

Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Hämatologie/Onkologie/Stammzelltransplantation
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Prädiktion der Graft-versus-Host-Erkrankung in pädiatrischen Patienten nach
hämatopoetischer Stammzelltransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marco Nicolas Andreas

aus Wiesbaden

Datum der Promotion: 06.03.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
Zusammenfassung	1
Abstract.....	3
1 Einleitung.....	4
1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation.....	4
1.2 Antigenpräsentation und Alloreaktivität	9
1.2.1 Immunologische Grundlagen der T-Zell-Immunität	9
1.2.2 T-Zell-Alloreaktivität.....	12
1.3 Graft-versus-Host-Erkrankung.....	15
1.3.1 Pathophysiologie.....	15
1.3.2 Symptomatik und Diagnose.....	17
1.3.3 Prophylaxe und Therapie.....	20
1.4 T-Gedächtniszellen und deren Subpopulationen	22
1.5 Assays zur Prädiktion der Graft-versus-Host-Erkrankung.....	23
2 Aufgabenstellung	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Verwendete Zellkulturlösungen und Antibiotika.....	26
3.1.2 Verwendete Chemikalien	26
3.1.3 Verwendete Lösungen und Puffer.....	27
3.1.4 Verwendete Kits	27
3.1.5 Verwendete Verbrauchsmaterialien	28
3.1.6 Verwendete Geräte.....	29
3.1.7 Verwendete Antikörper	30
3.2 Methoden.....	32
3.2.1 Patienten und Probanden	32
3.2.2 T-Zell-Alloreaktivitäts- <i>Assay</i> (<i>Allo-Assay</i>).....	33
3.2.3 Datenanalyse.....	40
3.2.4 <i>Gating</i> -Strategie.....	40
3.2.5 Statistik und Graphen.....	43
4 Ergebnisse.....	44
4.1 Assay-Etablierung	44
4.2 Assay-Evaluation	54

4.2.1 Varianzkoeffizient (CV).....	54
4.2.2 CFSE-Einfluss auf Aktivierungsmarker-Induktion.....	56
4.2.3 Mehrfach verwendete Spender im Verlauf.....	57
4.3 Auswahl der geeigneten Aktivierungsmarker.....	59
4.3.1 Vergleich der Höhe der Aktivierungsmarker-Induktion	59
4.3.2 Negativ-Auswahl anhand des <i>Backgrounds</i> der Aktivierungsmarker.....	60
4.4 Analyse der T-Zell-Memory-Subpopulationen (Subsets).....	61
4.5 Patientendaten.....	63
4.5.1 Alloreaktion.....	63
4.5.2 Klinischer Verlauf.....	65
4.5.3 T-Zell-Memory-Subpopulationen	67
5 Diskussion.....	71
5.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.....	71
5.2 Kritische Bewertung der Ergebnisse	72
5.2.1 Gesunde Probanden.....	72
5.2.2 T-Memory-Subpopulationen.....	83
5.2.3 Patienten	86
5.3 Faktoren mit Einfluss auf den Versuch.....	91
5.4 Integration in den klinischen Alltag	93
5.5 Ausblick.....	94
5.6 Schlussfolgerung	96
Literaturverzeichnis.....	97
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	
Eidesstattliche Versicherung.....	
Curriculum Vitae.....	
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

AF	<i>Alexa Fluor</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
BO	Bronchiolitis obliterans
BOOP	Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie
BV	<i>Brilliant Violet</i>
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> /Unterscheidungsgruppen
CFDA-SE/CFSE	<i>5(6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CM	<i>Complete</i> Medium
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CNV	<i>Copy number variation</i> /Kopienzahlvariation
CrP	C-reaktives Protein
CsA	Ciclosporin A
CTL	Zytotoxische T-Zelle
Cy	Cyanin
D	Donor, Spender
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> /Durchflusszytometrie
FCS	Fötales Kälberserum
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GI	Gastrointestinal
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GvHD	<i>Graft-versus-Host Disease</i> /Graft-versus-Host-Reaktion/

	Graft-versus-Host-Erkrankung
(aGvHD)	Akute Graft-versus-Host-Erkrankung
(cGvHD)	Chronische Graft-versus-Host-Erkrankung
GvL	Graft-versus-Leukämie-Reaktion
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSZT	(Allogene) hämatopoetische Stammzelltransplantation
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus Typ 1
ID	Identifikationsnummer
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin (Calciumsalz)
iPS	Idiopatisches Pneumonie-Syndrom
KG	Körpergewicht
LD	<i>Live Dead</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mukosa-/Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mHags	<i>Minor histocompatibility antigen</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex/</i> Haupthistokompatibilitätskomplex
MMF	Mycophenolat Mofetil
MTX	Methotrexat
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells/</i> Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline/</i> Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Chlorophyll-Protein
RIC	<i>Reduced intensity conditioning regimen/</i> Konditionierungsregime mit reduzierter Intensität

SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> /Einzelnukleotid-Polymorphismus
SOP	<i>Standard operating procedure</i>
TAM	Transplantationsassoziierte Mikroangiopathie
TBI	<i>Total body irradiation</i> /Ganzkörperbestrahlung
T _{CM}	<i>T central memory cells</i> /Zentrale Gedächtnis-T-Zellen
T _{EM}	<i>T effector memory cells</i> /Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
T _{EMRA}	<i>T effector memory RA</i> /RA-positive Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
T _{SCM}	T-Stammzell-Gedächtniszellen
TCR	<i>T cell receptor</i> /T-Zell-Rezeptor
TLR	<i>Toll-like receptor</i> /Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
UV	<i>Ultra Violet</i>

Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
g	Gramm
<i>g</i>	mittlere Erdbeschleunigung
h	Stunden
min	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimol
ng	Nanogramm
sek	Sekunden
U	<i>Units</i>

Zusammenfassung

Einleitung:

Die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) zählt mit einer Letalität von bis zu 60% zu den schwersten Komplikationen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Bisher sind Diagnose und Therapie erst nach dem Auftreten klinischer Symptome möglich. Um eine GvHD jedoch möglichst im Vorhinein zu verhindern, wird als Goldstandard die MHC-Expression von Spender und Empfänger vor der Transplantation verglichen, wobei eine hohe genetische Übereinstimmung mit einer geringeren GvHD-Inzidenz korreliert. Dennoch kann es sogar bei nahezu identischen MHCs zu einer GvHD kommen. Analog zum prätransplanten, donor-spezifischen IFN- γ -Elispot-*Assay*, der in der Nierentransplantation verwendet wird, wird in dieser Arbeit versucht ein Verfahren zu etablieren, das eine Abschätzung des GvHD- und des Abstoßungsrisikos vor Transplantation zusätzlich zur MHC-Expression ermöglicht.

Methodik:

Um das Verfahren zu etablieren, wurde peripheres Blut von 20 gesunden Spendern in einer *two-way mixed lymphocyte reaction* co-kultiviert und die Aktivierung der T-Zellen nach 17 Stunden Stimulationszeit mittels Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Für die letzten 2 Stunden (Ansatz 1) bzw. 13 Stunden (Ansatz 2) der Gesamtstimulationszeit wurde Brefeldin A hinzugegeben. Als Aktivierungsmarker wurden CD137, CD154, Granzym B, TNF- α , IFN- γ und IL-2 verwendet. Die Marker und der Zeitpunkt mit der höchsten Induktion und dem niedrigsten *Background* wurden bestimmt. Anschließend wurden diese in vier Patientenproben und deren Spendern gemessen. Alle Patienten wurden aufgrund einer Sichelzellerkrankheit transplantiert. In einem zweiten Schritt wurde mittels FACS analysiert, ob die Aktivierung aus einer neu-induzierten (*de novo* = naive) oder einer Gedächtniszell-vermittelten Immunantwort bestand.

Ergebnisse:

Bei der Verfahrensetablierung konnte in allen nicht-MHC-identen Gesunden eine T-Zell-vermittelte Erkennung von fremd-MHC gemessen werden. Die Marker mit der stärksten Induktion waren die Kombination aus CD137 und CD154, CD137 und IL-2 auf CD4⁺ T-Zellen sowie CD137 und Granzym B auf CD8⁺ T-Zellen. Die für eine Alloreaktion verantwortlichen T-Zellen waren vor allem *Central-Memory-Zellen* (T_{CM}) und RA-positive T-Effektor-*Memory-Zellen* (T_{EMRA}).

Schlussfolgerung:

Es gelang erfolgreich eine Analysemethode einzuführen, die alloreaktive T-Zellen erfassen kann. Jedoch ist die statistische Aussagekraft bei vier Patienten noch zu niedrig, sodass zur Absicherung der Ergebnisse ein größer angelegtes Immun-*Monitoring* erforderlich ist.

Abstract

Introduction: Graft-versus-host disease (GvHD) is with up to 60% lethality a major complication after hematopoietic stem cell transplantation that up to now can only be diagnosed and treated after onset of clinical symptoms. To prevent GvHD, MHC expression of donor and recipient is matched before transplantation. A high match correlates with a low manifestation of GvHD. GvHD can still occur in a highly-matched donor recipient pair. In analogy to the so called pretransplant donor-specific IFN- γ -Elispot-assay in kidney transplantation this paper's goal is to establish an assay to evaluate risk for GvHD-development and rejection after hematopoietic stem cell transplantation.

Methods: To establish the assay peripheral blood from 20 healthy donors was co-cultured comparable to a two-way mixed lymphocyte reaction and activation of T cells after 17 hours stimulation time was measured via flow cytometry (FACS). For the last 2 hours (reaction mixture 1) or the last 13 hours (reaction mixture 2) of stimulation time Brefeldin A was added. As primary outcome, the expression of activation markers (CD137, CD154, Granzyme B, TNF- α , IFN- γ und IL-2) was analysed and quantified. Activation markers and time points after Brefeldin A addition were compared and markers (marker combinations and time points) with the highest induction and lowest background were selected. These chosen markers were used for patients and their donor samples. All patients (included) were transplanted for their underlying Sickle Cell Disease. In an additional step the activation marker expressing T cells were analysed via FACS-analysis and assigned to their T memory subset affiliation.

Results: During establishment, all healthy donors showed a T cell mediated alloreaction against their non-matched reaction partner. The activation markers with the highest induction were a combination of CD137 and CD154, CD137 and IL-2 on CD4⁺ T cells as well as CD137 and Granzyme B on CD8⁺ T cells. Responsible T cells for the alloreaction were mainly central memory T cells (T_{CM}) and T effector memory RA positive T cells (T_{EMRA}).

Conclusion: A T cell allo-assay was successfully established. Nevertheless, further clinical immune monitoring is necessary to evaluate the power of the assay's predicational capacity.

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation*

Für viele hämatologische, maligne Erkrankungen ist die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) eine potentiell kurative Option.¹ Indikationen bestehen beispielsweise für die akute lymphatische Leukämie (ALL) sowie die akute myeloische Leukämie (AML) in Remission, für chronisch myeloische Leukämien (CML), myelodysplastische Syndrome (MDS) sowie für Hodgkin- oder Non-Hodgkin-Lymphome. Vor allem im pädiatrischen Bereich gibt es auch zahlreiche benigne Erkrankungen wie Hämoglobinopathien (u.a. die Sichelzellerkrankung und die Thalassämie), angeborene Immundefekte oder Stoffwechselerkrankungen, für welche die Stammzelltransplantation die einzig kurative Therapieoption darstellt. Hierfür sollte das individuelle Nutzen-Risiko-Profil abgewogen und auf Grundlage dessen entschieden werden, ob die Transplantation durchgeführt wird. Unterschieden werden muss zwischen der allogenen (Fremd- oder Familienspender) und der autologen Stammzelltransplantation, bei welcher der Patient selbst für einen späteren Zeitpunkt hämatopoetische Stammzellen spendet. Letztere ist vor allem relevant, wenn eine hoch-intensive Chemo- und/oder Radiotherapie bevorsteht, bei der das Knochenmark mit hoher Wahrscheinlichkeit zerstört werden wird.

Die hämatopoetische Stammzelle ist definiert als CD34⁺, CD38⁻ und *lineage*-negativ, d.h. sie exprimiert keine weiteren typisch myeloischen, bzw. lymphoiden Marker. Sie weist eine hohe regenerative Kapazität auf, weshalb sie für die hämatopoetische Stammzelltransplantation genutzt wird. Nach der Transplantation migriert die Zelle ins Knochenmark, von wo aus sie durch Differenzierung und Selbst-Erneuerung ein vollständiges und andauerndes lymphohämatopoetisches System aller drei Blutzellreihen beim Patienten etabliert. Betrachtet man die mononukleären Zellen des Knochenmarks, so finden sich dort circa ein Prozent hämatopoetische Stammzellen. Zur erfolgreichen Transplantation und damit zur stabilen Rekonstitution der weißen und roten Blutkörperchen sowie der Blutplättchen strebt man bei der Transplantatmenge eine Zielzellzahl von 2×10^6 CD34⁺ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht

* Die Grundlagen der Stammzelltransplantation sowie der Sichelzellerkrankung in diesem Kapitel sind, wenn nicht anders bezeichnet, dem Lehrbuch „Pädiatrische Hämatologie und Onkologie“ entnommen.¹⁰ Wird im Folgenden von Stammzelltransplantation oder Transplantation gesprochen, so ist, wenn nicht anders betitelt, die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation und deren Einsatz in der Pädiatrie gemeint. Zur besseren Lesbarkeit wurde in dieser Arbeit immer die männliche Form bei Personenbezeichnungen verwendet. Gemeint sind stets beide Geschlechter.

des Empfängers an.² Gewonnen werden die Zellen bei einer Knochenmarkentnahme, ähnlich einer repetitiven Knochenmarkpunktion, die dem Spender in Regionalanästhesie oder bei Kindern in Vollnarkose entnommen werden.

Als Blutstammzellquelle können seit der Entdeckung von Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSF) wie Granulozyten (G)-CSF und Granulozyten-Monozyten (GM)-CSF auch peripher gewonnene, vorher aus dem Knochenmark mobilisierte Zellen verwendet werden, da die CD34⁺ Stammzellen durch die Wachstumsfaktoren ins periphere Blut ausgeschwemmt werden.^{3,4} Auch Nabelschnurblut, das unter Geburt übrigbleibt und eingefroren konserviert in Blutbanken gelagert werden kann, kann für eine hämatopoetische Stammzelltransplantation genutzt werden. Die erste erfolgreiche Transplantation, bei der Nabelschnurblut verwendet wurde, ist 1989 beschrieben worden.⁵ Nabelschnurblut weist einen geringeren Anteil an Stammzellen auf, was zu verzögertem Anwachsen nach Transplantation und einer höheren Infektionsrate führen kann. Durch die weniger reifen Zellen ist allerdings keine komplette Übereinstimmung von Spender und Empfänger zwingend notwendig, da die unreifen T-Zellen im Transplantat einen geringeren Proliferationseffekt nach Stimulation durch Empfängerfremde Zellen aufweisen. Anzumerken ist, dass die Transplantation aus Nabelschnurblut bei Kindern in Deutschland kaum durchgeführt wird.

Bei der Suche nach einem möglichen Spender werden beim Patienten sowie dessen nahen Familienmitgliedern (Geschwister, Eltern) die Merkmale der Humanes Leukozytenantigen (HLA)-Klassen I (HLA-A, -B, -Cw) und II (HLA-DR und -DQ) bestimmt (genauer zu HLA-Klassen im Kapitel 1.2.1). Die Haplotypen-Deduktion der Familie dient zur Sicherung des Typisierungsergebnisses.⁶ Untersucht werden in den meisten Zentren 10 HLA-Allele, da die Übereinstimmung der oben genannten Allele besonders *Outcome*-relevant zu sein scheint. Des Weiteren ist es wichtig, mögliche Geschwisterspender zu identifizieren. Mit 25-30% Wahrscheinlichkeit findet sich hierbei ein 10 von 10 HLA-identer Geschwisterspender, da die HLA-Allele meist als kompletter Haplotyp von Vater und Mutter vererbt werden. Findet sich kein identes Geschwisterkind, so beginnt die Suche nach einem Fremdspender. Durch weltweite Datenbanken können heute im Median innerhalb von 20 Tagen mögliche Fremdspender ermittelt werden. Akzeptiert werden hierbei HLA-Übereinstimmungen von 10/10 sowie 9/10 Allelen. Sollte auch diese Suche erfolglos verlaufen, kommt eine haploidente Transplantation durch Mutter, Vater oder in seltenen Fällen Geschwister, Tanten oder Onkel in Frage. Erwähnenswert ist, dass die haploidente Transplantation durch verschiedene Möglichkeiten der Transplantat-Behandlung (vgl. Kap 1.3.3) immer sicherer für die Patienten wird.⁷ Die Fremdspender müssen immer auf Tauglichkeit zur Spende untersucht werden.

Hierzu wird unter anderem auf Infektionsmarker getestet, darunter Hepatitis B und C, humanes Immundefizienz-Virus (HIV), Toxoplasmose, Cytomegalievirus (CMV), humanes T-lymphotropes Virus Typ 1 (HTLV) und Lues.

Das sogenannte *Engraftment* (= Angehen) bezeichnet das Anwachsen des Transplantats beim Empfänger und ist meist definiert als eine an drei aufeinanderfolgenden Tagen gemessene Konzentration der neutrophilen Granulozyten über 500 Zellen/ μ l im peripheren Blut. Die Granulozyten sind klinisch betrachtet insbesondere für die Isolationsbedürftigkeit des Patienten relevant. Ein mehrtägiger Anstieg über 500 Zellen/ μ l zeigt die beginnende Immunkompetenz des Patienten an, wonach die Isolation gelockert werden kann.

Um ein Anwachsen der Stammzellen zu ermöglichen, wird vor jeder Transplantation die sogenannte Konditionierung durchgeführt. Zu den Zielen der Konditionierung gehört das Auslösen der Myelopoese (Myeloablation) sowie der Lymphopoese (Immunablation). Bei malignen Erkrankungen werden zusätzlich etwaige persistierende Tumorzellen eradiziert. Durchgeführt wird die Konditionierung meist als Kombination von Chemotherapeutika, die intravenös appliziert werden, teilweise zusammen mit einer Ganzkörperbestrahlung (*total body irradiation*, TBI). Die Auswahl der jeweiligen Chemotherapeutika-Kombinationen richtet sich nach der zugrundeliegenden Erkrankung. Verwendet werden unter anderem Busulfan, Melphalan oder Treosulfan. Um eine Abstoßung zu vermeiden, werden zusätzlich Cyclophosphamid oder Fludarabin als Immunsuppression gegeben. Die Transplantatabstoßung kann zusätzlich durch Anti-Thymozyten-Globulin (ATG), einen monoklonalen Antikörper gegen T-Zell-Antigene, vermieden werden. ATG ist darüber hinaus auch Teil der GvHD-Prophylaxe. Verstärkt antileukämisch wirksam ist die Konditionierung durch eine Kombination mit Etoposid oder Thiotepa. Vor allem bei verschiedenen benignen Erkrankungen wird ein Konditionierungsregime reduzierter Intensität (*reduced intensity regimen*, RIC) bevorzugt. Dieses ist nicht-myeloablativ und hat vor allem eine Immunablation zum Ziel.

Komplikationen der HSZT sind zahlreich und können sowohl infektiös als auch nicht-infektiös sein. Zu den infektiösen Komplikationen gehören sowohl bakterielle, als auch virale und fungale Infektionen. Bakterielle Infektionen treten begünstigt durch die Neutropenie kurz nach Transplantation sowie die herabgesetzte Magen-Darm-Barriere durch die Toxizität der Konditionierung auf. Keime der Standortflora können hierbei sowohl gram-positive als auch gram-negative Septitiden verursachen. Virale Infektionen entstehen durch Virus-Reaktivierung unter Immunsuppression, hierbei sind vor allem Adeno-, Cytomegalie-, Herpes-simplex- und Epstein-Barr-Viren zu nennen. Unter nicht-infektiöse Komplikationen nach HSZT fallen die akute sowie die chronische Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD, ausführlich besprochen in

Kap 1.3), pulmonale nicht-infektiöse Komplikationen (wie das idiopathische Pneumonie-Syndrom iPS, Bronchiolitis obliterans BO, Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie BOOP), sowie die transplantationsassoziierte Mikroangiopathie (TAM) (ebenfalls Folge des Konditionierungsregimes). Eine weitere schwere, nicht-infektiöse Komplikation ist das Transplantatversagen, das bei ein bis zehn Prozent der Patienten auftritt. Dieses manifestiert sich in zwei Formen. Die erste Form, das Nichtangehen, ist definiert als Fehlen der Spenderhämatopoese nach 28 Tagen (primäres Nichtangehen). Beim sekundären Nichtangehen kommt es zur Zytopenie nach vorigem *Engraftment*. Diese Form ist meist virusassoziiert. Behandelt wird das Nichtangehen durch erneute Stammzellgabe vom ursprünglichen Spender, einem sogenannten Stammzell-*Boost*. Eine zweite Form des Transplantatversagens ist die Abstoßung des Transplantats. Hierbei werden die Spenderzellen von Empfänger-T-Zellen eliminiert, welche die Konditionierung überlebt haben. Symptomatisch zeigt sich diese Art der Abstoßung durch eine Inflammation mit therapieresistentem Fieber, fulminantem Anstieg von C-reaktivem Protein (CrP), Ferritin sowie der Lactatdehydrogenase (LDH). Mit erneuter Konditionierung und Gabe von Stammzellen eines anderen Spenders wird versucht, die Transplantatabstoßung zu therapieren.

Werden bei malignen Grunderkrankungen nach erfolgter HZST erneut Tumorzellen im Blut gefunden, so spricht man von einem Rezidiv. In diesem Fall kann unter anderem durch Infusionen von Spender- beziehungsweise Donor-Lymphozyten, sogenannte DLIs, versucht werden Rezidivfreiheit zu erreichen, da die Donor-Lymphozyten die Tumorzellen angreifen.

Zu den Spätfolgen der HSZT gehören insbesondere Kardiomyopathien, Schilddrüsenfunktionsstörungen, vermindertes Längenwachstum, Osteoporose, Infertilität sowie Sekundärmalignome, über die der Patient entsprechend aufgeklärt werden sollte.⁸ Diese sind wahrscheinlich Resultate der Konditionierung, der prätransplanten Morbidität, sowie von Infektionen und der GvHD im Rahmen der Transplantation. Es existieren Empfehlungen für Screenings in der Langzeitbetreuung, um eine optimale Patientenbetreuung zu gewährleisten.⁹ Die Immunsuppression, die in der Anfangsphase nach Transplantation notwendig ist, um einer GvHD vorzubeugen, kann meist nach einem Jahr reduziert und schließlich sogar ganz abgesetzt werden. Nach erfolgtem Anwachsen des neuen Immunsystems weist dieses sämtliche Merkmale des Immunsystems des einstmaligen Donors auf. Hier besteht ein Unterschied zur soliden Organtransplantation, bei der die Immunsuppression lebenslang notwendig ist, da das Immunsystem nicht adaptiert.

Während in der Erwachsenen-HSZT eher maligne Erkrankungen eine Rolle spielen, stehen im pädiatrischen Bereich auch benigne Erkrankungen wie Hämoglobinopathien,

Stoffwechseldefekte und Immunopathien im Fokus. Eine Hämoglobinopathie, die vor allem bei Patienten aus dem Mittelmeerraum, Zentralafrika, dem Nahen Osten und Indien auftritt, ist die Sichelzellerkrankung. Da alle Patienten, die in diese Arbeit eingeschlossen wurden, von der Sichelzellerkrankung betroffen sind, wird diese hier in Kürze besprochen. Durch Mutationen im HbB-Gen resultiert eine relative Resistenz gegen Malaria, genauer gegen deren schwere Verlaufsformen, weshalb die Sichelzellerkrankung als evolutionsbiologischer Überlebensvorteil in den oben genannten Regionen diskutiert wird.¹⁰ Aufgrund der Mutation aggregiert das abnorme Hämoglobin (Sichelzeller-Hämoglobin, HbS), sobald es den Sauerstoff abgibt, und verleiht dem Erythrozyten die Sichelzellerform. Durch Verlust der Verformbarkeit werden die Erythrozyten vermehrt in der Milz abgebaut. Daraus resultiert eine hyperregeneratorische Anämie. Außerdem können die dysproportionierten roten Blutzellen vor allem im peripheren Kapillarnetz aggregieren, was zu Infarzierungen mit typischen Symptomen wie Schmerzen in den Akren, vor allem bei Kälte, und selten Priapismus führen kann. Sind Lunge oder Milz von der Infarzierung betroffen, so kann das akute Thoraxsyndrom mit Tachydyspnoe, Thoraxschmerzen und radiologisch mit neu aufgetretenem Infiltrat sowie die Milzsequestration auftreten, bei der es zur relativen Anämie bis hin zum Volumenmangelschock kommen kann. Alle Patienten mit einer Sichelzellerkrankung sind von Beginn an funktionell asplen, was mit Infektanfälligkeit vor allem für bekapselte Erreger einhergeht. Auch Hirngefäße können von Infarkten betroffen sein, was sich klinisch als Apoplex manifestiert. Ist die Niere betroffen, so zeigt sich dies akut durch Makrohämaturie und längerfristig durch die Entwicklung einer Niereninsuffizienz. Die Diagnose einer Sichelzellerkrankung wird durch Bestimmung eines kleinen Blutbilds, Differentialblutbild inklusive Retikulozyten, Hämoglobinelektrophorese sowie Molekulargenetik in Zusammenschau mit der klinischen Erscheinung gestellt. Therapiert wird die Sichelzellerkrankung zum einen symptomatisch durch Infektprophylaxe mit Penicillin, durch Hydroxycarbamid, welches die HbF-Synthese induziert, analgetisch sowie durch Transfusionen und Austauschtransfusionen. Kurativ kann die Sichelzellerkrankung durch die hämatopoetische Stammzelltransplantation behandelt werden.¹¹⁻¹³ Indikationen zur HSZT sind im Fluss begriffen. Bei Patienten mit einem vorhandenen Geschwisterspender ist die HSZT der *standard of care*. Bei symptomatischen Patienten und Vorhandensein eines HLA-identen Fremdspenders besteht generell die relative Indikation zur HSZT. Zu bemerken ist noch, dass gerade bei einer benignen Erkrankung wie der Sichelzellerkrankung die GvHD besonders gefürchtet ist, da hier die obligat zusammen mit dieser auftretenden Graft-versus-Leukämie-Reaktion (GvL, vgl. Kap. 1.3.2) keinen Nutzen für die Patienten bringt.

1.2 Antigenpräsentation und Alloreaktivität

1.2.1 Immunologische Grundlagen der T-Zell-Immunität

Das HLA, auch Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC), hat als Hauptfunktionen die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen sowie die Detektion von Pathogenen und nimmt somit eine Schlüsselfunktion für das adaptive Immunsystem ein. Beides geschieht durch die Präsentation von endo- und exogenen Peptiden durch polymorphe Zelloberflächenproteine, die durch die Genloci auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 kodiert werden.¹⁴ Eine hohe Rekombinationsrate sowie die Möglichkeit eine Vielzahl von Allelen zu exprimieren, garantiert den hohen Polymorphismus der HLA-Moleküle.^{15,16} Zwei Klassen von HLA sind bekannt, die jeweils aus einer α -Kette sowie einer β -Kette bestehen: HLA-Klasse I, kodiert von den HLA-Loci A,B, und C sowie HLA-Klasse II, deren Kodierung auf die HLA-Loci DR, DQ, DP zurückgeht (Abb. 1).¹⁷

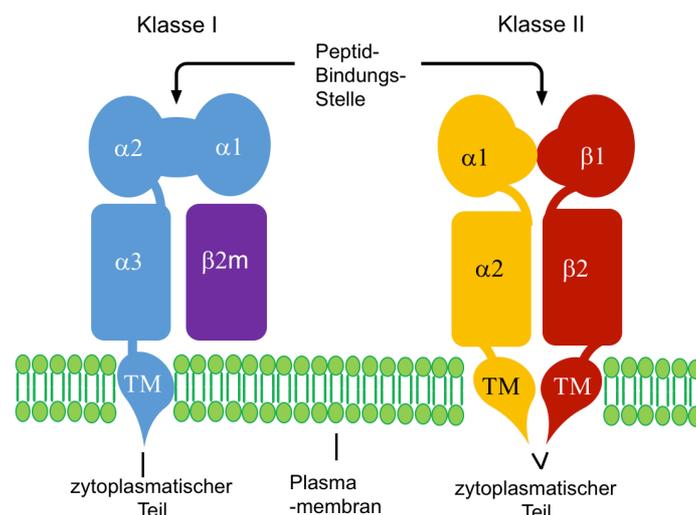


Abb. 1: HLA-Klassen nach Klein et al., 2000.

HLA-Moleküle der Klasse I und II bestehen aus einer α -Kette sowie einer β -Kette. Die Moleküle der HLA-Klasse I bestehen aus drei α -Untereinheiten, einer β -Untereinheit, einem Transmembrananteil (TM) sowie einem zyttoplasmatischen Teil. In ihrer Peptid-Bindungsstelle (α -1 und α -2) können Peptide mit einer Länge von 8 bis 12 Aminosäuren gebunden werden. Sie werden von $CD8^+$ Zellen erkannt und auf fast jeder Körperzelle exprimiert, lediglich ihre Dichte variiert.¹⁴ Klasse II Moleküle sind Heterodimere mit zwei Transmembrananteilen sowie zwei zyttoplasmatischen Untereinheiten. Die Bindungsstelle (α -1 und β -1) bindet Peptide von 15 bis 24 Aminosäuren Länge und wird von antigenpräsentierenden Zellen erkannt.

HLA-I-Moleküle, die vor allem Auto-Antigene und virale Proteine binden, werden als HLA-I-Peptid-Komplex (pHLA-I) von $CD8^+$ T-Lymphozyten erkannt.¹⁸ Die am Komplex beteiligten Peptide sind Produkte aus im Proteasom verstoffwechselten Proteine.¹⁴ Erkennt eine $CD8^+$ T-Zelle die Antigene aus körpereigenen Proteinen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR), wird diese

nicht aktiviert. Wird jedoch beispielsweise ein virales Peptid im pHLA-I von der T-Zelle erfasst, wird diese aktiviert und eliminiert die pHLA-I präsentierende Zelle.¹⁹ Dies geschieht entweder durch eine Perforin-Granzym-Kaskade, an deren Ende die Perforation der Membran der Zielzelle steht, oder durch die Interaktion des Fas-Rezeptor (FasR, CD95) der T-Zelle mit dem Fas-Ligand (FasL) der Zielzelle, wodurch eine Apoptose der Zielzelle ausgelöst wird, die durch intrazelluläre Initiator- und Effektorcaspasen vermittelt wird. Granzyme sind Serinproteasen. Humanes Granzym B (Serinprotease B, Granzym 2) ist eine der fünf vom Menschen synthetisierten Granzyme (A, B, G, H und K) und wird vor allem von zytotoxischen T-Zellen (CTL) sowie Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in Granula gespeichert. Bei Aktivierung ausgeschüttet bindet es an seinen Rezeptor Mannose-6-Phosphat/Insulin-like Wachstumsfaktor-II-Rezeptor und führt zur Apoptose der Zielzelle. Etwa ein Fünftel der CD8⁺ T-Zellen exprimiert Granzym B.²⁰ HLA-II wird nur von antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie beispielsweise Monozyten, B-Zellen oder Dendritischen Zellen (DC) exprimiert. HLA-II wird mit Peptiden (Länge 15 bis 24 Aminosäuren) von endozytierten, extrazellulären Proteinen nach lysosomaler Verarbeitung beladen. Der HLA-II-Peptid-Komplex (pHLA-II) wird von CD4⁺ T-Helfer-Zellen erkannt. Diese rekrutieren wiederum andere Immunzellen wie beispielsweise B-Zellen im Rahmen einer Immunantwort.¹⁴

Da es sich bei der HLA-Interaktion um das Zusammenspiel aus zwei Partnern handelt, ist es ebenfalls wichtig, die Funktionsweise der T-Zellen bzw. die Funktion des TCR zu erläutern. Auch dieser ist hoch polymorph und besteht ebenfalls aus einer α -Kette und einer β -Kette (Abb. 2²¹). Die Vielfalt an TCR-Expressionsmöglichkeiten wird durch drei Gen Loci (V, D und J) auf Chromosom 7 und 14 garantiert. Somatische Rekombination, eine unabhängige Expression von α - und β -Kette sowie Insertionen von N- oder P-Nukleotiden resultieren in einer möglichen Expressionsvariation von bis zu circa 10^8 verschiedenen TCRs.^{14,22-24}

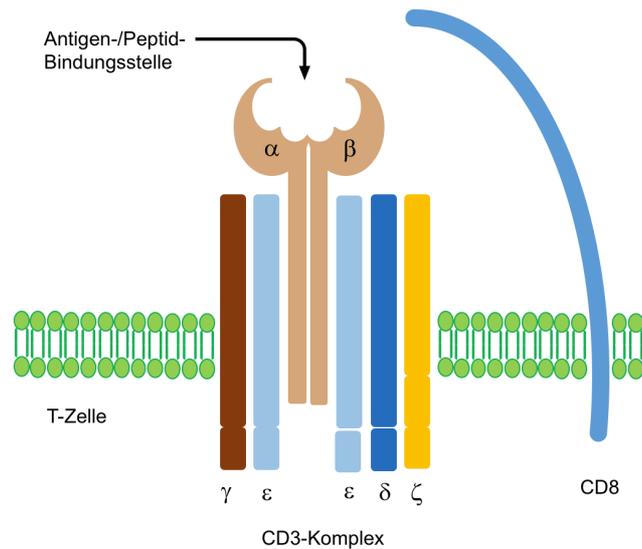


Abb. 2: T-Zell-Rezeptor (= CD3) nach Kershaw *et al.*, 2013. Darstellung des CD3-Komplexes und seiner Untereinheiten (α , β , γ , ϵ , δ , ζ) einer CD8⁺ T-Zelle.

Das Umordnen des TCR findet im Thymus statt, wo auch ein weiterer wichtiger Prozess der T-Zell-Reifung, die positive und die negative Selektion, stattfindet. Nach erfolgter Migration vom Knochenmark in den Thymus werden die noch unreifen T-Zellen mit auto-HLA-Molekülen auf Thymusepithel konfrontiert – die sogenannte positive Selektion. Werden auto-HLA-Moleküle erkannt, bekommt die T-Zelle Signale, die sie zum Überleben braucht, sonst geht sie aufgrund von Vernachlässigung in die Apoptose.^{25,26} Während der negativen Selektion werden T-Zellen, die mit zu hoher Affinität auf auto-Peptide im pHLA-Komplex reagieren, ausgelöscht. Hierdurch werden autoreaktive T-Zellen beseitigt.²⁷

Erkennt eine reife T-Zelle einen pHLA-Komplex (T-Zell-*Priming*), ist zur Aktivierung ein co-stimulatorisches Signal notwendig.²⁸ Hierbei handelt es sich um das Transmembranprotein CD28 auf der T-Zelle, das mit einem Transmembranprotein aus der B7-Familie (CD80 oder CD86) interagiert (Abb. 3, B²⁹). Bei T-Gedächtnis- oder T-Effektorzellen reicht dagegen meist das Signal durch den TCR zur Aktivierung, das co-stimulatorische Signal verstärkt die Reaktion (additiver Effekt).^{30,31} Ein weiterer co-stimulatorischer Rezeptor ist CD137, auch bekannt als 4-1BB. Er gehört zur Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Superfamilie. Als Mono-, Di- oder Tetramer wird er auf aktivierten T- und B-Zellen exprimiert und interagiert mit dem 4-1BBL Ligand (4-1BBL).³² Speziell bei CD4⁺ T-Zellen spielt das Transmembranprotein CD154 (CD40 Ligand, CD40L) als Co-Stimulus für die B-Zell-Aktivierung, die CD40 exprimieren, aber auch für die Synthese von T-Zell-Zytokinen eine Rolle.³³ Einmal aktiviert, sezerniert die T-Zelle Interleukin (IL)-2, einen potenten T-Zell-Wachstumsfaktor, der maßgeblich zu deren klonaler Expansion beiträgt.¹⁴

Die oben beschriebenen immunologischen Mechanismen bezeichnet man als zentrale Toleranz. Da diese nicht immer ausreicht, um alle autoreaktiven T-Zellen zu beseitigen, nutzt der Körper weitere Mechanismen, um chronischer Entzündung vorzubeugen – die periphere Toleranz. Dies geschieht in lymphatischem Gewebe außerhalb des Thymus und des Knochenmarks. Eine Schlüsselfunktion spielen hierbei immunsuppressive regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die entweder direkt aus dem Thymus stammen oder sich aus reifen naiven $CD4^+$ T-Zellen in der Peripherie entwickeln.³⁴ Auch einige Subpopulationen von B-Zellen, NK-Zellen, Dendritischen Zellen, Makrophagen sowie Mesenchymalen Stromazellen weisen regulatorische bzw. immunsuppressive Eigenschaften auf.³⁵

1.2.2 T-Zell-Alloreaktivität

Immunologische Erkennung und Abstoßung oder Vernichtung von transplantierten Spenderzellen beziehungsweise die Mechanismen, die daran beteiligt sind, werden gemeinhin als Alloreaktivität beschrieben.²⁹ Die Stärke der Immunantwort beruht zu großen Teilen auf der Diversität von Spender und Empfänger, die sich vor allem über die oben beschriebenen MHC-Moleküle ausdrückt.³⁶ Allgemein gilt es vor jeder allogenen Gewebetransplantation das Hindernis der körpereigenen Immunabwehr zu überwinden. Diese erkennt prinzipiell jedes Fremdmaterial als solches und eliminiert dieses, während eigenes Gewebe toleriert wird. Andererseits können Immunzellen, werden sie in einen immundefizienten Empfänger transplantiert, diesen als fremd erkennen und angreifen (Graft-versus-Host-Reaktion). Durch *Matching* von Donor und Empfänger sowie durch Suppression des Empfänger-Immunsystems diese Barrieren zu überwinden, sind die Meilensteine, die es ermöglicht haben, solide sowie hämatopoetische Transplantationen zu festen Bestandteilen des klinischen Alltags zu machen. Ein bis zehn Prozent aller gesunden menschlichen T-Zellen sind dazu in der Lage, fremdes humanes Gewebe zu erkennen.³⁷⁻³⁹ Verglichen mit der Pathogenreaktivität, die bei 0,001 Prozent liegt, handelt es sich hierbei um eine sehr hohe Zahl.^{40,41} Zur Erklärung werden vor allem zwei Theorien herangezogen. Bei der ersten Theorie spielt die positive und negative Selektion im Thymus eine Rolle (siehe Kap. 1.2.1). Bindet eine Zelle die präsentierten Antigene zu stark, so wird sie eliminiert – bindet sie diese zu schwach, stirbt sie durch Neglect. Dieser Auswahlprozess generiert T-Zellen, welche die präsentierten auto-HLA-Moleküle nur mäßig stark binden. Das kann man mit einer gewissen Toleranz für die Erkennung von fremd (allo)-HLA-Komplexen in Verbindung bringen.⁴² Ein weiterer Erklärungsansatz besagt, dass ein gewisser Anteil an TCR-HLA-Kontakten angeboren ist und nach dem Thymus-*Priming* der T-Zellen bestehen bleibt.⁴³ Auch spielt sicherlich die Tatsache eine Rolle, dass nicht immer der

ganze pHLA-Komplex erkannt wird, sondern es auch TCR-HLA-Interaktionen gibt, die HLA-dominant oder Peptid-dominant ablaufen. Ebenfalls existieren Mischformen der Interaktion.¹⁴ Eine klar abgegrenzte allospezifische T-Zell-Population kann man überdies nicht fassen, da die *Cross*-Reaktivität der pathogen-spezifischen T-Zellen zusätzlich zur Alloreaktivität beiträgt.⁴⁴ An der Alloreaktion beteiligte Zellen sind vor allem Zellen des adaptiven Immunsystems (B-, T- und NK-Zellen).³⁶ Die Theorie der *Cross*-Reaktivität wird von Litjens *et al.* unterstützt, die allospezifische T-Zellen in Anwesenheit von Co-Stimuli (CD28, CD49d) nachweisen konnten: Es kam hierbei zur *Crosslink*-Aktivierung virusspezifischer T-Memory-Zellen mit fremd-pHLA-Komplexen.⁴⁵

Wie bereits in Kap 1.2.1 beschrieben, braucht es einen allo-MCH-Peptid-Komplex sowie einen Co-Stimulus, beides präsentiert von einer APC, damit sich eine naive T-Zelle in eine Effektor-T-Zelle differenzieren kann. Zurzeit gibt es drei etablierte Möglichkeiten der T-Zell-Alloreaktivität (Abb. 3).²⁹ Als erste Möglichkeit, dem „Direkten Weg“, kann der von den Donor-Lymphozyten präsentierte allo-HLA-Komplex in der Peripherie des Empfängers direkt von Empfänger-T-Zellen erkannt werden. Dies führt zur schwerwiegenden Komplikation der akuten Abstoßung, die durch präformierte T-Effektor- und T-Gedächtnis-Subpopulationen vermittelt wird, welche nach dem Stimulus direkt aktiviert werden können.⁴⁶ Für die hämatopoetische Stammzelltransplantation wäre es *vice versa*, da in diesem Fall die transplantierten Donor-T-Zellen das neue eigene Immunsystem werden und demnach die eigentlichen auto-pHLA-Komplexe des Empfängers nun die allo-pHLA-Komplexe darstellen. Bei der zweiten Möglichkeit, der „Indirekten Aktivierung“, werden allo-HLA-Moleküle oder *minor histocompatibility antigens* (mHags) von autologen antigenpräsentierenden Zellen prozessiert und als Peptid-Teil des auto-pHLA-Komplexes den eigenen T-Zellen präsentiert. Die Folge ist die klonale Expansion der allospezifischen Zellen nach Aktivierung. In der soliden Organtransplantation wird diese Form der Aktivierung mit chronischer Abstoßung in Verbindung gebracht.^{47,48} In einem dritten, „Semidirekten Weg“ werden allo-HLA-Moleküle durch Endozytose in die auto-APC aufgenommen und auf deren Oberfläche präsentiert. Diese chimären auto-APCs können nun sowohl direkt T-Zellen aktivieren als auch prozessierte allo-HLA-Moleküle auf auto-pHLA-Komplexen präsentieren und so dem „Indirekten Weg“ folgen.⁴⁹ Wie auch für die pathogen-getriggerte Aktivierung von T-Zellen wird für die Alloreaktion ein zweiter Stimulus benötigt, um die T-Zelle zu aktivieren. Tritt kein Co-Stimulus auf, so führt dies zur Antigen-spezifischen T-Zell-Toleranz.⁵⁰ Demnach haben APCs eine besonders wichtige Rolle in der Alloreaktion.⁵¹

Ganz anders funktioniert die Aktivierung von NK-Zellen. Sie reagieren auf die Abwesenheit oder Divergenz von körpereigenen MHC Komplexen und attackieren Zellen, die keinen oder einen fremden MHC-Komplex auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Fremd-Intoleranz bzw. Selbst-Toleranz wird durch *Killer Cell Immunoglobulin-like* Rezeptoren (KIR) vermittelt. Auch das KIR-System ist extrem vielgestaltig und etwa vergleichbar mit dem HLA-System.⁵² Die Studienlage der letzten Jahre ergibt, dass die Rolle von NK-Zellen die Transplantation betreffend sehr komplex ist, da sie sowohl allogene als auch autoimmune Reaktionen unterdrücken können und ihnen somit eine regulatorische Funktion innewohnt.⁵³

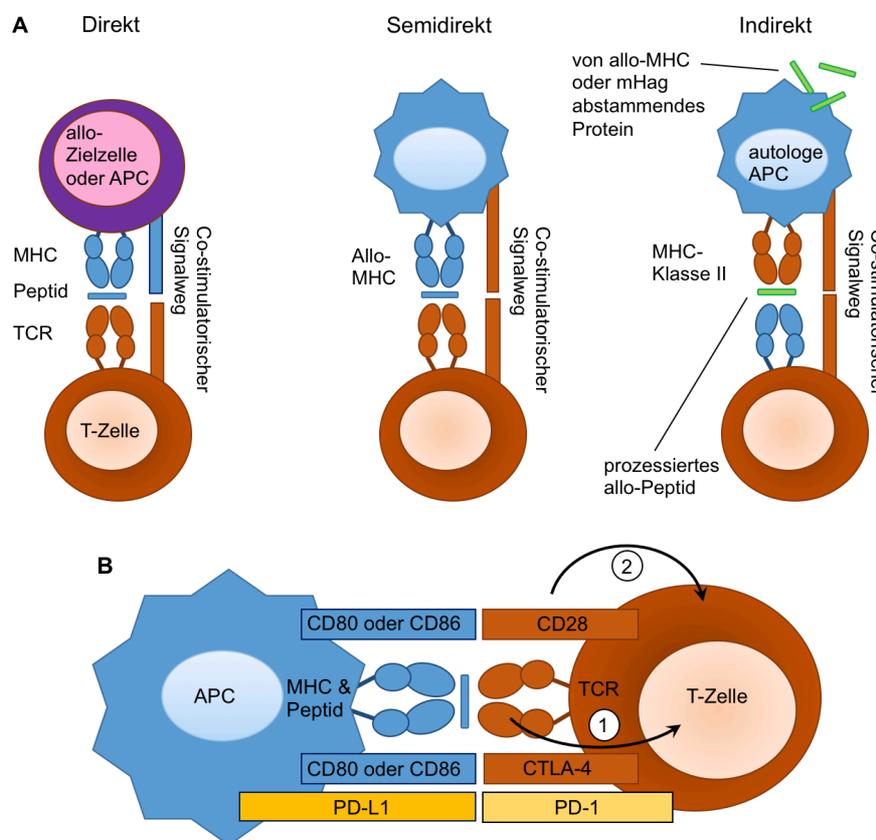


Abb. 3: Modell der T-Zell-Alloaktivität nach Zakrzewski *et al.*, 2014: Mechanismen der Alloaktivierung (A), Möglichkeiten der Interaktion zwischen antigenpräsentierender Zelle (APC) und T-Zelle (B).

A: Die drei Möglichkeiten der zellulären Alloaktivierung sind hier gezeigt: Der „Direkte Weg“, wobei die T-Zelle den allo-MHC-Peptid-Komplex direkt erkennt; der „Indirekte Weg“, bei dem die auto-APC prozessierte allo-MHC-Komplexe als Peptid im eigenen MHC-Peptid-Komplex zeigt sowie der „Semidirekte Weg“, eine Kombination aus „Direktem Weg“ und „Indirektem Weg“. Die Prozessierung der allo-MHCs erfolgt hierbei wie beim „Indirekten Weg“, die direkte Präsentation der allo-MHCs ist durch vorherige Endozytose derselben möglich. **B:** Eine APC interagiert im ersten Schritt über ihren MHC-Peptid-Komplex mit der T-Zelle durch ihren T-Zell-Rezeptor (TCR). Im zweiten Schritt erfolgt entweder ein Co-Stimulus (CD80/86 und CD28), der zur Aktivierung der T-Zelle führt, oder ein negatives Feedback über das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein (CTLA)-4, welches die Proliferation der T-Zelle herunter reguliert. Interagieren die beiden Zellen über Programmirtes-Zelltod-Protein (PD)-1 und seinen Liganden, PD-L1, wird die Apoptose der T-Zelle induziert.

1.3 Graft-versus-Host-Erkrankung

1.3.1 Pathophysiologie

Die Graft-versus-Host-Erkrankung, auch Spender-gegen-Wirt-Reaktion, wurde erstmals 1957 im Mausmodell beschrieben.⁵⁴ Auf Billingham gehen die drei Voraussetzungen für eine GvHD zurück: Das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten, der Empfänger muss Gewebe-Antigene exprimieren, die nicht im Donor vorhanden sind und der Empfänger muss immuninkompetent sein, das heißt unfähig, die transplantierten Zellen zu eliminieren.⁵⁵ Dies beschreibt exakt die Situation nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Aus neueren Studien ist bekannt, dass die immunkompetenten T-Zellen vor allem vom T-Helfer (T_H)-1-Profil sind.⁵⁶ Gewebe-Antigene, die der Donor nicht exprimiert, beziehen sich vor allem auf die MHCs (siehe Kap. 1.2.1). Jeder Patient, dessen Immunsystem durch die Konditionierung (siehe Kap. 1.1) zerstört wurde, ist unfähig die transplantierten Zellen zu eliminieren. Kurz gesagt kommt es mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer GvHD, wenn Patienten, die immunsupprimiert sind, Leukozyten eines anderen Individuums erhalten.⁵⁶

Bei der Pathophysiologie der GvHD geht man von einem dreistufigen Model aus. Zunächst wird das Gewebe durch die stattgefundene Konditionierung geschädigt. Antigenpräsentierende Zellen verarbeiten die durch Gewebeschäden freiwerdenden Moleküle und präsentieren diese auf ihren MHC II. In einem zweiten Schritt erkennen zytotoxische T-Zellen die freigewordenen Peptide und lösen nach Aktivierung einen sogenannten „Zytokinsturm“ aus, der im Zusammenspiel von löslichen Mediatoren wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1, IL-2, Interferon (IFN)- γ sowie Stickstoffmonoxid (NO) und zellulären Mediatoren (zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen) zu lokaler Gewebeschädigung führt (Abb. 4^{56,57}). Zu betonen ist, dass es sich dabei um eine physiologische Immunreaktion handelt, die durch Vorschäden ihr Ziel übertrifft.^{58,59}

Die Inzidenz von GvHD korreliert direkt mit dem Grad an *Mismatch* der MHC-Moleküle von Spender und Empfänger, das heißt, je höher die Übereinstimmung zwischen den beiden Protagonisten der Transplantation, desto weniger wahrscheinlich ist eine GvHD.⁶⁰ Die ideale Donor-Empfänger-Kombination ist für HLA-A, -B, -C, -DRB1 und HLA-DQ identisch und hat damit ein 10 von 10 *Match*.

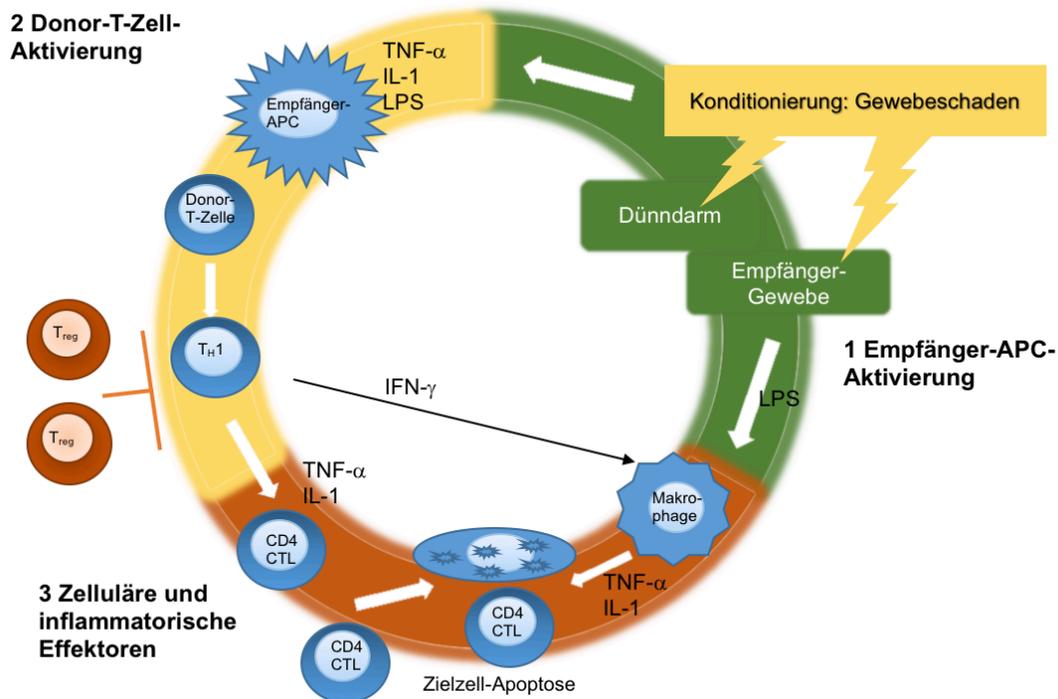


Abb. 4: GvHD-Pathophysiologie – Modell nach Ferrara *et al.*, 2009 und Zeiser *et al.*, 2017.

Im ersten Schritt „Empfänger-APC-Aktivierung“ reagiert das durch die Konditionierung vorgeschädigte Gewebe des Empfängers mit „Gefahr“-Signalen in Form von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1, der Expression von Adhäsionsmolekülen in höherer Dichte und MHC-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (APC).⁶¹ Die Gewebeschäden im Darm sind besonders entscheidend, da hier zum einen Lipopolysaccharid (LPS) frei wird, das als Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (PAMP) von Zellen der angeborenen Immunabwehr (vor allem Monozyten und neutrophilen Granulozyten) über Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR) erkannt wird und zum anderen, da das Schleimhaut-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT) in der Darmschleimhaut die Voraussetzung für die Interaktion zwischen APCs und T-Zellen liefert.^{62,63} In neueren Studien wurde gezeigt, dass *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), also intrazelluläre Moleküle, die bei Zellschaden freierwerden (beispielsweise Adenosintriphosphat, ATP, und Harnsäure), ebenfalls eine wichtige Rolle bei der GvHD-Entstehung spielen.⁶⁴ Schritt 1 schafft zusammenfassend die Voraussetzungen für das in Schritt 2 erfolgende T-Zell-*Priming* und die T-Zell-Expansion. „Donor-T-Zell-Aktivierung“ beschreibt den zweiten Schritt, in dem die Donor-T-Zellen Wirtsgewebe angreifen. Aktiviert werden diese durch die APCs und befeuert durch die „Gefahr“-Signale, welche die Expression von co-stimulatorischen Rezeptoren erhöhen.⁶⁵ Hierbei reagieren CD4⁺ T-Zellen auf autologe MHC II, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) auf autologe MHC I und beide T-Zell-Subtypen auf mHags. Im letzten Schritt „Zelluläre und inflammatorische Effektoren“ kommt es durch das Zusammenspiel zwischen zellulären Akteuren (CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen), Zytokinen (IL-1, IL-2, IFN- γ und TNF- α) sowie Stickstoffmonoxid (NO) zu einer Inflammationskaskade und lokaler Gewebeerzstörung. Diese wird durch sich im Gewebe befindliche Zellen des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise Makrophagen, weiter unterhalten. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) können die Entstehung einer GvHD hemmen.

Nichtsdestotrotz ist das HLA-*Matching* nicht allein ausschlaggebend für das Auftreten einer GvHD. 40% der identisch-transplantierten (10/10) Spender erleiden eine GvHD, die wahrscheinlich durch *minor histocompatibility antigens* (mHags) verursacht wird. Heute sind circa 50 dieser mHags bekannt, ein Großteil unterliegt jedoch noch der laufenden Erforschung. Es sind Peptide, die durch den intrazellulären Abbau von polymorphen Proteinen entstehen und

auf MHC I präsentiert werden. Die genetische Basis dieser Proteine besteht vor allem in Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), Basen-Paar-Insertionen, -Deletionen oder Kopienanzahlvariationen (CNV).⁶⁶ Die durch zytotoxische T-Zellen vermittelte Reaktion auf mHags ähnelt der Immunreaktion gegen Zellen, die mit einem Virus infiziert sind.^{67,68} Die Rolle weiterer Polymorphismen von Zytokinen, die ebenfalls in den „Zytokinsturm“ (siehe oben) involviert sind, beispielsweise TNF- α und IFN- γ , werden derzeit kontrovers diskutiert. Es wurden sowohl GvHD-verstärkende als auch GvHD-abschwächende Effekte dokumentiert.⁶⁹⁻⁷² Besonderes Augenmerk soll in dieser Arbeit auf die Zytokine gelegt werden, die bei der GvHD in großen Mengen produziert werden. Sie werden vornehmlich von T_H1-Zellen sezerniert, namentlich TNF- α , IL-2 und IFN- γ . Sowohl Spender- als auch Empfänger-Leukozyten können TNF- α produzieren. Während der GvHD besteht dessen Wirkung darin, APCs zu aktivieren sowie deren MHC-Expression zu steigern. Des Weiteren wirkt es als Chemokin, zieht Entzündungszellen an und wirkt selbst lokal nekrotisch.⁷³⁻⁷⁵ IL-2 ist als T-Zell-Promotor Ziel verschiedener prophylaktischer und therapeutischer Ansätze (vgl. Kap. 1.3.3).^{71,72}

Die zelluläre Antwort lässt sich noch weiter differenzieren. Zytotoxische T-Zellen, die Granzym und Perforin als Effektorfunktion nutzen, sind vor allem mit Gastrointestinale- und Haut-GvHD assoziiert, wohingegen CTLs, die über den Fas/FasL (CD95) mit ihrem Ziel interagieren, vor allem Leberschäden verursachen, da Hepatozyten in hohem Maß Fas exprimieren.^{59,76}

1.3.2 Symptomatik und Diagnose

30 bis 50 Prozent aller transplantierten Patienten erleiden eine akute GvHD (Grad 1 bis 4) und weitere 14 Prozent erkranken an einer schweren GVHD (Grad 3 bis 4).⁵⁷ Bis 2005 bestand die Einteilung zwischen akuter GvHD (aGvHD) bei Manifestation bis Tag 100 nach Transplantation und chronischer GvHD (cGvHD) bei späterem Auftreten wegen der zeitlichen Verschiebung durch die Nutzung von RIC und DLIs. Heute werden die verschiedenen Symptome von aGvHD und cGvHD berücksichtigt und eine *Late-onset* aGvHD, also eine GvHD nach Tag 100, sowie ein *Overlap Syndrom*, das Symptome von aGvHD und cGvHD beinhaltet, mit eingeschlossen.⁷⁷

Die aGVHD manifestiert sich an drei Organsystemen, nämlich Haut, Leber und Gastrointestinal-Trakt. Am häufigsten (bei 81% aller Patienten) und meist als erstes Organ ist die Haut betroffen. Oftmals fällt das Auftreten der GvHD-Hautsymptomatik mit dem *Engraftment* (siehe Kap. 1.1) zusammen. Charakteristisch ist ein makulopapulöses, juckendes

Exanthem, das meist an den Extremitäten beginnt, den ganzen Körper betreffen kann und nur den Kopf ausspart. In schweren Fällen kann es zu Blasenbildung und Ulzerationen kommen.⁷⁸ Der Gastrointestinal-Trakt ist bei 54 Prozent aller Patienten betroffen. Dies äußert sich zumeist in Symptomen wie Diarrhoe, es können aber auch Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen auftreten.⁷⁹ Die Diarrhoe ist sekretorisch und kann sich auf bis zu 2 bis 5 Liter pro Tag steigern. Radiologisch mutet die akute Darm-GvHD durch verdickte Dünndarmwände, lumenale Dilatation sowie im schwerwiegendsten Fall durch stehende Luft- und Flüssigkeitsspiegel als Ileus an.⁷⁸ Histologisch finden sich Ulzerationen, Apoptotische Körperchen im Kryptengrund, Kryptenabszesse und Verlust des Oberflächenepithels.⁸⁰ Die hepatische aGvHD kann schwer von anderen Komplikationen nach Stammzelltransplantation zu unterscheiden sein (Differentialdiagnosen: TAM, Sepsis, Medikamententoxizität, Eisenüberladung, virale Infektionen). In der Biopsie, für deren Durchführung streng Nutzen und Risiken abgewogen werden müssen, zeigt sich eine Entzündung des Endothels, Lymphozyteninfiltration der Portalfelder, eine Pericholangitis sowie eine Zerstörung des Gallengangsystems.^{81,82} Gemessen wird die Leber-aGvHD an der Höhe des Bilirubins im Serum. Die Einteilung der Schweregrade der aGvHD erfolgt anhand der drei betroffenen Organe und ist in Tabelle 1 dargestellt. Die zusammenfassenden Grade werden wie in Tabelle 2 zu sehen in vier Stufen eingeteilt: I (mild), II (moderat), III (schwer) und IV (sehr schwer).⁸³ Die schwere GvHD hat mit 25 Prozent Langzeitüberleben eine schlechte Prognose, für Grad IV beträgt das Langzeitüberleben sogar nur 5 Prozent.⁸⁴

Tab. 1 Organspezifische Stufeneinteilung der aGvHD nach Glucksberg *et al.*, 1974; revidiert von Przepiorka *et al.*, 1994

Stufe	Haut/Makulopapulöses Ekzem	Leber/Bilirubin	Gastrointestinal/Diarrhoe
+	<25% der Körperoberfläche	34-50 µmol/l	>500 ml
++	25-50% der Körperoberfläche	51-102 µmol/l	>1000 ml
+++	Generalisierte Erythrodermie	103-255 µmol/l	>1500 ml
++++	Generalisierte Erythrodermie mit Bullae und Desquamation	>255 µmol/l	Schwere abdominale Schmerzen mit oder ohne Ileus

Tab. 2 Gradeinteilung der Schwere der aGvHD nach Glucksberg *et al.*, 1974; revidiert von Przepiorka *et al.*, 1994

Grad der aGvHD	Grad der Organbeteiligung
I	Haut: + bis ++
II	Haut: + bis +++; Gastrointestinal-Trakt und/oder Leber: + Leicht geminderter klinischer Allgemeinzustand
III	Haut: ++ bis +++; Gastrointestinal-Trakt und/oder Leber: ++ bis +++ Beeinträchtigter klinischer Allgemeinzustand
IV	Haut: ++ bis +++; Gastrointestinal-Trakt und oder Leber: ++ bis ++++ Stark verminderter klinischer Allgemeinzustand

Die cGvHD manifestiert sich vielfältig und ist schwer zu fassen. Am ehesten mutet sie als Autoimmunerkrankung an, die jedes Organ betreffen kann. Vor kurzem wurden die Kriterien der Diagnose überarbeitet.⁷⁷ Nachdem lange Zeit keine Erfolge auf dem Gebiet der cGVHD-Forschung zu verzeichnen waren, wurde 2017 von Zeiser *et al.* ein Modell der cGVHD-Pathophysiologie veröffentlicht.⁸⁵ Hierbei spielen zum einen, wie bei der aGVHD, Gewebeschäden und die dadurch entstehende Inflammation eine Rolle, zum anderen scheinen aber auch Typ 17 T-Helfer-Zellen (T_{H17}) beteiligt zu sein. Der Verlust von Thymusepithel, der das Einbüßen der positiven Selektion zur Folge hat sowie die dadurch fehlenden regulatorischen T- und B-Zellen und schlussendlich eine Aktivierung von Fibroblasten durch verschiedene Zytokine tragen ebenfalls maßgeblich zur Entstehung der cGvHD bei.⁸⁵ Entstehen kann die cGvHD sowohl *de novo*, aber auch progredient aus der aGvHD oder nachdem eine stattgehabte aGvHD ausgeheilt war. Das vorherige Auftreten einer aGVHD ist zusammen mit hohem Alter des Empfängers oder Spenders, der Verwendung von Transplantaten aus peripherem Blut, einem HLA-*mismatch*, sowie der Stammzelltransplantation von weiblichen Spendern in männliche Empfänger ein Risikofaktor für die cGvHD.⁸⁵ Des Weiteren ist die cGvHD der größte Faktor für die Rezidiv-unabhängige Letalität nach Stammzelltransplantation.⁸⁶ Ein großes Risiko geht von einer Lungenbeteiligung der cGvHD aus, der Bronchiolitis obliterans, die therapeutisch schwer beherrschbar sein kann.⁸⁷

Gleichzeitig mit der GvHD tritt die Graft-versus-Leukämie-Reaktion (GvL) auf, die ebenfalls schon 1957 bei Mäusen entdeckt und später als positiver Prädiktor für das Überleben von Leukämiepatienten nach allogener Stammzelltransplantation beschrieben wurde.^{88,89} Hierbei

werden die Tumorzellen durch die transfundierten Spenderleukozyten eliminiert. Deshalb zielen neue Therapien auf die Elimination des GvHD-Effektes ab, ohne den GvL-Effekt zu tangieren.

1.3.3 Prophylaxe und Therapie

Um einer GvHD vorzubeugen, werden bei einer Stammzelltransplantation unter anderem Methotrexat (MTX), Ciclosporin A (CsA) und Tacrolimus eingesetzt. Ciclosporin A und Tacrolimus sind Calcineurin-Inhibitoren und hemmen die T-Zell-Aktivierung.⁹⁰ Dass Methotrexat einen dämpfenden Effekt auf die GvHD hat, wurde bereits kurz nach deren Auftreten im Mausmodell herausgefunden.⁹¹ 1962 entdeckt, wurde Ciclosporin A dagegen erst deutlich später gemeinsam mit Methotrexat als Standardprophylaxe für GvHD verwendet.⁹² Ciclosporin A, Methotrexat, Tacrolimus sowie weitere sich aktuell in der Forschung befindliche monoklonale Antikörper richten sich gegen das in der aGVHD produzierte IL-2 bzw. gegen dessen Rezeptor.⁹⁰

Da die T-Zellen in der Pathophysiologie eine entscheidende Rolle spielen (siehe Kap. 1.3.1), wurden verschiedene Methoden der *Graft*-Manipulation erforscht, bei denen T-Zellen auf unterschiedliche Weise und in unterschiedlichem Ausmaß depletiert werden. Dies geschieht entweder durch positive CD34⁺-Auswahl, durch negative T-Zell-Selektion, beides *ex vivo*⁷, oder die Applikation von T-Zell-Antikörpern *in vivo*⁹³. Allerdings führt sowohl eine partielle als auch eine komplette T-Zell-Depletion zwar zu geringerer GvHD-Manifestation, dafür aber zu mehr Rezidiven maligner Grunderkrankungen, Transplantatversagen sowie Infektionen.⁹⁴⁻⁹⁶ Anti-Thymozyten bzw. Anti-Lymphozyten Globulin (ATG) ist der besterforschte Antikörper der *in vivo* zur GvHD-Prophylaxe gegeben werden kann. Dieser wird aus dem Serum gegen-Thymus-Antigen-immunisierter Mäuse entnommen und zeigt trotz einiger biologischer Schwankungen in seiner Wirkung einen protektiven Effekt gegen chronische Lungendysfunktion sowie schwere cGvHD, wenn er vor Transplantation verabreicht wird.^{97,98} Auch die Reduktion der Konditionierungsintensität (RIC), die vor Transplantation für den Gewebeschaden und das proinflammatorische Milieu beim Empfänger verantwortlich ist, führt zu einer weniger starken GvHD. Allerdings wird diskutiert, dass es sich hierbei mehr um eine Verschiebung der Symptome zur bereits erwähnten *Late-onset* aGvHD oder zum *Overlap Syndrom* handeln könnte.^{99,100}

Die seit über 40 Jahren angewandte Erstlinientherapie der aGvHD ist der Einsatz von Steroiden, zusammen mit dem Anstreben von hochnormalen Serumspiegeln des verwendeten Immunsuppressivums.¹⁰¹ Leichte Hautsymptome werden in der Regel topisch therapiert. Bei

schwereren Graden der Haut-GvHD und jedem Auftreten von gastrointestinaler GvHD wird mit Steroiden (Dosierung: 2 mg/kg Körpergewicht) begonnen. Auf Steroide reagieren weniger als die Hälfte aller Patienten mit kompletter Remission.¹⁰² Je schwerer der GvHD-Grad, desto höher der Anteil der steroidrefraktären Patienten.¹⁰³ Ein fehlendes Ansprechen auf Corticosteroide ist definiert als eine progressive Symptomatik unter 3 Tagen Dauer oder ein ausbleibender Symptomregress innerhalb von 5 bis 14 Tagen nach Start der Therapie.¹⁰⁴ Es muss betont werden, dass Steroide in ihrer breiten, unspezifischen immunsuppressiven Wirkung Infektionen begünstigen, für die Patienten gerade nach Transplantation vulnerabel sind.

Ein weiterer Therapieansatz ist die extrakorporale Photophorese (ECP), welche im Tiermodell zur GvHD-Reduktion durch Erhöhung des Anteils der regulatorischen T-Zellen geführt hat.¹⁰⁵ In klinischen Studien wurde die ECP bei akuter sowie chronischer GvHD mit geringen Nebenwirkungen und effektiver Symptomkontrolle durchgeführt.¹⁰⁶ Auch Rezeptoren gegen das im „Zytokinsturm“ beteiligte TNF- α , wie zum Beispiel Etanercept, unterliegen aktuell der Forschung und kommen insbesondere bei schwerer steroidrefraktärer GvHD zum Einsatz, wo sie zumindest einen geringen positiven Effekt auf diese Hochrisikogruppe zu haben scheinen.¹⁰⁷ Neben den oben genannten *second line*-Therapieoptionen kommen auch anti-Lymphozyten- oder anti-Zytokin-gerichtete Antikörper, Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Janus-Kinase (JAK)-Inhibitoren, wie beispielsweise Ruxolitinib, oder mesenchymale Stammzellen als Therapieoption in Frage.¹⁰⁸

Bei der Behandlung der cGVHD sind ebenfalls Steroide die erste Wahl, allerdings ist der Effekt sehr divers. Es zeigt sich kein Unterschied von Steroiden als Monotherapie im Vergleich zu Steroiden zusätzlich zu Calcineurin-Inhibitoren.¹⁰⁹ Auch bei der cGVHD haben Steroide immer noch großes Risiko, zu infektiösen Todesfällen zu führen. Die ECP hat auch hier einen signifikant positiven Effekt auf Hochrisikopatienten und zeigt gute Remissionsergebnisse für Leber, orale Mukosa, Auge, Lunge und Haut.¹¹⁰ Ausgehend von den in Kapitel 1.3.2 genannten pathophysiologischen Erkenntnissen, die neue Ansatzpunkte für mögliche Therapien bieten, werden diese neuen Therapieoptionen derzeit in vielen Studien erprobt. Hierbei geht es unter anderem um die Blockade von Zellaktivierung durch direkte Zytokin-Antagonisierung oder durch Hemmung von intrazellulären Signalwegen.⁸⁵ Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die cGVHD eine optimale Supportivtherapie, breite Prophylaxe gegen Infektionen sowie ein multidisziplinärer Ansatz wichtige Therapiepfiler der Langzeitbetreuung darstellen.¹¹¹ Die Forschung an der cGVHD gestaltet sich nichtsdestotrotz schwierig, da die niedrigen Patientenzahlen kaum klinische Studien zulassen.

1.4 T-Gedächtniszellen und deren Subpopulationen

Nachdem die T-Zelle die positive und negative Selektion im Thymus durchlaufen hat, verlässt sie diesen in Richtung Lymphknoten als reife, naive T-Zelle (T_{naive}), mit dem ihr eigenen spezifischen Epitop. Um T_{naive} Zellen nachzuweisen sind nach heutiger Meinung mindestens drei Marker notwendig.¹¹² Unter anderem der Phänotyp $CD45RA^+CCR7^+CD95^-$ kann eine naive T-Zelle nachweisen.¹¹³ Nach Antigenpräsentation durch APCs differenziert die T_{naive} in eine T-Effektorzelle, die im peripheren Gewebe die Immunantwort gegen infizierte Zielzellen durchführt und diese zerstört.¹¹⁴ Nach *Antigen Clearance*, d.h. wenn kein viruspezifisches Antigen mehr vorhanden ist, sterben mehr als 95 Prozent der Effektor-T-Zellen, während der verbliebene Rest sich zu langlebigen T-Gedächtniszellen, bzw. T-*Memory*-Zellen entwickelt.¹¹⁵ Diese T-*Memory*-Zellen sind als eine sehr heterogene Population zu begreifen, die sich in zahlreiche Subpopulationen, auch *Subsets* genannt, einteilen lässt.¹¹⁶

Schon in den 1980er Jahren entdeckte man die Marker CD45RO sowie CD45RA, zwei *Splicing*-Varianten des Gens CD45. CD45RO wird vor allem von T-*Memory*-Zellen exprimiert und wird genutzt, um T-*Memory*-Zellen von T_{naive} zu unterscheiden.¹¹⁷ Will man nun die T-*Memory*-Zellen weiter unterteilen, so ist der Chemokinrezeptor 7 (CCR 7), ein Lymphknoten-*Homing*-Rezeptor, in Kombination mit CD45RA geeignet, um zwischen den T-*Memory*-*Subsets* zu differenzieren. So wurden $CCR7^+$ *Memory*-T-Zellen, welche durch ihren Rezeptor die Möglichkeit besitzen, in sekundäre lymphatische Organe zu migrieren, zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) genannt. Ihnen fehlt die Fähigkeit zur unmittelbaren Effektorfunktion. $CCR7^-$ *Memory*-Zellen werden Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) genannt, da sie eher in peripherem lymphatischem Gewebe anzutreffen sind und unter anderem durch präformierte Perforin-Granzym-Granula zur direkten zytotoxischen Aktivität befähigt sind. T_{CM} können sich in T_{EM} differenzieren. T_{EM} sind terminal differenziert, d.h. die umgekehrte Differenzierung ist nicht möglich.¹¹⁸

Vor nicht allzu langer Zeit wurden T-Gedächtniszellen entdeckt, die von ihrem Phänotyp einer T_{naive} sehr ähnlich sind und lediglich CD95 (FasL) überexprimieren, sogenannte T-Stammzell-Gedächtniszellen (T_{SCM}).¹¹⁹ Ihnen wird ein hohes Selbsterneuerungs-Potential zugeschrieben sowie die Fähigkeit, in generell jedes T-Gedächtnis-*Subset* zu differenzieren.¹²⁰

T_{CM} beinhalten T_{SCM} , da sie auch für CD95 positiv sind. Diese beiden Populationen können durch ihre CD45RO-Expression unterschieden werden (T_{CM} sind $CD45RO^+$, T_{SCM} sind $CD45RO^-$). Ein weiteres *Subset* der T_{EM} , das CD45RA wieder exprimiert, sind die terminalen T-Effektorzellen (T_{TE} auch T_{EMRA}).¹²¹ Sie kommen vor allem unter $CD8^+$ T-Zellen vor und exprimieren Seneszenz-Marker, haben kaum Proliferationspotential und sind damit terminal

ausdifferenziert.¹²² In Abbildung 5¹²⁰ ist das momentan gängigste Modell der Differenzierungswege der T-Gedächtnis-Subsets dargestellt.

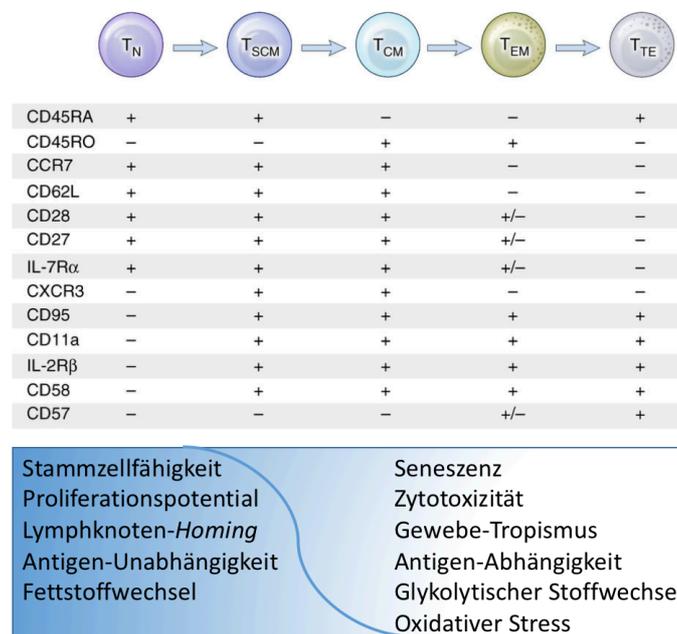


Abb. 5: Differenzierungswege sowie Oberflächenprofile der T-Memory-Subsets nach Gattioni *et al.*, 2017.

T-Gedächtnis-Subpopulationen können anhand bestimmter Oberflächenmarker unterschieden werden. Naive T-Zellen ($T_N = T_{naive}$ in dieser Arbeit) haben das größte proliferative Potential und die geringste Zytotoxizität. Entlang der Ausdifferenzierung verlieren die gezeigten Zellen ihre Stammzell-Fähigkeiten und gewinnen Effektor-Funktion.

Die Funktionen der T-Gedächtniszellen und der T_{naive} bei der GvHD nach Stammzelltransplantation suggerieren, dass diese unterschiedliche Effekte bezüglich der GvHD haben.¹²³ Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die *Subset*-Verteilung der alloreaktiven Zellen näher betrachtet werden. Auch die Funktion der T_{SCM} bei der T-Zell-Rekonstitution nach HSZT bzw. deren Beitrag zur GvHD ist Thema aktueller Forschung. Es wurde eine Korrelation zwischen aGvHD und dem Anstieg von T_{SCM} gefunden. T_{SCM} scheinen während der aGvHD die Zwischenstufe der Konversion von T_{naive} zu T-Effektor/Gedächtnis-Untergruppen zu sein.¹²⁴

1.5 Assays zur Prädiktion der Graft-versus-Host-Erkrankung

Die GvHD wird meist retrospektiv durch klinische Symptomatik und Biopsien diagnostiziert (siehe Kap. 1.3.2). Ziel aktueller Forschung ist es jedoch Prädiktionsmöglichkeiten zu finden, um bessere therapeutische Möglichkeiten zu haben.¹²⁵ Levine *et al.* publizierten 2015 einen prognostischen Score für die aGvHD, in den sie Serumlevel von Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) 1, ST2, und Reg3 α einschlossen.¹²⁶ Auch für die durch Massenspektrometrie erstellten Urinprofile,¹²⁷ mikroRNA im peripheren Blut,^{128,129} Serum-¹³⁰ und T-Zell-

Untersuchungen^{131,132} existieren Forschungsergebnisse, die in größeren Studien evaluiert werden sollen. Dennoch ist die Forschungslage auf diesem Gebiet unbefriedigend und erfordert weiteren Ideen und Ansätze.

Wirft man den Blick auf die solide Organtransplantation und die dortigen Komplikationen wie etwa eine Abstoßung, so fallen pathophysiologische Parallelen zur GvHD auf, denn auch hier spielen T-Zellen eine entscheidende Rolle.^{46,58} Speziell auf dem Gebiet der Nierentransplantation existiert ein sogenannter IFN- γ -Elispot-*Assay* (IFN- γ -Elispot, Elispot), der vor Transplantation genutzt wird um allospezifische T-Zellen zu entdecken und so eine prädiktive Aussage zur bevorstehenden Transplantation und deren Risiken zu treffen.¹³³ Dabei wird davon ausgegangen, dass T-Zellen, nachdem ihnen ein allospezifischer Stimulus präsentiert wurde, aktiviert werden und daraufhin IFN- γ sekretieren. Das sekretierte IFN- γ kann gemessen und quantifiziert werden, wobei eine höhere Anzahl positiver *Spots* mit einer höheren Anzahl präformierter allospezifischer T-Zellen und damit einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine Abstoßung korreliert.¹³⁴ Einen solchen *Assay* gibt es für allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation bisher nicht. Außerdem kann mit dem Elispot nur ein einziges Zytokin gemessen werden. Sezerniert eine allospezifische T-Zelle dieses nicht, so wird sie nicht als solche erkannt. Des Weiteren können im Elispot nur vornehmlich T-Gedächtniszellen analysiert werden.¹³⁵ Zusätzlich ist für diesen *Assay* das Überschreiten einer kritischen Zellmasse von 1:10.000 Zellen notwendig um eine allospezifische T-Zelle zu erkennen.¹³⁶

Als Möglichkeit der Bestimmung von T-Zell-Eigenschaften kam im Labor meiner Arbeitsgruppen neben dem oben besprochenen Elispot auch die Durchflusszytometrie, auch *fluorescence activated cell sorting* (FACS), in Frage. Hierbei können bis zu 17 Marker bzw. Charakteristika einer einzelnen Zelle untersucht werden, abhängig von der Anzahl der Laser.¹³⁷ Somit sind nicht nur Aussagen zur T-Zell-Aktivierung auf Einzelzellebene möglich, sondern auch eine T-Zell-*Subset*-Analyse der aktivierten Zellen. Des Weiteren könnte die Erfassbarkeit von allospezifischen T-Zellen über Co-Stimuli als Aktivierungsmarker (CD137, CD154) besser sein als über Zytokin-Aktivität (wie IFN- γ), da dadurch der *Pool* an allospezifischen T-Zellen unabhängig von deren funktionellen Differenzierung (T_{EM} , T_{CM} , T_{naive}) und deren Subtypen (T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} , usw.) beschrieben werden kann.¹³⁸ Damit ist die Durchflusszytometrie eine deutlich detailliertere und spezifischere Methode, um aktivierte allospezifische-T-Zellen zu ermitteln.

2 Aufgabenstellung

Die Kompatibilität von Spender und Empfänger einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation ist ein entscheidender Faktor für den Erfolg dieser Therapie. Der momentane Goldstandard ist die HLA-Kompatibilitäts-Prüfung von Spender und Empfänger. Anhand dieser kann die genetische Übereinstimmung von bis zu 10 Gen-Loci ermittelt werden. Trotz einer hohen genetischen Kongruenz kommt es dennoch bei vielen Patienten zu einer GvHD, eine der schwerwiegendsten Komplikationen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation.

Ziel dieser Arbeit soll es sein, eine Methode zu erproben, die eine Vorhersage über die Kompatibilität von Spender und Empfänger zur SZT zulässt. Konkret sollen im Blut des Spenders für den Empfänger spezifische alloreaktive T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Als Aktivierungsmarker wurden TNF- α , IFN- γ und IL-2 verwendet. Diese Marker und Zytokine sind vor allem ursächlich für eine T_H1 vermittelte aGvHD.⁵⁸ Weitere co-stimulatorische Signale für T-Zell-Aktivierung sind CD137 sowie CD154 (siehe Kap. 1.2.1). Aktivierte T-Zellen sezernieren IL-2, einen starken T-Zell-Wachstumsfaktor. Deshalb wurde auch dieser in das verwendete *Panel* integriert.¹⁴

Vorgehensweise:

- 1) *Panel*-Etablierung an 20 gesunden Probanden (mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht HLA-kompatibel) und Messen von T-Zell-Aktivierung anhand der Marker und Marker-Kombinationen
 - CD137, CD154, Granzym B, IL-2, TNF- α , IFN- γ
- 2) Positiv-Auswahl der geeignetsten Aktivierungsmarker nach Höhe der Induktion sowie Negativ-Auswahl nach Höhe des *Backgrounds* in unstimulierten Proben
- 3) Messen von einzelnen Patienten (Empfängern) und deren Spendern mit dem in Schritt 1) und 2) etablierten *Panel*
- 4) Versuch der Korrelation der gemessenen Patienten/Spender und deren klinischem Verlauf
- 5) Analyse der alloreaktiven T-Zellen aus 1) und 3) durch Einteilung in T-Gedächtnis-Subpopulationen und Versuch einer pathophysiologischen Hypothese

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Zellkulturlösungen und Antibiotika

Tab. 3 Verwendete Zellkulturlösungen und Antibiotika

Zellkulturlösung/Antibiotikum	Firma
Fötale Kälberserum 500ml ·BCR·S 0115	Biochrom (Berlin, DE)
Penicillin/Streptomycin 10.000 E/10.000	Biochrom (Berlin, DE)
VLE-RPMI 1640 (Very Low Endotoxin), w 2,0 g/L NaHCO ₃ , w stable glutamine	Biochrom (Berlin, DE)

3.1.2 Verwendete Chemikalien

Tab. 4 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Firma
5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester BioReagent, suitable for fluorescence, ≥90% (HPLC), CFSE	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)
Acetic acid, 5%	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)
Brefeldin A from <i>Penicillium brefeldianum</i> , ≥99% (HPLC and TLC)	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)
Dimethylsulfoxid >99,5% BioScience-Grade, M78, 13 g/mol – Dichte 1,1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, DE)
Descosept pur – Alkoholisches Schnelldesinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH (Malsfeld, DE)
HighClone Trypan Blue 0.2 um Filtered	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ionomycin Calcium Salt from <i>Streptomyces conglobatus</i>	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Molecule	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)
Staphylococcal enterotoxin B	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)

3.1.3 Verwendete Lösungen und Puffer

Tab. 5 Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Firma
Ampuwa Spüllösung 1000 ml Plastipur, Aqua ad iniectabilia, steril und endotoxinfrei	Fresenius Kabi (Bad Homburg, DE)
Biocoll Separating Solution, Isotonic Solution Density 1.077 g/ml, getestet for endotoxin	Biochrom (Berlin, DE)
CyPBS (Group Thiel, Institute for Medical Immunology, Charité Berlin) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o CaCl ₂ , w/oMgCl ₂	Gibco by life technologies/Thermo Fisher (Waltham, USA)
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

3.1.4 Verwendete Kits

Tab. 6 Verwendete Kits

Kits	Firma
Live/Dead Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, for UV excitation	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

3.1.5 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tab. 7 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
BD Vacutainer® One Use Holder	Becton, Dickinson and Company, (Franklin Lakes, USA)
BD Vacutainer® Plus blood collect tubes LH 170	Becton, Dickinson and Company, (Franklin Lakes, USA)
BD Vacutainer® Safety-Lock blood collection set	Becton, Dickinson and Company, (Franklin Lakes, USA)
CryoPure Tubes	Sarstedt (Nürnbrecht, DE)
Eppendorfgefäße (0,5-, 1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, DE)
FALCON Cell Strainer 70 µm Nylon	Corning Inc. (Corning, USA)
FALCON Conical Centrifuge Tubes (15-, 50 ml)	Corning Inc. (Corning, USA)
Pipettenspitzen steril (10-, 20-, 100-, 200-, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, DE)
Rundbodenröhrchen 5 ml, Polystyrol	Corning Inc. (Corning, USA)
Serologische Pipetten (5-, 10-, 25 ml)	Corning Inc. (Corning, USA)
Softasept® N	B Braun (Melsungen, DE)
Transferpipetten steril (3,5 ml)	Sarstedt (Nürnbrecht, DE)
Vasco Nitril Handschuhe	B. Braun (Melsungen, DE)
Zellkulturplatten 24-, 96- well	Corning Inc. (Corning, USA)

3.1.6 Verwendete Geräte

Tab. 8 Verwendete Geräte

Gerät	Firma
BD LSR Fortessa Cell Analyzer	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
Eisbad	neoLab Migge (Heidelberg, DE)
Grant Wasserbad	neoLab Migge (Heidelberg, DE)
Gefrierschrank Liebherr Premium NoFrost (-20°C)	Liebherr (Biberach an der Riß, DE)
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Hämatocytometer Deckglas 20 x 26 x 0,4 mm	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)
Kühlschrank Liebherr Profi Line (4°C)	Liebherr (Biberach and der Riß, DE)
neoLab-Vortex-Reagenzglasmixer	Grant (Cambridge, UK)
Olympus CX2 Mikroskop	Olympus (Hamburg, DE)
Pipetus 100-240 Volt	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, DE)
Pipetten (10-, 20-, 100-, 200-, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, DE)
Sanyo MCO-18AIC UV Double Stack Incubator	LabX (Midland, Kanada)
Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific (Hessisch Oldenburg, DE)
Sterilbank HERA - Safe HS12	Heraeus (Langenselbold, DE)
Zählkammer Neubauer - Improved	Laboroptik Ltd (Lancing, UK)
Ziegra Brucheis-Maschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH (Isernhagen, DE)

3.1.7 Verwendete Antikörper

Tab. 9 Verwendete FACS-Antikörper

Primärantikörper	Herkunftsorganismus	Firma	Bestellnummer	Klon
anti-CD3 Brilliant Violet 650	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	317324	OKT3
anti-CD4 PerCP/Cy5.5	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	344608	SK3
anti-CD8 Brilliant Violet 570	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	301038	RPA-T8
anti-CD45RA PE/Dazzle 594	Maus	BioLegend, (San Diego, USA)	304146	HI100
anti-CD45RO Brilliant Violet 785	Maus	BioLegend, (San Diego, USA)	304234	UCHL1
anti-CD95 (Fas) PE/Cy7	Maus	BioLegend, (San Diego, USA)	305622	DX2
anti-CD137 PE/Cy5	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	309808	4B4-1
anti-CD154 Brilliant Violet 711	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	310838	24-31
anti-CD195 (CCR7) PE	Maus	BioLegend, (San Diego, USA)	353204	G043H7
anti-Granzyme B Alexa Fluor 647	Maus	BD Biosciences, (Franklin Lakes, USA)	560212	GB11(RUO)
anti-IFN- γ Brilliant Violet 605	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	502536	4S.B3
anti-IL-2 Brilliant Violet 421	Ratte	BioLegend (San Diego, USA)	500328	MQ1-17H12
anti-TNF-alpha Alexa Fluor A700	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	502928	MAb11

Tab. 10 Verwendete Co-Stimulation

Primärantikörper	Herkunftsorganismus	Firma	Bestellnummer	Klon
LEAF (Low Endotoxin, Azide-Free) Purified anti-human-CD28	Maus	BioLegend, San Diego, USA	302923	CD28.2

3.2 Methoden

Beim Erstellen dieser Arbeit wurden die „Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis“ (Fassung 2.5.2016, zu finden unter: https://www.charite.de/fileadmin/user_upload/portal/charite/presse/publikationen/amtl-mitteilungsblatt/2016/AMB160715-175.pdf) und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen eingehalten.

3.2.1 Patienten und Probanden

Die Patienten wurden aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie der Charité Universitätsmedizin Berlin rekrutiert. Die Ethikkommission der Charité gab für diese Studie ihre Zustimmung (Ethikantragsnummer: EA2/114/15 und EA2/106/17). Einschlusskriterien waren eine bevorstehende beziehungsweise eine erfolgte hämatopoetische Stammzelltransplantation auf Station 39i im Campus Virchow-Klinikum. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden vor der Konditionierung aus heparinisiertem Blut der Patienten gewonnen und bei -80°C nicht länger als ein Jahr vor Verarbeitung aufbewahrt. Als Einfriermedium wurde fötales Kälberserum benutzt, das 10:1 mit Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt wurde. Des Weiteren wurden PBMCs von Spendern, die Familienspender bei einer haploidenten Transplantation waren, für diese Arbeit verwendet. Das Blut wurde bei diesen Spendern teilweise nach erfolgter Mobilisierung, teilweise im Verlauf entnommen und ebenfalls bei -80°C verwahrt. Für die Etablierung des Versuchs wurde 20 gesunden Probanden Blut aus einer peripheren Vene entnommen. Die Probanden gaben dazu ihr schriftlich bzw. mündliches Einverständnis. Das Blut wurde bei 4°C und im Dunkeln bis zur Verarbeitung verwahrt. Zwischen Blutentnahme und Verarbeitung lagen nie länger als vier Stunden. Haploident transplantierte Spender erhielten das Transplantat in Form peripherer Blutstammzellen nach TcR α/β /CD19-Depletion. Die Analyse der klinischen Verläufe erfolgte jeweils bis 1 Jahr *post transplantationem*.

Tab. 11 Statistische Daten der eingeschlossenen Patienten

Patienten ID	Geschlecht	Alter (bei Tx)	Erkrankung
421	männlich	9	Sichelzellerkrankung
431	männlich	8	Sichelzellerkrankung
561	weiblich	2	Sichelzellerkrankung
751	männlich	13	Sichelzellerkrankung, heterozygote α -Thalassämie

Abk.: Tx = Transplantation

Tab. 12 Statistische Daten der eingeschlossenen Spender

Spender ID	Geschlecht	Alter (bei Tx)	Verwandtschaftsgrad (Match)
42D	männlich	41	Vater (haploident, 5/10)
43D	weiblich	4	Schwester (ident, 10/10)
56D	weiblich	3	Schwester (ident, 10/10)
74D	weiblich	49	Mutter (haploident, 5/10)

Abk.: Tx = Transplantation.

3.2.2 T-Zell-Alloreaktivitäts-Assay (Allo-Assay)

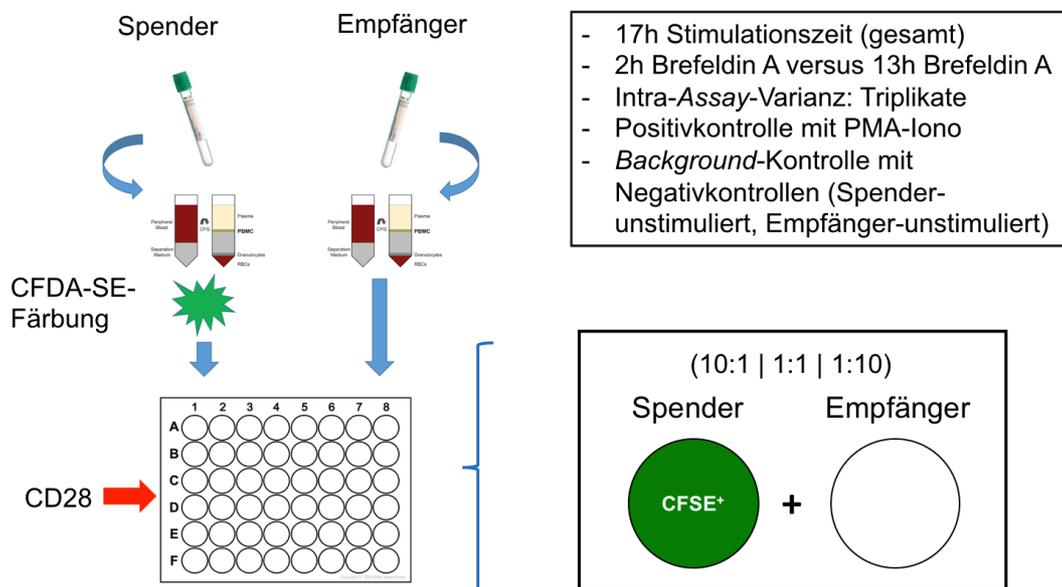


Abb. 6: Schema des Versuchsablaufs.

In Abbildung 6 ist das allgemeine Schema des Versuchsablaufs dargestellt, welcher in den folgenden Kapiteln näher erläutert wird.

3.2.2.1 PBMC-Isolation durch Dichtegradientenzentrifugation

Während der Arbeitsschritte in diesem Kapitel sowie der Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.2.3 wurde unter der Sicherheitswerkbank gearbeitet. 20 ml heparinisiertes Blut von zwei Spendern wurden jeweils 1:1 in 50 ml-Falcon-*Tubes* mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt. Zwei weitere 50 ml-Falcon-*Tubes* wurden mit 15 ml *Biocoll* befüllt und darauf je 40 ml verdünntes Blut vorsichtig aufgetragen, sodass sich zwei getrennte Schichten bildeten. Anschließend wurden die *Tubes* bei Raumtemperatur mit 1000 x g und ohne Bremse für 20 Minuten zentrifugiert. Die Bestandteile des Blutes ordneten sich nach ihrer Dichte an (Abb. 7¹³⁹). Nach der Zentrifugation wurde die PBMC-Schicht mit einer Transferpipette in ein mit 15 ml PBS vorbereitetes 50 ml-Falcon-*Tube* überführt und zwei Mal mit PBS gewaschen (4°C, 400 x g, 15 Minuten).

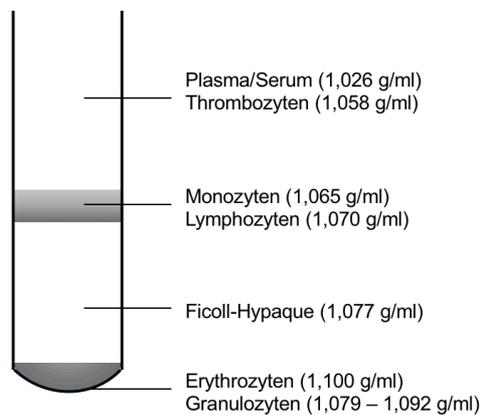


Abb. 7: Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von PBMC aus Luttmann *et al.*, 2004.

Nach der Zentrifugation ergibt sich eine Schichtung der Probe in Plasma/Serum- und Thrombozytenschicht, eine Schicht besteht aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), namentlich Monozyten und Lymphozyten, eine weitere aus Biocoll und in einer dritten Schicht lagern sich Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Gefäßes ab. Die Schichtung ergibt sich aus der Dichte der einzelnen Blutbestandteile sowie der Dichte von Biocoll, die genau bei 1,077 g/ml liegt. Die Zentrifugation beschleunigt die Verteilung der Bestandteile in die jeweiligen Schichten, deren Motor die Diffusion ist. In Klammern ist die Dichte der einzelnen Bestandteile angegeben.

3.2.2.2 Zellzählung

Vor dem zweiten Mal Waschen wurden die Zellen in 15 ml PBS gezählt. Zum Zählen der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet (Abb. 8¹⁴⁰). 10 µl der vorher resuspendierten Zelllösung wurden 1:2 mit Trypan-Blau verdünnt, welches mit fünfprozentiger Essigsäure 1:5 vorverdünnt war. Trypan-Blau färbt tote Zellen, deren Membran perforiert ist.

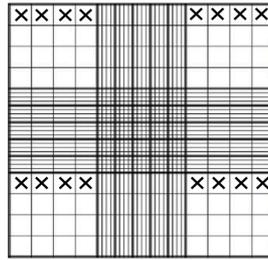


Abb. 8: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer nach Boxberger, 2007.

Die Neubauer-Zählkammer ist eine Zählkammer, die von den meisten Labors zum Zählen unterschiedlicher Zellarten verwendet wird. Gezählt wurden in diesem Versuch die in dieser Abbildung mit einem Kreuz markierten kleinen Kästchen. Die gezählte Zellzahl wurde im durchgeführten Versuch aufgrund der 1:2 Verdünnung verdoppelt, wodurch man die Konzentration als Zellzahl $\times 10^4/\text{ml}$ erhielt. Um auf Millionen Zellen pro ml zu kommen, wurde die errechnete Zahl durch 100 geteilt. Diese Zahl multipliziert mit dem vorher verwendeten Volumen PBS (ml) ergab die Gesamtzellzahl der einzelnen Probe.

3.2.2.3 CFDA-SE/CFSE-Färbung

Einer der beiden Donoren wurde beliebig für die Färbung mit 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE oder CFSE) ausgewählt (Donor 1 genannt). Dieser wurde auf eine Konzentration von 10 Mio Zellen pro ml in PBS eingestellt. Der Donor, der nicht gefärbt werden sollte (Donor 2), wurde auf 4 Mio Zellen pro ml in *Complete Medium* (CM, bestehend aus: VLE-RPMI 1640 Medium mit 50 ml hitzeinaktiviertem Fötalem Kälberserum (FCS) und 5 ml Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml / 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eingestellt. Die CFDA-SE-Färbung wurde vorab in zwei Konzentrationen (1 μM und 2 μM) sowie verschiedenen Färbezeiten (15, 30, 60 und 120 Sekunden) optimiert. Zudem wurde geprüft, ob die Fixierung der Zellen die Färbeintensität beeinflusst. Beide Optimierungsschritte sind in Abbildung 9 dargestellt.

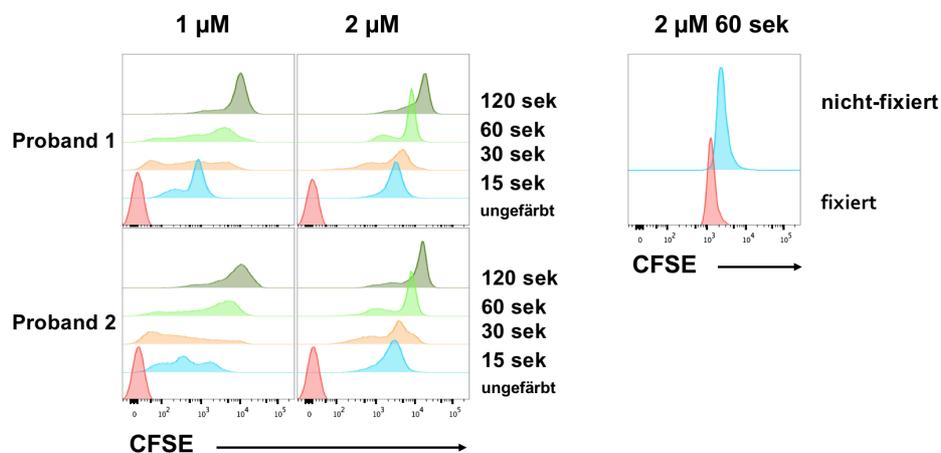


Abb. 9: Optimierung der CFDA-SE-Färbung vor der Anwendung in diesem Versuch.

Das beste Ergebnis der im linken Abbildungsabschnitt gezeigten Konzentrationen und Färbezeiten lieferte die Konzentration 2 μM CFDA-SE sowie eine Färbedauer von 60 Sekunden. Die Fixierung der Zellen hatte nur einen unwesentlichen Einfluss auf die Farbintensität (rechter Abbildungsteil).

Für die Färbung mit CFDA-SE wurde 2 μM CFDA-SE zur Zellsuspension gegeben. Da CFDA-SE in wässriger Lösung äußerst instabil ist, erfolgte die Verdünnung immer erst direkt vor der Färbung. CFDA-SE färbt alle Proteine in der Zelle und fluoresziert stark. Die Färbung diente somit dazu, die Spender in der FACS-Analyse deutlich voneinander unterscheiden zu können, was anhand der FACS-Daten in Abbildung 10 gezeigt ist. Nach 60 Sekunden wurde die Reaktion mit 10 ml FCS gestoppt, das *Tube* mit CM auf 50 ml aufgefüllt und anschließend zwei Mal mit CM gewaschen (4°C, 400 x g, 10 Minuten). Nach dem ersten Waschschrift wurden die Zellen in 15 ml CM erneut gezählt (Zielzellzahl: 4 Mio pro ml in CM). Die Konzentration der Zellen von Donor 2 konnte nun ein zweites Mal bestimmt werden. Entscheidend war ein gleiches Verhältnis der Konzentrationen von Donor 1 und 2, um für die Verdünnungen (vgl. Kap. 3.2.2.3) eine optimale Ratio zu erhalten.

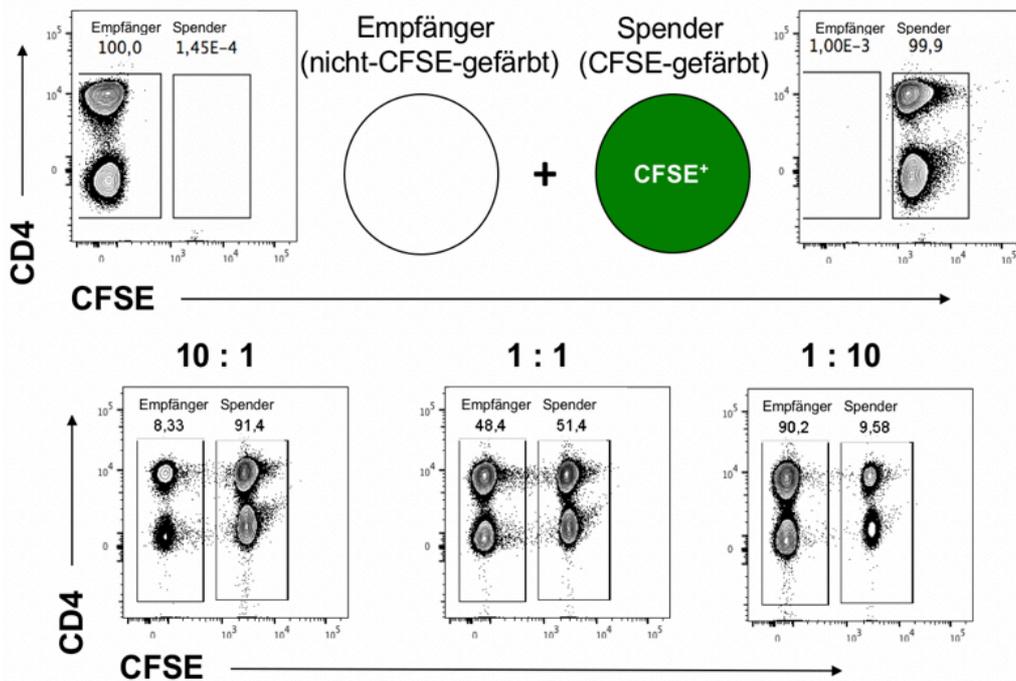


Abb. 10: FACS-Daten der CFSE-Färbung exemplarisch gezeigt für die verschiedenen Ansätze in Zellkultur jeweils für die CD4⁺ T-Zellen.

Empfänger und Spender sind zwei gesunde Donoren, von denen einer beliebig gefärbt und mit Spender (=Donor 1) bezeichnet wurde. Der andere gesunde Proband war demnach Empfänger (= Donor 2). Die Ratios sind für den Spender angegeben, die Ratios für den Empfänger ergeben sich *vice versa*.

3.2.2.4 Zellkulturansatz

Entsprechend Tabelle 13 wurden in zwei 24-Well-Platten (ein 2-Stunden- und ein 13-Stunden-Ansatz) die Zellen von Donor 1 und Donor 2 im Verhältnis 1:1, 10:1 und 1:10 zusammengegeben. Eine Übersicht über die Ansätze ist in Abbildung 10 (vgl. Kap. 3.2.2.3) als

FACS-Datensatz dargestellt. Für eine Positivkontrolle wurden in zwei separate FACS-*Tubes* je circa 100.000 Zellen von einem der beiden Donoren gegeben. Dies diente dazu, die maximale Kapazität der T-Zellen zur Zytokin-Produktion abzuschätzen. Stimuliert wurde die Positivkontrolle mit Ionomycin von *Streptomyces conglobatus* (Iono, Endkonzentration = 4 µg/ml) in Kombination mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, Endkonzentration = 2,5 ng/µl).¹⁴¹ Unmittelbar nach der Zugabe von PMA und Iono wurde mit Brefeldin A (BFA, Endkonzentration = 10 µg/ml) der Transfer vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat gestoppt. Damit verbleiben translatierte Proteine intrazellulär und werden nicht sekretiert.¹⁴² In jedes *Well* wurde 1 µl CD28 (Endkonzentration = 1 µg/ml) gegeben, welcher ein Co-Stimulus für T-Zell-Aktivierung und -Expansion ist.²⁹ Dies diente in diesem Versuch dazu, eine suboptimale Aktivierung allospezifischer T-Zellen auszuschließen und die Alloreaktion zu beschleunigen.

Tab. 13 Schematische Darstellung Zellkulturansatz

	CFSE	<i>non</i> -CFSE	CFSE	<i>non</i> -CFSE	CFSE	<i>non</i> -CFSE
1:1	2 Mio	2 Mio	2 Mio	2 Mio	2 Mio	2 Mio
10:1	2 Mio	200.000	2 Mio	200.000	2 Mio	200.000
1:10	200.000	2 Mio	200.000	2 Mio	200.000	2 Mio
<i>non</i>-CFSE	-	2 Mio	-	2 Mio	-	2 Mio
CFSE	2 Mio	-	2 Mio	-	2 Mio	-

CFSE bezeichnet die mit CFDA-SE gefärbten Zellen von Donor 1, *non*-CFSE bezieht sich auf die nicht mit CFDA-SE gefärbten Zellen von Donor 2. Ein Kästchen entspricht einem *Well*. Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl der verwendeten Zellen. Die Ausgangskonzentration für die Zellsuspension betrug 4 Mio/ml. Dementsprechend wurde in jedes *Well* 1 ml Volumen gegeben. Wurde weniger Zellsuspension eines Donors verwendet, so wurde das restliche Volumen mit *Complete Medium* auf 1 ml aufgefüllt. Die Verdünnungsangaben in der linken Spalte beziehen sich auf Donor 1. Die Verdünnung für Donor 2 ergab sich *vice versa*. Für die Co-Kulturen wurden jeweils Triplikate zur Überprüfung der Intra-Assay-Varianz angelegt (eine Zeile entspricht einer Verdünnung). Des Weiteren wurden Negativkontrollen angesetzt, ebenfalls in Triplikaten.

Für zwei Stunden wurden die 24-*Well*-Platte und die beiden FACS-*Tubes* zur Positivkontrolle bei 37°C im Brutschrank belassen. Danach wurde in den 2-Stunden-Ansatz sowie in eine der

beiden Positivkontrollen BFA (Endkonzentration siehe oben) gegeben. 13 Stunden nach Stimulation wurden der zweite Ansatz und die zweite Positivkontrolle ebenfalls mit BFA behandelt. Die zwei Ansätze wurden verglichen, um im späteren Verlauf den besten Zeitpunkt für den Golgistop zu bestimmen. Zusätzlich sollte ausgelotet werden, nach welcher Dauer eine höhere Induktion der Aktivierungsmarker erfolgt. Gleichzeitig sollten alle drei Wege der Alloaktivierung erfasst werden (siehe Kap. 1.2.2). Für weitere vier Stunden wurden alle Proben im Brutschrank belassen. Nach 17 Stunden Gesamtinkubationszeit wurden die Zellen mit einer Transferpipette geerntet. Mit einem Milliliter PBS, in Raumtemperatur, wurde das *Well* gespült. Pro *Well* wurde je ein FACS-*Tube* befüllt. Nach diesem Arbeitsschritt wurde nicht mehr unter der Sterilbank gearbeitet. Bei 4°C bei 400 x g wurden alle *Tubes* für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die *Tubes* gevortext.

3.2.2.5 FACS-Färbung

Entsprechend Tabelle 14 wurde der *Mastermix 1* für die extrazelluläre Färbung angemischt. Die Antikörper wurden in einem mit Eis gefüllten Eisbad gelagert und direkt vor der Nutzung gevortext. Antikörper der Farbe *Brilliant Violet* wurden vor Benutzung in der Minifuge wenige Sekunden zentrifugiert. In jedes *Tube* wurden 6 µl *Mastermix* gegeben und diese anschließend gevortext. Die *Tubes* wurden 30 Minuten bei 4°C und in Dunkelheit inkubiert.

Tab. 14 *Mastermix 1* für die extrazelluläre Färbung

Antikörper	Fluoreszenz	µl
1:67 LD UV	UV	1,5
1:100 CD45RA	PE/Dazzle	1
1:67 CD45RO	BV785	1,5
1:50 CD195/CCR7	PE	2

Die Gesamtzellzahl variierte in Abhängigkeit der gefärbten Probe zwischen 2 Mio und 4 Mio Zellen.

Im nächsten Schritt wurden 500 µl *Fixation/Permeabilisation Concentrate* und *Diluent* im Verhältnis 1:4 in jedes *Tube* gegeben, die *Tubes* einzeln gevortext und für 30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Danach wurden 2 ml *Permeabilisation Buffer* 10x und Ampuwa im Verhältnis 1:10 pro *Tube* hinzugefügt, wieder einzeln gevortext und bei 4°C, 450 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Proben wurden abgegossen und gevortext (siehe

oben). Ausgehend von Tabelle 15 wurde der *Mastermix 2* für die intrazelluläre Färbung vorbereitet und in jedes *FACS-Tube* 16 µl davon gegeben.

Tab. 15 *Mastermix 2* für die intrazelluläre Färbung

Antikörper	Fluoreszenz	µl
1:100 CD3	BV650	1
1:100 CD4	PerCP Cy5.5	1
1:100 CD8	BV570	1
1:100 CD95	PE Cy7	1
1:100 CD137	PE Cy5	1
1:50 CD154	BV711	2
1:20 IFN-γ	BV605	5
1:100 IL-2	BV421	1
1:50 Granzym B	AF647	2
1:100 TNF-α	AF700	1

Die Gesamtzellzahl variierte in Abhängigkeit der gefärbten Probe zwischen 2 Mio und 4 Mio Zellen.

Im nächsten Schritt wurden die Proben wieder gevortext und für 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Erneut wurde 2 ml verdünnter *Permeabilisation Buffer* in jedes *Tube* gegeben und diese wieder einzeln gevortext. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 4°C, 450 x g für 10 Minuten, danach wurden sie abgegossen und bis zur Messung bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

3.2.2.6 FACS-Messung

Vor der Messung wurden die Zellen in circa 200 µl PBS aufgenommen und gevortext. Für die FACS-Messung wurde der BD LSR Fortessa *Cell Analyzer* benutzt. Die violetten Filter wurden wie folgt getauscht: BP 525/50 gegen BP 565/50 sowie LP 505 gegen LP 550. Die Daten wurden mit der BD FACS Diva Software Version 8.0.2 erfasst.

3.2.2.7 Abweichungen vom Protokoll bei Patientenmessungen

Der Zellkulturansatz wurde aufgrund der nicht beeinflussbaren geringeren Zellzahl wie in Tabelle 16 dargestellt verändert. Statt Triplikaten wurden Duplikate zur Kontrolle der *Intra-Assay*-Varianz angesetzt. Außerdem entfiel der Verdünnungsansatz der 10:1 co-kultivierten Zellen. Alles Weitere wurde unverändert belassen. Aufgetaut wurden die sich in *Cryotubes* befindlichen Zellen im 37°C warmen Wasserbad, aus dem sie mit einer Transferpipette in ein

mit 50 ml CM vorbereitetes Falcon-*Tube* gegeben wurden. Anschließend wurden diese zwei Mal mit 50 ml CM gewaschen (400 x g, 4°C, 10 Minuten). Nach dem ersten Waschschrift wurde etwaiger Zellschrott durch Verwendung eines *Cell Strainers* herausgefiltert.

Tab. 16 Schematische Darstellung Zellkulturansatz bei Messung von Patienten/Spender-Proben

	CFSE	<i>non</i> -CFSE	CFDA	<i>non</i> -CFSE
1:1	2 Mio	2 Mio	2 Mio	2 Mio
1:10	200.000	2 Mio	200.000	2 Mio
<i>non</i> -CFSE	-	2 Mio	-	2 Mio
CFSE	2 Mio	-	2 Mio	-

CFSE bezeichnet die mit CFDA-SE gefärbten Zellen von Donor 1, *non*-CFSE bezieht sich auf die nicht mit CFDA-SE gefärbten Zellen von Donor 2. Ein Kästchen entspricht einem *Well*. Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl der verwendeten Zellen. Die Ausgangskonzentration für die Zellsuspension betrug 4 Mio/ml. Dementsprechend wurde in jedes *Well* 1 ml Volumen gegeben. Wurde weniger Zellsuspension eines Donors verwendet so wurde das restliche Volumen mit *Complete Medium* auf 1 ml aufgefüllt. Die Verdünnungsangaben in der linken Spalte beziehen sich auf Donor 1. Die Verdünnung für Donor 2 ergab sich *vice versa*. Für die Co-Kulturen wurden jeweils Duplikate zur Überprüfung der Intra-*Assay*-Varianz angelegt (eine Zeile entspricht einer Verdünnung). Des Weiteren wurden Negativkontrollen angelegt, ebenfalls in Duplikaten.

3.2.3 Datenanalyse

Die Datenauswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mithilfe des Programms Flow Jo in der Version 10.2 sowie Microsoft Excel für Mac, Version 15.32.

3.2.4 Gating-Strategie

Das *Gating* der FACS-Daten erfolgte entsprechend den Abbildungen 11 und 12. Die Abbildungen sind im *Gating*-Verlauf chronologisch geordnet. Die Kompensationsmatrix wurde für jeden Versuch vor Auswertung der Daten anhand von Kontrollfärbungen (Einzelfärbungen, FMOs) angepasst. Aufgrund von Artefakten (Fluorochrom-Aggregationen) konnten einzelne Marker nur in bestimmten Kombinationen, beziehungsweise nur einfach positiv ausgewertet werden. Bei der Datenerfassung spielten diese Artefakte allerdings keine Rolle mehr, da Marker-Spezifität durch die Kombination mit CD137 erreicht wurde. Einfach positive Marker wurden zusätzlich gegen einen anderen ebenfalls positiven Aktivierungsmarker verifiziert.

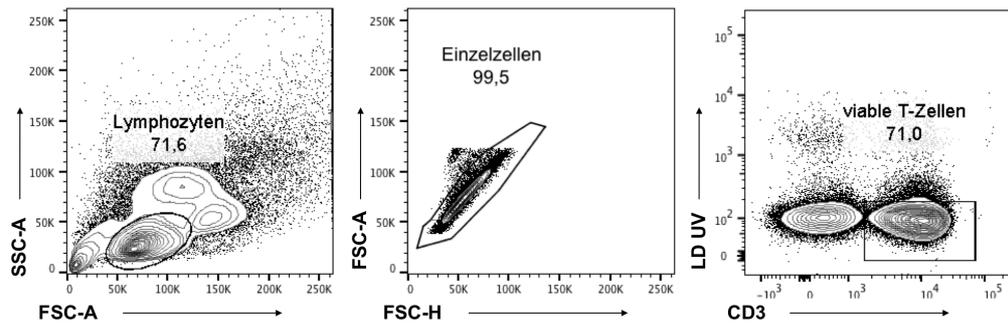


Abb. 11: T-Zell-Gating.

Im *Forward Scatter* (FSC-A) wurde gegen den *Sideward Scatter* (SSC-A) anhand von Größe und Granularität auf die Lymphozyten *gated*. Im zweiten Schritt wurden die Dubletten durch das Einzelzellen-*Gate* ausgeschlossen. Um die viablen T-Zellen zu identifizieren, wurde ein *Gate* für CD3 positive und für *Live Dead* (LD) negative Zellen gesetzt. Hierbei war es wichtig auch Zellen einzuschließen, die dabei an der Grenze zur CD3-negativen Population lagen, da T-Zellen bei Aktivierung den T-Zell Rezeptor (CD3) internalisieren.¹⁴³

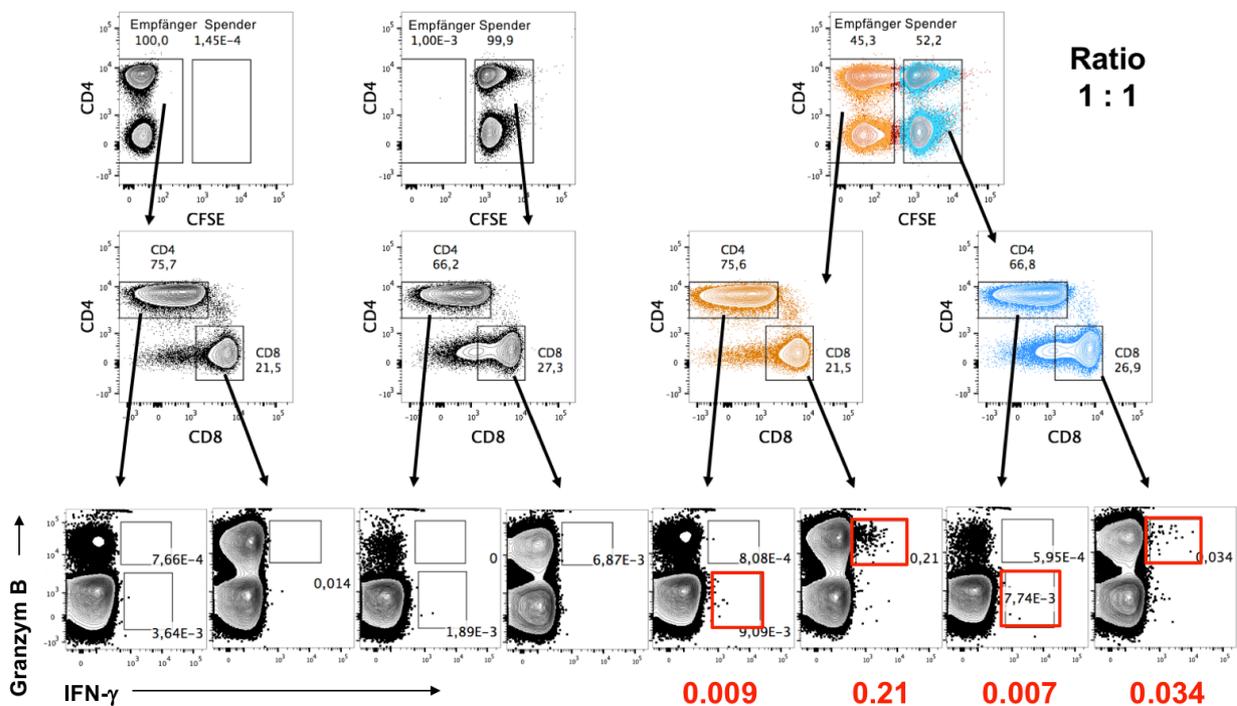


Abb. 12: Differenzierung der Donoren im *Gating* und Aktivierungsmarker-*Gating*.

Anhand eines beliebigen Markers wurden anhand der CFSE-Färbung Donor 1 von Donor 2, beziehungsweise Spender von Empfängern, unterschieden, um die alloreaktiven T-Zellen eindeutig zuordnen zu können. Da sich die jeweiligen CD4⁺ bzw. CD8⁺ Populationen zweier Donoren unterscheiden, erfolgte die Analyse dieser Populationen getrennt. Die Pfeile weisen auf die untergeordneten *Gates*. Jeweils aus den CD4⁺ und CD8⁺ Populationen der beiden Donoren wurde auf die aktivierten T-Zellen *gated*. Beispielhaft sind in dieser Abbildung zwei Aktivierungsmarker (Granzym B und IFN- γ) aus einer frühen Phase des Etablierungsverlaufs für die Ratio 1:1 dargestellt. Mit roter Umrandung hervorgehoben ist beispielhaft die Zytokin-Induktion auf den untersuchten T-Zellen. Im späteren Verlauf wurden Granzym B, TNF- α , IFN- γ , IL-2, sowie CD 154 allesamt gegen CD137 ausgewertet. Einfach für CD137 positive Zellen wurden gegen Granzym B bestimmt. Aufgrund von Artefakten (Fluorochrom-Aggregation) konnte CD154 nur einfach positiv gegen IFN- γ und doppelt positiv gegen CD137 bestimmt werden. CD137 und CD154 doppelt positive Zellen wurden nur in CD4⁺ Zellen bestimmt, da diese Population wegen der geringen Frequenz für diesen Versuch keinerlei Relevanz hat.

Das *Gating* der T-Zell-Memory-Subsets erfolgte zunächst global innerhalb der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen. Anschließend wurden, dargestellt in Abbildungen 13 und 14, mittels der so erstellten *Gates* folgende Aktivierungsmarker-Gates weiter nach den Subpopulationen untergliedert: CD4⁺CD137⁺CD154⁺, CD4⁺CD137⁺Granzym B⁺, CD4⁺CD137⁺IL-2⁺, sowie CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺ und CD8⁺CD137⁺IL-2⁺. In beiden Abbildungen wurden der Verständlichkeit halber nur die aktivierten CD4⁺CD137⁺Granzym B⁺ bzw. die CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺ in ihre Subpopulationen unterteilt.

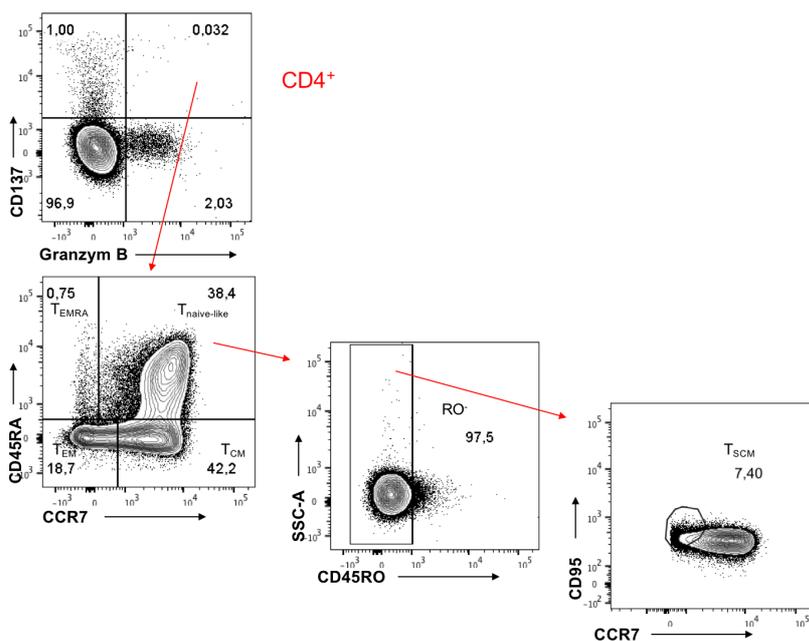


Abb. 13: T-Memory-Subset-Gating der CD4⁺ T-Zellen.

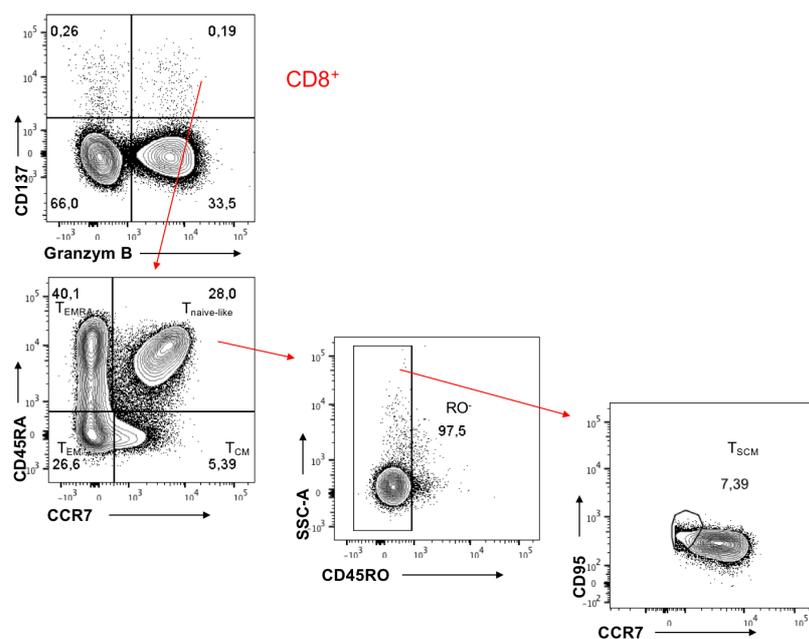


Abb. 14: T-Memory-Subset-Gating der CD8⁺ T-Zellen.

Die Subpopulationen der T-Gedächtniszellen sowie der naiven T-Zellen wurden entsprechend der in der Einleitung beschriebenen Marker CD45RA, CCR7, CD45RO sowie CD95 in vier Gruppen aufgeteilt (T_{EMRA} , T_{EM} , T_{CM} , T_{naive} und T_{SCM}). Da die T_{SCM} nur schwach positiv für CCR7 sind und deshalb nicht über das Quadranten-*Gate*, dargestellt in den Abbildungen 13 und 14, identifiziert werden konnten, wurden aus den $T_{naive-like}$ ($CD45RA^+$, $CCR7^+$) die CD45RO negativen *gated*, um diese von den noch enthaltenen T_{CM} abzugrenzen. In einem nächsten Schritt wurden diese $CD45RO^-$ naiven Zellen in der Marker-Kombination CD95 gegen CCR7 betrachtet. Die T_{SCM} sind schwach positiv für CCR7 und hoch positiv für CD95. Die T_{naive} sind eine errechnete Entität aus den $T_{naive-like}$ ($CD45RA^+$, $CCR7^+$) minus den T_{SCM} ($CD45RA^+$, $CCR7^+$, $CD45RO^-$, $CD95^+$) und daher nicht in den Abbildungen der *Gating*-Strategie enthalten.

3.2.5 Statistik und Graphen

Statistik und Graphen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 7 Version 7.0b für Mac erstellt. Es wurde die Marker-Induktion errechnet. Damit ist gemeint, dass der Mittelwert der drei Negativkontrollen (unstimulierte Proben, *Background*, Hintergrund), vom Mittelwert der drei Ansätze einer Ratio (beispielsweise 10:1) abgezogen wurde. Demnach ist die um den Hintergrund bereinigte Expression in den Abbildungen im Ergebnisteil (Kap. 4) dargestellt.

Sofern zwei Variablen verglichen wurden, wurde deren Normalverteilung mittels D'Agostino-Pearson-Test überprüft (Konfidenzintervalle bei 95%). Bei $p > 0,05$ wurde eine Normalverteilung der Variable angenommen. Waren beide Variablen normalverteilt und unabhängig voneinander, wurde der t-Test für unverbundene Stichproben mit Welscher Korrektur bei ungleicher Standardabweichung durchgeführt. Waren eine oder beide Variablen nicht-normalverteilt und beide unabhängig voneinander (p der Normalverteilungstests $\leq 0,05$), wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Beim t-Test bzw. beim Mann-Whitney-U-Test wurde davon ausgegangen, dass es zu keiner signifikanten Abweichung zwischen beiden Variablen kam, wenn $p > 0,05$ war. Wurden Variablen verglichen, bei denen eine Abhängigkeit bestand, zum Beispiel, wenn eine Probe desselben Spenders zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen wurde und somit eine biologische Abhängigkeit vorlag, so wurde der t-Test für verbundene Stichproben (normalverteilte Proben) beziehungsweise der Wilcoxon-Test (nicht-normalverteilte Proben) durchgeführt. Eine signifikante Abweichung im Vergleich zweier verbundener Variablen ergab sich bei $p < 0,05$. In den Abbildungen in Kapitel 4 ist der p-Wert als ein oder mehrere Sterne dargestellt (* = $p < 0,033$, ** = $p < 0,002$ und *** = $p < 0,001$).

4 Ergebnisse

4.1 Assay-Etablierung

Zur Etablierung der Methode wurden Zellen von 20 gesunden Spendern analysiert. In Abbildung 15 sind exemplarisch die gemessenen FACS-Daten der Aktivierungsmarker-Induktion für einen gesunden Probanden gezeigt.

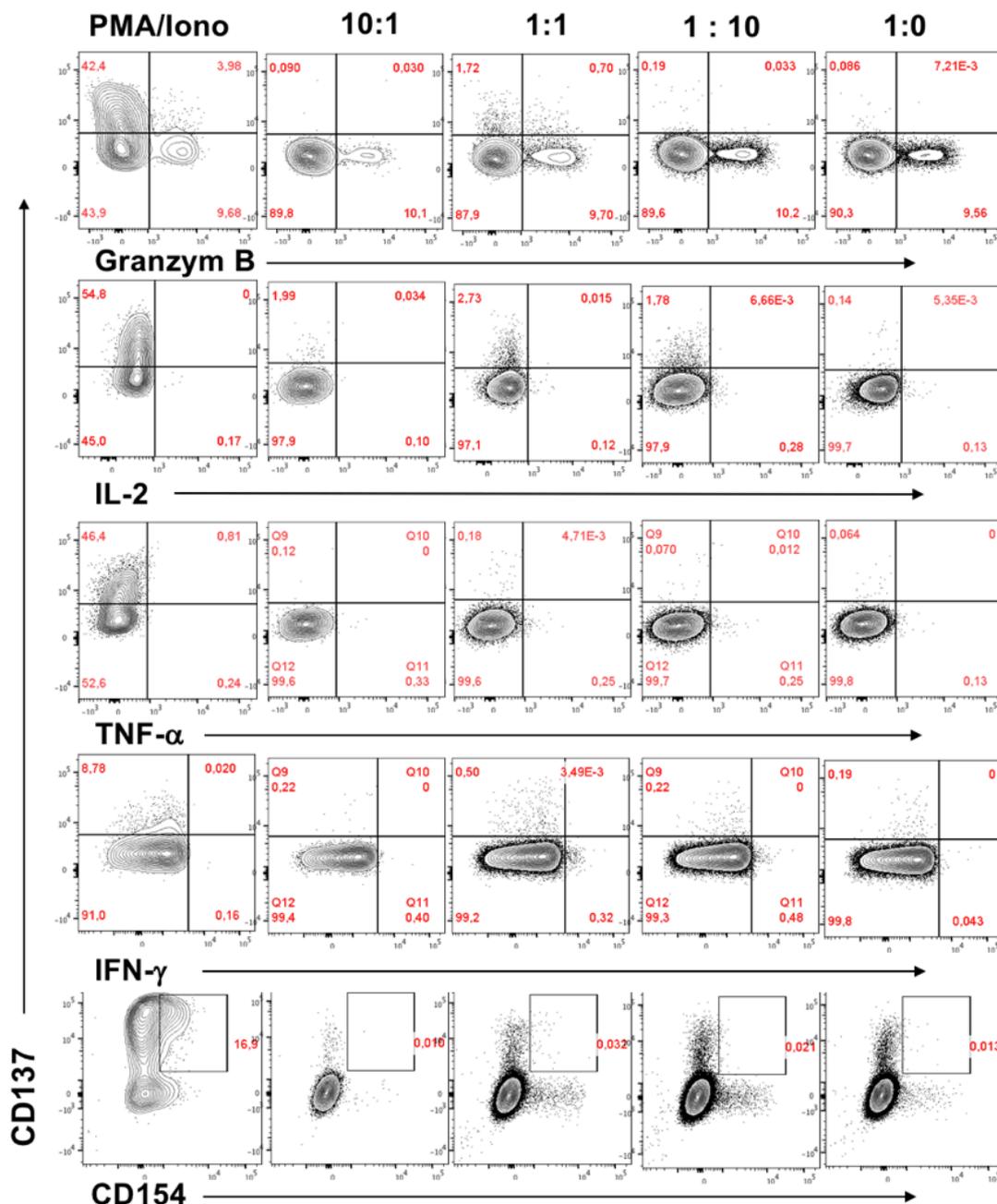


Abb. 15: FACS-Daten der Aktivierungsmarker-Induktion exemplarisch für einen gesunden Probanden. Gezeigt sind die Daten eines CFSE-ungefärbten Spenders. Die Populationen beziehen sich auf CD4⁺ T-Zellen. Das *Gating* wurde entsprechend den Angaben in Kapitel 3.2.4 durchgeführt. In Spalten dargestellt sind die Positivkontrolle (PMA/Iono), die drei Verdünnungsansätze (10:1, 1:1, 1:10) sowie die unstimulierte Probe (1:0).

Die gesunden Probanden sind in Abbildung 16 als Symbole dargestellt, welche der Übersicht halber einheitlich für die weiteren Abbildungen verwendet wurden. Die Aktivierungsmarker-Induktion aller für die *Assay*-Etablierung untersuchten Probandenpaare ist für die einfach für Aktivierungsmarker positiven CD4⁺ T-Zellen in Abbildung 17, für die einfach positiven CD8⁺ T-Zellen in Abbildung 18, für die doppelt positiven (Aktivierungsmarker-Kombinationen) CD4⁺ T-Zellen in Abbildung 19 sowie für die doppelt positiven CD8⁺ T-Zellen in Abbildung 20 dargestellt. Mit Marker-Induktion ist hier gemeint, dass der Mittelwert der drei Negativkontrollen (*Background*), vom Mittelwert der drei Ansätze einer Ratio abgezogen wurde. Demnach ist die um den *Background* bereinigte Expression in den Abbildungen zu sehen. Die Marker-Kombinationen CD4⁺TNF- α ⁺, CD8⁺TNF- α ⁺, CD4⁺CD137⁺TNF- α ⁺, CD8⁺CD137⁺TNF- α ⁺, CD4⁺CD137⁺IFN- γ ⁺ sowie CD8⁺CD137⁺IFN- γ ⁺ wurden später in den Versuch integriert, weshalb nur drei Spenderpaare gemessen wurden. CD4⁺IFN- γ ⁺ und CD8⁺IFN- γ ⁺ konnten wegen Artefakten nicht analysiert werden.

Die Kombination zweier Marker erhöht die Spezifität der analysierten Zellen, was in den Abbildungen 21 und 22 für die doppelt positiven Aktivierungsmarker deutlich zu sehen ist.



Abb. 16: Legende „Gesunde Donoren“ für Abb. 17 bis 22, sowie 24 und 25.

Für Spenderzellen, die in einem Versuch miteinander reagierten, wurde dieselbe Farbe verwendet. Für mit CFSE gefärbte Probandenzellen wurde ein Quadrat, für die ungefärbten ein Punkt als Symbol gewählt. Diese Formatierung wurde für alle Graphen der *Assay*-Etablierung (CFSE-Einfluss, Auswahl der geeigneten Aktivierungsmarker-Kombinationen, *Background*-Vergleich) beibehalten. Abk.: D = Donor.

In Abbildung 17 zeigt sich eine signifikant erhöhte Induktion von IL-2 im 13-Stunden-Ansatz in der Verdünnung 1:10 gegenüber der Verdünnung 10:1 ($p=0,003$). Betrachtet man die CD137-Induktion nach 2 Stunden, so ist hierbei der Ansatz 1:1 signifikant höher induziert als 10:1 ($p=0,0003$), jedoch signifikant geringer als der 1:10-Ansatz ($p=0,0002$). Dies gilt ebenso für die Ansätze nach 13 Stunden ($10:1 < 1:1$, $p < 0,0001$; $1:1 < 1:10$, $p < 0,0001$). Betrachtet man den 2-Stunden- und den 13-Stunden-Ansatz im Vergleich, so fällt eine signifikant höhere Induktion von IL-2 im 1:10-Ansatz auf ($p=0,0121$). Für CD154⁺ Zellen 2 Stunden nach BFA-Zugabe besteht eine signifikant niedrigere Expression des 10:1-Ansatzes sowohl gegenüber dem 1:1-Ansatz ($p=0,0092$), als auch dem 1:10-Ansatz ($p=0,0302$). Dies gilt ebenso für die Ansätze nach 13 Stunden ($10:1 < 1:1$, $p=0,0026$; $10:1 < 1:10$, $p=0,008$). Ein Vergleich der beiden Zeitpunkte ergibt eine signifikant höhere Induktion von CD154 nach 13 Stunden für die Ansätze 1:1 ($p=0,0002$) und 1:10 ($p=0,0087$).

**CD4⁺ - einfach
positiv**

Granzym B⁺

IL-2⁺

CD137⁺

CD154⁺

TNF- α ⁺

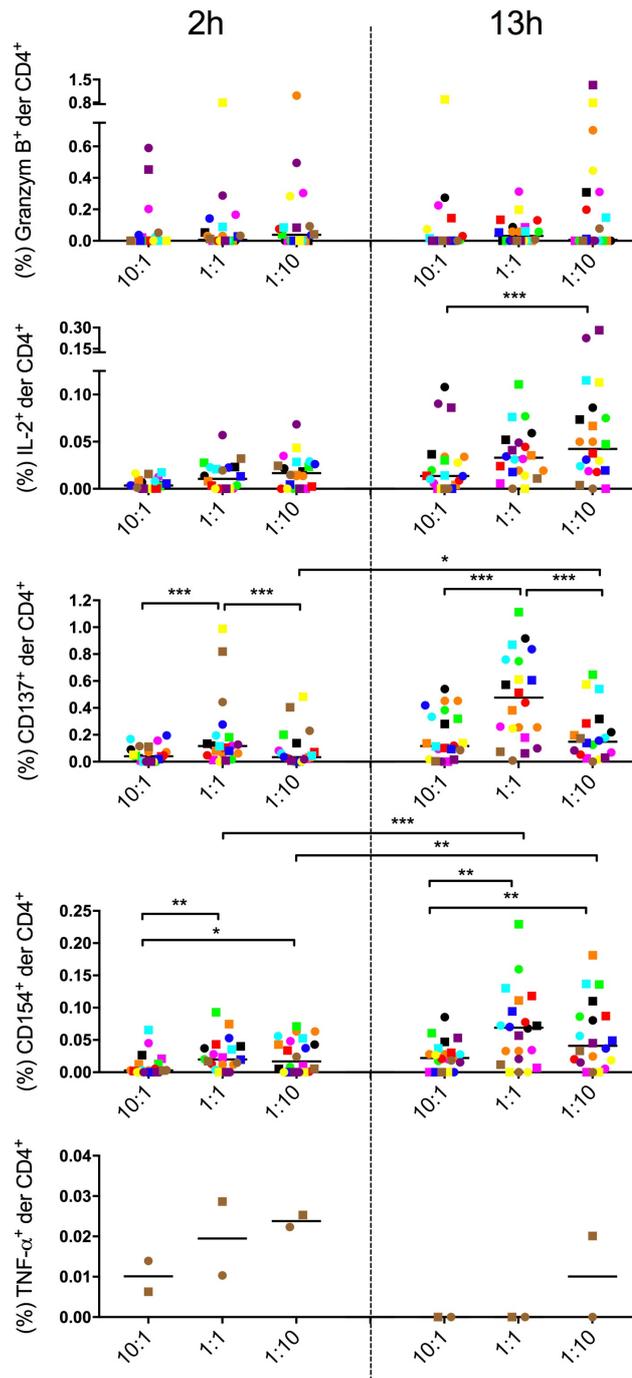


Abb. 17: Einfach positive Aktivierungsmarker der gesunden Donoren – CD4⁺ T-Zellen.

Dargestellt ist jeweils die Marker-Induktion (*Background*-bereinigter Triplikат-Mittelwert eines gesunden Probanden) zwei Stunden sowie 13 Stunden, nachdem die Sezernierung von Zytokinen durch Brefeldin A gestoppt wurde. Die verschiedenen Ansätze in Co-Kultur sind auf der X-Achse zu sehen (10:1, 1:1, 1:10). Die erste Zahl bezieht sich auf den gezeigten Spender. Demnach treffen in Verdünnung 10:1 zehn „eigene“ Zellen auf eine „fremde“ Zelle. In 1:1 ist das Verhältnis ausgeglichen und bei 1:10 trifft theoretisch eine „eigene“ Zelle auf zehn „fremde“. Die genaue Legende ist Abbildung 16 (s.o.) zu entnehmen.

Wie in Abbildung 18 verdeutlicht, zeigt sich für den Ansatz 13 Stunden nach BFA-Addition eine signifikant höhere Induktion von IL-2 für die Verdünnung 1:10 ($p=0,0245$) sowie im 13-

Stunden-Ansatz eine höhere Induktion für 1:10 gegenüber 1:1 ($p=0,0244$) sowie 10:1 ($p=0,0479$). Betrachtet man die CD137-Induktion, so ergibt sich sowohl für den 2-Stunden- als auch den 13-Stunden-Ansatz eine Staffelung in $10:1 < 1:1 < 1:10$ (p -Werte $< 0,001$, außer für 13 Stunden 1:1 versus 1:10, dort $p=0,0042$).

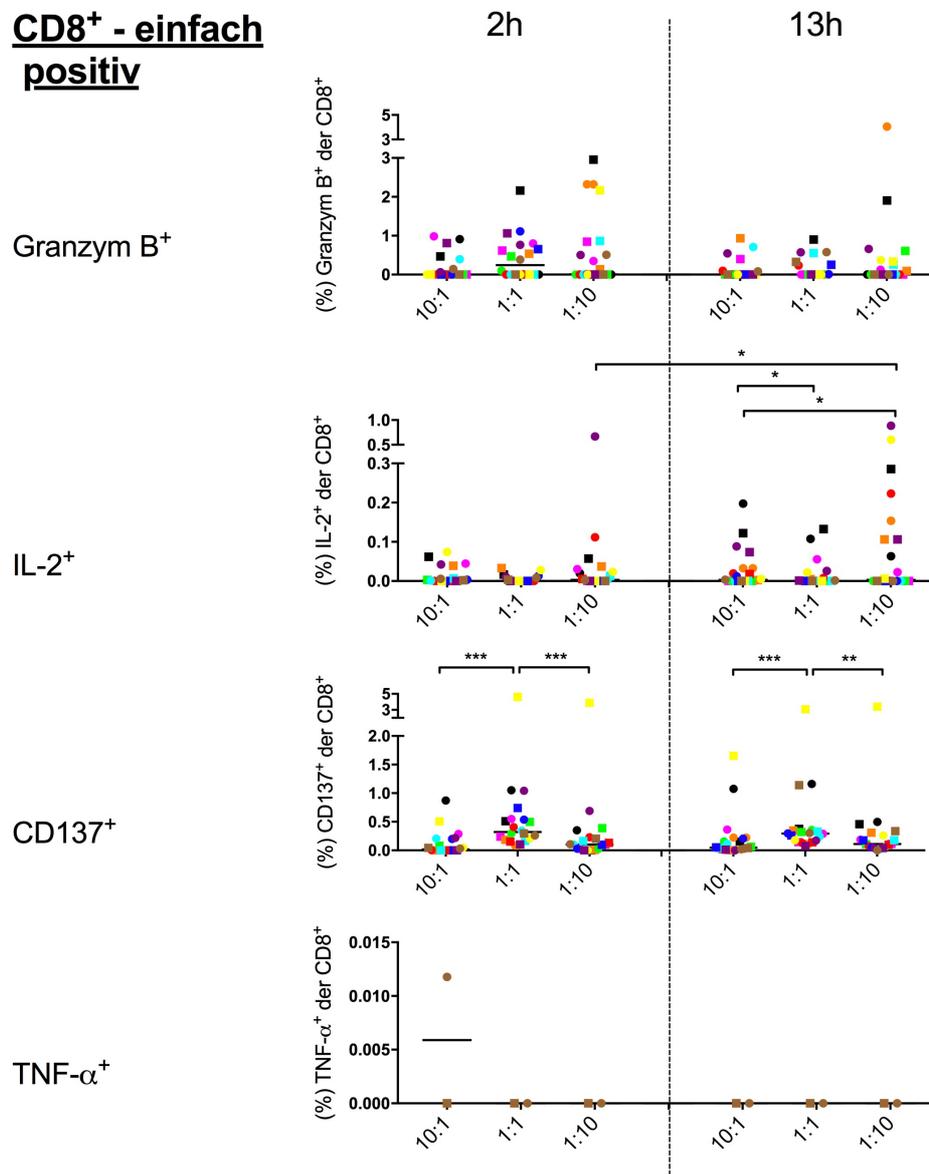


Abb. 18: Einfach positive Aktivierungsmarker – CD8⁺ T-Zellen.

Dargestellt ist jeweils die Marker-Induktion (*Background*-bereinigter Triplikат-Mittelwert eines gesunden Probanden) zwei Stunden sowie 13 Stunden, nachdem die Sezernierung von Zytokinen durch Brefeldin A gestoppt wurde. Die verschiedenen Ansätze in Co-Kultur sind auf der X-Achse zu sehen (10:1, 1:1, 1:10). Die erste Zahl bezieht sich auf den gezeigten Spender. Demnach treffen in Verdünnung 10:1 zehn „eigene“ Zellen auf eine „fremde“ Zelle. In 1:1 ist das Verhältnis ausgeglichen und bei 1:10 trifft theoretisch eine „eigene“ Zelle auf zehn „fremde“. Die genaue Legende ist Abbildung 16 (s.o.) zu entnehmen.

Signifikant niedriger ist die Induktion der Kombination CD137 und Granzym B, dargestellt in Abbildung 19. Für beide Zeitpunkte gilt: 10:1 ist geringer induziert als 1:1 (2 Stunden: $p=0,043$,

13 Stunden: $p < 0,0001$) sowie geringer als 1:10 (2 Stunden: $p = 0,0177$, 13 Stunden: $p = 0,0036$). Die Kombination aus CD137 und IL-2 zeigt im 2-Stunden-Ansatz eine Einteilung in 10:1 < 1:1 ($p < 0,0001$) > 1:10 ($p = 0,0417$). Außerdem ist 10:1 signifikant niedriger exprimiert als 1:10 ($p = 0,0003$). Nach 13 Stunden zeigt sich für die Expression der Kombination: 10:1 kleiner 1:1 ($p = 0,0002$) sowie kleiner 1:10 ($p < 0,0001$). Eine signifikant höhere Induktion ist im Vergleich der beiden Zeitpunkte für den 13-Stunden-Ansatz gegeben. Dies zeigt sich bei der Gegenüberstellung von 1:1 ($p = 0,0198$) und 1:10 ($p = 0,002$). Für die Induktion von CD137 und CD154 ist im 2-Stunden-Ansatz eine Unterteilung in 10:1 < 1:1 ($p < 0,0001$) > 1:10 ($p = 0,0009$) zu sehen. 1:10 ist zudem signifikant höher exprimiert als 10:1 ($p < 0,0001$). Die Verdünnung 10:1 ist im 13-Stunden-Ansatz sowohl gegenüber 1:1 ($p < 0,0001$) als auch gegenüber 1:10 ($p = 0,0003$) niedriger. Eine signifikant höhere Aktivierungsmarker-Induktion findet sich im Vergleich der Ansätze 1:10 beim 13-Stunden-Ansatz ($p = 0,0033$).

CD4⁺ - doppelt positiv

CD137⁺
Granzym B⁺

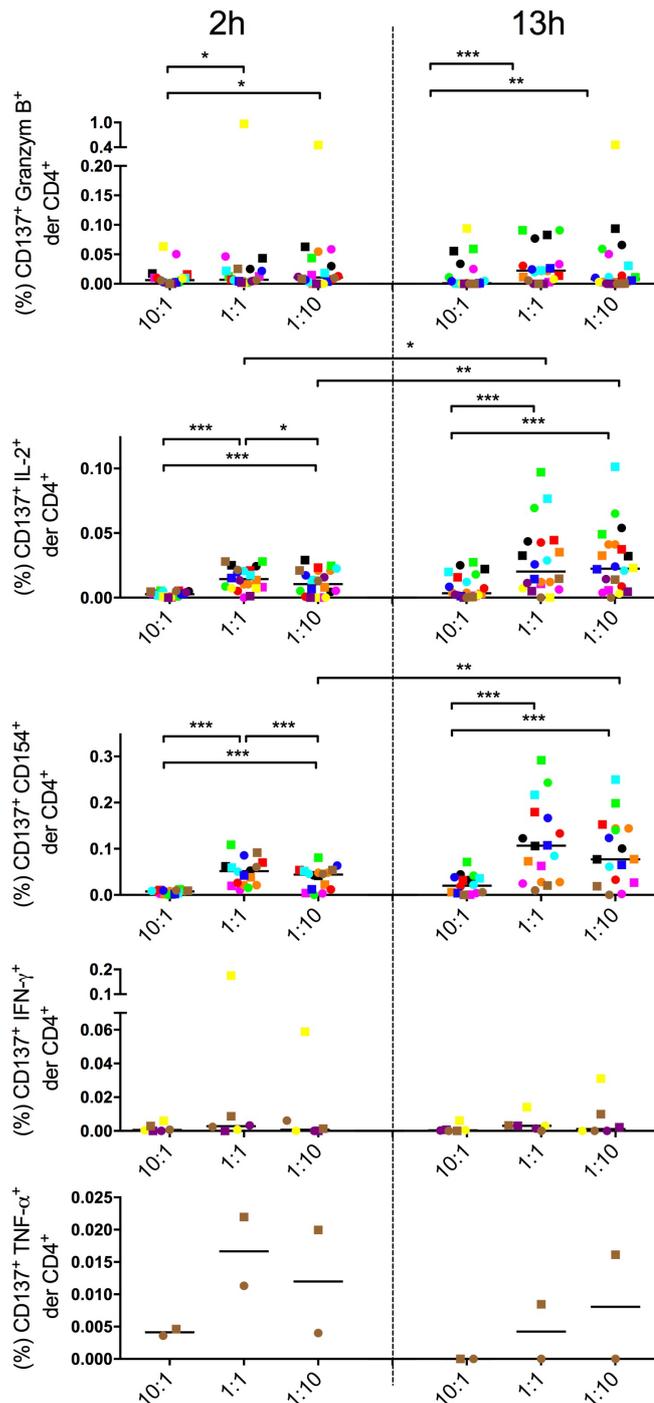


Abb. 19: Doppelt positive Aktivierungsmarker – CD4⁺ T-Zellen.

Dargestellt ist jeweils die Marker-Induktion (*Background*-bereinigter Triplikat-Mittelwert eines gesunden Probanden) zwei Stunden sowie 13 Stunden, nachdem die Sezernierung von Zytokinen durch Brefeldin A gestoppt wurde. Die verschiedenen Ansätze in Co-Kultur sind auf der X-Achse zu sehen (10:1, 1:1, 1:10). Die erste Zahl bezieht sich auf den gezeigten Spender. Demnach treffen in Verdünnung 10:1 zehn „eigene“ Zellen auf eine „fremde“ Zelle. In 1:1 ist das Verhältnis ausgeglichen und bei 1:10 trifft theoretisch eine „eigene“ Zelle auf zehn „fremde“. Die genaue Legende ist Abbildung 16 (s.o.) zu entnehmen.

Es lassen sich, wie in Abbildung 20 gezeigt, signifikante Unterschiede für die Induktion von CD137 und Granzym B feststellen. Hierbei liegt im 2-Stunden-Ansatz eine Staffelung

(10:1<1:1>1:10, p-Werte je <0,0001) vor. Außerdem sind die Aktivierungsmarker im Ansatz 1:10 signifikant höher exprimiert als im Ansatz 10:1 (p=0,001). Für den 13-Stunden-Ansatz gilt 10:1 kleiner 1:1 sowie kleiner 1:10 (p-Wert jeweils <0,0001).

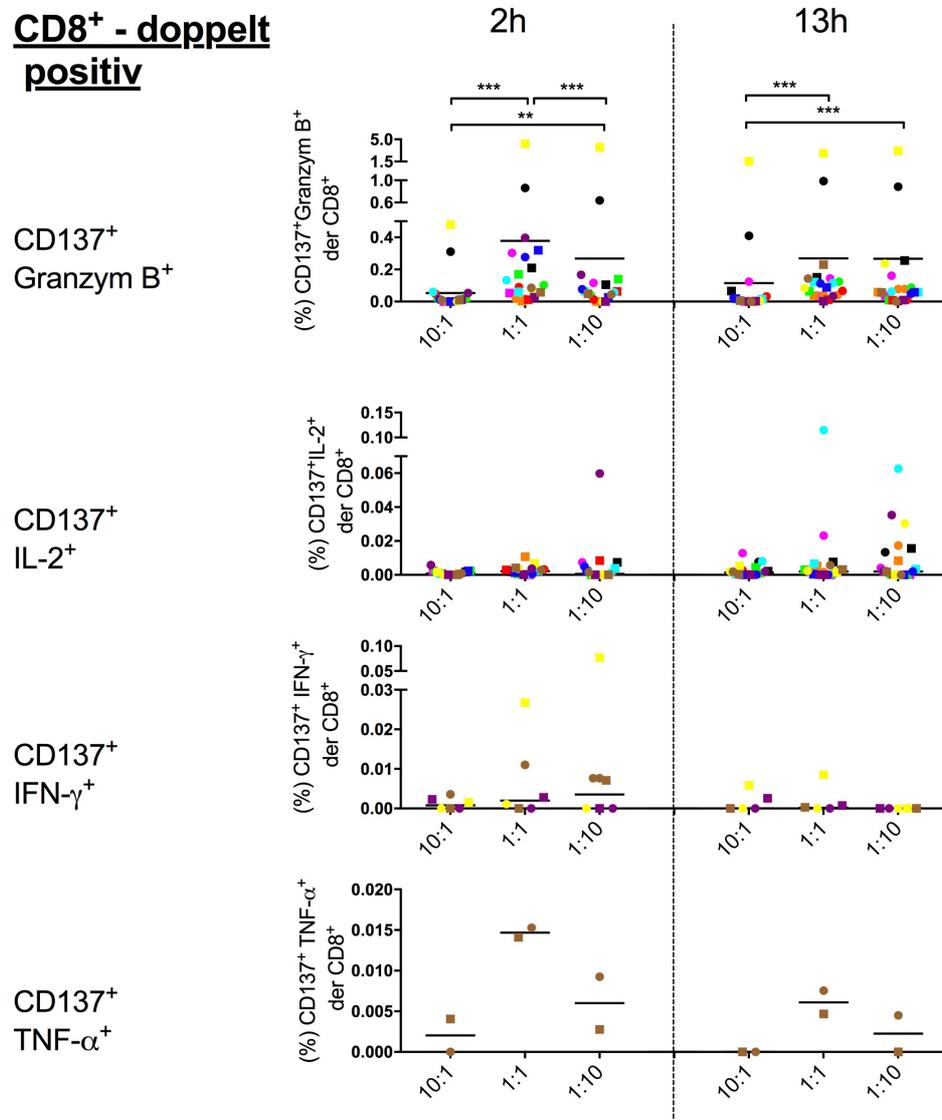


Abb. 20: Doppelt positive Aktivierungsmarker – CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt ist jeweils die Marker-Induktion (*Background*-bereinigter Triplikat-Mittelwert eines gesunden Probanden) zwei Stunden sowie 13 Stunden, nachdem die Sezernierung von Zytokinen durch Brefeldin A gestoppt wurde. Die verschiedenen Ansätze in Co-Kultur sind auf der X-Achse zu sehen (10:1, 1:1, 1:10). Die erste Zahl bezieht sich auf den gezeigten Spender. Demnach treffen in Verdünnung 10:1 zehn „eigene“ Zellen auf eine „fremde“ Zelle. In 1:1 ist das Verhältnis ausgeglichen und bei 1:10 trifft theoretisch eine „eigene“ Zelle auf zehn „fremde“. Die genaue Legende ist Abbildung 16 (s.o.) zu entnehmen.

Um die Spezifität des *Assays* zu erhöhen, wurde in mehreren Schritten die Auswahl der geeigneten Aktivierungsmarker getroffen. Ein wichtiger Punkt war der Vergleich des *Backgrounds* der einfach positiven gegenüber den doppelt positiven Aktivierungsmarkern. Der *Background* ist die Marker-Induktion, die in den unstimulierten Proben gemessen wurde und stellt damit eine unspezifische Aktivierungsmarker-Induktion wie etwa nach einem unkomplizierten Infekt des Spenders dar. Es zeigt sich ein deutlich niedrigerer *Background* für alle doppelt positiven Aktivierungsmarker-Kombinationen (CD4⁺ T-Zellen in Abb. 21, CD8⁺ T-Zellen in Abb. 22).

Zellen, die CD154 und CD8 auf ihrer Oberfläche exprimieren, sogenannte CD8⁺ T-Helfer-Zellen, machen eine Subpopulation der CD8⁺ T-Zellen, insbesondere der T-*Memory*-Zellen aus.¹⁴⁴ Allerdings ist ihre Rolle bei der Immunantwort derzeit umstritten und deshalb wurden sie in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.^{144,145} Zur Expression von Granzym B muss gesagt werden, dass hier streng genommen kein *Background* gemessen werden kann, da T-Zellen dieses - zu jedem Zeitpunkt und nicht nur bei Aktivierung - in unterschiedlichem Maß in Granula gespeichert haben (siehe Kap.1.2.1).²⁰

Insgesamt sieht man einen deutlich geringeren *Background* in den doppelt positiven Marker-Kombinationen. TNF- α - und IFN- γ -Kombinationen sind wegen der oben beschriebenen späteren Integration in den *Assay* mit geringerer Probandenanzahl dargestellt.

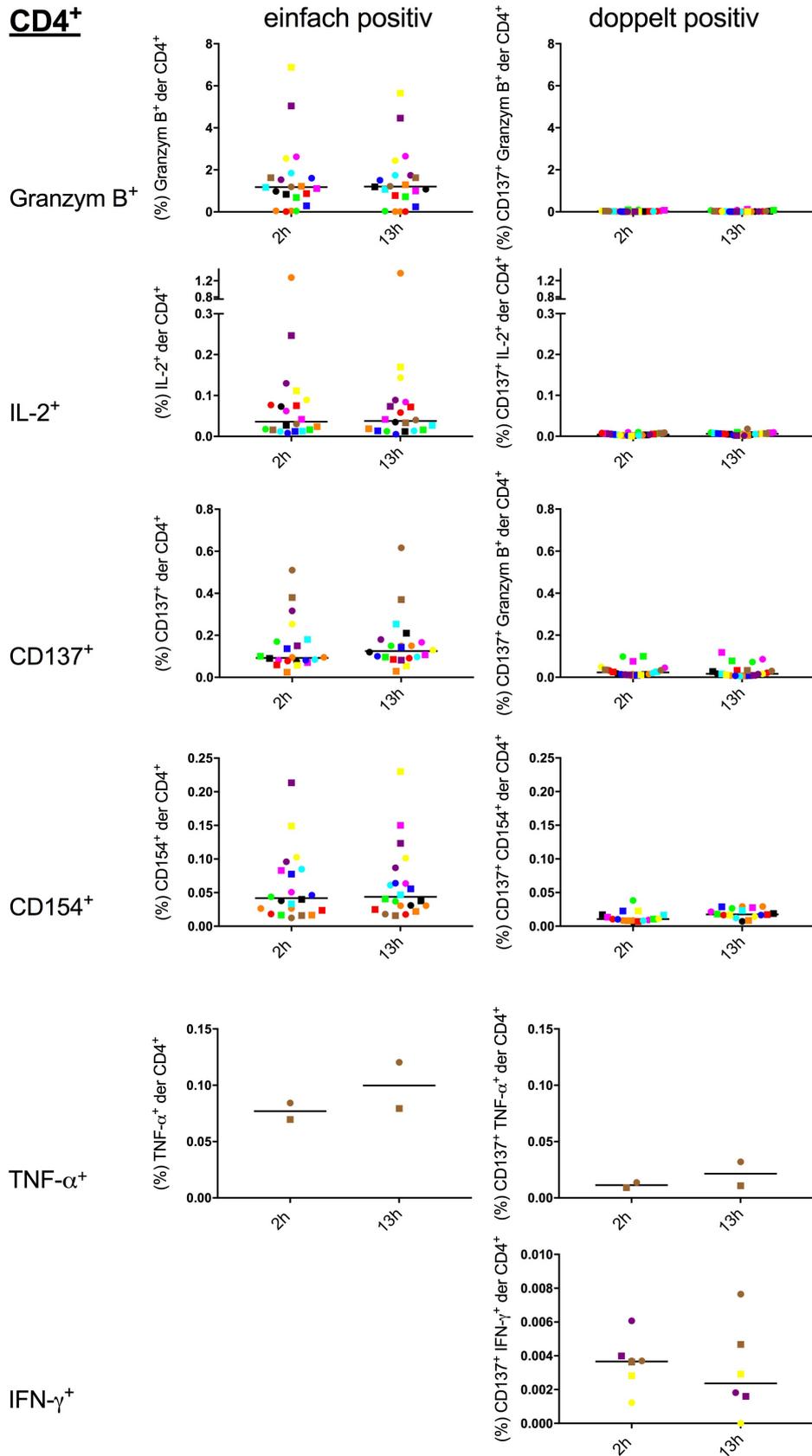


Abb. 21: Vergleich des *Backgrounds* der einfach positiven gegenüber den doppelt positiven Aktivierungsmarkern für die CD4⁺ T-Zellen.

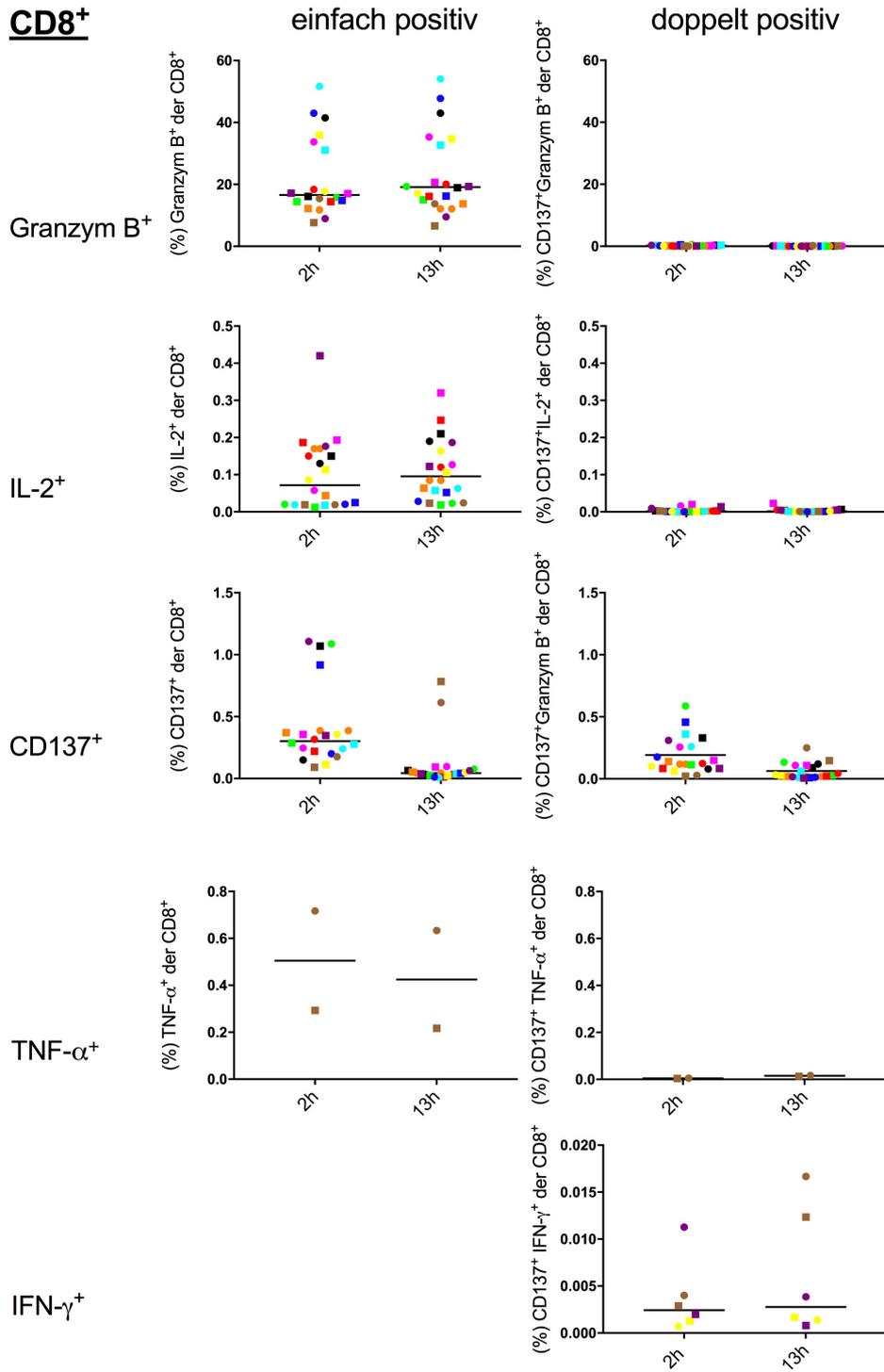


Abb. 22: Vergleich des *Backgrounds* der einfach positiven gegenüber den doppelt positiven Aktivierungsmarkern für die CD8⁺ T-Zellen.

4.2 Assay-Evaluation

4.2.1 Varianzkoeffizient (CV)

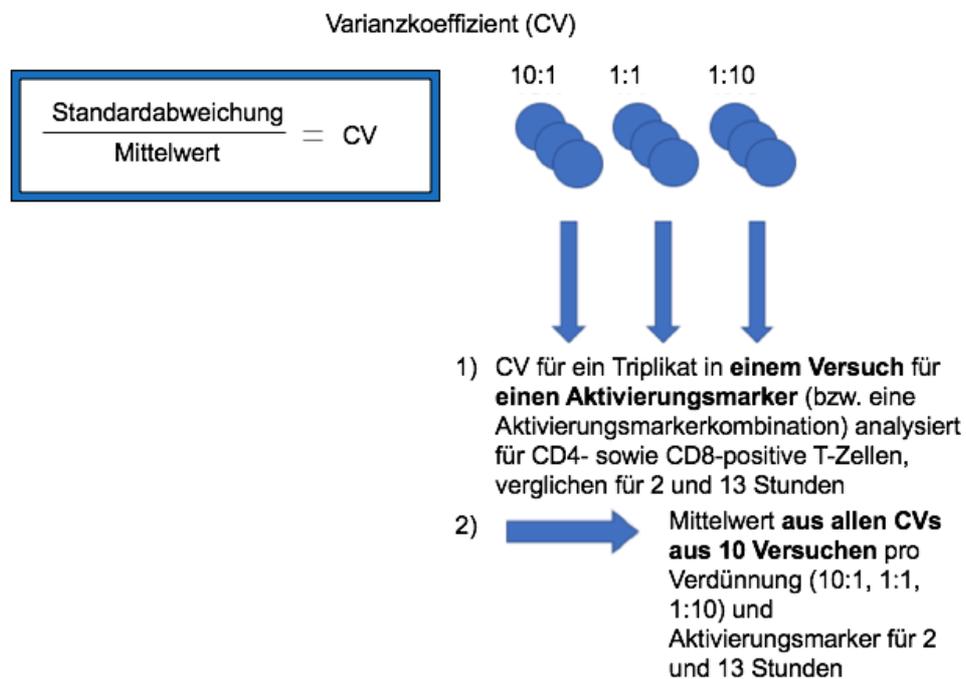


Abb. 23: Varianzkoeffizient (CV) – Schematische Darstellung der Auswertung.

Um die Aussagekraft der gemessenen Werte zu beurteilen, wurde der Varianzkoeffizient (*coefficient of variance*, CV) nach dem in Abbildung 23 erläuterten Schema berechnet. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 17 dargestellt. Speziell für Granzym B fällt ein besonders niedriger Varianzkoeffizient auf, wohingegen bei CD137⁺IL-2⁺ sowie CD137⁺IFN- γ ⁺ mit Werten bis zu 85% relativ hohe Abweichungen zu verzeichnen sind.

Tab. 17: Varianzkoeffizient (CV) – Ergebnisse der Auswertung

CD137 ⁺			
CV (%)			
Total	2h	13h	
10:1		15%	13%
1:1		8%	11%
1:10		15%	17%

CD137 ⁺ C154 ⁺			
CV (%)			
Total	2h	13h	
10:1		33%	17%
1:1		15%	17%
1:10		25%	16%

TNF- α ⁺			
CV (%)			
Total	2h	13h	
10:1		13%	15%
1:1		16%	26%
1:10		22%	5%

CD137 ⁺ TNF- α ⁺			
CV (%)			
Total	2h	13h	
10:1		28%	28%
1:1		22%	31%
1:10		44%	12%

CD154 ⁺			
CV (%)			
Total	2h	13h	
10:1		39%	33%
1:1		25%	24%
1:10		41%	41%

CD137 ⁺ IL-2 ⁺			
CV (%)			
Total	2h	13h	
10:1		67%	61%
1:1		45%	36%
1:10		63%	53%

Granzym B ⁺			
CV (%)			
Total	2h	13h	
10:1		5%	6%
1:1		5%	6%
1:10		6%	6%

CD137 ⁺ Granzym B ⁺			
CV (%)			
Total	2h	13h	
10:1		27%	31%
1:1		18%	21%
1:10		29%	30%

IL-2 ⁺			
CV (%)			
Total	2h	13h	
10:1		32%	36%
1:1		22%	28%
1:10		32%	32%

CD137 ⁺ IFN- γ ⁺			
CV (%)			
Total	2h	13h	
10:1		67%	68%
1:1		61%	79%
1:10		85%	72%

Die CV ist beschrieben als Standardabweichung (x_1, x_2, \dots, x_n) / Mittelwert (x_1, x_2, \dots, x_n). Die schematische Darstellung der Auswertung findet sich in Abbildung 23.

4.2.2 CFSE-Einfluss auf Aktivierungsmarker-Induktion

Des Weiteren wurde der Einfluss von CFSE auf die Induktion von Aktivierungsmarkern untersucht. Hierfür wurden die gemessenen gesunden Spender in die Gruppen „CFSE-gefärbt“ und „nicht-CFSE-gefärbt“ aufgeteilt und die Mediane der jeweiligen Gruppen ermittelt. Dies erfolgte exemplarisch an einer Aktivierungsmarker-Kombination (CD137, CD154) sowohl für CD4⁺ (Abb. 24), als auch für CD8⁺ T-Zellen (Abb. 25).

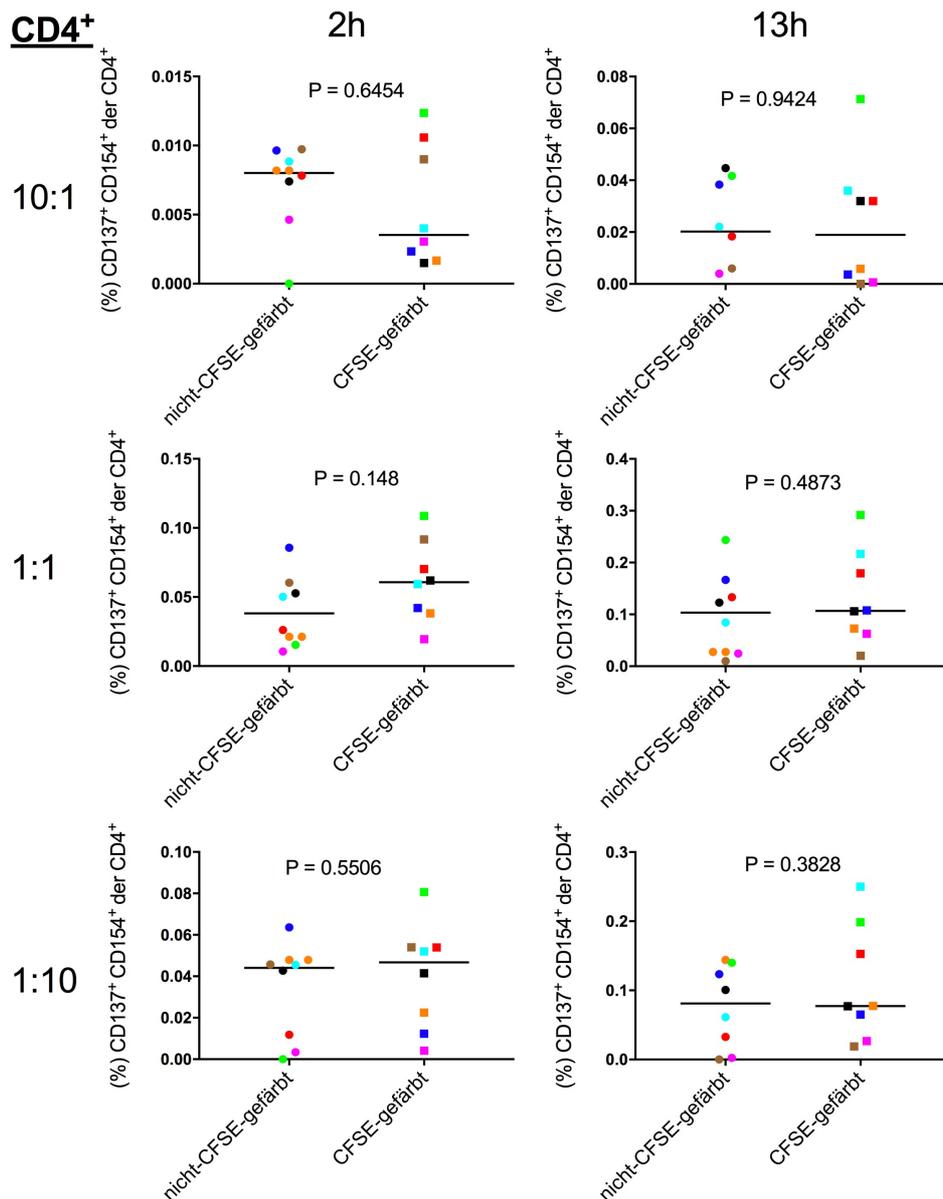


Abb. 24: CFSE-Einfluss auf CD137-, CD154-Induktion auf CD4⁺ T-Zellen

Der ermittelte p-Wert bezieht sich auf die durchgeführten t-Tests bei Normalverteilung sowie auf Mann-Whitney-U-Tests bei nicht-normalverteilten Proben. Es handelt sich um verschiedene Spender, daher wurde hiermit gezeigt werden, dass CFSE keinen Einfluss auf die Färbung hat.

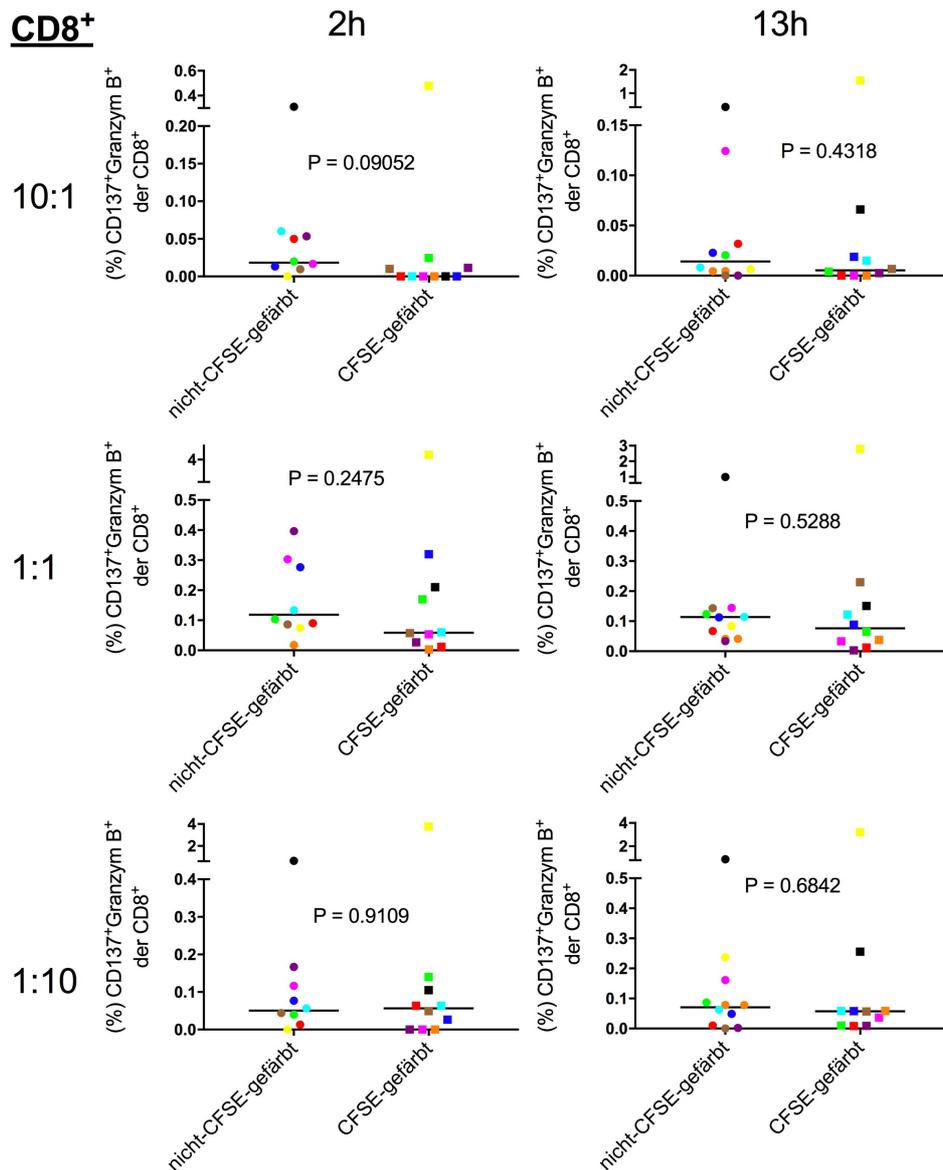


Abb. 25: CFSE-Einfluss auf CD137, Granzym B-Induktion auf CD8⁺ T-Zellen.

Der ermittelte p-Wert bezieht sich auf die durchgeführten t-Tests bei Normalverteilung sowie auf Mann-Whitney-U-Tests bei nicht-normalverteilten Proben. Es handelt sich um verschiedene Spender, daher wurde hiermit gezeigt werden, dass CFSE keinen Einfluss auf die Färbung hat.

In der statistischen Analyse nach dem Vorgehen wie in Kapitel 2.3.5 erläutert ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „CFSE-gefärbt“ und „nicht-CFSE-gefärbt“. Demnach hat die CFSE-Färbung keinen Einfluss auf die Aktivierungsmarker-Induktion.

4.2.3 Mehrfach verwendete Spender im Verlauf

Für eine weitere Qualitätskontrolle des Versuchs wurden im Etablierungsverlauf mehrfach verwendete Spender miteinander verglichen. Dies erfolgte exemplarisch anhand der Aktivierungsmarker CD137 (Abb. 26) sowie der Kombination aus CD137 und Granzym B (Abb. 27), jeweils auf CD4⁺ T-Zellen. Diese Marker wurden gewählt, da sie eine relativ hohe

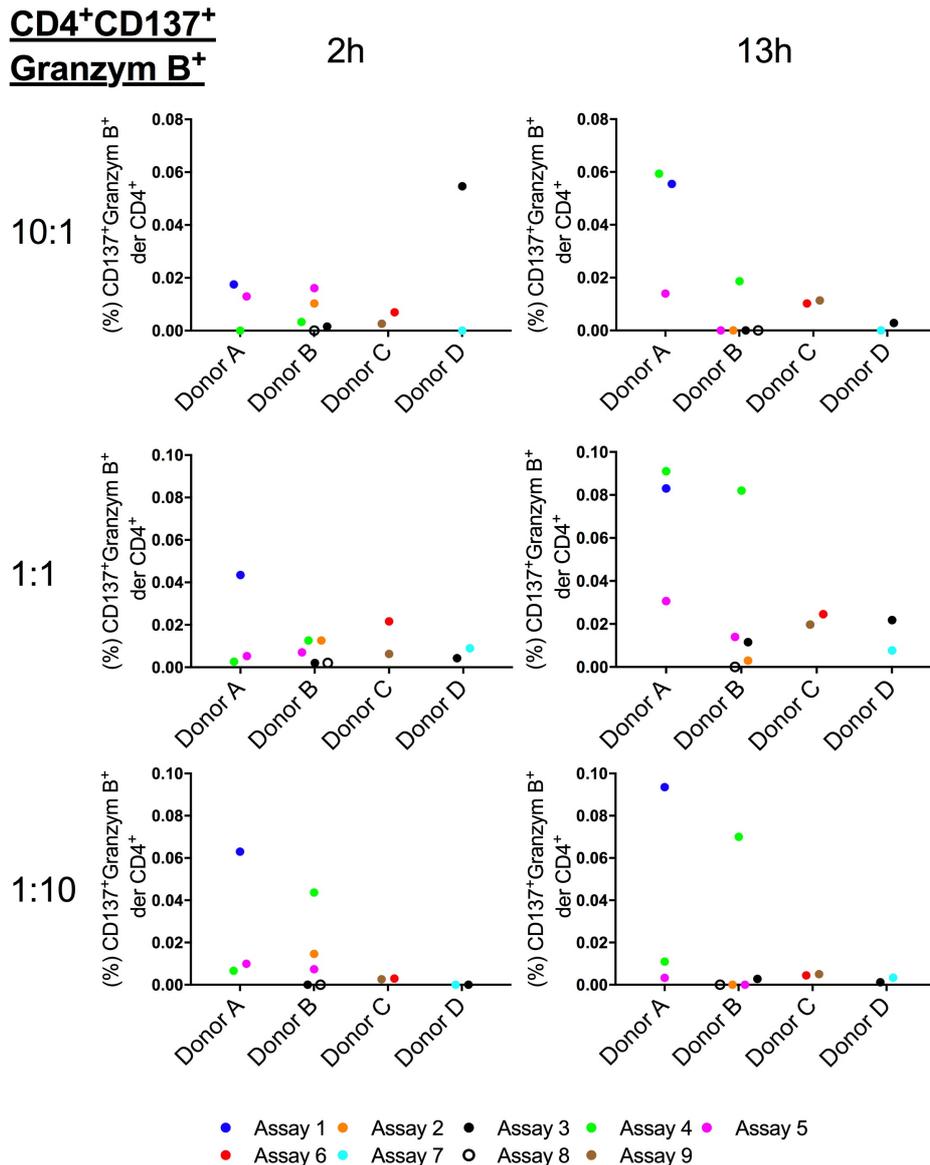


Abb. 27: Mehrfach verwendete Spender im Etablierungsverlauf – CD137⁺Granzym B⁺ auf CD4⁺ T-Zellen.

Vier Donoren (A-D) spendeten im Etablierungsverlauf mehrfach für die Versuche (1-9). Die so gewonnenen Zellen reagierten jeweils mit anderen Reaktionspartnern. Dabei wurden die T-Zellen immer mit verschiedenen HLA-Komplexen konfrontiert, auf die sie mit unterschiedlicher Stärke reagierten.

4.3 Auswahl der geeigneten Aktivierungsmarker

4.3.1 Vergleich der Höhe der Aktivierungsmarker-Induktion

Zur Auswahl der geeignetsten Marker wurden alle doppelt positiven Marker in Abbildung 28 nach der Höhe ihrer Induktion für CD4 und CD8 verglichen. Bei den CD8⁺ T-Zellen zeigte sich ein deutlicher Fokus auf CD137⁺Granzym B⁺ Zellen. Es wurden exemplarisch die FACS-Daten für CD137⁺Granzym B⁺ dargestellt (Abb. 28). Als geeignetste Marker-Kombinationen für die CD4⁺ T-Zellen stellten sich im Versuch CD137⁺CD154⁺ sowie CD137⁺IL-2⁺ heraus. Für die

mit CD137 doppelt positiven TNF- α und IFN- γ lagen nicht genügend Daten vor. CD137⁺Granzym B⁺ wurde zwar stark induziert, zeigt allerdings eine sehr hohe Devianz.

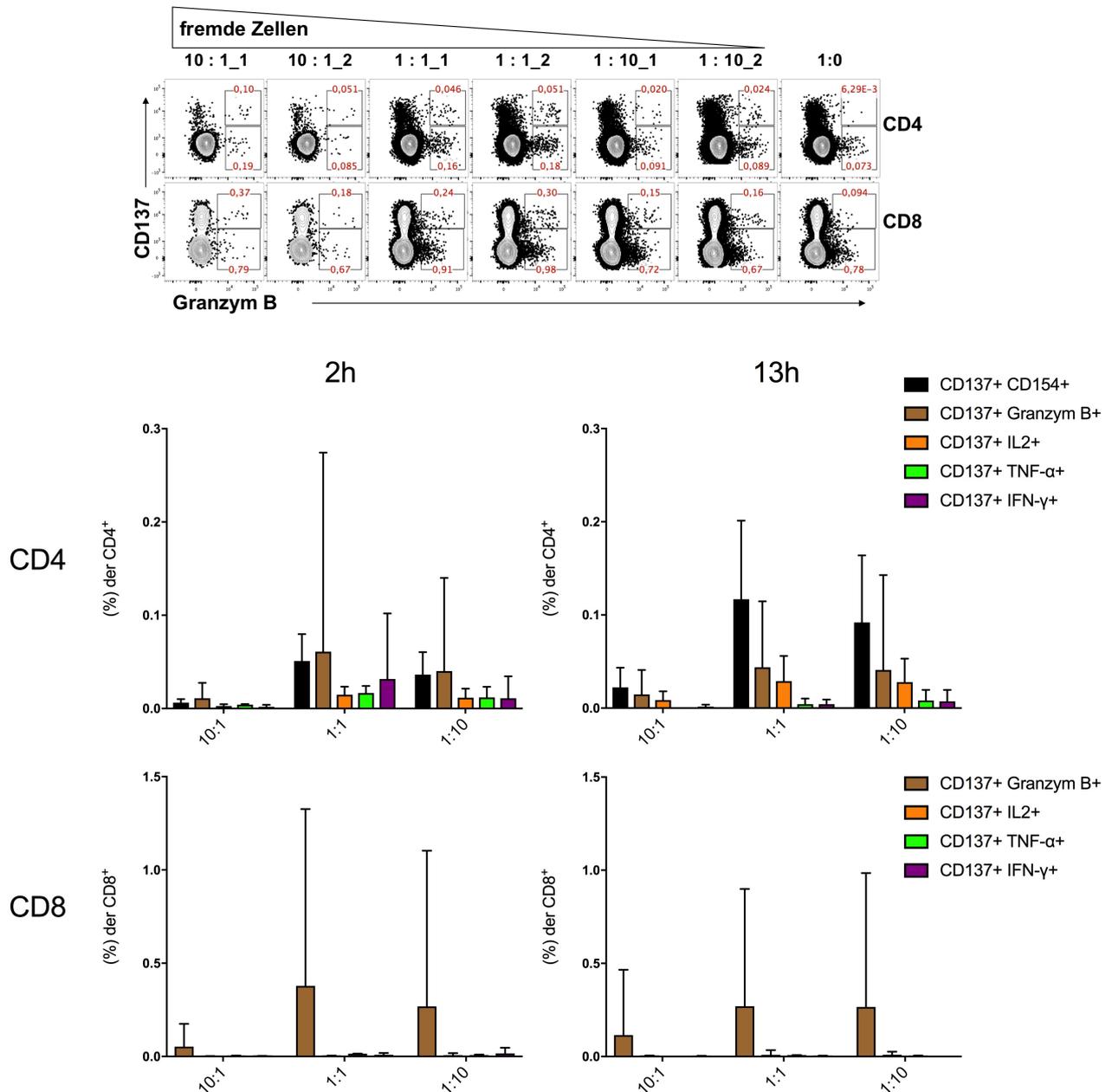


Abb. 28: Vergleich der doppelt positiven Marker nach Induktionshöhe für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Im oberen Teil der Abbildung sind die FACS-Daten für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für die Kombination aus CD137 und Granzym B exemplarisch für einen der verwendeten gesunden Spender nach 2 Stunden Stimulationszeit dargestellt (für zwei der drei Triplikate = Zahl hinter Ratio). Die Angabe „fremde Zellen“ bezieht sich hierbei auf den Donor 2, geht man vom Donor 1 als „eigene“ Zellen aus.

4.3.2 Negativ-Auswahl anhand des *Backgrounds* der Aktivierungsmarker

Weiterhin wurden die Marker-Kombinationen mit dem niedrigsten *Background* präferiert (näheres zum Verfahren siehe Kapitel 4.1 in Abb. 21 und 22).

4.4 Analyse der T-Zell-Memory-Subpopulationen (Subsets)

Die aktivierten, spezifisch-alloreaktiven T-Zellen der ausgewählten Aktivierungsmarker-Kombinationen wurden nach deren T-Gedächtnis-Subpopulationen eingeteilt (Abb. 29). Anschließend wurde gemessen, wie sich die *Subset*-Verteilungen nach 2 Stunden sowie nach 13 Stunden änderten und ob diese konstant waren (Abb. 33).

Das *Gating* für die T-Zell Differenzierung wurde anhand der Gesamt-CD4⁺-Population, beziehungsweise Gesamt-CD8⁺-Population durchgeführt und dann auf die aktivierten Zellen angewendet (vgl. Kap. 3.2.4).

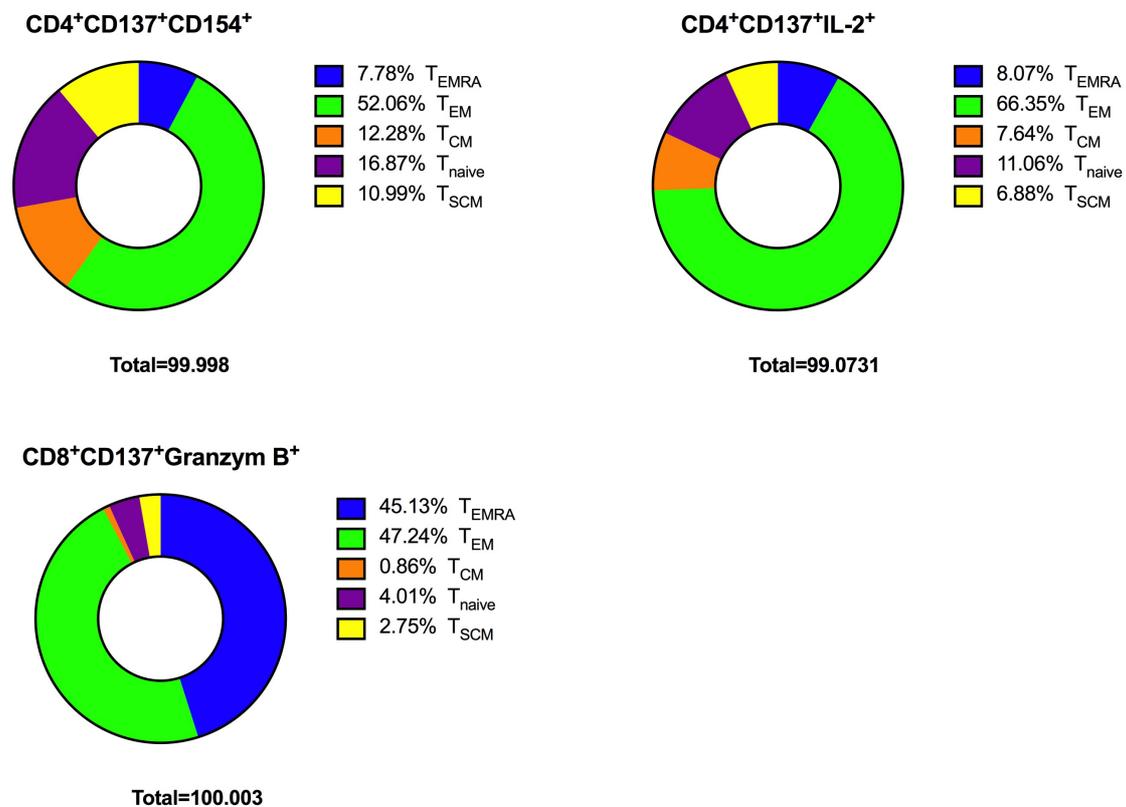


Abb. 29: T-Zell-Memory-Subset-Verteilung der gesunden Spender. Die Auswertung erfolgte anhand der *Gating*-Strategie, die in den Abbildungen 11 bis 14 erläutert ist.

Vor allem spätreaktive T-Memory-Zellen sind an der allospezifischen Immunreaktion beteiligt, namentlich T_{EMRA} sowie T_{CM}. Im Zeitverlauf sind die Verteilungsmuster weitestgehend konsistent.

In den Abbildungen 30, 31 und 32 ist die auf die Aktivierungsmarker angewandte *Gating*-Strategie der T-Zell-Gedächtnis-Subsets exemplarisch für einen gesunden Spender (Donor 20) dargestellt.

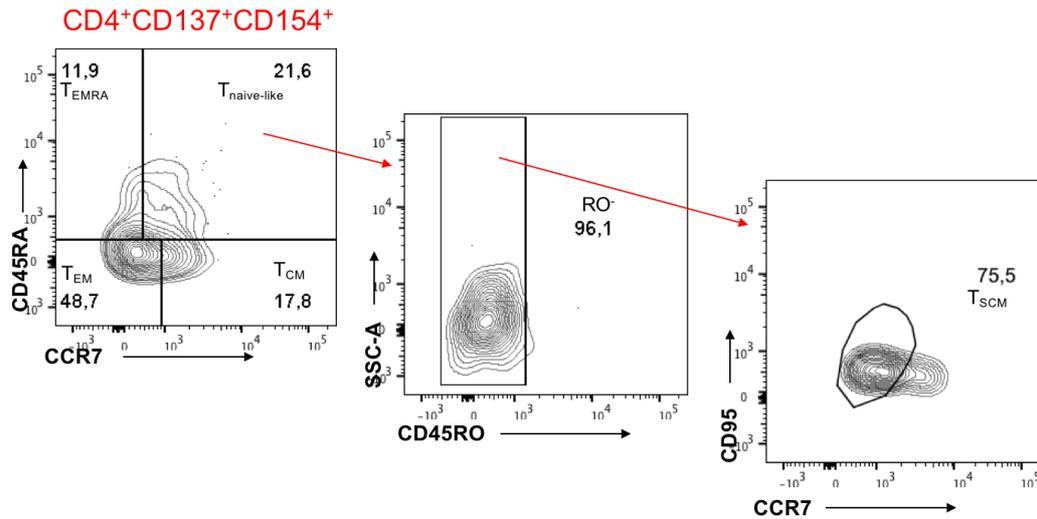


Abb. 30: T-Zell-Memory-Subsets der CD4⁺CD137⁺CD154⁺.

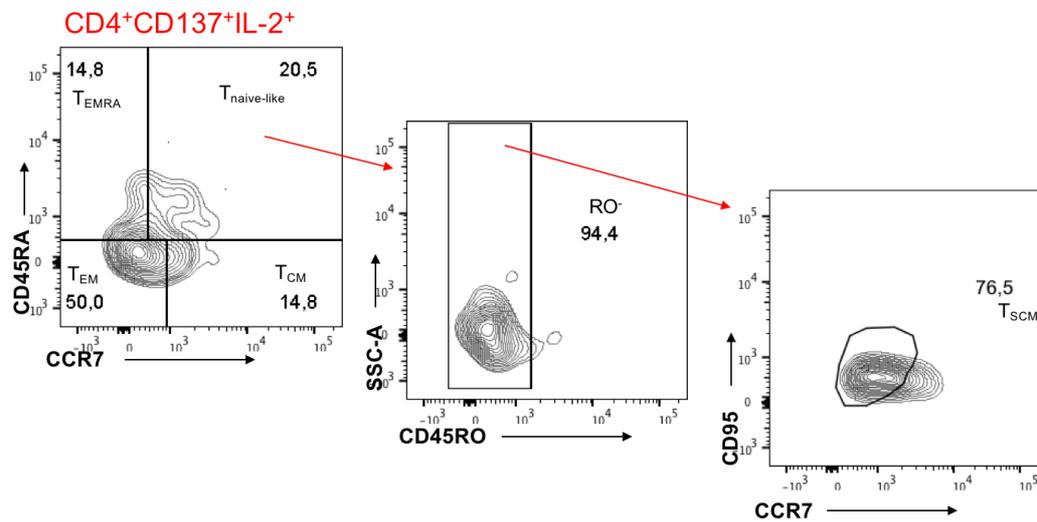


Abb. 31: T-Zell-Memory-Subsets der CD4⁺CD137⁺IL-2⁺.

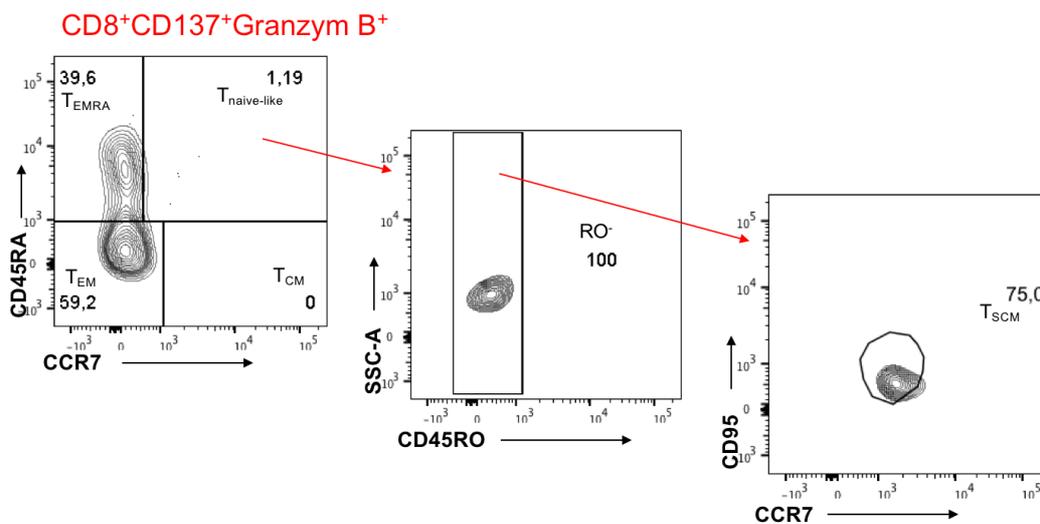


Abb. 32: T-Zell-Memory-Subsets der CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺.

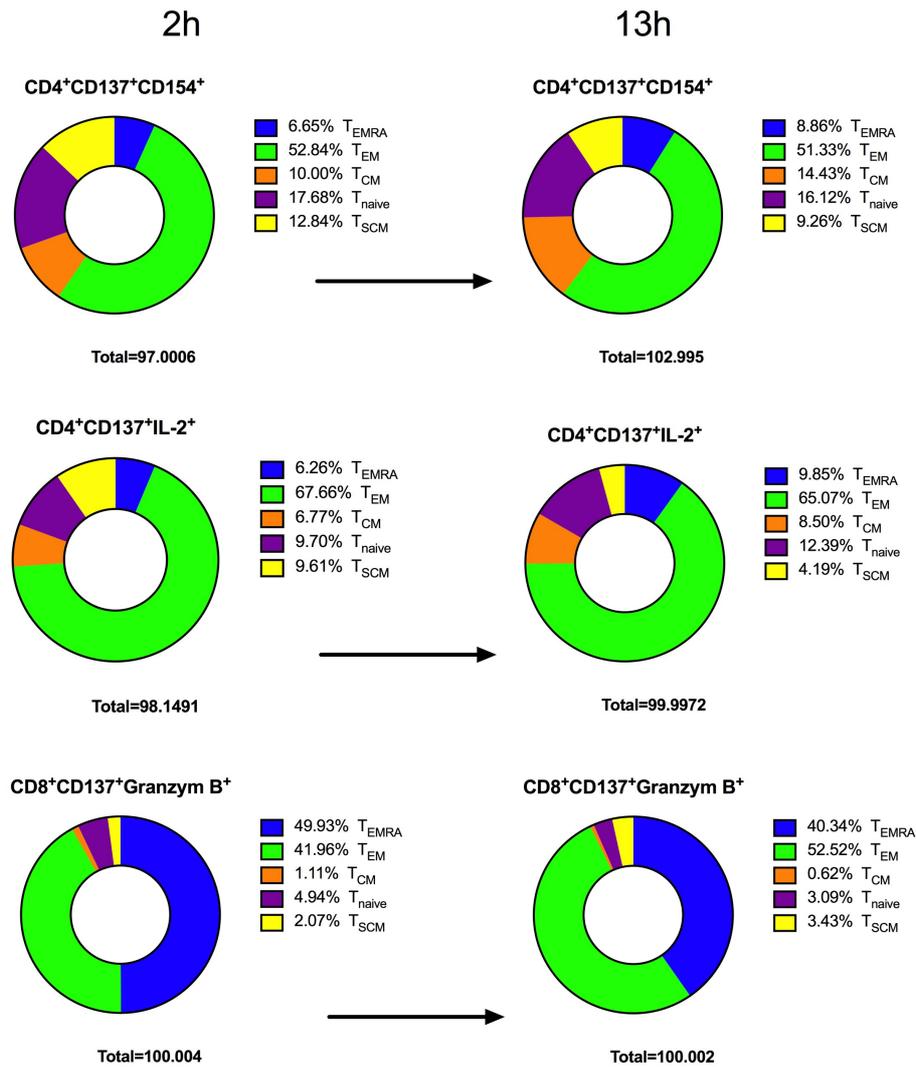
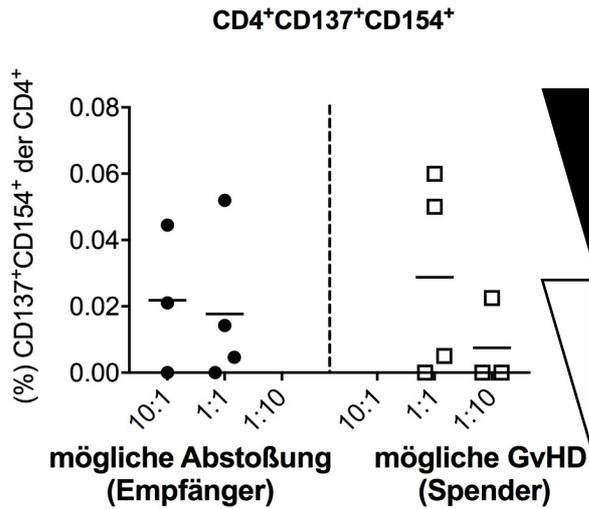


Abb. 33: T-Zell-Memory-Subset-Verteilung im Zeitverlauf.

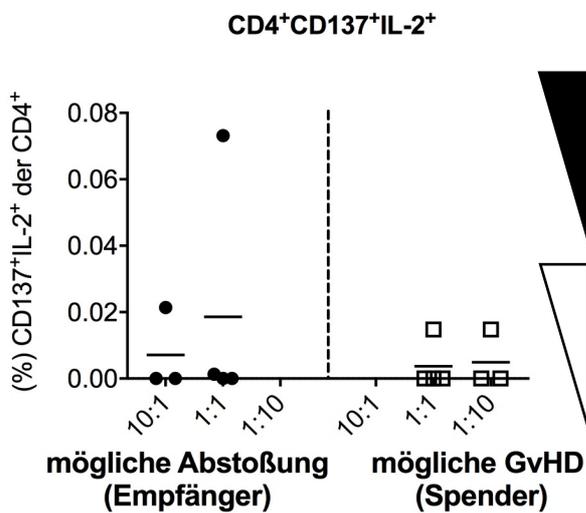
4.5 Patientendaten

4.5.1 Alloreaktion

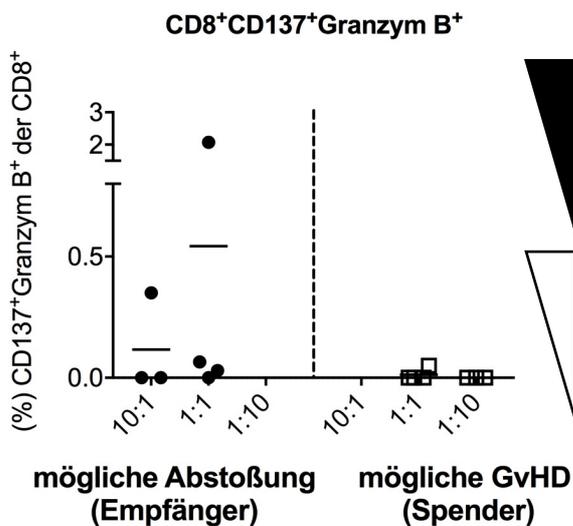
Die spezifische Aktivierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von Spendern und Empfängern ist in Abbildung 34 dargestellt. Auf der linken Seite ist die Aktivierung von Spendern und Empfängern für die ausgewählten Aktivierungsmarker zu sehen. Auf der rechten Seite sind sowohl Empfänger (schwarzer *Decrescendo*-Balken) sowie Spender (weißer *Decrescendo*-Balken) nach der Höhe ihrer Marker-Induktion geordnet. Empfänger und Spender mit der höchsten Aktivierung stehen an oberster Stelle. An letzter Stelle stehen Empfänger und Spender mit der niedrigsten Marker-Induktion. Unterstrichen sind Spender und Empfänger einer haploidenten Transplantation.



Patienten ID	10:1	1:1	1:10
<u>421</u>	0,21	0,052	
<u>431</u>	0,445	0,01425	
<u>561</u>	/	0,00463	
<u>741</u>	0	0	
<u>42D</u>		0,05	0,0225
<u>43D</u>		0,005	0
<u>56D</u>		0	/
<u>74D</u>		0	0



Patienten ID	10:1	1:1	1:10
<u>431</u>	0,02139	0,073175	
<u>421</u>	0	0,001275	
<u>741</u>	0	0	
<u>561</u>	/	0	
<u>42D</u>		0,01475	0,01475
<u>43D</u>		0	0
<u>56D</u>		0	/
<u>74D</u>		0	0



Patienten ID	10:1	1:1	1:10
<u>421</u>	0,35	2,075	
<u>561</u>	0	0,065	
<u>431</u>	/	0,0301	
<u>741</u>	0	0	
<u>42D</u>		0,05	0
<u>43D</u>		0	0
<u>56D</u>		0	/
<u>74D</u>		0	0

Abb. 34: Aktivierungsmarker-Induktion der Patienten und Spender im Vergleich.

4.5.2 Klinischer Verlauf

In den Tabellen 18 und 19 ist das klinische *Outcome* der Patienten mit Fokus auf Komplikationen nach HSZT dargestellt. Die GvHD-Gradeinteilung erfolgte anhand der Glucksberg-Skala (siehe Kap.1.3.2). Bei einem der vier eingeschlossenen Patienten wurde eine Haut-GvHD Grad I diagnostiziert und mit Steroiden behandelt. Bei einem zweiten Patienten bestand bei Diarrhoe und Erbrechen der Verdacht auf eine Darm-GvHD, die ebenfalls mit Steroiden behandelt wurde. Bei beiden Patienten sistierten die Symptome unter der Therapie. Patient 431 entwickelte ein juckendes, papulöses Exanthem. Eine GvHD als dessen Grundlage konnte ausgeschlossen werden. Ein Patient (561) erhielt eine DLI, bei einer Abstoßung anzeigendem fallendem Chimärismus. Bei allen vier Patienten kam es zu viralen Reaktivierungen und Organkomplikationen (insbesondere arterieller Hypertonus und akutes Nierenversagen). Alle Patienten erhielten eine dreimalige Gabe von ATG in Höhe von 10mg beziehungsweise 15 mg/kg Körpergewicht (KG). Als für die Konditionierung verwendete Chemotherapeutika kamen Fludarabin, Methotrexat, Thiotepa und Treosulfan zum Einsatz. Die GvHD-Prophylaxe erfolgte mit Mycophenolat Mofetil sowie Ciclosporin A, welches aufgrund eingeschränkter Nierenfunktion bei zwei Patienten auf Everolimus umgestellt werden musste. Das *Engraftment* fand im Mittel nach 23,5 Tagen statt. Bei drei von vier Patienten lag der Chimärismus bei 100% nach durchschnittlich 43 Tagen (± 16).

Tab. 18 Klinischer Verlauf I – Komplikationen

Patienten-ID	GvHD	Abstoßung	Infektionen (Auftreten Tag nach Tx)	Organ- komplikationen	GvHD- Therapie
421	Haut °I (+53)	nein	-V.a. HSV-Mukositis (+56) -CMV-PCR positiv (+14) - <i>C. difficile</i> -Antigen positiv (+3)	-ANV nach Aciclovir (+25) -ANV nach CsA (+43)	Prednisolon systemisch, Advantan und Protopic lokal (+62)
431	keine	nein	-HSV-Stomatitis (+43) -Katheterinfektion (MRSA) (+5) -Katheterinfektion (<i>P. aeruginosa</i>) und Sepsis (+163)	-arterieller Hypertonus -papulöses Exanthem unklarer Genese (+21)	keine
561	keine	DLI-Gabe (+66) bei fallendem Chimärismus	-Adeno-Virus-PCR im Stuhl positiv (+7) -CMV-Reaktivierung (+28) -EBV-Reaktivierung (+76)	-arterieller Hypertonus (+28) -Diarrhoe unklarer Genese (+150)	keine
741	V.a. GI- GvHD (+22)	nein	CMV-Reaktivierung (+4)	-arterieller Hypertonus -ANV (+11) - <i>Capillary-leak- Syndrom</i> (+19)	Prednisolon (+22)

In Klammern ist das Auftreten, bzw. die Durchführung an Tag X nach Transplantation angegeben. Abk.: ANV = Akutes Nierenversagen, *C. difficile* = *Clostridium difficile*, *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*, V.a. = Verdacht auf.

Tab. 19 Klinischer Verlauf II – Konditionierung, GvHD-Prophylaxe, Engraftment und Chimärismus

Patienten-ID	Konditionierung	GvHD-Prophylaxe	Engraftment	Chimärismus
421	ATG (3x15mg/kgKG), Thiotepa, Fludarabin, Treo sulfan	CsA, Everolimus, MMF	+20	100% (+66)
431	ATG (3x15mg/kgKG), Thiotepa, Fludarabin, Melphalan	CsA, Everolimus, MMF	+30	100% (+35)
561	ATG (3x10mg/kgKG), Thiotepa, Fludarabin, MTX	CsA, MMF	+25	100% (+42)
741	ATG (3x15mg/kgKG), Fludarabin, Treo sulfan, Thiotepa, MTX	CsA Everolimus MMF	+19	100% (+30)

In Klammern ist das Auftreten bzw. die Durchführung an Tag X nach Transplantation angegeben. Bei Kreatinin-Anstieg wurde von CsA auf Everolimus umgestellt. ATG ist sowohl Teil der Konditionierung als auch der GvHD-Prophylaxe, es ist in dieser Tabelle aus Platzgründen nur unter Konditionierung aufgeführt. Die CsA- und MMF-Gabe erfolgte zunächst intravenös, dann *per os*.

4.5.3 T-Zell-Memory-Subpopulationen

Die *Subset*-Verteilung der *Memory*-T-Zellen ist jeweils im Vergleich zu den Zellen der gesunden Kontrollgruppe in Tabelle 20 für die Spender und in Tabelle 21 für die Empfänger der hämatopoetischen Stammzelltransplantation dargestellt. Die *Decrescendo*-Balken zeigen die Höhe der Aktivierungsmarker-Induktion für Spender und Empfänger an, wonach diese von links nach rechts angeordnet sind.

Tab. 20 T-Zell-Memory-Subset-Verteilung der Spender

CD4⁺CD137⁺CD154⁺					
	Kontrolle	42D	43D	56D	74D
T _{EMRA}	7,78%	3,69%	0%	0%	100%
T _{EM}	52,06%	83,90%	100%	0%	0%
T _{CM}	12,28%	11,10%	0%	0%	0%
T _{naive}	16,87%	1,3225	0%	0%	0%
T _{SCM}	10,99%	0%	0%	0%	0%

CD4⁺CD137⁺IL-2⁺					
	Kontrolle	42D	43D	56D	74D
T _{EMRA}	8,00%	0,83%	0%	0%	0%
T _{EM}	65,74%	81,68%	0%	0%	0%
T _{CM}	7,57%	16,96%	0%	0%	0%
T _{naive}	10,96%	0,52%	0%	0%	0%
T _{SCM}	6,81%	0%	0%	0%	0%

CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺					
	Kontrolle	42D	43D	56D	74D
T _{EMRA}	45,13%	81,30%	100%	0%	0%
T _{EM}	47,24%	8,15%	0%	0%	0%
T _{CM}	0,86%	2,59%	0%	0%	0%
T _{naive}	4,01%	7,40%	0%	0%	0%
T _{SCM}	2,75%	0,56%	0%	0%	0%

Sofern alloreaktive Zellen bei den Spendern gemessen werden konnten, waren die Verteilungsmuster denen der gesunden Kontrolle ähnlich. Lediglich die Verteilung von CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺ zeigt einen deutlicheren Fokus auf die T_{EMRA}.

Tab. 21 T-Zell-Memory-Subset-Verteilung der Empfänger

CD4⁺CD137⁺CD154⁺					
	Kontrolle	421	431	561	741
T _{EMRA}	7,78%	10,12%	81,30%	0%	0%
T _{EM}	52,06%	70,93%	8,15%	0%	0%
T _{CM}	12,28%	10,55%	2,59%	100%	0%
T _{naive}	16,87%	4,41%	7,40%	0%	0%
T _{SCM}	10,99%	3,97%	0,56%	0%	0%

CD4⁺CD137⁺IL-2⁺					
	Kontrolle	421	431	561	741
T _{EMRA}	8,00%	25%	9,45%	0%	0%
T _{EM}	65,74%	25%	61,95%	0%	0%
T _{CM}	7,57%	16,68%	15%	0%	0%
T _{naive}	10,96%	0%	10,83%	0%	0%
T _{SCM}	6,81%	8,33%	2,78%	0%	0%

CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺					
	Kontrolle	421	431	561	741
T _{EMRA}	45,13%	98,15%	100%	100%	0%
T _{EM}	47,24%	1,51%	0%	0%	0%
T _{CM}	0,86%	0%	0%	0%	0%
T _{naive}	4,01%	0,13%	0%	0%	0%
T _{SCM}	2,75%	0,22%	0%	0%	0%

Bei den Empfängern ist die *Subset*-Verteilung diverser und lässt außer bei den CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺ Zellen keinen eindeutigen Fokus erkennen. Teilweise ergeben die gezeigten Werte keine 100 Prozent, da Mittelwerte gebildet wurden, von denen mehrere gleich Null waren. In den Abbildungen 35 bis 38 sind exemplarisch die FACS-Messdaten der T-Memory-Subset-Analyse für einen Empfänger (421) sowie einen Spender (42D) abgebildet.

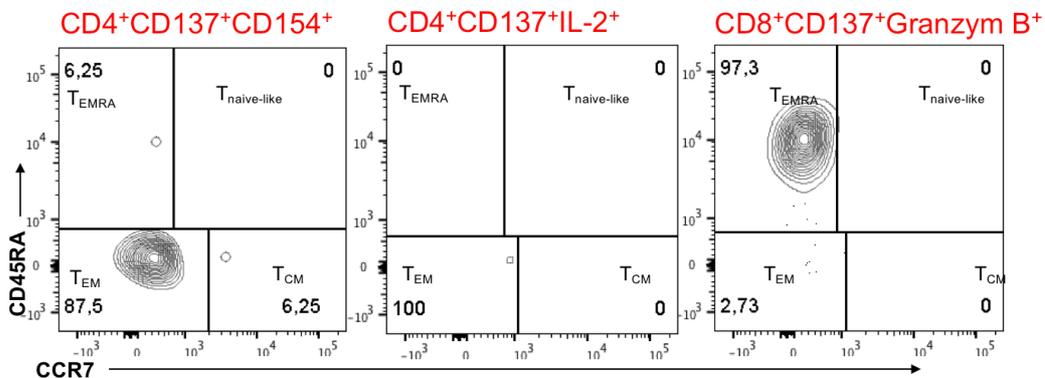


Abb. 35: FACS-Daten Patient 421 für CD137⁺CD154⁺ und CD137⁺IL-2⁺ der CD4⁺ T-Lymphozyten sowie für CD137⁺GranzymB⁺ der CD8⁺ T-Lymphozyten.

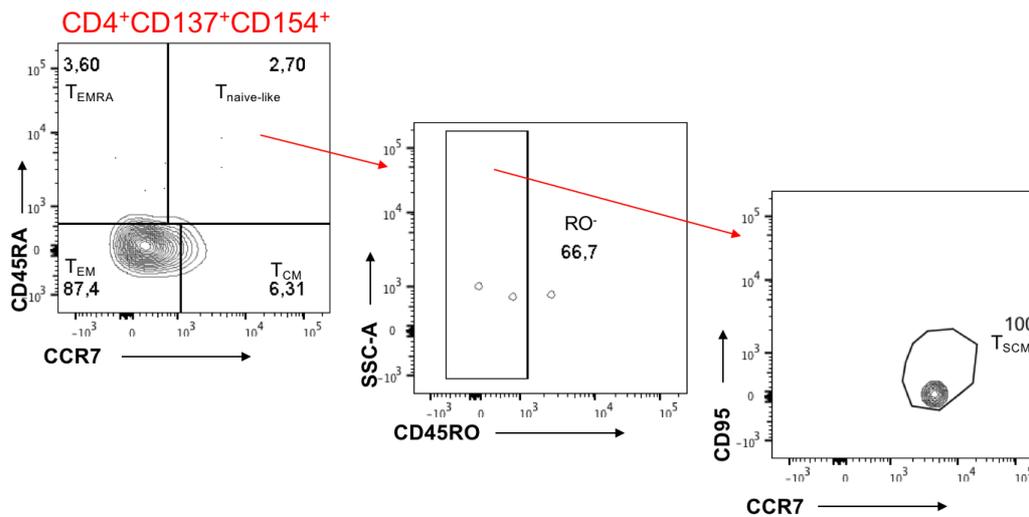


Abb. 36: FACS-Daten Spender 42D für CD137⁺CD154⁺ der CD4⁺ T-Lymphozyten.

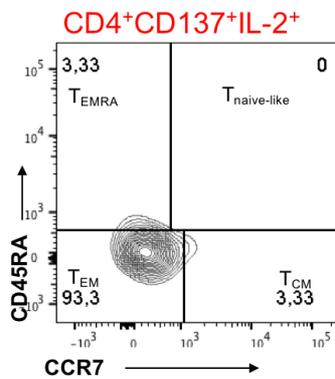


Abb. 37: FACS-Daten Spender 42D für CD137⁺IL-2⁺ der CD4⁺ T-Lymphozyten.

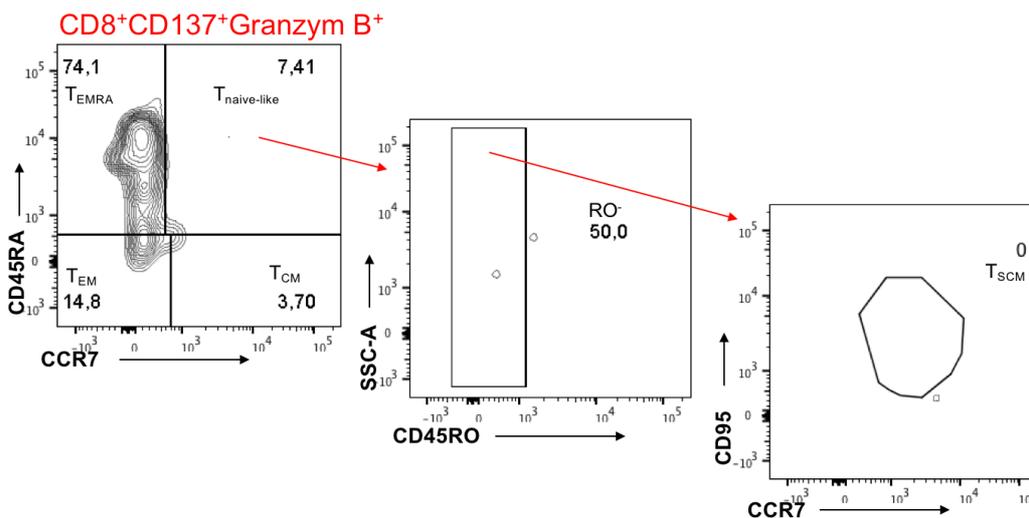


Abb. 38: FACS-Daten Spender 42D für CD137⁺Granzym B⁺ der CD8⁺ T-Lymphozyten.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte ein Versuch etabliert werden, mit dem allospezifische T-Zellen nach einer zweiseitigen *mixed lymphocyte reaction* (MLR) durch das durchflusszytometrische Messen der Aktivierungsmarker Granzym B, IL-2, CD137, CD154, IFN- γ sowie TNF- α identifiziert werden können.

Hierfür wurden 20 gesunde, höchstwahrscheinlich nicht-HLA-idente Spenderzellen in 10 Versuchen jeweils in Paaren und verschiedenen Ratios (10:1, 1:1, 1:10) in Kultur gegeben. Anschließend wurden mittels FACS die Oberflächenprofile der reagierenden Zellen sowie deren Zytokin-Produktion gemessen. Die Hintergrundaktivität wurde durch Negativkontrollen von den stimulierten Ansätzen abgezogen, wodurch sich eine bereinigte Induktion der Marker ergab. Sowohl die einfach positiven, als auch die doppelt positiven T-Zellen zeigten eine Induktion insbesondere der Marker Granzym B, IL-2, CD137 sowie CD154. Dies galt sowohl für die CD4⁺, als auch für die CD8⁺ T-Zellen.

Es war eine Dosisabhängigkeit erkennbar, wobei es in der 1:1 und 1:10 im Vergleich zur 10:1 Co-Kultur zu mehr Induktion kam, was für die Spezifität der Immunantwort spricht. Des Weiteren fand sich bei vielen Aktivierungsmarkern ein Plateau der Induktionshöhe bei 1:1, das für 1:10 nicht weiter zunahm. Für einige Marker zeigte sich die höchste Expression im 1:1-Ansatz. Außerdem gab es die Tendenz, dass die Induktion 13 Stunden nach Brefeldin A-Zugabe höher als die nach 2 Stunden war. Dies betraf vor allem die CD4⁺ T-Zellen.

Durch Kombination von Aktivierungsmarkern konnte der *Background* verringert und die Spezifität des *Assays* erhöht werden. Kombinationen mit dem niedrigsten *Background* und der höchsten Induktion waren CD4⁺CD137⁺CD154⁺, CD4⁺CD137⁺IL-2⁺ sowie CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺.

Die dominierenden Gedächtniszell-Subpopulationen der ausgewählten Marker-Kombinationen waren T_{EM} und T_{naive} für die CD4⁺ T-Zellen, sowie T_{EM} und T_{EMRA} für die CD8⁺ T-Zellen.

In Patientenproben konnten allospezifische T-Zellen von sowohl Spender- als auch Empfänger-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die dominierenden T-Gedächtnis-Subpopulationen waren mit noch stärkerer Tendenz als bei den gesunden Probanden die T_{EM} sowie die T_{EMRA}. Im klinischen Verlauf entwickelten zwei Patienten eine leichtgradige GvHD. Außerdem entwickelte ein Patient ein leichtes Transplantatversagen.

5.2 Kritische Bewertung der Ergebnisse

5.2.1 Gesunde Probanden

5.2.1.1 Analyse der Zytokine und Aktivierungsmarker

Generell sind verschiedene *Assays* bekannt, um eine Alloreaktion zu messen. Hierzu gehören Elispots, welche die Zytokin-Sezernierung messen (vgl. IFN- γ -Elispot, in Kap. 1.5 beschrieben), oder FACS-basierte *Assays*, die sich in Proliferations- und Aktivierungsmarker-*Assays* aufteilen lassen. Ein Aktivierungsmarker-*Assay* wurde in dieser Arbeit durchgeführt. Für die FACS-basierten *Assays* liegt meist eine MLR zugrunde. Ein Problem bei dieser Reaktion ist die mangelnde Quantifizierbarkeit der Alloreaktion. Durch Kombination der MLR mit Proliferations- beziehungsweise Aktivierungsmarkern kann dieses Problem gelöst werden. Ein ähnliches *Assay* wurde 2013 von Litjens *et al.* publiziert.⁴⁵ Allerdings lag hierbei der Fokus auf der Etablierung von CD137 als Marker für den gesamten *Pool* an allospezifischen T-Zellen. Der in dieser Arbeit vorgestellte Versuch geht darüber hinaus, integriert Granzym B in das *Panel*, schafft mit Ratios (10:1, 1:1, 1:10) eine Beurteilbarkeit der Dosisabhängigkeit und vergleicht die Zugabe von Brefeldin A nach 2 und 13 Stunden.

Granzym B wird vor allem bei CD8⁺ und NK-Zellen vorformiert zusammen mit Perforin in Granula gespeichert.¹⁴⁶ Bei CD4⁺ T-Zellen scheint es auch eine Expression von Granzym B zu geben, allerdings ist eine Bedeutung für die Exozytose derzeit nicht belegt.^{147,148} Generell ist die Granzym-Expression in CD8⁺ T-Zellen höher als CD4⁺ T-Zellen.¹⁴⁹ Auch in dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuch war die Granzym B-Expression von CD8⁺ Lymphozyten um ein Vielfaches höher als die der CD4⁺. Sowohl bei CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen scheint es die Tendenz zu geben, dass mehr Granzym detektiert wird, wenn die Sezernierung nach 2 Stunden durch Brefeldin A gestoppt wird. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit mehreren anderen Studien (vgl. Abb. 39¹⁵⁰ und 40¹⁵¹). Allerdings fanden weitere Studien einen zusätzlichen *Peak* der Expression bei 48 Stunden sowie eine maximale Akkumulation nach 72 Stunden¹⁵¹, beziehungsweise sogar erst nach drei bis fünf Tagen¹⁵². Granzym B unterschied sich dort von den anderen Zytokinen durch eine kontinuierliche Zunahme der Expression, wohingegen die anderen untersuchten Zytokine (IL-2, IFN- γ , TNF- α) meist biphasisch exprimiert wurden.¹⁵¹ Diese Zeitspannen über 13 Stunden konnten in dieser Arbeit auf Grund der kürzeren Versuchsdauer nicht untersucht werden. Im Gegensatz zu den oben genannten Arbeiten gab es in den Ergebnissen dieser Arbeit sogar die Tendenz zu mehr Induktion bei Sezernierungsstopp zwei Stunden nach Aktivierung. Ein möglicher Grund für die Abweichung könnte sein, dass

bei den genannten Arbeiten die Gen-Aktivität mittels *real-time* PCR gemessen wurde und demnach die Sezernierung keine Rolle spielte und nicht zu einem Verlust des zu messenden Zytokins durch die Sezernierung führte. Dies kann prinzipiell von Vorteil ist, da keine Aktivierungsmarker „verloren“ gehen. Allerdings ist die *real-time* PCR ein aufwendigeres Verfahren. Der Anspruch dieses Versuchs war es, einen möglichst einfach durchführbaren *Assay* zu etablieren.

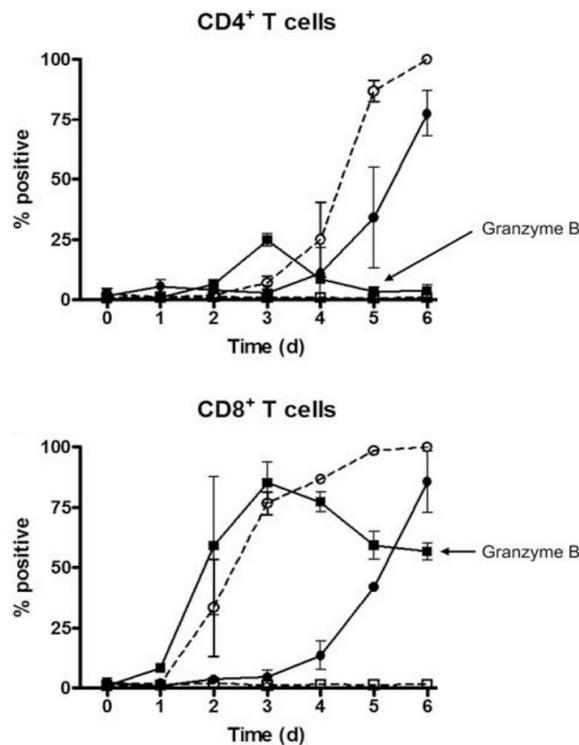


Abb. 39: Granzym-Kinetik aus Sheng *et al.*, 2009. Gemessen wurde die Proteinexpression an mehreren Zeitpunkten mittels FACS. Stimuliert wurden die T-Zellen durch CD3/CD28-*Beads*.

IL-2 wird oft als potenter Aktivierungsmarker verwendet. Es zeichnet sich durch seine frühe Verfügbarkeit insbesondere für T_H -Zellen aus, beeinflusst aber sowohl die Expansion von $CD4^+$ als auch von $CD8^+$ Zellen.¹⁵³ Die Induktionszeit für IL-2 gibt Abdalla *et al.* mit 30 Minuten bis 4 Stunden an.¹⁵¹ IL-2 wird vermehrt von $CD8^+$ T-Zellen gebildet, was auch in dieser Arbeit festgestellt werden konnte. Die Aktivierung ist in anderen Studien als biphasisch beschrieben, wobei kein Unterschied zwischen den T-Zell-Subpopulationen besteht (Abb. 40¹⁵¹). Der erste *Peak* ist nach 2 bis 6 Stunden zu verzeichnen. Der zweite *Peak* wird zwischen 12 und 16 Stunden erreicht. Eine biphasische Aktivierung konnte aufgrund von nur zwei analysierten Zeitpunkten nicht bewertet werden, dennoch wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl eine Expression nach 2 Stunden als auch nach 13 Stunden gefunden. Allerdings war die Induktion von IL-2 zum Zeitpunkt der BFA-Gabe nach 13 Stunden für die $CD8^+$ signifikant höher als

beim Sezernierungsstopp nach 2 Stunden. Dies steht im Gegensatz zu der oben genannten anderen Arbeit, bei der die höchste Aktivierung beim ersten *Peak* gemessen wurde.¹⁵¹ Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der erste Zeitpunkt relativ früh gewählt war und die Produktion gerade erst begonnen hatte. Der Zeitpunkt nach 13 Stunden liegt zwischen dem ersten und zweiten *Peak* und könnte daher die Expression des ersten *Peaks* miteinschließen. Weiterhin spielt die Antigen-Erkennung eine entscheidende Rolle. Ist das fremd-pHLA noch nicht exprimiert, kann dieses auch nicht erkannt werden. Die pHLA-Expression wird wiederum durch BFA inhibiert, was eine weitere Erklärung für die höhere Induktion von IL-2 nach 13 Stunden sein kann.

Die IFN- γ - und TNF- α -Expression wurde in der Arbeit von Abdalla *et al.* 5 bis 30 Minuten nach Aktivierung gemessen.¹⁵¹ Die maximale Expression aller Zytokine wurde dort 4 bis 8 Stunden nach Aktivierung erreicht, wobei es keine signifikanten Unterschiede zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gab. Die Induktion von IFN- γ war unabhängig von T-Zell-*Subset* oder Stimulus bis 96 Stunden nach Aktivierung kontinuierlich hoch. Andere Arbeiten fanden ebenfalls eine Expression von TNF- α und IL-2 innerhalb einer Stunde mit einem Maximum bei 3 bis 4 Stunden.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Aufgrund der späten Integration von IFN- γ und TNF- α in das bestehende *Panel* ist die Datenlage zu beiden Zytokinen in dieser Arbeit noch gering. Es gab eine minimale TNF- α -Aktivierung der CD4⁺ Zellen nach 2 Stunden. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen produzierten nach 13 Stunden kein Zytokin mehr. Dies könnte mit den oben genannten Eigenschaften von TNF- α als schnell sezerniertes Zytokin in Zusammenhang stehen.

Abdallah *et al.* empfiehlt ausgehend von den von seiner Arbeitsgruppe gemessenen Zytokinen IL-2, IFN- γ , TNF- α und Granzym B einen Messzeitpunkt 4 bis 8 Stunden nach Stimulation, für Granzym B sogar einen optimalen Zeitpunkt 48 bis 72 Stunden.¹⁵¹ Die Versuchsdaten dieser Arbeit sprechen ausgehend von den gemessenen Zytokinen für einen späteren Zeitpunkt, da hier insbesondere bei IL-2 eine höhere Aktivierungsmarker-Induktion gemessen wurde. Spätestens in Zusammenschau mit den co-stimulatorischen Transmembranproteinen CD137 und CD154 (siehe unten) ist ein später Messzeitpunkt zu favorisieren. Ob die Addition von Brefeldin A nach 13 Stunden optimal ist oder ob es einen noch günstigeren Zeitpunkt zwischen 2 und 13 Stunden gibt, könnte in weiteren Analysen getestet werden (siehe Kapitel 5.5).

Zellen, die keins der analysierten Zytokine (IL-2, TNF- α , IFN- γ) produzieren, bleiben somit undetektiert. Dies könnte die Frequenz der alloreaktiven T-Zellen niedriger erscheinen lassen, als sie in Wirklichkeit ist.³⁹ In diesem Versuch ließ sich dieses Bias nicht beeinflussen.

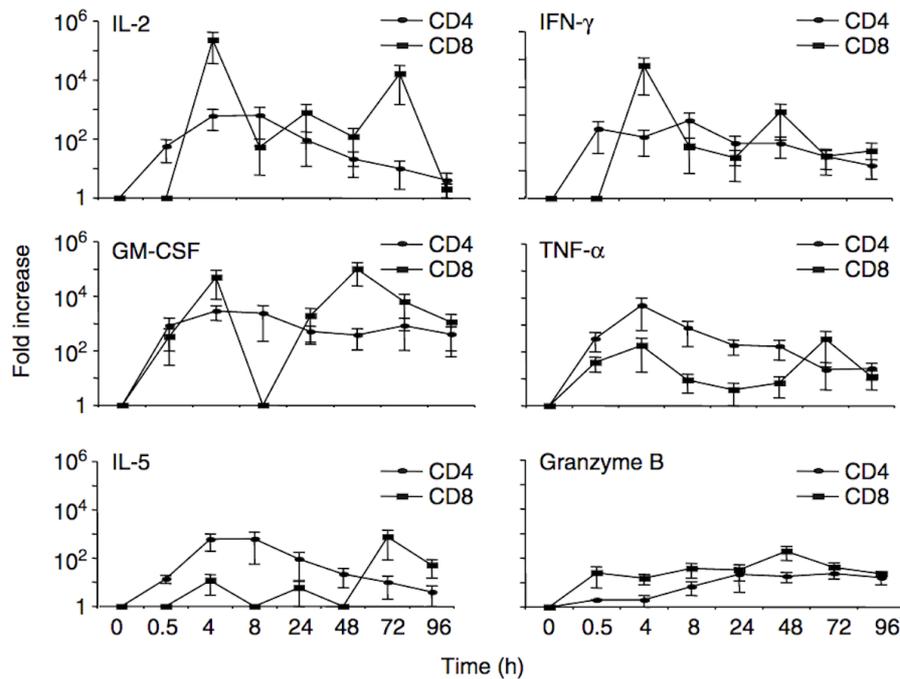


Abb. 40: Zytokin-Kinetik aus Abdalla *et al.*, 2003.

Gezeigt ist die Genexpression der Marker nach Stimulation mit *Purified Protein Derivative*, was mit der MHC-TCR-Interaktion vergleichbar ist. Relevant für den Vergleich mit den Daten dieser Arbeit waren die Zytokine IL-2, IFN- γ , TNF- α sowie Granzym B.

Wie bereits oben erwähnt zeigt eine Studie von Litjens *et al.* in 2013, dass der gesamte *Pool* an allospezifischen T-Zellen durch die Expression von CD137 erfasst werden kann.⁴⁵ 16 bis 24 Stunden nach Stimulation wird CD137 nach derzeitiger Studienlage hochreguliert und weist sehr spezifisch aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Spezifisch ist CD137 insbesondere auch, weil dessen Expression eine kurz vorher erfolgte TCR-Stimulation benötigt.¹⁵⁸ Mehrere Studien fanden ein Maximum der Expression bei 24 Stunden nach Aktivierung.^{45,157,158} Der optimale Messzeitpunkt wird zwischen 20 und 24 Stunden nach Stimulation angegeben. Demnach ist in dieser Arbeit selbst der zweite Sezernierungsstopp früh gewählt (nach 13 Stunden). Entsprechend einer Arbeit von Dawicki *et al.* beginnt die Antigen-induzierte Expression aber bereits nach 12 Stunden, dementsprechend ist der frühe Zeitpunkt vertretbar, insbesondere in Verbindung mit den übrigen Aktivierungsmarkern, deren Expressionsmaxima teilweise schon früher liegen.¹⁶⁰ Außerdem wird das in diesem Versuch verwendete Brefeldin A nach 18 Stunden toxisch (siehe Kap. 5.2.1.3). In dieser Arbeit fand sich ein signifikanter Anstieg der CD137-Induktion nach 13 Stunden bei den CD4⁺ T-Zellen. Bei den CD8⁺ Zellen kam es im Vergleich beider Messzeitpunkte zu keiner höheren Induktion, was darauf hindeuten könnte, dass es die CD8⁺ T-Zellen erst später mit der Expression von CD137 beginnen. Bezüglich der Höhe der Aktivierung fand Litjens *et al.* bei den CD8⁺CD137⁺

im Median eine Induktion von 0,05 Prozent.⁴⁵ In dieser Arbeit lag die Expression deutlich höher, nämlich bei 0,25 Prozent (CD8⁺CD137⁺ nach 2 und 13 Stunden) sowie bei bis zu 0,5 Prozent (CD4⁺CD137⁺ nach 13 Stunden). Es ist nicht eindeutig geklärt, welche Population (CD4⁺ oder CD8⁺) bei Aktivierung mehr CD137⁺ exprimiert. Andere Arbeiten fanden entweder mehr Expression bei den CD8⁺ T-Zellen oder keinen Unterschied.^{45,157} Diese Arbeit fand eine deutlich höhere Expression bei den CD4⁺CD137⁺.

Auf fast allen aktivierten CD4⁺ Lymphozyten existiert das Transmembranprotein CD154 (CD40 Ligand, CD40L). Die Expression ist streng reguliert.¹⁶¹ Es kann innerhalb kürzester Zeit an die Oberfläche gebracht werden und die Aktivierung von APCs auslösen, aber auch in sekretorischen Lysosomen von CD4⁺ *Memory*- und Effektorzellen (beide vom T_H1-Typ) bis zur Aktivierung gelagert werden. In der Studie von Koguchi *et al.* war gespeichertes CD154 bereits nach 5 Minuten detektierbar und ging nach einem *Peak* bei Minute 15 in stabile, kontinuierliche Expression nach 30 Minuten über. Eine weitere Zunahme war danach von *de novo* Synthese abhängig.¹⁶² Eine andere Arbeit von Lee *et al.* fand eine Detektierbarkeit nach 2 Stunden, einen *Peak* bei 6 Stunden und keinen Nachweis von CD154 nach 24 Stunden.¹⁶³ Litjens *et al.* propagierten 2013 ein biphasisches Muster, wobei sie den ersten *Peak* ebenso wie Lee *et al.* bei 6 Stunden sahen, zusätzlich jedoch einen zweiten *Peak* bei 24 Stunden verzeichneten.⁴⁵ Eine weitere Studie fand beim ersten *Peak* (4 bis 6 Stunden nach Stimulation) einen Median der Expression von CD154 bei 2,0 Prozent aller CD4⁺ T-Zellen.¹⁵⁷ In dieser Arbeit lag der Median der höchsten Expression (nach 13 Stunden in der Verdünnung 1:1) bei 0,75 Prozent aller CD4⁺. In Übereinstimmung mit der aktuellen Forschungslage exprimierten in dieser Arbeit nur ein Bruchteil der CD8⁺ den Marker CD154 (höchste Expression im Median 0,01% nach 13 Stunden in der Verdünnung 10:1, Daten nicht gezeigt). Weiterhin fand eine Studie heraus, dass CD154 nicht von alloreaktiven CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird, weshalb der Marker im weiteren Etablierungsverlauf bei den CD8⁺ T-Zellen nicht berücksichtigt wurde.¹⁶⁴ Im Einklang mit einer Arbeit von Litjens konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass mehr CD137 als CD154 auf alloreaktiven T-Zellen exprimiert wird.⁴⁵ Dies gilt allerdings nur, wenn man CD4⁺ und CD8⁺ zusammen betrachtet.

5.2.1.2 Analyse der Aktivierungsmarker-Kombinationen

Die meisten Zellen (90%) reagieren nach pMHC-Stimulation mit einer monofunktionalen Antwort, d.h. sie sezernieren nach Aktivierung nur ein Zytokin. Mehrere Zytokine werden eher über die Zeit verteilt sezerniert und nicht alle zu einem Zeitpunkt.¹⁵¹ Deshalb wurden in dieser Arbeit keine doppelt positiven Zytokine analysiert, sondern die Co-Expression von

Aktivierungsmarker CD137 und den jeweiligen Zytokinen. Litjens *et al.* bestätigte diese Erkenntnis: Es wurden dort vor allem einfach positive Zellen und kaum polyfunktionale Zellen gemessen, die an einer MHC-vermittelten Alloreaktion beteiligt waren.⁴⁵ Des Weiteren fand man signifikant weniger doppelt und dreifach positive Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle mit PMA/Iono, was darauf hindeutet, dass zwar prinzipiell die Zytokine *in vitro* gleichzeitig exprimiert werden können, es *in vivo* bei MHC-abhängiger Stimulation aber eher zu einer monofunktionalen Immunantwort kommt. Betrachtet man die Co-Expression von CD137 und Zytokinen isoliert, so fällt auf, dass T-Zellen, die CD137⁺ exprimieren, genauso viel Zytokin produzieren wie generell alle CD4⁺ und CD8⁺, ergo haben alle Zytokin⁺ allospezifischen T-Zellen auch CD137 auf ihrer Oberfläche.⁴⁵ Weiterhin produzieren CD137⁺ T-Zellen in einer großen Fraktion gar keine Zytokine.⁴⁵ Eine ähnliche Beobachtung konnte auch in Bezug auf Virus-spezifische T-Zellen gemacht werden, von denen ein Großteil ebenfalls nur Co-Stimuli exprimiert, aber keine Zytokine produziert.¹⁵⁷ Polyfunktionale Zellen, die nach Aktivierung mehrere Zytokine exprimieren, sind aber für eine sehr starke Immunantwort von großer Bedeutung.¹⁶⁵ Demnach ist es verwunderlich, dass nicht mehr polyfunktionale T-Zellen im Rahmen von Arbeiten, die sich mit der Alloreaktion beschäftigten, gemessen wurden. Es ist somit unklar, warum die von Litjens *et al.* gemessenen Zellen keine Zytokine exprimieren. Litjens *et al.* vermutete, dass es sich bei alloreaktiven T-Zellen um Antigen-reaktive T-Zellen mit geringer Avidität für den T-Zell-Rezeptor handelt. CD3⁺Zytokin⁻ Zellen gehen demnach nicht in die Anergie, sondern sie proliferieren, wenn sie mit IL-2 in Kontakt treten. Das könnte die im Vergleich zu Elispots und Aktivierungsmarker-Assays höhere Frequenz von alloreaktiven T-Zellen in Proliferations-Assays erklären.¹⁶⁴ Aufgrund dieser Annahmen wurde prinzipiell eine geringe Zytokin-Aktivierungsmarker-Co-Expression in dieser Arbeit erwartet. Einige wenige allospezifische T-Zellen waren jedoch doppelt positiv für CD137 und ein weiteres Zytokin. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse von Litjens in Abbildung 41⁴⁵ für die Zytokine IFN- γ , IL-2 sowie TNF- α dargestellt. Die Co-Expression von IFN- γ und TNF- α mit CD137 war, wie auch in der gezeigten Abbildung, in dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuch verschwindend gering, aber dennoch vorhanden, wenn auch die geringe Spenderanzahl dieser Arbeit nur eingeschränkte Aussagen zu beiden Zytokinen zulässt. IL-2 ist jedoch mit einer maximalen Expression in Kombination mit CD137 im Median von 0,02 Prozent vergleichsweise relativ hoch induziert, was die bereits auf einfach positivem Expressionslevel gefundene Tendenz zur hohen Expression von IL-2 bei CD4⁺ T-Zellen bestärkt. Es zeigte sich in dieser Arbeit eine Tendenz zu hoher doppelt positiver Expression von CD137⁺Granzym B⁺ innerhalb der CD8⁺ T-Zell-Population. Auf der Erforschung der

Kombination dieser beiden Marker liegt derzeit kein Fokus. Diese Arbeit zeigt auf, dass weitere Untersuchungen hierzu wertvolle Erkenntnisse liefern könnten.

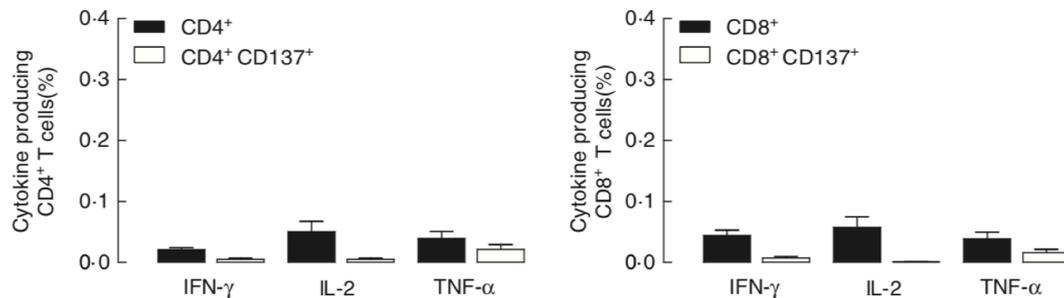


Abb. 41: Zytokin-Induktion allein sowie in Kombination mit CD137 auf T-Zellen aus Litjens *et al.*, 2013.

Stimuliert wurden die Zellen wie auch in dieser Arbeit durch eine zweiseitige MLR.

Mehrere Arbeiten fanden kaum (0,1% aller CD4⁺) oder nur eine marginale Induktion von CD137⁺CD154⁺ auf CD4⁺.^{45,157} Dies entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit (höchste Expression 0,1% nach 13 Stunden in der Verdünnung 1:1). Allerdings ist das Ergebnis im Vergleich mit der Induktion anderer doppelt positiver Marker vergleichsweise hoch und dessen Spezifität nicht zu vernachlässigen. Deshalb wurde diese Kombination in die engere Auswahl zur weiteren Analyse an Patientenproben genommen. Wie in Kapitel 1.5 besprochen könnte die Erfassbarkeit von allo-spezifischen T-Zellen über Co-Stimuli als Aktivierungsmarker (CD137, CD154) besser sein als über Zytokin-Aktivität.¹³⁸ Diese Hypothese lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit insbesondere für die CD4⁺ T-Zellen belegen.

Eine Analyse der dreifach positiven Zytokine scheint als nächster Schritt angebracht, um die Spezifität noch weiter zu erhöhen. Allerdings zeigten die in dieser Arbeit ausgewählten doppelt positiven Marker-Kombinationen keine weitere Zytokin-Aktivität, weshalb die Auswertung nicht weiter vertieft wurde (Daten nicht gezeigt). Dies ist vereinbar mit der aktuellen Studienlage: Eine monofunktionale Antwort ist die häufigste Immunantwort, danach die doppelt positive und schließlich, kaum messbar, eine dreifach positive Reaktion.^{45,166}

In einer ursprünglich gefassten Hypothese dieser Arbeit wurde vermutet, dass es zu einem graduellen Anstieg (10:1<1:1<1:10) der Induktion der Co-Kulturen kommen würde. Diese Annahme wurde gefasst, da theoretisch davon auszugehen ist, dass die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung einer alloreaktiven T-Zelle zunimmt, wenn diese mit vielen fremd-HLA-Peptid-Komplexen konfrontiert wird. Über die Zeit macht dies eine Aktivierung bei beispielsweise zehn „eigenen“ Zellen und lediglich einer „fremden“ Zelle unwahrscheinlicher als wenn eine „eigene“ Zelle theoretisch mit zehn „fremden“ Zellen in Kontakt treten kann. Die

Wahrscheinlichkeit, dass die Zelle in „Unterzahl“ mit einem spezifischen Stimulus konfrontiert wird, ist hierbei deutlich höher. Entsprechend der Hypothese kam es bei 10:1 zur geringsten Aktivierung der Marker. Jedoch zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit die höchste Aktivierung der meisten Marker bei 1:1. Bei 1:10 wurde meist entweder ein Plateau der Induktion erreicht oder die Aktivierung lag unter der des 1:1-Ansatzes. Fraglich ist, ob es tatsächlich zu geringer Expression der Marker im 1:10-Ansatz kam oder ob es einen weiteren Einflussfaktor gab, der zur niedrigeren Frequenz an aktivierten T-Zellen führte. Eine Möglichkeit wäre, behält man die ursprüngliche Hypothese bei, dass es wie vorhergesagt zu einer sehr starken Aktivierung kam, diese jedoch von allospezifischen, regulatorischen T-Zellen supprimiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T_{regs} (natürliche T_{regs} , nT_{regs}) im Mausmodell¹⁶⁷ und teilweise in humanen Studien^{168,169} einen präventiven und kontrollierenden Einfluss auf Alloantigen-vermittelte Immunreaktionen haben, wie auch beispielsweise auf die GvHD. Diese allospezifischen T_{reg} wurden im etablierten *Assay* bisher nicht beachtet. Eine Arbeit von Schönbrunn *et al.* aus dem Jahr 2012 zeigte, dass mittels der Marker CD137 und CD154 natürliche regulatorische T-Zellen in Abgrenzung von konventionellen T-Zellen aus MLRs isoliert werden können. Natürliche $Foxp3^+$ T_{reg} exprimieren entsprechend der Studie den Marker CD137 in Abwesenheit von CD154 ($CD137^+CD154^2$).¹⁷⁰ Beide Marker sind bereits im bestehenden *Panel* enthalten und erleichtern somit die Auswertung einer möglichen Suppression der Alloreaktion in Bezug zur oben erläuterten Hypothese. Abschließend gilt festzuhalten, dass eine Dosisabhängigkeit der Aktivierung innerhalb der drei Ratios festgestellt werden konnte, was für eine spezifische Aktivierung der T-Zellen spricht.

5.2.1.3 Validierung und Spezifität

Brefeldin A unterbricht den Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. Dadurch wird die Synthese neuer Proteine und deren anschließende Sezernierung reversibel gehemmt.¹⁷¹ O’Neil-Anderson *et al.* fand heraus, dass BFA die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 auf Lymphozyten vermindert, nicht jedoch die intrazelluläre Konzentration.¹⁷² BFA könnte potentiell auch Einfluss auf andere Aktivierungsmarker, wie beispielsweise CD137 haben. Eine Möglichkeit dies zu überprüfen, wäre beispielsweise der Vergleich mit einem anderen Sezernierungsstopp, wie Monensin, welches in der Arbeit von O’Neil-Anderson *et al.* keinen Einfluss auf die CD69 Expression hatte.¹⁷³ Auch CD4 wird sowohl bei BFA- als auch bei Monensin-Gabe herunterreguliert. Jedoch sah die zitierte Studie hier eine geringere Herabregulation bei BFA-Gabe. Des Weiteren konnte bei Brefeldin A im Vergleich zu Monensin mehr $TNF-\alpha$ intrazellulär erfasst werden,

bei IFN- γ gab es keine Unterschiede. Diese Erkenntnisse rechtfertigen die Verwendung von BFA für die in dieser Arbeit etablierte Methode. Nichts desto trotz kann Brefeldin nicht ohne Limitationen verwendet werden, da es bei langer Stimulationsdauer zytotoxisch wirkt. Bei Brefeldin A-Gabe nach 2 Stunden und einer Gesamt-Stimulationsdauer von 17 Stunden bei dem in dieser Arbeit etablierten *Assay* kommt man auf eine Präsenz von BFA von insgesamt 15 Stunden. Zwar schneidet BFA im Vergleich zum oben bereits erwähnten Monensin in der Langzeitstimulation besser ab, dennoch ist auch hier mit Zellverlusten zu rechnen. O'Neil-Anderson *et al.* kam zu dem Ergebnis, dass in einer unstimulierten Probe nach 2 Stunden in Anwesenheit von BFA noch 84 (± 9) Prozent der Zellen viabel waren, nach 4 Stunden noch 77 (± 7) Prozent. In einer stimulierten Probe waren die Werte ähnlich. Jedoch wurde nach 18 Stunden in Anwesenheit von BFA nur noch eine Viabilität von 69 (± 7) Prozent in der unstimulierten Probe gemessen - in der stimulierten Probe allerdings 84 (± 5) Prozent.¹⁷² Es ist also zu überlegen, ob nicht auch die lange Dauer in Anwesenheit von BFA (15 Stunden im 2-Stunden-Ansatz versus 4 Stunden im 13-Stunden-Ansatz) einen Einfluss auf die geringere Induktion im 2-Stunden-Ansatz gehabt haben könnte. Dies lässt sich mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht belegen, jedoch auch nicht vollkommen ausschließen. Dieser Annahme entgegen steht die gefundene Zytokin-Produktion der T-Zellen, welche weitestgehend mit der aktuellen Forschungslage übereinstimmt, und demnach eine höhere Induktion durch einen Sezernierungsstopp nach 13 Stunden wahrscheinlich macht. Dennoch ist es ungewöhnlich, dass gerade bei den Aktivierungsmarkern (CD137, CD154) ein deutlicher Unterschied der beiden Zeitpunkte auffällt, da diese eigentlich nicht sekretiert werden und demnach von BFA unbeeinflusst bleiben. Die höhere Induktion geht vermutlich auf *de novo*-Synthese zurück. Anfänglich wurde die in dieser Arbeit höhere Expression bei BFA-Addition nach 13 Stunden als indirekter Weg der Alloreaktion gedeutet, da die Ergebnisse insbesondere CD4⁺ T-Zellen betrafen. Diese Aussage muss jedoch revidiert werden, da eine Expression der pHLA-Komplexe durch die APCs erst nach 72 Stunden erfolgt.¹⁷⁴

Betrachtet man die Validität der gemessenen Daten, welche in dieser Arbeit vor allem durch die in Kapitel 4.2.1 beschriebene CV-Analyse evaluiert wurde, so variierten 8 der insgesamt 60 analysierten Aktivierungsmarker (jeweils mit Ratio und Zeitpunkt) weniger als 10 Prozent, 14 befanden sich in einem Bereich zwischen 10 und 20 Prozent, und 13 weitere zwischen 20 und 30 Prozent. Bei Streitz *et al.* wird von einem im Bereich der Durchflusszytometrie akzeptablen Bereich der CV-Abweichung von unter 30 Prozent gesprochen.¹⁷⁵ In dieser Arbeit wichen zusammengezählt 35 von 60 Markern weniger als 30 Prozent ab, 15 befanden sich in einem Grenzbereich zwischen 30 und 50 Prozent und lediglich 10 Marker wichen mehr als 50 Prozent

ab. Letztere traten vor allem bei der Kombination CD137⁺IFN- γ ⁺ auf, was sich durch die geringere Anzahl an Probanden erklären lässt. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass es sich bei der erwähnten Arbeit um eine multizentrische Studie mit einer weitaus höheren Probandenanzahl handelte. Außerdem wurden fünf statt wie in dieser Arbeit drei Replikate zur Überprüfung der Intra-*Assay*-Varianz angefertigt. Dies erklärt das bessere Abschneiden der angeführten Arbeit in Bezug auf die Validität der gemessenen Marker, zeigt aber auch, dass vorliegende Arbeit, trotz ihres begrenzten Ausmaßes und ihrer limitierten Möglichkeiten, bereits Marker valide etablieren konnte. Selbstverständlich könnten die Triplikate im weiteren Verlauf der Etablierung erhöht werden. Außerdem steht noch aus, eine Inter-*Operator*-Varianz zu bestimmen (näheres siehe Kapitel 5.5).

Generell ist eine CFSE-Färbung sehr gut geeignet, um Zellen *in vitro* ohne Einfluss auf deren Aktivierung voneinander zu trennen. Die CFSE-Färbung ist weit verbreitet und gut etabliert. Auch in dieser Arbeit konnte exemplarisch gezeigt werden, dass es zu keinem Einfluss auf die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kam.

Analysiert man Donoren, die im Verlauf der *Assay*-Etablierung mehrfach Blut spendeten, so fällt auf, dass deren Zellen mit unterschiedlich starker Aktivierung in verschiedenen *Assays* reagieren. Diese Beobachtung spricht dafür, dass es hierbei zu einer vom MHC-Peptid-Komplex abhängigen Induktion von Aktivierungsmarkern kam. Anhand dieser Erkenntnis konnte festgestellt werden, dass der *Assay* funktioniert und die in der Einleitung erwähnten Prinzipien der Alloreaktivität widerspiegelt.²⁹ Da im weiteren Verlauf die Aktivierung immer in Verbindung mit CD137 gemessen wurde, ist entsprechend Litjens *et al.* davon auszugehen, dass in dieser Arbeit annähernd sämtliche alloreaktiven T-Zellen erfasst werden konnten.⁴⁵

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf den *Background* der Aktivierungsmarker, so ist der gefundene äußerst geringe *Background* von CD154 vereinbar mit der aktuellen Forschungslage.¹³⁸ Dasselbe gilt für die Hintergrundaktivität von CD137.¹⁵⁸ Bei Kombination der beiden Marker fand die Arbeit von Litjens *et al.* einen noch weiter reduzierten *Background* bis < 0,0001 Prozent.⁴⁵ Dies passt zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Generell ist festzustellen, dass sich für sämtliche doppelt positiven Marker ein niedrigerer *Background* und damit eine höhere Spezifität im Vergleich zu den einfach positiven fand, was die Ergebnisse anderer Arbeiten bestätigt.^{45,165} In Abbildung 42 sind die Ergebnisse der Hintergrundaktivität der einfach positiven Zytokine sowie die Kombination der Zytokine mit CD137 aus der Arbeit von Litjens *et al.* dargestellt.⁴⁵ IFN- γ sowie TNF- α können wie bereits oben diskutiert aufgrund der geringen Spenderzahl nur mit Einschränkung beurteilt werden. Dennoch lassen sich hier ähnliche Tendenzen wie in der genannten Arbeit erkennen. Lediglich

der *Background* der $CD8^+TNF-\alpha^+$ ist in dieser Arbeit etwas höher. Die IL-2-Hintergrundaktivität liegt, ebenso wie in dieser Arbeit, unter 0,1 Prozent. Wie bereits in Kapitel 4.3.1 erwähnt, ist die gemessene Hintergrundaktivität von Granzym B kein „echter“ *Background*, da vor allem CTLs dieses Zytokin in Granula gespeichert in sich tragen. Hierbei war es eindrucksvoll, dass in Kombination mit CD137 diese vermeintliche Hintergrundaktivität gegen Null gesenkt werden konnte, was für eine hohe Spezifität dieser Kombination spricht.

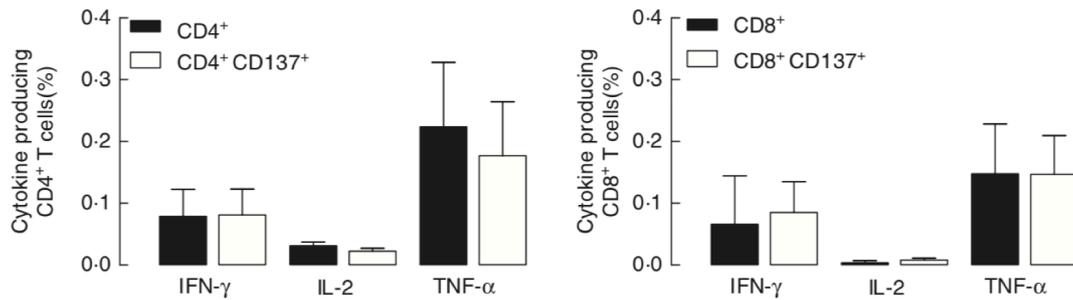


Abb. 42: *Background* der Induktion allein sowie in Kombination mit CD137 aus Litjens *et al.*, 2013. Stimuliert wurden die Zellen wie auch in dieser Arbeit durch eine zweiseitige MLR.

5.2.1.4 Auswahl der geeignetsten Aktivierungsmarker-Kombinationen

Um die Frage zu klären, welche der doppelt positiven Marker sich am besten zur Detektion der Alloreaktion eignen, wurden Mittelwerte der Ergebnisse der gesunden Spender gebildet (vgl. Kap. 4.3.3). Die Auswahl wurde für die $CD4^+$ sowie die $CD8^+$ Subpopulationen separat getroffen. Letztendlich ausschlaggebend für die Auswahl der Marker war die Höhe der Induktion, die für $CD4^+$ T-Zellen in der Kombination $CD137^+CD154^+$ am höchsten war, sowie ein niedriger *Background* (siehe Kap. 5.2.1.3). Die Entscheidung einer zweiten Marker-Kombination fiel gegen $CD137^+Granzym\ B^+$ und für $CD137^+IL-2^+$, zum einen, da der *Background* der $CD137^+Granzym\ B^+$ zwar niedrig, aber dennoch höher als der der $CD137^+IL-2^+$ war. Zum anderen kam es zu einer relativ hohen Varianz der gemessenen Spenderaktivierung bei $CD4^+CD137^+Granzym\ B^+$, insbesondere bei BFA-Gabe nach 2 Stunden, was die Validität des Assays negativ beeinflusst hätte. Bei den $CD8^+$ T-Zellen war das Ergebnis eindeutig, da es bei den $CD137^+Granzym\ B^+$ zur höchsten Aktivierung kam und die anderen Kombinationen im Vergleich eine kaum messbare Induktion zeigten. Die BFA-Gabe wurde für 13 Stunden nach Aktivierung terminiert, da es hier zu geringerer Varianz der Ergebnisse, einer signifikant höheren Induktion der $CD4^+CD137^+CD154^+$, der $CD4^+CD137^+IL-2^+$ sowie zu keiner signifikant niedrigeren Expression der $CD8^+CD137^+Granzym\ B^+$ nach 2 Stunden kam. Des Weiteren war die *Background*-Aktivität der genannten Marker nach 13 Stunden entweder gleich hoch oder niedriger als bei BFA-Addition nach 2 Stunden. Allerdings ist unklar, ob 13

Stunden eine realistische Zeitspanne für CD4-APC-Interaktion *in vivo* darstellt. Mehrere Gruppen gehen eher von 8 bis 40 Minuten CD4-APC-Kontaktzeit im Lymphknoten aus.^{176,177} Es konnten in der Zusammenschau der diskutierten Ergebnisse innerhalb vergleichsweise kurzer Zeit alloreaktive T-Zellen erfasst werden, sowohl innerhalb der CD4⁺ als auch der CD8⁺.

5.2.2 T-Memory-Subpopulationen

Eine weitere zu beantwortende Frage ist, warum bei dieser Arbeit T-Memory-Subsets und T_{naive} untersucht wurden. Laut Litjens *et al.* sind alle alloreaktiven T-Zellen in T-Memory-Zellen und T_{naive} zu finden.⁴⁵ Stimmt diese Hypothese, wären somit in dieser Arbeit alle möglichen Subpopulationen abgedeckt, was für die Sensitivität des Assays spräche. Weitere Gründe für den Fokus auf T-Gedächtniszellen waren, dass die Zellen der gesunden Probanden vor dem Assay nicht *geprimed* waren, das heißt, sie hatten keine Möglichkeit mit dem allo-Antigen bzw. dem allo-MHC-Komplex, durch den sie während des Versuchs aktiviert wurden, vorher in Kontakt zu treten. T-Gedächtniszellen sind zudem wenig abhängig von Co-Stimulation.^{178,179} Es wurde sogar APC-unabhängige Aktivierung von CD4⁺ T-Gedächtniszellen beschrieben.¹⁸⁰ Des Weiteren sind T-Memory-Zellen dazu in der Lage, schnell Zytokine zu produzieren und brauchen eine geringe Antigen-Dichte auf APCs, um aktiviert zu werden.¹⁸¹ Dies stellt eine gute Voraussetzung dar, um den Versuch erfolgreich durchzuführen.

Es kam zu einer stärkeren Aktivierung nach 13 Stunden. Dies wurde ursprünglich (vgl. Kap. 5.2.1.2) als indirekte Alloreaktion gedeutet, da vor allem die CD4⁺ T-Zellen Aktivierungsmarker im längeren Intervall stärker induzierten. Allerdings ist kritisch anzumerken, dass eine indirekte Alloreaktion Tage in Anspruch nimmt, in denen das Antigen von den APCs prozessiert wird, und dementsprechend mit diesem Assay nicht erfassbar war.¹⁷⁴ Auch ein T-Zell-Shift von T_{naive} zur T-Effektorzelle findet erst nach fünf bis zehn Tagen statt.¹⁴³ Durch die Zeitspanne von 17 Stunden der in dieser Arbeit etablierten Methode ist keine Analyse dieses Shifts möglich. Demnach ist die in diesem Versuch gemessene Aktivierung die des „Direkten Wegs“ (siehe Kap. 1.2.2). Alle Zellen mussten präformiert sein, um innerhalb des kurzen Zeitfensters dieses Assays aktiviert werden zu können, was weitestgehend auf T-Memory-Zellen zutrifft. Beim Modell der GvHD-Pathophysiologie geht man derzeit davon aus, dass es bei CD4⁺ T-Zellen durch *Priming* im Lymphknoten durch APCs zum beschriebenen Shift kommt. T_{naive} differenzieren hierbei in T-Effektor-Subsets. Allerdings können vor allem CD8⁺ T-Zellen auch direkt bei passender (spezifischer) TCR-pHLA-Komplex-Interaktion aktiviert werden. Die trifft eingeschränkt auch auf CD4⁺ T-Zellen zu, die dann vor allem durch Zytokin-Sezernierung (TNF- α) Zellen lysieren.

Diese Arbeit möchte die von Litjens *et al.* genannte Hypothese (s.o.) außerdem um die vor noch nicht allzu langer Zeit beschriebene Population der T_{SCM} erweitern, die ebenfalls relevante Anteile der allospezifischen T-Zellen bei den gesunden Probanden stellten. Ebenfalls scheinen diese in der T-Zell-Rekonstitution nach HSZT eine wichtige Rolle zu spielen. In einer Arbeit von Cieri *et al.* wurde gezeigt, dass T_{SCM} sich vor allem an den Tagen 5 und 8 nach Transplantation aus T_{naive} differenzieren und die größte Fraktion der T-Zellen darstellen.¹⁸² In Bezug auf die GvHD fand eine Arbeit von Tkachev *et al.* eine Korrelation mit der hohen Frequenz an Tag 5 und einer aGvHD. Außerdem differenzieren sich T_{naive} während der aGvHD über T_{SCM} in T-Gedächtnis- und T-Effektorzellen.¹²⁴ Dementgegen steht ein in dieser Arbeit gemessener relativ geringer Anteil der T_{SCM} an allospezifischen T-Zellen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich T_{naive} über T_{SCM} während einer GvHD in Effektorzellen differenzieren und diese nicht präformiert messbar sind.

CD137⁺IL-2⁺ allospezifische T-Zellen waren bei einer Studie vor allem naive T-Zellen (50%) und T_{CM} (40%), wohingegen alloreaktive T_{EMRA} diese Kombination nicht exprimierten.⁴⁵ In dieser Arbeit wurde CD137⁺IL-2⁺ lediglich für die CD4⁺ untersucht. Hierbei dominierten die T_{EM} (66%) gefolgt von den T_{naive} (11%) und zu etwa gleichen Teilen die T_{EMRA} (8%), T_{CM} (8%) sowie die T_{SCM} (7%). Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass es prinzipiell mehr T_{CM} innerhalb der CD4⁺ Zellen im Vergleich zu den CD8⁺ Zellen gibt (siehe Abbildung 43¹⁸³). Dies könnte die von der oben genannten Studie abweichenden Zahlen erklären. T_{naive} produzieren laut mehreren Arbeiten nur wenige Zytokine nach Aktivierung.¹³⁸ Meist wird IL-2 exprimiert, bevor sich die T_{naive} in verschiedene Effektor-T-Zellen differenzieren.¹⁸⁴ Der relativ geringe Anteil der T_{naive} an der doppelt positiven IL-2-Produktion in diesem Versuch bestätigt diese Beobachtung ebenfalls.

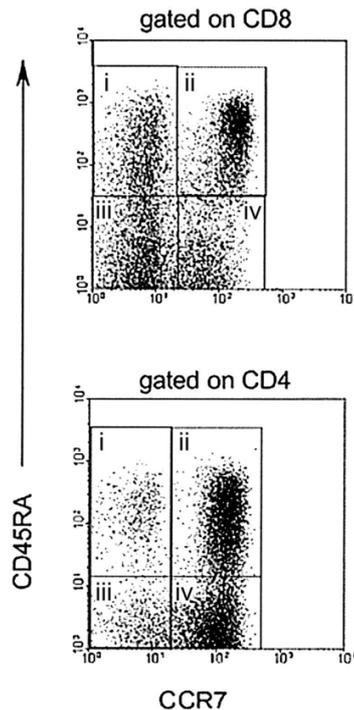


Abb. 43: Verteilung der T-Gedächtnis-Subsets aus Voehringer *et al.*, 2002.

Die Verteilung der T-Gedächtnis-Subpopulationen unterscheidet sich für die CD4⁺ sowie die CD8⁺ T-Zellen. Der Anteil T_{naive} (ii), sowie der T_{CM} (iv) ist allgemein bei den CD4⁺ höher. Die T_{EM} (iii) sowie die T_{EMRA} (i) stellen hingegen bei den CD8⁺ die höhere Fraktion.

Ähnlich sahen die Ergebnisse für die CD4⁺CD137⁺CD154⁺ aus. Auch hier stellten die T_{EM} (52%) den größten Anteil nach den T_{naive} (17%), während sich die restlichen Populationen wieder gleich verteilten. Gründe dafür sind vermutlich die gleichen wie für die bereits oben diskutierte Kombination aus CD137 und IL-2. Weiterhin beinhalten zwar T_{naive} und CD4⁺ Effektor- sowie *Memory*-T-Zellen CD154 präformiert in Vesikeln, jedoch sind nur Effektor- und *Memory*-Zellen in der Lage, diesen schnell an die Oberfläche zu bringen, was die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse stützt.¹⁶² Zusätzlich produzieren T_{CM} und T_{naive} kaum Zytokine und sind mit dem IFN- γ -Elisot leicht zu verpassen.^{118,159} Dies könnte auch ein Grund für den höheren Anteil der T_{CM} und T_{naive} in der Kombination CD137⁺CD154⁺ im Vergleich mit der Kombination CD137⁺IL-2⁺ sein (T_{CM}: 12% versus 8%, T_{naive}: 17% versus 11%) Der in dieser Arbeit beschriebene *Assay* kann demnach Zellen erfassen, die im IFN- γ -Elisot undetektiert bleiben würden.

Betrachtet man die für die CD8⁺ T-Zellen gemessene Kombination aus CD137 und Granzym B, so fällt auf, dass hier T_{EM} sowie T_{EMRA} fast die gesamte Population an alloreaktiven T-Zellen stellten (T_{EM} 47%, T_{EMRA} 45%). T_{naive} und T_{SCM} kamen zusammen gerade einmal auf 7% (T_{naive} 4%, T_{SCM} 3%). Auch hierbei ist sicherlich die von vorneherein unterschiedliche Höhe der Frequenz bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ein großer Faktor, der zum Fokus auf die Effektor-Gedächtnis-Subpopulationen beiträgt. Allerdings wurde in dieser Arbeit insgesamt ein

deutlicherer Anteil der T-Effektor-*Memory-Subsets* an allospezifischen T-Zellen festgestellt als in anderen Arbeiten. Dies sollte weiter untersucht werden und könnte wichtige Hinweise zu möglichen Therapiestrategien für die GvHD liefern. Für den Anstieg der T_{EMRA} konnte für die Nierentransplantation gezeigt werden, dass damit ein geringeres Risiko für Abstoßung einhergeht. Dies stellt zumindest die für die CD8⁺ gefundenen Ergebnissen dieser Arbeit in Frage, beziehungsweise wirft die Frage auf, warum eine so große Fraktion der CD8⁺ allospezifischen T-Zellen scheinbar protektiv gegen eine Transplantatabstoßung ist, die zum größten Teil einer aGvHD entspricht. Im Blut von Patienten mit cGvHD konnte beispielsweise ein Anstieg der T_{EMRA} und ein Abfall der T_{naive} im Vergleich zu Patienten ohne cGvHD gefunden werden.¹⁸⁵

Bezüglich der Kinetik der Zytokin-Produktion unterscheiden sich T-*Memory*-Zellen von T_{naive}. IL-2 Sezernierung beginnt bei T_{naive} nach ein bis zwei Stunden, bei T-Gedächtniszellen jedoch bereits nach 30 Minuten. Die maximale Produktion wird bei Gedächtniszellen nach ein bis zwei Stunden erreicht. Naive T-Zellen benötigen für ihr Produktionsmaximum sechs bis acht Stunden. T-*Memory*-Zellen produzieren im Allgemeinen mehr IL-2 als T_{naive}.¹⁵³ Die in diesem *Assay* gesetzten Zeitpunkte schließen somit sowohl T_{naive} als auch T-Gedächtniszellen ein, wobei vermutet werden könnte, dass der Anteil der T_{naive} im Vergleich zu der Dynamik der T-Gedächtniszellen nach 13-Stunden-Sezernierungsstopp höher war. Dies traf in dieser Arbeit auf CD4⁺CD137⁺IL-2⁺ zu. Für die anderen Marker-Kombinationen war die Verlagerung der jeweiligen Anteile nicht eindeutig, da es Tendenzen in beide Richtungen gab. Es kann vermutet werden, dass die *Subsets* der doppelt positiven Marker sich im gemessen Zeitintervall weitestgehend konsistent verhielten. Dies spricht für die Validität des *Assays*.

5.2.3 Patienten

Betrachtet man den klinischen Verlauf der vier in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten, so ist vor allem das Auftreten einer GvHD beziehungsweise einer Abstoßung (Transplantatversagen) relevant. Um den klinischen Verlauf in Bezug zum etablierten *Assay* zu setzen, wurde davon ausgegangen, dass eine Aktivierung der Spender-Lymphozyten mit dem Risiko einer GvHD einhergeht und die Induktion von Aktivierungsmarkern auf Empfänger-Lymphozyten zu einer möglichen Transplantatabstoßung führen kann (vgl. Kapitel 1.3.1). Da die Prädiktion der GvHD das Ziel dieser Arbeit war und die wenigen verfügbaren Zellen optimal genutzt werden sollten, wurde entschieden, den Zellkulturansatz so anzupassen, dass die Spenderzellen 1:10 mit Empfängerzellen co-kultiviert wurden; das heißt eine Spenderzelle kam mit zehn Empfängerzellen in Kontakt. Dies ist damit begründet, dass sich, wie bereits in

Kapitel 5.2.1 erläutert, die stärkste beziehungsweise zweitstärkste Induktion in dieser Ratio fand. Für die Empfängerzellen ergab sich die umgekehrte Ratio von 10:1. Außerdem wurde entschieden, Brefeldin A nach 13 Stunden Stimulationszeit hinzuzugeben (vgl. Kap. 5.2.1). Da es keinen vergleichbaren *Assay* in der aktuellen Forschungslandschaft gibt, wurde versucht, mögliche Korrelationstendenzen aus den vorhandenen Daten herauszuarbeiten.

Generell wurden Konditionierung und GvHD-Prophylaxe, die wichtige pathophysiologische Faktoren der aGvHD sind (vgl. Kap. 1.3.1), für alle eingeschlossenen Patienten ähnlich bis identisch durchgeführt, sodass diese als externe Störfaktoren auf den *Assay* weitestgehend ausgeschlossen werden können. Patient 421 entwickelte eine akute Grad I Haut-GvHD. Setzt man dies in Bezug zur gemessenen Aktivierungsmarker-Induktion der Spender-T-Zellen dieses Patienten, so stellt man fest, dass hier die höchste Induktion der CD4⁺CD137⁺CD154⁺, der CD4⁺CD137⁺IL-2⁺, sowie der CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺ aller vier gemessenen Patienten auftrat. Spricht man von der höchsten Induktion, so muss man erwähnen, dass diese trotzdem noch relativ gering ausfiel (0,014% bis 0,05%). Dies ist aber mit der leichten GvHD (Grad I) vereinbar. Der Verdacht auf eine Darm-aGVHD wurde bei Patient 741 an Tag 22 *post transplantationem* gestellt, nachdem plötzlich Durchfälle, Übelkeit und Erbrechen auftraten. Bezüglich der Aktivierungsmarker kam es bei diesem Patienten allerdings zu keinerlei Spender-T-Zell-Aktivierung im durchgeführten *Assay*. Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich bei der vermeintlichen GvHD nicht um Symptome einer GvHD, sondern möglicherweise um Symptome einer entzündlichen Gastroenteritis gehandelt haben könnte. Allerdings war eine mikrobiologische Stuhluntersuchung für alle untersuchten Erreger (*Clostridium difficile*, Adenoviren, Salmonellen, Shigellen, Yersinien, Campylobacter) negativ, was eine Gastroenteritis unwahrscheinlich macht. Ein weiterer Grund könnte sein, dass keine allospezifischen T-Zellen gemessen wurden, da es im Vergleich mit Patient 421 zu einer deutlich eingeschränkten Viabilität der aufgetauten T-Zellen kam (Daten nicht gezeigt). Es kann aufgrund dieser Unklarheiten nicht ausgeschlossen werden, dass der *Assay* keine Korrelation zur Klinik herstellen kann. Dem entgegen steht jedoch, dass die Spender-T-Zell-Aktivierung von zwei Patienten (431, 561), die keine GvHD entwickelten, ebenfalls bei null war. Insbesondere bei Patient 431 konnten ausreichend viele viable T-Zellen für den Versuch verwendet werden, was die Daten stützt.

Zu einer Abstoßung, beziehungsweise zu einem Transplantatversagen, kam es bei Patient 561, der eine DLI-Gabe nach fallendem Chimärismus benötigte. In Bezug zur gemessenen Empfänger-T-Zell-Aktivierung lag diese für CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺ mit 0,65 Prozent am zweithöchsten sowie am dritthöchsten für die CD4⁺CD137⁺CD154⁺ (0,004%). Die Marker-

Kombination aus CD137 und IL-2 wurde nicht auf Empfänger-T-Zellen von Patient 561 induziert. Gegen eine Korrelation dieser Daten spricht, dass bei den Empfänger-Lymphozyten der Patienten 421 und 431 eine höhere Aktivierungsmarker-Aktivität gemessen wurde, jedoch kein Transplantatversagen im klinischen Verlauf dokumentiert ist. Insbesondere wurde bei Patient 421 eine verhältnismäßig hohe Aktivierung in der 1:1-Co-Kultur der CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺ gemessen, die über 2 % aller CD8⁺ T-Zellen lag. Eine haploidente Transplantation könnte die hohe Aktivierung erklären (größeres HLA-*Mismatch*, ergo höhere Alloreaktivität der T-Zellen), allerdings trifft dies nur auf Patient 431 zu und nicht auf Patient 421, der HLA-ident transplantiert wurde und sogar eine höhere Aktivierung zeigt.

Die pathophysiologische Verbindung der vorformierten Spender-T-Zellen zur GvHD ist deutlich besser belegt als der Einfluss der präformierten Empfänger-T-Zellen auf eine Transplantatabstoßung. Demnach muss insbesondere letztere bezüglich Korrelationstendenzen zurückhaltend betrachtet werden. Interessant wäre zu sehen, ob es in einer umgekehrten Transplantation von Empfänger 421 auf Spender 42D zu einer GvHD gekommen wäre, da der Anteil präformierter allospezifischer T-Zellen von Empfänger 421 gegen Spender 42D sehr hoch war. Diese wurden wahrscheinlich durch die Konditionierung eradiziert, sodass sie nicht zur Transplantatabstoßung beitrugen.

Alle Patienten entwickelten Virusreaktivierungen, sodass hier keine Korrelationstendenzen festgestellt werden können.

Von den vier analysierten Patientenproben wurden zwei Patienten-Spender-Paare haploident transplantiert. Dies ging vor nicht allzu langer Zeit mit einem erhöhten Risiko für eine GvHD einher, mittlerweile ist die haploidente Transplantation durch verschiedene T-Zell-Depletionsverfahren entscheidend verbessert worden (vgl. Kap. 1.1 und 1.3.3). In dieser Arbeit zeigten zwei von zwei Patienten einer HLA-identen-Geschwisterspende (10/10) keine Aktivierungsmarker-Induktion auf Spenderseite. Einer von zwei Untersuchten der haploidenten Transplantation zeigte eine Induktion von bis zu 0,05 Prozent auf Spenderseite (42D). Bei der Analyse der Empfängerzellaktivierung kam es bei einem der beiden ident-transplantierten Empfänger zu keiner Induktion. Bei den Zellen der zwei haploident-transplantieren sowie eines der ident-transplantierten Patienten kam es zur Induktion. Die höchste Induktion lag hierbei bei einem haploident-transplantierten Patienten. Die Tendenz zur höheren Aktivierung der haploident-*gematchten* Zellen bestätigt die pathophysiologisch bekannte Grundannahme der Alloreaktivität (vgl. Kap. 1.2.2), da bei einer haploidenten Transplantation die HLA-Komplexe nur zur Hälfte übereinstimmen. Allerdings werden die Transplante vor haploidenter Transplantation durch das in Kapitel 1.1 erläuterte Verfahren T-Zell-depletiert, was dazu führt,

dass so gut wie keine T-Zellen, inklusive eventueller präformierter allospezifischer T-Zellen mehr vorhanden sind, die zur GvHD führen könnten.⁷ Dies stellt die Verwendung der in dieser Arbeit etablierten Methode für Paarungen haploidenter Transplantationen in Frage, da die Vorhersagemöglichkeit vor allem darauf beruht, dass präformierte allospezifische T-Zellen mittransplantiert werden. Für die Überprüfung der Anwendbarkeit und Validierung des *Assays* ist die Analyse haploident-transplantierte Patienten dennoch sehr wichtig. Litjens *et al.* fand in Übereinstimmung mit dieser Arbeit sehr geringe Frequenzen der CD4⁺CD137⁺ bei HLA-gematchten Spendern.⁴⁵ Weiterhin wurde gezeigt, dass die Depletion von CD137 signifikant Alloreaktivität verringern kann, was noch einmal die Relevanz des Markers für die Verwendung in diesem *Assay* zeigt.¹⁸⁶ Außerdem vermittelt die Interaktion von CD137 und seinem Liganden die GvHD im Mausmodell.^{187,188} Speziell die CD4⁺CD137⁺Zytokin⁻ T-Zellen scheinen laut mehrerer Studien für die GvHD eine große Rolle zu spielen.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Auch diese Arbeit fand die stärkste Induktion von Aktivierungsmarkern in der Kombination von CD137 und CD154; außerdem kam es hier zu den niedrigsten Varianzen in der CV-Analyse.

Für weiterführende Studien ist die Frage relevant, wie das Risiko für eine GvHD beziehungsweise eine Abstoßung optimal ausgewertet werden kann. Hierfür kommt die Analyse der Anzahl spezifischer alloreaktiver T-Zellen in Prozent oder als tatsächliche Zellzahlen in Frage. Weiterhin sollten durch Korrelationsanalysen Grenzwerte beziehungsweise -bereiche für die Höhe der Aktivierungsmarker-Induktion festgelegt werden (weitere Ausführungen in Kap. 5.6).

Bezüglich der Analyse der T-Zell-Memory-Subsets zu berücksichtigen, dass im Vergleich zu den erwachsenen, gesunden Spendern, die im Rahmen der Etablierung untersucht wurden, die pädiatrischen Patienten deutlich mehr naive T-Zellen aufweisen.^{192,193}

Bei den analysierten Subpopulationen der allospezifischen Empfänger-Lymphozyten zeigte sich im Vergleich zu den gesunden Probanden ebenfalls ein Fokus auf T_{EM} und T_{EMRA}. T_{CM} stellten die drittstärkste Fraktion. T_{naive} und T_{SCM} waren kaum an der Alloreaktion beteiligt. Insbesondere die CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺ Lymphozyten rekrutierten sich fast ausschließlich aus den T_{EMRA} (98-100%). Da die Empfänger-T-Zellen in Verbindung mit Transplantatversagen gesehen werden, ist hier besonders die Analyse der Zellen von Patient 561 interessant, da dieser als einziger der vier analysierten Patienten eine Abstoßung entwickelte. Es war zwar ein Fokus auf T_{CM} (CD4⁺CD137⁺CD154⁺) und T_{EMRA} (CD8⁺CD137⁺Granzym B⁺) erkennbar, allerdings war hier die zur Verfügung stehende Zellzahl so niedrig, dass diese Korrelationstendenz als unsicher zu werten ist. Der hohe Anteil an spätdifferenzierten Subpopulationen (T_{EM}, T_{EMRA}) könnte Ausdruck einer Infektion bei

Blutentnahme sein. Patient 471 zeigte leicht erhöhte Leukozyten am Entnahmetag, jedoch waren mehrere Blutkulturen negativ. Alle anderen Patienten hatten normwertige Entzündungsparameter (CrP und Leukozyten). Eine Abgrenzung von Aktivierung bei Inflammation lässt sich generell aber relativ sicher ausschließen. Die bei *Assay*-Etablierung gezeigte hohe Spezifität der gemessenen Zellen für den jeweiligen Reaktionspartner ermöglicht eine gute Differenzierung zwischen spezifischer Alloreaktion und unspezifischer Aktivierung. Die Spender-Lymphozyten konnten valide nur bei zwei Patienten (421, 431) mit genügend verfügbaren Zellen beurteilt werden. Hier zeigte sich, wie auch für die Empfänger-T-Zellen, ein stärkerer Fokus auf die T_{EM} bei den CD4⁺ T-Zellen sowie auf die T_{EMRA} bei den CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den gesunden Probanden. Patient 421 entwickelte wie oben beschrieben eine leichtgradige Haut-GvHD. Die damit assoziierten Spender-T-Zellen waren vor allem vom T_{EM}- sowie T_{naive-Memory}-Subtyp bei den CD4⁺ sowie vom T_{EM}- und vor allem T_{EMRA}-Subtyp bei den CD8⁺ Lymphozyten. Geerman *et al.* fand heraus, dass T_{EM} allein transplantiert keine GvHD auslösen können, wohingegen Transplantate, die T_{naive} und T_{CM} beinhalten, dies vermögen.¹⁹⁴ Sowohl allospezifische T_{EM} sowie T_{CM} der CD8⁺ T-Zellen wurden im Mausmodell mit GvHD assoziiert, T_{EM} sind dabei die dominierende Fraktion (>80%). Ähnlich verhält es sich bei den alloreaktiven CD4⁺ T-Gedächtniszellen, die eine persistierende GvHD vermitteln können.¹⁹⁵ Diese Ergebnisse decken sich mit denen dieser Arbeit. Andere Arbeiten fanden, dass T_{EM} keine GvHD verursachen, sondern lediglich zum GvL-Effekt beitragen. Dies kann nicht endgültig erklärt werden.¹²³ Man vermutet, dass T_{EM} ein weniger diverses TCR-Repertoire haben als T_{naive} und deshalb weniger alloreaktive Zellen darstellen. *In vitro* verursachten die CD4⁺ T_{EM} jedoch starke Alloreaktionen und Haut-Transplantat-Abstoßungen. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein geringeres T-Zell-Rezeptor-Repertoire keine ausreichende Erklärung für die reduzierte Fähigkeit eine GvHD zu induzieren ist. Eine Review von Huang *et al.* fasste 2016 zusammen, dass T-Gedächtniszellen, die für starke Abstoßungsreaktionen in solider Organtransplantation verantwortlich sind, nach HSZT keine oder nur leichtgradige GvHD induzieren. T_{naive} hingegen sind für die Entwicklung einer schweren GvHD verantwortlich.¹⁹⁶

Zusammenfassend ist die Forschungslage divers. Für die Ergebnisse dieser Arbeit ist die Bewertung der T_{naive} im Bezug zur GvHD insofern schlüssig, als dass keiner der eingeschlossenen Patienten eine hohe Frequenz an T_{naive} in den allospezifischen T-Zellen aufwies und ebenfalls keine Symptome einer höhergradigen GvHD entwickelte. Die geringen Symptome einer Haut-GvHD (Grad I) sind mit einem erhöhten Anteil an T_{EM} vereinbar.¹²³ Für weitere Messungen könnte der Versuch auch anders ausgewertet werden und von einer geringen

Wahrscheinlichkeit für eine schwere GvHD bei geringer Anzahl an allospezifischen T_{naive} sowie einer hohen Frequenz an T-Gedächtniszellen ausgegangen werden. Dies könnten weitere Analysen mit höheren Patientenzahlen zeigen.

5.3 Faktoren mit Einfluss auf den Versuch

Ein allgemeiner Einflussfaktor auf den Versuch waren die Durchführung in zwei Laboren und in zwei verschiedenen Arbeitsgruppen. Aufgrund der räumlichen Trennung von Spender- und Empfängerzellverarbeitung sowie deren Lagerung und der Durchführung des Versuchs traten verschiedene Schwierigkeiten auf. Zum einen war der Transport der Zellen zwischen den beiden Gebäuden (etwa 500 Meter Entfernung) nicht unwesentlich, zum anderen wurden die Patientenzellen von verschiedenen technischen Assistenten verarbeitet und teilweise unsteril eingefroren. Auch war die technische Ausstattung der beiden Arbeitsgruppen unterschiedlich. Kritisch zu sehen ist ebenfalls, dass die APC-Verteilung der untersuchten Proben nicht berücksichtigt wurde. Wie in Kap. 1.2.1 beschrieben, ist diese essentiell, um T-Zellen zu aktivieren. Die APC-Verteilung schwankt interindividuell. Eine Studie fand für Männer Frequenzen für myeloide APCs von 0,28 Prozent ($\pm 0,12\%$) und für Frauen von 0,32 Prozent ($\pm 0,13\%$). Für plasmazytoide APCs lagen die Frequenzen für Männer bei 0,11 Prozent ($\pm 0,06\%$) und für Frauen bei 0,11 Prozent ($\pm 0,07\%$).¹⁹⁷ Um diesem Bias entgegenzuwirken, wurden nur von der Sichelzellerkrankung betroffene Patienten in diese Arbeit eingeschlossen, damit eine relative Homogenität der Proben gewährleistet war. APCs in die Einzel-Zell-Analyse zu integrieren, würde diese weiter verfeinern und könnte die potentiellen Effekte von Antigen-Spezifität und Zell-Zell-Interaktionen auf einem parakrinen Interaktionslevel aufdecken.¹⁶⁶ Bei der Etablierung des *Assays* an gesunden Probanden wurde davon ausgegangen, dass diese nicht-MHC-ident waren. Es bestanden keinerlei Verwandtschaftsverhältnisse untereinander. Dennoch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es HLA-idente gesunde Spender gab. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit aufgrund der Diversität des HLA-Systems verschwindend gering und kann deshalb vernachlässigt werden.¹⁹⁸ Beim Auftauen von Patientenzellen starben stets mehr als die Hälfte aller Zellen, was die für den Versuch notwendige Quantität an Zellen stark einschränkte. Die bekannterweise relativ geringe Population von allospezifischen T-Zellen⁴⁵, die vorher mit circa 4 Mio Zellen pro *Well* gut detektierbar war, schrumpfte teilweise auf eine einzelne allospezifische Zelle, die pro *Well* gemessen werden konnte. Dies wirkte sich negativ auf die anschließende Auswertung und die Korrelation zwischen klinischem Verlauf und allospezifischer T-Zell-Aktivierung aus. Gründe für die eingeschränkte Viabilität der Zellen könnten zum einen eine ungünstige Lagerung sein,

da aus Platzgründen im Stickstofftank die Zellen zunächst bei -80°C eingefroren wurden. Empfohlen wird für nukleäre Zellen eine Aufbewahrung unter -120°C .^{140,199} Zum anderen könnte aber auch die Konstitution der Zellen einen Einfluss gehabt haben. Sichelzellpatienten weisen eine stete Endothelaktivierung auf, die zu Zellstress führt.²⁰⁰ Studien haben gezeigt, dass Zellen nach dem Auftauen besonders fragil sind.²⁰¹ Demnach könnten die schon vorbelasteten Zellen den belastenden Prozess des Einfrierens und Auftauen schlechter überstehen als Zellen gesunder Probanden beziehungsweise Zellen von Patienten, die von anderen Erkrankungen betroffen sind.

Die Hinzugabe von CD28, als Co-Stimulus, um suboptimal aktivierte, jedoch allo-spezifische T-Zellen zu erfassen, könnte eventuell durch *Cross*-Vernetzungen zu einer falsch-hohen Anzahl alloreaktiver T-Zellen geführt haben. Jedoch konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass Co-Stimuli (CD28 und CD49d) die Frequenz der allo-spezifischen T-Zellen erhöhen, aber nicht den *Background*, was bedeutet, dass es zu keiner falsch-hohen Frequenz durch Co-Stimuli kommt.⁴⁵

Bei der Färbung der Zellen ergab sich das Problem, dass in einigen Versuchen sämtliche gemessenen Zellen CCR7^+ waren. Diese Versuche konnten nicht zur T-Gedächtnis-*Subset*-Analyse hinzugezogen werden. Der Ursprung des Fehlers konnte nicht aufgeklärt werden. Behoben wurde er, indem der *Mastermix 2* unmittelbar vor der Färbung angemischt wurde und nicht wie in den Versuchen zuvor eine halbe Stunde vorher.

In Bezug auf die FACS-Messung ergibt sich bei einem *Panel* mit so vielen Markern eine erhöhte Fehleranfälligkeit. Die einzelnen Fluorochrome strahlen in andere hinein und die Differenzierung der Marker voneinander und Detektion von genauen Populationen ist erschwert. Es wird bei einem solch großen *Panel* ein erfahrener *Operator* benötigt, um einen niedrigen *Background* zu gewährleisten.⁴⁵ Dies war bei dieser Arbeit gewährleistet.

Die FACS-Auswertung ist prinzipiell subjektiv geprägt. Ein *Gate* zu setzen und eine Population eindeutig von einer anderen zu trennen, gestaltete sich teilweise als schwierig. Insbesondere die Population der T_{SCM} war mit den gewählten Marken oft schwierig zu bestimmen. Ein alternativer Marker für CD95 könnte CD62L/CXCR3 sein, der sich in neueren Studien als günstig für die Abgrenzung der T_{SCM} erwiesen hat.¹²⁰ Bezüglich der Auswertung ist als kritisch anzusehen, dass diese für die gesunden Probanden nicht blind durchgeführt wurde. Hierbei ist allerdings positiv anzumerken, dass die Beurteilung der Patienten- und Spenderdaten vor der Auswertung der klinischen Daten erfolgte und demnach eine quasi-Verblindung erfolgte. Die Darstellung der *Subsets* erfolgte nur in Hinblick auf die T_{naive} und die T-Gedächtnis-Subpopulationen. Demnach muss hier von einem Bias ausgegangen werden.

Da nur vier Patienten analysiert wurden und die Quantität und/oder Qualität dieser Versuche eingeschränkt war, lässt sich der *Assay* für Patienten noch nicht als vollständig etabliert ansehen.

5.4 Integration in den klinischen Alltag

Um einen Versuch zu kommerzialisieren und in den klinischen Alltag zu integrieren, muss der *Assay* verlässlich und praktikabel sein. Um dies zu gewährleisten, müssen Studien mit sehr großen Patientenzahlen durchgeführt werden. Auf dem Gebiet der hämatopoetischen Stammzelltransplantation gibt es bisher keinen *Assay*, um das Risiko einer GvHD oder einer Abstoßung abzuschätzen (vgl. Kap. 1.5). Über eine um die FACS-Färbung erweiterte *mixed lymphocyte reaction* konnte in dieser Arbeit ein Versuch erprobt werden, der dazu in der Lage ist, allospezifische T-Zellen in Gesunden zu detektieren.

Der Versuch an sich ist zeitlich gut in den klinischen Alltag zu integrieren. Start eines Versuchs war jeweils gegen 15 Uhr am ersten Tag. Bis 19 Uhr dauerte die Arbeit am Versuch bis die Zellen in Kultur waren (4 Stunden). Die Reaktion wurde am nächsten Tag um 8 Uhr gestoppt. Bis zum Ernten der Zellen gegen 12 Uhr war eine vierstündige Pause eingeplant. Von 12 bis 15 Uhr erfolgte die Färbung (3 Stunden) und um 17 Uhr konnte die Messung abgeschlossen werden. Insgesamt betrug also die reine Arbeitszeit an diesem Versuch 9 Stunden, die Zeitdauer, bis die Daten vorlagen, betrug insgesamt 26 Stunden. Das Auswerten dauerte abhängig von den gemessenen Proben bis zu einer Woche und bedurfte der Schulung im Messen und Auswerten des Versuchs.

Technische Assistenten in der Durchführung des Versuchs und der Auswertung zu schulen ist ein Kostenfaktor, der berücksichtigt werden muss. Ein zweiter Faktor sind die hohen Kosten für Antikörperanschaffung, Geräteanschaffung und deren Wartung. Allerdings ist eine HLA-Typisierung ebenfalls sehr kostspielig – die Fremdspendersuche allein kostet zwischen 10.000 und 26.000 €. ²⁰² In den meisten hämatologischen Laboren ist die Durchflusszytometrie bereits als Standardverfahren etabliert. Auch die PBMC-Isolation und die Ansätze in Zellkultur sind für sich genommen relativ einfache Arbeitsschritte, die nur kombiniert werden müssen. Das Hintereinanderschalten der verschiedenen Schritte erhöht allerdings die Varianz der Resultate. *Standard operation procedures* (SOPs) müssen erstellt werden, um möglichst gleiche Abläufe zu gewährleisten. Wie in Kapitel 5.3 erwähnt, arbeiteten zwei verschiedene Labore und Arbeitsgruppen an diesem Versuch. Insbesondere hier ist es wichtig, einheitliche Standards zu schaffen und im besten Fall den Versuch auf ein Labor zu beschränken, um unnötige und problematische Transportwege zu vermeiden. Auch das strikte Einhalten von Parameter-

Einstellungen an den Geräten sowie eine einheitliche Kompensationsmatrix ist Voraussetzung, um hohe Varianzen zu vermeiden und damit die Verlässlichkeit des *Assays* zu erhöhen.

Derzeit werden kontinuierlich und nach vereinheitlichtem Protokoll Zellen von weiteren Familienspendern und -empfängern eingelagert. Diese stehen zur sofortigen Verwendung für die in dieser Arbeit erprobte Methode zur Verfügung. Darunter sind nicht nur Patienten mit Sichelzellerkrankung, sondern auch malignen Erkrankungen. Für diese Patientengruppe könnte der *Assay* adaptiert werden. Problematisch ist generell die geringe Anzahl transplantierte Patienten im pädiatrischen Bereich. An der Charité werden jährlich circa 40 Patienten transplantiert – davon etwa 20 Familienspenden. Auf die Spenderzellen der autolog-ident-transplantierten Patienten hat nur die DKMS, ehemals Deutsche Knochenmarkspenderdatei, Zugriff, weshalb diese Daten nicht für diesen *Assay* verwendet werden konnten. Die DKMS könnte aber, sobald der Versuch etabliert wäre, diesen kommerziell erwerben und verwenden. Kritisch zu sehen ist ebenfalls der Vergleich zum bereits etablierten IFN- γ -Elispot (siehe Kap. 1.5). Im aktuellen Stand der Forschung sind die Ergebnisse nicht aussagekräftig genug, um mit diesem in Bezug auf verlässliche und schnelle klinische Anwendbarkeit in Konkurrenz zu stehen. Nachteilig für den Elispot ist, dass eine kritische Zellmasse von 1:10.000 überschritten werden muss, um eine allospezifische Aktivierung zu sehen.¹³⁶ Der in dieser Arbeit etablierte Versuch zeigt auch ohne Überschreiten dieser Voraussetzung allospezifische Zellen, was in den Kapiteln 4.1 bis 4.3 gezeigt werden konnte. Außerdem produziert der Großteil der CD137⁺, also des gesamten *Pools* an allospezifischen T-Zellen, kein IFN- γ , was wiederum zur Folge hat, dass eine größere Bandbreite an allospezifischen Lymphozyten erfasst werden kann als mit dem IFN- γ -Elispot.¹⁵⁷ Es ist zu betonen, dass der Elispot keine Aussage zur Biologie und damit zu potentiellen *Target*-Möglichkeit für Therapien liefert, was der in dieser Arbeit erprobte *Allo-Assay* vermag.

5.5 Ausblick

Um den *Assay* valider zu machen, sollten Zellen weiterer gesunder Spender untersucht werden. Hierbei könnten die Triplikate zur Kontrolle der Intra-*Assay*-Varianz erhöht werden. Außerdem könnte eine Inter-*Operator*-Varianz-Analyse durchgeführt werden. Weitere Methoden zur Überprüfung der *Assay*-Zuverlässigkeit wären ein *age-of-blood*-Test, bei dem der Einfluss verschiedener Zeitabstände bei Bearbeitungsbeginn nach Gewinnung des peripheren Bluts gemessen würde, sowie ein *age-of-stain*-Test, der die optimale Lagerungsdauer nach Färben der Zellen determinieren kann. Exemplarisch für die Standardisierung eines FACS-basierten *Panels* kann die *ONE-Study* genommen werden, die 2013 von Streitz *et al.* publiziert wurde.¹⁷⁵

Außerdem ist die Datenmenge zu TNF- α und IFN- γ aufgrund der späten Integration noch zu gering. Diese Marker sollten zunächst an gesunden Probanden validiert werden. Speziell IFN- γ ist in Bezug auf den IFN- γ -Elispot interessant. Diesbezüglich könnte der Elispot mit dem in dieser Arbeit etablierten Allo-*Assay* korreliert werden. Teilweise wurden mit dem Elispot Mitglieder meiner Arbeitsgruppe in *high-* und *low-responder* eingeteilt. Es wäre interessant zu sehen, ob sich diese Gradeinteilung der Alloreaktions-Bereitschaft auch in dem in dieser Arbeit etablierten Versuch zeigt. Führt man diese Überlegung weiter, so könnte eine MHC-PCR Analyse erstellt und mit dem *Assay* korreliert werden.

Wie in Kapitel 5.1 beschrieben, zeigt sich bei fast allen Markern die höchste Induktion in der 1:1-Verdünnung. Dies steht im Gegensatz zur anfänglich vermuteten Hypothese, dass die höchste Reaktion bei 1:10 auftreten würde. Wie bereits diskutiert, könnten T_{reg} hierbei eine Rolle spielen. Eine Möglichkeit dies zu überprüfen wäre die Integration von T_{reg}-identifizierenden Markern in das bestehende *Panel*. Vorschläge hierfür sind die in Studien bereits erprobten Marker CD121a/b, *latency-associated peptide* (LAP), GARP (LRRC32) und FoxP3.^{203,204} Auch für die Marker CD154 und CD137 wurde bereits gezeigt, dass diese eine Identifizierung der T_{reg} insbesondere als Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen ermöglichen.¹⁷⁰

Die CD154-Hochregulation nach 4 bis 12 Stunden ermöglicht es, diesen Marker mit Zytokinen zu kombinieren.¹³⁸ Eine Auswertung mit diesem Fokus (CD154⁺Zytokin⁺) ist bisher in dieser Arbeit nicht erfolgt und könnte Ziel weiterer Betrachtungen der bereits vorliegenden Daten sein.

Auch die NK-Zellen spielen eine nicht unwesentliche Rolle in der Alloreaktion (vgl. Kap 1.2.2). Wie die T_{reg} könnte man versuchen, diese Zellpopulation in das bestehende Antikörper-*Panel* zu integrieren. Ein möglicher Marker für NK-Zellen könnte CD56 sein, welcher von der Mehrheit der humanen NK-Zellen exprimiert wird. Um eine Differenzierung von NKT-Zellen zu ermöglichen, ist der bereits im *Panel* vorhandene Marker CD3 sinnvoll, da NK-Zellen diesen im Gegensatz zu NKT-Zellen nicht exprimieren.^{149,205,206}

Nicht nur weitere Zellpopulationen könnten untersucht werden, sondern auch weitere Aktivierungsmarker. In einem Review von 2013 werden mögliche Vorschläge genannt: CD69, CD25, CD71, HLA-DR, CD134 (OX40) und CRTAM.^{157-159,207-210} Eine Arbeit kritisiert CD25 jedoch als zu unspezifisch, da dieser teils auch ohne Aktivierung hochreguliert werde. CD137 zeigte im Vergleich zu CD69 die höhere und robustere Expression. Außerdem kommt es meist zur Koexpression von CD69 und CD25 auf CD137⁺ Zellen.¹⁵⁸ Auch weitere Zeitpunkte könnten im Verlauf getestet werden. Insbesondere CD137 scheint ein späteres Expressions-Maximum nach 24 Stunden zu haben (vgl. Kap. 5.2.1). Ein mögliches Schema für die Entnahme

von PBMCs aus den stimulierten Ansätzen zur Analyse könnte sein: 2h, 4h, 6h, ..., 24h. Limitierend hierbei ist die durch BFA vermittelte Zytotoxizität nach zu langer Inkubation (vgl. Kap. 5.2.1).

Bisher wurden bei vier Patienten-Spender-Paaren lediglich Proben vor Transplantation miteinander in Reaktion gegeben. Interessant könnte auch sein, Patientenzellen nach erfolgter immunologischer Rekonstitution auf alloreaktive T-Zellen zu untersuchen. Hierbei sollte es bei erfolgreicher Adaption des Spender-Immunsystems zu keiner Aktivierung kommen. Dies stellt ebenfalls eine gute Möglichkeit dar, den *Assay* weiter zu validieren. Den *Allo-Assay* mit Proben, die während einer akuten GvHD gewonnen wurden, durchzuführen wäre ebenso eine vor allem für das pathophysiologische Verständnis sinnvolle Überlegung. Dies wurde bisher nicht durchgeführt, da sich die Limitation ergab, dass bei klinischem Verdacht auf akute GvHD sofort mit der Immunsuppression begonnen wird und das Zeitfenster für die Entnahme sehr kurz ist.

5.6 Schlussfolgerung

In Kapitel 5.4 wurde bereits erwähnt, dass, um den *Assay* in den klinischen Alltag zu integrieren, dieser für eine große Gruppe an Patienten unterschiedlicher Erkrankungen erprobt werden muss. Mit dieser Arbeit sind die Grundvoraussetzungen für eine weitere Analyse der gefundenen Marker-Kombinationen geschaffen. Zwei Parameter könnten als *Outcome* einer Studie verwendet werden, nämlich erstens die Induktionshöhe (%) der Marker CD137⁺CD154⁺ sowie CD137⁺IL-2⁺ auf CD4⁺ T-Zellen und CD137⁺Granzym B⁺ auf CD8⁺ T-Zellen. Zweitens kann über die Leukozyten-*Counts* der Patienten bei Probenentnahme die genaue Anzahl der allospezifischen T-Zellen ermittelt werden – ein weiterer möglicher *Outcome*-Parameter. Diese beiden Parameter mit den klinischen Daten einer großen randomisierten, doppelt verblindeten, im besten Fall multizentrischen Studie auszuwerten, könnte frühzeitige Hinweise auf eine eventuelle Abstoßung des Transplantats beziehungsweise eine drohende GvHD geben.

Literaturverzeichnis

1. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001;411:385-9.
2. Kröger N, Zander A. Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven. 4 ed. Bremen: Uni-Med Science; 2015.
3. Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988;72:2074-81.
4. Socinski MA, Cannistra SA, Elias A, Antman KH, Schnipper L, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1988;1:1194-8.
5. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-8.
6. La Nasa G, Giardini C, Argioli F, Locatelli F, Arras M, De Stefano P, Ledda A, Pizzati A, Sanna MA, Vacca A, Lucarelli G, Contu L. Unrelated donor bone marrow transplantation for thalassemia: the effect of extended haplotypes. *Blood* 2002;99:4350-6.
7. Oevermann L, Handgretinger R. New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatr Res* 2012;71:418-26.
8. Dvorak CC, Gracia CR, Sanders JE, Cheng EY, Baker KS, Pulsipher MA, Petryk A. NCI, NHLBI/PBMTTC first international conference on late effects after pediatric hematopoietic cell transplantation: endocrine challenges-thyroid dysfunction, growth impairment, bone health, & reproductive risks. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1725-38.
9. Pulsipher MA, Skinner R, McDonald GB, Hingorani S, Armenian SH, Cooke KR, Gracia C, Petryk A, Bhatia S, Bunin N, Nieder ML, Dvorak CC, Sung L, Sanders JE, Kurtzberg J, Baker KS. National Cancer Institute, National Heart, Lung and Blood Institute/Pediatric Blood and Marrow Transplantation Consortium First International Consensus Conference on late effects after pediatric hematopoietic cell transplantation: the need for pediatric-specific long-term follow-up guidelines. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:334-47.
10. Niemeyer C, Eggert A. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. 2 ed. Berlin: Springer; 2018.

11. Johnson FL, Look AT, Gockerman J, Ruggiero MR, Dalla-Pozza L, Billings FT, 3rd. Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. *N Engl J Med* 1984;311:780-3.
12. Vermylen C, Cornu G. Bone marrow transplantation for sickle cell anemia. *Curr Opin Hematol* 1996;3:163-6.
13. Walters MC, Patience M, Leisenring W, Eckman JR, Scott JP, Mentzer WC, Davies SC, Ohene-Frempong K, Bernaudin F, Matthews DC, Storb R, Sullivan KM. Bone marrow transplantation for sickle cell disease. *N Engl J Med* 1996;335:369-76.
14. Murphy KM, Weaver C, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 9th ed. New York: Garland Science; 2016.
15. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernandez-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Muller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010;75:291-455.
16. Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* 2010;11:47-59.
17. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:702-9.
18. Rotzschke O, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, Jung G, Rammensee HG. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 1990;348:252-4.
19. Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ. Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* 1986;163:903-21.
20. Wever PC, Van Der Vliet HJ, Spaeny LH, Wolbink AM, Van Diepen FN, Froelich CJ, Hack CE, ten Berge IJ. The CD8+ granzyme B+ T-cell subset in peripheral blood from healthy individuals contains activated and apoptosis-prone cells. *Immunology* 1998;93:383-9.
21. Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2013;13:525-41.
22. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 1996;272:1755-62.
23. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, Alt FW. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992;68:855-67.

24. Rabbitts TH, Lefranc MP, Stinson MA, Sims JE, Schroder J, Steinmetz M, Spurr NL, Solomon E, Goodfellow PN. The chromosomal location of T-cell receptor genes and a T cell rearranging gene: possible correlation with specific translocations in human T cell leukaemia. *EMBO J* 1985;4:1461-5.
25. Zinkernagel RM, Callahan GN, Klein J, Dennert G. Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus. *Nature* 1978;271:251-3.
26. Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 1988;335:730-3.
27. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 1988;336:73-6.
28. Chai JG, Vendetti S, Bartok I, Schoendorf D, Takacs K, Elliott J, Lechler R, Dyson J. Critical role of costimulation in the activation of naive antigen-specific TCR transgenic CD8⁺ T cells in vitro. *J Immunol* 1999;163:1298-305.
29. Zakrzewski JL, van den Brink MR, Hubbell JA. Overcoming immunological barriers in regenerative medicine. *Nat Biotechnol* 2014;32:786-94.
30. Orabona C, Grohmann U, Belladonna ML, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, Bozza S, Volpi C, Salomon BL, Fioretti MC, Romani L, Puccetti P. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat Immunol* 2004;5:1134-42.
31. Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 2001;19:225-52.
32. Bitra A, Doukov T, Wang J, Picarda G, Benedict CA, Croft M, Zajonc DM. Crystal structure of murine 4-1BB and its interaction with 4-1BBL support a role for galectin-9 in 4-1BB signaling. *J Biol Chem* 2017.
33. Matus-Nicodemos R, Vavassori S, Castro-Faix M, Valentin-Acevedo A, Singh K, Marcelli V, Covey LR. Polypyrimidine tract-binding protein is critical for the turnover and subcellular distribution of CD40 ligand mRNA in CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2011;186:2164-71.
34. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012;30:531-64.
35. Wood KJ, Bushell A, Hester J. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 2012;12:417-30.
36. Petersdorf EW. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *Blood* 2013;122:1863-72.

37. Merckenschlager M, Graf D, Lovatt M, Bommhardt U, Zamoyska R, Fisher AG. How many thymocytes audition for selection? *J Exp Med* 1997;186:1149-58.
38. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 1993;11:385-402.
39. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 2001;166:973-81.
40. Alanio C, Lemaitre F, Law HK, Hasan M, Albert ML. Enumeration of human antigen-specific naive CD8⁺ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood* 2010;115:3718-25.
41. Geiger R, Duhon T, Lanzavecchia A, Sallusto F. Human naive and memory CD4⁺ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *J Exp Med* 2009;206:1525-34.
42. Gras S, Kjer-Nielsen L, Chen Z, Rossjohn J, McCluskey J. The structural bases of direct T-cell allorecognition: implications for T-cell-mediated transplant rejection. *Immunol Cell Biol* 2011;89:388-95.
43. Zerrahn J, Held W, Raulet DH. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 1997;88:627-36.
44. Felix NJ, Donermeyer DL, Horvath S, Walters JJ, Gross ML, Suri A, Allen PM. Alloreactive T cells respond specifically to multiple distinct peptide-MHC complexes. *Nat Immunol* 2007;8:388-97.
45. Litjens NH, de Wit EA, Baan CC, Betjes MG. Activation-induced CD137 is a fast assay for identification and multi-parameter flow cytometric analysis of alloreactive T cells. *Clin Exp Immunol* 2013;174:179-91.
46. Sijpkens YW, Doxiadis II, Mallat MJ, de Fijter JW, Bruijn JA, Claas FH, Paul LC. Early versus late acute rejection episodes in renal transplantation. *Transplantation* 2003;75:204-8.
47. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol* 2001;167:7199-206.
48. Benichou G, Tam RC, Soares LR, Fedoseyeva EV. Indirect T-cell allorecognition: perspectives for peptide-based therapy in transplantation. *Immunol Today* 1997;18:67-71.

49. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, Lechler RI. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 2004;173:4828-37.
50. Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M, Bluestone JA. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunol Rev* 2011;241:180-205.
51. Lakkis FG, Lechler RI. Origin and biology of the allogeneic response. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3.
52. Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology* 2010;129:8-19.
53. Gill RG. NK cells: elusive participants in transplantation immunity and tolerance. *Curr Opin Immunol* 2010;22:649-54.
54. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 1956;2:626-7.
55. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 1966;62:21-78.
56. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-61.
57. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med* 2017;377:2167-79.
58. Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol* 2006;43:3-10.
59. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:139-70.
60. Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, Gebuhrer L, Dubois V, Jollet I, Bois M, Perrier P, Masson D, Moine A, Absi L, Reviron D, Lepage V, Tamouza R, Toubert A, Marry E, Chir Z, Jouet JP, Blaise D, Charron D, Raffoux C. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:965-74.
61. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-5.
62. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95:2754-9.

63. Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A, Hamada H, Asakura H, Ishikawa H, Matsushima K. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol* 2003;4:154-60.
64. Wilhelm K, Ganesan J, Muller T, Durr C, Grimm M, Beilhack A, Krempl CD, Sorichter S, Gerlach UV, Juttner E, Zerweck A, Gartner F, Pellegatti P, Di Virgilio F, Ferrari D, Kambham N, Fisch P, Finke J, Idzko M, Zeiser R. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* 2010;16:1434-8.
65. Dustin ML. Role of adhesion molecules in activation signaling in T lymphocytes. *J Clin Immunol* 2001;21:258-63.
66. Oostvogels R, Lokhorst HM, Minnema MC, van Elk M, van den Oudenalder K, Spierings E, Mutis T, Spaapen RM. Identification of minor histocompatibility antigens based on the 1000 Genomes Project. *Haematologica* 2014;99:1854-9.
67. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 1974;248:701-2.
68. Bevan MJ. Interaction antigens detected by cytotoxic T cells with the major histocompatibility complex as modifier. *Nature* 1975;256:419-21.
69. Cavet J, Middleton PG, Segall M, Noreen H, Davies SM, Dickinson AM. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood* 1999;94:3941-6.
70. Dickinson AM, Charron D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 2005;17:517-25.
71. Fowler DH, Kurasawa K, Smith R, Eckhaus MA, Gress RE. Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood* 1994;84:3540-9.
72. Yang YG, Dey BR, Sergio JJ, Pearson DA, Sykes M. Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. *J Clin Invest* 1998;102:2126-35.
73. Hill GR, Teshima T, Rebel VI, Krijanovski OI, Cooke KR, Brinson YS, Ferrara JL. The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J Immunol* 2000;164:656-63.

74. Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J Exp Med* 1987;166:1280-9.
75. Brown GR, Lee E, Thiele DL. TNF-TNFR2 interactions are critical for the development of intestinal graft-versus-host disease in MHC class II-disparate (C57BL/6J-->C57BL/6J x bm12)F1 mice. *J Immunol* 2002;168:3065-71.
76. van den Brink MR, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2002;2:273-81.
77. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945-56.
78. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 2003;54:29-52.
79. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991;324:667-74.
80. Snover DC, Weisdorf SA, Vercellotti GM, Rank B, Hutton S, McGlave P. A histopathologic study of gastric and small intestinal graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Hum Pathol* 1985;16:387-92.
81. Snover DC, Weisdorf SA, Ramsay NK, McGlave P, Kersey JH. Hepatic graft versus host disease: a study of the predictive value of liver biopsy in diagnosis. *Hepatology* 1984;4:123-30.
82. Fujii N, Takenaka K, Shinagawa K, Ikeda K, Maeda Y, Sunami K, Hiramatsu Y, Matsuo K, Ishimaru F, Niiya K, Yoshino T, Hirabayashi N, Harada M. Hepatic graft-versus-host disease presenting as an acute hepatitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:1007-10.
83. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295-304.
84. Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, Leblond V, Ifrah N, Jouet JP, Loberiza F, Ringden O, Barrett AJ, Horowitz MM, Socie G, Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie C, Dana Farber Cancer I, International Bone Marrow Transplant R. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe

Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* 2005;106:1495-500.

85. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N Engl J Med* 2017;377:2565-79.

86. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY, Carabasi MH, Gale RP, Giralt S, Hale GA, Ilhan O, McCarthy PL, Socie G, Verdonck LF, Weisdorf DJ, Horowitz MM. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002;100:406-14.

87. Sano Y, Date H, Nagahiro I, Aoe M, Shimizu N. Living-donor lobar lung transplantation for bronchiolitis obliterans after bone marrow transplantation. *Ann Thorac Surg* 2005;79:1051-2.

88. Bortin MM, Truitt RL, Shih CY, Rimm AA. Graft-versus-leukemia: allosensitization of MHC compatible donors induces antileukemic reactivity without amplification of antihost reactivity. *Haematol Blood Transfus* 1980;25:31-9.

89. Barnes DW, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. *Br J Haematol* 1957;3:241-52.

90. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, Fay JW, Nademanee A, Antin JH, Christiansen NP, van der Jagt R, Herzig RH, Litzow MR, Wolff SN, Longo WL, Petersen FB, Karanes C, Avalos B, Storb R, Buell DN, Maher RM, Fitzsimmons WE, Wingard JR. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 1998;92:2303-14.

91. Uphoff DE. Alteration of homograft reaction by A-methopterin in lethally irradiated mice treated with homologous marrow. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958;99:651-3.

92. Storb R, Deeg HJ. Failure of allogeneic canine marrow grafts after total-body irradiation. Allogeneic "resistance" versus transfusion-induced sensitization. *Transplantation* 1986;42:571-80.

93. Luznik L, O'Donnell PV, Fuchs EJ. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Semin Oncol* 2012;39:683-93.

94. Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA, Unrelated Donor Marrow Transplantation T. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free

survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet* 2005;366:733-41.

95. Barge RM, Starrenburg CW, Falkenburg JH, Fibbe WE, Marijt EW, Willemze R. Long-term follow-up of myeloablative allogeneic stem cell transplantation using Campath "in the bag" as T-cell depletion: the Leiden experience. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:1129-34.

96. Ringden O, Remberger M, Aschan J, Lungman P, Lonnqvist B, Markling L. Long-term follow-up of a randomized trial comparing T cell depletion with a combination of methotrexate and cyclosporine in adult leukemic marrow transplant recipients. *Transplantation* 1994;58:887-91.

97. Bacigalupo A. Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:225-31.

98. Bacigalupo A, Lamparelli T, Barisione G, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, di Bartolomeo P, Oneto R, Bruno B, Sacchi N, van Lint MT, Bosi A, Gruppo Italiano Trapianti Midollo O. Thymoglobulin prevents chronic graft-versus-host disease, chronic lung dysfunction, and late transplant-related mortality: long-term follow-up of a randomized trial in patients undergoing unrelated donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:560-5.

99. Levine JE, Uberti JP, Ayash L, Reynolds C, Ferrara JL, Silver SM, Braun T, Yanik G, Hutchinson R, Ratanatharathorn V. Lowered-intensity preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation delays acute graft-versus-host disease but does not improve outcome for advanced hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:189-97.

100. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers ME, Maloney DG, Sandmaier BM, Maris MB, Storb R. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:756-62.

101. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, Beatty PG, Doney K, McDonald GB, Sanders JE. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 1990;76:1464-72.

102. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NK, Davies SM, Blazar BR. Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:387-94.

103. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Appelbaum FR, McDonald GB, Storb R, Hansen JA. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: secondary treatment. *Blood* 1991;77:1821-8.

104. Dignan FL, Scarisbrick JJ, Cornish J, Clark A, Amrolia P, Jackson G, Mahendra P, Taylor PC, Shah P, Lightman S, Fortune F, Kibbler C, Andreyev J, Albanese A, Hadzic N, Potter MN, Shaw BE, Haemato-oncology Task Force of British Committee for Standards in H, British Society for B, Marrow T. Organ-specific management and supportive care in chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2012;158:62-78.
105. Gatza E, Rogers CE, Clouthier SG, Lowler KP, Tawara I, Liu C, Reddy P, Ferrara JL. Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. *Blood* 2008;112:1515-21.
106. Greinix HT, Volc-Platzer B, Rabitsch W, Gmeinhart B, Guevara-Pineda C, Kalhs P, Krutmann J, Honigsmann H, Ciovica M, Knobler RM. Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease. *Blood* 1998;92:3098-104.
107. Park JH, Lee HJ, Kim SR, Song GW, Lee SK, Park SY, Kim KC, Hwang SH, Park JS. Etanercept for steroid-refractory acute graft versus host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Korean J Intern Med* 2014;29:630-6.
108. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, Litzow MR, Nieto Y, Savani BN, Schriber JR, Shaughnessy PJ, Wall DA, 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;18:1150-63.
109. Koc S, Leisenring W, Flowers ME, Anasetti C, Deeg HJ, Nash RA, Sanders JE, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR, Martin PJ. Therapy for chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood* 2002;100:48-51.
110. Couriel D, Hosing C, Saliba R, Shpall EJ, Andelini P, Popat U, Donato M, Champlin R. Extracorporeal photopheresis for acute and chronic graft-versus-host disease: does it work? *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:37-40.
111. Couriel D, Carpenter PA, Cutler C, Bolanos-Meade J, Treister NS, Gea-Banacloche J, Shaughnessy P, Hymes S, Kim S, Wayne AS, Chien JW, Neumann J, Mitchell S, Syrjala K, Moravec CK, Abramovitz L, Liebermann J, Berger A, Gerber L, Schubert M, Filipovich AH, Weisdorf D, Schubert MM, Shulman H, Schultz K, Mittelman B, Pavletic S, Vogelsang GB, Martin PJ, Lee SJ, Flowers ME. Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host disease: national institutes of health consensus development project on criteria for clinical

- trials in chronic Graft-versus-host disease: V. Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:375-96.
112. De Rosa SC, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat Med* 2001;7:245-8.
113. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013;43:2797-809.
114. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 2011;35:161-8.
115. Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ, Hanifin JM, Slifka MK. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* 2003;9:1131-7.
116. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol* 2012;33:323-32.
117. Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 1988;140:2171-8.
118. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708-12.
119. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* 2011;17:1290-7.
120. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nat Med* 2017;23:18-27.
121. Lugli E, Goldman CK, Perera LP, Smedley J, Pung R, Yovandich JL, Creekmore SP, Waldmann TA, Roederer M. Transient and persistent effects of IL-15 on lymphocyte homeostasis in nonhuman primates. *Blood* 2010;116:3238-48.
122. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 2003;101:2711-20.
123. Anderson BE, Tang AL, Wang Y, Froicu M, Rothstein D, McNiff JM, Jain D, Demetris AJ, Farber DL, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Enhancing alloreactivity does not restore GVHD induction but augments skin graft rejection by CD4(+) effector memory T cells. *Eur J Immunol* 2011;41:2782-92.

124. Tkachev V, Furlan SN, Watkins B, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Kean L. T Stem Cell Memory Dynamics during Acute Graft-Versus-Host Disease. *Blood* 2015;126:3079-.
125. Harris AC, Ferrara JL, Levine JE. Advances in predicting acute GVHD. *Br J Haematol* 2013;160:288-302.
126. Levine JE, Braun TM, Harris AC, Holler E, Taylor A, Miller H, Magenau J, Weisdorf DJ, Ho VT, Bolanos-Meade J, Alousi AM, Ferrara JL, Blood, Marrow Transplant Clinical Trials N. A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study. *Lancet Haematol* 2015;2:e21-9.
127. Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K. Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer* 2004;101:1936-46.
128. Ranganathan P, Heaphy CE, Costinean S, Stauffer N, Na C, Hamadani M, Santhanam R, Mao C, Taylor PA, Sandhu S, He G, Shana'ah A, Nuovo GJ, Lagana A, Cascione L, Obad S, Broom O, Kauppinen S, Byrd JC, Caligiuri M, Perrotti D, Hadley GA, Marcucci G, Devine SM, Blazar BR, Croce CM, Garzon R. Regulation of acute graft-versus-host disease by microRNA-155. *Blood* 2012;119:4786-97.
129. Zhang C, Bai N, Huang W, Zhang P, Luo Y, Men S, Wen T, Tong H, Wang S, Tian YP. The predictive value of selected serum microRNAs for acute GVHD by TaqMan MicroRNA arrays. *Ann Hematol* 2016;95:1833-43.
130. Srinivasan R, Daniels J, Fusaro V, Lundqvist A, Killian JK, Geho D, Quezado M, Kleiner D, Rucker S, Espina V, Whiteley G, Liotta L, Petricoin E, Pittaluga S, Hitt B, Barrett AJ, Rosenblatt K, Childs RW. Accurate diagnosis of acute graft-versus-host disease using serum proteomic pattern analysis. *Exp Hematol* 2006;34:796-801.
131. Lee SE, Lim JY, Yoon JH, Shin SH, Cho BS, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, Lee S, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Min WS, Min CK. CD161(+) T cells as predictive markers for acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:421-8.
132. Budde H, Papert S, Maas JH, Reichardt HM, Wulf G, Hasenkamp J, Riggert J, Legler TJ. Prediction of graft-versus-host disease: a biomarker panel based on lymphocytes and cytokines. *Ann Hematol* 2017;96:1127-33.
133. Gebauer BS, Hricik DE, Atallah A, Bryan K, Riley J, Tary-Lehmann M, Greenspan NS, Dejeo C, Boehm BO, Hering BJ, Heeger PS. Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool. *Am J Transplant* 2002;2:857-66.

134. Augustine JJ, Siu DS, Clemente MJ, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE. Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005;5:1971-5.
135. Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, Dejelo C, Hricik DE, Schulak JA, Tary-Lehmann M. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol* 1999;163:2267-75.
136. Matesic D, Lehmann PV, Heeger PS. High-resolution characterization of cytokine-producing alloreactivity in naive and allograft-primed mice. *Transplantation* 1998;65:906-14.
137. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4:648-55.
138. Bacher P, Schink C, Teutschbein J, Kniemeyer O, Assenmacher M, Brakhage AA, Scheffold A. Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire. *J Immunol* 2013;190:3967-76.
139. Luttmann W. *Der Experimentator: Immunologie*. 1. Aufl. ed. Heidelberg ; München: Elsevier; 2004.
140. Boxberger HJ. *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken*. Weinheim: Wiley-VCH; 2007.
141. Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* 1989;143:1283-9.
142. Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 1992;116:1071-80.
143. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009;27:591-619.
144. Frentsch M, Stark R, Matzmohr N, Meier S, Durlanik S, Schulz AR, Stervbo U, Jurchott K, Gebhardt F, Heine G, Reuter MA, Betts MR, Busch D, Thiel A. CD40L expression permits CD8⁺ T cells to execute immunologic helper functions. *Blood* 2013;122:405-12.
145. Durlanik S, Loyal L, Stark R, Sercan Alp O, Hartung A, Radbruch A, von Herrath M, Matzmohr N, Frentsch M, Thiel A. CD40L expression by CD4(+) but not CD8(+) T cells regulates antiviral immune responses in acute LCMV infection in mice. *Eur J Immunol* 2016;46:2566-73.
146. Grossman WJ, Revell PA, Lu ZH, Johnson H, Bredemeyer AJ, Ley TJ. The orphan granzymes of humans and mice. *Curr Opin Immunol* 2003;15:544-52.

147. Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ, Cooper DA, Rowland-Jones SL, Kelleher AD. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* 2002;168:5954-8.
148. Norris PJ, Sumaroka M, Brander C, Moffett HF, Boswell SL, Nguyen T, Sykulev Y, Walker BD, Rosenberg ES. Multiple effector functions mediated by human immunodeficiency virus-specific CD4(+) T-cell clones. *J Virol* 2001;75:9771-9.
149. Bratke K, Kuepper M, Bade B, Virchow JC, Jr., Luttmann W. Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood. *Eur J Immunol* 2005;35:2608-16.
150. Cai SF, Fehniger TA, Cao X, Mayer JC, Brune JD, French AR, Ley TJ. Differential expression of granzyme B and C in murine cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 2009;182:6287-97.
151. Abdalla AO, Kiaii S, Hansson L, Rossmann ED, Jeddi-Tehrani M, Shokri F, Osterborg A, Mellstedt H, Rabbani H. Kinetics of cytokine gene expression in human CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subsets using quantitative real-time PCR. *Scand J Immunol* 2003;58:601-6.
152. Kelso A, Costelloe EO, Johnson BJ, Groves P, Buttigieg K, Fitzpatrick DR. The genes for perforin, granzymes A-C and IFN-gamma are differentially expressed in single CD8(+) T cells during primary activation. *Int Immunol* 2002;14:605-13.
153. Sojka DK, Bruniquel D, Schwartz RH, Singh NJ. IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. *J Immunol* 2004;172:6136-43.
154. Fan J, Nishanian P, Breen EC, McDonald M, Fahey JL. Cytokine gene expression in normal human lymphocytes in response to stimulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:335-40.
155. Hartel C, Fricke L, Schumacher N, Kirchner H, Muller-Steinhardt M. Delayed cytokine mRNA expression kinetics after T-lymphocyte costimulation: a quantitative measure of the efficacy of cyclosporin A-based immunosuppression. *Clin Chem* 2002;48:2225-31.
156. Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 2001;14:205-15.
157. Wehler TC, Karg M, Distler E, Konur A, Nonn M, Meyer RG, Huber C, Hartwig UF, Herr W. Rapid identification and sorting of viable virus-reactive CD4(+) and CD8(+) T cells based on antigen-triggered CD137 expression. *J Immunol Methods* 2008;339:23-37.

158. Wolfl M, Kuball J, Eyrich M, Schlegel PG, Greenberg PD. Use of CD137 to study the full repertoire of CD8⁺ T cells without the need to know epitope specificities. *Cytometry A* 2008;73:1043-9.
159. Wolfl M, Kuball J, Ho WY, Nguyen H, Manley TJ, Bleakley M, Greenberg PD. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8⁺ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood* 2007;110:201-10.
160. Dawicki W, Watts TH. Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* 2004;34:743-51.
161. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000;67:2-17.
162. Koguchi Y, Thauland TJ, Slifka MK, Parker DC. Preformed CD40 ligand exists in secretory lysosomes in effector and memory CD4⁺ T cells and is quickly expressed on the cell surface in an antigen-specific manner. *Blood* 2007;110:2520-7.
163. Lee BO, Haynes L, Eaton SM, Swain SL, Randall TD. The biological outcome of CD40 signaling is dependent on the duration of CD40 ligand expression: reciprocal regulation by interleukin (IL)-4 and IL-12. *J Exp Med* 2002;196:693-704.
164. Litjens NH, van de Wetering J, van Besouw NM, Betjes MG. The human alloreactive CD4⁺ T-cell repertoire is biased to a Th17 response and the frequency is inversely related to the number of HLA class II mismatches. *Blood* 2009;114:3947-55.
165. De Rosa SC, Lu FX, Yu J, Perfetto SP, Falloon J, Moser S, Evans TG, Koup R, Miller CJ, Roederer M. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *J Immunol* 2004;173:5372-80.
166. Han Q, Bagheri N, Bradshaw EM, Hafler DA, Lauffenburger DA, Love JC. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:1607-12.
167. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JP. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 2008;14:88-92.
168. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Del Papa B, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y, Velardi A, Aversa F, Martelli MF. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117:3921-8.

169. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Piseshka B, Dada A, Niemand C, Assenmacher M, Orso E, Andreesen R, Holler E, Edinger M. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:267-74.
170. Schoenbrunn A, Frentsch M, Kohler S, Keye J, Doms H, Moewes B, Dong J, Loddenkemper C, Sieper J, Wu P, Romagnani C, Matzmohr N, 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;189:5985-94.
171. Sciaky N, Presley J, Smith C, Zaal KJ, Cole N, Moreira JE, Terasaki M, Siggia E, Lippincott-Schwartz J. Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* 1997;139:1137-55.
172. O'Neil-Andersen NJ, Lawrence DA. Differential modulation of surface and intracellular protein expression by T cells after stimulation in the presence of monensin or brefeldin A. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:243-50.
173. Mollenhauer HH, Morre DJ, Rowe LD. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1990;1031:225-46.
174. Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 2003;299:1400-3.
175. Streitz M, Miloud T, Kapinsky M, Reed MR, Magari R, Geissler EK, Hutchinson JA, Vogt K, Schlickeiser S, Kverneland AH, Meisel C, Volk HD, Sawitzki B. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res* 2013;2:17.
176. Okada T, Miller MJ, Parker I, Krummel MF, Neighbors M, Hartley SB, O'Garra A, Cahalan MD, Cyster JG. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol* 2005;3:e150.
177. Allen CD, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 2007;315:528-31.
178. Luqman M, Bottomly K. Activation requirements for CD4+ T cells differing in CD45R expression. *J Immunol* 1992;149:2300-6.
179. Byrne JA, Butler JL, Cooper MD. Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *J Immunol* 1988;141:3249-57.
180. Croft M, Bradley LM, Swain SL. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* 1994;152:2675-85.

181. Rogers PR, Dubey C, Swain SL. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* 2000;164:2338-46.
182. Cieri N, Oliveira G, Greco R, Forcato M, Taccioli C, Cianciotti B, Valtolina V, Noviello M, Vago L, Bondanza A, Lunghi F, Markt S, Bellio L, Bordignon C, Bicciato S, Peccatori J, Ciceri F, Bonini C. Generation of human memory stem T cells after haploidentical T-replete hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2015;125:2865-74.
183. Voehringer D, Koschella M, Pircher H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1). *Blood* 2002;100:3698-702.
184. Wang X, Mosmann T. In vivo priming of CD4 T cells that produce interleukin (IL)-2 but not IL-4 or interferon (IFN)-gamma, and can subsequently differentiate into IL-4- or IFN-gamma-secreting cells. *J Exp Med* 2001;194:1069-80.
185. D'Asaro M, Dieli F, Caccamo N, Musso M, Porretto F, Salerno A. Increase of CCR7-CD45RA+ CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease. *Leukemia* 2006;20:545-7.
186. Wehler TC, Nonn M, Brandt B, Britten CM, Grone M, Todorova M, Link I, Khan SA, Meyer RG, Huber C, Hartwig UF, Herr W. Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from antileukemic and antitumor donor T-cell lines. *Blood* 2007;109:365-73.
187. Blazar BR, Kwon BS, Panoskaltis-Mortari A, Kwak KB, Peschon JJ, Taylor PA. Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Immunol* 2001;166:3174-83.
188. Blazar BR, Lees CJ, Martin PJ, Noelle RJ, Kwon B, Murphy W, Taylor PA. Host T cells resist graft-versus-host disease mediated by donor leukocyte infusions. *J Immunol* 2000;165:4901-9.
189. Broen K, van der Waart AB, Greupink-Draaisma A, Metz J, Feuth T, Schaap NP, Blijlevens NM, van der Velden WJ, Dolstra H. Polymorphisms in CCR6 are associated with chronic graft-versus-host disease and invasive fungal disease in matched-related hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1443-9.
190. Ratajczak P, Janin A, Peffault de Latour R, Leboeuf C, Desveaux A, Keyvanfar K, Robin M, Clave E, Douay C, Quinquenel A, Pichereau C, Bertheau P, Mary JY, Socie G. Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood* 2010;116:1165-71.

191. Vokaer B, Van Rompaey N, Lemaitre PH, Lhomme F, Kubjak C, Benghiat FS, Iwakura Y, Petein M, Field KA, Goldman M, Le Moine A, Charbonnier LM. Critical role of regulatory T cells in Th17-mediated minor antigen-disparate rejection. *J Immunol* 2010;185:3417-25.
192. Haynes L, Eaton SM, Swain SL. Effect of age on naive CD4 responses: impact on effector generation and memory development. *Springer Semin Immunopathol* 2002;24:53-60.
193. Hobbs MV, Ernst DN. T cell differentiation and cytokine expression in late life. *Dev Comp Immunol* 1997;21:461-70.
194. Geerman S, Nolte MA. Impact of T cells on hematopoietic stem and progenitor cell function: Good guys or bad guys? *World J Stem Cells* 2017;9:37-44.
195. Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG. Alloreactive memory T cells are responsible for the persistence of graft-versus-host disease. *J Immunol* 2005;174:3051-8.
196. Huang W, Chao NJ. Memory T cells: A helpful guard for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation without causing graft-versus-host disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2017.
197. Ueda Y, Hagihara M, Okamoto A, Higuchi A, Tanabe A, Hirabayashi K, Izumi S, Makino T, Kato S, Hotta T. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Hum Immunol* 2003;64:1144-51.
198. Muller CR, Ehninger G, Goldmann SF. Gene and haplotype frequencies for the loci hLA-A, hLA-B, and hLA-DR based on over 13,000 german blood donors. *Hum Immunol* 2003;64:137-51.
199. Lindl T. Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 5., überarb. und erw. Aufl. ed. Heidelberg u.a.: Spektrum Akad. Verl.; 2002.
200. Conran N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2018;68:263-99.
201. Janetzki S, Panageas KS, Ben-Porat L, Boyer J, Britten CM, Clay TM, Kalos M, Maecker HT, Romero P, Yuan J, Kast WM, Hoos A, Elispot Proficiency Panel of the CVCIAWG. Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:303-15.
202. Anlage zum Behandlungsvertrag für stationäre Behandlung. Klinikum der Universität München, 2012. (Accessed 24/04, 2018, at <http://www.klinikum.uni->

muenchen.de/Kinderklinik-und-Kinderpoliklinik-im-Dr-von-Haunerschen-Kinderspital/download/inhalt/fuer_eltern/Preisliste_2012-0701.pdf.)

203. Tran DQ, Andersson J, Hardwick D, Bebris L, Illei GG, Shevach EM. Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3⁺ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 2009;113:5125-33.
204. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:13445-50.
205. Gershenfeld HK, Hershberger RJ, Shows TB, Weissman IL. Cloning and chromosomal assignment of a human cDNA encoding a T cell- and natural killer cell-specific trypsin-like serine protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1184-8.
206. Hameed A, Lowrey DM, Lichtenheld M, Podack ER. Characterization of three serine esterases isolated from human IL-2 activated killer cells. *J Immunol* 1988;141:3142-7.
207. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A, Turano A. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 1997;27:71-6.
208. Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, Thiel A. Direct access to CD4⁺ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 2005;11:1118-24.
209. Maino VC, Suni MA, Ruitenberg JJ. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* 1995;20:127-33.
210. Mardiney M, 3rd, Brown MR, Fleisher TA. Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals. *Cytometry* 1996;26:305-10.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: HLA-Klassen nach Klein et al., 2000.....	9
Abb. 2: T-Zell-Rezeptor (= CD3) nach Kershaw <i>et al.</i> , 2013.....	11
Abb. 3: Modell der T-Zell-Alloreaktivität nach Zakrzewski <i>et al.</i> , 2014: Mechanismen der Alloaktivierung (A), Möglichkeiten der Interaktion zwischen antigenpräsentierender Zelle (APC) und T-Zelle (B).	14
Abb. 4: GvHD-Pathophysiologie – Modell nach Ferrara <i>et al.</i> , 2009 und Zeiser <i>et al.</i> , 2017.16	
Abb. 5: Differenzierungswege sowie Oberflächenprofile der T-Memory-Subsets nach Gattioni <i>et al.</i> , 2017.	23
Abb. 6: Schema des Versuchsablaufs.	33
Abb. 7: Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von PBMC aus Luttmann <i>et al.</i> , 2004.	34
Abb. 8: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer nach Boxberger, 2007.	35
Abb. 9: Optimierung der CFDA-SE-Färbung vor der Anwendung in diesem Versuch.....	35
Abb. 10: FACS-Daten der CFSE-Färbung exemplarisch gezeigt für die verschiedenen Ansätze in Zellkultur jeweils für die CD4 ⁺ T-Zellen.	36
Abb. 11: T-Zell-Gating.....	41
Abb. 12: Differenzierung der Donoren im Gating und Aktivierungsmarker-Gating.....	41
Abb. 13: T-Memory-Subset-Gating der CD4 ⁺ T-Zellen.	42
Abb. 14: T-Memory-Subset-Gating der CD8 ⁺ T-Zellen.	42
Abb. 15: FACS-Daten der Aktivierungsmarker-Induktion exemplarisch für einen gesunden Probanden.	44
Abb. 16: Legende „Gesunde Donoren“ für Abb. 17 bis 22, sowie 24 und 25.	45
Abb. 17: Einfach positive Aktivierungsmarker der gesunden Donoren – CD4 ⁺ T-Zellen.	46
Abb. 18: Einfach positive Aktivierungsmarker – CD8 ⁺ T-Zellen.....	47
Abb. 19: Doppelt positive Aktivierungsmarker – CD4 ⁺ T-Zellen.	49
Abb. 20: Doppelt positive Aktivierungsmarker – CD8 ⁺ T-Zellen.	50
Abb. 21: Vergleich des Backgrounds der einfach positiven gegenüber den doppelt positiven Aktivierungsmarkern für die CD4 ⁺ T-Zellen.....	52
Abb. 22: Vergleich des Backgrounds der einfach positiven gegenüber den doppelt positiven Aktivierungsmarkern für die CD8 ⁺ T-Zellen.....	53
Abb. 23: Varianzkoeffizient (CV) – Schematische Darstellung der Auswertung.....	54

Abb. 24: CFSE-Einfluss auf CD137-, CD154-Induktion auf CD4 ⁺ T-Zellen	56
Abb. 25: CFSE-Einfluss auf CD137, Granzym B-Induktion auf CD8 ⁺ T-Zellen.....	57
Abb. 26: Mehrfach verwendete Spender im Etablierungsverlauf – CD137-Induktion auf CD4 ⁺ T-Zellen.	58
Abb. 27: Mehrfach verwendete Spender im Etablierungsverlauf – CD137 ⁺ Granzym B ⁺ auf CD4 ⁺ T-Zellen.....	59
Abb. 28: Vergleich der doppelt positiven Marker nach Induktionshöhe für CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	60
Abb. 29: T-Zell- <i>Memory-Subset</i> -Verteilung der gesunden Spender.....	61
Abb. 30: T-Zell- <i>Memory-Subsets</i> der CD4 ⁺ CD137 ⁺ CD154 ⁺	62
Abb. 31: T-Zell- <i>Memory-Subsets</i> der CD4 ⁺ CD137 ⁺ IL-2 ⁺	62
Abb. 32: T-Zell- <i>Memory-Subsets</i> der CD8 ⁺ CD137 ⁺ Granzym B ⁺	62
Abb. 33: T-Zell- <i>Memory-Subset</i> -Verteilung im Zeitverlauf.....	63
Abb. 34: Aktivierungsmarker-Induktion der Patienten und Spender im Vergleich.....	64
Abb. 35: FACS-Daten Patient 421 für CD137 ⁺ CD154 ⁺ und CD137 ⁺ IL-2 ⁺ der CD4 ⁺ T-Lymphozyten sowie für CD137 ⁺ GranzymB ⁺ der CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	69
Abb. 36: FACS-Daten Spender 42D für CD137 ⁺ CD154 ⁺ der CD4 ⁺ T-Lymphozyten.....	70
Abb. 37: FACS-Daten Spender 42D für CD137 ⁺ IL-2 ⁺ der CD4 ⁺ T-Lymphozyten.....	70
Abb. 38: FACS-Daten Spender 42D für CD137 ⁺ Granzym B ⁺ der CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	70
Abb. 39: Granzym-Kinetik aus Sheng <i>et al.</i> , 2009.....	73
Abb. 40: Zytokin-Kinetik aus Abdalla <i>et al.</i> , 2003.	75
Abb. 41: Zytokin-Induktion allein sowie in Kombination mit CD137 auf T-Zellen aus Litjens <i>et al.</i> , 2013.	78
Abb. 42: <i>Background</i> der Induktion allein sowie in Kombination mit CD137 aus Litjens <i>et al.</i> , 2013.....	82
Abb. 43: Verteilung der T-Gedächtnis- <i>Subsets</i> aus Voehringer <i>et al.</i> , 2002.....	85

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Organspezifische Stufeneinteilung der aGvHD nach Glucksberg <i>et al.</i> , 1974; revidiert von Przepiorka <i>et al.</i> , 1994.....	18
Tab. 2 Gradeinteilung der Schwere der aGvHD nach Glucksberg <i>et al.</i> , 1974; revidiert von Przepiorka <i>et al.</i> , 1994.....	19
Tab. 3 Verwendete Zellkulturlösungen und Antibiotika	26
Tab. 4 Verwendete Chemikalien.....	26
Tab. 5 Verwendete Puffer und Lösungen	27
Tab. 6 Verwendete Kits	27
Tab. 7 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	28
Tab. 8 Verwendete Geräte	29
Tab. 9 Verwendete FACS-Antikörper.....	30
Tab. 10 Verwendete Co-Stimulation.....	31
Tab. 11 Statistische Daten der eingeschlossenen Patienten.....	33
Tab. 12 Statistische Daten der eingeschlossenen Spender.....	33
Tab. 13 Schematische Darstellung Zellkulturansatz	37
Tab. 14 <i>Mastermix</i> 1 für die extrazelluläre Färbung.....	38
Tab. 15 <i>Mastermix</i> 2 für die intrazelluläre Färbung.....	39
Tab. 16 Schematische Darstellung Zellkulturansatz bei Messung von Patienten/Spender-Proben.....	40
Tab. 17: Varianzkoeffizient (CV) – Ergebnisse der Auswertung.....	55
Tab. 18 Klinischer Verlauf I – Komplikationen.....	66
Tab. 19 Klinischer Verlauf II – Konditionierung, GvHD-Prophylaxe, Engraftment und Chimärismus	67
Tab. 20 T-Zell- <i>Memory-Subset</i> -Verteilung der Spender.....	68
Tab. 21 T-Zell- <i>Memory-Subset</i> -Verteilung der Empfänger	69

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marco Nicolas Andreas, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Prädiktion der Graft-versus-Host-Erkrankung in pädiatrischen Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation*“ 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) 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.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, 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

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

keine

Curriculum Vitae

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

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Angelika Eggert für die freundliche Bereitstellung des Themas meiner Dissertation und für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe bedanken.

Meinen Betreuern, Dr. Lena Oevermann und Dr. Michael Schmück-Heneresse, gilt besonderer Dank. Sie waren stets und zu jeder Zeit für mich da und waren für mich durch ihren Einsatz, ihre Motivation, ihre zahlreichen Anregungen und ihre Kritik eine große Hilfe.

Der AG Volk und AG Eggert danke ich für die zur Verfügung gestellten Geräte und Materialien. Meinen Kollegen aus den Arbeitsgruppen danke ich für die Einweisung und Hilfe im Labor und für die vielen guten Gespräche. Insbesondere Inás, Karin, Eva, Lisa, Laura, Annika, Anke, Jacky und Leila waren mir eine große Unterstützung, sowohl fachlich als auch menschlich.

Mein Dank gilt natürlich meinen Freunden, die immer zur Stelle sind, wenn ich sie brauche und mich daran erinnern, was mir im Leben wichtig ist. Sie haben mich über so manches Labortief hinweggebracht, indem sie mich immer wieder ermutigt haben nicht aufzugeben.

Ganz besonderer Dank gilt auch Lea für ihre geduldigen und akribischen Korrekturen, ihren immerwährenden Zuspruch, ihre Zuversicht und ihr Vertrauen.

Meiner Familie möchte ich vor allem danken. Ohne sie wäre mein Studium und diese Arbeit niemals möglich gewesen.