs	CD45+ LIN- HLA-DR+ CD11c+ CD16+ BDCA3-
MDC1 mDCs	CD45+ LIN- HLA-DR+ CD11c+ CD16- BDCA3-
MDC2 mDCs	CD45+ LIN- HLA-DR+ CD11c+ CD16+ BDCA3+
Lymphozyten	CD45+ CD14-
NK-Zellen	CD45+ CD3- CD56+
NK-T-Zellen	CD45+ CD3+ CD56+
CD16- CD56 <sup>high</sup> NK-Zellen	CD45+ CD3- CD16- CD56 <sup>high</sup>
CD16+ CD56 <sup>high</sup> NK-Zelle	CD45+ CD3- CD16+ CD56 <sup>high</sup>
CD16- CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen	CD45+ CD3- CD16- CD56 <sup>dim</sup>
CD16+ CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen	CD45+ CD3- CD16+ CD56 <sup>dim</sup>
T-Zellen	CD45+ CD3+
TCR $\alpha\beta$ T-Zellen = $\alpha\beta$ + T-Zellen	CD45+ CD3+ TCR $\alpha\beta$ +
TCR $\gamma\delta$ T-Zellen = $\gamma\delta$ + T-Zellen	CD45+ CD3+ TCR $\gamma\delta$ +
TCR $\gamma\delta$ CD4- CD8- T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4- CD8- TCR $\gamma\delta$ +
CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+
nT <sub>reg</sub> S	CD45+ CD3+ CD4+ CD25 <sup>high</sup> FoxP3+
Naive nT <sub>reg</sub> S	CD45+ CD3+ CD4+ CD25 <sup>high</sup> FoxP3+ CD45RA+
CD45RA- nT <sub>reg</sub> S	CD45+ CD3+ CD4+ CD25 <sup>high</sup> FoxP3+ CD45RA-
CD39+ nT <sub>reg</sub> S	CD45+ CD3+ CD4+ CD25 <sup>high</sup> FoxP3+ CD39+
CD127 <sup>low</sup> nT <sub>reg</sub> S	CD45+ CD3+ CD4+ CD25 <sup>high</sup> FoxP3+ CD127 <sup>low</sup>
TEMRA CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7-
Naive CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7+
Zentrale Gedächtnis-CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7+
Effektor-Gedächtnis-CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7-
Naive CD4+ CD27+ CD28+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7+ CD27+ CD28+
Zentrale Gedächtnis-CD4+ CD27+	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7+ CD27+ CD28+

**Tabelle 21. Übersicht der immunologischen Begleituntersuchungen. (Fortsetzung)**

Zelltyp	Gating
EM1 CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7- CD27+ CD28+
EM2 CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7- CD27+ CD28-
pE1 CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7- CD27+ CD28+
pE2 CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7- CD27+ CD28-
EM4 CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7- CD27- CD28+
EM3 CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA- CCR7- CD27- CD28-
E CD4+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD45RA+ CCR7- CD27- CD28-
CD4+ CD57+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ CD57+
CD4+ HLA-DR+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ HLA-DR+
CD4+ HLA-DR- T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ HLA-DR-
CD4+ TCR $\alpha\beta$ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ TCR $\alpha\beta$
CD4+ TCR $\gamma\delta$ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD4+ TCR $\gamma\delta$
CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+
TEMRA CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA+ CCR7-
Naive CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA+ CCR7+
Zentrale Gedächtnis-CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA- CCR7+
Effektor-Gedächtnis-CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA- CCR7-
Naive CD8+ CD27+ CD28+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA+ CCR7+ CD27+ CD28+
Zentrale Gedächtnis-CD8+ CD27+	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA- CCR7+ CD27+ CD28+
EM1 CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA- CCR7- CD27+ CD28+
EM2 CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA- CCR7- CD27+ CD28-
pE1 CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA+ CCR7- CD27+ CD28+
pE2 CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA+ CCR7- CD27+ CD28-
EM4 CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA- CCR7- CD27- CD28+
EM3 CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA- CCR7- CD27- CD28-
E CD8+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD45RA+ CCR7- CD27- CD28-
CD8+ CD57+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ CD57+
CD8+ HLA-DR+ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ HLA-DR+
CD8+ HLA-DR- T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ HLA-DR-
CD8+ TCR $\alpha\beta$ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ TCR $\alpha\beta$
CD8+ TCR $\gamma\delta$ T-Zellen	CD45+ CD3+ CD8+ TCR $\gamma\delta$
B-Zellen	CD45+ CD19+ CD3-
Naive B-Zellen	CD45+ CD19+ IgD+ CD27-
Klassen-gewechselte B-Zellen	CD45+ CD19+ IgD- IgM- CD27+ CD38dim
Nicht-Klassen-gewechselte B-Zellen	CD45+ CD19+ IgD- IgM+ CD27+ CD38dim
Plasmablasten	CD45+ CD19+ IgD- IgM- CD27high CD38high
Transitionale B-Zellen	CD45+ CD19+ IgM+ CD27- CD38high CD24+
Marginalzonen B-Zellen	CD45+ CD19+ IgD+ CD27+
CD21low B-Zellen	CD45+ CD19+ CD21low CD38low

Die relativen Zellzahlen der einzelnen Populationen wurden durchflusszytometrisch bestimmt (Gatingstrategie siehe Abschnitt 2.2.5.4.). Die absoluten Zellzahlen wurden anhand der Leukozytenwerte aus der hämatologischen Blutuntersuchung berechnet.

#### 3.2.4.1. Patient 1

Patient 1 zeigte nach nT<sub>reg</sub>-ACT einen stabilen Verlauf der Lymphozyten knapp unterhalb der Normgrenze (Abbildung 24; A). Nur in Woche 16, zeitgleich mit dem stationären Aufenthalt (siehe Abschnitt 3.2.2.1.), kam es zu einem passageren Lymphozytenanstieg.

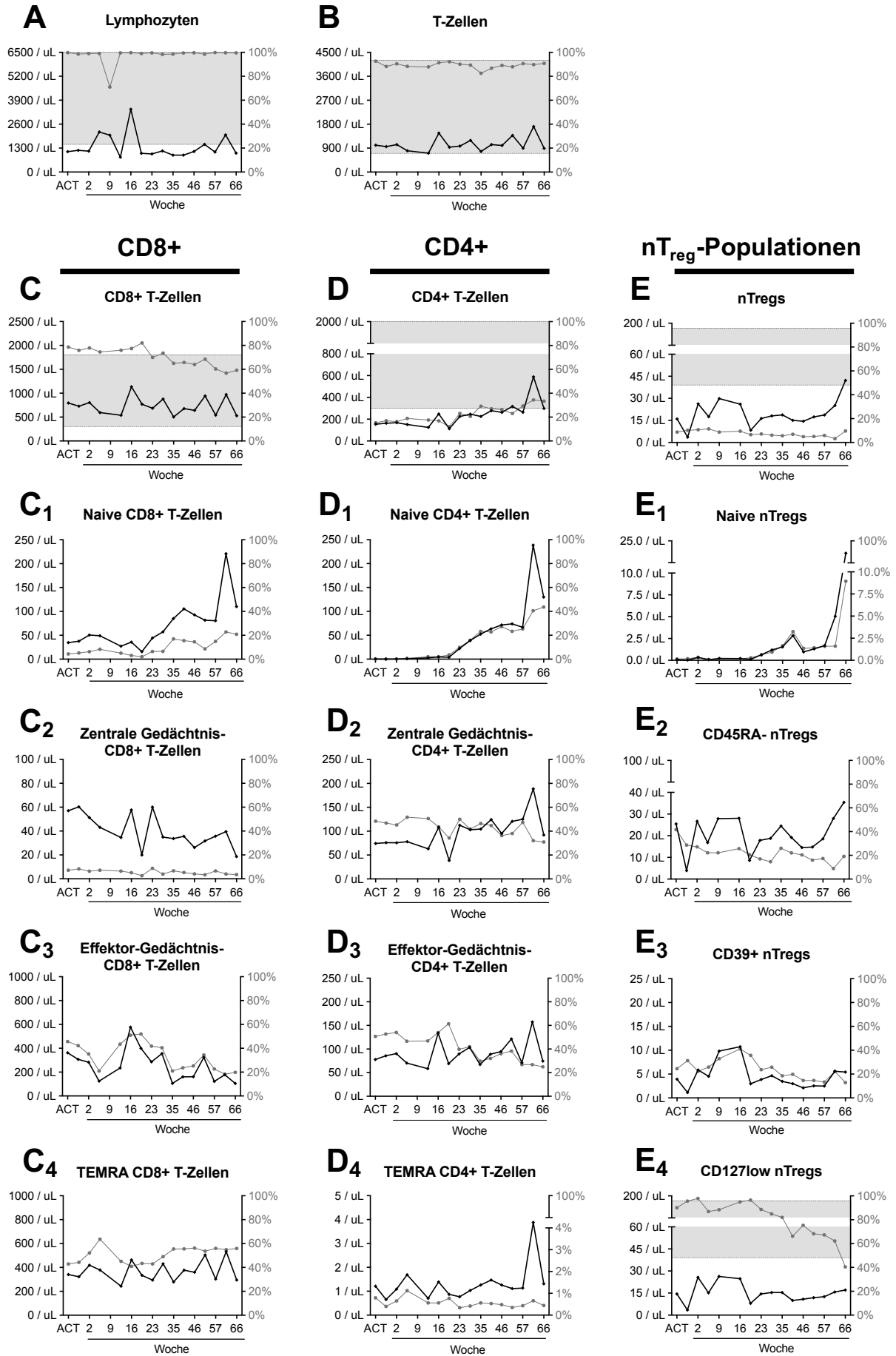


Für die T-Zellpopulation ließen sich insgesamt gleichbleibende Zellzahlen im unteren Normbereich beobachten (Abbildung 24; B). Auch die absolute Zahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte einen konstanten Verlauf, wobei der Anteil CD8<sup>+</sup> Zellen an der Gesamt-T-Zellzahl jedoch um 25% sank (Abbildung 24; C). Unterteilt man die CD8<sup>+</sup> T-Zellen entsprechend ihrer Expression von CD45RA und CCR7, fällt zudem ein deutlicher Anstieg naiver CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T-Zellen auf (Abbildung 24; C<sub>1</sub>). Auch der relative Anteil naiver Zellen innerhalb des CD8<sup>+</sup> T-Zellkompartiments stieg von 4% auf 20% an. Die absoluten Zellzahlen der CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> zentralen Gedächtnis-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> Effektor-Gedächtnis-T-Zellen fielen dagegen auf ca. 1/3 des Ausgangswerts (Abbildung 24; C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>). Ebenso zeigte der relative Anteil CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> Effektor-Gedächtnis-T-Zellen eine deutliche Abnahme (Abbildung 24; C<sub>3</sub>). Für die CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> TEMRA-T-Zellen ließ sich keine Veränderung der absoluten bzw. relativen Zellzahl beobachten.

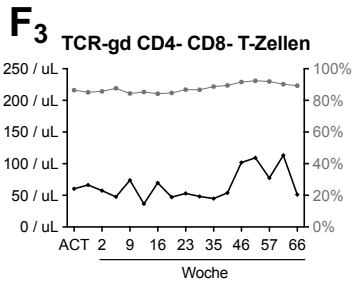
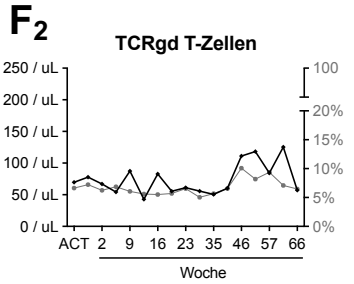
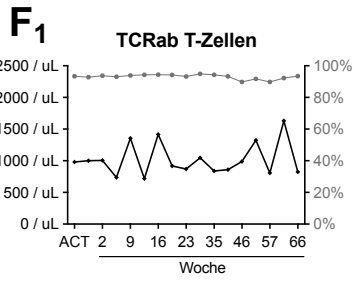
Die CD4<sup>+</sup> Zellen lagen direkt nach nT<sub>reg</sub>-ACT mit ca. 200 /  $\mu$ L deutlich unterhalb des altersspezifischen Referenzbereichs; im Verlauf zeigte sich jedoch eine signifikante Zunahme, sodass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen 62 Wochen nach nT<sub>reg</sub>-ACT den Normbereich erreichten (Abbildung 24; D). Neben dem Anstieg der absoluten CD4<sup>+</sup> T-Zellzahl stieg auch der Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen am T-Zellkompartiment von ca. 15% auf über 30%. Die Untersuchung der einzelnen Subpopulationen zeigt ferner, dass der Anstieg CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor allem auf die Proliferation naiver CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen war (Abbildung 24; D<sub>1</sub>). Zu beachten ist hierbei, dass 18 Wochen nach nT<sub>reg</sub>-ACT überhaupt erstmalig eine messbare Anzahl naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut des Patienten nachgewiesen werden konnte. 66 Wochen nach nT<sub>reg</sub>-ACT zeigten dann 40% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen naiven Phänotyp. Die CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> zentralen Gedächtnis-T-Zellen wiesen nach nT<sub>reg</sub>-ACT einen leichten Anstieg der absoluten Zellzahl auf (Abbildung 24; D<sub>2</sub>), während der prozentuale Anteil der CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> Effektor-Gedächtnis-T-Zellen an der Gesamtzellzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen von ca. 50% auf 25% sank (Abbildung 24; D<sub>3</sub>). Der Verlauf der CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> TEMRA-T-Zellen war, ähnlich wie im CD8<sup>+</sup> T-Zellkompartiment, weitgehend stabil (Abbildung 24; D<sub>4</sub>). Nach nT<sub>reg</sub>-ACT ließ sich somit sowohl für CD4<sup>+</sup> als auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein Anstieg der naiven Zellpopulation bei gleichzeitigem Absinken der relativen (CD4<sup>+</sup>) bzw. relativen und absoluten (CD8<sup>+</sup>) Zahl der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen beobachten.

Um den Einfluss des Zellprodukts auf das nT<sub>reg</sub>-Kompartiment zu untersuchen, wurde der Verlauf verschiedener nT<sub>reg</sub>-Populationen bestimmt. Hierbei zeigte sich vorrangig ein 2.5-facher Anstieg der absoluten Zellzahl CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> nT<sub>reg</sub>S (Abbildung 24; E). Damit lag die nT<sub>reg</sub>-Zellzahl 66 Wochen nach nT<sub>reg</sub>-ACT erstmalig im altersspezifischen Normbereich. Bei näherer Betrachtung der einzelnen nT<sub>reg</sub>-Kompartimente fällt zudem auf, dass ein zweiteiliger

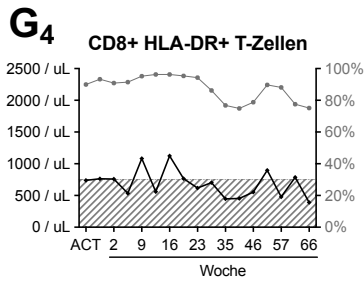
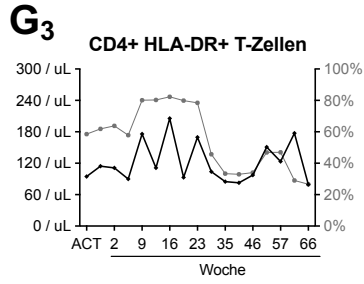
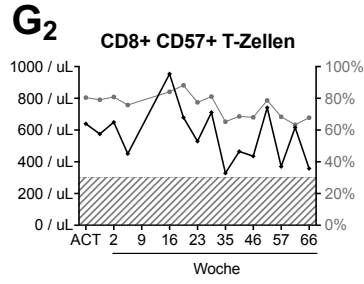
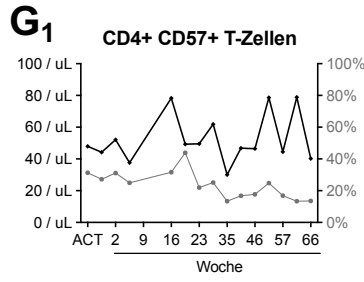
Verlauf vorliegt: Zunächst kam es zu einem Anstieg CD39+ und CD45RA- nT<sub>reg</sub>s, beides Marker für einen Gedächtnis-Phänotyps von nT<sub>reg</sub>s (Abbildung 24; E<sub>2</sub>; E<sub>3</sub>)<sup>52,263</sup>. Später waren jedoch naive CD45RA+ nT<sub>reg</sub>s für die weitere Zunahme der nT<sub>reg</sub>-Gesamtzellzahl verantwortlich (Abbildung 24; E<sub>1</sub>), während sich die CD45RA- und die CD39+ nT<sub>reg</sub>s stabil verhielten. Der Anteil CD127low nT<sub>reg</sub>s an der nT<sub>reg</sub>-Gesamtzellzahl zeigte im Verlauf eine deutliche Abnahme, gleichzeitig blieb die absolute Zellzahl weitgehend unverändert (Abbildung 24; E<sub>4</sub>).



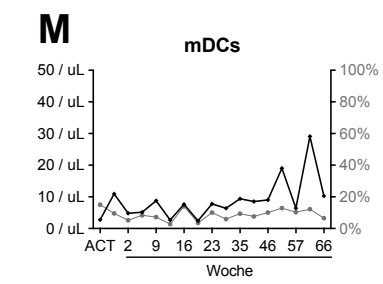
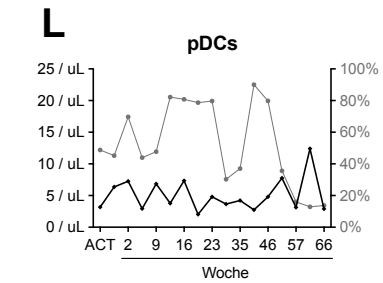
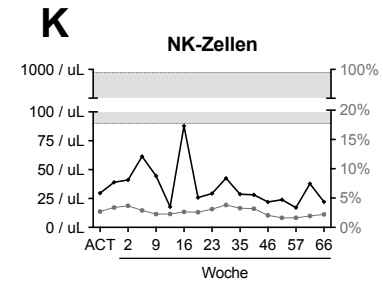
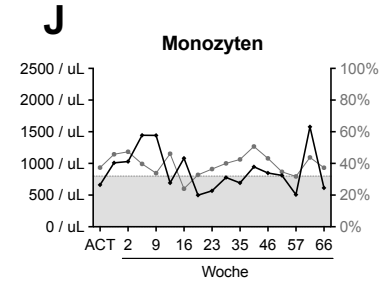
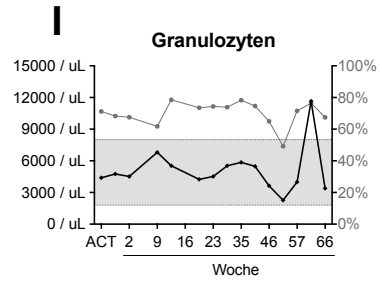
**TCR-Expression**



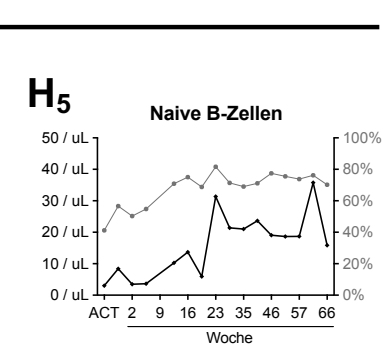
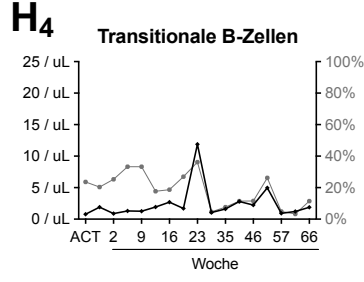
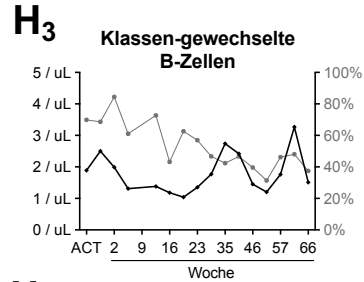
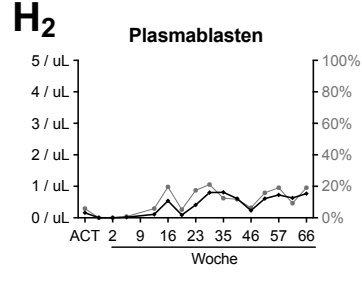
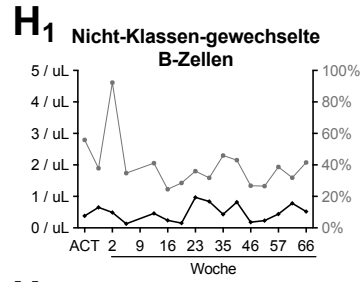
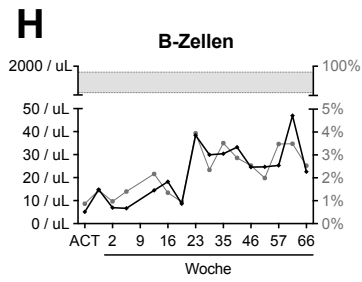
**T-Zellaktivierung**



**Angeborene Immunität**



**B-Zell-Populationen**



**Abbildung 24. Patient 1: Darstellung immunologischer Zellveränderungen nach nT<sub>reg</sub>-ACT.**

Dargestellt sind die absoluten und relativen Zellzahlen von 35 ausgewählten Zelltypen an insgesamt 17 Follow-Up-Zeitpunkten. Die relativen Zellzahlen sind in grau, die absoluten Zellzahlen in schwarz dargestellt. Es wurden die Lymphozyten (A), der T-Zell-Verlauf (B), das CD8<sup>+</sup> (C, C<sub>1-4</sub>) und CD4<sup>+</sup> (D, D<sub>1-4</sub>) T-Zellkompartiment, die nT<sub>reg</sub>S und nT<sub>reg</sub>-Subpopulationen (E, E<sub>1-4</sub>), die TCR-Expression (F<sub>1-3</sub>), die T-Zellaktivierung (G<sub>1-4</sub>), die B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen (H, H<sub>1-5</sub>) sowie einzelne Zelltypen der angeborenen Immunität (I, J, K, L, M) untersucht. Die altersspezifischen Referenzbereiche der absoluten Zellzahlen erscheinen grau unterlegt. Die altersspezifischen Referenzbereiche des relativen Zellanteils sind grau schraffiert dargestellt. nT<sub>reg</sub>S = CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> Zellen. (Für weitere Zelltyp-Definitionen siehe Abschnitt 3.2.4; Tabelle 21. Für das methodische Vorgehen und die Gatingstrategie siehe Abschnitt 2.2.5.4).

Da neue Ansätze der GVHD-Prävention die Elimination von  $\alpha\beta^+$  T-Zellen aus Stammzelltransplantaten vor allo-HSCT umfassen und  $\gamma\delta^+$  T-Zellen regulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden, erfolgte die Untersuchung der TCR-Expression nach nT<sub>reg</sub>-ACT (Abbildung 24; F<sub>1-3</sub>)<sup>264,265</sup>. Diese zeigte einen stabilen Verlauf von  $\alpha\beta^+$  sowie  $\gamma\delta^+$  T-Zellen, wobei 5-10% aller T-Zellen die TCR-Isoform  $\gamma\delta$  exprimierten (Abbildung 24; F<sub>2</sub>) und davon wiederum 90% CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> waren (Abbildung 24; F<sub>3</sub>).

Die Expression von CD57 und HLA-DR ist mit einer erhöhten T-Zell-Aktivität assoziiert und für cGVHD-Patienten wurden erhöhte Zahlen CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben<sup>266,267</sup>. Nach nT<sub>reg</sub>-ACT zeigte die Untersuchung dieser Marker einen leichten prozentualen Abfall für CD57<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 24; G<sub>1-2</sub>) sowie eine Reduktion des relativen Anteils HLA-DR<sup>+</sup> exprimierender Zellen im CD4<sup>+</sup> T-Zellkompartiment um 55% (Abbildung 24, G<sub>3</sub>). Die HLA-DR Expression der CD8<sup>+</sup> T-Zellen blieb weitgehend konstant (Abbildung 24; G<sub>4</sub>).

Im B-Zellkompartiment beobachteten wir einen deutlichen Anstieg der Gesamtzellzahl, der vor allem auf eine Zunahme naiver CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> B-Zellen zurückzuführen war (Abbildung 24; H, H<sub>5</sub>). Die CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>dim</sup> Klassen-gewechselten B-Zellen zeigten dagegen eine prozentuale Abnahme von 46% (Abbildung 24; H<sub>3</sub>). CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD38<sup>dim</sup> Nicht-Klassen-gewechselte B-Zellen, CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>CD27<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> Plasmablasten und CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>high</sup>CD24<sup>+</sup> Transitionale B-Zellen verhielten sich weitgehend stabil (Abbildung 24; H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>). Insgesamt kam es im B-Zellkompartiment somit, analog zum T-Zellkompartiment, erstmalig zu einem Anstieg naiver B-Zellen bei gleichzeitigem prozentualen Abfall von B-Zellen eines Gedächtnis-Phänotyps.

Um schließlich die Effekte des nT<sub>reg</sub>-ACTs auf die angeborene Immunität zu untersuchen, wurden Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen sowie pDCs und mDCs bestimmt. Der zeitliche Verlauf zeigte hierbei keine quantitative Beeinträchtigung der angeborenen Immunität nach adoptivem Zelltransfer (Abbildung 24, I-M). Die NK-Zellen lagen über den gesamten

Beobachtungszeitraum deutlich unterhalb des Referenzbereichs, blieben aber im zeitlichen Verlauf weitgehend stabil (Abbildung 24; K). Ähnlich wie für die gesamte Lymphozytenpopulation beobachtet, kam es in Woche 16 zu einem passageren Anstieg der NK-Zellen. Für die LIN-HLA-DR+CD11c-CD123+BDCA2+ pDCs, die vorwiegend für die Abwehr viraler Pathogene wichtig sind<sup>268</sup>, ließ sich ein prozentualer Abfall bei gleichbleibenden absoluten Zellzahlen beobachten (Abbildung 24; L). LIN-HLA-DR+CD11c+ mDCs, welche *in vivo* vor allem die Aktivierung von Th1, Th2, Th17 und CD8+ T-Zellen bewirken<sup>268</sup>, zeigten hingegen einen leichten Anstieg der absoluten Zellzahl (Abbildung 24; M).

#### 3.2.4.2. Patient 2

Zum Zeitpunkt des nT<sub>reg</sub>-ACTs ließ sich bei Patient 2 eine schwere Lymphopenie mit ca. 200 Zellen /  $\mu$ L nachweisen, die auch nach Zelltransfer einen stabilen Verlauf zeigte (Abbildung 25; A). Die Gesamt-T-Zellzahl lag ebenfalls deutlich unterhalb des Normbereichs und blieb in den ersten 5 Wochen weitgehend unverändert (Abbildung 25; B). Sowohl die CD8+ als auch die CD4+ T-Zellen waren stark erniedrigt und zeigten innerhalb der ersten Wochen stabile Zellzahlen (siehe Abbildung 25; C, D), wobei der relative Anteil CD4+ T-Zellen innerhalb des T-Zellkompartiments mit ca. 80% deutlich höher war als bei Patient 1 (siehe Abbildung 24; D).

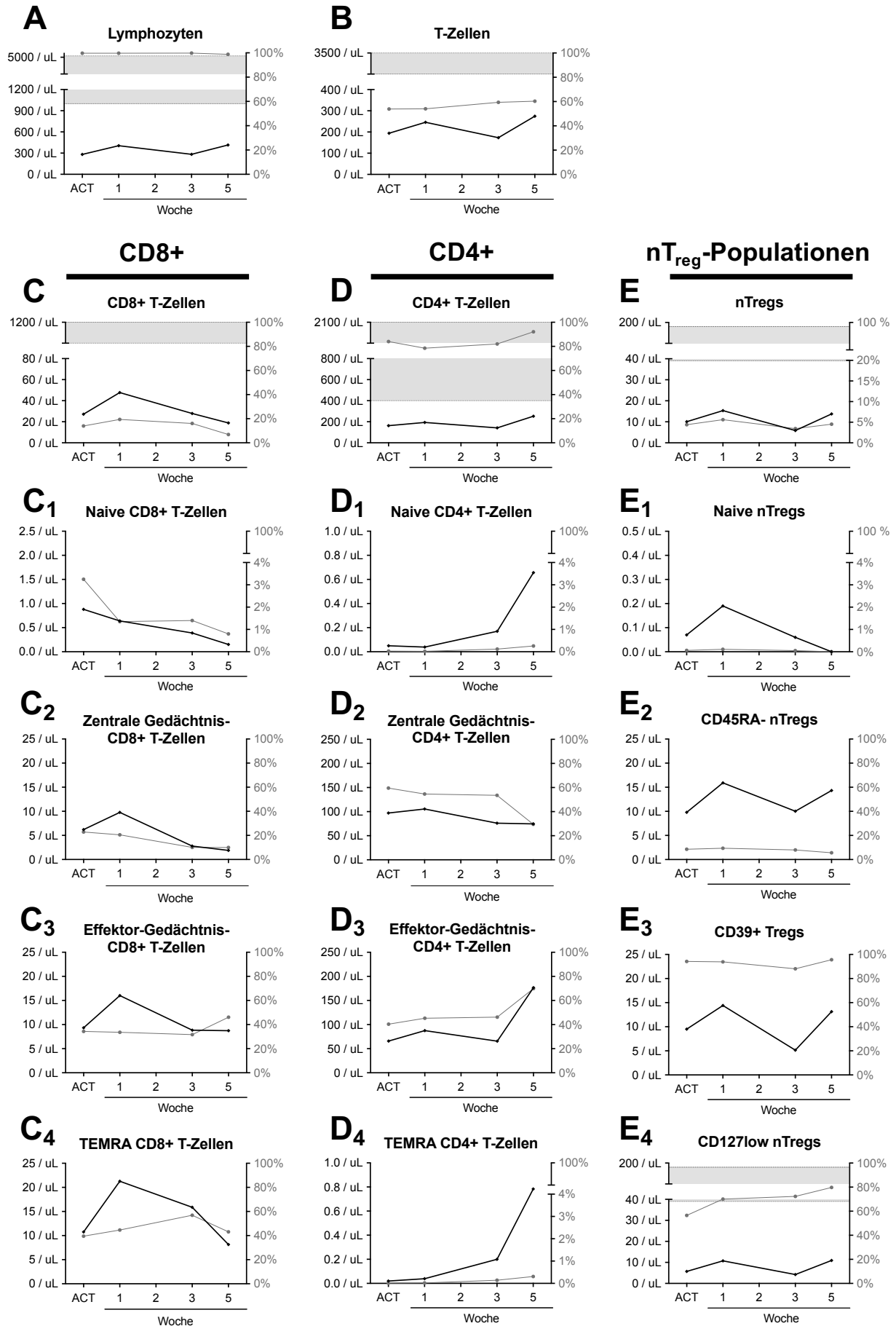
Die Betrachtung der einzelnen CD8+ Subpopulationen ergab einen leichten Abfall der naiven CD8+CD45RA+CCR7+ T-Zellen und der CD8+CD45RA-CCR7+ zentralen Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 25; C<sub>1-2</sub>), wobei Letzteres auch bei Patient 1 bereits in den ersten Wochen nach nT<sub>reg</sub>-ACT zu beobachten war (siehe Abbildung 24; C<sub>2</sub>). Die Zellzahlen der CD8+CD45RA-CCR7- Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und der CD8+CD45RA+CCR7-TEMRA-T-Zellen waren im Vergleich zu Patient 1 deutlich vermindert und zeigten im Verlauf keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 25; C<sub>3-4</sub>).

Die nähere Untersuchung der CD4+ T-Zellen ergab einen geringfügig ansteigenden Trend für naive CD4+CD45RA+CCR7+ T-Zellen, CD4+CD45RA-CCR7- Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und CD4+CD45RA+CCR7-TEMRA-T-Zellen, während die Zahl der CD4+CD45RA-CCR7+ zentralen Gedächtnis-T-Zellen unverändert blieb (Abbildung 25; D<sub>1-4</sub>). Der Vergleich mit Patient 1 zeigt auch für diesen keine deutlichen Veränderungen der CD4+ Subpopulationen innerhalb der ersten 5 Wochen nach nT<sub>reg</sub>-ACT; ein klarer Anstieg der naiven CD4+ T-Zellen ließ sich erst ab Woche 16 feststellen (siehe Abbildung 24; D<sub>1</sub>).

Die nT<sub>reg</sub>-Zellzahl von Patient 2 lag zum Zeitpunkt des nT<sub>reg</sub>-ACTs, ähnlich wie bei Patient 1, deutlich unterhalb des altersspezifischen Referenzbereichs (Abbildung 24; E). Auch im Verlauf blieben die nT<sub>regs</sub> bei einem Wert von ca. 10 /  $\mu$ L stabil. Dies ist mit den Ergebnissen von

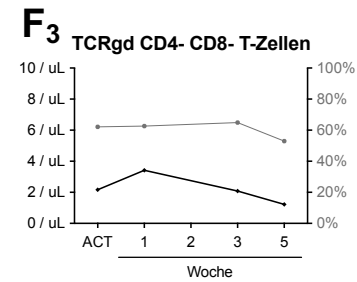
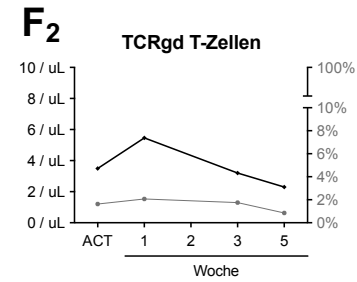
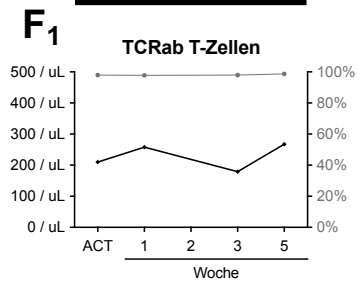
Patient 1 vereinbar, bei dem sich erst ab Woche 9 eine deutliche  $nT_{reg}$ -Zunahme beobachten ließ (siehe Abbildung 24; E). Die Betrachtung der einzelnen  $nT_{reg}$ -Populationen zeigte, bis auf einen leichten prozentualen Anstieg der  $CD4+CD25^{high}FoxP3+CD127^{low}$   $nT_{regS}$  (Abbildung 25; E<sub>4</sub>), keine weiteren klaren Veränderungen nach  $nT_{reg}$ -ACT (Abbildung 25; E, E<sub>1,2,3</sub>). Wie bei Patient 1 waren auch bei Patient 2 in den ersten 5 Wochen nach Zelltransfer kaum naive  $nT_{regs}$  nachweisbar (Abbildung 25, E<sub>1</sub>).

Die Zahl  $\alpha\beta+$  und  $\gamma\delta+$  T-Zellen war im Vergleich zu Patient 1 deutlich erniedrigt und zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum einen stabilen Verlauf (Abbildung 25; F<sub>1-3</sub>). Auch die  $CD57+$  T-Zellen verhielten sich nach  $nT_{reg}$ -ACT unauffällig, wobei der relative Anteil  $CD57+$  exprimierender  $CD8+$  T-Zellen mit ca. 70% anhaltend hoch war (Abbildung 25, G<sub>1-2</sub>). Die Bestimmung HLA-DR+ T-Zellen ergab bei einer gleichbleibenden Zahl HLA-DR+ $CD8+$  T-Zellen einen deutlichen Anstieg HLA-DR+ exprimierender  $CD4+$  T-Zellen von 30 Zellen /  $\mu$ L auf 80 Zellen /  $\mu$ L (Abbildung 25; G<sub>3-4</sub>).

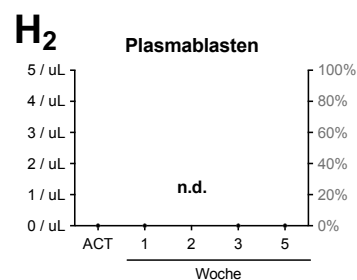
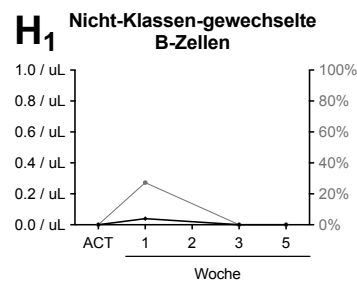
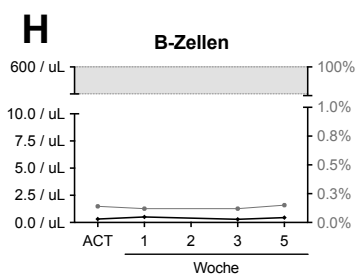




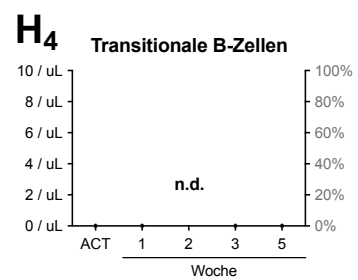
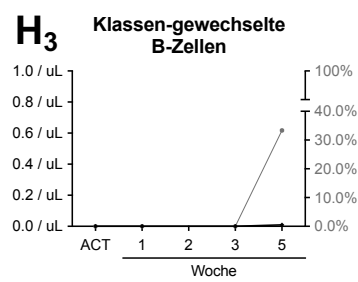
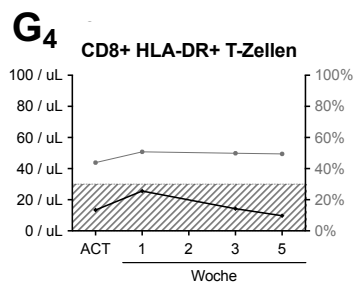
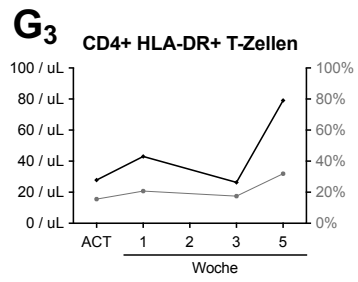
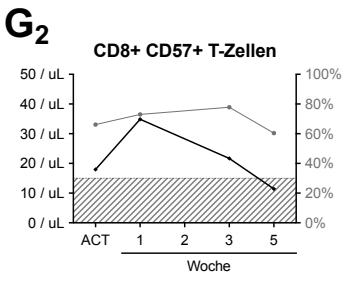
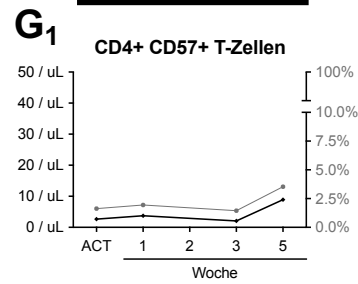
**TCR-Expression**



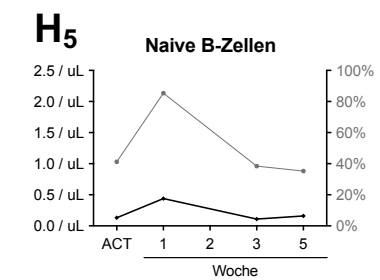
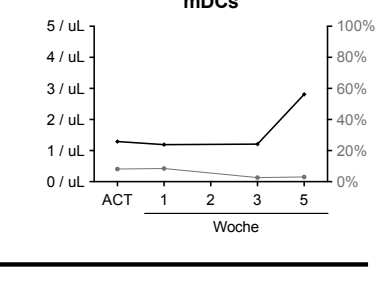
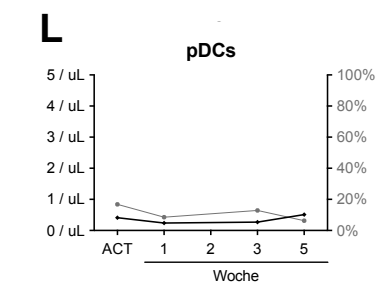
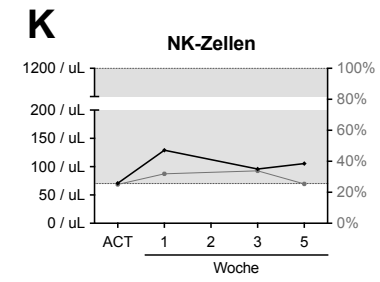
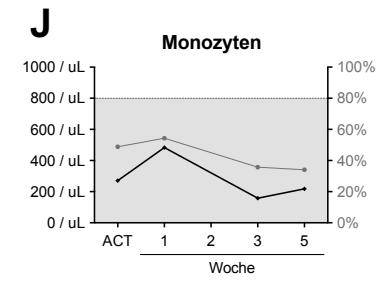
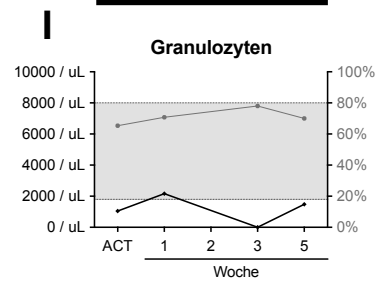
**B-Zell-Populationen**



**T-Zellaktivierung**



**Angeborene Immunität**



**Abbildung 25. Patient 2: Darstellung immunologischer Zellveränderungen nach nT<sub>reg</sub>-ACT.**

Dargestellt sind die absoluten und relativen Zellzahlen der 35 ausgewählten Zelltypen an insgesamt 4 Follow-Up-Zeitpunkten. Die relativen Zellzahlen sind in grau, die absoluten Zellzahlen in schwarz dargestellt. Es wurden die Lymphozyten (A), der T-Zell-Verlauf (B), das CD8<sup>+</sup> (C, C<sub>1-4</sub>) und CD4<sup>+</sup> (D, D<sub>1-4</sub>) T-Zellkompartiment, nT<sub>reg</sub>S und nT<sub>reg</sub>-Subpopulationen (E, E<sub>1-4</sub>), die TCR-Expression (F<sub>1-3</sub>), die T-Zellaktivierung (G<sub>1-4</sub>), die B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen (H, H<sub>1-5</sub>) sowie Zellen der angeborenen Immunität (I, J, K, L, M) untersucht. Die altersspezifischen Referenzbereiche der absoluten Zellzahlen erscheinen grau unterlegt. Die altersspezifischen Referenzbereiche des relativen Zellanteils sind grau schraffiert dargestellt. nT<sub>reg</sub>S = CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> Zellen. (Für weitere Zelltyp-Definitionen siehe Abschnitt 3.2.4. Tabelle 21; Für das methodische Vorgehen und die Gatingstrategie siehe Abschnitt 2.2.5.4). N.d. = nicht detektiert.

Zum Zeitpunkt des nT<sub>reg</sub>-ACTs ließen sich bei Patient 2 kaum B-Zellen nachweisen (Abbildung 25; H). Auch im Verlauf zeigten sich stark erniedrigte Zellzahlen, was die Analyse der einzelnen B-Zell-Subpopulationen erschwerte (Abbildung 25; H<sub>1,3,5</sub>). Tatsächlich konnten CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>high</sup>CD24<sup>+</sup> Transitionale B-Zellen und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>CD27<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> Plasmablasten zu keinem Follow-Up-Zeitpunkt detektiert werden (Abbildung 25; H<sub>2,4</sub>).

Schließlich wurden auch für Patient 2 einige Zelltypen des angeborenen Immunsystems untersucht. Hierbei zeigten sich eine stabile Granulozytopenie (Abbildung 25; I) sowie normwertige Monozyten und NK-Zellen, die auch nach nT<sub>reg</sub>-ACT gleichbleibende Zellzahlen aufwiesen (Abbildung 25; J, K). Während der Verlauf der pDCs unauffällig war, ließ sich ein leicht steigender Trend der LIN-HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> mDCs beobachten (Abbildung 25; L, M). Insgesamt zeigte sich somit auch bei Patient 2 keine quantitative Beeinträchtigung der angeborenen Immunität.

**3.2.5. Zusammenfassung: nT<sub>reg</sub>-ACTs bei pädiatrischer cGVHD**

Die Zusammenschau der Ergebnisse dieser zwei nT<sub>reg</sub>-ACTs zeigt für Patient 1 eine signifikante klinische Besserung mit deutlicher Steigerung der Lebensqualität und für Patient 2 eine passagere Stabilisierung der cGVHD. Inwiefern der Tod von Patient 2 mit dem nT<sub>reg</sub>-ACT, der cGVHD, dem unkontrollierten Infektionsgeschehen und der Medikamententoxizität auf Leber und Niere zusammenhängt, ist schwer zu beurteilen.

Die bei Patient 2 beobachtete deutliche Lymphopenie und der beschränkte Beobachtungszeitraum erschweren die Formulierung zusammenfassender Erkenntnisse. Allgemein lässt sich jedoch anmerken, dass die Ergebnisse von Patient 2 nicht im Widerspruch zu den Beobachtungen von Patient 1 stehen, da sich auch dort die beschriebenen immunologischen Veränderungen erst im längeren zeitlichen Verlauf zeigten.

Folgende Punkte lassen sich somit festhalten:

- (1) Bei 1/2 Patienten kam es nach nT<sub>reg</sub>-ACT zu einem biphasischem nT<sub>reg</sub>-Verlauf, der sich durch einen Anstieg der Gedächtnis-nT<sub>reg</sub>s zu Beginn und einer kontinuierlichen Zunahme naiver nT<sub>reg</sub>s im weiteren Verlauf kennzeichnete. Bei Patient 2 konnte analog in den ersten 5 Wochen keine signifikante Veränderung der nT<sub>reg</sub>-Zahl beobachtet werden.
- (2) Beide Kompartimente des adaptiven Immunsystems, T- und B-Zellen, zeigten bei 1/2 Patienten eine deutliche Zunahme naiver Zellen bei gleichzeitiger Abnahme von Effektor-T-Zellen bzw. Klassen-gewechselten B-Zellen.
- (3) Die Zellen der angeborenen Immunität zeigten nach nT<sub>reg</sub>-ACT einen stabilen Verlauf ohne quantitative Beeinträchtigung.

## 4. Diskussion

### 4.1. Herstellung von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten für die klinische Anwendung

Zur Herstellung von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten können verschiedene Isolations- und Expansionsverfahren angewendet werden. In der Literatur wird hierbei v.a. zwischen der Generierung polyklonaler und antigenspezifischer bzw. alloreaktiver Zellprodukte unterschieden<sup>248,254,255,269,270</sup>. Sagoo *et al.* zeigten in einem humanisierten Mausmodell, dass antigenspezifische nT<sub>reg</sub>S eine Entzündungsreaktion nach allogener Hauttransplantation potenter verhindern konnten als polyklonal expandierte nT<sub>reg</sub>S<sup>255</sup>. Auch Landwehr-Kenzel *et al.* beobachteten eine stärkere Suppressionskapazität von alloreaktiven nT<sub>reg</sub>S<sup>256</sup>. Klinische Studien und die Ergebnisse dieser Arbeit belegen wiederum die Effektivität polyklonal expandierter nT<sub>reg</sub>S<sup>190–192,236</sup>. Zum aktuellen Kenntnisstand wird angenommen, dass polyklonale nT<sub>reg</sub>S sowohl *in vivo* als auch *in vitro* immunmodulierende Wirkung zeigen, jedoch die 5- bis 32-fache Zellzahl eingesetzt werden muss, um eine vergleichbare Effektivität wie antigenspezifische nT<sub>reg</sub>S zu erzielen<sup>270</sup>. Die Ergebnisse unserer Proliferationsassays zeigen hierzu, dass nT<sub>reg</sub>S in einem nT<sub>reg</sub>:T<sub>conv</sub>-Verhältnis von 1:20 eine deutliche Suppression der T<sub>conv</sub>-Proliferation erzielen. Eine weitere Titration der nT<sub>reg</sub>:T<sub>conv</sub>-Verhältnisse muss durchgeführt werden, um die niedrigste nT<sub>reg</sub>-Dosis zu ermitteln, die für eine potente Proliferationsinhibition von T<sub>conv</sub> benötigt wird. Die Herstellung antigenspezifischer nT<sub>reg</sub>S ist dagegen aufgrund ihrer geringen Häufigkeit im peripheren Blut mit größeren technischen Schwierigkeiten verbunden. Protokolle zur *in vitro* Herstellung antigenspezifischer, oligo- bzw. monoklonaler nT<sub>reg</sub>S durch Kokultivierung mit artifiziellen bzw. vom Spender stammenden APCs (oligoklonal) oder durch retrovirale Transduktion genetisch-veränderter TCRs (monoklonal) befinden sich in der Entwicklung<sup>256,269,271–273</sup>. „Large-scale“-Protokolle, die klinische Anwendung finden, fehlen jedoch bisher<sup>248,274,275</sup>.

Für die Herstellung eines polyklonalen nT<sub>reg</sub>-Zellprodukts ist zunächst die Auswahl einer geeigneten nT<sub>reg</sub>-Quelle wichtig. Grundsätzlich können nT<sub>reg</sub>S aus peripherem Blut, Nabelschnurblut (UCB) und Leukapheresat gewonnen werden<sup>236,242,245,248</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nT<sub>reg</sub>S aus peripherem Blut isoliert, was aufgrund der breiten Verfügbarkeit kostengünstig, für den Spender wenig belastend und für die klinische Anwendung geeignet ist. Aus 100 ml Vollblut wurden durchschnittlich  $1.3 \times 10^6$  nT<sub>reg</sub>S gewonnen. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen nT<sub>reg</sub>-Erträgen, die bei  $1 - 4.5 \times 10^6$  nT<sub>reg</sub>S pro 100 ml Vollblut liegen<sup>242,243,270,274</sup>. Brunstein *et al.* nutzten hingegen UCB als nT<sub>reg</sub>-Quelle und erzielten einen Ertrag von  $0.4 - 7.6 \times 10^6$  CD4+CD25+ Zellen pro aufgetaute UCB-Einheit. Die Reinheit, definiert als Anteil CD4+CD25+ Zellen im Zellprodukt, lag zwischen 29-96%<sup>236</sup>. Hoffmann *et al.* waren 2006 die Ersten, denen eine GMP-konforme nT<sub>reg</sub>-Isolation aus

Leukapheresat-Produkten via zweistufiger Magnetsortierung gelang<sup>243</sup>. Nach CD19 Depletion und 3 Zyklen CD25 Anreicherung blieben 1.72% der Zellen aus dem Leukapheresat-Produkt als „Zielpopulation“ zurück (Im Mittel  $168 \times 10^6$  aus  $9.8 \times 10^9$  Zellen), wovon durchschnittlich 49,5% einen CD4+CD25high Phänotyp aufwiesen<sup>243</sup>. Grundsätzlich werden, je nach Indikation, autologe oder allogene nT<sub>reg</sub>s gewonnen. Die Isolation erfolgt dabei entweder durch die Oberflächenfärbung von nT<sub>reg</sub>-Markern (v.a. CD4, CD25, CD127) und anschließende Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting, FACS*) oder über magnetische Zellsortierung (*Magnetic activated cell sorting, MACS*)<sup>269,274</sup>. Für ersteren Ansatz besteht zwar eine FDA-Zulassung (*Food and Drug Administration*) für den amerikanischen Markt, in Europa sind FACS-sortierte nT<sub>reg</sub>-Produkte bisher jedoch nicht zugelassen, da die verfügbaren FACS-Geräte nicht die GMP-Kriterien der EMA (Europäische Arzneimittel-Agentur) erfüllen<sup>245,269</sup>. Die zweiseitige Magnetisolation von CD8-CD25+ Zellen mit Hilfe des CliniMACS-Systems (Miltenyi Biotec GmbH) ist hingegen GMP-konform und findet inzwischen breite Anwendung<sup>235,243,245,249,270</sup>.

Technische Schwierigkeiten in der Herstellung von nT<sub>reg</sub>-Produkten liegen auch im Bereich der Zellexpansion. Aufgrund der niedrigen Erträge ist eine *ex vivo* Expansion der isolierten nT<sub>reg</sub>s in den meisten Fällen erforderlich<sup>270,274</sup>. Trotz Vorliegen effizienter Expansionsprotokolle zur Herstellung polyklonaler nT<sub>reg</sub>-Produkte stellt die Generierung ausreichender Zellzahlen in der Praxis weiterhin eine Herausforderung dar<sup>235,248</sup>. In einer nT<sub>reg</sub>-Studie von Brunstein *et al.* erhielten 6 von 23 Patienten (26%) aufgrund unzureichender Zellexpansion nicht die geplante Zelldosierung<sup>192</sup>. Die mittlere Expansionsrate lag nach 18-tägiger Kokultur mit CD3/CD28-ummantelten Expansionsbeads bei 211-fach<sup>192</sup>. In einer nT<sub>reg</sub>-Studie von Theil *et al.* wuchs die Zellzahl nach 12-tägiger Zellkultur auf das 4.5-fache an<sup>191</sup>. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimente zeigen, dass sich durch die 26-tägige Kultivierung mit IL-2 und Rapamycin sowie durch wiederholte Stimulationen mit CD3/CD28-ummantelten Expansionsbeads eine durchschnittliche Expansionsrate von 6600-fach erzielen lässt. Bei einem mittleren Ertrag von  $1.3 \times 10^6$  nT<sub>reg</sub>s aus 100 ml Vollblut ließen sich mit den angewandten Isolations- und Expansionsprotokollen somit polyklonale Zellprodukte mit durchschnittlich  $8.6 \times 10^9$  nT<sub>reg</sub>s herstellen. Bei einem 80 kg schweren Patienten könnten so nT<sub>reg</sub>-Dosierungen von bis zu  $100 \times 10^6$  / kg eingesetzt werden. Nur in einer jüngsten Studie von Brunstein *et al.* konnten noch höhere Expansionsraten von durchschnittlich 13.000-fach erreicht werden<sup>236</sup>. Dort wurde das nT<sub>reg</sub>-Wachstum jedoch nicht mit CD3/CD28 Beads, sondern mit CD3mAb beladenen artifiziellen KT64/86-APCs stimuliert<sup>236</sup>. Diese haben den Nachteil, kein „off-the-shelf“-GMP-Produkt darzustellen, weswegen sie in einer jüngsten Studie von Seay *et al.* im Vergleich zu CD3/CD28-basierter Expansion nicht favorisiert wurden<sup>246</sup>.

Da die Lagerung und Kryokonservierung von nT<sub>reg</sub>-Produkten bisher nur eingeschränkt möglich ist<sup>249,250</sup>, spielt der Isolationszeitpunkt von nT<sub>reg</sub>s für die klinische Anwendung eine bedeutsame Rolle. Die gleichzeitige Isolation von nT<sub>reg</sub>s und Stammzellen aus dem Blut von G-CSF mobilisierten PBSC-Spendern könnte präventive nT<sub>reg</sub>-Applikationen vor dem Auftreten von GVHD-Erscheinungen ermöglichen. Ukena *et al.* zeigten bereits, dass sich nT<sub>reg</sub>s aus dem Blut G-CSF mobilisierter Spender isolieren lassen und eine befriedigende T<sub>conv</sub>-Suppression *in vitro* zeigen (ca. 70% bei einem 1:1 Verhältnis von T<sub>conv</sub> : nT<sub>reg</sub>)<sup>251</sup>. Die nT<sub>reg</sub>s wurden jedoch durchflusszytometrisch isoliert, sodass keine Daten zu GMP-konformen nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten vorliegen<sup>251</sup>. Die hier durchgeführten Experimente mit nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten aus dem Blut G-CSF mobilisierter Spender zeigen, ähnlich wie bei Ukena *et al.*, eine hohe nT<sub>reg</sub>-Reinheit der Zellprodukte und keine Produktion proinflammatorischer Zytokine. Die Zellexpansion der G-CSF-nT<sub>reg</sub>-Linien verhielt sich in den ersten 19 Tagen vergleichbar zu dem Expansionsverhalten von nT<sub>reg</sub>s aus unbehandeltem Vollblut. Nach 26 Tagen waren die Zellen auf das 895-fache angewachsen und wiesen damit zwar ein niedrigeres Durchschnittswachstum auf, dies lag jedoch innerhalb der Streubreite des Wachstums unbehandelter nT<sub>reg</sub>s (86- bis 102.000-fach). Auch hinsichtlich der CD154/CD137 Expression entsprachen die G-CSF-nT<sub>reg</sub>s dem konventionellen Zellprodukt. Im Gegensatz dazu ließ sich bei den Proliferationsassays eine geringere Suppressionskapazität von 76.5% vs. 90.1% für CD4+ und 42.5% vs. 83.1% für CD8+ beobachten. Grund dafür könnte sein, dass bei den Proliferationsassays der G-CSF-nT<sub>reg</sub>-Linien aufgetaute statt frisch isolierte T<sub>conv</sub> verwendet werden mussten. Dies führte möglicherweise zu veränderten Eigenschaften der T<sub>conv</sub>. Nach 4 Tagen Kokultur konnten für die G-CSF-nT<sub>reg</sub>-Linien insgesamt deutlich weniger Responderzellen (< 1000 Zellen) durchflusszytometrisch erfasst werden, was die Analyse der Ergebnisse zusätzlich erschwerte. Ferner zeigten auch die stimulierten T<sub>conv</sub> ohne nT<sub>reg</sub>s (=Positivkontrolle) in einem Assay keine deutliche Proliferation. Die Nutzung frischer allogener Responderzellen ist daher für künftige Experimente dringend erforderlich. Anzumerken ist jedoch auch, dass, trotz geringerer Suppressionskapazität im Vergleich zum konventionellen nT<sub>reg</sub>-Zellprodukt, die hier generierten G-CSF-nT<sub>reg</sub>s im Vergleich zu G-CSF-nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten in der Literatur mindestens gleichwertig waren: Während die Suppressionskapazität von Ukena *et al.* für CD4+ T<sub>conv</sub> bei knapp 70% lag, betrug die Suppressionskapazität hier 76.5%<sup>251</sup>. Anhand der Ergebnisse unserer G-CSF-Daten lässt sich somit ableiten, dass aus G-CSF mobilisiertem Vollblut nT<sub>reg</sub>-Produkte mit hoher Reinheit, befriedigendem Zellwachstum und suppressiven Eigenschaften generiert werden können. Dennoch sind weitere Experimente mit größeren Zelllinienanzahlen und die Nutzung alternativer Suppressionassays nötig, um die Produktfunktionalität weiter zu evaluieren.

## 4.2. Qualitätsbewertung von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten

Die Qualität von nT<sub>reg</sub>-Produkten wird vor allem durch die Reinheit und die Funktionalität der nT<sub>reg</sub>s bestimmt. Erstere wird meist durch den Anteil FoxP3+ nT<sub>reg</sub>s definiert. Da in der Literatur jedoch unterschiedliche nT<sub>reg</sub>-Marker verwendet werden, ist ein Vergleich der einzelnen Produktreinheiten schwierig. Trzonkowski *et al.* verwendeten beispielsweise nur FoxP3 als Reinheitsmarker und gaben eine Expression von 40-90% an<sup>190</sup>, während Theil *et al.* Zellprodukte mit einem durchschnittlichen Anteil CD4+CD25highCD127lowFoxP3+ Zellen von 78% herstellten<sup>191</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellprodukte aus unbehandeltem Vollblut generiert, die einen mittleren Anteil CD4+CD25highFoxP3+ nT<sub>reg</sub>s von 91% aufwiesen. Als zusätzliches Qualitätsmerkmal wurde eine Bestimmung proinflammatorischer Zytokine durchgeführt, um dadurch das Vorliegen von T<sub>conv</sub> nachzuweisen bzw. auszuschließen. Im Vergleich zu Brunstein *et al.*, die ebenfalls die Zytokinmessungen durchführten, lagen die Werte mit 5.4% für TNF- $\alpha$ , (Brunstein: 28%) 1.7% für IL-2 (Brunstein: 3.6%) und 1.7% für IFN- $\gamma$  (Brunstein: 0.3%) insgesamt deutlich niedriger<sup>236</sup>.

Für die Herstellung qualitativ hochwertiger nT<sub>reg</sub>-Zellprodukte ist es entscheidend, nT<sub>reg</sub>s klar von kontaminierenden T<sub>conv</sub> und iT<sub>reg</sub>s zu unterscheiden. Dies ist bisher nur über eine TSDR-Analyse oder indirekt über die Bestimmung von Effektorzytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-2 und IFN- $\gamma$ ) nach *in vitro* Stimulation möglich, nicht aber durch den Nachweis eines charakteristischen, nT<sub>reg</sub>-spezifischen Oberflächenphänotyps. In der Literatur wird CD137 (= 4-1BB), ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, als Oberflächenmarker aktivierter nT<sub>reg</sub>s beschrieben<sup>51,61</sup>. CD154 (= CD40L), ein Mitglied der TNF-Familie, ist dagegen ein Aktivierungsmarker, der vorwiegend von T<sub>conv</sub> exprimiert wird<sup>276</sup>. Sharma *et al.* zeigten zwar auch für FoxP3+ T<sub>reg</sub>-Populationen eine CD154 Expression nach *in vitro* Stimulation, diese ging jedoch mit der Aneignung T<sub>conv</sub>-typischer Eigenschaften einher<sup>277</sup>. Eine Bestimmung des TSDR-Demethylierungsstatus, um zu untersuchen, ob es sich um iT<sub>reg</sub>s oder nT<sub>reg</sub>s handelte, wurde leider nicht durchgeführt<sup>277</sup>.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse beschrieben Schoenbrunn *et al.* einen spezifischen CD154-/CD137+ Phänotyp für antigenspezifische nT<sub>reg</sub>s, während T<sub>conv</sub> ein CD137+/CD154+ und polyklonal expandierte nT<sub>reg</sub>s ein CD154-/CD137- Expressionsmuster zeigten<sup>61</sup>. Um zu untersuchen, ob (1) unser Zellprodukt CD154+ T<sub>conv</sub> oder T<sub>conv</sub>-ähnliche T<sub>reg</sub>s enthält und (2) CD137 als Selektionsmarker für nT<sub>reg</sub>-Zellprodukte geeignet ist, wurde sowohl von frisch magnetsortierten als auch von polyklonalen, *ex vivo* expandierten nT<sub>reg</sub>s der CD154/CD137 Phänotyp bestimmt. Ähnlich wie bei Schoenbrunn *et al.*, die nach 5h PMA/Ionomycin-Stimulation für FACS-isolierte CD4+CD25+ Zellen eine deutliche CD137 Expression zeigten<sup>61</sup>, ließ sich bei frisch isolierten nT<sub>reg</sub>s ein hoher Anteil CD154-/CD137+

Zellen (75%) nachweisen. CD154+ exprimierende Zellen waren im Isolat hingegen nicht nachweisbar. Nach polyklonaler Expansion wurde ein Verlust der CD137+ Expression beobachtet, ohne dass der Aktivierungsmarker CD154 exprimiert wurde. Der Anteil CD154-/CD137+ Zellen lag jedoch weiterhin bei durchschnittlich 51%, während er bei Schoenbrunn *et al.* nur 2.1% betrug. Zudem zeigte sich eine starke Heterogenität in der Expression; bei n=13 Zelllinien variierte der Anteil CD154-/CD137+ Zellen zwischen 3 - 97%. Um zu untersuchen, ob sich CD154-/CD137+ und CD154-/CD137- nT<sub>reg</sub>s in ihrer Produktqualität unterscheiden, wurde für beide Fraktionen die Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-2 und IFN- $\gamma$  bestimmt. Die Ergebnisse zeigten keine Unterschiede in der Zytokinproduktion, sämtliche Werte lagen < 2%. Auch bei Nowak *et al.* zeigten nT<sub>reg</sub>s nach polyklonaler *ex vivo* Expansion einen primär CD154-/CD137+ Phänotyp, der mit keiner Expression proinflammatorischer Zytokine einherging<sup>259</sup>. Der Anteil CD154+ exprimierender nT<sub>reg</sub>s lag hierbei jedoch mit 27.25% deutlich über unseren Ergebnissen (< 2% CD154+ nT<sub>reg</sub>s nach Expansion, siehe Abschnitt 3.1.4.; Abbildung 17) und Zytokinmessungen zeigten für diese nT<sub>reg</sub>-Fraktion eine signifikante Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-2 und IFN- $\gamma$ <sup>259</sup>. Die von Nowak *et al.* durchgeführten TSDR-Analysen ergaben für CD154-/CD137+ nT<sub>reg</sub>s eine deutlich stärkere TSDR-Demethylierung im Vergleich zu CD154+ nT<sub>reg</sub>s bzw. unsortierten nT<sub>reg</sub>s (~80% vs. ~10% vs. ~60%)<sup>259</sup>. Die gesonderte TSDR-Bestimmung von CD154-/CD137- nT<sub>reg</sub>s wurde leider nicht durchgeführt. Da sich in unserem Zellprodukt CD154-/CD137- und CD154-/CD137+ nT<sub>reg</sub>s nicht in der Produktion von Effektorzytokinen unterschieden und ferner keine CD154 Expression nachweisbar war, stellt CD137 anhand der hier gewonnenen Daten keinen Qualitätsmarker polyklonaler nT<sub>reg</sub>-Produkte dar. TSDR-Analysen sollten durchgeführt werden, um vor allem die CD154-/CD137+ und CD154-/CD137- nT<sub>reg</sub>s unseres Zellprodukts auf Unterschiede im TSDR-Demethylierungsstatus zu untersuchen. Klonalitätsanalysen könnten zudem erklären, worauf die Abnahme CD137+ exprimierender nT<sub>reg</sub>s im Verlauf der polyklonalen Expansion zurückzuführen ist; ob (1) die Expression von CD137 im Verlauf der Zellkultur auf Zellebene abnimmt oder ob (2) vor allem eine Expansion CD137- nT<sub>reg</sub>s vorliegt.

Ein weiteres entscheidendes Qualitätskriterium von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten ist die Suppressionskapazität *in vitro*. Auch hier ist die Vergleichbarkeit der Zellfunktionalität durch Verwendung unterschiedlicher Suppressionsassays eingeschränkt. Di Ianni *et al.* nutzen ebenfalls einen CFSE-basierten Assay und erreichten eine durchschnittliche T<sub>conv</sub>-Inhibition von 67%<sup>195</sup>. Die durchschnittliche Suppressionskapazität der hier generierten Zellprodukte lag mit 90% bedeutend höher. Im Gegensatz zu Di Ianni *et al.* wurde zudem die Suppression von CD8+ T<sub>conv</sub> bestimmt, welche im Mittel bei 83% lag. Dies erscheint sinnvoll, da auch CD8+ T<sub>conv</sub> über Apoptoseinduktion und Thymusschädigung zu der Pathogenese der cGVHD beitragen<sup>172,177</sup>.



Insgesamt lassen sich mit den hier angewandten Isolations- und Expansionsprotokollen somit nT<sub>reg</sub>s hoher Qualität herstellen, die in ihrer Reinheit und Funktionalität den Zellprodukten aus bisher publizierten klinischen Studien gleichwertig, wenn nicht überlegen, sind.

### 4.3. Sicherheit und Wirksamkeit von nT<sub>reg</sub>-ACTs in der Transplantationsmedizin

nT<sub>reg</sub>s sind potente Suppressoren von Auto- und Alloimmunität, weshalb vor allem im Bereich der Transplantationsmedizin die klinische Anwendung von nT<sub>reg</sub>-ACTs intensiv erforscht wird<sup>241,278,279</sup>. Präklinische Daten konnten zeigen, dass die Applikation von nT<sub>reg</sub>s zu einer signifikanten Verbesserung bis hin zur erfolgreichen Prävention der GVHD führt<sup>230,280</sup>. Im Bereich der soliden Organtransplantation (SOT) konnten Mausmodelle die positiven Effekte von nT<sub>reg</sub>s auf das Langzeittransplantatüberleben nachweisen<sup>254,281</sup>. Auch erste klinische Erfahrungen mit nT<sub>reg</sub>-ACTs bestehen: Im Bereich der GVHD-Therapie und -Prävention wurden bisher 97 erwachsene Patienten mit nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten behandelt<sup>190–192,195,236–238</sup>, innerhalb der SOT wurden erste Studien zu nT<sub>reg</sub>-ACTs bei Patienten nach Nieren- und Lebertransplantation publiziert<sup>234,239,240</sup>. Todo *et al.* behandelten 10 Patienten nach Lebertransplantation mit durchschnittlich  $23 \times 10^6$  / kg iT<sub>reg</sub>s und zeigten eine gute Verträglichkeit sowie das erfolgreiche Absetzen der immunsuppressiven Therapie bei stabiler Transplantatfunktion in 7/10 Patienten (davon 4/10 langfristig)<sup>234</sup>. Chandran *et al.* und Mathew *et al.* verabreichten insgesamt 12 Patienten (3 + 9) nach Nierentransplantation autologe, polyklonal expandierte nT<sub>reg</sub>s<sup>239,240</sup>. Beide Arbeitsgruppen berichteten von einer guten Verträglichkeit, auch bei einer applizierten Gesamtzellzahl von  $5 \times 10^9$  nT<sub>reg</sub>s. Zudem zeigte keiner der Patienten schwere Infektionen, Malignome oder ein Transplantatversagen im Verlauf<sup>239,240</sup>. Interessanterweise konnten Mathew *et al.* nach nT<sub>reg</sub>-Applikation zudem einen langfristigen und signifikanten nT<sub>reg</sub>-Anstieg *in vivo* beobachten<sup>239,240</sup>. Den Beginn großer klinischer Studien repräsentiert die „ONE Study“, die als Phase I/IIa-Studie nT<sub>reg</sub>s zur Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation einsetzt<sup>282</sup>. Für eine Übersicht der publizierten und fortlaufenden nT<sub>reg</sub>-Studien in der Transplantationsmedizin siehe Abschnitt 1.3.; Tabelle 5 und 6.

Im Bereich der GVHD erhielten 90 der 97 Patienten nT<sub>reg</sub>s zur Prävention der Erkrankung<sup>192,195,236</sup>. Di Ianni *et al.* behandelten 28 Patienten präventiv (Tag -4 vor HLA-haploidentischer HSCT) mit  $2 - 4 \times 10^6$  / kg frisch isolierten nT<sub>reg</sub>s aus dem Leukapheresat der Stammzellspender<sup>195</sup>. Im Verlauf kam es nur bei 2 von 26 evaluierbaren Patienten zu einer aGVHD  $\geq$  Grad II und nach einem mittleren Follow-Up-Zeitraum von 11.2 Monaten zeigte keiner der Patienten Zeichen einer cGVHD<sup>195</sup>. Auch ließ sich eine zügige T-Zellrekonstitution sowie eine verbesserte Immunantwort gegenüber opportunistischen Keimen im Vergleich zu Patienten ohne nT<sub>reg</sub>-Gabe beobachten<sup>195</sup>. Nach 12 Monaten waren jedoch 13/26 Patienten verstorben, womit eine höhere Mortalitätsrate im Vergleich mit vorherigen Publikationen der Arbeitsgruppe

(50% vs. 36.5%) vorlag<sup>283</sup>. 7 der 13 Todesfälle wurden auf aggressive Polychemotherapie bzw. konditionierungsbedingte Toxizität zurückgeführt, 2 Patienten verstarben an einer GVHD und 4 weitere an Aspergillus-Infektionen, die bereits vor HSCT bzw. nT<sub>reg</sub>-ACT vorlagen und jeweils > 2 Monate nach Zelltransfer tödlich verliefen<sup>195</sup>. Da der nT<sub>reg</sub>-Transfer zeitgleich mit der Stammzelltransplantation durchgeführt wurde, ist der Einfluss der nT<sub>reg</sub>s auf die erhöhte Mortalitätsrate schwer zu beurteilen. Der frühere Nachweis pathogenspezifischer T-Zellen im Vergleich zu Kontrollen sowie die geringere Inzidenz von CMV-Reaktivierungen sprechen jedoch gegen eine nT<sub>reg</sub>-bedingte Einschränkung der Immunität<sup>195</sup>. Eine folgende Publikation von Martelli *et al.* beschrieb den klinischen Verlauf von insgesamt 43 Patienten nach nT<sub>reg</sub>-ACT, wobei die Ergebnisse von 24 der 43 Patienten bereits durch die beschriebene Studie von Di Ianni *et al.* veröffentlicht wurden<sup>195,238</sup>. Die ergänzenden Daten zeigten nach der präventiven Applikation von durchschnittlich  $2.5 \times 10^6$  / kg frisch isolierten nT<sub>reg</sub>s eine ähnliche Inzidenz von aGVHD (15% vs. 11%) im Vergleich mit historischen Kontrollen<sup>238</sup>. Nur ein Patient entwickelte nach nT<sub>reg</sub>-Applikation eine cGVHD. Weitere Untersuchungen zeigten auch hier, dass spezifische T-Zellantworten gegenüber Pathogenen wie *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* und CMV deutlich früher nachweisbar waren als bei Patienten nach haploidentischer HSCT ohne nT<sub>reg</sub>-ACT<sup>238</sup>.

Brunstein *et al.* publizierten zwei Studien in denen insgesamt 34 (23 + 11) Patienten nach Double-UCBT (*double umbilical cord blood transplantation*) mit polyklonalen, *ex vivo* expandierten nT<sub>reg</sub>s behandelt wurden<sup>192,236</sup>. Die Zellen wurden ebenfalls aus UCB isoliert und in Dosierungen von  $1 - 100 \times 10^6$  / kg an Tag +1 nach Transplantation appliziert<sup>192,236</sup>. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse auch bei nT<sub>reg</sub>-Dosierungen von  $100 \times 10^6$  / kg keine Dosis-limitierende Toxizität, keine Häufung opportunistischer Infektionen gegenüber gleichbehandelten Kontrollen ohne nT<sub>reg</sub>-Gabe und nur milde infusionsassoziierte Unverträglichkeiten<sup>192,236</sup>. Bei Zelldosierungen von  $1 - 30 \times 10^6$  / kg nT<sub>reg</sub>s lag die Inzidenz von aGVHD bei 43% (historische Kontrollen: 61%) und die von cGVHD bei 14% (historische Kontrollen: 26%)<sup>192</sup>. Die Applikation höherer Zelldosierungen ( $3 - 100 \times 10^6$  / kg nT<sub>reg</sub>s) in der zweiten Studie führte zu einer weiteren Reduktion der aGVHD auf 9% (Kontrollen: 45%) und einem vollständigen Ausbleiben von cGVHD-Symptomen (Kontrollen: 14%)<sup>236</sup>. Anzumerken ist, dass aufgrund technischer Schwierigkeiten die geplanten nT<sub>reg</sub>-Zieldosierungen teilweise nicht erreicht werden konnten<sup>192,236</sup>. Edinger *et al.* verabreichten schließlich 9 weiteren Patienten nach HSCT frisch isolierte nT<sub>reg</sub>s in Dosierungen von bis zu  $5 \times 10^6$  / kg<sup>237</sup>. Die Zellapplikation wurde von den Patienten gut vertragen und keiner entwickelte im Verlauf eine GVHD, opportunistische Infektionen oder ein Krankheitsrezidiv<sup>237</sup>.

Zur therapeutischen Applikation von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten bei GVHD wurden bisher nur zwei Studien mit insgesamt 7 (2 + 5) Patienten publiziert<sup>190,191</sup>. Tatsächlich beschreiben die

Ergebnisse dieser Arbeit erstmalig die Anwendung von nT<sub>reg</sub>-ACTs bei pädiatrischen cGVHD-Patienten, wodurch wichtige Informationen für zukünftige Studien gewonnen werden können. Trzonkowski *et al.* behandelten zwei Patienten mit polyklonalen, *ex vivo* expandierten nT<sub>reg</sub>S<sup>190</sup>. Eine Patientin litt an einer schweren cGVHD und erhielt 0.1 x 10<sup>6</sup> / kg nT<sub>reg</sub>S, die im Verlauf ein Absetzen der MMF-Therapie sowie eine Reduktion der täglichen Prednisolongabe von 60 mg auf 5 mg erlaubten<sup>190</sup>. Klinisch zeigte sich eine verbesserte Lungenfunktion, eine Gewichtszunahme in den Normbereich sowie eine Reduktion muskuloskelettaler Schmerzen<sup>190</sup>. Der zweite Patient, mit einer Grad IV aGVHD, erhielt insgesamt drei nT<sub>reg</sub>-Infusionen mit einer Gesamtzellzahl von 3 x 10<sup>6</sup> / kg<sup>190</sup>. Diese konnten den Zustand des Patienten kurzzeitig verbessern, er verstarb jedoch 19 Tage nach der letzten Zellapplikation an einem Multiorganversagen<sup>190</sup>. Theil *et al.* behandelten fünf cGVHD-Patienten mit 0.5 – 4.5 x 10<sup>6</sup> / kg polyklonalen, *ex vivo* expandierten nT<sub>reg</sub>S<sup>191</sup>. Eine klinische Verbesserung der cGVHD-Symptomatik konnte in 2/5 und eine Reduktion der immunsuppressiven Medikation in 3/5 Patienten erzielt werden<sup>191</sup>. Hinweise auf Toxizität oder akute unerwünschte immunologische Reaktionen wurden nicht beobachtet<sup>191</sup>. Nach einem durchschnittlichen Follow-Up von 19 Monaten waren jedoch 2/5 Patienten verstorben und 2/5 (davon einer unter den Verstorbenen) an einem kutanen Malignom (ein Plattenepithelkarzinom und ein malignes Melanom) erkrankt<sup>191</sup>. Auch entwickelten 4/5 Patienten im Verlauf eine Sepsis (10 Wochen, 8 Monate bzw. 10 Monate nach nT<sub>reg</sub>-ACT), wobei nicht abschließend beurteilt werden konnte, inwiefern dies durch die cGVHD-Erkrankung, die immunsuppressive Medikation oder den nT<sub>reg</sub>-ACT begünstigt wurde<sup>191</sup>.

In Zusammenschau dieser klinischen Daten ergibt sich eine positive Bewertung und Risiko-Nutzen-Abwägung von nT<sub>reg</sub>-ACTs in der Prävention und Therapie der GVHD. Dies steht im Einklang mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten. Ähnlich wie bei Trzonkowski *et al.* und Theil *et al.* zeigten die beiden Patienten nach nT<sub>reg</sub>-ACT entweder eine vorübergehende klinische Stabilisierung (Patient 2) oder eine signifikante Besserung der cGVHD (Patient 1). Letztere konnte auch in Form einer Fotodokumentation veranschaulicht werden, die die Verbesserung des Hautstatus im zeitlichen Verlauf darstellt. Die Eltern von Patient 1 berichteten ferner über eine erleichterte Nahrungsaufnahme, weniger Schmerzen und eine gesteigerte Leistungsfähigkeit. Altersentsprechende Alltagsaktivitäten waren dem Patienten wieder möglich, was auch das psychische Wohlbefinden verbesserte.

Die bereits veröffentlichten Daten der nT<sub>reg</sub>-behandelten cGVHD-Patienten berichteten von einer Reduktion der immunsuppressiven Medikation bei insgesamt 4/6 Patienten<sup>190,191</sup>. Auch für Patient 1 konnte die tägliche Prednisolondosis von 10mg (= 0.45 mg/kg) auf 5 mg (= 0.22 mg/kg) reduziert werden und erreichte damit ein Niveau unterhalb der Cushing-Schwelle.

In Übereinstimmung mit den publizierten Daten von Theil *et al.* und Trzonkowski *et al.* zeigte keines der beiden Kinder während oder nach der nT<sub>reg</sub>-Infusion Zeichen einer Anaphylaxie oder akuten Toxizität<sup>190,191</sup>. In Woche 16 nach nT<sub>reg</sub>-ACT wurde der Patient 1 jedoch unter dem Verdacht einer beginnenden bakteriellen Infektion stationär aufgenommen. Unter antibiotischer Therapie kam es zu einer klinischen Besserung und der Patient konnte nach fünf Tagen entlassen werden. Tatsächlich zeigten die immunologischen Begleituntersuchungen zeitgleich zu dem vermuteten Infekt in Woche 16 einen Anstieg der Lymphozytenzahl, was darauf hindeutet, dass keine nT<sub>reg</sub>-vermittelte Übersuppression des Immunsystems vorlag. Weitere unerwünschte Ereignisse, intensivpflichtige stationäre Aufenthalte, wie bei Theil *et al.* beschriebene Sepsis-Perioden oder andere klinische Zeichen einer erhöhten Infektsukzeptibilität traten nicht auf. Patient 2 verstarb 35 Tage nach nT<sub>reg</sub>-ACT. Als Todesursache wurde die Exazerbation einer bereits vor dem Zelltransfer bestehenden pulmonalen Aspergillose vermutet. Aufgrund der immunmodulierenden Wirkung von nT<sub>reg</sub>s kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der nT<sub>reg</sub>-ACT zu dieser Entwicklung beitrug. Somit besteht ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Tod von Patient 2 und der nT<sub>reg</sub>-Applikation, ob ein kausaler Zusammenhang vorliegt, bleibt jedoch unklar. Zu betonen ist an dieser Stelle, dass auch bei Di Ianni *et al.* vier Patienten nach nT<sub>reg</sub>-ACT an Aspergillus-Infektionen verstarben. Diese erhielten jedoch nT<sub>reg</sub>s in einem präventiven Ansatz und zeitgleich zu einer haploidentischen HSCT. Die immunologische Überwachung von Patient 2 zeigte, wie auch bei Patient 1, keine quantitative Beeinträchtigung der Zellen der angeborenen Immunität nach nT<sub>reg</sub>-ACT. Auch Anzeichen eines Zytokinsturms als Folge des Zelltransfers wurden bei keinem der beiden Patienten beobachtet. Das CRP zeigte bei Patient 2 zwei Wochen nach nT<sub>reg</sub>-ACT einen progredienten Anstieg, bei Patient 1 war es hingegen (bis auf 2 Werte) stets normwertig. Die labormedizinische Bestimmung von Transaminasen und Retentionsparametern ergab keine Anzeichen von Leber- oder Nierentoxizität durch den nT<sub>reg</sub>-ACT. Zwar war bei Patient 2 ein Anstieg des Kreatinins zu beobachten, dieser litt aber bereits vor nT<sub>reg</sub>-ACT an einer chronisch progredienten Niereninsuffizienz. Kutane Melanome, wie sie in 2/5 Patienten bei Theil *et al.* auftraten, wurden nicht beobachtet<sup>191</sup>.

Bisher wurden somit 8 Patienten, die an einer chronischen GVHD litten, mit nT<sub>reg</sub>s behandelt (1 Patient von Trzonkowski *et al.*, 5 von Theil *et al.* und die 2 hier beschriebenen Patienten). Die Zusammenschau dieser Daten zeigt, dass bei 4/8 (50%) eine (vorrübergehende) Stabilisierung der Erkrankung, bei 4/8 (50%) eine deutliche Symptombesserung und bei 5/8 (63%) eine Reduktion der immunsuppressiven Medikation erzielt werden konnte. Der adoptive Zelltransfer von nT<sub>reg</sub>s war gut verträglich und eine sichere nT<sub>reg</sub>-Applikation in einer Dosierung von  $3 \times 10^6$  Zellen / kg möglich. Dies unterstützt die grundlegenden Ergebnisse anderer Studien, die auch für Zelldosierungen bis  $100 \text{ nT}_{\text{reg}} \text{ s} / \text{kg}$  ein vertretbares Sicherheitsprofil

beschrieben<sup>191,192,236</sup>. Auch wenn aufgrund der bisher unzureichenden Datenlage keine abschließende Beurteilung der Arzneimittelsicherheit möglich ist, konnten die Ergebnisse den Nutzen von nT<sub>reg</sub>-ACTs in der Therapie der cGVHD weiter festigen. Da konventionelle GVHD-Therapien nicht ausreichend effektiv und mit schweren Nebenwirkungen verbunden sind, ist das bisher günstiger erscheinende Risiko-Nutzen-Verhältnis von nT<sub>reg</sub>-ACTs zudem hervorzuheben.

#### 4.4. Immunologische Effekte von nT<sub>reg</sub>-ACTs bei cGVHD-Patienten

In den vergangenen Jahren hat es große Fortschritte in dem pathophysiologischen Verständnis der cGVHD gegeben<sup>284,285</sup>. Präklinische und klinische Studien konnten zeigen, dass verschiedene Zelltypen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems an der Krankheitsentstehung beteiligt sind und bildeten damit die Grundlage für neue therapeutische Interventionsmöglichkeiten<sup>284,285</sup>. Im Folgenden werden unsere immunologischen Ergebnisse nach nT<sub>reg</sub>-ACT im Hinblick auf neuste Erkenntnisse der cGVHD-Entstehung eingeordnet.

##### 4.4.1. Veränderungen des angeborenen Immunsystems

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind vor allem für die initiale Krankheitsentstehung und cGVHD-bedingten Fibroseprozesse entscheidend<sup>284</sup>. Konditionierungs- und aGVHD-bedingte Gewebeschäden führen zu Zelluntergang und konsekutiv zur Freisetzung von sogenannten DAMPS (*Damage-associated molecular patterns*), die bei Monozyten und DCs die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine induzieren<sup>284</sup>. Weng *et al.* zeigten, dass die Aktivierung des Oberflächenrezeptors TLR-4 (z. B. durch DAMPs) maßgeblich an der Entstehung kutaner cGVHD-Manifestationen beteiligt ist<sup>286</sup>. TLR-4 bewirkt über den NF-κB-Signalweg unter anderem die Freisetzung von IL-6 und ICAM-1, welche wiederum die Aktivierung von T-Zellen und eine gesteigerte Gewebemigration von Leukozyten hervorrufen<sup>286</sup>. Zudem sezernieren aktivierte Makrophagen MMPs (Matrixmetalloproteinasen), TGFβ und PDGF - Faktoren, die Fibroblasten stimulieren, eine gesteigerte Bildung von Extrazellulärmatrix bewirken und somit zu den fibrotischen Prozessen der cGVHD beitragen<sup>284,287</sup>. Schwab *et al.* beschrieben erstmalig die Bedeutung von neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung der aGVHD<sup>165</sup>. Auch hier führten konditionierungsbedingte Schäden der Darmmukosa zu einer periintestinalen Bakterienansammlung und damit verbundenen Rekrutierung von Neutrophilen<sup>165</sup>. Durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*ROS, reactive oxygen species*) bewirkten die Granulozyten eine Freisetzung von DAMPs und sekundär die Aktivierung von T-Zellen<sup>165</sup>. Damit tragen auch neutrophile Granulozyten indirekt zur Pathogenese der cGVHD bei. Für NK-Zellen konnten Kheav *et al.* dagegen einen protektiven Effekt nachweisen; die frühe

NK-Zellrekonstitution nach HSCT ging mit einem niedrigeren cGVHD-Risiko einher, was vermutlich auf eine NK-Zell-abhängige Inhibition alloreaktiver T-Zellen zurückzuführen ist<sup>288</sup>.

Dendritische Zellen (DCs) stellen eine weitere Zellpopulation dar, der eine Bedeutung in der cGVHD-Entstehung zukommt<sup>289</sup>. Als wichtigste APCs werden sie vorrangig mit Funktionen im Bereich der T-Zell-Stimulation und Immunaktivierung in Zusammenhang gebracht. Allerdings weiß man heute, dass DCs auch tolerogene Eigenschaften besitzen<sup>290,291</sup>. Mahnke *et al.* zeigten im Mausmodell, dass immature, tolerogene DCs bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Expression von CD25 und CTLA-4 hochregulieren und damit eine Induktion von iT<sub>reg</sub>s hervorrufen<sup>292</sup>. Im Rahmen einer synergistischen, bidirektionalen Kommunikation wirken T<sub>reg</sub>s wiederum auf DCs; sie inhibieren antigenpräsentierende Funktionen, hemmen die Reifung von mDCs, induzieren die Produktion von IL-10 und stärken damit ihren tolerogenen Phänotyp<sup>293,294</sup>. Interessanterweise zeigten zahlreiche Studien, dass die immunmodulierende Wirkung von Glukokortikoiden unter anderem auf dieser DC-T<sub>reg</sub>-Sequenz beruht<sup>295-297</sup>. Die Behandlung mit Dexamethason führt *in vitro* sowie *in vivo* nicht nur zu einer verminderten DC-Aktivität und -Reifung, sondern zudem zu einer Induktion von T<sub>reg</sub>s<sup>295,296,298</sup>. Eine Studie von Prado *et al.* zeigte jedoch, dass Dexamethason zwar eine erhöhte FoxP3-Expression bewirkt, diese jedoch nicht mit einer Zunahme der suppressiven Eigenschaften einhergeht<sup>299</sup>. Der adoptive Transfer von nT<sub>reg</sub>s stellt dagegen einen Ansatz dar, der eine Steigerung der regulatorischen Funktionen von DCs und nT<sub>reg</sub>s bewirken könnte.

Die Ergebnisse der Immunüberwachung von Patient 1 zeigten nach nT<sub>reg</sub>-ACT keine wesentliche quantitative Beeinträchtigung des angeborenen Immunsystems, auch trat keine Häufung schwerer bakterieller Infektionen auf. Die NK-Zellen lagen zum Zeitpunkt des nT<sub>reg</sub> ACTs unterhalb des Referenzbereichs und blieben im Verlauf weitgehend stabil. Dies könnte Ausdruck der cGVHD-Erkrankung sein, da erniedrigte NK-Zellen bei cGVHD-Patienten beschrieben wurden (siehe Abschnitt 1.2.2.2.; Tabelle 3)<sup>186</sup>. Für pDCs wurde eine prozentuale Abnahme beobachtet. Obwohl pDCs intrinsische tolerogene Eigenschaften zugeschrieben werden<sup>289</sup>, zeigten Clark *et al.* erhöhte pDC-Zellzahlen im peripheren Blut von cGVHD-Patienten<sup>300</sup>. Dies könnte die Abnahme der pDCs im Zusammenhang mit einer klinischen Besserung bei Patient 1 erklären. Andere Studien beobachteten jedoch ein erhöhtes aGVHD-Risiko und ein niedrigeres Gesamtüberleben für HSCT-Patienten mit geringen pDC-Zellzahlen, sodass weiterhin Unklarheiten in der Rolle von pDCs bei cGVHD bestehen<sup>289,301</sup>.

Klinisch beobachteten wir bei Patient 1 eine deutliche Verbesserung der Haut mit leicht rückläufigen fibrotischen Veränderungen. Auch die gastrointestinalen cGVHD-Manifestationen besserten sich im zeitlichen Verlauf. Inwiefern diese Veränderungen durch Zellen des

angeborenen Immunsystems bedingt sind und welche Rolle dabei  $nT_{reg}$ s zukommt, bleibt jedoch unklar. Hierfür wären immunologische und histologische Untersuchungen von Haut- und Schleimhautbiopsien nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren.

#### 4.4.2. Veränderungen des adaptiven Immunsystems

Nach einer Phase der akuten Inflammation, die vorwiegend durch Zellen des angeborenen Immunsystems vermittelt wird, kommt es bei der cGVHD zu einer Dysregulation von Zellen des adaptiven Immunsystems<sup>284</sup>. Das Überwiegen proinflammatorischer und die Defizienz regulatorischer Zellen führen zu einer chronischen Entzündungsreaktion, die sich klinisch unter anderem durch Hautveränderungen, chronische Colitis, Bronchiolitis und Malabsorption äußert<sup>284</sup>.

##### 4.4.2.1. Veränderungen des T-Zellkompartiments

T-Zellen spielen eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Gewebeschäden und chronischer Entzündung bei cGVHD<sup>175,183</sup>. Während man früher davon ausging, dass die Erkrankung durch Th2-Zellen ausgelöst wird, weiß man heute, dass auch Th1- und Th17-Zellen sowie CD8+ T-Zellen an der cGVHD-Entstehung beteiligt sind<sup>284</sup>. Brügggen *et al.* zeigten in einer präklinischen Studie, dass kutane cGVHD-Manifestationen vorwiegend durch IL-17- und IL-23-produzierende Th17-Zellen und IFN- $\gamma$ -produzierende Th1- und CD8+ T-Zellen verursacht werden<sup>181</sup>. Interessanterweise beobachteten Chen *et al.* im Mausmodell, dass die Induktion von Th1- und Th17-Zellen auf einem  $nT_{reg}$ -Mangel beruht und die Applikation von  $nT_{reg}$ s eine Reduktion IFN- $\gamma$ - und IL-17-produzierender CD4+ T-Zellen bewirkt<sup>302</sup>.

Einen weiteren Pathomechanismus stellt die Entstehung alloreaktiver CD4+ T-Zellen aufgrund von gestörter zentraler und/oder peripherer Toleranz dar. Durch die Zerstörung von Thymusgewebe und mTECs (*Medullary thymic epithelial cells*) kommt es zu einer fehlerhaften negativen Selektion und dadurch zur Entstehung aberranter CD4+ T-Zellen<sup>303</sup>. Diese führen wiederum zu weiterer Thymusschädigung und ferner zu Thymus-unabhängigen Mechanismen der cGVHD-Entstehung (z. B. Induktion von Autoantikörperbildung)<sup>303</sup>. Weitere Erkenntnisse lieferten Alho *et al.*, indem sie zeigten, dass vor allem naive und zentrale Gedächtnis-T-Zellen - d.h. weitgehend undifferenzierte T-Zellen - nach HSCT überwiegen und mit einer erhöhten cGVHD-Inzidenz assoziiert sind<sup>304</sup>. Auch Distler *et al.* zeigten vor allem für naive T-Zellen eine erhöhte Alloreaktivität nach HSCT<sup>305</sup>. Auf Grundlage dieser Daten wurden bereits GMP-konforme Protokolle zur Depletion von CD45RA+ T-Zellen aus den Leukapheresat-Produkten von Stammzellspendern entwickelt<sup>306</sup>. Eine erste Phase-II-Studie von Bleakley *et al.* zeigte, dass CD45RA depletierte Stammzelltransplantate mit einem geringeren Auftreten von cGVHD, nicht aber von aGVHD, einhergehen<sup>307</sup>. Interessanterweise kehren sich

die beschriebenen Effekte bei Manifestation der cGVHD um, sodass cGVHD-Patienten erniedrigte Zahlen naiver T-Zellen aufweisen<sup>186,304</sup>. Schließlich zeigten die umfassenden Untersuchungen von Alho *et al.* zur T-Zellrekonstitution nach HSCT, dass die Thymus-abhängige *de novo* Synthese von T-Zellen nach HSCT zugunsten der  $T_{conv}$  verschoben ist, dass kaum naive  $nT_{reg}$ s gebildet werden und dass das geringere  $nT_{reg}/T_{conv}$ -Verhältnis zu einem erhöhten cGVHD-Risiko führt<sup>304</sup>.

Die für die cGVHD charakteristische  $nT_{reg}$ -Defizienz beruht nicht nur auf einem quantitativen Mangel, sondern vor allem auf der Dominanz von Gedächtnis- $nT_{reg}$ s sowie einer erhöhten Apoptosesuszeptibilität der Zellen<sup>284</sup>. Kawano *et al.* beschrieben 2011, dass  $nT_{reg}$ s von cGVHD-Patienten eine niedrigere Telomeraseaktivität sowie eine geringere Expression des antiapoptotischen Proteins BCL-2 aufweisen und daher vermehrt in Apoptose gehen<sup>308</sup>. Matsuoka *et al.* zeigten, dass es nach HSCT zwar zunächst zu einem Anstieg von Gedächtnis- $nT_{reg}$ s kommt, die erhöhte Vulnerabilität gegenüber Fas-FasL-mediierter Apoptoseinduktion jedoch im Verlauf eine Abnahme von Gedächtnis- $nT_{reg}$ s bewirkt<sup>188</sup>. Interessanterweise kam es nur bei Patienten mit prolongierter CD4+ Lymphopenie (< 260 Zellen /  $\mu$ l, 6 Monate nach HSCT) zu einem  $nT_{reg}$ -Abfall, was einen Zusammenhang zwischen verzögerter CD4+  $T_{conv}$ -Rekonstitution und einem proapoptotischem  $nT_{reg}$ -Phänotyp vermuten lässt<sup>188</sup>.

Die immunologischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Effekte von *ex vivo* expandierten, polyklonalen  $nT_{reg}$ s auf das T-Zellkompartiment. Wir konnten erstmalig eine langfristige Zunahme naiver CD4+ und CD8+ T-Zellen nachweisen. Bisher zeigten nur Brunstein *et al.* in einer Studie zur präventiven  $nT_{reg}$ -Applikation ein früheres Engraftment naiver CD4+ Zellen im Vergleich zu HSCT-Patienten ohne  $nT_{reg}$ -ACT<sup>236</sup>. Niedrige Zellzahlen naiver T-Zellen stellen nicht nur einen Biomarker der cGVHD dar (Tabelle 3, Abschnitt 1.2.2.2)<sup>186</sup>, sondern gehen auch mit einer eingeschränkten Abwehr gegenüber unbekanntem Pathogenen einher, sodass der  $nT_{reg}$ -vermittelte Anstieg sowohl einen Rückgang der Krankheitsaktivität als auch eine verbesserte Abwehrfunktion indiziert. Neben der Zunahme naiver CD4+ T-Zellen konnte auch ein allgemeiner Anstieg CD4+ T-Zellen beobachtet werden; 51 Wochen nach  $nT_{reg}$ -ACT erreichte Patient 1 erstmalig normwertige Zahlen CD4+ T-Zellen. Durch den Transfer von  $nT_{reg}$ s kam es somit zu einer Aufhebung der CD4+ Lymphopenie und darüber möglicherweise auch zu einer positiven Beeinflussung der erhöhten Apoptosesuszeptibilität von  $nT_{reg}$ s<sup>188</sup>.

Der Verlauf der  $nT_{reg}$ s zeigte einen deutlichen Anstieg der absoluten Zellzahl nach  $nT_{reg}$ -ACT, jedoch keine prozentuale Zunahme. Dieser Anstieg war zu Beginn auf eine Proliferation von CD45RA- und CD39+  $nT_{reg}$ s zurückzuführen. CD39 wurde als Marker für einen *effector/memory-like*- $nT_{reg}$ -Phänotyp beschrieben und Untersuchungen von Patienten mit Multipler Sklerose zeigten erniedrigte Zellzahlen für CD39+  $nT_{reg}$ s, während die Gesamtzellzahl



von nT<sub>reg</sub>s nicht vermindert war<sup>52,98</sup>. Somit könnte der Anstieg CD39+ nT<sub>reg</sub>s auch für Patient 1 auf eine verminderte Krankheitsaktivität bzw. eine verbesserte Immunregulation hindeuten. Die weitere Untersuchung des nT<sub>reg</sub>-Kompartment ergab einen relativen Abfall der CD127low nT<sub>reg</sub>s. Obwohl eine niedrige CD127 Expression lange als Charakteristikum von nT<sub>reg</sub>s galt, zeigte eine Studie von Simonetta *et al.* dass die Hochregulierung von CD127 mit einer Zunahme der nT<sub>reg</sub>-Aktivität und damit der T<sub>conv</sub>-Suppression einhergeht<sup>60</sup>. Dies könnte darauf hindeuten, dass nT<sub>reg</sub>-ACTs zu einer Steigerung der nT<sub>reg</sub>-Aktivität *in vivo* führen. Schließlich ließ sich nach nT<sub>reg</sub>-ACT eine deutliche Zunahme naiver nT<sub>reg</sub>s beobachten, was mit den Daten von Theil *et al.* übereinstimmt<sup>191</sup>. Dies weist auf die endogene Neusynthese von nT<sub>reg</sub>s hin, da *ex vivo* expandierte nT<sub>reg</sub>s einen CD45RA- Phänotyp besitzen<sup>191</sup>. Der Mangel naiver nT<sub>reg</sub>s stellt ein Merkmal der cGVHD dar<sup>304</sup>. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die Applikation von nT<sub>reg</sub>s *in vivo* eine positive Beeinflussung der cGVHD-bedingten nT<sub>reg</sub>-Defizienz bewirken kann.

Als Maß für die *in vivo* Funktionalität der nT<sub>reg</sub>s bestimmten Theil *et al.* die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 für CD4+ und CD8+ T<sub>conv</sub>. Der überwiegende Teil der Patienten präsentierte eine Abnahme der CD69+ Expression innerhalb der ersten 20 - 60 Tage nach nT<sub>reg</sub>-ACT. Wir bestimmten zur Untersuchung der T-Zellaktivierung die Zahl der zentralen Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen sowie die Expression von HLA-DR und CD57. Die Ergebnisse zeigten einen langfristigen Rückgang der T-Zellaktivierung: CD8+ zentrale Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen fielen auch 12 Monate nach Zelltransfer noch kontinuierlich ab. Die Untersuchung des CD4+ Zellkompartiments ergab nur einen prozentualen Abfall der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (von 50% auf 25%), zusätzlich jedoch eine deutliche Reduktion der prozentualen HLA-DR-Expression, was ebenfalls auf einen Rückgang der CD4+ Zellaktivierung hindeutet. Die Beeinflussung von Th1- und Th17-Zellen durch den nT<sub>reg</sub>-ACT lässt sich nur schwer bewerten, da entsprechende Oberflächenmarker nicht gefärbt wurden. Die Bestimmung von IFN- $\gamma$ , welches von Th1-Zellen produziert wird, kann jedoch als indirekter Marker herangezogen werden und zeigte bei keinem der beiden Patienten Anzeichen einer kurzfristigen Th1-Aktivierung.

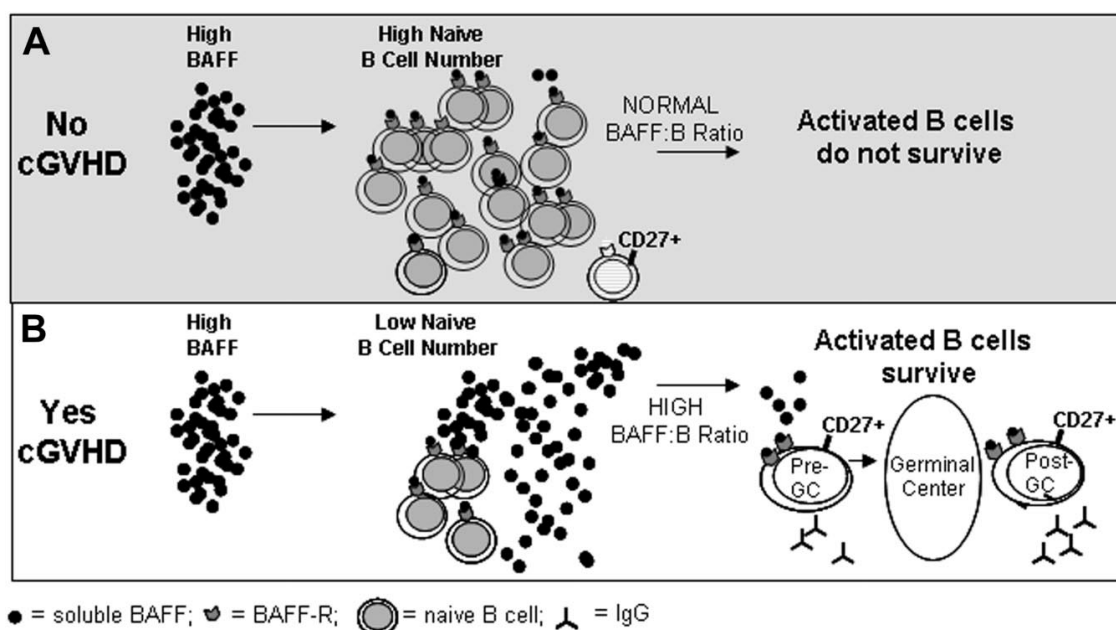
Um weitere Erkenntnisse über die Effekte von nT<sub>reg</sub>-ACTs auf das nT<sub>reg</sub>-Kompartment zu gewinnen, sind Analysen des TCR-Repertoires nötig. Diese könnten beispielsweise Aufschluss darüber geben, ob nT<sub>reg</sub>-ACTs zu Veränderungen der TCR-Diversität führen oder ob nur bestimmte nT<sub>reg</sub>-Klone *in vivo* persistieren. Eine jüngste Studie von Theil *et al.* untersuchte erstmalig das TCR-Repertoire von zwei cGVHD-Patienten nach nT<sub>reg</sub>-ACT und zeigte für einen Patienten ein nahezu unverändertes nT<sub>reg</sub>-TCR-Repertoire, für den anderen Patienten hingegen ein TCR-Repertoire, das stark dem des nT<sub>reg</sub>-Zellprodukts ähnelte<sup>309</sup>. Dies deutet auf individuelle TCR-Veränderungen nach nT<sub>reg</sub>-ACT hin, deren Einflussfaktoren künftig näher

erforscht werden müssen. So könnten TCR-Analysen als sinnvolle Ergänzung in der Immunüberwachung nach nT<sub>reg</sub>-ACT eingesetzt werden.

#### 4.4.2.2. Veränderungen des B-Zellkompartiments

Entgegen der früheren Annahme, die cGVHD wäre eine rein T-Zell-vermittelte Erkrankung, wissen wir heute, dass auch das B-Zellkompartiment einen erheblichen Einfluss auf die Krankheitsentstehung hat<sup>196</sup>.

Ein Merkmal der gestörten B-Zell-Homöostase bei cGVHD ist das Vorliegen eines erhöhten BAFF/B-Zell-Verhältnisses<sup>178</sup>. Dies ist zum einen auf den Mangel naiver B-Zellen und zum anderen auf hohe BAFF-Konzentrationen bei Patienten mit cGVHD zurückzuführen (Abbildung 26)<sup>178</sup>. Sarantopoulos *et al.* zeigten, dass bei cGVHD-Patienten eine Dominanz CD27+ und damit Antigen-erfahrener B-Zellen vorliegt und vor allem Plasmablasten und IgD<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>CD27+ B-Zellen (=Pre-germinal center B cells) mit erhöhten BAFF-Konzentrationen korrelieren<sup>178</sup>.



#### Abbildung 26. Entstehung alloreaktiver B-Zellen bei cGVHD.

Nach HSCT kommt es *in vivo* zu erhöhten BAFF-Konzentrationen. Liegen gleichzeitig hohe Zellzahlen naiver B-Zellen vor, ist das BAFF/B-Zell-Verhältnis regelrecht und auto- oder alloreaktive B-Zellen erhalten kein Überlebenssignal. Ist die Zellzahl naiver B-Zellen jedoch verringert, kommt es zu einem erhöhten BAFF/B-Zell-Verhältnis und Auto- bzw. Alloantikörper werden gebildet. Aus Sarantopoulos, Stevenson und Kim *et al.* (2009)<sup>178</sup>.

Hohe BAFF-Spiegel bzw. ein erhöhtes BAFF/B-Zell-Verhältnis schützen alloreaktive B-Zellen vor dem Zelltod durch negative Selektion<sup>178</sup>. Dass Alloantikörper-bildende B-Zellen zu der Pathogenese der cGVHD beitragen, zeigten Miklos *et al.*, indem sie bei männlichen

Empfängern von Stammzellpräparaten weiblicher Spender H-Y-Antikörper nachwiesen, die sich gegen das DBY-Epitop des Y-Chromosoms richteten<sup>310</sup>. Zudem beobachteten Hua Jin *et al.* in einer jüngsten Studie, dass genveränderte Mäuse, die keine Antikörper sezernieren, nur transiente cGVHD-Symptome mit geringer Thymusschädigung und verringerter kutaner Th17-Infiltration zeigten<sup>179</sup>. Dies lässt schlussfolgern, dass B-Zellen - zusammen mit einem Mangel an nT<sub>reg</sub>S<sup>302</sup> - maßgeblich zu den Th17-vermittelten cGVHD-Manifestationen der Haut beitragen.

Ein weiteres Merkmal der B-Zell-Dyshomöostase ist ein Mangel an B<sub>reg</sub>S<sup>311</sup>. B<sub>reg</sub>S sind IL-10 produzierende B-Zellen, die *in vitro* in der Lage sind, die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T<sub>conv</sub> zu inhibieren<sup>312</sup>. De Masson *et al.* konnten nachweisen, dass cGVHD-Patienten verringerte Zellzahlen IL-10-produzierender Plasmablasten und CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur für das T-Zellkompartiment, sondern auch für B-Zellen, ein Ungleichgewicht zwischen proinflammatorischen und regulatorischen Zelltypen vorliegt.

Nach nT<sub>reg</sub>-ACT beobachteten wir bei Patient 1 einen deutlichen Anstieg der Gesamt-B-Zellzahl, der vor allem auf eine Expansion naiver B-Zellen zurückzuführen war. Dies impliziert zum einen, dass die Applikation von nT<sub>reg</sub>S die humorale Immunantwort gegenüber unbekanntem Antigenen positiv beeinflusst. Zum anderen senkt der Anstieg naiver B-Zellen das BAFF/B-Zell-Verhältnis und induziert damit ein Milieu, in dem alloreaktive B-Zellen weniger Überlebenssignale erhalten. Dies könnte somit ein Mechanismus sein, über den nT<sub>reg</sub>S zu der Wiederherstellung einer adäquaten B-Zell-Homöostase beitragen.

In Bezug auf Antigen-erfahrene (CD27<sup>+</sup>) B-Zell-Subpopulation konnten wir vor allem eine deutliche prozentuale Abnahme der Klassen-gewechselten B-Zellen feststellen. Da die Dominanz CD27<sup>+</sup> B-Zellen ein Charakteristikum der cGVHD darstellt, kann eine Abnahme dieser Zellen möglicherweise als positive Krankheitsbeeinflussung gewertet werden. Gegen diese Interpretation spricht jedoch, dass die Plasmablasten, die bei aktiver cGVHD typischerweise erhöht vorliegen<sup>186</sup>, nach nT<sub>reg</sub>-ACT einen leichten Anstieg zeigten.

#### **4.5. Ausblick: Zukünftige Anwendung von nT<sub>reg</sub>-ACTs**

Die Beleuchtung der immunologischen Veränderungen nach nT<sub>reg</sub>-ACT zeigt, dass die beschriebenen klinischen Effekte mit der Zunahme bzw. dem Abfall spezifischer Immunzellen einhergehen. Ferner zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch etablierte Herstellungsprotokolle qualitativ hochwertige nT<sub>reg</sub>-Zellprodukte generiert werden können, die sich in der klinischen Anwendung als wirksam und sicher erweisen. Daher ist die Durchführung randomisierter kontrollierter Studien gerechtfertigt und notwendig, um die Effektivität und

Sicherheit von nT<sub>reg</sub>-ACTs weiter zu untersuchen und sie künftig als evidenzbasierte Behandlungsoption bei (pädiatrischer) cGVHD und anderen Erkrankungen anbieten zu können.

Um nT<sub>reg</sub>s einem breiten Patientenkollektiv zur Verfügung stellen zu können, müssen jedoch neue Herausforderungen überwunden werden. Hierbei stehen vor allem die Optimierung der Zellherstellung, der Zelllagerung, der Zellapplikation und der Zelldetektion *in vivo* im Vordergrund.

Das in dieser Arbeit angewandte Herstellungsprotokoll ist für die breite klinische Anwendung polyklonaler nT<sub>reg</sub>-Zellprodukte geeignet. Dennoch muss weitere Forschungsarbeit geleistet werden, um neue spezifische nT<sub>reg</sub>-Marker zu identifizieren und die klare Abgrenzung zu iT<sub>reg</sub>s und T<sub>conv</sub> zu erleichtern. Die Entwicklung und klinische Evaluation von GMP-konformen FACS-Geräten könnte außerdem die gezielte Selektion spezifischer nT<sub>reg</sub>-Populationen ermöglichen<sup>279</sup>.

Durch längerfristige Lagerung von nT<sub>reg</sub>s könnten die Zellprodukte flexibler angewendet werden und wiederholte Zellapplikationen wären möglich. Aktuell bestehen verschiedene Protokolle zur Kryokonservierung, die mit unterschiedlichem Erfolg eingesetzt werden<sup>245,250</sup>. Fest steht, dass die derzeitigen Kenntnisse über die Effekte der Kryokonservierung auf nT<sub>reg</sub>s limitiert sind und daher künftige Studien benötigt werden, um die Methoden zur Lagerung von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten näher zu untersuchen<sup>249</sup>.

Für die Optimierung der Zellapplikation stellt sich vordergründig die Frage, wann die nT<sub>reg</sub>-Gabe nach allo-HSCT (oder SOT) erfolgen soll. Diese Arbeit behandelt den therapeutischen Einsatz von nT<sub>reg</sub>-ACTs bei cGVHD-Patienten. Langfristig wäre die Verhinderung einer Krankheitsentstehung durch prophylaktische nT<sub>reg</sub>-Applikation erstrebenswert. Di Ianni *et al.* und Brunstein *et al.* konnten bereits vielversprechende Daten für die präventive Anwendung von nT<sub>reg</sub>s liefern<sup>192,195</sup>. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zudem erstmalig die Isolation von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten aus dem Blut G-CSF mobilisierter Stammzellspender unter GMP-Bedingungen, wodurch eine nT<sub>reg</sub>-Applikation innerhalb des Engraftment-Zeitraums erfolgen könnte. Auf Grundlage dieser Daten müssen nun standardisierte Protokolle zur präventiven nT<sub>reg</sub>-Applikation entwickelt werden.

Schließlich, um künftig die Effekte von nT<sub>reg</sub>-ACTs nachhaltiger untersuchen zu können, müssen nicht-invasive und sichere Möglichkeiten zur Detektion und *in vivo* Überwachung infundierter nT<sub>reg</sub>s entwickelt werden. Erste Ansätze wurden bereits von Bluestone *et al.* beschrieben, die Typ I Diabetes Patienten mit Glucose-markierten nT<sub>reg</sub>s behandelten<sup>313</sup>. Auch die *in vivo* Darstellung von nT<sub>reg</sub>s über Multiphotonenmikroskope findet bereits einige Anwendung<sup>314</sup>.

In der Zukunft sind somit weitere Forschungsaufgaben zu bewältigen, um den Eingang von nT<sub>reg</sub>s in die klinische Praxis zu ermöglichen. Fortlaufende Studien werden zusätzlich neue Erkenntnisse liefern, um die Wirksamkeit und Sicherheit von nT<sub>reg</sub>-Zellprodukten nachhaltiger beurteilen zu können. Da zahlreiche Krankheitsbilder durch allo- und autoreaktive Pathomechanismen vermittelt werden, könnte die erfolgreiche Anwendung von nT<sub>reg</sub>s im klinischen Alltag einen großen Benefit bringen.

---

**Literaturverzeichnis**

1. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):3-23.
2. Medzhitov R and Janeway C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000;173:89-97.
3. Sperandio B, Fischer N, and Sansonetti PJ. Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies. *Semin Immunol.* 2015;27(2):111-118.
4. Dempsey PW, Vaidya SA, and Cheng G. The Art of War: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:2604-2621.
5. Aderem A and Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:593-623.
6. Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, and Hermann M. New insights into Neutrophil extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in inflammation. *Front Immunol.* 2016;7(302):1-8.
7. Chaplin DD. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(2):430-435.
8. Janeway CA. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.* 2001;3:1167-1171.
9. Moser M and Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine.* 2010;28S:2-13.
10. Nikolich-Zugich J, Slifka MK, and Messaoudi I. T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:123-132.
11. Glanville J, Zhai W, Berka J, Telman D, Huerta G, Mehta G, Ni I, Mei L, Sundar PD, Day GM, Cox D, Rajpal A, and Pons J. Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(48):20216–20221.
12. Shinnakasu R and Kurosaki T. Regulation of memory B and plasma cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2017;45:126-131.
13. Pieper K, Grimbacher B, and Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):959-971.
14. Purnama C, Camous X, and Larbi A. An Overview of T Cell Subsets and Their Potential Use as Markers of Immunological Ageing. *Int Trends Immun.* 2013;1(4):21-32.
15. Gascoigne NRJ, Rybakin V, Acuto O, and Brzostek J. TCR Signal Strength and T Cell Development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2016;32:327-348.
16. Breed ER, Lee ST, and Hogquist KA. Directing T cell fate: How thymic antigen presentation cells coordinate thymocyte selection. *Semin Cell Dev Biol.* 2017:1-9.
17. Neefjes J, Jongasma MLM, Paul P, and Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(12):823-836.
18. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Najj A, and

- Caton AJ. Thymic selection of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2001;2(4):301-306.
19. Ohkura N, Kitagawa Y, and Sakaguchi S. Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity*. 2013;38(3):414-423.
  20. Chen L and Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(April):227-242.
  21. Mosmann TR and Coffmann RL. TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-173.
  22. Hirahara K and Nakayama T. CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in inflammatory diseases : beyond the Th1 / Th2 paradigm. *Int Immunol*. 2016;28(4):163-171.
  23. Belge K, Brück J, and Ghoreschi K. Advances in treating psoriasis. *F1000 Prime Reports*. 2014;6(4).
  24. Vignali DAA, Collison LW, and Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523-532.
  25. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, and Lieberhaber SA. Suppressor T Cells. *J Immunol*. 1972;108(3):586-590.
  26. Nishizuka Y and Sakakura T. Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice. *Science*. 1969;166(3906):753-755.
  27. Ramsdell F and Ziegler SF. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(5):343-349.
  28. Bennett CL, Yoshioka R, Kiyosawa H, Barker DF, Fain PR, Shigeoka AO, and Chance PF. X-Linked Syndrome of Polyendocrinopathy, Immune Dysfunction, and Diarrhea Maps to Xp11.23-Xq13.3. *Am J Hum Genet*. 2000;66:461-468.
  29. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT CP& OH. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet Vol*. 2001;27:20–21.
  30. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko S-A., Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF RF. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001;27:68–73.
  31. Ziegler SF. FOXP3 : Of Mice and Men. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:209-226.
  32. Powel BR, Buist NR SP. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr*. 1982;100(5):731-737.
  33. Barzaghi F, Amaya C, Neven B, Ricci S, Kucuk ZY, Bleesing JJ, Nademi Z, Slatter A, Ulloa ER, Shcherbina A, Roppelt A, Worth A, Silva J, Aiuti A, Murguía-favela L, Speckmann C, Carneiro-sampaio M, Schulz A, Steinmann S et al. Long-term follow-up of IPEX syndrome patients after different therapeutic strategies: An international multicenter retrospective study. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(3):1036-1049.
  34. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, and Toda M. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor alpha-Chains (CD25). *J*

- Immunol.* 1995;155:1151-1164.
35. Thornton A and Shevach E. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J Exp Med.* 1998;188(2):287-296.
  36. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, and Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by suppressive T cells : induction of autoimmune disease by breaking their anergic / suppressive state. *Int Immunol.* 1998;10(12):1969-1980.
  37. Fontenot JD, Gavin MA, and Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-336.
  38. Khattri R, Cox T, Yasayko S, and Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):337-342.
  39. Rodríguez-Perea AL, Arcia ED, Rueda CM, and Velilla PA. Phenotypic characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clin Exp Immunol.* 2016;(52):1-20.
  40. Schmetterer KG, Neunkirchner A, and Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J.* 2012;26(6):2253-2276.
  41. Schwartz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol.* 2005;6(4):327-330.
  42. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DAA, and Ziegler SF. Regulatory T cells : recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Publ Gr.* 2013;14(4):307-308.
  43. Bluestone JA and Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:253-257.
  44. Caramalho Í, Nunes-Cabaço H, Foxall RB, and Sousa AE. Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. *Front Immunol.* 2015;6:1-7.
  45. Laakso SM, Laurinolli T, Rossi LH, Lehtoviita A, Sairanen H, Perheentupa J, Kekäläinen E, and Arstila TP. Regulatory T cell defect in APECED patients is associated with loss of naive FOXP3(+) precursors and impaired activated population. *J Autoimmun.* 2010;35:351-357.
  46. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, and Huehn J. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007;5(2):169-178.
  47. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, and Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* 2016;37(11):803-811.
  48. Shevach EM and Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev.* 2014;259:88-102.
  49. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A, Cells RT, and Barrat FJ. IL-10-Secreting Regulatory T Cells Do Not Express Foxp3 but Have Comparable Regulatory Function to Naturally Occurring CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2004;172:5986-5993.



50. Lafaille MAC De and Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells : More of the Same or a Division of Labor ? *Immunity*. 2009;30:626-635.
51. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, and Byrne MC. CD4+ CD25+ Immunoregulatory T Cells : Gene Expression Analysis Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor. *Immunity*. 2002;16:311-323.
52. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Mitri D Di, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Ho S, Centonze D, Bernardi G, Luisa M, Acqua D, Rossini PM, Battistini L, Ro O, and Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells : hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225-1233.
53. Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Nocentini G, Ayroldi E, and Riccardi C. GITR , a member of the TNF receptor superfamily , is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol*. 2004;34:613-622.
54. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort E, Huizinga TWJ, and Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):129-138.
55. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas B, Groth DS, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, and Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 + T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701-1711.
56. Lin X, Chen M, Liu Y, Guo Z, He Dr. X, Brand D, and Zheng Dr. SG. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3+ regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(2):116-123.
57. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Türbachova I, Hamann A, Olek S, and Huehn J. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3 + conventional T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37:2378-2389.
58. Hori S, Nomura T, and Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*. 2003;229:1057-1061.
59. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, and Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500.
60. Simonetta F, Chiali A, Cordier C, Urrutia A, Girault I, Tanchot C, and Bourgeois C. Increased CD127 expression on activated FOXP3 1 CD4 1 regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2010;40:2528-2538.
61. Schoenbrunn A, Frensch M, Kohler S, Keye J, Dooms H, Moewes B, Dong J, Loddenkemper C, Sieper J, Wu P, Romagnani C, Matzmohr N, and Thiel A. A converse 4-1BB and CD40 ligand expression pattern delineates activated regulatory T cells (Treg) and conventional T cells enabling direct isolation of alloantigen-reactive natural Foxp3+ Treg. *J Immunol*. 2012;189(12):5985-5994.
62. Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, and Zhao Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell Mol Immunol*. 2006;3(3):189-195.
63. Tai X, Laethem V, Pobezinsky L, Guintert T, Sharrow SO, Adams A, Granger L, Kruhlak M, Lindsten T, Thompson CB, Feigenbaum L, and Singer A. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4+ T cells. *Blood*. 2012;119(22):5155-5164.

64. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, Boehmer H Von, Buer J, and Hansen W. Neuropilin-1 : a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2004;34:623-630.
65. Milpied P, Renand A, Bruneau J, Mendes-Da-Cruz DA, Jacquelin S, Asnafi V, Rubio M-T, Macintyre E, Lepelletier Y, and Hermine O. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol*. 2009;39:1466-1471.
66. Szurek E, Cebula A, Wojciech L, Pietrzak M, Rempala G, Kisielow P, and Ignatowicz L. Differences in Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4+ FoxP3+ Regulatory T Cells. *PLoS One*. 2015:1-16.
67. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, and Ley TJ. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity*. 2007;27:635-646.
68. Huang C, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, and Vignali DAA. Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity*. 2004;21:503-513.
69. Garín MI, Chu C, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, and Lechler RI. Galectin-1 : a key effector of regulation mediated by CD4+ CD25+ T cells. *Blood*. 2007;109(5):2058-2066.
70. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, and Shevach EM. Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3 + T Regulatory Cells. *J Immunol*. 2010;184:3433-3441.
71. Löhning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A, Hamelmann E, and Kroczek RA. Expression of ICOS In Vivo Defines CD4+ Effector T Cells with High Inflammatory Potential and a Strong Bias for Secretion of Interleukin 10. *J Exp Med J Exp Med*. 2003;197(2):181-193.
72. Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, and Thomson AW. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol*. 2006;176(5):2808-2816.
73. Parry R V, Chemnitz JM, Frauwirth K a, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi S V, Linsley PS, Thompson CB, and Riley L. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9543-9553.
74. Probst-Kepper M, Geffers R, Kröger A, Viegas N, Erck C, Hecht HJ, Lünsdorf H, Roubin R, Moharreggh-Khiabani D, Wagner K, Ocklenburg F, Jeron A, Garritsen H, Arstila TP, Kekäläinen E, Balling R, Hauser H, Buer J, and Weiss S. GARP: A key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *J Cell Mol Med*. 2009;13:3343-3357.
75. Sun L, Jin H, and Li H. GARP : a surface molecule of regulatory T cells that is involved in the regulatory function and TGF- $\beta$  releasing. *Oncotarget*. 2016;7(27):42826-42836.
76. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Jr WRH, Muller W, and Rudensky AY. Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity*. 2008;28:546-558.
77. Vignali DAA. How many mechanisms do regulatory T cells need? *Eur J Immunol*. 2008;38:908-911.

78. Li Z, Li D, Tsun A, and Li B. FOXP3(+) regulatory T cells and their functional regulation. *Cell Mol Immunol*. 2015;2:1-8.
79. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, and Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4 + CD25 + regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med*. 2005;202(11):1539-1547.
80. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, and Kronenberg M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*. 2009;10(11):1178-1184.
81. Robinson DS. The Role of Regulatory T Lymphocytes in Asthma Pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005;5:136-141.
82. Ostroukhova M, Seguin-devaux C, Oriss TB, Dixon-mccarthy B, Yang L, Ameredes BT, Corcoran TE, and Ray A. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4 + T cells expressing membrane-bound TGF- $\beta$  and FOXP3. *J Clin Invest*. 2004;114(1).
83. Xia Z, Xu L, Zhong W, Wei J-J, Li N-L, Shao J, Li Y-Z, Yu S-C, and Zhang Z-L. Heme Oxygenase-1 Attenuates Ovalbumin-Induced Airway Inflammation by Up-Regulation of Foxp3 Bound Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *Am J Pathol*. 2007;171(6):1904-1914.
84. Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, and Flavell RA. CD4+ CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF- $\beta$  – TGF- $\beta$  receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(19):10878–10883.
85. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, and Shevach EM. CD4+ CD25+ Regulatory T Cells Can Mediate Suppressor Function in the Absence of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Production and Responsiveness. *J Exp Med*. 2002;196(2):237-245.
86. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, and Vignali DAA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(22):566-569.
87. Josefowicz SZ, Lu L, and Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531-564.
88. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, and Rosa SC De. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns , cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol*. 2009;85:88-97.
89. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, and Ley TJ. Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. *Immunity*. 2004;21:589-601.
90. Gondek DC, Lu L, Quezada SA, and Noelle RJ. Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4 + CD25 + Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J Immunol*. 2005;174:1783-1786.
91. Zhao D, Thornton AM, Dipaolo RJ, and Shevach EM. Activated CD4+ CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*. 2006;107(10):3925-3933.
92. Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, and Wang Y. Involvement of cellular death in TRAIL / DR5-dependent suppression induced by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Cell Death Differ*. 2007;14:2076-2084.

93. Nelson BH. IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance. *J Immunol.* 2004;172:3983-3988.
94. Boyman O and Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(3):180-190.
95. De la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, and Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+ CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004;34:2480-2488.
96. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Peter H, and Suri-Payer E. Rapid Suppression of Cytokine Transcription in Human CD4 +CD25- T Cells by CD4+ Foxp3+ Regulatory T Cells: Independence of IL-2 Consumption, TGF-  $\beta$ , and Various Inhibitors of TCR Signaling. *J Immunol.* 2007;179:3578-3587.
97. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, and Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1142-1152.
98. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, and Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1257-1265.
99. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-heßling S, Palmethofer A, Serfl E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, and Schmitt E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell – mediated suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1303-1310.
100. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, and Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 -dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology.* 2006;118:240-249.
101. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre M, and Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1206-1212.
102. Mellor AL and Munn DH. IDO Expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:762-774.
103. Chen W, Liang X, Peterson A, Munn DH, and Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol.* 2008;181(8):5396-5404.
104. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, Tom I, Ivelja S, Refino CJ, Clark H, Eaton D, and Grogan JL. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol.* 2009;10(1):48-57.
105. Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, and Betz AG. Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity.* 2008;28(3):402-413.
106. Alroqi FJ and Chatila TA. T Regulatory Cell Biology in Health and Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016;16(4):27.
107. Azizi G, Pouyani MR, Abolhassani H, Sharifi L, dizaji MZ, Mohammadi J, Mirshafiey A, and Aghamohammadi A. Cellular and molecular mechanisms of immune dysregulation and autoimmunity. *Cell Immunol.* 2016;310:14-26.
108. Verbsky JW CT. Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X- linked

- (IPEX) and IPEX-Related Disorders: an Evolving Web of Heritable Autoimmune Diseases. *Curr Opin Pediatr*. 2013;25(6):708-714.
109. Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, and Roifman CM. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3168-3171.
110. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CJ, Vegoe AL, Hsieh C, Jenkins MK, and Farrar MA. Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T Cell Repertoire. *Immunity*. 2008;28:112-121.
111. Jenks JA, Seki S, Kanai T, Huang J, Morgan AA, Scalco RC, Nath R, Bucayu R, Wit JM, Al-Herz W, Ramadan D, Jorge AA, Bacchetta R, Hwa V, Rosenfeld R, and Nadeau KC. Differentiating the roles of STAT5B and STAT5A in human CD4 + T cells. *Clin Immunol*. 2013;148(2):227-236.
112. Charbonnier LM, Janssen E, Chou J, Ohsumi TK, Keles S, Hsu JT, Massaad MJ, Garcia-Lloret M, Hanna-Wakim R, Dbaibo G, Alangari AA, Alsultan A, Al-Zahrani D, Geha RS, and Chatila TA. Regulatory T-cell deficiency and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like disorder caused by loss-of-function mutations in LRBA. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(1):217-227.
113. Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Julie E, Avery DT, Schickel J, Tran DQ, Stoddard J, Frucht DM, Dumitriu B, Scheinberg P, and Folio LR. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science*. 2015;345(6204):1623-1627.
114. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, Zhang Y, Liu Z, Fritz JM, Marsh R, Husami A, Kissell D, Nortman S, Chaturvedi V, Haines H, Young LR, Mo J, Filipovich AH, Bleesing JJ, Mustillo P, Stephens M, Rueda CM, Chougnet CA, Hoebe K, McElwee JM. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science*. 2015;349(6246):436-440.
115. Fuchs S, Rensing-Ehl A, Speckmann C, Bengsch B, Schmitt-Graeff A, Bondzio I, Maul-Pavicic A, Bass T, Vraetz T, Strahm B, Ankermann T, Benson M, Caliebe A, Folster-Holst R, Kaiser P, Thimme R, Schamel WW, Schwarz K, Feske S et al. Antiviral and Regulatory T Cell Immunity in a Patient with Stromal Interaction Molecule 1 Deficiency. *J Immunol*. 2012;188(3):1523-1533.
116. Mathis D and Benoist C. *Aire*. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):287-312.
117. Kekalainen E, Tuovinen H, Joensuu J, Gylling M, Franssila R, Pontynen N, Talvensaari K, Perheentupa J, Miettinen A, and Arstila TP. A Defect of Regulatory T Cells in Patients with Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy. *J Immunol*. 2007;178(2):1208-1215.
118. Fondane M, Lambert N, Pasquier B, and Deist L. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*. 2006;444(November):110-114.
119. Hsieh WC, Hsu TS, Chang YJ, and Lai MZ. IL-6 receptor blockade corrects defects of XIAP-deficient regulatory T cells. *Nat Commun*. 2018;9(1).
120. Roifman CM, Dadi H, Somech R, Nahum A, and Sharfe N. Characterization of Z-associated protein , 70 kd (ZAP70)- deficient human lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6):1226-1233.e1.
121. Kim JK, Klinger M, Benjamin J, Xiao Y, Erle DJ, Littman DR, and Killeen N. Impact of the TCR Signal on Regulatory T Cell Homeostasis , Function , and Trafficking. *PLoS One*.

- 2009;4(8).
122. Du X, Shi H, Li J, Dong Y, Liang J, Ye J, Kong S, Zhang S, Zhong T, Yuan Z, Xu T, Zhuang Y, Zheng B, Geng J-G, and Tao W. Mst1/Mst2 Regulate Development and Function of Regulatory T Cells through Modulation of Foxo1/Foxo3 Stability in Autoimmune Disease. *J Immunol*. 2014;192(4):1525-1535.
  123. Gomez-Rodriguez J, Wohlfert EA, Handon R, Meylan F, Wu JZ, Anderson SM, Kirby MR, Belkaid Y, and Schwartzberg PL. Itk-mediated integration of T cell receptor and cytokine signaling regulates the balance between Th17 and regulatory T cells. *J Exp Med*. 2014;211(3):529-543.
  124. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, and Jordan MS. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):591-619.
  125. Hauck F, Randriamampita C, Martin E, Gerart S, Lambert N, Lim A, Soulier J, Maciorowski Z, Touzot F, Moshous D, Quartier P, Heritier S, Blanche S, Rieux-Laucat F, Brousse N, Callebaut I, Veillette A, Hivroz C, Fischer A et al. Primary T-cell immunodeficiency with immunodysregulation caused by autosomal recessive LCK deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(5).
  126. Nehme NT, Schmid JP, Debeurme F, and André- I. MST1 mutations in autosomal recessive primary immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. *Blood*. 2012;119(15):3458-3469.
  127. Huang W, Jeong A-R, Kannan AK, Huang L, and August A. IL-2-Inducible T Cell Kinase Tunes T Regulatory Cell Development and Is Required for Suppressive Function. *J Immunol*. 2014;193(5):2267-2272.
  128. Poliani PL, Fontana E, Roifman CM, and Notarangelo LD.  $\zeta$  Chain-associated protein of 70 kDa (ZAP70) deficiency in human subjects is associated with abnormalities of thymic stromal cells: Implications for T-cell tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(2):1-6.
  129. Shaw PJ and Feske S. Regulation of lymphocyte function by ORAI and STIM proteins in infection and autoimmunity. *J Physiol*. 2012;17(February):4157-4167.
  130. Picard C, McCarl C-A, Papolos A, Khalil S, Lüthy K, Hivroz C, Ph D, Ledeist F, Rieux-laucat F, Rechavi G, Rao A, Fischer A, and Feske S. Stim1 Mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N Engl J Med*. 2009;360(19):1971-1980.
  131. Ochs HD, Oukka M, and Torgerson TR. TH17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;123(5):977-983.
  132. Azizi G, Hafezi N, Mohammadi H, Yazdani R, Alinia T, Tavakol M, Aghamohammadi A, and Mirshafiey A. Abnormality of regulatory T cells in common variable immunodeficiency. *Cell Immunol*. 2017;315:11-17.
  133. Verbsky JW and Chatila TA. T-regulatory cells in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011;11:539-544.
  134. Fevang B, Yndestad A, Sandberg WJ, Holm AM, and Müller F. Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2007;147:521-525.
  135. Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, Baz Z, Metin A, Cattaneo F, Villa A, Aiuti A, Battaglia M, Roncarolo M, and Dupré L. WASP regulates suppressor activity natural regulatory T cells. *J Exp Med*. 2007;204(2):369-380.

136. Minegishi Y and Saito M. Molecular mechanisms of the immunological abnormalities in hyper-IgE syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1246(1):34-40.
137. Daikeler T, Hügler T, Farge D, Andolina M, Gualandi F, Baldomero H, Bocelli-Tyndall C, Brune M, Dalle JH, Urban C, Ehninger G, Gibson B, Linder B, Lioure B, Marmont A, Matthes-Martin S, Nachbaur D, Schuetz P, Tyndall A et al. Allogeneic hematopoietic SCT for patients with autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2009;44(1):27-33.
138. Henig I and Zuckerman T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J.* 2014;5(4):1-15.
139. Dean C, Cliff A, Lerner G, Hickman R, Sale E, Sanders JE, and Weiden L. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 1977;49(4):511-534.
140. Majhail NS and Rizzo JD. Surviving the cure: long term follow up of hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(9):1145-1151.
141. Passweg JR, Baldomero H, Peters C, Gaspar HB, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Falkenburg JHF, Farge-Bancel D, Gennery A, Halter J, Kröger N, Lanza F, Marsh J, Mohty M, Sureda A, Velardi A, and Madrigal A. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(6):744-750.
142. Anne L Lennard GJ. Stem cell transplantation. *BMJ.* 2001;175:42-46.
143. Kekre N and Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood.* 2014;124(3):334-343.
144. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, and Anasetti C. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood.* 2007;110(13):4576-4583.
145. Korbling M and Freireich E. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood.* 2011;117(24):6411-6416.
146. Abrams RA, Glaubiger D, Appelbaum FR, and Deisseroth AB. Result of Attempted Hematopoietic Reconstitution Using Isologous Peripheral Blood Mononuclear Cells: A Case Report. *Blood.* 1980;56(3):516-521.
147. Hölig K. G-CSF in healthy allogeneic stem cell donors. *Transfus Med Hemotherapy.* 2013;40(4):225-235.
148. MrCredie KB, Hersh EM, and Freireich EJ. Cells Capable of Colony Formation in the Peripheral Blood of Man. *Science.* 1971;171:293-294.
149. Holtick U, Albrecht M, Chemnitz JM, Theurich S, Shimabukuro-Vornhagen A, Skoetz N, Scheid C, and von Bergwelt-Baildon M. Comparison of bone marrow versus peripheral blood allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in adults—a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;94(2):20141231.
150. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, Chapuis B, Chopra R, Cornelissen JJ, Gale RP, Goldman JM, Jr FRL, Hertenstein B, Klein JP, Zhang M, and Ringde O. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic

- transplantation. *Blood*. 2000;95(12):3702-3709.
151. Chu R, Brazauskas R, Kan F, Bashey A, Bredeson C, Camitta B, Chiang K, Frangoul H, Gale RP, Gee A, George B, Goldman FD, Gross TG, Gupta V, Hale GA, Isola L, Ispizua AU, Lazarus H, Marsh J et al. Comparison of Outcomes after Transplantation of G-CSF – Stimulated Bone Marrow Grafts versus Bone Marrow or Peripheral Blood Grafts from HLA-Matched Sibling Donors for Patients with Severe Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(7):1018-1024.
  152. Gyurkocza B and Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation : one size does not fit all. *Blood*. 2014;124(3):344-353.
  153. Miller KB, Roberts TF, Chan G, Schenkein DP, Lawrence D, Sprague K, Gorgun G, Relias V, Grodman H, Mahajan A, and Foss FM. A novel reduced intensity regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation associated with a reduced incidence graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33(9):881-889.
  154. Bhatia S, Francisco L, Carter A, Sun C, Baker KS, Gurney JG, Mcglave PB, Nademanee A, Donnell MO, Ramsay NKC, Robison LL, Snyder D, Stein A, Forman SJ, and Weisdorf DJ. Late mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation and functional status of long-term survivors : report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Transplantation*. 2018;110(10):3784-3793.
  155. Magenau J, Runaas L, and Reddy P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2016;173(2):190-205.
  156. Jagasia M, Arora M, Flowers MED, Chao NJ, Mccarthy PL, Cutler CS, Urbano-ispizua A, Pavletic SZ, Haagenson MD, Zhang M, Antin JH, Bolwell BJ, Bredeson C, Cahn J, Cairo M, Gale RP, Gupta V, Lee SJ, Litzow M et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012;119(1):296-308.
  157. Jacobsohn DA and Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2(35):1-9.
  158. Blazar BR, Murphy WJ, and Abedi M. Advances in Graft versus host disease biology and Therapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;12(6):443-458.
  159. Couriel D, Caldera H, Champlin R, and Komanduri K. Acute graft-versus-host disease: Pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer*. 2004;101(9):1936-1946.
  160. Hill GR and Ferrara JLM. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease : rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000;95(9):2754-2759.
  161. Boitnott JK, Lee LA, Hallick JP, Torbenson M, Jacobsohn DA, Arai S, Anders V, and Vogelsang GB. Hepatitic variant of graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusion. *Blood*. 2002;100(12):3903-3907.
  162. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann H, Beatty P, Hows JT, and Thomas E. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15(6):825-828.
  163. Ferrara JL, Levy R, and Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs -host disease. *BB MT*. 1999;356:347-356.
  164. Xun BCQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, and Widmer MB. Effect of Total Body Irradiation, Busulfan-Cyclophosphamide, or Cyclophosphamide Conditioning. *Blood*.



- 1994;83(8):2360-2367.
165. Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A, Reichardt W, Karlsson FJ, Radhakrishnan S V, Hanke K, Schmitt-Graeff A, Freudenberg M, von Loewenich FD, Wolf P, Leonhardt F, Baxan N, Pfeifer D, Schmah O, Schönle A et al. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med.* 2014;20(6):648-654.
  166. Marek A, Stern M, Chalandon Y, Ansari M, Ozsahin H, Güngör T, Gerber B, Kühne T, Passweg JR, Gratwohl A, Tichelli A, Seger R, Schanz U, Halter J, and Stussi G. The impact of T-cell depletion techniques on the outcome after haploidentical hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(1):55-61.
  167. Alousi AM, Weisdorf DJ, Logan BR, Bolan J, Carter S, Difronzo N, Pasquini M, Goldstein SC, Ho VT, Hayes-lattin B, Wingard JR, and Horowitz MM. Etanercept , mycophenolate , denileukin , or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease: a randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. *Blood.* 2009;114(3):511-518.
  168. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, Litzow MR, Nieto Y, Savani BN, Schriber JR, Shaughnessy PJ, Wall DA, and Carpenter PA. First- and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(8):1150-1163.
  169. Hilgendorf I, Greinix H, Halter JP, Lawitschka A, Bertz H, and Wolff D. Long-Term Follow-up After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Dtsch Arztebl Int.* 2015;112:51-58.
  170. Mohty B and Mohty M. Long-term complications and side effects after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an update. *Blood Cancer J.* 2011;1(4):1-5.
  171. Mattsson J, Ringdén O, and Storb R. Graft Failure after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(1):165-170.
  172. Socié G and Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2014;124(3):374-384.
  173. Baird K and Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol.* 2006;13:426-435.
  174. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, Palmer J, Weisdorf D, Treister NS, Cheng G, Kerr H, Stratton P, Duarte RF, Mcdonald GB, Inamoto Y, Vigorito A, Arai S, Datile MB, Jacobsohn D et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I . The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(3):389-401.
  175. Min C-K. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease: the unveiling of an enigma. *Korean J Hematol.* 2011;46(2):80-87.
  176. Flowers MED, Parker PM, Johnston LJ, Matos AVB, Storer B, Bensinger WI, Storb R, Appelbaum FR, Forman SJ, Blume KG, and Martin PJ. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood.* 2002;100(2):415-419.
  177. Nishimori H, Maeda Y, and Tanimoto M. Chronic graft-versus-host disease: Disease biology and novel therapeutic strategies. *Acta Med Okayama.* 2013;67(1):1-8.

178. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Cutler CS, Bhuiya NS, Schowalter M, Ho VT, Alyea EP, Koreth J, Blazar BR, Soiffer RJ, Antin JH, and Ritz J. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;113(16):3865-3874.
179. Jin H, Ni X, Deng R, Song Q, Young J, Cassady K, Zhang M, Forman S, Martin PJ, Liu Q, and Zeng D. Antibodies from donor B cells perpetuate cutaneous chronic graft-versus-host disease in mice. *Blood*. 2016;127(18):2249-2261.
180. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Washel WS, Bhuiya NS, Cutler CS, Alyea EP, Ho VT, Soiffer RJ, Antin JH, and Ritz J. Recovery of B-cell homeostasis after rituximab in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2011;117(7):2275-2283.
181. Brügggen MC, Klein I, Greinix H, Bauer W, Kuzmina Z, Rabitsch W, Kalhs P, Petzelbauer P, Knobler R, Stingl G, and Stary G. Diverse T-cell responses characterize the different manifestations of cutaneous graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;123(2):290-300.
182. Ghayur T, Seemayer TA, Xenocostas A, and Lapp WS. Complete sequential regeneration of graft-vs.-host-induced severely dysplastic thymuses. Implications for the pathogenesis of chronic graft-vs.-host disease. *Am J Pathol*. 1988;133(1):39-46.
183. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, and Tanimoto M. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007;109(4):1756-1765.
184. Zhang Y, Hexner E, Frank D, and Emerson SG. CD4+ T Cells Generated De Novo from Donor Hemopoietic Stem Cells Mediate the Evolution from Acute to Chronic Graft-versus-Host Disease. *J Immunol*. 2007;179:3305-3314.
185. Imado T, Iwasaki T, Kataoka Y, Kuroiwa T, Hara H, Fujimoto J, and Sano H. Hepatocyte growth factor preserves graft-versus-leukemia effect and T-cell reconstitution after marrow transplantation. *Blood*. 2004;104(5):1542-1549.
186. Pidala J, Sarwal M, Roedder S, and Lee SJ. Biologic markers of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(3):324-331.
187. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, Bellucci R, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, and Ritz J. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106(8):2903-2911.
188. Matsuoka K, Kim HT, Mcdonough S, Bascug G, Warshauer B, Koreth J, Cutler C, Ho VT, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, and Ritz J. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1479-1493.
189. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, Fietz T, Wolff D, Terpe H, Steiner B, Berg E, Miehke S, Bornha M, Schneider T, Zeitz M, Stein H, Thiel E, Duchmann R, and Uharek L. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood*. 2006;107(4):1717-1723.
190. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszuk A, Krzystyniak A, Marek N, Myśliwska J, and Hellmann A. 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. *Clin Immunol*. 2009;133(1):22-26.
191. Theil A, Tuve S, Oelschlägel U, Maiwald A, Döhler D, Oßmann D, Zenkel A, Wilhelm C, Middeke JM, Shayegi N, Trautmann-Grill K, von Bonin M, Platzbecker U, Ehninger G, Bonifacio E, and Bornhäuser M. Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into

- patients with chronic graft-versus-host disease. *Cytotherapy*. 2015;17(4):473-486.
192. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, Mckenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, Defor T, Levine BL, June CH, Rubinstein P, Mcglave PB, Blazar BR, and Wagner JE. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011;117(3):1061-1070.
  193. Matsuoka K, Koreth J, Kim HT, Bascug G, McDonough S, Kawano Y, Murase K, Cutler C, Ho VT, Alyea EP, Armand P, Blazar BR, Antin JH, Soiffer RJ, and Ritz J. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2013;5(179):1-11.
  194. Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, Nelson C, Tennis NC, Riley JL, June CH, Miller JS, Wagner JE, and Blazar BR. Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. *Am J Transplant*. 2011;11(6):1148-1157.
  195. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Del Papa B, Zei T, Iacucci Ostini R, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 2011;117(14):3921-3928.
  196. Sarantopoulos S and Ritz J. Aberrant B-cell homeostasis in chronic GVHD. *Blood*. 2015;125(11):1703-1707.
  197. Rozmus J and Schultz KR. Biomarkers in chronic graft-versus-host disease. *Expert Rev Hematol*. 2011;4(3):329-342.
  198. Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, Cooke KR, Lathrop J, Griffith LM, Hansen J, Jagasia M, Miklos D, Pavletic S, Parkman R, Russek-Cohen E, Flowers MED, Lee S, Martin P, Vogelsang G, Walton M, and Schultz KR. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: III: The 2014 biomarker working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(5):780-792.
  199. Bohmann EM, Fehn U, Holler B, Weber D, Holler E, Herr W, Hoffmann P, Edinger M, and Wolff D. Altered immune reconstitution of B and T cells precedes the onset of clinical symptoms of chronic graft-versus-host disease and is influenced by the type of onset. *Ann Hematol*. 2017;96(2):299-310.
  200. Hill L, Alousi A, Kebriaei P, Mehta R, Rezvani K, and Shpall E. New and emerging therapies for acute and chronic graft versus host disease. *Ther Adv Hematol*. 2018;9(1):21-46.
  201. Wolff D, Gerbitz A, Ayuk F, Kiani A, Hildebrandt GC, Vogelsang GB, Elad S, Lawitschka A, Socie G, Pavletic SZ, Holler E, and Greinix H. Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): First-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:1611-1628.
  202. Wolff D, Bertz H, Greinix H, Lawitschka A, Halter J, and Holler E. Klinische Versorgung der chronischen Graft-versus-Host-Krankheit. *Dtsch Arztebl*. 2011;108(43):732-741.
  203. Zadik Y, Elad S, Shapira A, Shapira MY, Zadik Y, Elad S, Shapira A, and Shapira MY. Expert Opinion on Pharmacotherapy Treatment of oral mucosal manifestations of chronic graft-versus-host disease : dexamethasone vs . budesonide. *Expert Opin Pharmacother*. 2017;18(3):235-242.

204. Noce CW, Gomes A, Shcaira V, Corrêa MEP, Moreira MCR, Júnior AS, Gonçalves LS, Garnica M, Maiolino A, and Torres SR. Randomized Double-Blind Clinical Trial for the Topical Treatment of Symptomatic Oral Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(8):1163-1168.
205. Abud TB, Amparo F, Saboo US, Zazzo A Di, Dohlman TH, Ciolino JB, Hamrah P, and Dana R. A Clinical Trial Comparing the Safety and Efficacy of Topical Tacrolimus versus Methylprednisolone in Ocular Graft-versus-Host Disease. *Ophthalmology*. 2016;123(7):1449-1457.
206. Koc S, Leisenring W, Flowers MED, Anasetti C, Deeg HJ, Nash RA, Sanders JE, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR, and Martin PJ. Therapy for chronic graft-versus-host disease : a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood*. 2002;100(1):48-52.
207. Sullivan KM, Dahlberg S, Yee G, Sanders JE, Nims J, Storb A, Hill R, and Shields A. Alternating-Day Cyclosporine and Prednisone for Treatment of High-Risk Chronic Graft-versus-Host-Disease. *Blood*. 1988;72(2):555-562.
208. De Jesus J, Gosh S, Hsu Y, Neuman J, Cohen A, Champlin R, Couriel D AU. Tacrolimus in combination with steroids for the treatment of chronic GVHD. *BB MT*. 2002;Poster Ses(122):49-50.
209. Flowers MED and Martin PJ. How We treat chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(4):606-615.
210. Oray M, Samra KA, Ebrahimiadib N, and Meese H. Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opin Drug Saf*. 2016;15(4):457-465.
211. Flowers MED, Storer B, Carpenter P, Rezvani AR, Vigorito AC, Campregher P V, Moravec C, Kiem H, Fero M, Georges G, Warren E, Lee S, Sanders JE, Appelbaum F, and Martin PJ. Treatment Change as a Predictor of Outcome among Patients with Classic Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(12):1380-1384.
212. Inamoto Y and Flowers MED. Treatment of chronic graft-versus-host disease in 2011. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(6):414-420.
213. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, Verbeek M, Maas-Bauer K, Metzelder SK, Spoerl S, Ditschkowski M, Ecsedi M, Sockel K, Ayuk F, Ajib S, Sicre de Fontbrune F, Na I, Penter L, Holtick U, Wolf D, Schuler E, Meyer E, Apostolova P, Bertz H, Marks R, Lübbert M, von BN. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multi-center survey. *Leukemia*. 2015;29(10):2062-2068.
214. Miklos D, Cutler CS, Arora M, Waller EK, Jagasia M, Pusic I, Flowers ME, Logan AC, Nakamura R, Blazar BR, Li Y, Chang S, Lal I, Dubovsky J, James DF, Styles L, and Jaglowski S. Ibrutinib for chronic graft-versus-host disease after failure of prior therapy. *Blood*. 2017;130(21):2243-2251.
215. Herrera AF, Kim HT, Bindra B, Jones KT, Alyea EP, Armand P, Cutler CS, Ho VT, Nikiforow S, Blazar BR, Ritz J, Antin JH, Soiffer RJ, and Koreth J. A Phase II Study of Bortezomib Plus Prednisone for Initial Therapy of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(11):1737-1743.
216. Koreth J, Kim HT, Jones KT, Lange PB, Reynolds CG, Chammas MJ, Dusenbury K, Whangbo J, Nikiforow S, Alyea EP, Armand P, Cutler CS, Ho VT, Chen Y Bin, Avigan D, Blazar BR, Antin JH, Ritz J, and Soiffer RJ. Efficacy, durability, and response predictors

- of low-dose interleukin-2 therapy for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2016;128(1):130-137.
217. Michael M, Shimoni A, and Nagler A. Novel immunosuppression compounds and experimental therapies for chronic graft-versus-host disease. *Acta Haematol*. 2013;130(1):34-43.
218. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, and Schreiber SL. Calcineurin Is a Common Target of Cyclophilin A and FKBP-FK506 Complexes. *Cell*. 1991;66:807-815.
219. Allison AC and Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*. 2000;47:85-118.
220. Kirken RA and Wang YL. Molecular Actions of Sirolimus : Sirolimus and mTor. *Transplant Proc*. 2003;(35):227-230.
221. Hautmann AH, Wolff D, Hahn J, Edinger M, Schirmer N, Ammer J, Holler B, Landfried K, Hautmann MG, Ahrens N, and Ugocsai P. Extracorporeal photopheresis in 62 patients with acute and chronic GVHD : Results of treatment with the COBE Spectra System. *Bone Marrow Transplant*. 2012;48(3):439-445.
222. Lucchini G, Introna M, Dander E, Rovelli A, Balduzzi A, Capelli C, Belotti D, Gaipa G, Bonanomi S, Salvade A, Perseghin P, Vinci P, Lanino E, Chiusolo P, Orofino MG, Markt S, Golay J, Rambaldi A, Biondi A et al. Platelet-lysate-Expanded Mesenchymal Stromal Cells as a Salvage Therapy for Severe Resistant Graft-versus-Host Disease in a Pediatric Population. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:1293-1301.
223. Vigorito AC, Campregher P V, Storer BE, Carpenter PA, Moravec CK, Kiem H, Fero ML, Warren EH, Lee SJ, Appelbaum FR, Martin PJ, and Flowers MED. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood*. 2009;114(3):702-709.
224. E Gluckman, V Rocha, A Boyer-Chammard, F Locatelli, W Arcese, R Pasquini, J Ortega, G Souillet, E Ferreira, JP Laporte, M Fernandez CC. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med*. 1997;337(6):373-381.
225. Zecca M, Prete A, Rondelli R, Lanino E, Balduzzi A, Messina C, and Fagioli F. Chronic graft-versus-host disease in children : incidence , risk factors , and impact on outcome. *Blood*. 2002;100(4):1192-1201.
226. Eapen M, Horowitz MM, Klein JP, Champlin RE, Jr FRL, Ringdén O, and Wagner JE. Higher Mortality After Allogeneic Peripheral-Blood Transplantation Compared With Bone Marrow in Children and Adolescents: The Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol*. 2004;22(24):4872-4880.
227. Leung W, Ahn H, Rose SR, Phipps S, Smith T, Gan K, O'Connor M, Hale G a, Kasow K a, Barfield RC, Madden RM, and Pui C-H. A Prospective cohort study of late sequelae of pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Medicine (Baltimore)*. 2007;86(4):215-224.
228. Baird, Kristin MD, Cooke, Kenneth MD, and Schultz, Kirk R. MD. Chronic Graft Versus Host Disease (GVHD) in Children. *Pediatr Clin North Am*. 2010;57(1):297-322.
229. Lai H-C, Stacey RD, FitzSimmons C, Allen DB, Kosorok MR, Rosenstein BJ, Campbell PW FP. Risk of persistent growth impairment after alternate-day prednisone treatment in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2000;342(12):851-859.

230. Taylor PA, Lees CJ, and Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4 +CD25 + immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2002;99(10):3493-3499.
231. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, and Negrin RS. CD4 + CD25 + regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Me*. 2003;9(9):1144-1150.
232. Nguyen VH, Shashidhar S, Chang DS, Ho L, Kambham N, Bachmann M, Brown JM, Negrin RS, and T R. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Animals*. 2008;111(2):945-953.
233. Marek-Trzonkowska N, Sliwiec MaM, Dobyszuk A, Grabowska M, Nska IT, Nska JJS, Wujtewicz A a., Witkowski P, Mlynarski W, Balcerska A, Sliwska JM, and Piotr Trzonkowski. Administration of CD4+CD25highCD127- regulatory T cells preserves  $\beta$ -cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care*. 2012;35:1817-1820.
234. Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaitzu M, Nagatsu A, Oura T, Watanabe M, Aoyagi T, Suzuki T, Shimamura T, Kamiyama T, Sato N, Sugita J, Hatanaka K, Bashuda H, Habu S, Demetris AJ, and Okumura K. A Pilot Study of Operational Tolerance with a Regulatory T Cell-Based Cell Therapy in Living Donor Liver Transplantation. *Hepatology*. 2016;64(2):552.
235. Di Ianni M, Del Papa B, Cecchini D, Bonifacio E, Moretti L, Zei T, Iacucci Ostini R, Falzetti F, Fontana L, Tagliapietra G, Maldini C, Martelli MF, and Tabilio A. Immunomagnetic isolation of CD4+CD25+FoxP3 + natural T regulatory lymphocytes for clinical applications. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(2):246-253.
236. Brunstein CG, Miller JS, Mckenna DH, Hippen KL, Defor TE, Sumstad D, Curtsinger J, Verneris MR, Macmillan ML, Levine BL, Riley JL, June CH, Le C, Weisdorf DJ, McGlave PB, Blazar BR, and Wagner JE. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics , toxicity profile, and clinical effect. *Blood*. 2016;127(8):1044-1052.
237. Edinger M and Hoffmann P. Regulatory T cells in stem cell transplantation: Strategies and first clinical experiences. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(5):679-684.
238. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Pierini A, Massei MS, Amico L, Urbani E, Papa B Del, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Tognellini R, Reisner Y, Aversa F, Falini B, and Velardi A. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood*. 2014;124(4):638-645.
239. Mathew JM, H-Voss J, LeFever A, Konieczna I, Stratton C, He J, Huang X, Gallon L, Skaro A, Ansari MJ, and Leventhal JR. A Phase i Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-12.
240. Chandran S, Tang Q, Sarwal M, Laszik Z, Putnam A, Lee K, Leung J, Nguyen V, Sigdel T, Tavares E, Yang J, Hellerstein M, Fitch M, Bluestone J, and F V. Polyclonal Regulatory T Cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. *Am J Transplant*. 2017;17:2945-2954.
241. Schliesser U, Streitz M, and Sawitzki B. Tregs: Application for solid-organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2012;17(1):34-41.

242. Safinia N, Vaikunthanathan T, Fraser H, Thirkell S, Lowe K, Blackmore L, Whitehouse G, Martinez-Llordella M, Jassem W, Sanchez-Fueyo A, Lechler RI, and Lombardi G. Successful expansion of functional and stable regulatory T cells for immunotherapy in liver transplantation. *Oncotarget*. 2016;7(7):7563-7577.
243. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Piseshka B, Dada A, Niemand C, Assenmacher M, Orsó E, Andreesen R, Holler E, and Edinger M. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(3):267-274.
244. Pahwa R, Jaggaiahgari S, Pahwa S, Inverardi L, Tzakis A, and Ricordi C. Isolation and expansion of human natural T regulatory cells for cellular therapy. *J Immunol Methods*. 2010;363(1):67-79.
245. Peters JH, Preijers FW, Woestenenk R, Hilbrands LB, Koenen HJPM, and Joosten I. Clinical grade Treg: GMP isolation, improvement of purity by CD127pos depletion, Treg expansion, and Treg cryopreservation. *PLoS One*. 2008;3(9).
246. Seay HR, Putnam AL, Cserny J, Posgai AL, Rosenau EH, Wingard JR, Girard KF, Kraus M, Lares AP, Brown HL, Brown KS, Balavage KT, Peters LD, Bushdorf AN, Atkinson MA, Bluestone JA, Haller MJ, and Brusko TM. Expansion of Human Tregs from Cryopreserved Umbilical Cord Blood for GMP-Compliant Autologous Adoptive Cell Transfer Therapy. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2017;4:178-191.
247. Sagoo P, Lombardi G, and Lechler RI. Regulatory T cells as therapeutic cells. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13(6):645-653.
248. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, and Edinger M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4+ CD25high regulatory T cells. *Blood*. 2004;104(3):895-904.
249. Daniele N, Scerpa MC, Landi F, Caniglia M, Miele MJ, Locatelli F, Isacchi G, and Zinno F. T(reg) cells: collection, processing, storage and clinical use. *Pathol - Res Pract*. 2011;207(4):209-215.
250. Elkord E. Frequency of human T regulatory cells in peripheral blood is significantly reduced by cryopreservation. *J Immunol Methods*. 2009;347(1-2):87-90.
251. Ukena SN, Velaga S, Goudeva L, Ivanyi P, Olek S, Falk CS, Ganser A, and Franzke A. Human Regulatory T Cells of G-CSF Mobilized Allogeneic Stem Cell Donors Qualify for Clinical Application. *PLoS One*. 2012;7(12):1-10.
252. Strauss L, Whiteside TL, Knights A, Bergmann C, Knuth A, and Zippelius A. Selective Survival of Naturally Occurring Human CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Cultured with Rapamycin. *J Immunol*. 2007;178(1):320-329.
253. Basu S, Golovina T, Mikheeva T, June CH, and Riley JL. Cutting Edge: Foxp3-Mediated Induction of Pim 2 Allows Human T Regulatory Cells to Preferentially Expand in Rapamycin. *J Immunol*. 2008;180(9):5794-5798.
254. Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, and Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen – specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*. 2007;109(2):827-835.
255. Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, and Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med*. 2011;3(83):83-42.

256. Landwehr-Kenzel S, Issa F, Luu SH, Schmück M, Lei H, Zobel A, Thiel A, Babel N, Wood K, Volk HD, and Reinke P. Novel GMP-compatible protocol employing an allogeneic B cell bank for clonal expansion of allospecific natural regulatory T cells. *Am J Transplant.* 2014;14(3):594-606.
257. Tu W, Lau Y-L, Zheng J, Liu Y, Chan P-L, Mao H, Dionis K, Schneider P, and Lewis DB. Efficient induction and expansion of human alloantigen-specific CD8 regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood.* 2008;112:2554-2562.
258. Bacher P and Scheffold A. Flow-Cytometric Analysis of Rare Antigen-Specific T Cells. *Cytometry.* 2013;83A:692-701.
259. Nowak A, Lock D, Bacher P, Hohnstein T, Vogt K, Gottfreund J, Giehr P, Polansky JK, Sawitzki B, Kaiser A, Walter J, and Scheffold A. CD137+CD154- expression as a regulatory T cell (Treg)-specific activation signature for identification and sorting of stable human tregs from in vitro expansion cultures. *Front Immunol.* 2018;9(Feb):1-15.
260. Venken K, Thewissen M, Hellings N, Somers V, Hensen K, Rummens JL, and Stinissen P. A CFSE based assay for measuring CD4+CD25+ regulatory T cell mediated suppression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses. *J Immunol Methods.* 2007;322(1-2):1-11.
261. Streitz M, Miloud T, Kapinsky M, Reed MR, Magari R, Geissler EK, Hutchinson JA, Vogt K, Schlickeiser S, Kverneland AH, Meisel C, Volk H-D, and Sawitzki B. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res.* 2013;2(1):17.
262. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, Armand P, Cutler C, Ho V, Treister NS, Bienfang DC, Prasad S, Tzachanis D, Joyce RM, Avigan DE, Antin JH, Ritz J, and Soiffer RJ. Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med.* 2011;365(22):2055-2066.
263. Rosenblum MD, Way SS, and Abbas AK. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(2):90-101.
264. Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo ME, Masetti R, Pende D, Falco M, Handgretinger R, Moretta F, Lucarelli B, Brescia LP, Pira GL, Testi M, Cancrini C, Kabbara N, Carsetti R, Finocchi A, and Moretta A. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of ab 1 T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood.* 2015;124(5):822-827.
265. Li X, Kang N, Zhang X, Dong X, Wei W, Cui L, Ba D, and He W. Generation of Human Regulatory  $\gamma\delta$ T Cells by TCR  $\gamma\delta$  Stimulation in the Presence of TGF-beta and Their Involvement in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol.* 2011;186(12):6693-6700.
266. Throsby E. The role of HLA in T cell activation. *Hum Immunol.* 1984;9:1-7.
267. Fukuda H, Nakamura H, Tominaga N, Teshima H, Hiraoka A, Shibata H, and Masaoka T. Marked increase of CD8+S6F1+ and CD8+CD57+ cells in patients with graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1994;13(2):181-185.
268. Collin M and Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018;154(1):3-20.
269. Singer BD, King LS, and D'Alessio FR. Regulatory T cells as immunotherapy. *Front Immunol.* 2014;5(46):1-10.



270. Tang Q and Bluestone JA. Regulatory T-Cell Therapy in Transplantation: Moving to the Clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3:1-15.
271. Tsang JY, Tanriver Y, Jiang S, Xue S, Ratnasothy K, Chen D, Stauss HJ, Bucy RP, Lombardi G, and Lechler R. Conferring indirect allospecificity on CD4+ CD25+ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3619-3628.
272. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, and Steinman RM. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;198(2):235-247.
273. Kochenderfer JN, Yu Z, Frasher D, Restifo NP, and Rosenberg SA. Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. *Blood.* 2010;116(19):3875-3887.
274. Riley JL, June CH, and Blazar BR. Human T Regulatory Cells as Therapeutic Agents: Take a Billion or So of These and Call Me in the Morning. *Immunity.* 2009;30(5):656-665.
275. June CH and Blazar BR. Clinical application of expanded CD4+ 25+ cells. *Semin Immunol.* 2006;18:78-88.
276. Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, and Thiel A. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med.* 2005;11:1118.
277. Sharma MD, Hou DY, Baban B, Koni PA, He Y, Chandler PR, Blazar BR, Mellor AL, and Munn DH. Reprogrammed Foxp3+ Regulatory T Cells Provide Essential Help to Support Cross-presentation and CD8+ T Cell Priming in Naive Mice. *Immunity.* 2010;33(6):942-954.
278. Wood KJ, Bushell A, and Hester J. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(6):417-430.
279. Romano M, Tung SL, Smyth LA, and Lombardi G. Treg therapy in transplantation: a general overview. *Transpl Int.* 2017;30(8):745-753.
280. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, and Strober S. Donor-type CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Exp Med.* 2002;196(3):389-399.
281. Issa F, Hester J, Goto R, Nadig S, Goodacre TE, and Wood K. Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanised mouse model. *Transplantation.* 2010;90(12):1321-1327.
282. Van Der Net JB, Bushell A, Wood KJ, and Harden PN. Regulatory T cells: First steps of clinical application in solid organ transplantation. *Transpl Int.* 2016;29(1):3-11.
283. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, Felicini R, Falcinelli F, Velardi A, Ruggeri L, Aloisi T, Saab JP, Santucci A, Perruccio K, Martelli MP, Mecucci C, Reisner Y, and Martelli MF. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: A phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol.* 2005;23(15):3447-3454.
284. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, Brink MRM, Van Den, Hansen JA, Parkman R, Miklos DB, Martin PJ, Paczesny S, Vogelsang G, Pavletic S, Ritz J, Schultz KR, and Blazar BR. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus

- Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(2):211-234.
285. Macdonald KPA, Hill GR, and Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease : biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood*. 2017;129(1):13-22.
286. Weng J, Lai P, Geng S, Luo C, Wu S, Ling W, Deng C, Huang X, Lu Z, and Du X. Role of Toll-like receptor 4 signaling in cutaneous chronic graft-versus-host disease. *Clin Transplant*. 2015;29(10):547-554.
287. Alexander KA, Flynn R, Lineburg KE, Kuns RD, Teal BE, Olver SD, Lor M, Raffelt NC, Koyama M, Leveque L, Le Texier L, Melino M, Markey KA, Varelias A, Engwerda C, Serody JS, Janela B, Ginhoux F, Clouston AD et al. CSF-1-dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4266-4280.
288. Kheav VD, Busson M, Scieux C, de Latour RP, Maki G, Haas P, Mazon MC, Carmagnat M, Masso E, Xhaard A, Robin M, Ribaud P, Dulphy N, Loiseau P, Charron D, Socié G, Toubert A, and Moins-Teisserenc H. Favorable impact of natural killer cell reconstitution on chronic graft-versus-host disease and cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2014;99(12):1860-1867.
289. Stenger EO, Turnquist HR, Mapara MY, and Thomson AW. Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. *Blood*. 2012;119(22):5088-5103.
290. Raker VK, Domogalla MP, and Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells for regulatory T cell induction in man. *Front Immunol*. 2015;6:1-11.
291. Mahnke K, Johnson TS, Ring S, and Enk AH. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: A two-way relationship. *J Dermatol Sci*. 2007;46(3):159-167.
292. Mahnke K, Qian Y, Knop J, and Enk AH. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*. 2003;101(12):4862-4869.
293. Houot R, Perrot I, Garcia E, Durand I, and Lebecque S. Human CD4+ CD25high Regulatory T Cells Modulate Myeloid but Not Plasmacytoid Dendritic Cells Activation. *J Immunol*. 2006;176(9):5293-5298.
294. Veldhoen M, Moncrieffe H, Hocking RJ, Atkins CJ, and Stockinger B. Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells. *J Immunol*. 2006;176(10):6202-6210.
295. Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, and Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol*. 2014;5(JAN).
296. Woltman AM, Fijter JW De, Kamerling SWA, Paul LC, Daha MR, and Kooten C Van. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2000;30(7):1807-1812.
297. Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, Ramonda R, Iaccarino L, and Doria A. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev*. 2011;10(6):305-310.
298. Emmer PM, Vlag J Van Der, Adema GJ, and Hilbrands LB. Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness. *Transplantation*. 2006;81(10):1451-1459.

299. Prado C, Gómez J, López P, Paz B De, Gutiérrez C, and Suárez A. Immunobiology Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. *Immunobiology*. 2011;216(3):386-392.
300. Clark FJ, Freeman L, Dzionek A, Schmitz J, McMullan D, Simpson P, Mason J, Mahendra P, Craddock C, Griffiths M, Moss PA, and Chakraverty R. Origin and subset distribution of peripheral blood dendritic cells in patients with chronic graft-versus-host-disease. *Transplantation*. 2003;75(2):221-225.
301. Mohty M, Blaise D, Faucher C, Bardou V-J, Gastaut J-A, Viens P, Olive D, and Gaugler B. Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004;56:1-6.
302. Chen X, Vodanovic-jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, and Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007;110(10):3804-3813.
303. Wu T, Young JS, Johnston H, Ni X, Deng R, Racine J, Wang M, Wang A, Todorov I, Wang J, and Zeng D. Thymic Damage, Impaired Negative Selection, and Development of Chronic Graft-versus-Host Disease Caused by Donor CD4+ and CD8+ T Cells. *J Immunol*. 2013;191:488-499.
304. Alho AC, Kim HT, Chammas MJ, Reynolds CG, Matos TR, Forcade E, Whangbo J, Nikiforow S, Cutler CS, Koreth J, Ho VT, Armand P, Antin JH, Alyea EP, Lacerda JF, Soiffer RJ, and Ritz J. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood*. 2016;127(5):646-658.
305. Distler E, Bloetz A, Albrecht J, Asdufan S, Hohberger A, Frey M, Schnürer E, Thomas S, Theobald M, Hartwig UF, and Herr W. Alloreactive and leukemia-reactive T cells are preferentially derived from naïve precursors in healthy donors: implications for immunotherapy with memory T cells. *Haematologica*. 2011;96(7):1024-1032.
306. Teschner D, Distler E, Wehler D, Frey M, Marandiuc D, Langeveld K, Theobald M, Thomas S, and Herr W. Depletion of naïve T cells using clinical grade magnetic CD45RA beads : a new approach for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49:138-144.
307. Bleakley M, Heimfeld S, Loeb KR, Jones L a, Chaney C, Seropian S, Gooley T a, Sommermeyer F, Riddell SR, and Shlomchik WD. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naïve T cell – depleted stem cell grafts. *J Clin Invest*. 2015;125(13):1-13.
308. Kawano Y, Kim HHT, Matsuoka K-I, Bascug G, McDonough S, Ho VT, Cutler C, Koreth J, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, and Ritz J. Low telomerase activity in CD4+ regulatory T cells in patients with severe chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;118(18):3-5.
309. Theil A, Wilhelm C, Kuhn M, Petzold A, Tuve S, Oelschlägel U, Dahl A, Bornhäuser M, Bonifacio E, and Eugster A. T cell receptor repertoires after adoptive transfer of expanded allogeneic regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2016;187:316-324.
310. Miklos DB, Kim HT, Zorn E, Hochberg EP, Guo L, Mattes-Ritz A, Viatte S, Soiffer RJ, Antin JH, and Ritz J. Antibody response to DBY minor histocompatibility antigen is induced after allogeneic stem cell transplantation and in healthy female donors. *Blood*. 2004;103(1):353-359.

311. Masson D, Bouaziz J, Buanec L, Robin M, Meara AO, Parquet N, Rybojad M, Hau E, Michonneau D, Fontbrune FS De, Bergeron A, Itzykson R, Dhedin N, Bengoufa D, De Latour RP, Xhaard A, Bagot M, Bensussan A, and Soci. CD24<sup>hi</sup> CD27<sup>+</sup> and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(11):1830-1840.
312. Bouaziz J-D, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, and Musette P. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4<sup>+</sup> T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol*. 2010;40(10):2686-2691.
313. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Hellerstein MK, Herold KC, Lares A, Lee MR, Li K, Liu W, Long SA, Masiello LM, Nguyen V, Putnam AL, Sayre P, and Tang Q. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med*. 2015;7(315):1-34.
314. Hickey MJ and Chow Z. Viewing immune regulation as it happens : in vivo imaging for investigation of regulatory T-cell function. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(6):514-519.

### **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Leonie Müller-Jensen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „*Ex vivo* expandierte regulatorische T-Zellen als adjuvante Therapieoption bei chronischer Graft-versus-Host-Erkrankung“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Leonie Müller-Jensen

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Petra Reinke, Leiterin des Forschungsbereichs „Immunologie“ am BCRT, für die freundliche Überlassung dieses spannenden Dissertationsthemas und die stets ermutigende und individuelle Begleitung dieser Arbeit. Durch die gemeinsamen Gespräche habe ich viel lernen können, sie werden mir stets als eine besondere Bereicherung in Erinnerung bleiben.

Frau Dr. med. Sybille Landwehr-Kenzel danke ich für die Betreuung und die kompetenten Anregungen zur Realisierung dieser Arbeit.

Henrike Hoffmann, Anne Forke, Carola Beier, Insa Lehmann, Daniel Kaiser und Dr. rer. nat. Andy Römhild möchte ich für ihre herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe des GMP-Bereichs danken. Die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche, die großartige Arbeitsatmosphäre und ihre kompetente Hilfe bei technischen Fragestellungen haben besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dipl.-Biol. Matthias Streit und Frau Anke Jurisch danke ich für die wertvolle Unterstützung bei durchflusszytometrischen Experimenten sowie der Hilfe bei technischen Schwierigkeiten. Dr. Desirée Kunkel möchte ich für die Nutzung des BCRT Durchflusszytometrie-Labors danken.

Für die finanzielle Unterstützung und die Aufnahme in das integrierte Graduiertenkolleg des SFB650 möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk, Prof. Dr. rer. nat. Max Löhning, Frau Dr. med. Nina Babel und Frau Tina Kornprobst herzlich bedanken. Dies hat mir eine intensive und konzentrierte Forschungszeit ermöglicht.

Bei den Patienten und ihren Familien möchte ich mich für ihre besondere Kooperation und Mitarbeit bedanken.

Meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis und ihre tatkräftige Unterstützung. Die großzügigen und bereitwilligen Blutspenden haben außerdem die Durchführung vieler Experimente ermöglicht.

Besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern, Margarita und Axel Müller-Jensen, meinem Bruder Moritz Müller-Jensen und meinem Freund Stefan Meyer, die mich durch ihre Liebe und ihren Rückhalt auf meinem Lebensweg bestärken. Diese Arbeit möchte ich ihnen widmen.