

Aus der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

MAIT-Zellbiologie im Kontext von Lebertransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lion Gabriel Thiel

aus Friedberg (Bayern)

Datum der Promotion: 03.12.2021

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
2	ABSTRACTS	7
2.1	ABSTRACT (ENGLISCH)	7
2.2	ABSTRACT (DEUTSCH)	8
3	EINLEITUNG	9
3.1	MAIT ZELLEN.....	9
3.1.1	<i>MAIT Zell Differenzierung</i>	9
3.1.2	<i>MAIT Zell Phänotyp</i>	10
3.1.3	<i>MAIT Zell Aktivierung</i>	10
3.1.4	<i>Rolle von MAIT Zellen bei Lebererkrankungen</i>	11
3.2	LEBERTRANSPLANTATION	12
3.3	ABSTOßUNGSREAKTIONEN	12
3.4	IMMUNSUPPRESSION	13
3.4.1	<i>Prednisolon</i>	13
3.4.2	<i>Calcineurin Inhibitoren</i>	13
3.4.3	<i>Mycophenolat Mofetil und Mycophenolsäure</i>	14
3.5	WEANING UND OPERATIONALE TOLERANZ NACH LEBERTRANSPLANTATION	14
3.5.1	<i>Weaning von Immunsuppression nach Lebertransplantation</i>	14
3.5.2	<i>Operationale Toleranz</i>	14
3.6	MAIT ZELLEN UND IMMUNSUPPRESSIVA IM TRANSPLANTATIONSKONTEXT (FORSCHUNGSSTAND).....	15
4	FRAGESTELLUNG	17
5	MATERIAL UND METHODEN	18
5.1	IMMUNSUPPRESSIVA.....	18
5.2	ANTIGENE UND ZYTOKINE	18
5.3	ANTIKÖRPER.....	19
5.4	VERSUCHSAUFBAU UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE	21
5.4.1	<i>Durchflusszytometrie</i>	21
5.4.2	<i>Immunfluoreszenzfärbung</i>	22
5.4.3	<i>Zellisolation</i>	22
5.4.4	<i>Phänotypisierung</i>	23
5.4.5	<i>Funktionelle Assays</i>	23
5.5	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE.....	24
5.5.1	<i>Gating Strategie</i>	24

5.5.2 Auswertung	25
5.5.3 Statistische Analyse	25
5.6 PATIENTINNEN UND GESUNDE SPENDERINNEN	26
6 ERGEBNISSE	29
6.1 BEEINFLUSSUNG VON MAIT ZELL FUNKTIONEN GESUNDER SPENDERINNEN DURCH IMMUNSUPPRESSION ABHÄNGIG VOM AKTIVIERUNGSMECHANISMUS	29
6.2 DIVERGENTE T-ZELL FREQUENZEN UNTER IMMUNSUPPRESSION	29
6.3 MAIT ZELLEN IN LTX-PATIENTEN ZEIGEN UNTER IMMUNSUPPRESSION EINEN AKTIVierten, FUNKTIONELL ERSCHÖPFTEN PHÄNOTYP	31
6.4 FUNKTIONELLE MAIT ZELL BEEINTRÄCHTIGUNG NACH LEBERTRANSPLANTATION	32
6.5 VERMINDERTE MAIT ZELL POLYFUNKTIONALITÄT UNTER IMMUNSUPPRESSION	35
6.6 NORMALISIERUNGSTENDENZEN VON MAIT ZELL PHÄNOTYP UND FUNKTIONEN NACH WEANING	36
6.7 MAIT ZELL VERLUST UND AKTIVierter PHÄNOTYP NACH NIERENTRANSPLANTATION	37
7 DISKUSSION	38
7.1 MULTIFAKTORIELL BEDINGTER MAIT ZELL VERLUST	38
7.2 CHRONISCHE MAIT ZELL AKTIVIERUNG UND FUNKTIONELLE ERSCHÖPFUNG	40
7.3 UNTERSCHIEDLICHE BEEINTRÄCHTIGUNG VON MAIT ZELL FUNKTIONEN	41
7.4 KLINISCHE IMPLIKATIONEN BEEINTRÄCHTIGTER MAIT ZELL BIOLOGIE	42
7.5 POTENTIAL VON MAIT ZELLEN ALS BIOMARKER FÜR TOLERANZ	43
7.6 LIMITATIONEN DER STUDIE	43
8 LITERATURVERZEICHNIS	45
9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	50
10 AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION	51
11 AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST (ISI WEB OF KNOWLEDGESM)	52
12 DRUCKEXEMPLAR DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATION	53
13 LEBENS LAUF	72
14 PUBLIKATIONS LISTE	74
15 DANKSAGUNG	75

1 Abkürzungsverzeichnis

aCasp3	active Caspase 3, aktive Caspase 3
APC	Antigen presenting cells, antigenpräsentierende Zellen
BD	Becton, Dickinson and Company (BD Biosciences)
BL	Biolegend
CD	Cluster of differentiation, Unterscheidungsgruppen
CyA	Cyclosporin A
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CD152
D	day, Tag
Diff	Differenzierung
DN	Doppelt (CD4 und CD8) negativ
eBio	eBioscience
EF	Effektorfunktion
EM	Effector Memory, Effektor-Gedächtnis (T-Zellen)
f	female, weiblich
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
gMFI	Geometric mean, geometrisches Mittel
GREs	Glucocorticoid responsive elements
GrB	Granzyme B, Granzym B
GS	Gesunde SpenderInnen
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatocellular Carcinoma, Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin

IMPDH	Inosin-5'-Monophosphat Dehydrogenase
IS	Immunsuppression / Immunsuppressiva
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
m	male, männlich
MAIT-Zellen	Mucosal-associated invariant T-cells
MDR1	ATP-binding cassette-multi-drug efflux protein 1
MELD Score	Match model of end-stage liver disease score
MFI	Mean fluorescence intensity, durchschnittliche Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MHC	Major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolate mofetile, Mycophenolat Mofetil
MOI	Multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion
MPA	Mycophenolic acid, Mycophenolensäure
MR-1	MHC-related molecule 1
mTOR	Mechanistic target of Rapamycin
NF κ-B	Nuclear factor κ-B
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NTx	Nierentransplantation
OD	Optische Dichte

PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger / zbtb16
Pred	Prednisolon
ROR γ t	RAR-related orphan receptor γ
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
SOP	Standard Operating Procedures
SSC	Side scatter, Seitwärtsstreulicht
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
Tac	Tacrolimus
T-bet	T-box transcription factor TBX21
TCR	T-cell receptor, T-Zell Rezeptor
TL1A	TNF-like ligand 1A / Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI)
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tol	Operational tolerant nach Weaning
TR	Tissue Residency
TReg	Regulatorische T-Zelle
UNOS	United Network for Organ Sharing
y	years, Jahre

2 Abstracts

2.1 Abstract (englisch)

Within the last 30 years, one-year survival of liver transplanted individuals dramatically improved due to the introduction of novel immunosuppressive drugs. Nevertheless, long term survival following liver transplantation (LTx) has not changed appreciably. Mucosal associated invariant T (MAIT) cells particularly react to microbial vitamin B metabolites as well as to inflammatory stimulation. They represent up to 50% of liver T cells thus suggesting an important role in liver immunity. However, little is known about the impact of commonly used immunosuppressants (IS) after LTx on MAIT cells. Here, effector molecule production of MAIT cells was significantly impaired after *in vitro* stimulation of healthy donors derived peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) when preincubated with prednisolone (Pred). Antigen-specific *in vitro* stimulation of MAIT cells with lysed *Escherichia coli* was additionally impaired after preincubation with calcineurin inhibitors. *Ex vivo* flow cytometric analysis of peripheral MAIT cells in patients after LTx showed significantly decreased MAIT cell frequencies independently of IS type and dosage. These did not recover after weaning of IS and were similarly decreased in operationally tolerant (tol) and kidney transplanted individuals. MAIT cells of liver transplanted donors additionally showed an activated, PD-1 positive phenotype. Furthermore, impairment of MAIT cell effector functions and polyfunctionality in liver transplanted patients was independent of IS regimen and dosage. Nevertheless, normalization tendencies of MAIT cell phenotype and functionality after weaning and in tolerant patients were observed. In summary, this study demonstrates a functional and phenotypic impairment of MAIT cells by IS and LTx, which was not completely reversible after discontinuation of IS. Altogether, the results shown here indicate a loss of MAIT cells probably caused by primary disease even before LTx. They also provide further explanations for increased infection frequency under IS after LTx. More studies will be needed to evaluate an impaired MAIT cell recovery due to dysbiosis as well as to confirm the potential of MAIT cells as potential indicators for development of operational tolerance.

2.2 Abstract (deutsch)

Das 1-Jahres-Überleben von lebertransplantierten PatientInnen hat sich in den letzten 30 Jahren aufgrund der Einführung neuer Immunsuppressiva (IS) deutlich verbessert. Es besteht jedoch weiterhin eine gleichbleibend hohe Langzeitmortalität, welche insbesondere durch Nebenwirkungen der Immunsuppression bedingt ist. Mucosal associated invariant T (MAIT) Zellen erkennen mikrobielle Vitamin-B-Metabolite und reagieren auf inflammatorische Stimuli. Ihr Anteil an intrahepatischen T-Zellen beträgt bis zu 50%, sodass von einer wichtigen Rolle in der (Leber-)Immunität ausgegangen wird. Über den Einfluss nach Lebertransplantation (LTx) verwendeter IS auf MAIT Zellen ist bisher wenig bekannt. In dieser Arbeit zeigte sich nach *in vitro* Stimulation von peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) gesunder SpenderInnen durch einen Zytokinstimulus eine signifikant reduzierte Frequenz Effektormoleküle produzierender MAIT Zellen nach Vorinkubation mit Prednisolon (Pred). Bei antigenspezifischer Stimulation mit lysierten *Escherichia coli* war die MAIT Zell-Antwort nach Vorinkubation mit Pred sowie Calcineurininhibitoren beeinträchtigt. In durchflusszytometrischen *ex vivo* Analysen von MAIT Zellen lebertransplantierten PatientInnen zeigte sich eine deutliche Reduktion der MAIT Zell-Frequenz unabhängig von Art und Stärke der IS, welche auch nach Weaning der IS, bei „operational“ toleranten (tol) PatientInnen und in PatientInnen nach Nierentransplantation (NTx) bestand. *Ex vivo* konnte weiterhin ein aktivierter und PD-1-positiver MAIT Zell Phänotyp bei lebertransplantierten PatientInnen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich *ex vivo* eine von IS Regime und Stärke unabhängige Beeinträchtigung von MAIT Zell Effektorfunktionen und Polyfunktionalität lebertransplantierten PatientInnen. Bei tol PatientInnen und nach Weaning der IS waren eine weitestgehende Normalisierung des Phänotyps sowie eine leicht verbesserte Funktionalität nach Stimulation auffällig. Zusammenfassend betrachtet konnte in dieser Arbeit eine funktionelle und phänotypische Beeinträchtigung von MAIT Zellen durch IS und LTx gezeigt werden, welche nach Absetzen der IS nicht vollständig reversibel war. Insgesamt deuten die hier gezeigten Ergebnisse auf einen grunderkrankungsbedingten MAIT Zell Verlust bereits vor LTx hin und bieten einen weiteren Erklärungsansatz für gehäufte Infektionen unter IS nach LTx. Eine möglicherweise verminderte Rekonstitution der MAIT Zell Populationen nach LTx im Rahmen von Dysbiose sowie die Eignung von MAIT Zellen als Biomarker für Toleranzentwicklung sollte in weiteren Studien objektiviert werden.

3 Einleitung

3.1 MAIT Zellen

Eine Immunantwort kann allgemein in eine angeborene und erworbene (adaptive) Immunreaktion eingeteilt werden. Eine schnelle, aber unspezifische initiale Abwehrreaktion erfolgt insbesondere durch das angeborene Immunsystem. Diesem werden beispielsweise Makrophagen, Natürliche Killer (NK) Zellen, Granulozyten oder das Komplementsystem zugeordnet. Nach Kontakt mit einem, die Immunreaktion auslösenden, Antigen, tritt im Verlauf zusätzlich eine verzögerte, antigenspezifische Abwehr durch das adaptive Immunsystem ein. Vereinfacht wird eine antikörpervermittelte, humorale Antwort durch B-Lymphozyten von einer zellulären, T-Zell-vermittelten Reaktion unterschieden (zusammengefasst in (1)). Nicht jede Immunzelle kann eindeutig einem der oben genannten Konzepte zugeordnet werden. Die erstmals im Jahr 1993 von Porcelli et al. beschriebenen mucosal-associated invariant T (MAIT) Zellen sind T-Lymphozyten mit Eigenschaften von Zellen des angeborenen Immunsystems (2). Der Anteil von MAIT Zellen beträgt zwischen 1 und 10% der CD3⁺ T-Zellen im peripheren Blut. Ein signifikanter Anteil der T-Zellen in mukosalen Grenzflächen wie dem Darm (insbesondere im Jejunum) und bis zu 50% aller intrahepatischen T-Zellen, sind ebenfalls MAIT Zellen. Darüber hinaus wurden MAIT Zellen auch in der Lunge, dem Pankreas oder dem Endometrium nachgewiesen (zusammengefasst in (3)).

3.1.1 MAIT Zell Differenzierung

Analog zu konventionellen T-Lymphozyten entwickeln MAIT Zellen im Thymus zunächst über Rekombination entsprechender Gene einen spezifischen T-Zell Rezeptor (TCR) mit semi-invarianter α - und limitierter β -Kette. Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen erfolgt die positive Selektion jedoch nicht über polymorphe major histocompatibility complex (MHC) 1 oder 2 Moleküle, sondern durch das spezialisierte, monomorphe MHC1-ähnliche Molekül (MHC-related protein 1) MR1 (4). MR1 präsentiert Vitamin B Metabolite des Riboflavinbiosynthese Reaktionsweges, welche von diversen Bakterien und Pilzen produziert werden (5). Sowohl der MAIT TCR, als auch MR1 sind in Säugetieren hoch konserviert, sodass von einem hohen Selektionsdruck ausgegangen wird (6). MAIT Zellen verlassen den Thymus als naive (CCR7⁺CD45RA⁺) Zellen. Die weitere Expansion und Reifung sowie der Erwerb eines Effector-Memory (EM, CCR7⁻CD45RA⁻) Phänotyps erfolgt in peripheren Geweben, hauptsächlich über Interaktionen mit B-Zellen und Kommensalen der Darmflora (7).

3.1.2 MAIT Zell Phänotyp

MAIT Zellen exprimieren einen semi-invarianten TCR mit der invarianten Alpha-Kette $V\alpha 7.2$ - $J\alpha 33$ sowie einer varianten Beta-Kette mit begrenztem Repertoire (8). Weitere zur Identifikation genutzte Surrogatmerkmale sind eine hohe Expression der Oberflächenmoleküle CD161, einem C-type lectin (9), sowie die alpha-Kette des Interleukin 18 Rezeptors (IL18R α ; auch: CD218) (10). MAIT-Zellen im Blut haben überwiegend einen CD4⁻CD8⁻ (doppelt negativen, DN) oder CD8 α ⁺ Phänotyp, wobei auch geringe Frequenzen von CD4⁺ und CD4⁺CD8⁺ MAIT Zellen nachgewiesen wurden (zusammengefasst in (11)). Periphere MAIT Zellen haben vorrangig einen CCR7⁻CD45RA⁻ Effector Memory Phänotyp (12). Außerdem befinden sich MAIT Zellen aus Blutproben in einem nicht-proliferativen G0 Stadium mit geringer Expression des Zellteilungsmarkers Ki67 (9). Interessanterweise exprimieren MAIT Zellen im Vergleich zu anderen CD8⁺ T-Zellen in hohem Maße ATP-binding cassette-multi-drug efflux protein 1 (MDR1 beziehungsweise P-Glycoprotein), eine Efflux-Pumpe, welche mit Resistenzen gegenüber verschiedenen Substanzen assoziiert ist (13).

3.1.3 MAIT Zell Aktivierung

MAIT Zellen können über eine antigenvermittelte TCR-Stimulation (5) oder alternativ TCR-unabhängig über Zytokine (14) aktiviert werden. Eine zytokinvermittelte MAIT Zell Stimulation kann auch durch Antigen präsentierende Zellen (APCs) oder bakteriell (15) beziehungsweise viral (16) infizierte Zellen erfolgen. Humane MAIT Zellen weisen ein gemischtes Th1-Th17-Transkriptionsfaktorprofil auf. Sie exprimieren neben Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF), Nuclear factor κ -B (NF- κ B) (17) oder Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (18) überwiegend den mit Interferon γ (IFN γ) Produktion assoziierten T-box transcription factor TBX21 (T-bet) sowie den mit IL17A Produktion assoziierten RAR-related orphan receptor γ (ROR γ t) (zusammengefasst in (19)). Grundsätzlich können MAIT Zellen nach Aktivierung verschiedene Effektormoleküle, darunter Tumornekrosefaktor α (TNF α), IFN γ , Granzyme B (GrB), IL2 und IL17, produzieren (11). Nach aktuellem Wissensstand scheinen TCR-unabhängige Stimulationswege jedoch langsamer zu sein und eine weniger vielfältige Expression von Effektormolekülen zu induzieren (20). Außerdem sind synergistische Effekte bei gleichzeitiger TCR-abhängiger und -unabhängiger Stimulation bekannt (21).

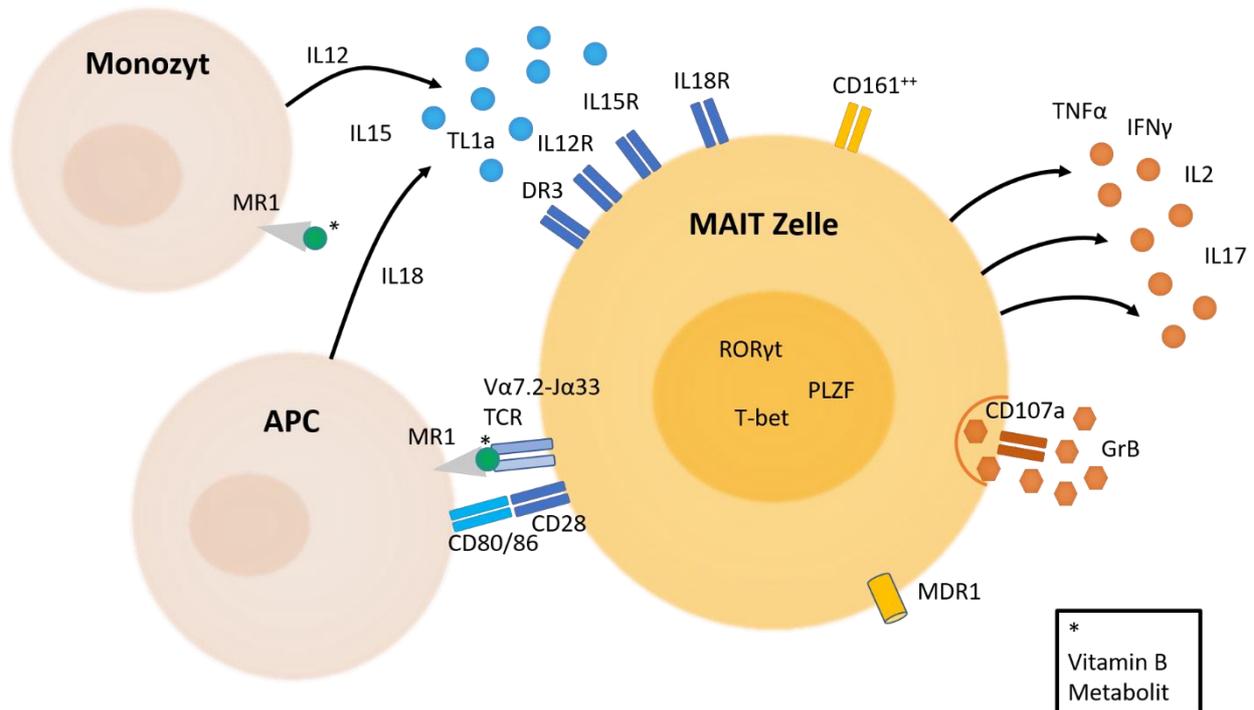


Abbildung 1. Schematische Darstellung relevanter (Effektor-)Moleküle der MAIT Zelle.

Die MAIT Zelle wird über eine starke Expression von CD161 und ihren spezifischen T-Zell Rezeptor Va7.2 identifiziert. Ein weiteres Merkmal ist die Expression der Effluxpumpe MDR1. MAIT Zellen können antigenspezifisch über den MR1-Rezeptor und oder inflammatorisch durch Zytokine stimuliert werden. Über verschiedene Signalwege (Th1 / Th17 Transkriptionsprofil) exprimierte Effektormoleküle beinhalten TNF α , IFN γ , GrB und IL2. Nach antigenspezifischer Stimulation sind zusätzlich IL17 sowie der vesikelständige Degranulationsmarker CD107a nachweisbar. Nach: Kurioka et al.(3).

3.1.4 Rolle von MAIT Zellen bei Lebererkrankungen

Obwohl über die Funktion von MAIT Zellen für den Organismus noch wenig bekannt ist, wird davon ausgegangen, dass sie unter anderem eine wichtige Rolle in der Darm-Leber Achse des Immunsystems einnehmen (zusammengefasst in (3)). Als Teil dessen verhindern sie die Translokation vom Darm über die Vena porta transportierter mikrobieller Metaboliten und bakterieller Bestandteile in den Systemkreislauf. Ferner konnten MAIT Zellen mit zahlreichen infektiösen, autoinflammatorischen und malignen Erkrankungen assoziiert werden (zusammengefasst in (11)). Insbesondere für verschiedene, auch im Kontext einer Lebertransplantation relevante (22), bakterielle Erreger wie beispielsweise Coli, Salmonellen oder Mykobakterien, aber auch Fungi (beispielsweise Aspergillus, Candida) (23, 24) sind Interaktionen mit MAIT Zellen bekannt. Darüber hinaus berichten mehrere Autoren von einer veränderten MAIT Zell Biologie bei autoimmuner Hepatitis, primär biliärer Zirrhose, primär sklerosierender Cholangitis, alkoholinduzierter Leberzirrhose, nicht-alkoholischer Fettleber und chronischen Hepatitiden (zusammengefasst in (3)), Hepatitis-B (HBV) beziehungsweise -C Virus (HCV) Infektionen (zusammengefasst in (25)) sowie bei hepatozellulärem Karzinom (HCC) und

Lebermetastasen (zusammengefasst in (26)). Eine Studie von Hegde et al. erbrachte außerdem Hinweise darauf, dass MAIT Zellen profibrotische und proinflammatorische Veränderungen bei chronischen Lebererkrankungen fördern (27).

3.2 Lebertransplantation

Eine Lebertransplantation (LTx) ist als *ultima ratio* bei schweren Lebererkrankungen eine potenziell lebensrettende Therapie. Die Organallokation erfolgt in Abhängigkeit des match model of end-stage liver disease (MELD) Scores. Zu den häufigsten Indikationen in Europa gehören chronische virale Hepatitiden, insbesondere HCV, alkoholinduzierte Leberzirrhose sowie das HCC (28). Die kurzfristigen Outcomes (1-Jahres-Überleben) von Lebertransplantationen haben sich in den letzten 30 Jahren aufgrund der Einführung neuer immunsuppressiver Medikamente deutlich verbessert. Im Gegensatz dazu ist einer retrospektiven Analyse der United Network for Organ Sharing (UNOS) Datenbank zufolge das Langzeitüberleben von lebertransplantierten PatientInnen nicht signifikant verändert. Ein Hauptgrund für die gleichbleibend hohe Langzeitmortalität sind die gemeinsamen Langzeitnebenwirkungen verwendeter Immunsuppressiva (IS): vor allem ein erhöhtes Risiko für Infektionen und maligne Erkrankungen (29). Entsprechend betonen Rana et al. den Bedarf nach einer optimierten Langzeitimmunsuppression (29), welche direkt oder indirekt für bis zu 68,9% der Mortalität nach LTx ursächlich ist (30).

3.3 Abstoßungsreaktionen

Ziel einer IS Therapie ist das Verhindern von Transplantatabstoßungsreaktionen. Hyperakute, durch bereits existierende zirkulierende Antikörper vermittelte Abstoßungen innerhalb von Stunden sind nicht zuletzt aufgrund der Verwendung blutgruppenkompatibler Transplantate selten. Akute zellulär (T-Zell Aktivierung über Präsentation alloreaktiver Moleküle durch APC) oder humoral (Alloantikörperproduktion von B-Zellen, insbesondere gegen MHC Klasse I Moleküle) vermittelte Abstoßungsreaktionen innerhalb von Monaten können in einem Großteil der Fälle mit gängigen IS adäquat behandelt werden. Im Gegensatz dazu kann eine chronische Abstoßung über Jahre durch aktuelle IS Therapien wenig beeinflusst werden. Hier resultieren antigenspezifische zelluläre und humorale Immunreaktionen in einer chronischen Entzündung mit konsekutiver Endothelaktivierung und Ausschüttung von Entzündungsmediatoren sowie freien Radikalen. Diese führen langfristig zu einer Gefäßschädigung mit Intimaproliferation, welche eine zunehmende Gewebischämie bis hin zu einem Transplantatverlust bewirkt (zusammengefasst in (31)).

3.4 Immunsuppression

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte IS bei LTx umfassen Prednisolon (Pred), Cyclosporin A (CyA), Tacrolimus (Tac) und Mycophenolat Mofetil (MMF). Dabei handelt es sich um die am häufigsten zur Immunsuppression eingesetzten Substanzen, wobei neuere Therapieansätze wie mammalian target of Rapamycin (mTOR)-Inhibitoren zunehmend an Bedeutung gewinnen (zusammengefasst in (32)). Viele IS sind ebenfalls Substrate des von MAIT Zellen exprimierten MDR1 (zusammengefasst in (33)).

3.4.1 Prednisolon

Pred ist ein synthetisches Glucocorticoid und aktiver Metabolit von Prednison. Der Wirkstoff supprimiert das Immunsystem über verschiedene Wege, welche bis heute nicht vollständig verstanden sind. Insgesamt beeinflusst Pred die Aktivierung, Proliferation und Verteilung von Lymphozyten. Bekannte Wirkmechanismen sind unter anderem eine Hemmung der Zytokin-Genexpression über Bindung an verschiedene DNA Loci in Form von glucocorticoid responsive elements (GREs) sowie eine Hemmung der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern. So werden beispielsweise die Produktion von IL1, 2 und 6, aber auch von IFN γ oder TNF α gehemmt (zusammengefasst in (34)). Glucocorticoide werden insbesondere in der frühen postoperativen Phase und seltener auch im Rahmen einer Erhaltungstherapie eingesetzt. Eine Langzeittherapie kann unter anderem zur Entwicklung eines Katarakts, eines Metabolischen Syndroms, einer Osteoporose oder emotionaler Instabilität führen (zusammengefasst in (35)).

3.4.2 Calcineurin Inhibitoren

Die Hauptsubstanzen der gegenwärtigen immunsuppressiven Therapie nach LTx sind die Calcineurin Inhibitoren Tac und das seltener eingesetzte CyA. Nach Komplexbildung mit dem FK-binding protein 12 (Tac) respektive Cyclophilin (CyA) binden und hemmen die Medikamente die Calcium- und Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin. Calcineurin ermöglicht die Transkription von multiplen inflammatorisch und aktivierend wirkenden Zytokinen wie beispielsweise IL2, welches die Proliferation (alloreaktiver) T-Zellen fördert, und ist somit eine wichtige Komponente der Immunantwort beziehungsweise der Transplantatabstoßung. Beide Medikamente haben ähnliche Nebenwirkungsprofile. Wichtige unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind Nephrotoxizität, metabolische Nebenwirkungen und arterielle Hypertonie (zusammengefasst in (35)).

3.4.3 Mycophenolat Mofetil und Mycophenolsäure

MMF sowie dessen Metabolit Mycophenolsäure (MPA) sind Antimetabolite und verhindern die *de novo* Purin-Nukleotidsynthese über Bindung der Inosin-5'-Monophosphat Dehydrogenase (IMPDH). Dies hemmt die DNA Replikation und damit auch die Proliferation von B- und T-Lymphozyten. Weitere Hauptnebenwirkungen sind insbesondere gastrointestinale Symptome sowie Leuko-, Erythro- und Thrombopenien (zusammengefasst in (35)).

3.5 Weaning und operationale Toleranz nach Lebertransplantation

3.5.1 Weaning von Immunsuppression nach Lebertransplantation

Aufgrund der Nebenwirkungen immunsuppressiver Medikation werden verschiedene Strategien zur Reduktion und zum vollständigen Absetzen (Weaning) von IS entwickelt. Auf Basis bisheriger Studien ist davon auszugehen, dass ein Weaning nach LTx in ungefähr 20 – 30 % (Spanne: 6 – 63 %) der Fälle erfolgreich verläuft (zusammengefasst in (36)). Aufgrund des Risikos einer Abstoßungsreaktion nach Reduktion der IS, welche mit teils lebensbedrohlichen Nebenwirkungen einhergeht, erhält jedoch ein Großteil der PatientInnen eine lebenslange IS. Die Entwicklung von Strategien zur Identifikation potenziell toleranter PatientInnen ist deshalb ein wichtiger Forschungsbereich. Gegenwärtig sind jedoch noch keine zuverlässigen Biomarker zur Identifikation dieses Patientenkollektives bekannt. Am vielversprechendsten scheinen derzeit Analysen von Genexpressionsprofilen zur Eisenhomöostase aus bioptisch entnommenem Lebergewebe (zusammengefasst in (36)). Durch weniger invasive Verfahren (beispielsweise Blutuntersuchungen) gewonnene Biomarker zur prospektiven Detektion immunologisch toleranter PatientInnen nach LTx konnten bislang nicht identifiziert werden.

3.5.2 Operationale Toleranz

Ziel von Weaning- oder Toleranzinduktionsmaßnahmen ist das Erreichen von Toleranz gegenüber dem Transplantat. Diese kann unterschiedlich definiert werden. In klinischen Kontexten ist die Surrogatdefinition operationaler Toleranz gebräuchlich. Operationale Toleranz bezeichnet den Zustand einer fehlenden Transplantatabstoßungsreaktion bei immunkompetenten, IS-freien PatientInnen (zusammengefasst in (31)). Goldstandard zum Monitoring von Toleranz ist die histologische Untersuchung von Lebergewebe via Leberbiopsie. Aufgrund der Invasivität des Eingriffs erfolgt ein Routinemonitoring Lebertransplantierter außerhalb von Akutsituationen meist über klinische Untersuchung sowie laborchemisches Monitoring von Leberenzymen. Insbesondere bei chronischen Abstoßungsreaktionen können diese Leberenzyme im Normbereich

oder nur gering erhöht sein. Entsprechend gelten beide Methoden als wenig sensitiv und spezifisch, aber ausreichend für die Feststellung operationaler Toleranz (zusammengefasst in (37)). Aus immunologischer Perspektive kann Toleranz außerdem in eine zentrale und periphere Komponente unterteilt werden, wobei insbesondere letztere im Transplantationskontext relevant ist. Mechanismen peripherer Toleranz beinhalten die sogenannte Anergie, eine funktionelle Inaktivierung durch ausbleibende Kostimulation bei TCR-Stimulation, und die Apoptose, ein, beispielsweise durch Überstimulation, induzierter programmierter Zelltod. Außerdem kontrollieren verschiedene regulatorische Immunzellen, insbesondere $CD4^+CD25^{\text{high}}$ FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs) die Immunantwort. Sie supprimieren die Immunzellaktivität über direkten Kontakt durch cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) und lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) Moleküle, Induktion von Apoptose, Zytokinsekretion oder eine metabolische Beeinträchtigung der Zielzelle (zusammengefasst in (31)). Insgesamt gilt das Erreichen von Toleranz als naheliegendste Lösung zur Verbesserung der Langzeitmorbidity und -mortality von Lebertransplantierten (38). Einerseits würden die mit der IS einhergehenden gravierenden Nebenwirkungen vermieden werden, andererseits wäre das langfristige Organüberleben durch eine ausbleibende chronische Abstoßungsreaktion verbessert.

3.6 MAIT Zellen und Immunsuppressiva im Transplantationskontext (Forschungsstand)

Aufgrund hoher MAIT-Zell Frequenzen sowohl im peripheren Blut als auch in der Leber sowie deren hochkonservierten TCR wird angenommen, dass diese eine wichtige Funktion im menschlichen Immunsystem beziehungsweise in der Leber erfüllen. Dafür spricht auch, dass eine Reaktivität von MAIT Zellen auf viele Erreger (23, 24), welche zu Infektionen nach Lebertransplantation führen (22), gezeigt ist. Außerdem wird von einer Beteiligung von MAIT Zellen bei autoimmunen Lebererkrankungen ausgegangen (siehe 3.1.4), sodass auch eine pro- oder antiinflammatorische Beteiligung der Zellen im Rahmen einer Abstoßungsreaktion nach Transplantation denkbar wäre. Zum Verfassungszeitpunkt der vorliegenden Arbeit waren nur wenige Daten zu den Auswirkungen einer LTx und/oder von IS und deren Weaning auf die Biologie von MAIT Zellen publiziert. Eine Pharmakoresistenz von MAIT-Zellen aufgrund ihrer hohen MDR1 Expression wurde bisher hauptsächlich für verschiedene Chemotherapeutika gezeigt (39). Im Gegensatz dazu konnten mehrere Studien Effekte von IS auf MAIT Zellen nachweisen. Fergusson et al. beobachteten nach *in vitro* Inkubation mit MPA oder Tac eine beeinträchtigte MAIT Zell Proliferation sowie eine verminderte GrB Expression von MAIT Zellen nach Inkubation mit Pred (13). Darüber hinaus konnten Hinks et al. einen Effekt inhalativer

Glucocorticoide auf MAIT Zell Frequenzen und IFN γ Produktion bei elf COPD PatientInnen nachweisen (40). Insgesamt bleibt die Datenlage zum Einfluss verschiedener IS auf MAIT Zellen jedoch begrenzt.

4 Fragestellung

Die in der Leber zahlreich vorhandenen MAIT Zellen sind eine relevante, bisher unzureichend erforschte T-Zell Population. Es gibt Hinweise auf eine protektive Rolle bei bakteriellen (41), viralen (42) und Pilz-Infektionen (43). Gleichzeitig haben MAIT Zellen auch proinflammatorische und -fibrotische Eigenschaften (27). Die genannten Charakteristika sind von besonderer Relevanz im Kontext einer LTx sowie der damit verbundenen IS. Ein Hauptproblem ist hier das zuletzt wenig verbesserte Langzeitüberleben lebertransplantierte PatientInnen (29). Wichtige Ursachen dafür sind unter anderem eine erhöhte Infektanfälligkeit unter IS (30) sowie eine chronische Abstoßungsreaktion des Transplantats mit zunehmender Fibrosierung der Leber (44). Bei wenigen PatientInnen ist jedoch ein Absetzen der IS unter Ausbleiben einer Rejektion möglich, was das (Transplantat-) Überleben verbessert (zusammengefasst in (45)). Angesichts ihrer großen Anzahl in der Leber, sowohl protektiven als auch profibrotischen Eigenschaften ist eine Beteiligung von MAIT Zellen an den oben genannten Prozessen wahrscheinlich. Zum Einfluss von LTx, IS und deren Weaning auf MAIT Zellen existieren jedoch nur wenige Daten. Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist, funktionelle und phänotypische Veränderungen von MAIT Zellen im Kontext einer LTx sowie der damit einhergehenden IS zu untersuchen. Beide Faktoren werden dabei differenziell anhand einer vergleichenden Analyse peripherer MAIT Zellen gesunder SpenderInnen (GS), immunsupprimierter und operational toleranter lebertransplantierte PatientInnen ohne IS (tol) sowie nierentransplantierte PatientInnen analysiert. Dabei ergeben sich folgende Fragestellungen.

- 1.) Beeinflussen die derzeit in der klinischen Routine nach LTx verwendeten Immunsuppressiva wie beispielsweise Glucocorticoide, Calcineurininhibitoren oder Antimetabolite grundsätzlich die MAIT Zell Funktionalität?
- 2.) Welche funktionellen und phänotypischen Veränderungen sind in MAIT Zellen im peripheren Blut lebertransplantierte PatientInnen nachweisbar? Existieren dosis- oder substanzabhängige Unterschiede?
- 3.) Werden MAIT Zellen bereits durch die LTx selbst beeinflusst oder sind potentielle Beeinträchtigungen der MAIT Zell Funktionalität sowie phänotypische Veränderungen ausschließlich auf die immunsuppressive Therapie zurückzuführen?
- 4.) Inwieweit sind phänotypische und funktionelle Veränderungen der peripheren MAIT Zellen nach LTx und IS durch Weaning der IS reversibel?
- 5.) Welche phänotypischen Eigenschaften und funktionelle Einschränkungen zeigen periphere MAIT Zellen operational toleranter lebertransplantierte PatientInnen?

5 Material und Methoden

5.1 Immunsuppressiva

Die Auswahl der untersuchten IS für die in vitro Experimente erfolgte nach ihrer klinischen Relevanz, welche über eine Literaturrecherche in der Datenbank PubMed sowie in Rücksprache mit behandelnden Ärzten des Transplantationszentrums der Charité eingeschätzt wurde. Zur Konzentrationsbestimmung der IS erfolgte eine Auswertung der entsprechenden Standard Operating Procedures (SOPs) des Charité Transplantationszentrums, internationalen Empfehlungen (35, 46) sowie strukturell ähnlicher Experimente (47). Zur Gewährleistung möglichst standardisierter Untersuchungsbedingungen wurden die jeweiligen Wirkstoffe aliquotiert und bei -20°C (CyA, MPA, Pred) respektive 4°C (Tac) gelagert. Hierfür wurden nach entsprechender Verdünnung mit Ethanol Aliquots von Tacrolimus (Prograf®, Astellas Pharma, Tokyo, Japan) in einer Konzentration von 10 µg/ml, Cyclosporin A (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) in einer Konzentration von 120 µg/ml und Mycophenolsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, Minnesota, USA) in einer Konzentration von 2,7 mg/ml hergestellt. Prednisolon (Prednisolut®, Mibe, Sandersdorf-Brehna, Deutschland) wurde in phosphate-buffered saline (PBS) gelöst und in einer Konzentration von 570 µg/ml aliquotiert. Die Inkubation von PBMCs mit den jeweiligen Substanzen erfolgte dann in den Endkonzentrationen 10 ng/ml für Tac, 120 ng/ml für CyA, 2,7 µg / ml für MPA und 0,57 µg / ml für Pred. Dies entsprach IS Dosierungen, wie sie unmittelbar nach einer Lebertransplantation angestrebt werden. Zur Versuchsoptimierung wurden außerdem antigen- sowie zytokinvermittelte Stimulationen (siehe 4.5) von PBMCs gesunder SpenderInnen (n=6) mit jeweils der 0,1-fachen, 10-fachen sowie der festgelegten IS Konzentration, beziehungsweise mit Präinkubationszeiten verschiedener Länge durchgeführt.

5.2 Antigene und Zytokine

Für die funktionalen Assays wurden peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) bei 37°C und einem Luft-CO²-Gehalt von 5% in jeweils 300 µl RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) stimuliert. Letzteres war mit 0,3 mg / ml Glutamin, 100 U / ml Penicillin und 0,1 mg / ml Streptomycin sowie 10 % menschlichem AB Serum (jeweils Biochrom) versetzt. Als inflammatorischer Stimulus wurde eine Kombination der Zytokine IL12, IL15 (jeweils Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), IL18 und TNF-like ligand 1A (TL1A) (je R&D, Minneapolis, Minnesota, USA) gewählt, wobei Titrationen mit 1%, 10% und 100% der ebenfalls in einer Arbeit von Sattler et al. (14) verwendeten Zytokinkonzentrationen bei gleichzeitiger

Inkubation mit den festgelegten IS Konzentrationen durchgeführt wurden. Die finalen Zytokinkonzentrationen betragen je 5 ng / ml für IL12, IL15 und IL18 sowie 10 ng / ml für TL1A. Für die antigenvermittelte Stimulation wurden lysierte *E. coli* Bakterien (Laborstamm DH5 α) als Modellantigen sowie anti-CD28 Antikörper in der Konzentration von 1 μ g / ml (Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA) als Ko-Stimulus verwendet. Die Bakterien wurden aus einer laboreigenen Kultur gezüchtet und in 1%iger Formalinlösung für 5 Minuten fixiert. Zur Minimierung von Formalinrückständen erfolgten anschließend mehrere Waschschrte. Die Anzahl der Bakterien wurde mit einem NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) spektralphotometrisch über den Optischen Dichtewert (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Aliquots wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch mit RPMI Medium auf eine Konzentration von 10⁶ Bakterien / 10 μ l verdünnt. Für die DH5 α Antigenstimulation erfolgten Titrations mit einer Multiplizität der Infektion von 10, 30 und 100 zur optimierten Darstellung der Stimulations- und Immunsuppressionseffekte. Diese war bei einer MOI von 30 gegeben. Die Spezifität der bakteriellen Stimulation wurde über Hinzugabe von anti-MR1 Antikörpern in einer Konzentration von 10 μ g/ml (Biolegend) beziehungsweise einer Isotypkontrolle vor bakterieller Stimulation bestätigt.

5.3 Antikörper

Die durchflusszytometrischen Multiparameter-Messungen beinhalteten Kombinationen der in Tabelle 1 gelisteten Markersets zur Analyse relevanter Lymphozytenpopulationen, deren Phänotyp sowie ihres funktionellen Repertoires nach Stimulation. Für die Auswahl geeigneter Marker erfolgte zunächst eine Literaturrecherche über die Datenbank PubMed hinsichtlich der von MAIT Zellen exprimierten Moleküle. Anschließend wurden geeignete Markersets zusammengestellt. Die Arbeitskonzentrationen der verwendeten Antikörper wurden durch Titrations ermittelt, wobei die jeweils niedrigste Konzentration zum Einsatz kam, bei der zwei klar trennbare Populationen unterschieden werden konnten.

Tabelle 1: Liste verwendeter Antikörper zur Oberflächenfärbung

Marker	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Konzentration	Eigenschaft
CD3	PerCP / Cy5.5	BL	SK7	1:100	T-Zellen
CD4	BUV395	BD	SK3	1:50	T-Helfer
CD8	APC eFluor 780	eBio	SK1	1:100	T-Zytotoxisch
CD14	BV510	BL	M5E2	1:100	Monozyten
CD19	BV510	BL	H1B19	1:100	B-Zellen
Life / Death	Aqua (BV510)	BL		1:800	Tote Zellen
CD161	PE / Dazzle 594	BL	HP-3G10	1:30	MAIT
	BV421		HP-3G10	1:30	
IL18R	PE / Dazzle 594	BL	H44	1:100	MAIT
TCR Vα 7.2	APC	BL	3C10	1:100	MAIT
CD56	BV785	BL	5.1.H11	1:200	NK
	Alexa 700	BL	HCD56	1:100	
CD69	Alexa 700	BL	FN50	1:100	Aktivierung
CD103	PE	BL	Ber-ACT8	1:200	TR
KLRG1	FITC	BL	SA231A2	1:200	TR
NKG2D	BV421	BL	1D11	1:30	NK
CD45RA	PE / Cy7	BL	HI100	1:800	Diff
CCR7	BV711	BD	3D12	1:50	Diff
CD8β	PE / Cy7	eBio	SIDI8BEE	1:200	Diff
CD27	PE	BL	M-T271	1:200	Diff
CXCR3	BV785	BL	G025H7	1:200	Diff
HLA-DR	FITC	BL	L243	1:100	Aktivierung
CD38	BV605	BL	HIT2	1:200	Aktivierung
PD1	BV711	BD	EH12.1	1:200	Anergie
CD107a	FITC	BL	H4A3	1:400	Degranulation
CD25	PE / Cy7	BL	BC96	1:100	TReg

Tabelle 2: Liste verwendeter Antikörper zur intrazellulären Färbung

Marker	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Konzentration	Eigenschaft
FoxP3	Alexa647	BL	150D	1:50	TReg
CTLA4	BV421	BL	BNI3	1:50	TReg
Ki67	Alexa700	BD	B56	1:100	Proliferation
aCasp3	BV650	BD	C92-605	1:300	Apoptose
TNFa	PE	BL	MAb11	1:800	EF
IL2	BV605	BL	MG1-17H12	1:200	EF
IL17	BV785	BL	BL168	1:200	EF
TNFa	PE	BL	MAb11	1:800	EF
IFNg	eFluor 450	eBio	4S.B3	1:100	EF
GrB	Alexa 700	BD	GB11	1:100	EF

Tabellen 1 und 2: Zusammenfassung der zur Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Antikörper.

Die Antikörper wurden in verschiedenen Panels kombiniert. Abkürzungen: BL: Biologend; BD: Beckton Dickinson; eBio: eBioscience. TR: Tissue Residency; Diff: Differenzierung; EF: Effektorfunktion.

5.4 Versuchsaufbau und Durchflusszytometrie

5.4.1 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie können sowohl physikalische Eigenschaften als auch Oberflächenantigene und intrazelluläre Moleküle von Zellen gemessen werden. Die Zellen passieren dazu in einer Flüssigkeit, meist PBS, einzeln durch einen Hüllstrom hydrodynamisch fokussiert, mehrere Lichtquellen (meist Laser). Verschiedene Detektoren (Photodioden und/oder Photoelektronenvervielfacher) messen die Lichtstreuung der Zellen und das Fluoreszenzlicht. Dabei konvertieren und verstärken die Detektoren die Lichtsignale (Photonen) zu einem elektrischen Signal, welches von entsprechenden Programmen in graphische Darstellungen umgewandelt wird. Streulicht wird als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) oder Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) detektiert. Der FSC bezeichnet die Streuung entlang der Lichtachse des Lasers und gibt Auskunft über die Größe gemessener Zellen. Der SSC misst die Granularität von Zellen, indem Lichtstreuung im rechten Winkel (annähernd 90°) zum einfallenden Lichtstrahl erfasst wird. Schließlich kann auch die Durchflussrate der Zellen abhängig vom Zweck der Analyse festgelegt werden. Hohe Durchflussraten, wie in der vorliegenden Arbeit, werden unter anderem bei Immunphänotypisierungen verwendet (zusammengefasst in (48)).

5.4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Analyse von Zellkomponenten werden diese mit Antikörpern gegen die zu bestimmende Struktur markiert. Der Sichtbarmachung dienen Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorophore), die direkt an den Antikörper oder an einen gegen den ersten Antikörper gerichteten Antikörper gebunden sind. Die Fluorophore werden durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen angeregt und emittieren daraufhin ein definiertes, langwelligeres Lichtspektrum. Da die Farben von anregendem und ausgestrahltem Licht unterschiedlich sind, können diese durch die Verwendung optischer Filter (long pass, short pass, band pass) getrennt und von nachgeschalteten Detektoren unterschieden werden. Die Verwendung unterschiedlicher Farbstoff-Laser Kombinationen ermöglicht eine gleichzeitige Messung verschiedener Moleküle. Zusätzliche Variabilität kann über sogenannte Tandem-Fluorophore, Kombinationen zweier Farbstoffe, erreicht werden. Da sich die Emissionsspektren einzelner Fluorophore überschneiden können (spektrale Überlappung), müssen für eine korrekte Messung im Rahmen einer Kompensation Teile der jeweiligen Signale von denen anderer Emissionen subtrahiert werden und umgekehrt (zusammengefasst in (48)). Als Ausgangswerte für eine adäquate Kompensation wurden deshalb zunächst Einzelmessungen der verwendeten Farbstoffe durchgeführt und ein entsprechendes Kompensationsprofil erstellt, welches probenabhängig individuell angepasst werden konnte. Neben der Frequenz der ein Merkmal exprimierenden Zellen kann auch die Stärke der Merkmalsausprägung über die mean fluorescence intensity (MFI) bestimmt werden. Zur Berechnung der MFI wurde in dieser Arbeit der geometric mean (gMFI) verwendet.

5.4.3 Zellisolation

Für die Untersuchungen wurden PBMCs aus jeweils 20 ml heparinisierendem Vollblut von leber- und nierentransplantierten ProbandInnen sowie von gesunden SpenderInnen isoliert. Die Zellen wurden über Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll (Dichte 1,077 g/ml, Biochrom, Berlin, Deutschland) getrennt. Anschließend erfolgte eine Zellzahlbestimmung durch Stromausschlussverfahren und Pulsflächenanalyse mittels CASY® TT (OLS OMNI Life Science, Bremen, Deutschland). Danach wurden eine Phänotypisierung und funktionale Assays (siehe 3.4.4-5) durchgeführt. Für weiterführende Untersuchungen wurde jeweils ein Teil der Zellen sowie Serumproben der PatientInnen kryokonserviert.

5.4.4 Phänotypisierung

Für die Phänotypisierung wurden abhängig von der Gesamtzellzahl $1-2 \times 10^6$ PBMCs pro Probe in zwei verschiedenen Panels analysiert, wobei die Zellen jeweils in PBS / BSA mit den in Tabelle 1 genannten Fluoreszenzfarbstoffen in den angegebenen Konzentrationen resuspendiert wurden, sodass sich ein Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$ ergab. Die Färbung erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur. In manchen Fällen war ein zweiter Färbeschritt für die Dauer von 10 Minuten bei 4°C nötig.

5.4.5 Funktionelle Assays

Für die funktionellen Assays (siehe Abbildung 2) wurden abhängig von der Gesamtzahl der isolierten PBMCs zwischen 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen pro Probe verwendet. Die Zellen wurden in $300 \mu\text{l}$ RPMI Medium (siehe 4.2) für 22 Stunden bei 37°C mit den entsprechenden Zytokinen oder E. coli und aCD28 inkubiert. Zur intrazellulären Messung sezernierter Proteine wurde Brefeldin A (BrefA, Sigma-Aldrich) mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ in den letzten 4 Stunden der Zytokinstimulation beziehungsweise zusammen mit BD GolgiStop™ (Hauptbestandteil: Monensin, BD Biosciences, 1: 1000) für die letzten 18 Stunden der E. coli Stimulation hinzugegeben. Beide Substanzen wirken über eine Inhibierung des Golgi Apparates und führen so zur intrazellulären Akkumulation normalerweise sezernierter Proteine (49). Für die in vitro Experimente mit PBMCs gesunder SpenderInnen wurden diese in $300 \mu\text{l}$ RPMI zwei Stunden mit den oben genannten IS in verschiedenen Konzentrationen oder den Kombinationen Tac + MPA,

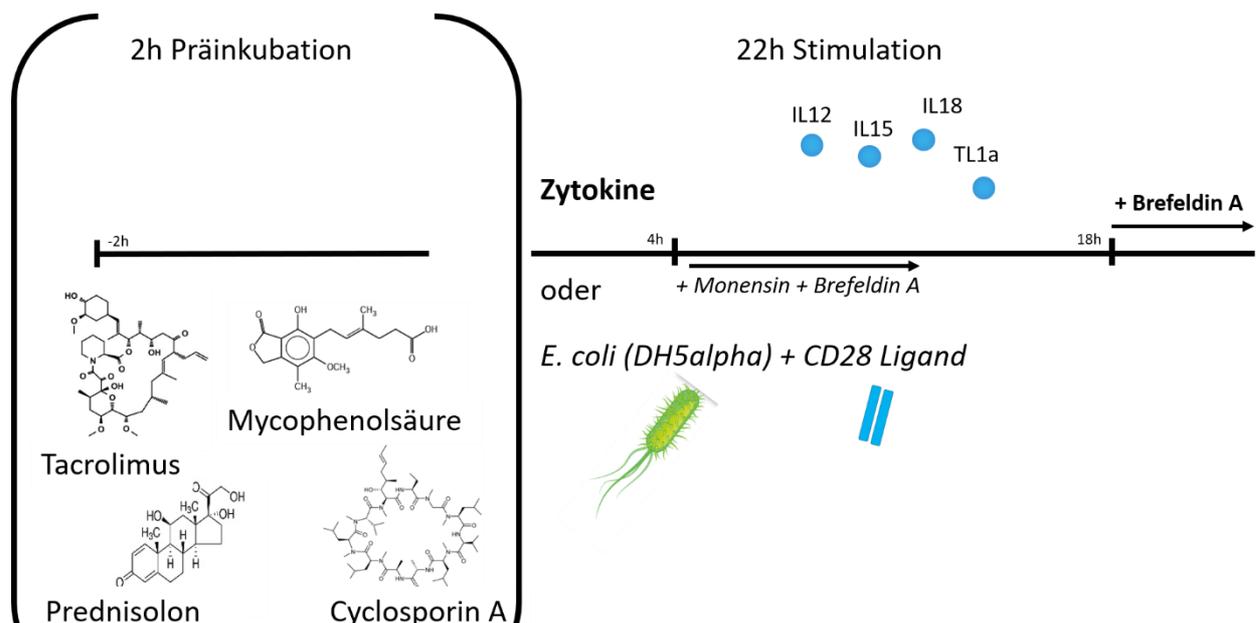


Abbildung 2: Zusammenfassung der funktionellen Assays.

Tac + Pred, CyA + Pred beziehungsweise MPA + Pred vorinkubiert. Bei allen Stimulationsexperimenten erfolgte eine Negativ- (keine Stimulation) und bei in vitro Versuchen zusätzlich eine Positivkontrolle (Stimulus ohne IS sowie Stimulus mit Ethanol, dem verwendeten Lösungsmittel der IS). Nach Stimulationsende wurde zunächst eine Oberflächenfärbung (siehe 5.4.4) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit BD FACSTTM Lysing Solution respektive BD FACSTTM Permeabilizing Solution 2 (beide BD Biosciences). Dann folgte eine Färbung intrazellulär akkumulierter Proteine wie beispielsweise TNF α , IFN γ oder aCasp3 für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

5.5 Durchflusszytometrische Analyse

Alle durchflusszytometrischen Analysen erfolgten mit einem FACS LSR FortessaTM X20 (Becton Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) mit vier Lasern in den Farben Rot (633 nm), Blau (488 nm), Violett (405 nm) und Ultraviolett (355 nm) sowie 16 Filtern. In dieser Konfiguration konnten maximal 16 verschiedene Parameter gleichzeitig gemessen werden. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die gewaschenen Zellpellets zunächst in 100 μ l PBS gelöst und kurz gevortext. Noch nicht gemessene Proben wurden bis zu ihrer Messung bei 4°C gelagert. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurde ein Detektionsschwellenwert (Threshold) von 20.000 festgelegt, sodass kleinere Partikel nicht aufgezeichnet wurden.

5.5.1 Gating Strategie

Für die Analyse durchflusszytometrischer Daten existieren wenig definierte Standards. Deshalb ist sie in hohem Maße von der Erfahrung des Experimentators abhängig. Leitkonzepte der Datenanalyse sind es, die zu erforschenden Zellpopulationen selektiv darzustellen und dann über Abbildung untersuchter Biomarker weitere Informationen über diese zu gewinnen. Diese Methode wird als Gating bezeichnet. Ein Gate ist dabei eine definierte Region auf einem Graphen, welche eine abgrenzbare Zellpopulation umfasst (zusammengefasst in (48)). Durch das Definieren von Gates können störende Zellen und Partikel schrittweise ausgeschlossen werden, bis die Zielpopulationen dargestellt sind. Die verwendete Gating Strategie kann in Abbildung 3 nachvollzogen werden.

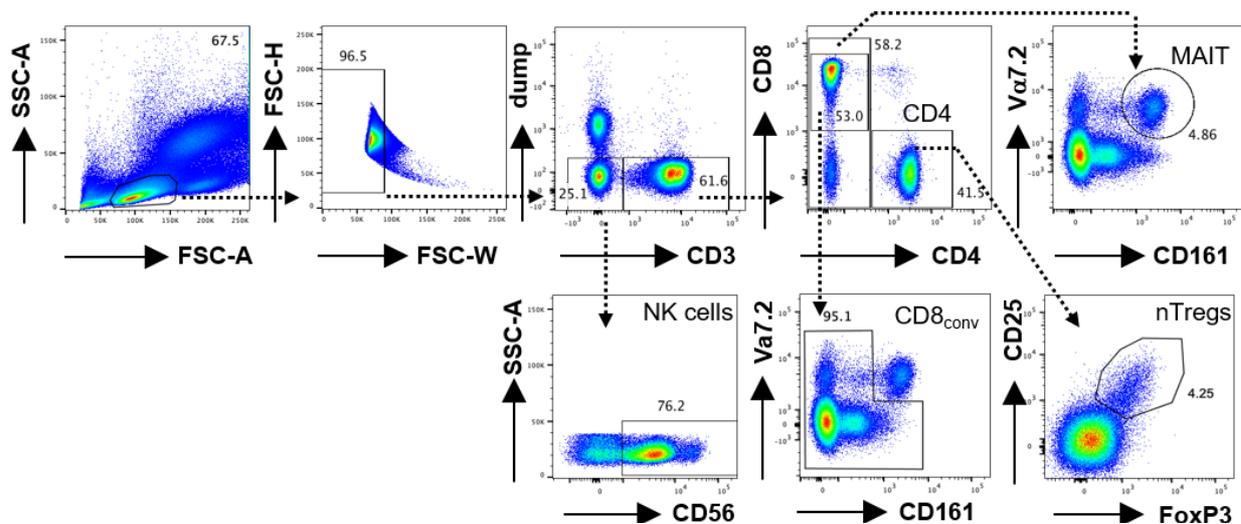


Abbildung 3: Gating Strategie

Zunächst erfolgte ein Gating auf Lymphozyten. Im Anschluss wurden über FSC-W und -H Dubletten ausgeschlossen. Über einen „dump“ (CD14, CD19, L/D) Channel wurden tote Zellen, Monozyten und B-Zellen ausgeschlossen. MAIT Zellen waren CD3⁺, CD8⁺ oder CD8⁻CD4⁻ sowie Va7.2⁺CD161^{high}. „Konventionelle“, nicht-MAIT CD8⁺ Zellen wurden entsprechend der Darstellung identifiziert. CD4⁺ T-Zellen waren CD3⁺ und CD4⁺CD8⁻. Regulatorische T-Zellen waren CD3⁺, CD4⁺CD8⁻ und CD25^{high}FoxP3⁺. NK Zellen wurden als CD3⁻ Zellen über CD56 Expression selektiert. Nach Sattler, Thiel et al. (50).

5.5.2 Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte manuell mit dem Programm FlowJo (Version 10, Treestar, Ashland, Oregon, USA). In dieser Arbeit gezeigte Durchflusszytometriedaten sind als Dot Plots (zweidimensionale Streudiagramme zur gleichzeitigen Auswertung zweier Merkmale) dargestellt. Um in die Analyse integriert zu werden, musste eine Mindestzellzahl von 25 Zellen in der jeweiligen Zielpopulation nachweisbar sein. Außerdem wurden für einzelne Proben Marker mit ungenügendem Färbeergebnis ausgeschlossen. In unseren Analysen erfolgte jeweils eine Gruppierung der PatientInnen entsprechend ihrer IS sowie deren Stärke. Hier entspricht Gruppe 1 einer Medikation mit Tac Serumspiegeln < 3 ng/ml oder CyA < 50 ng/ml. Gruppe 2 erhielt IS mit Tac 3-5 ng/ml oder CyA 50-100 ng/ml. Gruppe 3 wurde mit Tac Spiegeln über 5ng/ml bzw. CyA Spiegeln über 100 ng/ml behandelt. Die MMF Dosis (bis zu 500 mg/d) war für die Gruppeneinteilung unerheblich.

5.5.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der in FlowJo ausgewerteten Daten erfolgte durch die Software Graphpad PRISM (Version 8.0, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA). Ergebnisse wurden in Diagrammen dargestellt. Alle Balkendiagramme zeigen den Mittelwert ±

Standardfehler (Standard error of the mean, SEM). Für die statistische Analyse wurden die Messwerte zunächst mittels D'Agostino-Pearson sowie Shapiro-Wilk Tests auf eine Normalverteilung hin überprüft. Abhängig von der Normalverteilung wurde bei Vergleichen von zwei unabhängigen Stichproben ein T-Test mit Welch-Korrektur beziehungsweise ein Mann-Whitney Test angewandt. Statistische Vergleiche von mehr als zwei ungepaarten Gruppen erfolgten via ANOVA, wenn eine Normalverteilung angenommen werden konnte, oder Kruskal-Wallis-Test, falls keine Normalverteilung bestand. In allen statistischen Tests mit mehreren Gruppen wurden die jeweiligen Behandlungsgruppen mit der Referenzpopulation (GS) verglichen.

5.6 PatientInnen und gesunde SpenderInnen

Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt und nach dessen Vorgaben ausgeführt (EA 2/028/13, EA 2/035/16, EA 4/127/17). Alle Probanden gaben entsprechend der Helsinki Deklaration ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Gesunde SpenderInnen für eine altersangepasste Kontrollgruppe wurden auf freiwilliger Basis rekrutiert. Einschlusskriterium für leber- und nierentransplantierte PatientInnen war eine laborchemisch und klinisch stabile Transplantatfunktion zum Zeitpunkt der immunologischen Analyse. Ausgeschlossen wurden PatientInnen und gesunde SpenderInnen mit klinischen Hinweisen auf eine akute beziehungsweise chronische Infektion oder Inflammation zum Untersuchungszeitpunkt. Ein Ausschlusskriterium bei HBV- oder HCV-infizierten ProbandInnen waren darüber hinaus Rezidive innerhalb eines Jahres vor dem Messzeitpunkt. Die Liste der eingeschlossenen PatientInnen ist in den Tabellen 2 und 3 einsehbar (modifiziert nach Sattler, Thiel et al. (50)).

Tabelle 3: Charakteristika lebertransplantiertes PatientInnen und gesunder SpenderInnen

Variablen	Alle PatientInnen (n=58)	Tolerante PatientInnen (n=8)	Gesunde SpenderInnen (n=19)
Alter (y ± SD)*	61,78 (11,75)	63,8 (10,3)	61,26 (6,51)
Geschlecht (weiblich)**	21/58 (36,2%)	1/8 (12,5%)	10/19 (52,6%)
Jahre seit Transplantation (y ± SD)*	12.59 (7,2)	15.5 (7,2)	
Tolerante Gruppe (IS-frei)**		8/58 (13,8%)	
Tolerante Gruppe: durchschnittliche IS-freie Zeit [#]		36.8 (75,6)	
IS Gruppe 1**	20/58 (34,5%)		
IS Gruppe 2**	19/58 (32,8%)		
IS Gruppe 3**	11/58 (19%)		
IS**			
Tacrolimus + Mycophenolat Mofetil	19/58 (32,8%)		
Tacrolimus	16/58 (27,6%)		
Keine	8/58 (13,8%)		
Mycophenolat Mofetil	6/58 (10,3%)		
Cyclosporin A + Mycophenolat Mofetil	5/58 (8,6%)		
Cyclosporin A	4/58 (6,9%)		
Grunderkrankung**			
Nutritiv-toxische Zirrhose	13/58 (22, 4%)		
Hepatitis C	11/58 (19%)	5 (62,5%)	
Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	9/58 (15,5%)	1 (12,5%)	
Hepatitis B	9/58 (15,5%)	1 (12,5%)	
Primär biliäre Cholangitis	4/58 (6,9%)		
Kryptogene Zirrhose	3/58 (5,2%)	1 (12,5%)	
Alpha-1 Antitrypsin Mangel	2/58 (3,4%)		
Primär sklerosierende Cholangitis	2/58 (3,4%)		
Budd–Chiari Syndrom	1/58 (1,7%)		
Caroli Syndrom	1/58 (1,7%)		
Chemotherapie-induzierte Zirrhose	1/58 (1,7%)		
Sekundär biliäre Zirrhose	1/58 (1,7%)		
Morbus Wilson	1/58 (1,7%)		

Tabelle 3: Charakteristika lebertransplantiertes PatientInnen und gesunder SpenderInnen

Fußnoten: y: Jahre, *Durchschnitt ± Standardabweichung; **Anteil (Prozentzahl;) #Monate ± Standardabweichung. Die Einteilung der PatientInnen in IS Gruppen ist in Kapitel 5.4.8 beschrieben. Nach Sattler, Thiel et al.(50).

Tabelle 4: Charakteristika während der Studie geweanter PatientInnen

Patientennummer	Alter ⁺	Geschlecht (m/f)	Zeit seit Tx [§]	Grunderkrankung	IS [°]	IS- freie Zeit [#]
11	74	m	13	HCV	MMF	9
12	60	m	8	Kryptogen	Tac + MMF	6
13	65	m	14	HCC	Tac	4

Tabelle 4: Charakteristika während der Studie geweanter PatientInnen.

Fußnoten: m: männlich, f: weiblich, Tx: Transplantation, ⁺Bei Baseline Analyse, [§]Jahre, [°]vor Absetzen der IS, [#]Monate. Nach Sattler, Thiel et al.(50).

Tabelle 5: Charakteristika nierentransplantiertes PatientInnen

Variablen	PatientInnen (n=23)
Alter (y ± SD)*	58,57 (11,7)
Geschlecht (weiblich)**	8/23 (34,8%)
Jahre seit Transplantation (y ± SD)*	9,3 (5,0)
IS**	
Tacrolimus + Mycophenolat Mofetil + Prednisolon	11/23 (47,8%)
Cyclosporin A + Mycophenolat Mofetil + Prednisolon	8/23 (34,8%)
Tacrolimus +Mycophenolat Mofetil	2/23 (8,7%)
Tacrolimus + Prednisolon	2/23 (8,7%)
Grunderkrankung**	
Hypertensive Nephropathie	5/23 (21,7%)
IgA Nephropathie	3/23 (13%)
Glomerulonephritis	3/23 (13%)
Pyelonephritis	2/23 (8,7%)
Polyzystische Nierenerkrankung	2/23 (8,7%)
Kryptogen	2/23 (8,7%)
Zystinose	1/23 (4,3%)
Diabetische Nephropathie	1/23 (4,3%)
Diabetische + Hypertensive Nephropathie	1/23 (4,3%)
Fokal segmentale Glomerulosklerose	1/23 (4,3%)
Obstruktive Nephropathie	1/23 (4,3%)
Systemischer Lupus Erythematodes	1/23 (4,3%)

Tabelle 5: Charakteristika nierentransplantiertes PatientInnen

Fußnoten: y: Jahre, *Durchschnitt ± Standardabweichung; **Anteil (Prozentzahl); #Monate ± Standardabweichung. Die Einteilung der PatientInnen in IS Gruppen ist in Kapitel 5.4.8 beschrieben. Nach Sattler, Thiel et al.(50).

6 Ergebnisse

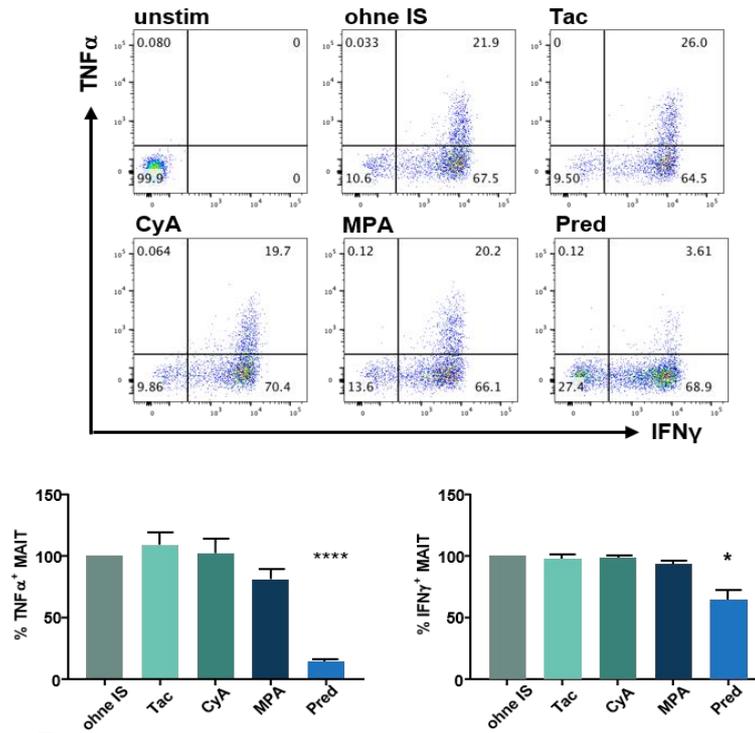
6.1 Beeinflussung von MAIT Zell Funktionen gesunder SpenderInnen durch Immunsuppression abhängig vom Aktivierungsmechanismus

Zur Untersuchung eines potenziellen Einflusses bei LTx gängiger IS auf MAIT Zellen wurden PBMCs gesunder SpenderInnen *in vitro* mit verschiedenen IS (Tac, CyA, MPA, Pred und Kombinationen) in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine 22-stündige Stimulation, entweder mittels Zytokinstimulation unter Verwendung von IL12, IL15, IL18 sowie TL1A in vortitrierten Konzentrationen oder mit *E. coli* Bakterien in Kombination mit aCD28. Durchflusszytometrische Messungen der von MAIT Zellen produzierten Zytokine zeigten hierbei, dass nach Zytokinstimulation lediglich Prednisolon die Expression der Zytokine TNF α und IFN γ signifikant supprimierte (Abbildung 4). Bei antigenspezifischer Stimulation war eine signifikante Hemmung der TNF α und IFN γ Expression zusätzlich unter IS mit Tac beobachtbar. TNF α konnte außerdem nach Präinkubation mit CyA supprimiert werden (Abbildung 4). Weiterhin beeinträchtigte sowohl eine Vorinkubation mit Pred als auch mit Calcineurininhibitoren die Ausschüttung von IL17. Die Expression des bei *E. coli* Stimulation nachweisbaren Degranulationsmarkers CD107a blieb durch die IS unbeeinträchtigt. Die sowohl bei Zytokin- als auch *E. coli* Stimulation gemessene Serinprotease GrB war lediglich nach antigenspezifischer Stimulation und Präinkubation mit Pred signifikant vermindert (Daten nicht gezeigt. Vergleiche jeweils Sattler, Thiel et al. (50)).

6.2 Divergente T-Zell Frequenzen unter Immunsuppression

Zur Untersuchung des Einflusses von LTx beziehungsweise IS auf MAIT Zellen erfolgte eine durchflusszytometrische *ex vivo* Phänotypisierung verschiedener Lymphozytenpopulationen lebertransplantierte SpenderInnen im Vergleich zu einer gesunden altersgematchten Vergleichsgruppe (Abbildung 5). Hier waren signifikant reduzierte MAIT Zell Frequenzen bei immunsupprimierten SpenderInnen auffällig. Diese zeigten sich unabhängig von der individuellen IS Medikation. Bei toleranten geweant (tol) lebertransplantierten PatientInnen blieben MAIT Zell Frequenzen ebenfalls signifikant erniedrigt. Die Frequenzen von Treg sowie konventionellen CD4⁺ T-Zellen waren lediglich bei IS PatientInnen signifikant vermindert und erholten sich nach Weaning. Weiterhin zeigten sich die Frequenzen CD8⁺ T-Zellen bei beiden Patientengruppen signifikant erhöht. Bezüglich der NK Zell Frequenzen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber gesunden Individuen.

A Zytokinstimulation



B E. coli Stimulation

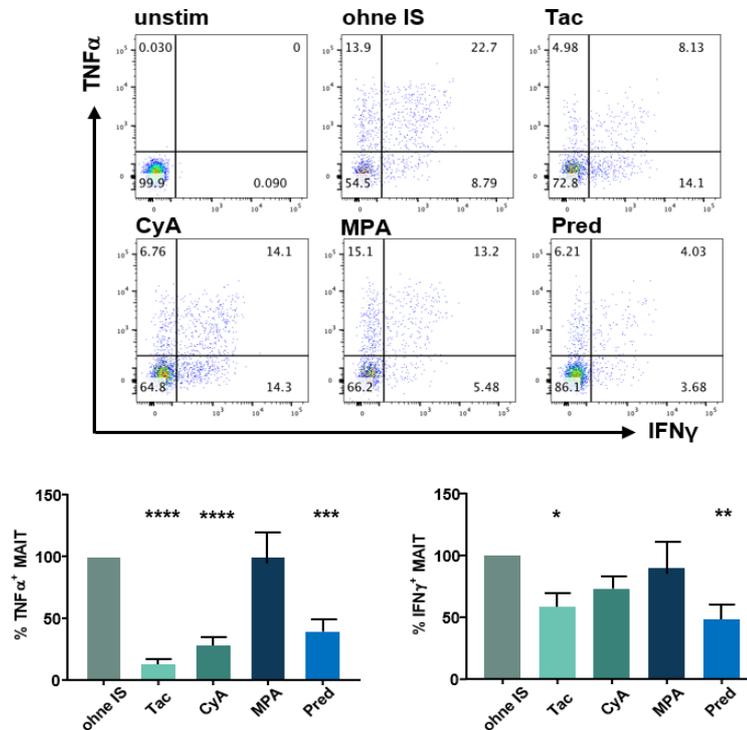


Abbildung 4: Anteil von TNF α und IFN γ produzierenden CD8⁺ und DN MAIT-Zellen nach inflammatorischer (A) oder antigenspezifischer (B) Stimulation von PBMCs unter 22h Koinkubation mit verschiedenen IS.

Oben: exemplarische Darstellung einzelner Dotplots. Unten: Balkendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SEM in Prozent der Zytokinproduktion stimulierter PBMCs ohne IS, welche als 100% definiert wurden. Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Vergleich einzelner Gruppen (n=6) mit der Referenzgruppe (ohne IS). Legende für diese und alle folgenden Abbildungen: *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001. Abbildung nach Sattler, Thiel et al. (50).

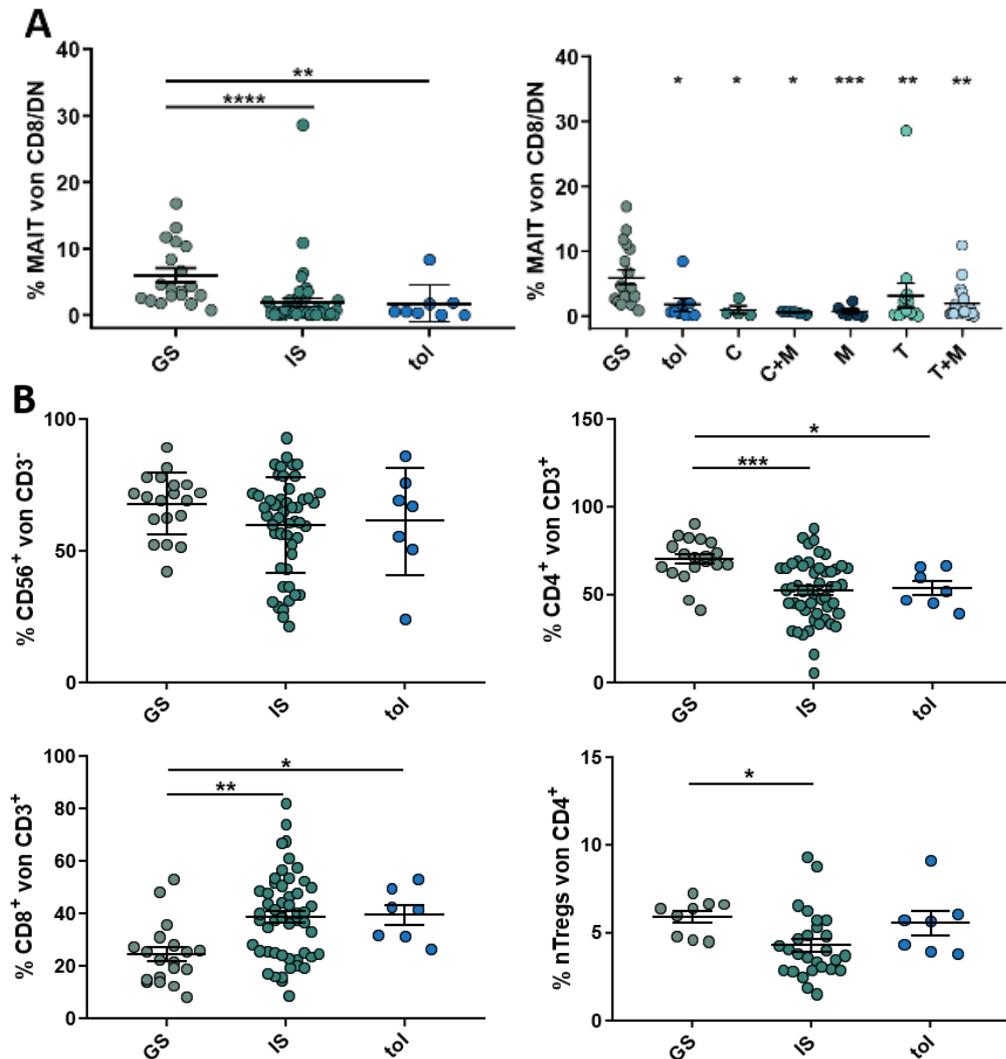


Abbildung 5: Zellfrequenzen altersgemachter gesunder SpenderInnen (GS, n=20) im Vergleich zu immunsupprimierten (IS, n=58) sowie toleranten (tol, n=7-8) Lebertransplantierten PatientInnen.

MAIT-Zell Frequenzen Lebertransplantierter PatientInnen (A) sind zusätzlich aufgeschlüsselt nach der jeweiligen IS dargestellt. Unten (B) sind NK ($CD3^+CD56^+$), $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie nTreg Frequenzen abgebildet. Die Punktdiagramme zeigen einzelne Messwerte sowie Mittelwerte und SEM. Statistische Vergleiche beziehen sich jeweils auf die Referenzpopulation (GS). Nach Sattler, Thiel et al. (50).

6.3 MAIT Zellen in LTx-Patienten zeigen unter Immunsuppression einen aktivierten, funktionell erschöpften Phänotyp

Zur Identifizierung möglicher Biomarker für die Entwicklung operationaler Toleranz nach Lebertransplantation erfolgte außerdem eine durchflusszytometrische Analyse verschiedener MAIT Zell Aktivierungs- und Differenzierungsmarker (Abbildung 6). Hier zeigten sich bei MAIT Zellen immunsupprimierter PatientInnen erhöhte Aktivierungsmarker (CD69, CD38, HLA-DR) im Vergleich zu einer altersgemachten Kontrollgruppe gesunder SpenderInnen. Interessanterweise war hier bei toleranten PatientInnen kein signifikanter Unterschied zur

Kontrollgruppe detektierbar. Auch in einer IS-Subgruppenanalyse konnte eine Signifikanz nicht für alle IS-Regimes nachgewiesen werden. Weiterhin war bei immunsupprimierten sowie toleranten PatientInnen eine signifikante Erhöhung des Erschöpfungsmarkers PD1 auffällig, welche in einer Analyse der IS-Subgruppen nicht für jede IS-Kohorte Signifikanz erreichte. Darüber hinaus konnte in unstimulierten MAIT-Zellen immunsupprimierter und toleranter PatientInnen eine signifikant erhöhte ex vivo Expression von GrB nachgewiesen werden, welche ebenfalls nicht bei allen IS-Subgruppen Signifikanz erreichte.

6.4 Funktionelle MAIT Zell Beeinträchtigung nach Lebertransplantation

Zur Analyse der funktionellen Beeinträchtigung von MAIT Zellen lebertransplantierter PatientInnen wurden PBMCs analog zu 5.1 mit Zytokinen oder E.coli und aCD28 stimuliert und die durchflusszytometrisch gemessene Produktion verschiedener Effektormoleküle mit einer altersgemachten gesunden Referenzpopulation (GS) statistisch verglichen (Abbildung 7). Unabhängig von der Art der Stimulation zeigte sich hierbei eine signifikant verminderte Expression von TNF α und IFN γ bei immunsupprimierten PatientInnen. In einer Subgruppenanalyse abhängig von der verwendeten IS waren Unterschiede nur in wenigen Fällen signifikant. Bei toleranten PatientInnen war ausschließlich die IFN γ Produktion nach antigenspezifischer Stimulation signifikant vermindert. Weiterhin zeigte sich eine reduzierte Expression des bei E. coli Stimulation nachweisbaren Degranulationsmarkers CD107a in der IS Gruppe, welche nach Subgruppenanalyse nicht in allen Untergruppen signifikant wurde. Darüber hinaus konnte eine signifikante Erhöhung der GrB Expression immunsupprimierter PatientInnen nach E. coli Stimulation festgestellt werden, welche nicht für alle IS Untergruppen Signifikanz erreichte (Daten nicht gezeigt. Vergleiche Sattler, Thiel et al. (50)).

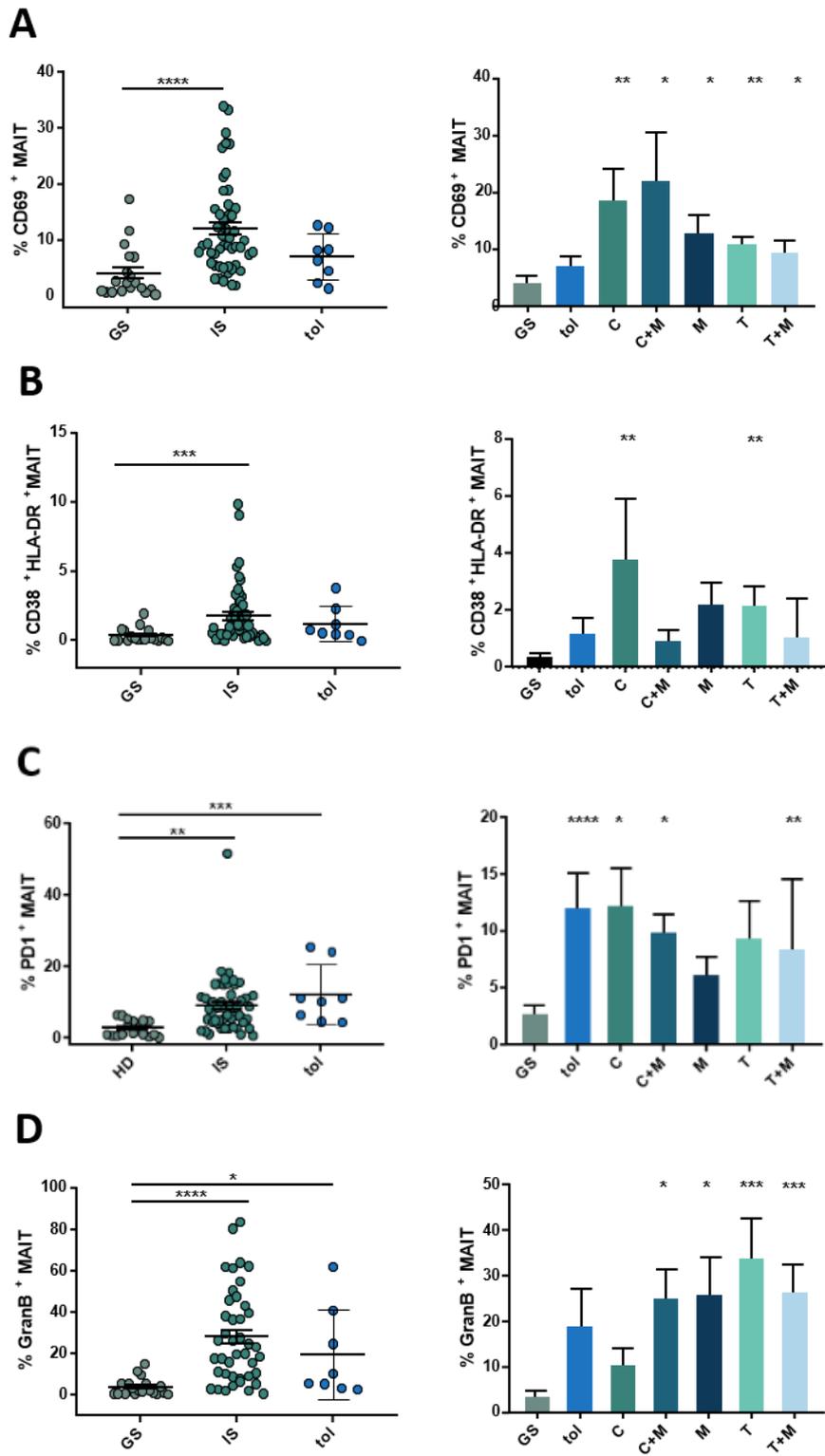
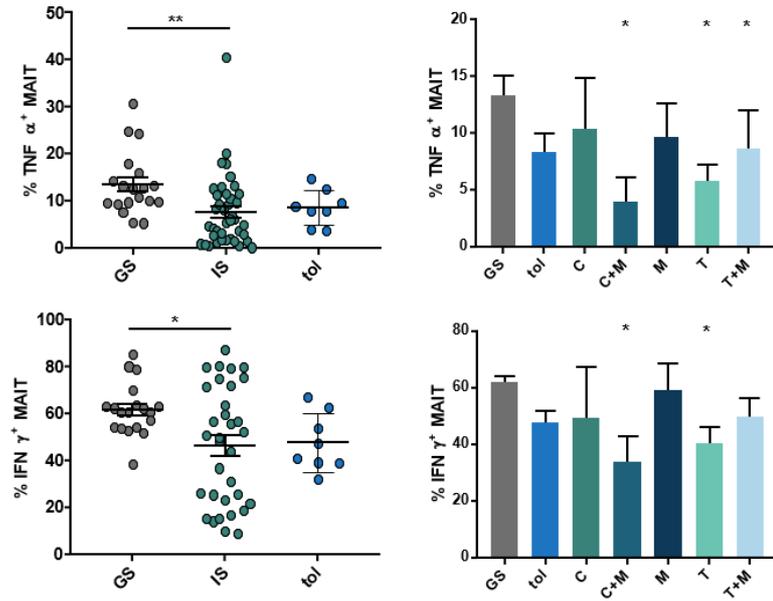


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung von Aktivierungsmarkern (A+B), funktionellen Erschöpfungsmarkern (C) sowie ex vivo Granzyme B Expression (D) von MAIT Zellen gesunder SpenderInnen (GS, n=20), immunsupprimierter (IS, n=58) und toleranter (tol, n=7-8) PatientInnen.

Balkendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SEM. Punktdiagramme zeigen einzelne Messwerte sowie Mittelwerte und SEM. Statistische Vergleiche beziehen sich jeweils auf die Referenzpopulation (GS). Nach Sattler, Thiel et al. (50).

A Zytokine



B E. Coli

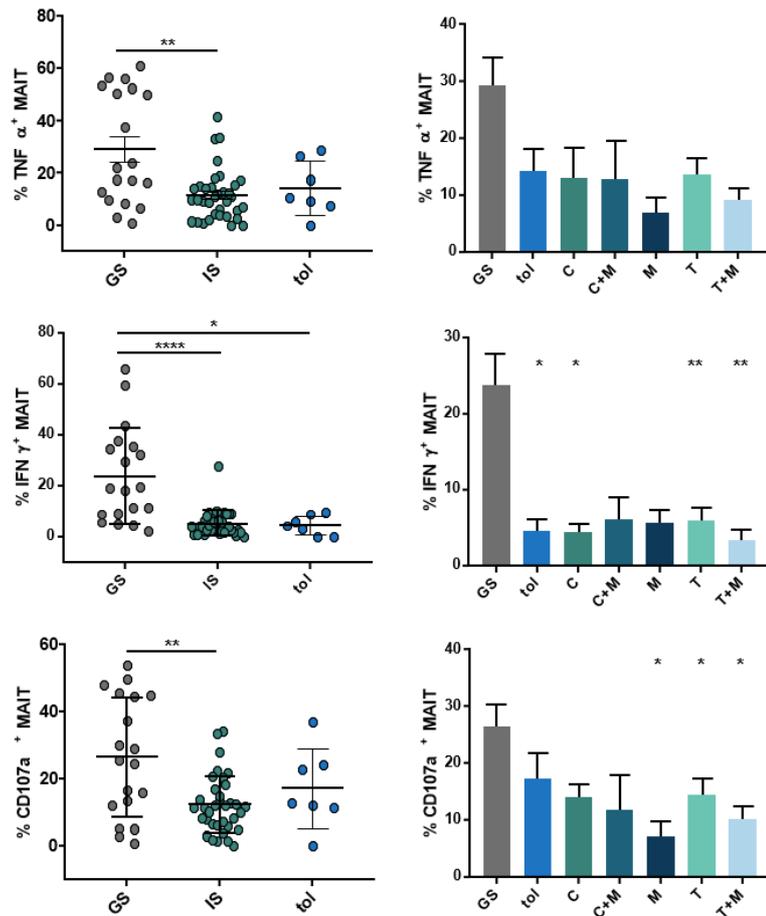


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der Effektormolekülexpression von MAIT Zellen gesunder SpenderInnen (GS, n=20) im Vergleich zu immunsupprimierten (IS, n=58) und toleranten (tol, n=7-8) PatientInnen nach inflammatorischem Stimulus durch Zytokine (A) oder antigenspezifischer Stimulation mit E. coli (B).

Balkendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SEM. Punktdiagramme zeigen einzelne Messwerte sowie Mittelwerte und SEM. Statistische Vergleiche beziehen sich jeweils auf die Referenzpopulation (GS). Nach Sattler, Thiel et al. (50).

6.5 Verminderte MAIT Zell Polyfunktionalität unter Immunsuppression

Außerdem erfolgte eine Bewertung der Beeinträchtigung von MAIT Zell Funktionalität bei lebertransplantierten PatientInnen durch eine Analyse der gleichzeitigen Produktion multipler Effektormoleküle mithilfe von Boolean Gating. Unterschieden werden dabei Zellen, welche keines (0), eines (1) oder gleichzeitig mehrere Moleküle (2, 3 oder 4) produzieren. Nach Zytokinstimulation erfasste Marker beinhalteten TNF α , IFN γ und GrB. Nach E. coli Stimulation gemessene Moleküle waren TNF α , IFN γ , GrB sowie CD107a. Im Vergleich zu einer altersgematchten gesunden Kontrollgruppe zeigte sich hier nach Zytokinstimulation eine Reduktion tripel- und doppelpositiver Zellen sowohl unter verschiedenen IS als auch bei toleranten PatientInnen. Nach antigenspezifischer Stimulation waren die Frequenzen quadrupel-, tripel- und doppelpositiver MAIT Zellen lebertransplantiertes PatientInnen reduziert.

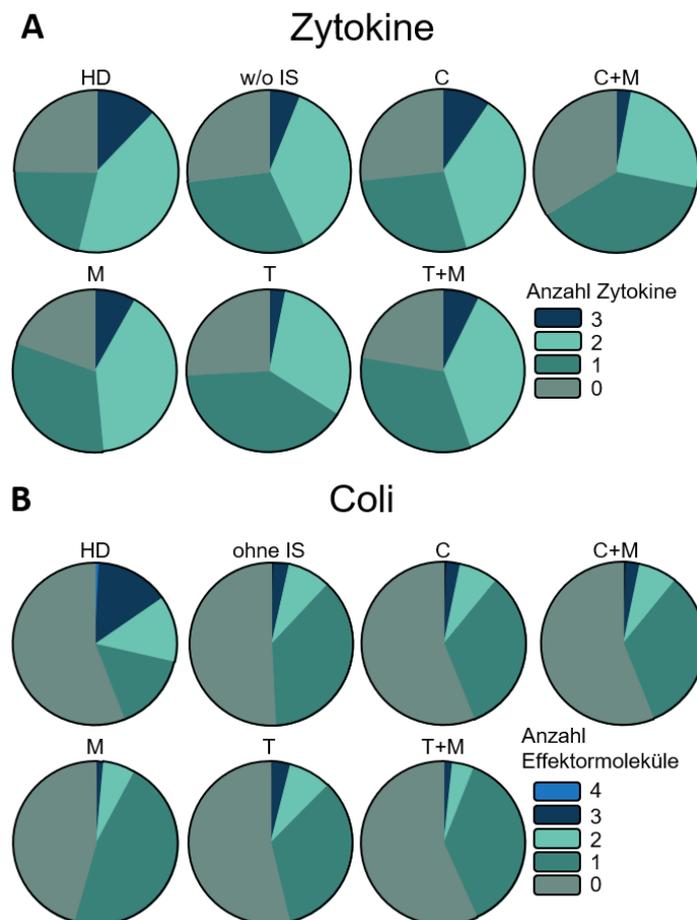


Abbildung 8: Polyfunktionalitätsanalyse von MAIT Zellen gesunder SpenderInnen (GS, n=20), immunsupprimierten und toleranten (tol, n=7-8) PatientInnen nach inflammatorischem Stimulus durch Zytokine (A) oder antigenspezifischer Stimulation mit *e. coli* und *aCD28* (B).

In A analysierte Moleküle beinhalten GrB, IFN γ und TNF α . Nach coli Stimulation wurde weiterhin CD107a berücksichtigt. Die Kreisdiagramme zeigen Mittelwerte. Nach Sattler, Thiel et al. (50).

6.6 Normalisierungstendenzen von MAIT Zell Phänotyp und Funktionen nach Weaning

Zur Untersuchung von Veränderungen des MAIT Zell Phänotyps und der MAIT Zell Funktionalität nach erfolgreichem Weaning wurden PBMCs von drei PatientInnen vor und 4-9 Monate nach vollständigem Absetzen der IS Medikation durchflusszytometrisch untersucht. In erfolgreich geweanten PatientInnen zeigte sich eine reduzierte Expression der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR sowie der *ex vivo* GrB Produktion. Außerdem war ein deutlicher Anstieg von PD1 sowie eine leichte Erhöhung der CD69 Expression nachweisbar. Funktionell zeigte sich unabhängig von der Stimulationsart eine gesteigerte Produktion von TNF α und IFN γ . Nach E. coli Stimulation war die Frequenz CD107a exprimierender Zellen bei geweanten PatientInnen erhöht.

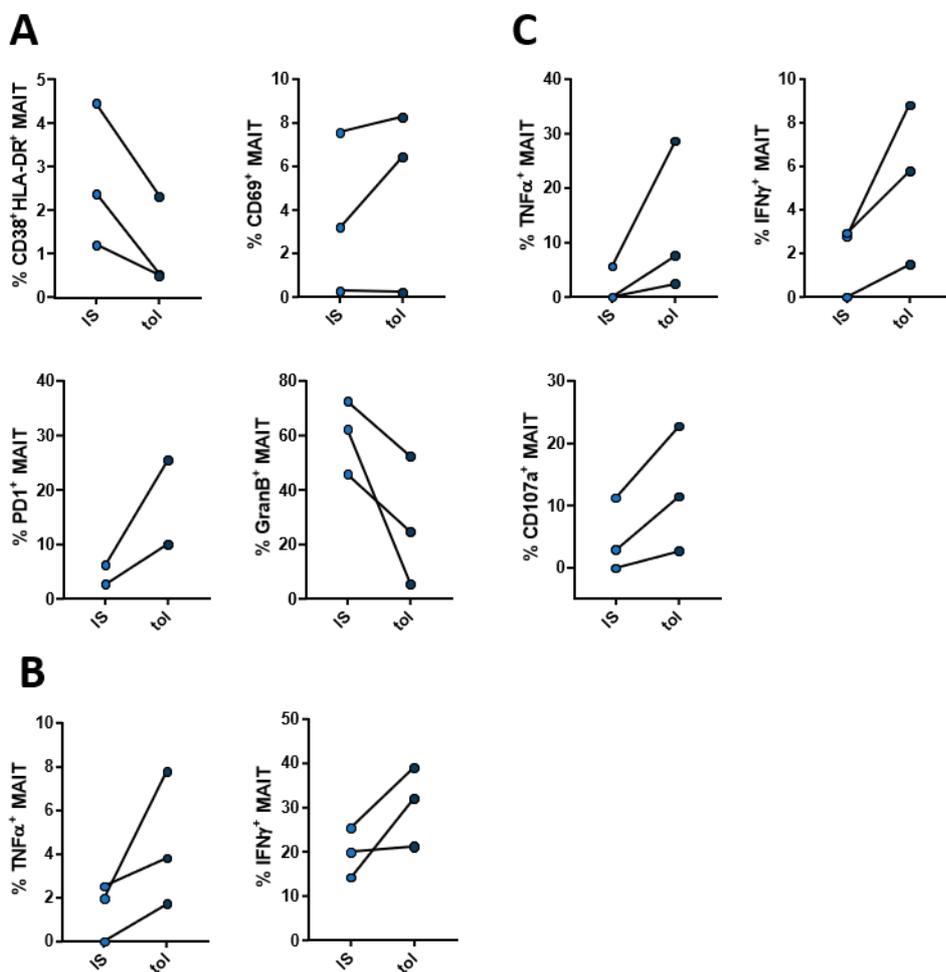


Abbildung 9: Longitudinale Beobachtung des MAIT Zell Phänotyps (A) sowie der MAIT Zell Funktion nach Zytokin- (B) oder Coli Stimulation (C)

Gezeigt sind zwei beziehungsweise drei während der Studie geweante PatientInnen vor (IS) und 4-9 Monate nach abgeschlossenem Weaning (tol) bei stabiler Transplantatfunktion. Zusammengehörige Werte sind im Punktdiagramm mit Linien verbunden. Nach Sattler, Thiel et al. (50)

6.7 MAIT Zell Verlust und aktivierter Phänotyp nach Nierentransplantation

Um zwischen Effekten von LTx und IS zu differenzieren, wurden zusätzlich PBMCs nierentransplanterter PatientInnen unter mit LTx vergleichbarer immunsuppressiver Medikation isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich im Vergleich zu gesunden SpenderInnen eine signifikante Reduktion peripherer MAIT Zellen, welche ebenfalls vermehrt die Aktivierungsmarker CD69 sowie CD38 und HLA-DR exprimierten. Weiterhin war eine signifikante Erniedrigung von T-Helfer Zellen sowie eine signifikante Erhöhung zytotoxischer T-Zellen auffällig. NK Zell Frequenzen blieben unverändert.

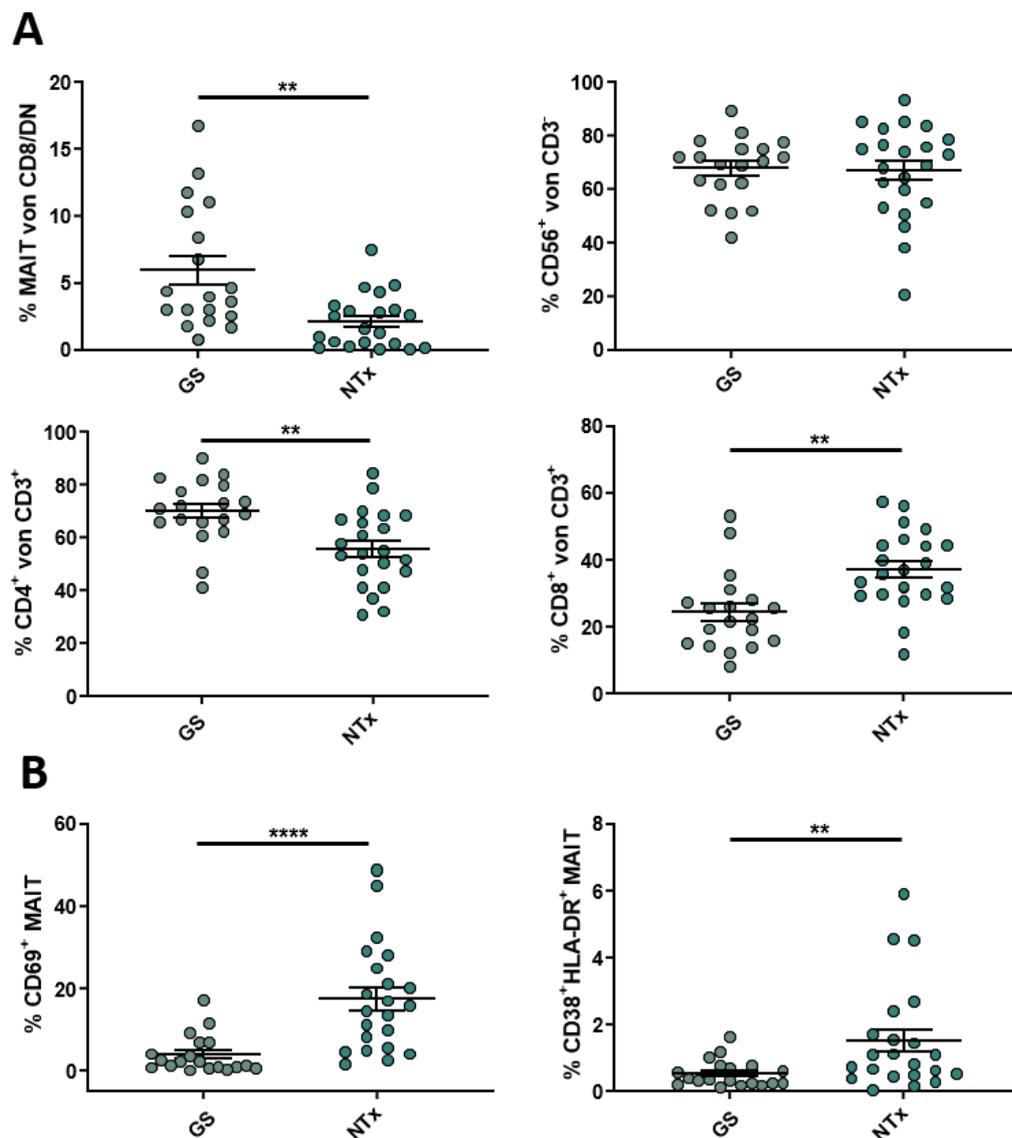


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung von Zell-Frequenzen (A) sowie MAIT Zell Expression verschiedener Aktivierungsmarker (B) immunsupprimierter nierentransplanterter PatientInnen (NTx, n=23) im Vergleich zu gesunden SpenderInnen (GS, n=20).

Punktdiagramme zeigen einzelne Messwerte sowie Mittelwerte und SEM. Statistische Vergleiche beziehen sich jeweils auf die Referenzpopulation (GS). Nach Sattler, Thiel et al. (50).

7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von LTx, IS und deren Weaning auf MAIT Zellen differenziell untersucht werden. Insbesondere war dabei von Interesse, inwieweit gängige bei LTx verwendeten Immunsuppressiva MAIT Zell Funktionen und Phänotyp *in vitro* und *ex vivo* beeinflussen. Außerdem sollte eruiert werden, ob bereits die LTx selbst MAIT Zell Phänotyp und Funktionalität beeinflusst. Darüber hinaus sollten MAIT Zell Veränderungen durch Weaning sowie Eigenschaften von MAIT Zellen operational toleranter SpenderInnen untersucht werden.

7.1 Multifaktoriell bedingter MAIT Zell Verlust

In den durchflusszytometrischen Messungen war eine signifikante Reduktion der MAIT Zell Frequenzen in lebertransplantierten PatientInnen im Vergleich zu gesunden SpenderInnen auffällig. Diese zeigte sich bei allen transplantierten ProbandInnen unabhängig von der Grunderkrankung (Daten nicht gezeigt), dem jeweiligen IS Regime oder der Stärke der IS (vgl. Sattler, Thiel et al. (50)). Auch nach Weaning und bei toleranten SpenderInnen blieben MAIT Zellen signifikant erniedrigt. Weiterhin konnte eine Reduktion von peripheren MAIT Zellen nach Transplantation auch bei nierentransplantierten SpenderInnen nachgewiesen werden. Eine Erniedrigung der MAIT Zell Frequenzen im Blut als Reaktion auf unterschiedliche Erkrankungen ist in der Literatur vielfach beschrieben. Dies wurde sowohl für Erkrankungen, in denen eine protektive Rolle, als auch für Erkrankungen, in denen ein pathologischer Einfluss von MAIT Zellen angenommen wird, gezeigt (zusammengefasst in (51)). Auch für Leber- (zusammengefasst in (3)) und terminale Niereninsuffizienz sowie nach NTx (52) konnte ein peripherer MAIT-Zell-Verlust festgestellt werden. In einer Studie wiesen Xue et al. nach, dass dieser bei PatientInnen mit chronischer HepB Infektion abhängig vom Schweregrad der Leberinsuffizienz war und sich mit Verbesserung der Leberfunktion teilweise erholte (53). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich gezeigt, dass sich MAIT Zell Populationen nach LTx analog zu Patienten nach NTx (52) nicht erholen. Auch nach Weaning der IS blieben MAIT Zell Frequenzen niedrig, sodass von einem grunderkrankungs- und weniger IS-bedingten MAIT-Zell-Verlust auszugehen ist. Als Pathomechanismus für den Verlust peripherer MAIT Zellen werden in der Literatur verschiedene Ursachen diskutiert. Eine Hypothese ist die Migration von MAIT Zellen aus dem Blut in entzündete Organe. So konnten bei PatientInnen mit fortgeschrittener Leberzirrhose in

Aszitespunktionen erhöhte Frequenzen funktionaler MAIT Zellen nachgewiesen werden, die bei PatientInnen mit Leberzirrhose und spontan bakterieller Peritonitis zusätzlich überproportional erhöht waren. Im peripheren Blut hingegen zeigten sich die MAIT Zellen bei beiden Patientengruppen erniedrigt und funktionell eingeschränkt (54). Die Expression des bei Inflammation für die Leber spezifischen Zielrezeptors CXCR3 war in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten jedoch bei MAIT Zellen nicht erhöht (Daten nicht gezeigt). Deshalb ist von keiner verstärkten Migration in die Leber auszugehen. Weiterhin gelten MAIT Zellen als anfällig für aktivierungsinduzierte Apoptose (zusammengefasst in (3)). In der vorliegenden Arbeit war die aktivierte Caspase 3 (aCasp3) in MAIT Zellen jedoch nicht erhöht, sodass dieser Mechanismus nicht bestätigt werden konnte (Vergleiche Sattler, Thiel et al. (50)). Eine weitere Ursache für erniedrigte MAIT Zell Frequenzen könnte neben einem grunderkrankungsbedingtem MAIT Zell Verlust deren geringes Regenerationspotential sein. Hinweise hierfür sind einerseits die geringe Expression von Ki67 (zusammengefasst in (3)). Andererseits konnten über den stark exprimierten MDR1 hinausgehende Stammzeleigenschaften wie eine große Telomerlänge oder verstärkte Telomeraseaktivität bei MAIT Zellen nicht nachgewiesen werden (55). Eine IS scheint sich ebenfalls auf das Regenerationspotential von MAIT Zellen auszuwirken. Nach *in vitro* Inkubation von MAIT Zellen gesunder SpenderInnen mit MPA, Tac oder Pred zeigten diese eine beeinträchtigte Proliferation, wobei ebenfalls keine vermehrte Apoptose festgestellt werden konnte (13). Auch in anderen Kontexten ist eine ausbleibende Erholung von MAIT Zell Populationen nach erfolgreicher Therapie dokumentiert (zusammengefasst in (3)). Im Transplantationskontext sind MAIT Zellen diesbezüglich nur nach allogener Stammzelltransplantation untersucht worden. Konuma et al. berichteten, dass sich MAIT Zell Frequenzen nach allogener Nabelschnurbluttransplantation bei chronischer Graft versus Host Disease erst nach ungefähr 10 Jahren vollständig erholten (56). Eine Rekonstitution von peripheren MAIT Zell Frequenzen in allogenen stammzelltransplantierten PatientInnen konnte jedoch positiv mit einer hohen Darm-Mikrobiomdiversität sowie hohen Zahlen von *Bifidobacterium longum* sowie *Blautia* Spezies im Darm korreliert werden (zusammengefasst in (57)). *In vitro* konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Exposition von MAIT Zellen mit *E. coli* eine MR1-abhängige Proliferation induziert (58). Insgesamt weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass ein intaktes und diverses Darm-Mikrobiom zu einer Proliferation von MAIT Zellen beiträgt. Auch bei fortgeschrittenen Lebererkrankungen und nach LTx wird von einer Dysbiose ausgegangen (zusammengefasst in (59)), welche eine Regeneration des MAIT Zell Kompartiments negativ beeinflussen könnte. Insgesamt könnten die Beobachtungen in dieser

Arbeit somit auf einen MAIT Zell Verlust im Rahmen der Grunderkrankung hindeuten, welcher schon vor LTx manifest war. Die Rekonstitution verminderter MAIT Zell Populationen könnte zusätzlich durch eine häufig nach LTx vorhandene Dysbiose sowie durch IS gehemmt werden. Auch in anderen T-Zell Untergruppen waren Veränderungen der Populationszahlen nachweisbar, welche bereits publizierten Daten zu CD4⁺, CD8⁺ (60) und regulatorischen T Zellen (zusammengefasst in (61)) bestätigen. Interessanterweise blieben die Frequenzen von CD3⁻CD56⁺ NK Zellen jedoch unbeeinträchtigt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Dugast et al., die nach NTx von unveränderten peripheren NK-Zell Frequenzen berichteten (62). Nach LTx ist lediglich eine signifikante Reduktion bestimmter NK Zell Populationen nach einer Woche gezeigt (63), sodass aufgrund unserer Ergebnisse langfristig von einer Erholung der Populationszahlen ausgegangen werden kann.

7.2 Chronische MAIT Zell Aktivierung und funktionelle Erschöpfung

Der in dieser Arbeit beobachtete MAIT Zell Phänotyp könnte ebenfalls durch eine LTx-assoziierte Dysbiose erklärt werden. MAIT Zellen exprimierten einen aktivierten, funktionell erschöpften Phänotyp, wobei GrB, CD69, HLA-DR, CD38 und PD1 signifikant erhöht waren. Nach Weaning und in tol PatientInnen zeigten die oben genannten Werte, abgesehen von PD1, Normalisierungstendenzen (siehe Abbildungen 6 und 9). Einen vergleichbaren Phänotyp peripherer MAIT Zell beschreiben Li et al. bei PatientInnen mit alkoholischer Hepatitis. Auch hier waren CD69, CD38, HLA-DR, GrB und PD1 signifikant erhöht. In follow-up Untersuchungen nach 6 und 12 Monaten zeigte sich ein normalisierter Phänotyp bei abstinenten PatientInnen, wobei initial beobachtete erniedrigte MAIT Zell Frequenzen nicht vollständig normalisiert waren (64). Ein aktivierter, funktionell erschöpfter Phänotyp peripherer MAIT Zellen wurde ebenfalls bei chronischer Hepatitis B Infektion detektiert (65). Nach Untersuchungen peripherer MAIT Zellen von PatientInnen mit alkoholischer Hepatitis sowie äthyltoxischer Leberzirrhose postulierten Riva et al., dass die oben beschriebenen Veränderungen bezüglich der chronischen MAIT Zell Aktivierung durch Translokation von Darmbakterien ins Blut aufgrund einer bei Lebererkrankungen gestörten Barrierefunktion des Darms entstünden. Dies führe initial zu Hyperaktivierung und reaktiver Anergie von MAIT Zellen sowie final zu einer Depletion dieser. In ihrer Studie zeigten die Autoren, dass bei lebererkrankten PatientInnen im Blut erhöhte Werte eines Surrogatmarkers für die Translokation von Darmbakterien ins Blut (D-Laktat) messbar waren. Periphere MAIT Zellen waren ebenfalls depletiert, aktiviert und anerg. Eine in vitro Exposition von PBMCs mit Antigen-Extrakten von Stuhlproben erkrankter PatientInnen, nicht

jedoch von Stuhlproben-Extrakten gesunder PatientInnen, induzierte MAIT-Zell spezifisch vergleichbare phänotypische Veränderungen (66). Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass sich MAIT Zellen lebertransplantiertes PatientInnen phänotypisch erst nach Weaning der IS gesunden Individuen angleichen. Eine Dysbiose und gestörte Darmbarrierefunktion könnten den Phänotyp ebenfalls beeinflussen und mitursächlich für die auch nach Weaning erhöhte PD1 Expression sein.

7.3 Unterschiedliche Beeinträchtigung von MAIT Zell Funktionen

In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse von Fergusson et al., wonach MAIT Zellen trotz hoher MDR1 Expression nicht resistent gegenüber IS sind (13), bestätigt und erweitert werden. In vitro zeigte sich nach Zytokinstimulation lediglich unter Vorinkubation mit Pred eine signifikante Funktionseinschränkung von MAIT Zellen, während diese nach antigenspezifischer Stimulation auch bei Inkubation mit Calcineurininhibitoren bestand. Dieser Unterschied kann durch die verschiedenen pharmakologischen Wirkmechanismen der jeweiligen IS erklärt werden. Antigen-spezifische Stimulation von MAIT Zellen erfolgt hauptsächlich TCR-abhängig, wobei Calcineurin wesentlicher Bestandteil der Aktivierungskaskade ist und diese entsprechend von Calcineurininhibitoren unterbunden wird (67). Auch Glucocorticoide hemmen TCR-abhängige Signalwege in T-Zellen, beispielsweise über Inhibition des Aktivator Protein 1 (zusammengefasst in (68)). Eine teilweise erhaltene Zytokinproduktion von MAIT Zellen unter IS könnte damit erklärt werden, dass MAIT Zellen nach E. coli Stimulation auch MR1-unabhängig aktiviert werden können, wie in MR1-Blockade Experimenten gezeigt wurde (vergleiche Sattler, Thiel et al. (50)). Diese TCR-unabhängige Aktivierung erfolgt durch Koexpression anderer Zytokine, beispielsweise von IL12 und IL18 (69). Die unter anderem NF κ B-vermittelte Zytokinexpression nach Zytokinstimulation konnte in vitro nur durch Pred gehemmt werden, welches die Translokation jenes Transkriptionsfaktors in den Zellkern hemmt (zusammengefasst in (34)). Ex vivo waren sowohl Zytokinproduktion als auch Polyfunktionalität unabhängig von der jeweiligen IS reduziert (Verweis auf Abb.). Neben der direkten Wirkung der IS könnte hier der oben beschriebene anerge Phänotyp ursächlich sein. Dafür spricht, dass auch in tol PatientInnen die Zytokinproduktion supprimiert und der Erschöpfungsmarker PD1 weiterhin erhöht waren. In longitudinaler Betrachtung konnte nach Absetzen der IS eine verbesserte Effektormolekülproduktion beobachtet werden, welche mit abnehmenden Frequenzen von aktivierten HLA-DR/CD38⁺ MAIT Zellen, aber weiterhin erhöhten Anteilen PD1⁺ Zellen koinzidierte. Deshalb ist zusätzlich von einem direkten Einfluss der IS auf die MAIT Zell

Zytokinproduktion auszugehen. Außerdem könnte der weiterhin bestehende funktionell erschöpfte Phänotyp erklären, warum die Zytokinproduktion von MAIT Zellen in tol PatientInnen nicht das Niveau von MAIT Zellen gesunder SpenderInnen erreichte. Interessanterweise blieb das zytotoxische Potential von MAIT Zellen, welches über die Messung von GrB nach Stimulation erfasst wurde, von der IS weitestgehend unbeeinträchtigt. Lediglich in vitro nach E. coli Stimulation zeigte sich eine signifikante Suppression nach Vorinkubation mit Pred, welche ex vivo nicht beobachtbar war (vergleiche Sattler, Thiel et al. (50)). Im Gegensatz dazu zeigte sich die Degranulation von MAIT Zellen, hier untersucht über den Degranulationsmarker CD107a, ex vivo unabhängig von der jeweiligen IS beeinträchtigt und erholte sich leicht nach Absetzen der IS. Somit konnte erstmals eine Beeinträchtigung der zytotoxischen Aktivität von MAIT Zellen durch IS gezeigt werden, welche bereits bei CD8⁺ T-Zellen nach in vitro Vorinkubation mit Pred oder Tac bekannt ist (70). Insgesamt konnte somit eine reduzierte MAIT Zell Funktion, sowohl nach TCR-abhängiger als auch TCR-unabhängiger Stimulation, nach Lebertransplantation demonstriert werden.

7.4 **Klinische Implikationen beeinträchtigter MAIT Zell Biologie**

Die Folgen einer gestörten MAIT Zell Biologie für den menschlichen Organismus sind noch wenig untersucht und Gegenstand aktueller Forschung. Angesichts der Interaktion von MAIT Zellen mit multiplen, im Kontext einer LTx relevanten, Erregern ist es wahrscheinlich, dass eine Depletion dieser Population zur erhöhten Infektanfälligkeit lebertransplantierte PatientInnen beiträgt. Dafür spricht, dass in nierentransplantierten PatientInnen mit chronischen Harnwegsinfektionen funktionell beeinträchtigte MAIT Zellen nachweisbar waren (71). Außerdem wurde eine erhöhte Anfälligkeit für pulmonale Tuberkuloseinfektionen im Kontext einer Immunkompromittierung durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) (72) sowie schwerere Krankheitsverläufe von Pseudomonas aeruginosa Infektionen bei Mukoviszidose PatientInnen (73) mit einem Mangel an MAIT Zellen assoziiert. Eine Hauptursache des eingeschränkten Langzeitüberlebens lebertransplantierte PatientInnen sind die chronische Abstoßungsreaktion sowie inflammatorische Prozesse in der Leber, welche im Verlauf auftreten können (zusammengefasst in (74)). Insofern könnten eine Reduktion und Funktionseinschränkung von MAIT Zellen auch positive Effekte haben, da diese bei chronischem Leberschaden proinflammatorische und profibrotische Eigenschaften aufweisen (27) und somit den Funktionsverlust eines Transplantats beschleunigen könnten. Zur Beantwortung der Frage, inwieweit sich eine MAIT Zell Beeinträchtigung effektiv auf Infektanfälligkeit und Transplantatüberleben nach LTx auswirkt,

sind perspektivisch weitere Studien vonnöten. Ein weiterer Ansatzpunkt für zukünftige Forschung wären prospektive Untersuchungen zu Auswirkungen einer Dysbiose Therapie auf MAIT Zellen und Infektanfälligkeit lebertransplantiertes SpenderInnen.

7.5 Potential von MAIT Zellen als Biomarker für Toleranz

In der vorliegenden Arbeit waren MAIT Zellen lebertransplantiertes PatientInnen depletiert und funktionell beeinträchtigt. Dabei zeigten sich ähnliche Expressionsmuster in immunsupprimierten und tol PatientInnen, wobei nach Weaning ein weiterer Anstieg von PD1 sowie eine Normalisierungstendenz verschiedener Aktivierungsmarker auffällig waren. Insgesamt ergeben sich aus diesen Beobachtungen lediglich Anhaltspunkte hinsichtlich für eine Toleranzentwicklung prädiktive MAIT Zell Attribute, welche in weiteren Studien untersucht werden sollten. Es konnte jedoch an anderer Stelle gezeigt werden, dass eine starke MAIT Zell Depletion bei PatientInnen mit HepB-assoziiertem Leberversagen Prädiktor für ein schlechteres Gesamtüberleben war (53). Im Kontext einer autologer Stammzelltransplantation wurde außerdem festgestellt, dass hohe MAIT Zell Frequenzen vor Therapiebeginn mit signifikant niedrigeren CRP Werten, kürzer andauernden Fiebersymptomen sowie verkürzter antibiotischer Therapie nach Transplantation assoziiert waren (75). Longitudinale Analysen von MAIT Zell Frequenzen vor und nach LTx sowie im weiteren Verlauf könnten zeigen, inwieweit diese Erkenntnisse auf das hier untersuchte Setting übertragbar sind.

7.6 Limitationen der Studie

Bezüglich der Aussagekraft dieser Arbeit ergeben sich verschiedene Limitationen. Zunächst erfolgten keine Stimulationen isolierter MAIT Zellen, sondern von kompletten PBMCs, sodass eine indirekte Beeinflussung der MAIT Zell Aktivierung durch Auswirkungen der IS auf andere Zellen nicht auszuschließen ist. Weiterhin erfolgte die Klassifikation von PatientInnen als tolerant auf Basis der Kriterien operationaler Toleranz, welche durch Klinik und laborchemische Parameter festgelegt, aus medizinisch-ethischen Gründen jedoch nur teilweise bioptisch bestätigt wurde. Angesichts geringer Sensitivität und Spezifität der durchgeführten laborchemischen und klinischen Untersuchungen hinsichtlich der Detektion einer chronischen Abstoßungsreaktion (zusammengefasst in (37)) kann ein Vorliegen dieser nicht definitiv ausgeschlossen werden. Ein weiterer Nachteil fehlender Leberbiopsien ist, dass ausschließlich MAIT Zellen im Blut analysiert werden konnten. Daten von Huang et al. deuten jedoch daraufhin, dass Ergebnisse hinsichtlich der hier durchgeführten quantitativen und qualitativen MAIT Zell Untersuchungen größtenteils auf in der Leber residente MAIT Zellen übertragen werden können (65). Ferner sollte bei der

Interpretation der Daten berücksichtigt werden, dass die hier gewählte Referenzpopulation bezüglich des Alters, nicht jedoch hinsichtlich der Geschlechterverteilung mit den untersuchten Patientengruppen übereinstimmen. Diese Diskrepanz kann jedoch teilweise vernachlässigt werden, da das Geschlecht im Gegensatz zum Lebensalter keine Auswirkungen auf MAIT Zell Frequenzen hat (76). Schließlich ist anzumerken, dass in dieser Arbeit durchgeführte statistische Analysen aufgrund der niedrigen Zahl untersuchter ProbandInnen eingeschränkt aussagekräftig sind. Die abgebildeten Unterschiede zeigen zwar deutliche Trends, formal sollten diese jedoch in Untersuchungen mit größeren Fallzahlen bestätigt werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
2. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med.* 1993;178(1):1-16.
3. Kurioka A, Walker LJ, Klenerman P, Willberg CB. MAIT cells: new guardians of the liver. *Clin Transl Immunology.* 2016;5(8):e98.
4. Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, Affaticati P, Gilfillan S, Lantz O. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature.* 2003;422(6928):164-9.
5. Corbett AJ, Eckle SB, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, Chen Z, Reantragoon R, Meehan B, Cao H, Williamson NA, Strugnell RA, Van Sinderen D, Mak JY, Fairlie DP, Kjer-Nielsen L, Rossjohn J, McCluskey J. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature.* 2014;509(7500):361-5.
6. Tsukamoto K, Deakin JE, Graves JA, Hashimoto K. Exceptionally high conservation of the MHC class I-related gene, MR1, among mammals. *Immunogenetics.* 2013;65(2):115-24.
7. Martin E, Treiner E, Duban L, Guerri L, Laude H, Toly C, Premel V, Devys A, Moura IC, Tilloy F, Cherif S, Vera G, Latour S, Soudais C, Lantz O. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol.* 2009;7(3):e54.
8. Tilloy F, Treiner E, Park S-H, Garcia C, Lemonnier F, de la Salle H, Bendelac A, Bonneville M, Lantz O. An Invariant T Cell Receptor α Chain Defines a Novel TAP-independent Major Histocompatibility Complex Class Ib-restricted α/β T Cell Subpopulation in Mammals. *The Journal of Experimental Medicine.* 1999;189(12):1907-21.
9. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Peguillet I, Premel V, Louis D, Milder M, Le Bourhis L, Soudais C, Treiner E, Lantz O. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood.* 2011;117(4):1250-9.
10. Billerbeck E, Kang YH, Walker L, Lockstone H, Grafmueller S, Fleming V, Flint J, Willberg CB, Bengsch B, Seigel B, Ramamurthy N, Zitzmann N, Barnes EJ, Thevanayagam J, Bhagwanani A, Leslie A, Oo YH, Kollnberger S, Bowness P, Drognitz O, Adams DH, Blum HE, Thimme R, Klenerman P. Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(7):3006-11.
11. Godfrey DI, Koay HF, McCluskey J, Gherardin NA. The biology and functional importance of MAIT cells. *Nat Immunol.* 2019;20(9):1110-28.
12. Gold MC, Eid T, Smyk-Pearson S, Eberling Y, Swarbrick GM, Langley SM, Streeter PR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. Human thymic MR1-restricted MAIT cells are innate pathogen-reactive effectors that adapt following thymic egress. *Mucosal Immunology.* 2012;6(1):35-44.
13. Fergusson JR, Ussher JE, Kurioka A, Klenerman P, Walker LJ. High MDR-1 expression by MAIT cells confers resistance to cytotoxic but not immunosuppressive MDR-1 substrates. *Clin Exp Immunol.* 2018;194(2):180-91.
14. Sattler A, Thiel LG, Ruhm AH, Souidi N, Seifert M, Herberth G, Kotsch K. The TL1A-DR3 Axis Selectively Drives Effector Functions in Human MAIT Cells. *The Journal of Immunology.* 2019.
15. Wallington JC, Williams AP, Staples KJ, Wilkinson TMA. IL-12 and IL-7 synergize to control mucosal-associated invariant T-cell cytotoxic responses to bacterial infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(6):2182-95 e6.
16. van Wilgenburg B, Scherwitzl I, Hutchinson EC, Leng T, Kurioka A, Kulicke C, de Lara C, Cole S, Vasanawathana S, Limpitikul W, Malasit P, Young D, Denney L, Moore MD, Fabris

- P, Giordani MT, Oo YH, Laidlaw SM, Dustin LB, Ho L-P, Thompson FM, Ramamurthy N, Mongkolsapaya J, Willberg CB, Sreaton GR, Klenerman P. MAIT cells are activated during human viral infections. *Nature Communications*. 2016;7(1).
17. Ussher JE, van Wilgenburg B, Hannaway RF, Ruustal K, Phalora P, Kurioka A, Hansen TH, Willberg CB, Phillips RE, Klenerman P. TLR signaling in human antigen-presenting cells regulates MR1-dependent activation of MAIT cells. *Eur J Immunol*. 2016;46(7):1600-14.
 18. Wilson RP, Ives ML, Rao G, Lau A, Payne K, Kobayashi M, Arkwright PD, Peake J, Wong M, Adelstein S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Picard C, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Gray P, Stepensky P, Warnatz K, Freeman AF, Rossjohn J, McCluskey J, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Ma CS, Tangye SG, Deenick EK. STAT3 is a critical cell-intrinsic regulator of human unconventional T cell numbers and function. *J Exp Med*. 2015;212(6):855-64.
 19. Hinks TSC, Zhang XW. MAIT Cell Activation and Functions. *Front Immunol*. 2020;11:1014.
 20. Lamichhane R, Schneider M, de la Harpe SM, Harrop TWR, Hannaway RF, Dearden PK, Kirman JR, Tyndall JDA, Vernall AJ, Ussher JE. TCR- or Cytokine-Activated CD8(+) Mucosal-Associated Invariant T Cells Are Rapid Polyfunctional Effectors That Can Coordinate Immune Responses. *Cell Rep*. 2019;28(12):3061-76 e5.
 21. Leng T, Akther HD, Hackstein CP, Powell K, King T, Friedrich M, Christoforidou Z, McCuaig S, Neyazi M, Arancibia-Carcamo CV, Hagel J, Powrie F, Oxford IBDI, Peres RS, Millar V, Ebner D, Lamichhane R, Ussher J, Hinks TSC, Marchi E, Willberg C, Klenerman P. TCR and Inflammatory Signals Tune Human MAIT Cells to Exert Specific Tissue Repair and Effector Functions. *Cell Rep*. 2019;28(12):3077-91 e5.
 22. Hernandez Mdel P, Martin P, Simkins J. Infectious Complications After Liver Transplantation. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2015;11(11):741-53.
 23. Jahreis S, Bottcher S, Hartung S, Rachow T, Rummeler S, Dietl AM, Haas H, Walther G, Hochhaus A, von Lilienfeld-Toal M. Human MAIT cells are rapidly activated by *Aspergillus* spp. in an APC-dependent manner. *Eur J Immunol*. 2018;48(10):1698-706.
 24. Meermeier EW, Harriff MJ, Karamooz E, Lewinsohn DM. MAIT cells and microbial immunity. *Immunology and Cell Biology*. 2018;96(6):607-17.
 25. Ussher JE, Willberg CB, Klenerman P. MAIT cells and viruses. *Immunol Cell Biol*. 2018;96(6):630-41.
 26. Vacchini A, Chancellor A, Spagnuolo J, Mori L, De Libero G. MR1-Restricted T Cells Are Unprecedented Cancer Fighters. *Front Immunol*. 2020;11:751.
 27. Hegde P, Weiss E, Paradis V, Wan J, Mabire M, Sukriti S, Rautou PE, Albuquerque M, Picq O, Gupta AC, Ferrere G, Gilgenkrantz H, Kiaf B, Toubal A, Beaudoin L, Letteron P, Moreau R, Lehuen A, Lotersztajn S. Mucosal-associated invariant T cells are a profibrogenic immune cell population in the liver. *Nat Commun*. 2018;9(1):2146.
 28. Jochmans I, van Rosmalen M, Pirenne J, Samuel U. Adult Liver Allocation in Eurotransplant. *Transplantation*. 2017;101(7):1542-50.
 29. Rana A, Ackah RL, Webb GJ, Halazun KJ, Vierling JM, Liu H, Wu MF, Yoeli D, Kueht M, Mindikoglu AL, Sussman NL, Galvan NT, Cotton RT, O'Mahony CA, Goss JA. No Gains in Long-term Survival After Liver Transplantation Over the Past Three Decades. *Ann Surg*. 2019;269(1):20-7.
 30. Gelson W, Hoare M, Dawwas MF, Vowler S, Gibbs P, Alexander G. The pattern of late mortality in liver transplant recipients in the United Kingdom. *Transplantation*. 2011;91(11):1240-4.
 31. Boucault L, Bézie S, Ossart J, Guillonneau C. Tolerance in Organ Transplantation. *Frontiers in Transplantation* 2016.

32. Wiesner RH, Fung JJ. Present state of immunosuppressive therapy in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2011;17 Suppl 3:S1-9.
33. Lo A, Burckart GJ. P-glycoprotein and drug therapy in organ transplantation. *J Clin Pharmacol.* 1999;39(10):995-1005.
34. Smith L. Corticosteroids in Solid Organ Transplantation: Update and Review of the Literature. *Journal of Pharmacy Practice.* 2016;16(6):380-7.
35. Post DJ, Douglas DD, Mulligan DC. Immunosuppression in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2005;11(11):1307-14.
36. Levitsky J, Feng S. Tolerance in clinical liver transplantation. *Hum Immunol.* 2018;79(5):283-7.
37. Banff Working G, Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO, Clouston A, Charlotte F, Czaja A, Daskal I, El-Monayeri MS, Fontes P, Fung J, Gridelli B, Guido M, Haga H, Hart J, Honsova E, Hubscher S, Itoh T, Jhala N, Jungmann P, Khettry U, Lassman C, Ligato S, Lunz JG, 3rd, Marcos A, Minervini MI, Molne J, Nalesnik M, Nasser I, Neil D, Ochoa E, Pappo O, Randhawa P, Reinholt FP, Ruiz P, Sebahg M, Spada M, Sonzogni A, Tsamandas AC, Wernerson A, Wu T, Yilmaz F. Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. *Hepatology.* 2006;44(2):489-501.
38. Leventhal JR, Mathew JM. Outstanding questions in transplantation: Tolerance. *Am J Transplant.* 2020;20(2):348-54.
39. Turtle CJ, Swanson HM, Fujii N, Estey EH, Riddell SR. A distinct subset of self-renewing human memory CD8+ T cells survives cytotoxic chemotherapy. *Immunity.* 2009;31(5):834-44.
40. Hinks TS, Wallington JC, Williams AP, Djukanovic R, Staples KJ, Wilkinson TM. Steroid-induced Deficiency of Mucosal-associated Invariant T Cells in the Chronic Obstructive Pulmonary Disease Lung. Implications for Nontypeable *Haemophilus influenzae* Infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194(10):1208-18.
41. Le Bourhis L, Dusseaux M, Bohineust A, Bessoles S, Martin E, Premel V, Core M, Sleurs D, Serriari NE, Treiner E, Hivroz C, Sansonetti P, Gougeon ML, Soudais C, Lantz O. MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003681.
42. van Wilgenburg B, Scherwitzl I, Hutchinson EC, Leng T, Kurioka A, Kulicke C, de Lara C, Cole S, Vasanawathana S, Limpitikul W, Malasit P, Young D, Denney L, consortium S-H, Moore MD, Fabris P, Giordani MT, Oo YH, Laidlaw SM, Dustin LB, Ho LP, Thompson FM, Ramamurthy N, Mongkolsapaya J, Willberg CB, Screatton GR, Klenerman P. MAIT cells are activated during human viral infections. *Nat Commun.* 2016;7:11653.
43. Le Bourhis L, Martin E, Peguillet I, Guihot A, Froux N, Core M, Levy E, Dusseaux M, Meyssonier V, Premel V, Ngo C, Riteau B, Duban L, Robert D, Huang S, Rottman M, Soudais C, Lantz O. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol.* 2010;11(8):701-8.
44. Pruthi J, Medkiff KA, Esrason KT, Donovan JA, Yoshida EM, Erb SR, Steinbrecher UP, Fong TL. Analysis of causes of death in liver transplant recipients who survived more than 3 years. *Liver Transpl.* 2001;7(9):811-5.
45. Thomson AW, Vionnet J, Sanchez-Fueyo A. Understanding, predicting and achieving liver transplant tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(12):719-39.
46. Charlton M, Levitsky J, Aqel B, O'Grady J, Hemibach J, Rinella M, Fung J, Ghabril M, Thomason R, Burra P, Little EC, Berenguer M, Shaked A, Trotter J, Roberts J, Rodriguez-Davalos M, Rela M, Pomfret E, Heyrend C, Gallegos-Orozco J, Saliba F. International Liver Transplantation Society Consensus Statement on Immunosuppression in Liver Transplant Recipients. *Transplantation.* 2018;102(5):727-43.

47. Weist BJ, Wehler P, El Ahmad L, Schmueck-Henneresse M, Millward JM, Nienen M, Neumann AU, Reinke P, Babel N. A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients. *Kidney Int.* 2015;88(6):1293-303.
48. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(2):163-76.
49. 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(2):243-50.
50. Sattler A, Thiel LG, Ruhm AH, Bergmann Y, Dornieden T, Choi M, Halleck F, Friedersdorff F, Eurich D, Kotsch K. Mucosal Associated Invariant T Cells are Differentially Impaired in Tolerant and Immunosuppressed Liver Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2020.
51. Provine NM, Klenerman P. MAIT Cells in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2020;38:203-28.
52. Baron M, Belo R, Cathelin D, Moreira-Teixeira L, Cartery C, Rondeau E, Mesnard L, Leite-de-Moraes M. Innate-like and conventional T cell populations from hemodialyzed and kidney transplanted patients are equally compromised. *PLoS One.* 2014;9(8):e105422.
53. Xue H, Li H, Ju LL, Han XD, Cheng TC, Luo X, Chen L, Shao JG, She YJ, Bian ZL. Mucosal-associated invariant T cells in hepatitis B virus-related liver failure. *World J Gastroenterol.* 2020;26(31):4703-17.
54. Niehaus CE, Strunz B, Cornillet M, Falk CS, Schnieders A, Maasoumy B, Hardtke S, Manns MP, Rm Kraft A, Bjorkstrom NK, Cornberg M. MAIT cells are enriched and highly functional in ascites of patients with decompensated liver cirrhosis. *Hepatology.* 2020.
55. Havenith SH, Yong SL, Henson SM, Piet B, Idu MM, Koch SD, Jonkers RE, Kragten NA, Akbar AN, van Lier RA, ten Berge IJ. Analysis of stem-cell-like properties of human CD161⁺⁺IL-18R α ⁺ memory CD8⁺ T cells. *Int Immunol.* 2012;24(10):625-36.
56. Konuma T, Kohara C, Watanabe E, Takahashi S, Ozawa G, Suzuki K, Mizukami M, Nagai E, Jimbo K, Kaito Y, Isobe M, Kato S, Takahashi S, Chiba A, Miyake S, Tojo A. Reconstitution of Circulating Mucosal-Associated Invariant T Cells after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Its Association with the Riboflavin Synthetic Pathway of Gut Microbiota in Cord Blood Transplant Recipients. *J Immunol.* 2020;204(6):1462-73.
57. Dekker L, de Koning C, Lindemans C, Nierkens S. Reconstitution of T Cell Subsets Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Cancers (Basel).* 2020;12(7).
58. Dias J, Sobkowiak MJ, Sandberg JK, Leeansyah E. Human MAIT-cell responses to *Escherichia coli*: activation, cytokine production, proliferation, and cytotoxicity. *J Leukoc Biol.* 2016;100(1):233-40.
59. Kriss M, Verna EC, Rosen HR, Lozupone CA. Functional Microbiomics in Liver Transplantation: Identifying Novel Targets for Improving Allograft Outcomes. *Transplantation.* 2019;103(4):668-78.
60. Kim JM, Kwon CHD, Joh JW, Choi GS, Kang ES, Lee SK. Comparative Peripheral Blood T Cells Analysis Between Adult Deceased Donor Liver Transplantation (DDLT) and Living Donor Liver Transplantation (LDLT). *Ann Transplant.* 2017;22:475-83.
61. Whitehouse GP, Hope A, Sanchez-Fueyo A. Regulatory T-cell therapy in liver transplantation. *Transpl Int.* 2017;30(8):776-84.
62. Dugast E, David G, Oger R, Danger R, Judor JP, Gagne K, Chesneau M, Degauque N, Soullillou JP, Paul P, Picard C, Guerif P, Conchon S, Giral M, Gervois N, Retiere C, Brouard S. Broad Impairment of Natural Killer Cells from Operationally Tolerant Kidney Transplanted Patients. *Front Immunol.* 2017;8:1721.

63. Oertel M, Kohlhaw K, Diepolder HM, Schroder S, Schwarz R, Tannapfel A, Mossner J, Hauss J, Berr F. Alloreactivity of natural killer cells in allogeneic liver transplantation. *Transplantation*. 2001;72(1):116-22.
64. Li W, Lin EL, Liangpunsakul S, Lan J, Chalasani S, Rane S, Puri P, Kamath PS, Sanyal AJ, Shah VH, Radaeva S, Crabb DW, Chalasani N, Yu Q. Alcohol Abstinence Does Not Fully Reverse Abnormalities of Mucosal-Associated Invariant T Cells in the Blood of Patients With Alcoholic Hepatitis. *Clin Transl Gastroenterol*. 2019;10(6):e00052.
65. Huang W, He W, Shi X, Ye Q, He X, Dou L, Gao Y. Mucosal-associated invariant T-cells are severely reduced and exhausted in humans with chronic HBV infection. *J Viral Hepat*. 2020.
66. Riva A, Patel V, Kurioka A, Jeffery HC, Wright G, Tarff S, Shawcross D, Ryan JM, Evans A, Azarian S, Bajaj JS, Fagan A, Patel V, Mehta K, Lopez C, Simonova M, Katzarov K, Hadzhiolova T, Pavlova S, Wendon JA, Oo YH, Klenerman P, Williams R, Chokshi S. Mucosa-associated invariant T cells link intestinal immunity with antibacterial immune defects in alcoholic liver disease. *Gut*. 2018;67(5):918-30.
67. Dutta D, Barr VA, Akpan I, Mittelstadt PR, Singha LI, Samelson LE, Ashwell JD. Recruitment of calcineurin to the TCR positively regulates T cell activation. *Nat Immunol*. 2017;18(2):196-204.
68. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):233-47.
69. Suliman S, Murphy M, Musvosvi M, Gela A, Meermeier EW, Geldenhuys H, Hopley C, Toefy A, Bilek N, Veldsman A, Hanekom WA, Johnson JL, Boom WH, Obermoser G, Huang H, Hatherill M, Lewinsohn DM, Nemes E, Scriba TJ. MR1-Independent Activation of Human Mucosal-Associated Invariant T Cells by Mycobacteria. *J Immunol*. 2019;203(11):2917-27.
70. Demmers MW, Korevaar SS, Betjes MG, Weimar W, Rowshani AT, Baan CC. Limited efficacy of immunosuppressive drugs on CD8+ T cell-mediated and natural killer cell-mediated lysis of human renal tubular epithelial cells. *Transplantation*. 2014;97(11):1110-8.
71. Terpstra ML, Remmerswaal EBM, van Aalderen MC, Wever JJ, Sinnige MJ, van der Bom-Baylon ND, Bemelman FJ, Geerlings SE. Circulating mucosal-associated invariant T cells in subjects with recurrent urinary tract infections are functionally impaired. *Immun Inflamm Dis*. 2020;8(1):80-92.
72. Eberhard JM, Kummer S, Hartjen P, Hüfner A, Diedrich T, Degen O, Lohse AW, van Lunzen J, Schulze zur Wiesch J. Reduced CD161+ MAIT cell frequencies in HCV and HIV/HCV co-infection: Is the liver the heart of the matter? *Journal of Hepatology*. 2016;65(6):1261-3.
73. Smith DJ, Hill GR, Bell SC, Reid DW. Reduced mucosal associated invariant T-cells are associated with increased disease severity and *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *PLoS One*. 2014;9(10):e109891.
74. Suhling H, Gottlieb J, Bara C, Taubert R, Jackel E, Schiffer M, Brasen JH. [Chronic rejection: Differences and similarities in various solid organ transplants]. *Internist (Berl)*. 2016;57(1):25-37.
75. Novak J, Dobrovolny J, Brozova J, Novakova L, Kozak T. Recovery of mucosal-associated invariant T cells after myeloablative chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Clin Exp Med*. 2016;16(4):529-37.
76. Chen P, Deng W, Li D, Zeng T, Huang L, Wang Q, Wang J, Zhang W, Yu X, Duan D, Wang J, Xia H, Chen H, Huang W, Li J, Zhang D, Zhong XP, Gao J. Circulating Mucosal-Associated Invariant T Cells in a Large Cohort of Healthy Chinese Individuals From Newborn to Elderly. *Front Immunol*. 2019;10:260.

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lion Gabriel Thiel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „MAIT-Zellbiologie im Kontext von Lebertransplantation“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

10 Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Lion Gabriel Thiel hatte folgenden Anteil an der Publikation

Sattler A*, Thiel LG*, Ruhm AH, Bergmann Y, Dornieden T, Choi M, Halleck F, Friedersdorff F, Eurich D, Kotsch K. Mucosal Associated Invariant T Cells are Differentially Impaired in Tolerant and Immunosuppressed Liver Transplant Recipients. Am J Transplant. 2020.

- Literaturrecherche als Grundlage für die Planung und Konzeption aller Experimente sowie das Verfassen von Einleitung und Diskussion der oben genannten Publikation
- Ca 50% Anteil bei der Planung und Konzeption aller Experimente
- Organisation und Aufbereitung der verwendeten Immunsuppressiva
- Vollständige Etablierung und Durchführung der in vitro Assays inkl. Titrationsen von Immunsuppressiva, Zytokinen und Coli (Figures 1+2)
- 50% Anteil bei Akquise und Analyse (Phänotypisierung, Stimulationssays) der Blutproben freiwilliger SpenderInnen (n=10; Kontrollgruppen in Abbildungen)
- Hauptanteil bei Akquise und Analyse der Blutproben lebertransplantierter PatientInnen (n=53; Figures 3-6)
- Teilweise Akquise und Analyse der Blutproben nierentransplantierter PatientInnen (n=5; Figure 7)
- Vollständige Auswertung aller Daten und deren statistische Analyse
- Vollständige Erstellung der Abbildungen und Tabellen für die Publikation (Tables 1-3; Figures 1-7, Supplement 1-3)
- Mitarbeit beim Verfassen des Manuskripts (Abstract, Introduction, Results, Discussion), Hauptanteil beim Verfassen des Abschnitts Materials and Methods
- Mitarbeit beim Überarbeiten des Manuskripts im Rahmen der Revision

Unterschrift des Doktoranden

11 Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE, SSCI
Selected Categories: **“TRANSPLANTATION”** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 25 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION	12,436	8.578	0.027310
2	AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION	24,285	7.163	0.050970



Received: 11 February 2020 | Revised: 12 May 2020 | Accepted: 26 May 2020

DOI: 10.1111/ajt.16122

ORIGINAL ARTICLE

AJT

Mucosal associated invariant T cells are differentially impaired in tolerant and immunosuppressed liver transplant recipients

Arne Sattler^{1*} | Lion G. Thiel^{1*} | Annkathrin H. Ruhm¹ | Yasmin Bergmann¹ |
Theresa Dornieden¹ | Mira Choi² | Fabian Halleck² | Frank Friedersdorff³ |
Dennis Eurich⁴ | Katja Kotsch¹

¹Department for General, Visceral and Vascular Surgery, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

²Department for Nephrology and Internal Intensive Care, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

³Department for Urology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

⁴Department for Surgery, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

Correspondence

Arne Sattler
Email: ame.sattler@charite.de

Funding information

Bundesministerin für Wirtschaft und Energie, Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand, Grant/Award Number: ZF4245603AJ7; Sonnenfeldstiftung, Grant/Award Number: Personal student award to A.H.R.

Mucosal associated invariant T (MAIT-) cells represent a semi-invariant T cell population responsive to microbial vitamin B metabolite and innate cytokine stimulation, executing border tissue protection and particularly contributing to human liver immunity. The impact of immunosuppressants on MAIT cell biology alone and in context with solid organ transplantation has not been thoroughly examined. Here, we demonstrate that in vitro cytokine activation of peripheral MAIT cells from healthy individuals was impaired by glucocorticoids, whereas antigen-specific stimulation was additionally sensitive to calcineurin inhibitors. In liver transplant (LTx) recipients, significant depletion of peripheral MAIT cells was observed that was largely independent of the type and dosage of immunosuppression, equally applied to tolerant patients, and was reproducible in kidney transplant recipients. However, MAIT cells from tolerant LTx patients exhibited a markedly diminished ex vivo activation signature, associated with individual regain of functional competence toward antigenic and cytokine stimulation. Still, MAIT cells from tolerant and treated liver recipients exhibited high levels of PD1, accompanied by functional impairment particularly toward bacterial stimulation that also affected polyfunctionality. Our data suggest interlinked effects of primary liver pathology and immunosuppressive treatment on overall MAIT cell fitness after transplantation and propose their monitoring in context with tolerance induction protocols.

KEY WORDS

basic (laboratory) research/science, flow cytometry, immunobiology, immunosuppressant, immunosuppression/immune modulation, liver transplantation/hepatology, lymphocyte biology: activation, T cell biology, tolerance, translational research/science

Abbreviations: CyA or C, cyclosporine A; GranB, granzyme B; HC, healthy control(s); IS, immunosuppression; ISD, immunosuppressive drug; KTx, kidney transplant; LTx, liver transplant; MAIT cell, mucosal associated invariant T cell; MPA or M, mycophenolic acid; Pred or P, prednisolone; Tac or T, tacrolimus.

*These authors contributed equally.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2020 The Authors. American Journal of Transplantation published by Wiley Periodicals LLC on behalf of The American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons

1 | INTRODUCTION

Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells constitute an innate-like T cell subset in mammals¹ that is gaining increasing attention because of its unconventional antigen specificity² and an emerging role in host protection³ and tissue repair.⁴ MAIT cells are uniquely identified based on coexpression of a semi-invariant T cell receptor (TCR V α 7.2-J α 33 in humans⁵) along with the C-type lectin CD161 or interleukin 18 receptor alpha;⁶ they are restricted by the HLA-Ib major histocompatibility complex (MHC)-related protein I (MR1) presenting vitamin B metabolites produced by a multitude of microbes and fungi that employ the riboflavin synthesis pathway.² Accumulating data, including our own,^{7,8} indicate that alternative activation modes via inflammatory cytokines exist, positioning MAIT cells in between innate and adaptive immunity. Apart from their abundance in peripheral blood¹ and at mucosal surfaces such as in the intestine⁹ or lung,¹⁰ MAIT cells account for up to 45% of intrahepatic T cells^{6,11,12} where they likely contribute to an intestine-downstream firewall protecting bile ducts and sinusoids.¹³ Several studies have reported a disturbed MAIT cell biology in liver diseases; as a common motif, MAIT cells are significantly depleted from the periphery in autoimmune hepatitis, primary biliary cholangitis, alcoholic liver disease, or chronic hepatitis C, a phenomenon being associated with changes in their functional repertoire.¹⁴⁻¹⁷ So far, it has not been addressed whether MAIT cell homeostasis is restored in transplanted individuals and how diverse immunosuppressive regimens affect its reconstitution. Based on prominent expression of the multidrug resistance protein 1, MAIT cells are protected from xenotoxic stress, for example, induced by common cytostatic therapy.⁶ With respect to immunosuppressive agents, however, there is only limited information on how these drugs affect MAIT cell effector functions *in vitro* and *in vivo*.

Given their emerging role in host protection, we studied peripheral MAIT cell responses toward bacterial and innate cytokine stimuli in the presence of common immunosuppressive medication in healthy individuals *in vitro*. Furthermore, we comprehensively extended our analysis to the examination of peripheral blood derived MAIT cell frequencies, activation state, and effector functions in immunosuppressed and tolerant liver transplant recipients *ex vivo*. Although not exactly reflecting intra-organ biology, our choice of peripheral MAIT cell analysis overcomes experimental limitations imposed by biopsy material, enables repeated sampling, and allows direct comparison with the aforementioned studies on liver diseases. Our data pave the way toward understanding how immunosuppressive therapy and/or the postorgan transplantation state per se affects MAIT cell biology—with possible implications for immunological competence of patients at risk of opportunistic infections.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Study approval

The study protocol was approved by the ethics committee of the Charité-Universitätsmedizin Berlin (No. EA2/028/13, EA2/035/16 and

EA4/127/17) and carried out in compliance with its guidelines. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

2.2 | Study participants

Details of individuals enrolled are summarized in Tables 1-3. Liver transplant (LTx) recipients initially diagnosed with hepatitis C virus (HCV) infection did not show viral reactivation at least within 3 years prior to the study. For some analyses, LTx patients treated with immunosuppression (IS) drugs were grouped according to drug levels. Group 1 included patients with serum levels of tacrolimus (Tac) < 3 ng/mL or cyclosporine A (CyA) < 50 ng/mL \pm up to 500 mg mycophenolate mofetil (MMF) (1-0-1), Group 2 with Tac 3-5 ng/mL or CyA 50-100 ng/mL \pm up to 500 mg MMF (1-0-1), Group 3 with Tac > 5 ng/mL or CyA > 100 ng/mL \pm up to 500 mg MMF (1-0-1).

2.3 | Cell isolation

Peripheral blood was collected from liver and kidney transplanted individuals and from healthy controls; peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Paque™ density gradient centrifugation and freshly analyzed.

2.4 | Stimulation conditions

PBMC were cultured in RPMI1640 media containing 0.3 mg/mL glutamine, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, and 10% human AB serum (all Biochrom, Cambridge, UK). In all functional assays, cells were stimulated for 22 hours at 37°C. For cytokine stimulation, a combination of interleukin-12 (IL-12), IL-15 (5 ng/mL each, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), IL-18 (5 ng/mL, R&D, Minneapolis, MN), and TL1A (10 ng/mL, R&D) was used after determining optimal concentrations. Brefeldin A (BrefA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was present for the last 4 hours. Bacterial stimulation was performed with formalin-fixed *E. coli* (lab strain DH5 α) at a pretitrated multiplicity of infection of 30 in the presence of anti-CD28 (1 μ g/mL, 28.2, Biolegend, San Diego, CA) for costimulation. Specificity of bacterial stimulation was controlled by adding anti-MR1 (10 μ g/mL, 26.5, Biolegend) or isotype control prior to bacterial stimulation. BrefA and Monensin (GolgiStop™, BD Biosciences, San Jose, CA) were added after 4 hours, enabling optimal CD107a and cytokine staining. In some experiments, PBMC were preincubated with immediate posttransplant consensus concentrations (based on Refs. 18 and 19-21 and according to local hospital guidelines) of tacrolimus (10 ng/mL, Astellas Pharma, Tokyo, Japan, Prograf®), cyclosporin A (120 ng/mL, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), mycophenolic acid (2.7 μ g/mL, Sigma-Aldrich), or prednisolone (Prednisolut®, 0.57 μ g/mL, Mibe, Sandersdorf-Brehna, Germany) for 2 hours and subsequently stimulated as described previously. Drug concentrations were titrated as indicated.

TABLE 1 Characteristics of LTx patients and healthy donors

Variable	All patients (n = 58)	Tolerant patients (n = 8)	Healthy donors (n = 19)
Age (y ± SD) ^a	61.78 (11.75)	63.8 (10.3)	61.26 (6.51)
Gender (females) ^b	21/58 (36.2%)	1/8 (12.5%)	10/19 (52.6%)
Time since transplantation (y ± SD) ^a	12.59 (7.2)	17.3 (5.5)	
Tolerant group (IS-free) ^b		8/58 (13.8%)	
Tolerant group: mean IS-free time ^c		36.8 (75.6)	
IS group 1 ^{b,d}	20/58 (34.5%)		
IS group 2 ^{b,d}	19/58 (32.8%)		
IS group 3 ^{b,d}	11/58 (19%)		
IS medication ^b			
Tacrolimus + mycophenolate mofetil	19/58 (32.8%)		
Tacrolimus	16/58 (27.6%)		
None	8/58 (13.8%)		
Mycophenolate mofetil	6/58 (10.3%)		
Cyclosporin A + mycophenolate mofetil	5/58 (8.6%)		
Cyclosporin A	4/58 (6.9%)		
Primary disease ^b			
Nutritive-toxic cirrhosis	13/58 (22.4%)		
Hepatitis C	11/58 (19%)	5 (62.5%)	
Hepatocellular carcinoma	9/58 (15.5%)	1 (12.5%)	
Hepatitis B	9/58 (15.5%)	1 (12.5%)	
Primary biliary cholangitis	4/58 (6.9%)		
Cryptogenic cirrhosis	3/58 (5.2%)	1 (12.5%)	
Alpha-1 antitrypsin deficiency	2/58 (3.4%)		
Primary sclerosing cholangitis	2/58 (3.4%)		
Budd-Chiari syndrome	1/58 (1.7%)		
Caroli syndrome	1/58 (1.7%)		
Chemotherapy-induced cirrhosis	1/58 (1.7%)		
Secondary biliary cirrhosis	1/58 (1.7%)		
Wilson's disease	1/58 (1.7%)		

Abbreviations: IS, immunosuppression; LTx, liver transplant.

^aMean ± SD.

^bCount (%).

^cMonths ± SD.

^dFor characterization of IS groups, see materials and methods section.

2.5 | Flow cytometric analysis

For surface stainings, antibodies against CD3 (SK7, Biolegend), CD4 (SK3, Becton Dickinson), CD8 (SK1, Ebioscience, San Diego, CA), CD8β (SID18BEE, eBioscience), CD25 (BC96, Biolegend), CD27 (M-T271, Biolegend), CD38 (HIT2, BD), CD45RA (HI100, Biolegend), CD56 (5.1H11, Biolegend), CD69 (FN50, Biolegend),

CD103 (Ber-ACT8, Biolegend), CD161 (HP-3G10, Biolegend), TCRVα7.2 (3C10, Biolegend), IL-18Rα (H44, Biolegend), CCR7 (3D12, BD), KLRG1 (SA231A2, Biolegend), NKG2D (1D11, Biolegend), HLA-DR (L243, Biolegend), and PD1 (EH12.1, BD) were used. Unwanted cells were excluded via a "dump channel" containing CD14⁺ (M5E2, Biolegend), CD19⁺ (HIB19, Biolegend) and dead cells (fixable live/dead, Biolegend). The basic gating

TABLE 2 Characteristics of IS-free LTx patients

Patient number	01	02 ^a	03 ^a	04	05	06	07	08 ^a
Age (y)	53	61	75	46	74	64	72	65
Gender (m/f)	m	m	m	f	m	m	m	m
Time since Tx (y)	19	9	14	26	12	22	22	14
IS-free time (mo)	19	6	9	223	9	21	3	4
Primary disease	HCV	Crypt.	HCV	HBV	HCV	HCV	HCC	HCV
Biopsy	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No
Rejection	No	No	No	No	n.a.	No	n.a.	n.a.
Liver function ^b								
gGT (U/L)	211	300	52	27	20	17	14	28
AP (U/L)	158	135	56	86	75	62	48	73
Total bilirubin (mg/dL)	0.7	0.8	1.1	1.11	0.63	0.6	1.61	0.15
ALT/AST (U/L)	36/43	38/48	30/31	23/31	18/28	13/21	34/33	23/20
INR	1.03	0.92	1.14	1.35	0.99	1.23	1.12	n.d.

Abbreviations: ALT/AST, aspartate transaminase/alanine transaminase; AP, alkaline phosphatase; gGT, Gamma-glutamyltransferase; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; INR, international normalized ratio; IS, immunosuppression; LTx, liver transplant; n.a., not applicable; n.d. not determined.

^aWeaned during the study.

^bAt time of cellular analysis.

strategy to identify MAIT cells and other subsets within PBMC is shown in Figure S1A.

After stimulation, cells were fixed in FACS™ Lysing Solution (BD), permeabilized with FACS™ Perm II Solution (BD), and intracellularly stained with anti-tumor necrosis factor alpha (anti-TNF α) (MAb11, Biolegend), anti-interferon gamma (anti-IFN γ) (4SB3, Ebioscience), anti-granzymeB (GB11, BD), and anti-IL-17 (BL168, Biolegend). Where indicated, granzymeB or activated Caspase 3 (C92-605, BD) were intracellularly assessed ex vivo. For assessing expression of FoxP3 (150D, Biolegend), CTLA-4 (BN13, Biolegend), and/or Ki67 (B56, BD), cells were fixed and permeabilized using the Foxp3 staining buffer set (Ebioscience). Cells were analyzed on a FACS™ Fortessa X20 (BD).

2.6 | Data analysis

FACS data were analyzed with FlowJo 10 (BD); polyfunctionality was assessed via Boolean gating. Statistical analysis and graph creation were conducted using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad, La Jolla, CA). The Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate the distribution of each parameter. Depending on Gaussian distribution, analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test (with Dunn post hoc) was chosen for multiple comparisons; for 2-group comparisons with unpaired samples, t test with Welch's correction or Mann-Whitney test was used. For analysis of paired data (eg, titrations), paired t test or Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed depending on data distribution. In all tests, a value of $P < .05$ was

considered significant with * $P \leq .05$, ** $P \leq .01$, *** $P \leq .001$, and **** $P \leq .0001$.

3 | RESULTS

3.1 | Impairment of cytokine-induced MAIT cell functions by immunosuppressive drugs in vitro

To address the functional impact of immunosuppressive agents used in clinical routine after solid organ transplantation on human MAIT cells, PBMC from healthy donors were preincubated with tacrolimus, cyclosporine A, mycophenolic acid, or prednisolone. Thereafter, cells were stimulated with pretitrated (data not shown) concentrations of IL-12, IL-15, IL-18, and TL1A, a cytokine combination robustly inducing the effector molecules TNF α , IFN γ , and granzymeB in MAIT cells in a T cell receptor independent fashion.^{7,8} Whereas prednisolone significantly inhibited TNF α and IFN γ secretion but did not reduce frequencies of MAIT cells producing the cytotoxic mediator granzymeB, none of the other drugs affected MAIT cell functionality (Figure 1A-D). Titration of immunosuppressive agents revealed that increasing concentrations by 10-fold further diminished TNF α ⁺ MAIT cell frequencies significantly only in the presence of prednisolone (Figure S1B); higher concentrations of immunosuppressants did not show additional effects on frequencies of IFN γ ⁺ or granzymeB⁺ cells (data not shown). Only prednisolone significantly affected multipotency of MAIT cells as mirrored by diminished portions of cells coexpressing all 3

TABLE 3 Characteristics of KTx patients

Variable	Patients (n = 23)
Age (y ± SD) ^a	58.57 (11.7)
Gender (females) ^b	8/23 (34.8%)
Time since transplantation (y ± SD) ^a	9.3 (5.0)
IS medication ^b	
Tacrolimus + mycophenolate mofetil + prednisolone	11/23 (47.8%)
Cyclosporin A + mycophenolate mofetil + prednisolone	8/23 (34.8%)
Tacrolimus + mycophenolate mofetil	2/23 (8.7%)
Tacrolimus + prednisolone	2/23 (8.7%)
Primary disease ^b	
Hypertensive nephropathy	5/23 (21.7%)
IgA nephropathy	3/23 (13%)
Glomerulonephritis	3/23 (13%)
Pyelonephritis	2/23 (8.7%)
Polycystic kidney disease	2/23 (8.7%)
Unknown	2/23 (8.7%)
Cystinosis	1/23 (4.3%)
Diabetic nephropathy	1/23 (4.3%)
Diabetic + hypertensive nephropathy	1/23 (4.3%)
Focal segmental glomerulosclerosis	1/23 (4.3%)
Obstructive nephropathy	1/23 (4.3%)
Systemic lupus erythematosus	1/23 (4.3%)

Abbreviations: IS, immunosuppression; KTx, kidney transplant.

^aMean ± SD.

^bCount (%).

effector molecules (Figure 1E,F), accompanied by an increase of cells expressing only one or no effector molecule (Figure 1F). Unless otherwise stated, live CD3⁺TCRV α 7.2⁺CD161⁺ CD8⁺ and CD8⁻CD4⁻ “DN” MAIT cells were identified within PBMC as depicted in the gating strategy in Figure S1A.

3.2 | Impairment of *E. coli* induced MAIT cell functions by immunosuppressive drugs in vitro

To decipher whether immunosuppressants influence MAIT cell functions induced by antigenic triggering, PBMC of healthy individuals were activated with formalin-fixed *E. coli*. IL-17 and the degranulation marker CD107a were included in the analysis being typically induced after TCR-dependent MAIT cell activation. Under these conditions, Tac, CyA, and prednisolone (Pred) significantly diminished frequencies of TNF α ⁺ and IL-17⁺ MAIT cells, whereas Tac and Pred also significantly reduced portions of IFN γ ⁺ cells; granzymeB expression was impaired only by Pred. Interestingly, the capacity of MAIT cells to release cytotoxic granula, being reflected by CD107a staining, was not affected by any of the drugs applied (Figure 2A-F). A dose dependency of immunosuppressive

agents on frequencies of TNF α ⁺ MAIT cells was evident for both Tac, CyA and Pred (Figure S1C). In context with bacterial stimulation, polyfunctionality of MAIT cells was significantly diminished following preincubation with Tac and CyA and moderately affected by Pred, as mirrored by reduced frequencies of cells expressing 4 effector molecules at a time (TNF α , IFN γ , granzymeB, and CD107a) (Figure 2G,H). As frequencies of IL-17⁺ MAIT cells were very low, they were excluded from polyfunctional analyses. In line with earlier reports,²² bacterial activation of MAIT cells proved to be largely, but not completely antigen-specific as mirrored by substantial, but not full abrogation of effector function upon MR1 blockade (Figure S1D).

3.3 | Depletion of peripheral MAIT cells in immunosuppressed and tolerant liver transplant recipients

To address how different immunosuppressive regimens affect MAIT cell biology in vivo, their frequencies were determined in treated liver transplant recipients in comparison to a group of tolerant patients as well as to age-matched healthy controls (Tables 1 and 2). Overall, frequencies of TCRV α 7.2⁺CD161⁺ MAIT cells within the CD3⁺ T cell compartment were significantly reduced in LTx patients as compared to healthy controls (Figure 3B). This observation was largely independent of the type of IS regimen (Figure 3A,C) or the dosage of medication (Figure 3D) and equally accounted for tolerant patients (Figure 3A,C,D). These findings could be reproduced when only MAIT cells within the CD8⁺ and DN compartment were quantified (Figure 3F-H). For a limited number of LTx patients, we assessed MAIT cells during immunosuppressive therapy and 4-9 months after cessation (Table 2). After successful weaning from medication (as reflected by stable graft function), we did not note consistent changes in MAIT cell frequencies both within the CD3⁺ and the CD8⁺/DN compartment (Figure 3E,I). Subset distribution analysis highlighted a significant rise in CD4⁺ MAIT cells (Figure 3J) in treated, but not tolerant LTx patients at the expense of the CD8⁺ population (Figure 3K), whereas the DN subset remained unaffected (Figure 3L). There was no significant correlation between MAIT cell frequencies and time since transplantation in all LTx patients (data not shown).

Contrary to MAIT cell subset distribution (Figure 3J,K), we observed an inverted ratio of conventional T cells with increased portions of CD8⁺ at the expense of the CD4⁺ population in all LTx patients regardless of being treated or not, as compared to healthy controls (Figure S2A,B). Whereas frequencies of CD3⁺CD56⁺ natural killer (NK) cells were similar in all groups (Figure S2C), we detected a significant drop of CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ natural regulatory T cells in patients treated with immunosuppressive drugs (ISDs) but not in tolerant patients, as compared to healthy controls (Figure S2D). Natural regulatory T cells (nTregs) of both patient groups were further characterized by significantly reduced portions of CTLA4, higher proliferation as mirrored by Ki67 expression, but no differences in frequencies of activated HLA-DR⁺ cells (Figure S2E-G). nTregs from all LTx patients showed a substantial reduction of the naïve CD45RA⁺CCR7⁺ subset, counterbalanced by a rise in CD45RA⁻CCR7⁻ effector/memory nTregs (Figure S2H,I).

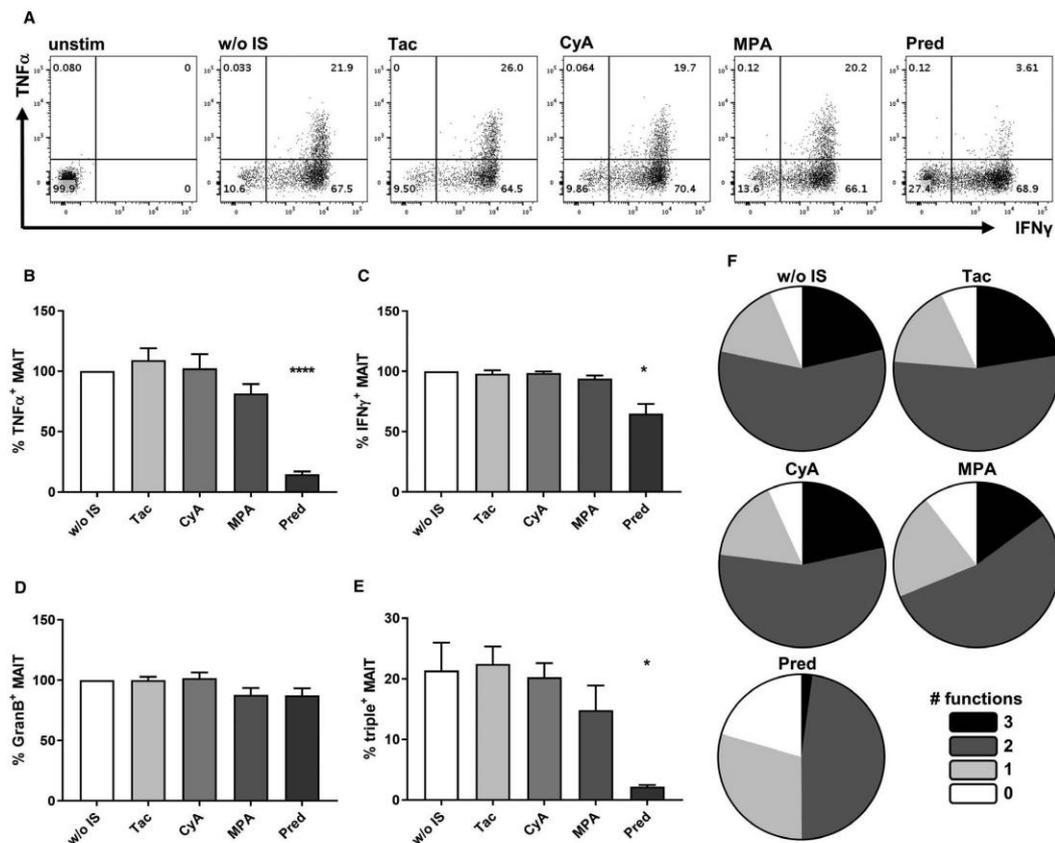


FIGURE 1 Impact of immunosuppressive drugs on cytokine-mediated MAIT cell activation in vitro. Peripheral blood mononuclear cells of healthy donors were preincubated with immunosuppressive drugs as indicated, followed by stimulation with IL-12, IL-15, IL-18, and TL1A. Frequencies of CD8⁺ and CD8⁻CD4⁻ "DN" MAIT cells expressing TNF α (A,B), IFN γ (A,C), or granzymeB (D) were quantified by FACS. Polyfunctionality was assessed by Boolean gating in MAIT cells that express 3 (E,F), 2, 1, or no functions (TNF α , IFN γ , granzymeB) (F) at a time. Results are based on 5 individual donors obtained in 3 independent experiments. For polyfunctionality analysis (F), the respective means were used. In (B-D), values of stimulated cultures in the absence of ISDs were set to 100%, allowing normalization. All bar graphs show means \pm SEM. In all statistical analyses with more than 2 groups, treatment groups were compared to the reference group (w/o IS). CyA, cyclosporine A; FACS, fluorescence-activated cell sorting; IFN γ , interferon gamma; IL, interleukin; IS, immunosuppression; ISD, immunosuppressive drug; MAIT, mucosal associated invariant T; MPA, mycophenolic acid; Pred, prednisolone; Tac, tacrolimus; TNF α , tumor necrosis factor alpha

3.4 | An ex vivo activation signature on MAIT cells distinguishes tolerant LTx patients from those receiving immunosuppressive therapy

To identify cellular signatures that are differentially regulated on MAIT cells isolated from immunosuppressed or tolerant LTx patients, a set of activation and differentiation related molecules was analyzed ex vivo by flow cytometry. First, frequencies of cells expressing the activation markers CD69 (Figure 4A), HLA-DR (Figure 4D), CD38 (Figure 4G), the inducible inhibitor PD1 (Figure 4M), the cytotoxic mediator granzymeB (Figure 4P), or coexpressing CD38 and HLA-DR (Figure 4J) were

significantly upregulated in patients as compared to healthy controls. Stratification for treatment regimen, however, revealed that tolerant patients showed no significant differences in frequencies of CD69⁺ (Figure 4B), HLA-DR⁺ (Figure 4E), CD38⁺ (Figure 4H), or granzymeB⁺ (Figure 4Q) MAIT cells in comparison to healthy individuals, whereas these markers were significantly upregulated in most treated LTx recipients. Comparing this activation signature in patients during treatment and after cessation of medication, we noted a consistent reduction of MAIT cells being CD38⁺ (Figure 4I), CD38⁺HLA-DR⁺ (Figure 4L), and granzymeB⁺ (Figure 4R). Apart from diminished frequencies of IL-18R⁺ MAIT cells in both tolerant and treated patients (Figure S3A) that did now show a distinct

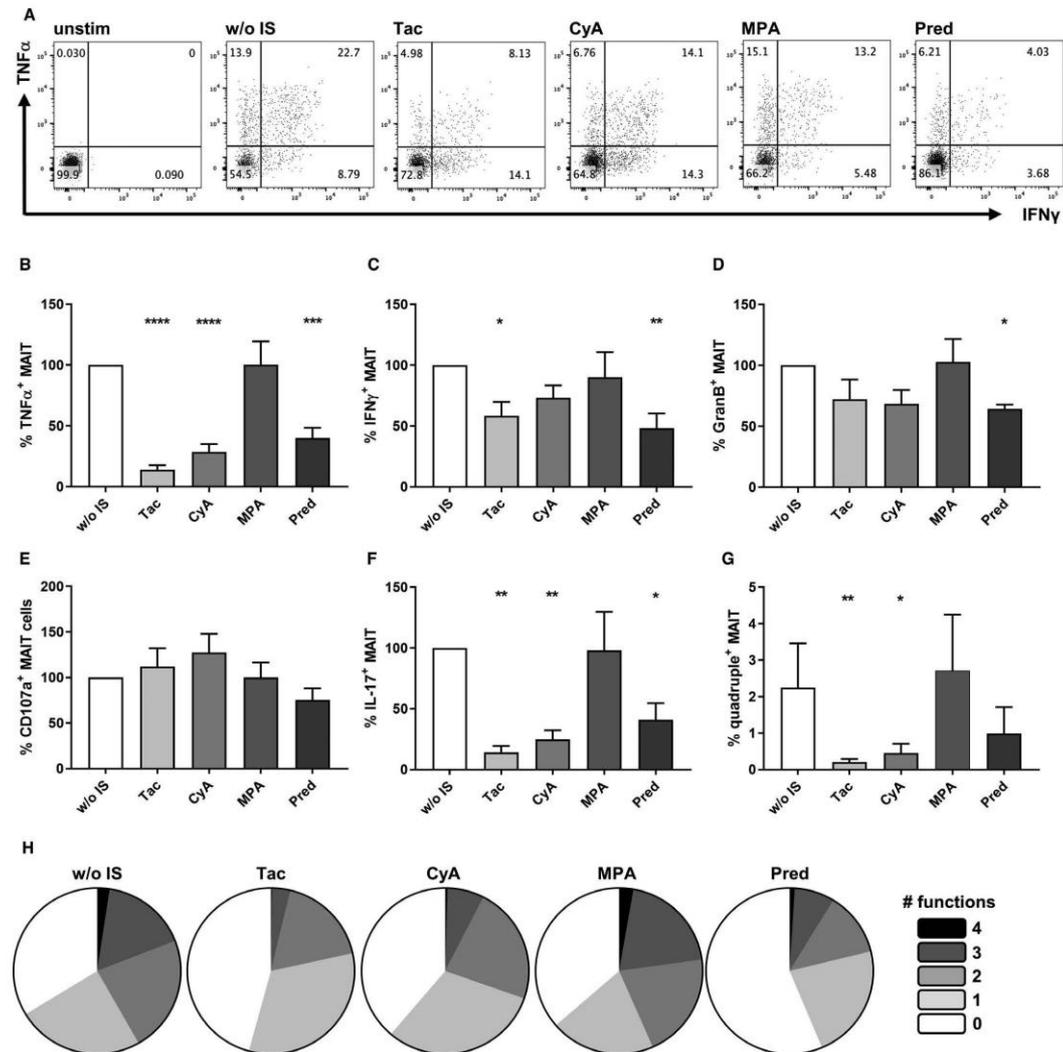


FIGURE 2 Impact of immunosuppressive drugs on bacterial MAIT cell activation in vitro. Peripheral blood mononuclear cells of healthy donors were preincubated with immunosuppressive drugs as indicated, followed by stimulation with fixed *E. coli*. Frequencies of MAIT cells expressing TNF α (A,B), IFN γ (A,C), granzymeB (D), CD107a (E), or IL-17 (F) were quantified by FACS. Polyfunctionality was assessed by Boolean gating in MAIT cells that express 4 (G,H), 3, 2, 1, or no functions (TNF α , IFN γ , granzymeB, CD107a) (H) at a time. Results are based on 6 individual donors obtained in 3 independent experiments. For polyfunctionality analysis (H), the respective means were used. In (B-F), values of stimulated cultures in the absence of ISDs were set to 100%, allowing normalization. All bar graphs show means \pm SEM. In all statistical analyses with more than 2 groups, treatment groups were compared to the reference group (w/o IS). CyA, cyclosporine A; FACS, fluorescence-activated cell sorting; IFN γ , interferon gamma; IL, interleukin; IS, immunosuppression; ISD, immunosuppressive drug; MAIT, mucosal associated invariant T; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; Pred, prednisolone; TNF α , tumor necrosis factor alpha

expression in subgroups (data not shown), transplant recipients did not exhibit quantitative differences in MAIT cells expressing the pro-apoptotic marker activated caspase 3, or the differentiation

related molecules CD56, CD27, or CD8 β ex vivo; however, we found the NK-associated activating receptor NKG2D to be slightly upregulated in treated patients (Figure S3B-F).

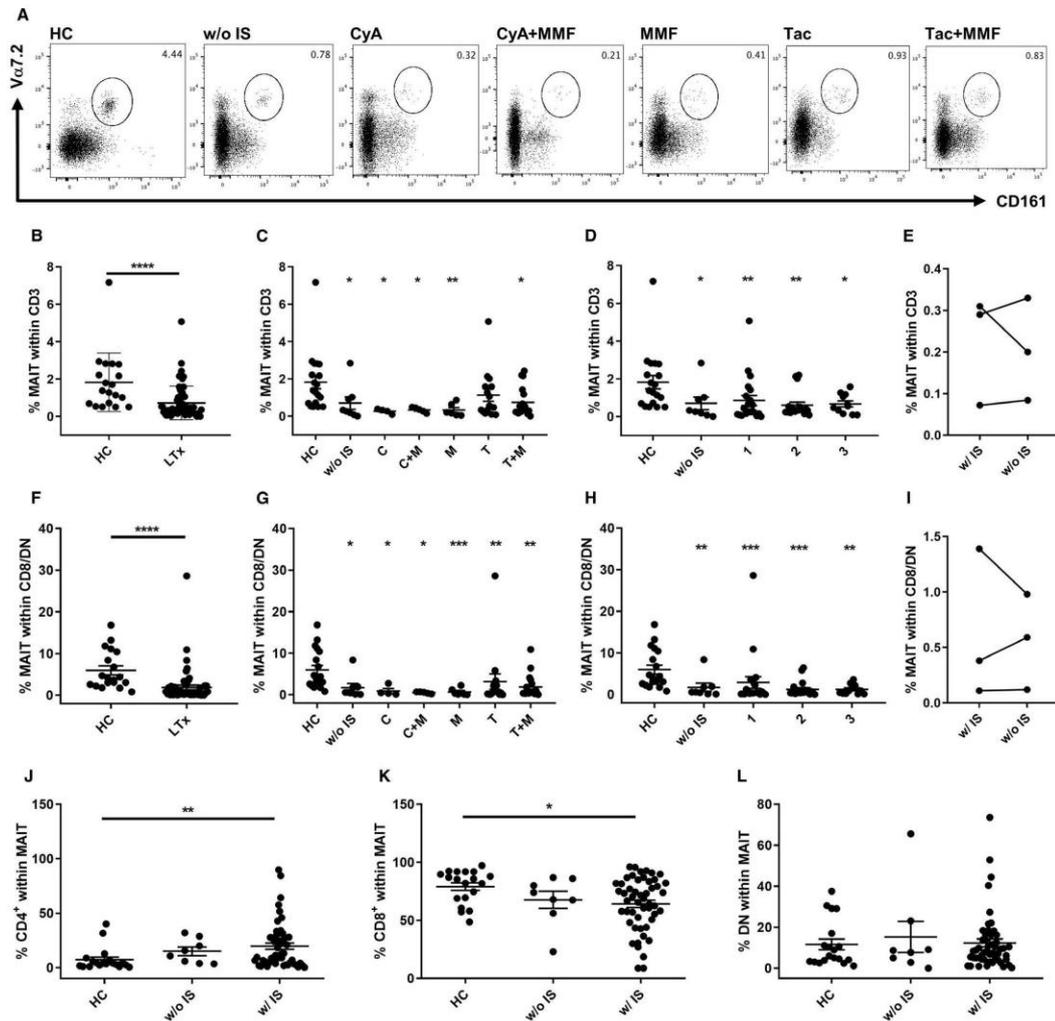
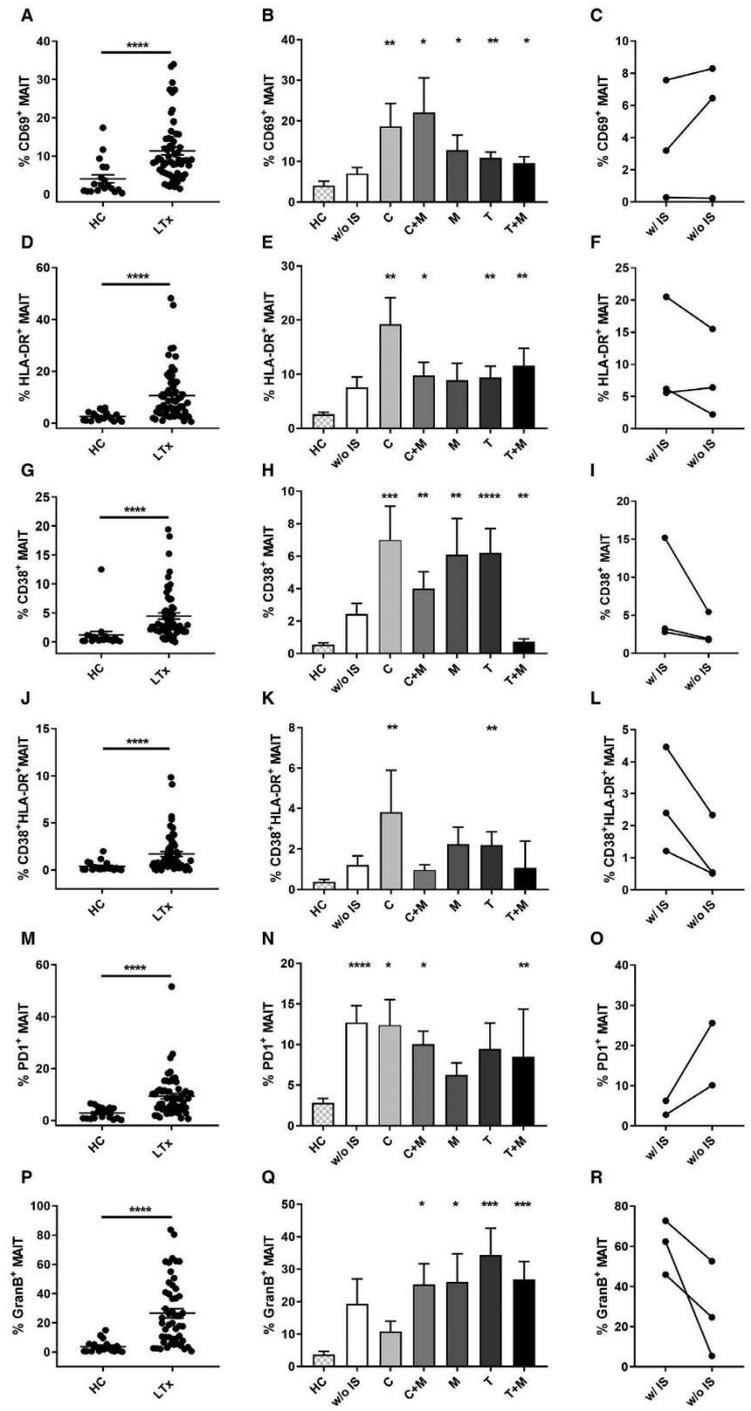


FIGURE 3 Quantitative impairment of MAIT cells in LTx patients. Frequencies of peripheral MAIT cells were determined in tolerant and treated liver transplant recipients and age-matched healthy controls (HC) by FACS within the total CD3⁺ (B-D) or combined CD8⁺/DN (A and F-H) compartment. Patients were further stratified according to their type (C + G) or dosage of treatment, or the absence thereof (see Table 1 for details) (D,H). The above mentioned analyses were further conducted in 3 liver transplant recipients during ISD treatment and 4-9 mo after complete drug weaning (E,I). CD4⁺, CD8⁺, and DN MAIT cell subsets were individually quantified in tolerant and treated patients and compared to healthy donors (J-L). All bar graphs show means \pm SEM. In all statistical analyses with more than 2 groups, treatment groups were compared to the reference group (HC). C or CyA, cyclosporine A; FACS, fluorescence-activated cell sorting; HC, healthy controls; ISD, immunosuppressive drug; MAIT, mucosal associated invariant T; M or MPA, mycophenolic acid; Pred, prednisolone; T or Tac, tacrolimus

FIGURE 4 Tolerant and treated LTx patients are characterized by different activation patterns ex vivo. Frequencies of CD8⁺/DN peripheral MAIT cells expressing CD69 (A,B), HLA-DR (D,E), CD38 (G,H), HLA-DR⁺CD38 (J,K), PD1 (M,N), or granzymeB (P,Q) were quantified ex vivo by FACS in tolerant and treated liver transplant recipients in comparison with age-matched healthy controls. The marker set was further monitored in 3 liver transplant recipients during and after cessation of ISD treatment (C, F, I, L, O, and R). All bar graphs show means \pm SEM. In all statistical analyses with more than 2 groups, treatment groups were compared to the reference group (HC). C, cyclosporine A; FACS, fluorescence-activated cell sorting; HC, healthy controls; IS, immunosuppression; ISD, immunosuppressive drug; LTx, liver transplant; M, mycophenolic acid; MAIT, mucosal associated invariant T; T, tacrolimus



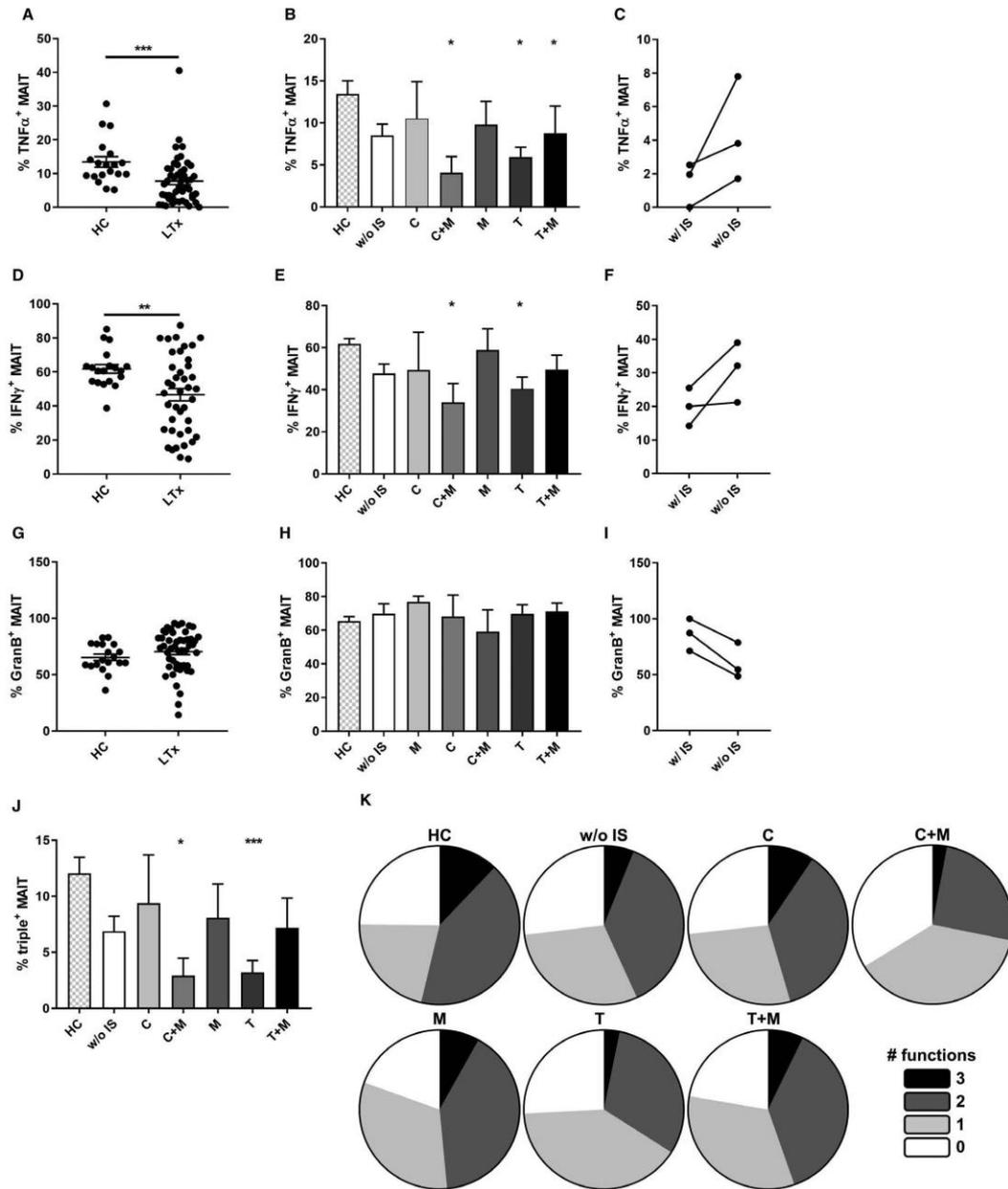


FIGURE 5 Differential impairment of MAIT cells from LTx patients in response to cytokine stimulation. Peripheral blood mononuclear cells from differently treated or tolerant LTx patients and healthy controls were stimulated with IL-12, IL-15, IL-18, and TL1A. Frequencies of MAIT cells expressing TNF α (A,B), IFN γ (D,E), or granzymeB (G,H) were quantified by FACS. MAIT cells from patients before and after ISD weaning were analyzed in an identical fashion (C, F, and I). Polyfunctionality was assessed by Boolean gating in MAIT cells that express 3 (J,K), 2, 1 or no functions (TNF α , IFN γ , granzymeB) (K) at a time. For polyfunctional analysis in (K), the respective means were used. All bar graphs show means \pm SEM. In all statistical analyses with more than 2 groups, treatment groups were compared to the reference group (HC). C, cyclosporine A; FACS, fluorescence-activated cell sorting; HC, healthy controls; IFN γ , interferon gamma; IL, interleukin; IS, immunosuppression; LTx, liver transplant; M, mycophenolic acid; MAIT, mucosal associated invariant T; T, tacrolimus; TNF α , tumor necrosis factor alpha

3.5 | Impairment of cytokine-induced MAIT cell functions in LTx patients

To address whether MAIT cells isolated from LTx patients are functionally altered in response to inflammatory cytokines, cells were stimulated directly ex vivo with IL-12, IL-15, IL-18, and TL1A and analyzed for cytokine and cytotoxic molecule production. Collectively, transplanted individuals showed a significant impairment of TNF α and IFN γ production, whereas frequencies of cytokine-induced granzymeB expressing cells were not affected (Figure 5A,D,G). With respect to different treatment regimens, individuals receiving CyA+MPA or Tac (\pm MPA with respect to TNF α production) exhibited significantly reduced frequencies of TNF α ⁺ and IFN γ ⁺ cells (Figure 5B,E), accompanied by a drop in multipotency (Figure 5J,K). Importantly, whereas MAIT cells of patients weaned from immunosuppression regained their capacity to secrete higher levels of TNF α and IFN γ , they were characterized by a consistent drop in granzymeB⁺ cells after cessation of medication (Figure 5C,F,I).

3.6 | Impairment of *E. coli* induced MAIT cell functions in LTx patients

In analogy to previous in vitro experiments (Figure 2), we compared the functional capacity of MAIT cells toward bacterial stimulation between LTx patients and healthy controls ex vivo. Overall, frequencies of *E. coli* reactive MAIT cells expressing TNF α (Figure 6A), IFN γ (Figure 6D), and CD107a (Figure 6J) were significantly reduced in patients as compared to controls, whereas those producing granzymeB showed a pronounced increase (Figure 6G). We observed a trend toward reduced frequencies of TNF α ⁺, IFN γ ⁺, and CD107a⁺ MAIT cells in patients regardless of the type of medication (Figure 6B,E,K) that reached significance for IFN γ not only in individuals treated with mycophenolic acid (MPA), Tac-, or Tac+ MPA but also in tolerant LTx patients (Figure 6E), whereas a drop in CD107a⁺ cells was confined to the 3 aforementioned treatment groups only (Figure 6K). Assessment of polyfunctionality of bacteria-triggered MAIT cells revealed a significant reduction in cells coexpressing all 4 molecules in patients treated with Tac \pm MPA as well as in tolerant patients (Figure 6M,N). Withdrawal from immunosuppression led to increased portions of cytokine and CD107a positive cells in all 3 individuals monitored (Figure 6C,F,L) but showed no consistency with respect to granzymeB expression (Figure 6I). Bacterial induction of IL-17 was neither significantly diminished in treated nor in tolerant LTx patients and not included into polyfunctional analyses because of low event counts (data not shown).

3.7 | Kidney transplanted individuals share quantitative and qualitative features of MAIT cells with patients after liver transplantation

To investigate whether prominent features of MAIT cells identified in LTx patients are shared with immunosuppressed individuals after

kidney transplantation (KTx, Table 3), cells from a cohort with 23 patients were analyzed ex vivo by flow cytometry. Interestingly, KTx patients exhibited equally diminished frequencies of MAIT cells both within the CD3⁺ (Figure 7A) and the CD8⁺/DN (Figure 7B) subsets and we also noted a significant reduction of CD8⁺ MAIT cells that was counterbalanced by a rise of the CD4⁺ and DN subsets, although not reaching significance (Figure 7C-E). Whereas portions of CD69⁺ and CD38⁺ MAIT cells were similarly increased as observed for LTx recipients in comparison to healthy controls (Figure 7F,G), we could not detect significant changes in frequencies of HLA-DR- or PD1-expressing MAIT cells ex vivo (Figure 7H,I). Also in agreement with our data from liver transplant recipients, we observed an inverted CD4 to CD8 ratio in KTx patients (Figure 7J,K).

4 | DISCUSSION

In this report, we comprehensively examined how peripheral MAIT cell biology is affected by immunosuppressive medication in vitro and in individuals after liver and kidney transplantation ex vivo. Based on a comparison between tolerant or recently weaned LTx patients and treated individuals, we were able to attribute abnormalities in activation state, phenotype, and effector functions partially to the ISD treatment, whereas quantitative impairment is most likely related to the overall post liver transplantation state, because MAIT cell frequencies do not significantly recover after cessation of treatment.

Owing to their innate receptor repertoire, MAIT cells are not solely dependent on TCR mediated activation by bacterial ligands but also respond to cytokines, for example, released in the course of bacterial²³ and viral infections.³ As recently published by us and others,^{8,24} the TL1A containing cytokine combination applied herein robustly and predominantly induces production of the key antimicrobial mediators TNF α , IFN γ , and granzymeB in human MAIT cells. Under these conditions, only prednisolone significantly inhibited cytokine production and polyfunctionality in vitro, whereas cytotoxicity, based on granzyme expression, remained unaffected. In contrast, *E. coli* induced cytokine production and polyfunctionality were diminished both in the presence of calcineurin inhibitors and prednisolone, whereas only the latter significantly reduced frequencies of granzymeB⁺ MAIT cells. Our data substantially extend the earlier finding that high expression of the multidrug resistance protein 1 does not rescue MAIT cell proliferation from inhibition by IS drugs,²⁵ because we now provide evidence for both impaired TCR-dependent and -independent effector functions. At the same time, our results mirror the respective signaling pathways required for effector molecule synthesis: whereas cytokine-mediated TNF α and IFN γ production involves phosphorylation of NF κ B,^{8,26} a component classically targeted by glucocorticoids,²⁷ *E. coli* induced activation involves TCR downstream calcineurin that is blocked by tacrolimus and cyclosporin A (reviewed in Ref. 28), as well as glucocorticoid targets such as AP-1 (reviewed in Ref. 29). The observation that individual MAIT cell effector functions are differentially regulated by ISD

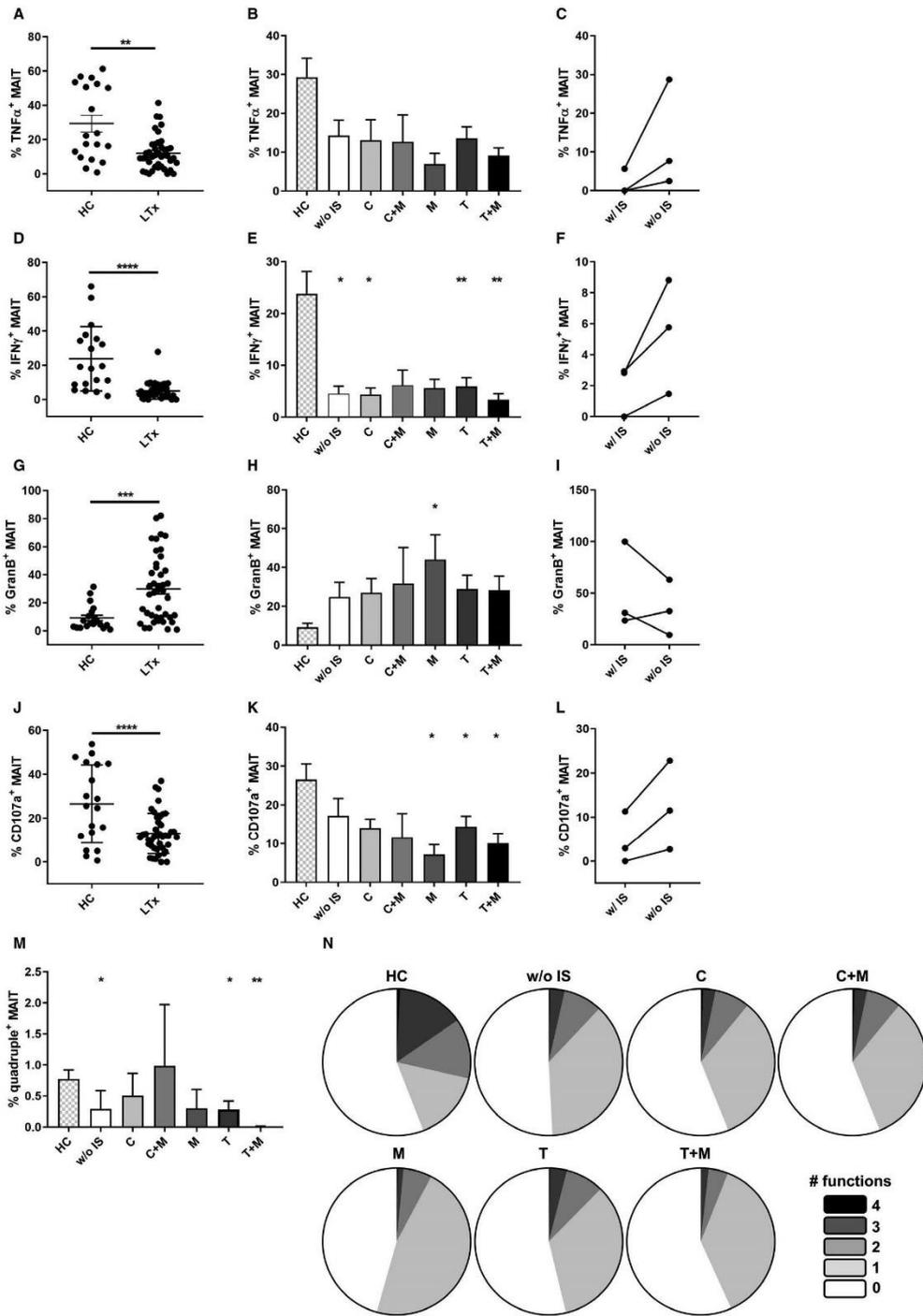


FIGURE 6 Differential functional responses of MAIT cells from LTx patients toward bacterial stimulation. Peripheral blood mononuclear cells from differently treated or tolerant LTx patients and healthy controls were stimulated with formalin-fixed *E. coli*. Frequencies of MAIT cells expressing TNF α (A,B), IFN γ (D,E), granzymeB (G,H), or CD107a (J,K) were quantified by FACS. MAIT cells from patients before and after ISD treatment cessation were analyzed in an identical fashion (C, F, I, and L). Polyfunctionality was assessed by Boolean gating in MAIT cells that express 4 (M,N), 3, 2, 1, or no functions (TNF α , IFN γ , granzymeB, CD107a) (N) at a time. For the latter analysis, the respective means were used. All bar graphs show means \pm SEM. In all statistical analyses with more than 2 groups, treatment groups were compared to the reference group (HC). C, cyclosporine A; FACS, fluorescence-activated cell sorting; HC, healthy controls; IFN γ , interferon gamma; IS, immunosuppression; LTx, liver transplant; M, mycophenolic acid; MAIT, mucosal associated invariant T; T, tacrolimus; TNF α , tumor necrosis factor alpha

treatment is supported by data focusing on conventional T cells: similarly to MAIT cells, TNF α production by virus-specific T cells showed a higher sensitivity toward inhibition by immunosuppressants than IFN γ secretion. Furthermore, the cytotoxic potential was only mildly affected by calcineurin inhibitors or prednisolone.¹⁸ At least with respect to IFN γ and granzymeB production, our findings are mechanistically comprehensible as *E. coli* induced effector molecule synthesis in MAIT cells is not solely TCR-dependent, which we confirm in MR1 blocking experiments but could be augmented by cytokines like IL-12 being coreleased in context with bacterial triggering.^{22,30} By this means, calcineurin-mediated activation (and thereby consequences of its inhibition by ISD) could be partially bypassed. To allow for translation, drug concentrations in our in vitro assays matched default initial plasma levels recommended for transplant recipients; in addition, titration experiments corroborated effects on MAIT cell functions only for those drugs that already showed potency at therapeutic levels.

As a hallmark, we demonstrate that LTx patients are characterized by a pronounced reduction of peripheral MAIT cells as compared to age-matched healthy controls. This feature comprised all organ recipients regardless of treatment regimen or dosage; surprisingly, it equally accounted for tolerant patients and was reproducible in KTx patients receiving standard IS medication. We cannot not fully exclude that transplantation itself modifies MAIT cell biology, which could, for example, be addressed in an autotransplant setting with nonhuman primates harboring similar MAIT cell frequencies as humans.³¹ However, since depletion of MAIT cells is characteristic of severe liver¹⁴⁻¹⁷ and kidney damage,³² our observation supports the hypothesis that the primary disease likely predetermines the post-transplant MAIT cell pool and that its quantitative replenishment is largely independent from immunosuppression. Peripheral loss of MAIT cells is a common motif in liver diseases of autoimmune,¹⁴ infectious,¹⁷ and lifestyle-related origin.¹⁶ It further encompasses several nonhepatic pathologies, with HIV being most extensively

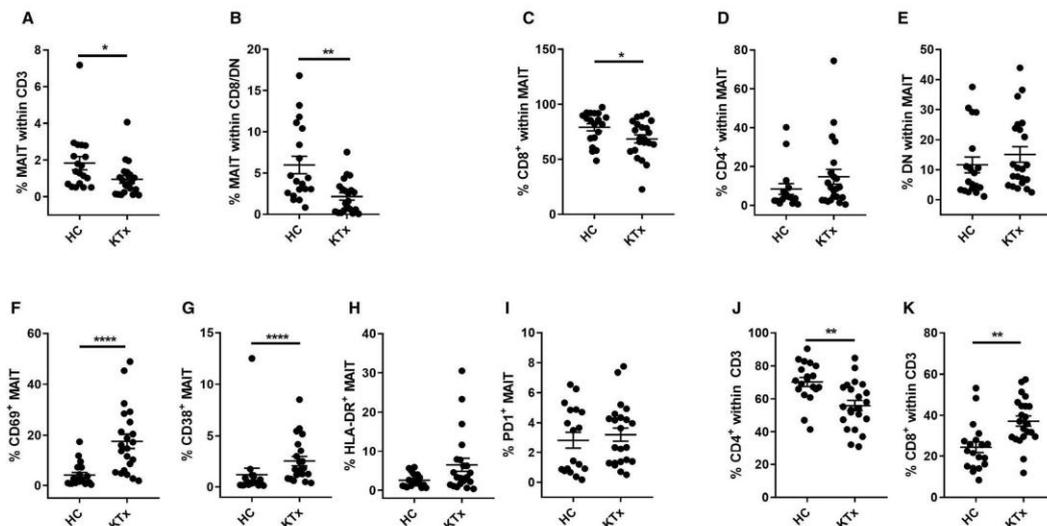


FIGURE 7 Quantitative and phenotypic alterations in MAIT- and conventional T cells from kidney transplanted patients. Frequencies of peripheral MAIT cells were determined in ISD treated kidney transplant recipients (Table 3) in comparison to healthy individuals (HC) by FACS within the total CD3⁺ (A) or CD8⁺/DN (B) compartment. Within total MAIT cells, portions of CD8⁺, CD4⁺, and DN subsets were further quantified (C-E). For determining the ex vivo activation and exhaustion state, expression of CD69 (F), CD38 (G), HLA-DR (H), and PD1 (I) was analyzed. Frequencies of conventional CD4⁺ and CD8⁺ T cells within the CD3 compartment are depicted in (J) and (K), respectively. All bar graphs show means \pm SEM. FACS, fluorescence-activated cell sorting; HC, healthy controls; KTx, kidney transplant; MAIT, mucosal associated invariant T

studied.³³ The aforementioned conditions are also interlinked by the general inability to restore MAIT cell homeostasis despite successful treatment, a phenomenon possibly related to their comparatively poor proliferative potential, as reflected, for example, by low portions of peripheral Ki67⁺ MAIT cells³⁴ and a high pro-apoptotic propensity.³⁵ At least with respect to the latter, however, we did not detect elevated frequencies of activated caspase 3 positive MAIT cells, thus questioning the relevance of this mechanism at least within the time frame (on average >10 years since transplantation) of our analyses.

Overall, it still remains obscure what factors promote self-renewal of this unconventional T cell population once thymic output declines and what niches are critical for their survival. Within the transplantation field, the only comprehensive data sets available derive from stem cell transplantation trials. Whereas in an autologous context, MAIT cells recover early,³⁶ their frequencies do not significantly increase within 2 years after allogeneic stem cell transplantation,³⁷ suggesting an impact of the inflammatory milieu on their reconstitution. As extra-thymic MAIT cell expansion is possibly depending on interactions with commensals,³⁸ it is tempting to speculate that in concert with (subclinical) alloinflammation, dysbiosis, established not only during early liver pathology, but also partially maintained after LTx,^{39,40} contributes to curtailment of MAIT cell regeneration. Based on data from alcoholic hepatitis, it has already been hypothesized that gut dysbiosis might initially lead to chronic MAIT cell hyperactivation, followed by functional exhaustion, finally promoting their depletion.^{16,41} MAIT cells traversing such developmental path are characterized by high expression of CD69, HLA-DR, CD38, PD1, and granzymeB, a signature we observe ex vivo in the majority of treated LTx patients and partially in kidney graft recipients. Interestingly, we demonstrate that this activation pattern is largely downregulated in tolerant individuals, with the exception of PD1, suggesting the possibility of partial normalization of allo- and/or dysbiosis-related triggers. These changes also include the general composition of the MAIT cell pool as the CD4⁺ subset, being quantitatively expanded in treated patients at the expense of the CD8⁺ population, was not significantly different from normal donors in treatment-free individuals. For a selected set of markers (CD38, CD38+HLA-DR, granzymeB), examined in patients before and after weaning from IS drugs, attenuation of activation, but not quantitative recovery, was achieved within months, accompanied by a consistent regain of effector cytokine production and cytotoxic capacity. In consequence, our data, together with studies on MAIT cells in severe liver diseases, indicate that transplantation does not entail an environment fostering quantitative regeneration of the MAIT cell pool. Clearly, future studies are needed in order to address whether our findings are restricted to the periphery or mirror local MAIT cell impairment within the liver. Among the few data sets available, a recent report with HCV-infected individuals demonstrated that peripheral MAIT cells might serve as surrogates reflecting the intraorgan situation: patients were characterized by both peripheral and intrahepatic depletion of MAIT

cells that equally showed signs of ex vivo hyperactivation,¹⁷ as we also report here.

With respect to patients successfully weaned from medication, it largely remains unclear what predisposes an organ recipient to develop tolerance against the graft, and it is still obscure what characterizes a tolerant immune system. In agreement with the few systematic reports on cellular immunity in operationally tolerant liver recipients,⁴² we found normal frequencies of nTregs in tolerant, but not in ISD-treated patients. However, these differences did not extend to ex vivo proliferation, CTLA-4 expression, or differentiation state, thereby not allowing further speculation on their active involvement in the regulation of alloimmunity. Still, despite fingerprints of tolerance within the MAIT- and nTreg compartment, both treated and tolerant organ recipients share an overall attenuated response toward ex vivo stimulation: although not always reaching significance, both patient groups are particularly characterized by impaired cytokine production and cytotoxic capacity (as reflected by CD107a), but elevated portions of granzymeB⁺ cells after bacterial triggering in comparison to controls. Because high PD-1 levels accompany this partially dysfunctional state also in patients after drug weaning, it needs to be addressed how and when functional exhaustion is imprinted and what consequences arise. Based on experimental limitations in humans, and given the complex individual contribution of alloimmunity, immunosuppression, dysbiosis, and opportunistic infections in our patient cohort, experimental models are needed to decipher in depth the impact of MAIT cells on overall health. However, livers of BALB/c or C57BL/6 mice contain roughly 30-50 times less MAIT cells than humans; furthermore, murine MAIT cells preferentially secrete IL-17 rather than IFN γ .⁴³ The few experimental studies available provide at least limited translational insights regarding how MAIT cells might contribute to both protective immunity and maintenance of eubiosis. With respect to the latter, MAIT cells are instrumental for regulating gut microbiota in experimental stem cell transplantation.⁴⁴ A similar link between quantitative MAIT cell reconstitution and diversity of gut microbiota after allogeneic stem cell transplantation was recently described for humans,⁴⁵ arguing in favor of such correlation analyses also after LTx. Infection models further indicated that MAIT cells contribute to decreased bacterial burden in urinary tract infections⁴⁶ and mediate protection against mycosis,⁴⁷ suggesting a role in these frequent opportunistic infections after kidney⁴⁸ or liver⁴⁹ transplantation, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by the Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand, Project ZF4245603AJ7 to KK) and funded by a student award from the Sonnenfeld Stiftung (to AHR).

DISCLOSURE

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Arne Sattler  <https://orcid.org/0000-0003-2572-5641>

Mira Choi  <https://orcid.org/0000-0002-0286-1491>

Frank Friedersdorff  <https://orcid.org/0000-0002-3104-911X>

Katja Kotsch  <https://orcid.org/0000-0002-3803-0964>

REFERENCES

- Treiner E, Duban L, Bahram S, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*. 2003;422(6928):164-169.
- Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*. 2012;491(7426):717-723.
- van Wilgenburg B, Scherwitzl I, Hutchinson EC, et al. MAIT cells are activated during human viral infections. *Nat Commun*. 2016;7:11653.
- Constantinides MG, Link VM, Tamoutounour S, et al. MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. *Science*. 2019;366(6464):eaax6624.
- Tilloy F, Treiner E, Park SH, et al. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med*. 1999;189(12):1907-1921.
- Dusseaux M, Martin E, Serriari N, et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood*. 2011;117(4):1250-1259.
- Sattler A, Dang-Heine C, Reinke P, Babel N. IL-15 dependent induction of IL-18 secretion as a feedback mechanism controlling human MAIT-cell effector functions. *Eur J Immunol*. 2015;45(8):2286-2298.
- Sattler A, Thiel LG, Ruhm AH, et al. The TL1A-DR3 axis selectively drives effector functions in human MAIT cells. *J Immunol*. 2019;203(11):2970-2978.
- Fergusson JR, Hühn MH, Swadlow L, et al. CD161(int)CD8+ T cells: a novel population of highly functional, memory CD8+ T cells enriched within the gut. *Mucosal Immunol*. 2016;9(2):401-413.
- Wang H, D'Souza C, Lim XY, et al. MAIT cells protect against pulmonary Legionella longbeachae infection. *Nat Commun*. 2018;9(1):3350.
- Tang X-Z, Jo J, Tan AT, et al. IL-7 licenses activation of human liver intrasinusoidal mucosal-associated invariant T cells. *J Immunol*. 2013;190(7):3142-3152.
- Jeffery HC, van Wilgenburg B, Kurioka A, et al. Biliary epithelium and liver B cells exposed to bacteria activate intrahepatic MAIT cells through MR1. *J Hepatol*. 2016;64(5):1118-1127.
- Kurioka A, Walker LJ, Klenerman P, Willberg CB. MAIT cells: new guardians of the liver. *Clin Transl Immunol*. 2016;5(8):e98.
- Renand A, Habes S, Mosnier J-F, et al. Immune alterations in patients with type 1 autoimmune hepatitis persist upon standard immunosuppressive treatment. *Hepatol Commun*. 2018;2(8):968-981.
- Seth E, Zimmer CL, Reuterwall-Hansson M, et al. Primary sclerosing cholangitis leads to dysfunction and loss of MAIT cells. *Eur J Immunol*. 2018;48(12):1997-2004.
- Riva A, Patel V, Kurioka A, et al. Mucosa-associated invariant T cells link intestinal immunity with antibacterial immune defects in alcoholic liver disease. *Gut*. 2018;67(5):918-930.
- Boite FJ, O'Keefe AC, Webb LM, et al. Intra-hepatic depletion of mucosal-associated invariant T cells in hepatitis C virus-induced liver inflammation. *Gastroenterology*. 2017;153(5):1392-1403.e2.
- Weist BJD, Wehler P, El Ahmad L, et al. A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients. *Kidney Int*. 2015;88(6):1293-1303.
- Post DJ, Douglas DD, Mulligan DC. Immunosuppression in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2005;11(11):1307-1314.
- Charlton M, Levitsky J, Aqel B, et al. International Liver Transplantation Society Consensus Statement on immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2018;102(5):727-743.
- Moini M, Schilsky ML, Tichy EM. Review on immunosuppression in liver transplantation. *World J Hepatol*. 2015;7(10):1355-1368.
- Ussher JE, Bilton M, Attwod E, et al. CD161++ CD8+ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur J Immunol*. 2014;44(1):195-203.
- Chua WJ, Truscott SM, Eickhoff CS, Blazevic A, Hoff DF, Hansen TH. Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infect Immun*. 2012;80(9):3256-3267.
- Leng T, Akther HD, Hackstein C-P, et al. TCR and inflammatory signals tune human MAIT cells to exert specific tissue repair and effector functions. *Cell Rep*. 2019;28(12):3077-3091.e5.
- Fergusson JR, Ussher JE, Kurioka A, Klenerman P, Walker LJ. High MDR-1 expression by MAIT cells confers resistance to cytotoxic but not immunosuppressive MDR-1 substrates. *Clin Exp Immunol*. 2018;194(2):180-191.
- Robinson D, Shibuya K, Mui A, et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NF-kappaB. *Immunity*. 1997;7(4):571-581.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*. 1995;270(5234):286-290.
- Azzi JR, Sayegh MH, Mallat SG. Calcineurin inhibitors: 40 years later, can't live without. *J Immunol*. 2013;191(12):5785-5791.
- Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):233-247.
- Kurioka A, Ussher JE, Cosgrove C, et al. MAIT cells are licensed through granzyme exchange to kill bacterially sensitized targets. *Mucosal Immunol*. 2015;8(2):429-440.
- Greene JM, Dash P, Roy S, et al. MR1-restricted mucosal-associated invariant T (MAIT) cells respond to mycobacterial vaccination and infection in nonhuman primates. *Mucosal Immunol*. 2017;10(3):802-813.
- Juno JA, Waruk JLM, Wragg KM, et al. Mucosal-associated invariant T cells are depleted and exhibit altered chemokine receptor expression and elevated granulocyte macrophage-colony stimulating factor production during end-stage renal disease. *Front Immunol*. 2018;9:1076.
- Leeansyah E, Ganesh A, Quigley MF, et al. Activation, exhaustion, and persistent decline of the antimicrobial MR1-restricted MAIT-cell population in chronic HIV-1 infection. *Blood*. 2013;121(7):1124-1135.
- Leeansyah E, Loh L, Nixon DF, Sandberg JK. Acquisition of innate-like microbial reactivity in mucosal tissues during human fetal MAIT-cell development. *Nat Commun*. 2014;5:3143.
- Gérart S, Sibérlis S, Martin E, et al. Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood*. 2013;121(4):614-623.
- Novak J, Dobrovolny J, Brozova J, Novakova L, Kozak T. Recovery of mucosal-associated invariant T cells after myeloablative chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Clin Exp Med*. 2016;16(4):529-537.
- Solders M, Erkers T, Gorchs L, et al. Mucosal-associated invariant T cells display a poor reconstitution and altered phenotype after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2017;8:1861.
- Garner LC, Klenerman P, Provine NM. Insights into mucosal-associated invariant T cell biology from studies of invariant natural killer T cells. *Front Immunol*. 2018;9:1478.

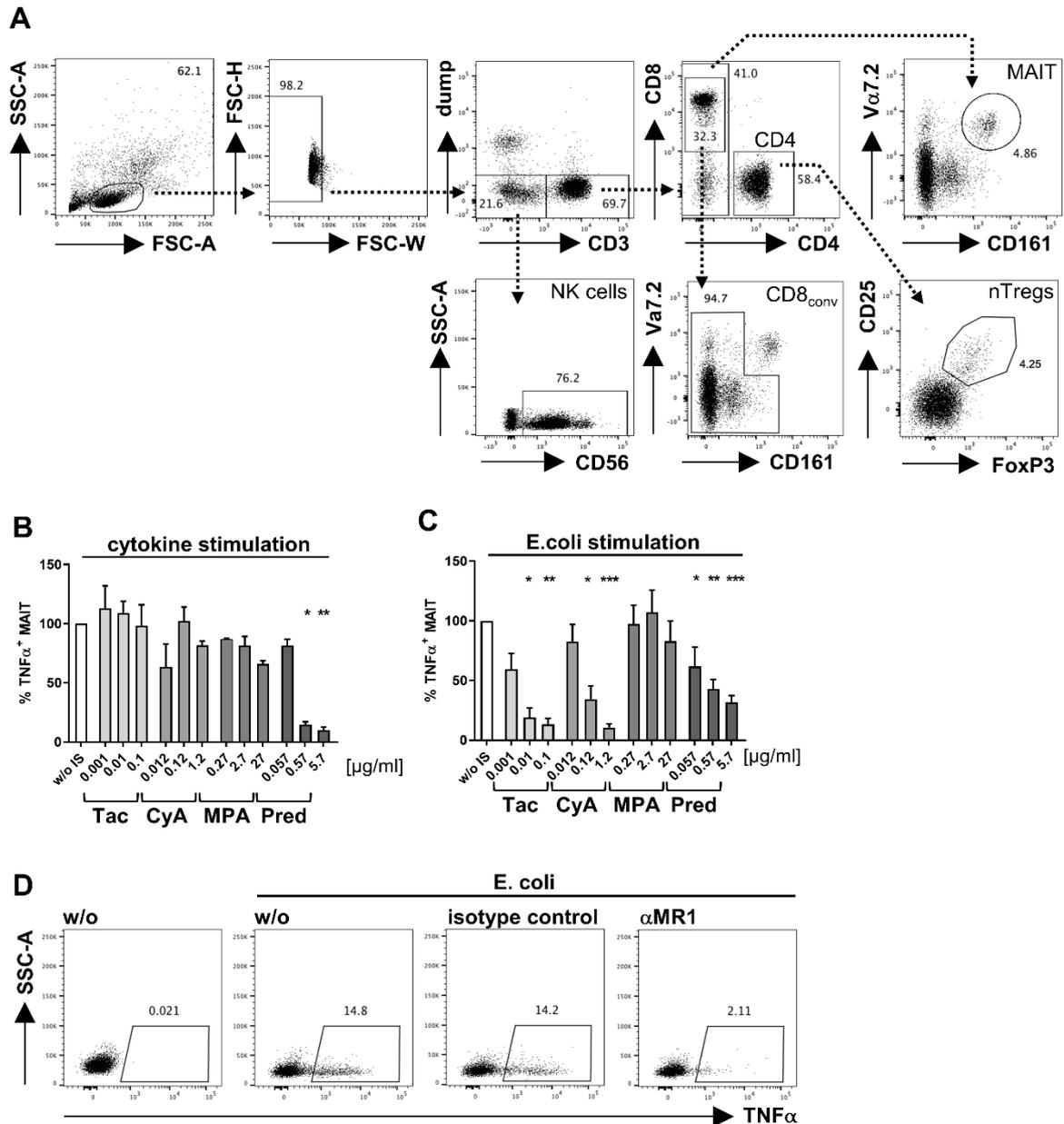
39. Annavaġhala MK, Gomez-Simmonds A, Macesic N, et al. Colonizing multidrug-resistant bacteria and the longitudinal evolution of the intestinal microbiome after liver transplantation. *Nat Commun.* 2019;10(1):4715.
40. Bajaj JS, Fagan A, Sikaroodi M, et al. Liver transplant modulates gut microbial dysbiosis and cognitive function in cirrhosis. *Liver Transpl.* 2017;23(7):907-914.
41. Li W, Lin EL, Liangpunsakul S, et al. Alcohol abstinence does not fully reverse abnormalities of mucosal-associated invariant T cells in the blood of patients with alcoholic hepatitis. *Clin Transl Gastroenterol.* 2019;10(6):e00052.
42. Lau AH, Vitalone MJ, Haas K, et al. Mass cytometry reveals a distinct immunoprofile of operational tolerance in pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 2016;20(8):1072-1080.
43. Rahimpour A, Koay HF, Enders A, et al. Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. *J Exp Med.* 2015;212(7):1095-1108.
44. Varelias A, Bunting MD, Ormerod KL, et al. Recipient mucosal-associated invariant T cells control GVHD within the colon. *J Clin Invest.* 2018;128(5):1919-1936.
45. Konuma T, Kohara C, Watanabe E, et al. Reconstitution of circulating mucosal-associated invariant T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation: its association with the riboflavin synthetic pathway of gut microbiota in cord blood transplant recipients. *J Immunol.* 2020;204(6):1462-1473.
46. Cui Y, Franciszkiewicz K, Mburu YK, et al. Mucosal-associated invariant T cell-rich congenic mouse strain allows functional evaluation. *J Clin Invest.* 2015;125(11):4171-4185.
47. Dias J, Leeansyah E, Sandberg JK. Multiple layers of heterogeneity and subset diversity in human MAIT cell responses to distinct microorganisms and to innate cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(27):E5434-E5443.
48. Vidal E, Torre-Cisneros J, Blanes M, et al. Bacterial urinary tract infection after solid organ transplantation in the RESITRA cohort. *Transpl Infect Dis.* 2012;14(6):595-603.
49. Hernandez MdelP, Martin P, Simkins J. Infectious complications after liver transplantation. *Gastroenterol Hepatol.* 2015;11(11):741-753.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Sattler A, Thiel LG, Ruhm AH, et al. Mucosal associated invariant T cells are differentially impaired in tolerant and immunosuppressed liver transplant recipients. *Am J Transplant.* 2021;21:87-102. <https://doi.org/10.1111/ajt.16122>

Supplemental Figure 1, Sattler, Thiel et al.

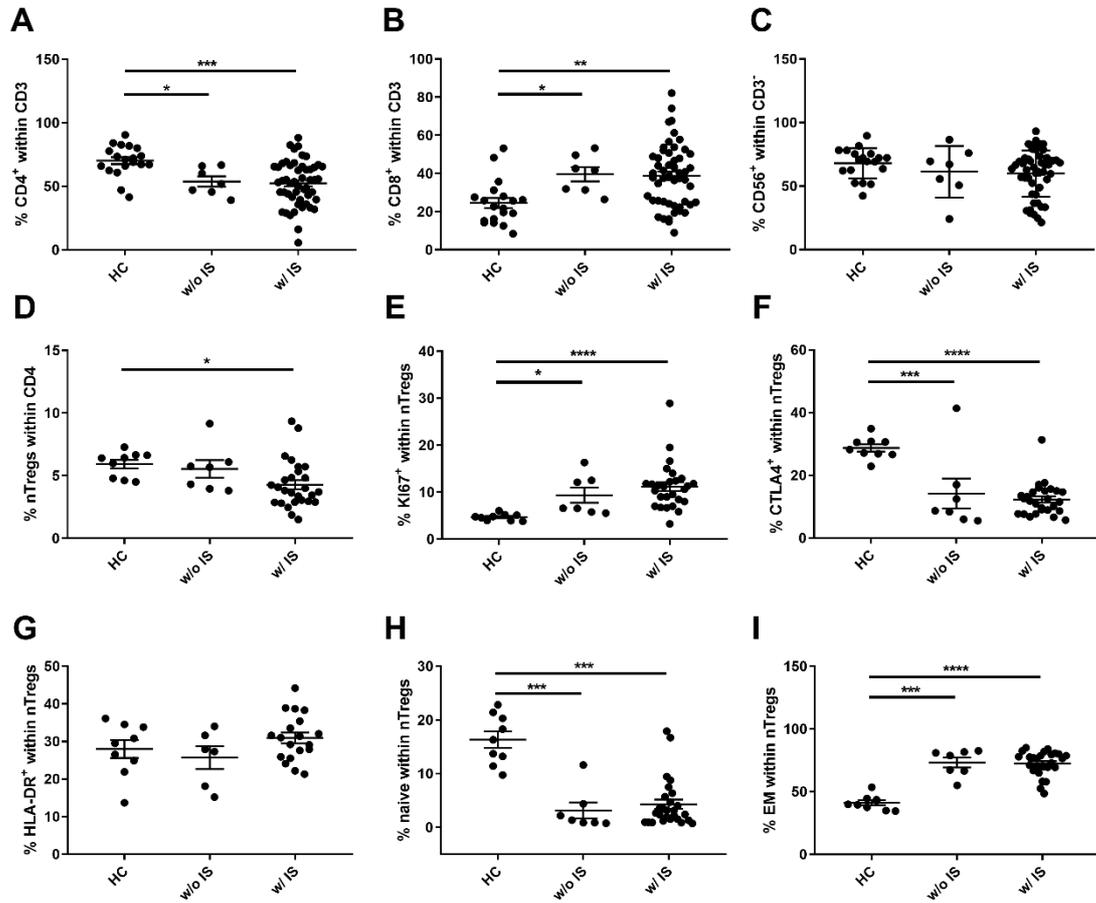


Supplemental Figure 1 (A) Gating strategy. MAIT cells were detected by FACS according to co-expression of TCRV α 7.2 and CD161 after gating on live CD3⁺ CD14⁻CD19⁻ ("dump"-negative) CD8⁺ and CD8⁻CD4⁻ singlets within lymphocytes. CD8⁺ non-MAIT ("CD8_{conv}") and CD4⁺ cells were identified by electronic gating as depicted. Naturally occurring regulatory T-cells ("nTregs") were identified based on coexpression of CD25 and FoxP3. NK cells were identified within the dump⁻CD3⁻ population based on CD56 expression.

(B) and (C) Titration of immunosuppressive drugs in vitro. PBMC of healthy donors were preincubated with titrated concentrations of immunosuppressive drugs as indicated, followed by stimulation with cytokines (B) or E.coli (C). Frequencies of CD8⁺ and CD8⁻CD4⁻ "DN" MAIT cells expressing TNF α were quantified by FACS. Values in the absence of ISD were set to 100 %. All bar graphs show means \pm SEM. In all statistical analyses, treatment groups were compared to the reference group (w/o IS), n=5, respectively.

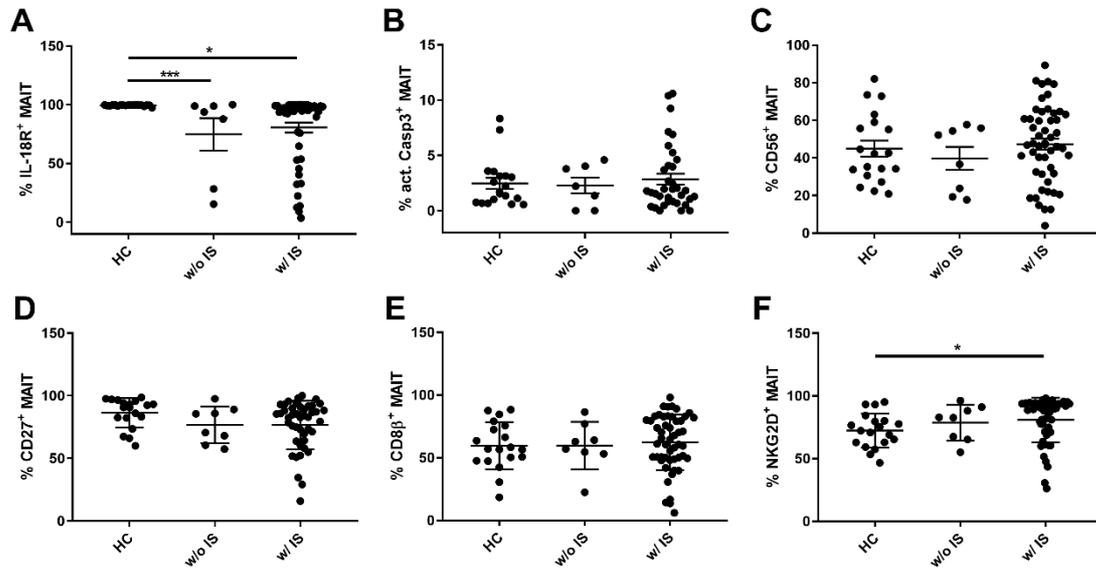
(D) Control of antigen-specific activation. Prior to bacterial stimulation, antigen-specific MAIT cell activation was blocked by 30-minutes pre-treatment with anti-MR1, resulting in substantially reduced TNF α production in comparison to an isotype control. Representative for two experiments with different donors.

Supplemental Figure 2, Sattler, Thiel et al.



Supplemental Figure 2 Lymphocyte subset analysis in LTx patients. Frequencies of CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells within CD3⁺ as well as CD56⁺ NK cells within CD3⁺ cells (C) were quantified in tolerant and ISD treated patients as compared to healthy donors by FACS. Frequencies of nTregs were detected within CD4 according to coexpression of CD25 and FoxP3 (D). Proliferation of nTregs was quantified according to Ki67 expression (E), activation by measuring CTLA4 (F) and HLA-DR (G). Frequencies of naïve CD25⁺FoxP3⁺ nTregs were detected based on coexpression of CD45RA and CCR7 (H), whereas effector-memory-type nTregs were quantified based on the absence of both markers (I). All bar graphs show means ± SEM. In all statistical analyses, treatment groups were compared to the reference group (HC).

Supplemental Figure 3, Sattler, Thiel et al.



Supplemental Figure 3 MAIT cell differentiation and apoptosis. Frequencies of CD8⁺ and CD8⁺CD4⁻ “DN” peripheral MAIT cells ex vivo expressing IL-18R α (A), activated caspase 3 (B), CD56 (C), CD27 (D), CD8 β (E) or NKG2D (F) were quantified by FACS in tolerant and treated liver transplant recipients in comparison to age-matched healthy individuals. All bar graphs show means \pm SEM. In all statistical analyses, treatment groups were compared to the reference group (HC).

13 **Lebenslauf**

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

14 Publikationsliste

Sattler A, Thiel LG, Ruhm AH, Souidi N, Seifert M, Herberth G, Kotsch K. The TL1A-DR3 Axis Selectively Drives Effector Functions in Human MAIT Cells. *The Journal of Immunology*. 2019.

Sattler A*, Thiel LG*, Ruhm AH, Bergmann Y, Dornieden T, Choi M, Halleck F, Friedersdorff F, Eurich D, Kotsch K. Mucosal Associated Invariant T Cells are Differentially Impaired in Tolerant and Immunosuppressed Liver Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2020.

15 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder danken: für die bedingungslose Unterstützung und Liebe seit ich denken kann. Und meiner Oma, die immer stolz auf mich war, auch wenn sie kein Wort von dem verstanden hat, was ich erzähle.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Katja Kotsch für das in mich gesetzte Vertrauen, die anspruchsvolle, aufopferungsvolle Förderung und viele teure (!!!) Budgetzugeständnisse sowie Dr. rer. nat. Arne Sattler für eine phänomenale Betreuung und Beratung in allen Lebenslagen, unendliche Geduld und die besten Pizzaaerlebnisse Berlins.

Außerdem möchte ich auch Elena Hunger, Theresa Dornieden, Yasmin Bergmann und Ann-Kathrin Ruhm für die jederzeit tatkräftige und moralische Unterstützung danken.

Mein weiterer Dank gilt allen Koautoren, insbesondere auch Herrn PD Dennis Eurich, und Mitgliedern der AG „Transplantationsimmunologie“ für die herzliche Zusammenarbeit und kritische Auseinandersetzung mit meinen Projekten.

Schließlich möchte ich auch meiner Lerngruppe und all meinen anderen FreundInnen für die liebevolle Unterstützung und ein allzeit offenes Ohr danken.

Ohne euch alle hätte ich das nie geschafft!