

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie  
und dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Langfristige Veränderungen in der  
Immunzellzusammensetzung nach Dünndarmtransplantation  
und deren Assoziation mit Abstoßungsreaktionen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadja Luise Stobutzki

aus Berlin

Datum der Promotion: 26.06.2022

# Inhaltsverzeichnis

1 Abstracts.....	1
1.1 Abstract Deutsch.....	1
1.2 Abstract Englisch .....	2
2. Manteltext zur Publikationspromotion .....	3
2.1 Wissenschaftlicher Hintergrund und Fragestellung.....	3
2.1.1 Hypothesen.....	6
2.2. Methodik.....	7
2.2.1 Studienpopulation.....	7
2.2.2 Durchflusszytometrie.....	8
2.2.3 Chimärismusanalyse von T-Zellen .....	10
2.2.4 Genexpressionsanalyse (q RT-PCR).....	11
2.2.5. Methylierungsstatus von Foxp3 .....	12
2.2.6 Zytokin- und Chemokinmessung.....	13
2.2.7 Datenanalyse und statistische Auswertung.....	13
2.3. Ergebnisse und Ausblick .....	14
2.4. Literaturverzeichnis .....	21
3. Eidesstattliche Versicherung .....	26
3.1 Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....	27
4. Journal Summary List.....	30
5. Publikation.....	31
6. Curriculum Vitae.....	55
7. Publikationsliste.....	57
8. Danksagung.....	58

# 1 Abstracts

## 1.1 Abstract Deutsch

Der folgende Text entspricht dem Abstract der Arbeit „Long-Term Signs of T Cell and Myeloid Cell Activation After Intestinal Transplantation With Cellular Rejections Contributing to Further Increase of CD16<sup>+</sup> Cell Subsets“  
(DOI: 10.3389/fimmu.2019.00866)

Der gastrointestinale Trakt sorgt für eine Balance zwischen Toleranz-vermittelnden und inflammatorischen Immunreaktionen. Der ständige Kontakt mit Pathogenen kann zusätzlich die Immunreaktionen verstärken und damit zu Komplikationen nach Dünndarmtransplantation (ITx) beitragen.

Wir vermuten dementsprechend, dass ITx-Patienten in den verschiedenen Immunzellsubgruppen sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems dauerhafte Zeichen einer Immunzellaktivierung zeigen. Informationen über den Einfluss einer ITx auf die Immunzellzusammensetzung insbesondere in Bezug auf langfristige Veränderungen sind spärlich.

Wir untersuchten aktivierte und differenzierte Subgruppen des angeborenen und erworbenen Immunsystems nach ITx im Bezug zur Zeit nach Transplantation, durchgemachte Episoden von zellulären oder Antikörper-vermittelten

Abstoßungsreaktionen oder Art des Transplantats mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie, der Analyse der Genexpression sowie von Zytokinen und Chemokinen im Serum. ITx-Patienten zeigten dabei eine erhöhte Expression von CD16 exprimierenden Monozyten und myeloiden dendritischen Zellen (DCs) im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Dies war sogar bei Patienten, die vor mehr als 10 Jahren transplantiert wurden, nachweisbar. Weiterhin zeigten konventionelle CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen dauerhafte Zeichen einer Aktivierung, was durch gleichzeitig erhöhte CCR4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen kompensiert wird.

Patienten, die eine zelluläre Abstoßungsreaktion hatten, zeigten sogar noch höherer Anteile an CD16<sup>+</sup> Monozyten und DCs, während nach Transplantation von größeren Mengen Spendergewebe im Zuge einer multiviszeralen Transplantation eine deutlich gesteigerte T-Zellaktivierung beobachtet werden konnte.

Die dauerhafte Entzündung und die Aktivierung der angeborenen Immunzellen sind eventuell ein Grund für die schlechten Ergebnisse nach intestinaler Transplantation.

## 1.2 Abstract Englisch

Der folgende Text entspricht dem englischen Abstract der Arbeit „Long-Term Signs of T Cell and Myeloid Cell Activation After Intestinal Transplantation With Cellular Rejections Contributing to Further Increase of CD16<sup>+</sup> Cell Subsets“

(DOI: 10.3389/fimmu.2019.00866)

The intestine mediates a delicate balance between tolerogenic and inflammatory immune responses. The continuous pathogen encounter might also augment immune cell responses contributing to complications observed upon intestinal transplantation (ITx).

We thus hypothesized that ITx patients show persistent signs of immune cell activation affecting both the adaptive and innate cell compartment. Information on the impact of intestinal grafts on immune cell composition, however, especially in the long-term is sparse.

We here assessed activated and differentiated adaptive and innate immune subsets according to time, previous experience of cellular or antibody-mediated rejections or type of transplant after ITx applying multi-parametric flow cytometry, gene expression, serum cytokine and chemokine profiling. ITx patients showed an increase in CD16 expressing monocytes and myeloid dendritic cells (DCs) compared to healthy controls. This was even detectable in patients who were transplanted more than 10 years ago. Also, conventional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells showed persistent signs of activation counterbalanced by increased activated CCR4<sup>+</sup> regulatory T cells. Patients with previous cellular rejections had even higher proportions of CD16<sup>+</sup> monocytes and DCs, whereas transplanting higher donor mass with multi-visceral grafts was associated with increased T cell activation. The persistent inflammation and innate immune cell activation might contribute to unsatisfactory results after ITx.

## 2. Manteltext zur Publikationspromotion

### 2.1 Wissenschaftlicher Hintergrund und Fragestellung

Dünndarmtransplantationen wurden seit 1964 experimentell und seit 1987 erfolgreich mit zunächst schlechten Überlebensraten sowohl für das Transplantat als auch für den Patienten durchgeführt. Die Wende kam 1989 mit der Einführung des Calcineurin-Inhibitors Tacrolimus. Infolgedessen stieg in den 90er Jahren die Überlebensrate für das 1. Jahr auf 60% und für das 3. Jahr auf ca. 50% (1). So wurde die Dünndarmtransplantation zur akzeptierten Therapieoption bei Patienten mit lebensbedrohlichen Komplikationen im Zuge der parenteralen Ernährung bei Funktionsverlust des Dünndarms (2). Aktuell werden durchschnittlich über 100 Transplantationen pro Jahr weltweit durchgeführt (1, 3). Davon wird nur ein sehr kleiner einstelliger Anteil in Deutschland transplantiert (3).

Der Darm sorgt für die nötige Aufnahme von Nährstoffen, ist aber auch eine der größten Barrieren des Körpers zur Außenwelt und dementsprechend im ständigen Kontakt mit Pathogenen und Kommensalen. So muss eine feine Balance zwischen Toleranz und Immunabwehr vermittelt werden. Hierbei ist eine effiziente Kommunikation zwischen lokalen und infiltrierenden Immunzellen unabdingbar, um ein gesundes Gleichgewicht zwischen inflammatorischen Reaktionen zur Pathogenabwehr und Toleranz gegenüber der Standortflora und lebensmittelvermittelten Antigenen zu bewahren (4). Der Darm ist deshalb besonders reich an verschiedenen lymphatischen Geweben und weist dementsprechend auch eine hohe Dichte an T- und B-Zellen sowie Makrophagen und dendritische Zellen auf. Es findet eine unmittelbare Antigenerkennung statt, Chemokin- und/oder Rezeptor-vermittelte Kommunikation kann erfolgen und je nach generiertem Signal eine Immunantwort initiiert werden (2, 5). So ist der Darm auch im Vergleich zu anderen transplantierbaren Organen deutlich reicher an Immunzellen und deswegen auch an Spender-Immunzellen im Falle einer Organtransplantation (5). Diese befinden sich weiterhin in einem ständigen Austausch mit dem Immunsystems des Empfängers (5). Das ist nicht zuletzt der Grund, warum Dünndarmtransplantationen immer noch eine große Herausforderung darstellen und mit höheren Komplikationsraten als bei anderen Transplantationen verbunden sind. Im Allgemeinen kommt es nach Transplantation bereits intraoperativ häufiger zu Ischämie- und/oder Reperfusionsschäden. Diese zusammen mit Infektionen und

Entzündungen im Verlauf führen zur Expression von Oberflächenmolekülen sowie Toll-like-Rezeptoren, die wiederum inflammatorische Prozesse auslösen oder begünstigen können (5). Es ist also nachvollziehbar, dass Patienten nach Transplantation eines so immunogenen und keimbesiedelten Organs wie dem Darm deutlich höhere Raten an akuten Abstoßungsreaktionen haben, zu invasiven Infektionen neigen und aufgrund der hohen Dichte an Spender-Immunzellen auch häufiger die sogenannte Graft-vs.-Host-Erkrankung entwickeln (6, 7). Zusätzlich ist die Rate an Antikörper-vermittelten humoralen Abstoßungsreaktionen höher als nach anderen Transplantationen (8-10). Diese spielen auch eine Rolle bei spätem Funktionsverlust des Transplantats im Zuge zunehmender chronischer Abstoßungen (5). Bei aktuell fehlenden Serummarkern zur Diagnose einer kompromittierten Transplantatfunktion können Abstoßungsreaktionen nur mittels einer Kombination aus klinischen Anzeichen, endoskopischer Inspektion und histologischer Aufarbeitung von Biopsien sowie des Nachweises von Spender-spezifischen anti-HLA oder nicht-spezifischen anti-HLA Antikörpern im Serum festgestellt werden (8, 9, 11-15).

Insbesondere die invasive Diagnostik mittels Entnahme von Biopsien ist jedoch mit einer hohen Rate an Komplikationen verbunden und scheint sogar ähnliche verletzungsbedingte Immunreaktionen auszulösen. Zusätzlich ist die histologische Unterscheidung von Abstoßungsreaktionen und viralen Infekten immer noch schwierig (14). Bei klinischem und histologischem Verdacht auf Abstoßungsreaktion wird deswegen zunächst symptomatisch mit ergänzenden immunsuppressiven Präparaten wie Glukokortikoiden behandelt. Die Therapie beginnt so meist ungezielt und zeitversetzt zum Beginn der immunologischen Abwehrreaktion.

Es ist also nicht verwunderlich, dass trotz besserer Medikamente akute Abstoßungsreaktionen neben invasiven Infektionen immer noch der Hauptgrund für den Verlust eines Transplantats sind (1, 6, 7). Demensprechend zeigt sich zur besseren langfristigen Versorgung dieser Patientengruppe eine Notwendigkeit für die weitere Suche nach nicht invasiven, zuverlässigen und frühzeitig sichtbaren Markern für Abstoßungsreaktionen.

Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass vor oder während einer Abstoßungsreaktion erhöhte Anteile bzw. vermehrte Produktion von Mediatoren lokaler und peripherer Th1 und Th17 Zellen sowie CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen werden können (16-23).

Dem gegenüber ist aber wenig über die Bedeutung der Zellen des angeborenen bzw. unspezifischen Immunsystems bekannt. Gupta et. al. untersuchte das Verhältnis von myeloiden zu plasmazytoiden dendritischen Zellen bei Dünndarm-transplantierten Kindern mit früher akuter zellulärer Abstoßungsreaktion. Hier konnte eine sichtbare Verschiebung zugunsten der myeloiden Zellen während einer akuten zellulären Abstoßung nachgewiesen werden (24). Ob diese Veränderungen aber langfristig erhalten bleiben, wurde in der Studie nicht untersucht.

Insgesamt wurden bisher jeweils nur einzelne Immunzellpopulationen betrachtet. Eine übergreifende, mehrere Subtypen umfassende Analyse der Zusammensetzung der Immunzellen ist bisher nicht durchgeführt worden.

So sind zum Beispiel Veränderungen in B-Zellsubtypen trotz ihres großen Vorkommens im Darm und ihrer Bedeutung insbesondere für die humorale Immunabwehr bisher nicht analysiert worden.

Auch wurden Langzeitveränderungen des Immunsystems und im Detail einzelner Subtypen sowie der Einfluss von stattgefundenen Abstoßungsreaktionen auf die langfristige Zusammensetzung bisher nicht untersucht. Weiterhin wurden in bisher durchgeführten immunologischen Studien zelluläre und humorale Abstoßungsreaktion bei der Analyse meist nicht unterschieden und sind auch nicht direkt verglichen worden.

Wenn man bedenkt, dass das Immunsystem des Darms sich insbesondere aufgrund der besonderen immunologischen Balance in ständiger Interaktion mit anderen immunologischen Kompartimenten wie Blut und der Leber (25-27) befindet, ist anzunehmen, dass bei dauerhafter immunologischer Interaktion zwischen Eigen- und Fremdzellen große und insbesondere dauerhafte systemische Veränderungen in der Zusammensetzung der Immunzellen hervorgerufen werden.

Eine Untersuchung der Subtypen, die davon betroffen sind, wird nicht nur ein besseres Verständnis der Interaktion von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems sowie der Immunreaktionen aller Zellen nach intestinaler Transplantation, sondern auch neue Einblicke in die allgemeine Physiologie des Darmes ermöglichen. So können hier eventuell mögliche Veränderungen nachgewiesen werden, die wiederum Hinweise auf Ursachen und begünstigende Faktoren für akute Abstoßungen oder chronische Endzündungsprozesse liefern können.

Grant et. al. wies bereits nach statistischer Auswertung von Transplantationszahlen und Arten von Komplikationen im Zeitraum von 1988 bis 2011 daraufhin, dass der Schlüssel zur Verbesserung der Langzeitergebnisse nach ITx im besseren Verständnis des Immunsystems im Generellen und des Darms im Speziellen liegt. Als Konsequenz untersuchten wir in dieser Studie ob nach Dünndarm- bzw. multiviszeraler Transplantation dauerhafte Veränderungen in der Zusammensetzung der Immunzellen nachweisbar sind. Dabei lag der Fokus auf entzündungsfördernden Subtypen des angeborenen Immunsystems und den aktivierten Subtypen des erworbenen Immunsystems.

### 2.1.1 Hypothesen

Um insbesondere zu überprüfen, ob nach intestinaler Transplantation tatsächlich dauerhafte Zeichen einer Immunzellaktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems nachweisbar sind, führten wir eine multiparametrische Analyse der peripheren Immunzellen im Blut durch.

Unsere Untersuchungen beruhen auf folgenden drei Hypothesen:

1. Aufgrund der erhöhten Präsenz von Immunzellen und Pathogenen im Dünndarm wird nach ITx eine ständige Immunantwort ausgelöst, die eine erhöhte Zahl inflammatorischer T-Zellen und angeborenen Immunzellen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden hervorruft.
2. ITx-Patienten nähern sich nur sehr langsam der Immunzellzusammensetzung gesunder Kontrollprobanden nach Transplantation an. Um dies zu untersuchen, unterteilten wir die ITx-Patienten je nach Zeit seit Transplantation in Langzeittransplantierte über 10 Jahre (ITx1), Kurzzeittransplantierte 0-4 Jahre (ITx3) und den Transplantierten zwischen 4-10 Jahren (ITx2).
3. Abgelaufene Episoden von akuten humoral/gemischten (AR1) oder isoliert zellulären (AR2) Abstoßungsreaktionen verändern langfristig die Zusammensetzung der Immunzellen zugunsten aktivierter oder inflammatorischer Subgruppen im Vergleich zu Patienten ohne jegliche Abstoßungsreaktionen (noAR) nach Transplantation.



Unterstützend zur Zellanalyse führten wir Untersuchungen von ausgewählten Genen, dem Demethylierungsgrad des Foxp3- Genes, Chemokin- und Zytokinspiegeln sowie dem Chimärismus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch.

## 2.2. Methodik

### 2.2.1 Studienpopulation

Insgesamt wurden Proben von 11 isoliert Dünndarm-transplantierten (DTx) und 10 multiviszeral transplantierten (MTx) Patienten zwischen April 2014 und Februar 2015 entnommen (Tabelle 1). Zur Reduktion möglicher Fehlerquellen wurden ausschließlich Patienten, die an der Klinik für Allgemein- Viszeral- und Transplantationschirurgie des Virchow-Klinikums der Charité im Zeitraum von 2000 bis Februar 2014 transplantiert und nachversorgt wurden, im eventfreien Intervall im Zuge der ambulanten Nachsorge untersucht. Pro transplantierten Patienten (ITx) wurden drei bis acht aufeinanderfolgende Proben entnommen und jeweils der Median daraus gebildet.

Weiterhin wurden Proben von insgesamt 17 gesunden Probanden im vergleichbaren Alter und von beiden Geschlechtern gesammelt, um eine den ITx-Patienten vergleichbare Kontrollgruppe zu erhalten.

Die ITx-Patienten erhielten eine Induktionstherapie mit Thymoglobulin (Thymoglobulin®, Genzyme, Cambridge, Mass., USA; 7,5 mg/kg BW total dose) und eine Einmaldosis von Infliximab (Remicade®, Centocor Inc., Essex Pharma GmbH; 5 mg/kg BW). Die Erhaltungstherapie erfolgte dann mit Tacrolimus und Rapamycin (Sirolimus/ Everolimus) oder MMF (Cellcept®, Hoffmann-LaRoche, Switzerland).

Dabei war der Tacrolimus-Spiegel im untersuchten Intervall in allen Gruppen gleich. Die Patienten wurden zum einen unterteilt (i) nach Zeit seit der Transplantation (ITx1  $\geq$  10 Jahre, ITx2 = 4-10 Jahre, ITx3 = 0-4 Jahre) und zum anderen (ii) nach Auftreten von Abstoßungsreaktionen, wobei Patienten ohne Abstoßung (no AR), Patienten mit einer oder mehreren humoralen oder gemischten (humoral und zellulär; AR 1) oder mit rein zellulären (AR 2) Abstoßungsreaktionen unterschieden wurden.

Abstoßungsreaktionen wurden über klinische Symptome in Zusammenschau mit den jeweiligen Biopsie-Ergebnissen, welche nach etablierten histologischen Kriterien für Abstoßungsreaktionen bestimmt wurden (12, 13), diagnostiziert.

Bei der Diagnose von humoralen Abstoßungen wurden weiterhin anti-Donor HLA Antikörper bestimmt und eine histologische Färbung vom Komplementspaltprodukt C4d durchgeführt (9).

Alle eingeschlossenen Patienten und gesunden Kontrollen gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der hier durchgeführten Studie, die von der Ethikkommission der Charité—Universitätsmedizin Berlin genehmigt wurde (EA2/044/08 & EA2-020-14).

### 2.2.2 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurden die verschiedenen Immunzellsubklassen unter Verwendung fluoreszenz-markierter Antikörper (Ak) in sieben verschiedenen Ak-Paneln nachgewiesen und ihr prozentualer Anteil sowie ihre Absolutzahl ermittelt. Die Färbung und Messung des intrazellulären und der oberflächlichen Antigene erfolgte nach standardisiertem Protokoll des ONE-Study Konsortiums (29, 30). Das erste Panel gibt dabei einen Überblick über die Verteilung bzw. dem absoluten und prozentualen Anteil der verschiedenen Immunzellgruppen des angeborenen (NK-Zellen, Granulozyten und Monozyten) und erworbenen Immunsystems (B- und T-Zellen) im Allgemeinen. Zur Analyse der zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen mit unterschiedlicher Expression von HLA-DR als Aktivierungsmarker und den verschiedenen T-Zellrezeptoren wurde Panel 2 durchgeführt. Dabei wurde insbesondere die Subgruppe der  $\gamma\delta$  T-Zellen, welche neben Haut und Lunge vermehrt im Darm vorkommen und die Expression  $V\delta 1$  und  $V\delta 2$ - Ketten im  $\gamma\delta$  - Rezeptor untersucht. Des Weiteren wurden die Langzeitaktivierung und die Differenzierung sowie die Proliferation der T-Zellen nach Transplantation in Panel 3 untersucht. Neben der Analyse weiterer Aktivierungsmarker wie CD57, PD-1 und CCR7 erfolgt hier auch die Untersuchung der differenzierten T-Zellen mittels Nachweises der Expression von CD28 und CD27. Die prozentuale und absolute Anzahl an B-Zellen ( $CD19^+$ ) und deren Subpopulationen wurde in Panel 4 analysiert. Dabei lag der Fokus auf der Differenzierung der B-Zellen in Gedächtniszellen ( $IgD^- IgM^+ CD27^+ CD38^-$ ), Plasmazellen ( $IgD^- IgM^+ CD27^+ CD38^{high}$ ) und transitionelle B-Zellen ( $IgM^+ CD27^- CD38^+ CD24^{high}$ ) sowie marginal Zonen B-Zellen ( $CD27^+ IgD^+$ ). In Panel 5 werden speziell nochmal die verschiedenen Subpopulationen der dendritischen Zellen (DCs,  $LIN^- HLA-DR^+$ ) betrachtet mit besonderem Fokus auf die myeloiden DCs

(CD11c<sup>+</sup>) mit Expression von CD1c<sup>+</sup> und zusätzlicher Expression von Clec9 bei fehlender Expression von CD16 sowie peripheren DCs (CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>).

Aufgrund ihrer führenden immunologischen Rolle im Darm (4) etablierten wir zusätzlich zur besseren Unterscheidung und Klassifizierung der T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen (Tregs) einen Ansatz mit Antikörper gegen Chemokin-Rezeptoren (Panel 6). Das siebte Panel zur allgemeinen Untersuchung der Tregs wurde ebenfalls von der OneStudy übernommen. Die verwendeten Antikörper und die spezielle Gating-Strategie des Chemokin-Panels können den anhängenden Tabellen und Abbildungen entnommen werden (Tabelle 1 und Abbildung 1 im Anhang).

Die Proben wurden innerhalb von 4h nach Abnahme gefärbt und gemessen. Parallel ging eine weitere EDTA-Probe an das Diagnostiklabor (Labor Berlin) zur standardisierten Bestimmung der Leukozytenzahl.

Es wurden jeweils 100µl EDTA-Vollblut unmittelbar mit den für jedes Panel vorbereiteten Ak-Mixen versetzt und nach 15min Inkubation erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit 1,5ml Versa-Lyse-Fix-Solution bestehend aus 2ml VersaLyse™ und 50µl IOTest® Fixative Solution (Beckman Coulter GmbH). Für die dendritischen Zellen (Panel 5) wurde der beschriebene Ansatz zweifach vorbereitet und nach der Färbung zusammengeführt.

Für den Nachweis von Foxp3 in regulatorischen T-Zellen (Panel 7) wurden jeweils 50µl Vollblut wie zuvor beschrieben mit den Oberflächenantikörpern versetzt und anschließend mit dem Perfix-nc Kit (Beckman Coulter) die intrazelluläre Färbung von Foxp3 mit einer Stunde Inkubationszeit durchgeführt.

Für das B-Zell-Panel (Panel 4) wurden 300µl EDTA Vollblut zuerst mittels 15ml Red Blood Cell Lysing Solution (Miltenyi Biotec GmbH) für 12 Minuten lysiert und anschließend die Färbung durchgeführt.

Alle Proben wurden durchschnittlich innerhalb von 30 Minuten am 10-Farben, 3-Laser Durchflusszytometer „Navios“ der Firma Beckman Coulter gemessen. Die Zielkanäle für alle Fluorochrome wurden mittels „Flow-Set Pro Beads“ (Beckman Coulter) definiert und täglich vor den Messungen mit „Flow Check Pro Beats“ (Beckman Coulter) überprüft und gegebenenfalls kalibriert.

### 2.2.3 Chimärismusanalyse von T-Zellen

Um zu überprüfen, ob mögliche Veränderungen ausschließlich durch die T-Zellen des Empfängers hervorgerufen wurden, führten wir die Chimärismusanalyse zur Analyse von prozentualen Anteilen von Spender-T-Zellen im Blut durch. Dabei werden die Spender- und Empfängerallele auf so genannten „short tandem repeats“ mittels Polymerasekettenreaktion nachgewiesen. Dafür werden fluoreszenz-markierte Primer verwendet. Zunächst müssen aber die Zellen isoliert, gefärbt und sortiert werden.

Direkt nach Abnahme erfolgte die Isolation der peripheren blutmononukleären Zellen (PBMCs) aus Heparin-Vollblut bei Raumtemperatur. Hierbei wurde das Blut 1:2 mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK) gemischt und mittels Dichtegradientenzentrifugation (Biocoll, Biochrom, Berlin, Germany) die PBMCs angereichert. Die Zellen wurden gewaschen, transferiert und die Zellzahl mittels Hemocytometer bestimmt. Die isolierten PBMCs wurden anschließend bis zur weiteren Verarbeitung kryokonserviert.

Die PBMCs wurden bei Weiterverarbeitung mit 3,2mg/ml humanem Immunglobulin (Beriglobin, CSL Behring, Germany) für insgesamt 5 Minuten inkubiert. Auf diesem Weg wurden die Fc-Rezeptoren blockiert, so dass anschließend die Färbung mit anti-TCR $\alpha\beta$ -PE, anti-CD4-APC and anti-HLA-DR-ECD erfolgen konnte. Unmittelbar vor dem Sortieren und nach Waschen der Zellen erfolgte die Färbung mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), welches mit der DNA interkaliert und somit eine Unterscheidung von toten (DAPI<sup>+</sup>) und lebendigen (DAPI<sup>-</sup>) Zellen ermöglicht. Die gewünschten Populationen DAPI<sup>-</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> Zellen und -HLA-DR<sup>+</sup> Zellen wurden mit dem FACSAria II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) isoliert. Die genaue Gatingstrategie kann Abbildung 4 im Anhang des Papers entnommen werden.

Nach herausfiltern der gewünschten T-Zellpopulationen erfolgte die eigentliche quantitative Chimärismusanalyse. Die DNA wurde mittels standardisiertem Verfahren (QIA-Amp; QIAGEN), nach Angaben des Herstellers extrahiert. Für die anschließende Amplifikation der DNA durch qPCR nutzten wir das AmpFISTR® Identifier™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) und folgten den Angaben des Herstellers. Dieses Kit enthält Paare von fluoreszenz-markierten Primern (insgesamt 4 Fluoreszenzfarbstoffe) für die Vermehrung von gleichzeitig 16 DNA-Abschnitten. Die anschließende Fragmentlängenanalyse der PCR-Produkte erfolgte

nach Zugabe von 0,3µl GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard, dem fünften Fluoreszenzfarbstoff zur Größenbestimmung, am Genetic Analyzer 3730 (Applied Biosystems). Die Daten wurden mittels GeneMapper 3.7. Software von Applied Biosystems analysiert. Dabei wurden für die Quantifizierung die Fläche der Peaks des Spenders ins Verhältnis zur Summe der Fläche der Peaks des Empfängers und Spender gesetzt.

$$\left( \frac{\sum \text{Fläche Peaks des Spenders}}{\sum \text{Fläche Peaks des Rezipienten} + \sum \text{Fläche Peaks des Spenders}} \right) \times 100 = \text{Anteil Spenderzellen [\%]}$$

Quelle: Protokoll zur Chimärismusanalyse, Labor Berlin, MOL AM-01514, Version 2, 2019

Die Sensitivität der Methode beträgt dabei 1%.

#### 2.2.4 Genexpressionsanalyse (q RT-PCR)

Zusätzlich zur zellulären Analyse führten wir quantitative Messungen der mRNA-Expression immunrelevanter Gene (>20) in einem multiplexen Ansatz durch. Die untersuchten Gen-Marker wurden bereits bei nierentransplantierten Patienten mit operationeller Toleranz bzw. mit akuter/chronischer Abstoßung vermehrt exprimiert nachgewiesen (im Anhang Tabelle 5).

Hierfür wurden Blutproben in speziellen RNA-stabilisierenden Röhrchen (Tempus Blood RNA Tubes; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany) und EDTA abgenommen.

Die RNA wurde mittels MagMAX™ für Stabilized Blood Tubes RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) nach standardisiertem Protokoll des Herstellers unter ständiger Kühlung extrahiert. Der RNA-Gehalt wurde mittels NanoDrop 100 Spektrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH) quantifiziert und bis zu 1000ng RNA wurden mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) in c-DNA nach Angaben des Herstellers umgeschrieben.

Anschließend wurde jeweils 100µl jeder Probe mittels TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific), microfluidic cards und TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific) am ViiA7 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) nach standardisiertem Protokoll gemessen. Insgesamt wurde die Genexpression von 21 Genen und 3 „Housekeeping-Genen (HPRT, GAPDH und B2M) als Doppelwertbestimmung auf 384-Well- microfluid Custom TaqMan® Array Cards gemessen. Die generierten Daten wurden wiederum mit der ViiA7 Software v 1.2.2 ausgewertet und in Excel exportiert. Hier wurden die Differenzen aus den

Mittelwerten des Zielgens und dem Mittelwert jedes Referenzgens (Housekeeping-Gen: Hypoxanthine- guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), beta-2-microglobulin (B2M) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)) gebildet und die relative Expression nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode berechnet.

### 2.2.5. Methylierungsstatus von Foxp3

Weiterhin führten wir eine quantitative DNA-Methylierungs-Analyse einer spezifischen hoch konservierten Region im Foxp3-Gen (TSDR - Treg-specific demethylated region), welche aktiv demethyliert wird, mittels rt-PCR durch. Die EDTA-Proben wurden zunächst eingefroren und für die Untersuchung jeweils aufgetaut. Zur Untersuchung des Methylierungsstatus erfolgte die Isolation von genomischer DNA aus EDTA-Vollblut mit dem QIAamp DNA-Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden 200µl Blut mit Pufferlösung und Proteinkinase K inkubiert. Die Lyse wurde nach 10 Minuten mit Ethanol beendet. Der Ansatz wurde anschließend mit verschiedenen Pufferlösungen gewaschen und über eine Membran herausgefiltert. Der DNA-Gehalt wird wie zuvor mit dem NanoDrop 100 Spektrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH) gemessen. Anschließend werden bis zu 2µg DNA pro Probe bisulfitiert. Dies erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen) und Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400/9600, Applied Biosystems). Dabei wird nicht-methyliertes Cytosin in Uracil durch die Behandlung der DNA mit Natrium-Bisulfite umgewandelt, wohingegen methyliertes Cytosin unverändert bleibt. Nach Reinigung der bisulfitierten DNA erfolgte die Messung der Sequenzunterschiede mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion mit dem ABI 7500Cycler (Thermo Fisher Scientific), wodurch der Anteil der demethylierten DNA im Verhältnis zur Gesamt-DNA bestimmt werden kann. Hierfür wurden 10 µl FastStart Universal Probe Master (ROX, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 100 ng Lambda DNA (NEB, Frankfurt a.M., Germany), 5 pmol spezifische Sonde für Methylierung oder Demethylierung, 30 pmol spezifische Primer für Methylierung oder Demethylierung und mindestens 15 ng bisulfitierte DNA bzw. Standardkontrolle (alle Epiontis GmbH, Berlin, Germany) verwendet, so dass ein Endvolumen von 20µl pro Reaktionsansatz entstand. Jede Probe wurde in Dreifachbestimmungen gemessen. Für die Berechnung des prozentualen Anteils an CD4<sup>+</sup>T-Zellen mit demethylierter TSDR wurde der Mittelwert aller drei Messungen einer Probe gebildet und ins Verhältnis zur

Gesamt-Foxp3-DNA gesetzt. Anschließend wurden diese auf den Anteil an CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T-Zellen, welche mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurden, bezogen. Da sich das FoxP3-Gen auf dem X-Chromosom befindet, wurden bei weiblichen Patienten alle Ergebnisse verdoppelt.

### 2.2.6 Zytokin- und Chemokinmessung

Zusätzlich zur Analyse der T-Helferzellen und regulatorischen Zellen in der Durchflusszytometrie führten wir eine quantitative Analyse der Zytokin- und Chemokinspiegel im Serum durch. Dabei wurden Konzentrationen von T –Zellen und Makrophagen anlockenden Chemokinen wie CXCL1, CXCL10, CCL2, CCL7 und CCL3 und von durch T-Helferzellen freigesetzten Zytokinen wie Interleukin (IL) -2, IL-4, IL-5, IL-10, IL- 17A und Interferon Gamma (INF- $\gamma$ ) bestimmt. Hierfür wurde Vollblut entnommen, unmittelbar danach zentrifugiert und das Serum in ein Eppendorf-Gefäß transferiert und bei -20° eingelagert.

Für die Luminex-Analyse wurde die Proben nach Herstellerangaben des Milliplex® MAP Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vorbereitet. Dafür wurde jeweils 25 $\mu$ l Serum mit 25 $\mu$ l „Antibody-Immobilized Magnetic Beads“ über Nacht und anschließend mit 25 $\mu$ l Detektions-Ak inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels Bio Plex® 200 Systems (Luminex, Bio-Rad Laboratories GmbH) gemessen. Das Gerät wurde alle 30 Tage mit Bio-Plex® Validation Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH) überprüft und wurde jeden Tag mit Bio-Plex® Calibration Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH) kalibriert.

### 2.2.7 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mittels Kaluza Version 1.2 (Beckman Coulter). Die einzelnen Subpopulationen wurden anhand spezifischer Oberflächenantigene unterschieden und nach standardisierten Protokollen definiert (30). Zur Berechnung der absoluten Zellzahlen für alle Populationen wurde die im Labor Berlin bestimmte Leukozytenzahl in Bezug zur Anzahl der CD45<sup>+</sup>Zellen in jedem einzelnen Ak-Panel gesetzt. Die Berechnung der korrespondierenden Anteile aller dargestellten Populationen erfolgte in Excel. Bei mehreren Proben pro Patienten wurde aus allen Ergebnissen der Median bestimmt. Während der untersuchten Periode waren die jeweiligen Zellpopulationen der einzelnen Patienten im zeitlichen

Verlauf vergleichbar stabil (siehe im Anhang Abbildung 2). Alle statistischen Analysen wurden in „R“ durchgeführt.

Unterschiede in prozentualen Anteilen und absoluten Zellzahlen jeder untersuchten Population in Bezug auf gesunde Kontrollen und ITx-Patienten, Zeitpunkt der Transplantation, Abstoßungsstatus oder Art des Transplantats sind mittels Kruskal-Wallis-Test und Conover post-hoc Test analysiert worden. Dabei wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test zunächst festgestellt, ob generell Unterschiede für die Ergebnisse eines Messparameters bestehen und anschließend durch den Conover post-hoc-tests überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen vorhanden sind.

Ergebnisse wurden als signifikant angesehen, wenn  $p < 0,05$  erreicht wurde. Die P-Werte wurden aufgrund des explorativen Ansatzes dieser Studie nicht für Mehrfachtestungen angepasst.

Zur zusammenfassenden Darstellung aller signifikanten ( $p < 0,05$ ) Messparameter erstellten wir farbcodierte Heatmaps, welche in sich nochmal nach Ähnlichkeiten sortiert (geclustert) wurden. Dies erfolgte einmal für alle aktivierten und differenzierten sowie naiven und nicht aktivierten Zellgruppen bei ITx-Patienten im zeitlichen Verlauf und im Vergleich zu gesunden Probanden. Außerdem wurden signifikante Populationen in Bezug auf den Abstoßungsstatus dargestellt. Hierbei verwendeten wir jeweils eine hierarchische Clusteranalyse. Dies ermöglicht eine übersichtliche Darstellung der Unterschiede und Gemeinsamkeiten aller geclusterten Populationen in Bezug zum zeitlichen Verlauf und Abstoßungsreaktionen und im Vergleich beider Kohorten (ITx vs. HCs).

Um Differenzen farblich darstellen zu können, wurden für die Heatmaps die Z-Scores berechnet. Dafür wurden alle Werte eines Parameters durch die Standardabweichung geteilt und der Mittelwert jeweils abgezogen. So erhielten wir am Ende für alle Werte eine Standardabweichung, die gleich 1 war und einen Mittelwert der 0 entsprach.

### 2.3. Ergebnisse und Ausblick

Wir führten eine umfassende Analyse der Immunzellzusammensetzung nach Dünndarm- und Multiviszeral-Transplantation durch. Der Fokus lag dabei auf langfristigen Veränderungen im zeitlichen Verlauf und im Vergleich zu gesunden



Kontrollen sowie nach durchlebten Abstoßungsreaktionen unterschieden nach zellulärer und humoraler Genese. Es wurden absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile betrachtet.

Insgesamt konnten deutliche Veränderungen in der Zusammensetzung einzelner Immunzellsubgruppen nach intestinaler Transplantation nachgewiesen werden. Insbesondere im angeborenen Immunsystem waren diese im erstaunlichen Ausmaß ersichtlich. So zeigte sich der Anteil der CD16 exprimierenden Monozyten und myeloiden dendritischen Zellen (DCs) nach intestinaler Transplantation deutlich erhöht. Dies war auch noch nach 10 Jahren nach Transplantation ersichtlich. Zusätzlich konnte bei Patienten mit durchlaufener zellulärer Abstoßung nochmals deutlich höhere Werte insbesondere der absoluten Zahlen der Gesamt-DCs, CD16<sup>+</sup> Monozyten und 16<sup>+</sup> myeloider DCs (Abbildung 1C und Anhang Tabelle 3 und 4) ermittelt werden.

Nach zellulärer Abstoßung waren zusätzlich die prozentualen Anteile der Gesamt-NK-Zellen reduziert. Jedoch zeigte sich innerhalb dieser ein deutlich erhöhter Anteil der differenzierten CD56<sup>high</sup> NK-Zellen. In Zusammenschau mit reduzierter Expression des peripheren Toll-like-Rezeptors 5 (TLR 5) konnten Patienten mit Episoden von zellulärer Abstoßung von Patienten mit stabiler Transplantatfunktion und jenen mit humoralen Abstoßungen abgegrenzt werden. Hierbei ist zu betonen, dass diese Veränderungen nicht durch Schwankungen in der immunsuppressiven Therapie beeinflusst wurden, da sich die Tacrolimus-Spiegel in allen drei Gruppen nicht unterschieden. Diese Abgrenzung von Patienten mit isoliert zellulärer Abstoßung zu gesunden Probanden und Patienten mit humoral/gemischter Abstoßung ist in der grafischen Darstellung der Heatmap besonders eindeutig erkennbar (Abbildung 6c).

Insgesamt ließen sich deutlich alterierte Zusammensetzungen der NK-Zellen bei Patienten mit Abstoßungsreaktionen beobachten. Dies beruht womöglich auf dem Zusammenhang zwischen der Aktivierung der NK-Zellen bei Abstoßungsreaktionen und der Akkumulation dieser Zellen im Transplantat. Die Daten stehen jedoch im Widerspruch zu anderen Studien. So zeigten sich bei Patienten nach Nierentransplantation mit nachweisbaren Spender-spezifischen anti-HLA Antikörpern (DSA) und nicht-DSA ein verminderter Anteil an CD56<sup>+</sup> NK-Zellen mit stark erhöhtem Anteil an CD56<sup>high</sup> NK-Zellen unabhängig von der Art der Antikörper, bereits durchgemachten akuten Abstoßungen oder dem Therapieregime (31). Weiterhin

wurden in Biopsien von nierentransplantierten Patienten mit antikörper-vermittelter Abstoßung vermehrt NK-Zell assoziierte mRNA nachgewiesen. In dieser Arbeit waren bei humoraler Abstoßung reduzierte zirkulierende NK-Zellen und erhöhte Anteile an CD56<sup>high</sup> NK-Zellen nachweisbar. Weiterhin zeigten die Patienten mit überstandener zellulärer Abstoßung das in den Studien bei Patienten mit humoraler Abstoßungsreaktion beschriebene Verteilungsmuster der NK-Zellen. (31-33). Wie bereits erwähnt, haben Studien bei intestinal transplantierten Kindern mit akuten Abstoßungsreaktionen erhöhte Anteile an myeloiden Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen nachgewiesen (24, 34). Auch bei unseren Untersuchungen waren CD16 exprimierende Monozyten und myeloide DCs am höchsten bei zellulärer Abstoßung nach Transplantation. Erhöhte Anteile an CD16<sup>+</sup> Monozyten wurden ebenfalls bei Patienten mit chronischer Entzündung wie bei chronischer Niereninsuffizienz (CKD) detektiert und es wird diskutiert, ob diese hierbei den epithelialen Schaden widerspiegeln (35).

Weiterhin waren Granulozyten proportional und absolut erniedrigt in Proben von Patienten mit Zustand nach zellulärer Abstoßung. Tatsächlich wurde die intestinale Diapedese von Neutrophilen bei Abstoßungsreaktionen sowohl vom zellulären (28) als auch Antikörper-vermittelten Typ (36, 37) bereits beschrieben. Da unsere Blutanalysen zeitlich verzögert, relativ spät nach der Abstoßungsreaktion durchgeführt wurden, deuten unsere Ergebnisse an, dass die Migration der Granulozyten auch in Abwesenheit von klinischen Symptomen anhält.

Im Vergleich zu myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) werden pDCs eher mit Toleranzentwicklung assoziiert. Dies konnte zum Beispiel bereits bei lebertransplantierten Patienten gezeigt werden (38, 39). Folglich gibt das niedrige Verhältnis von pDC/mDC und die hohen Anteile an inflammatorischen CD16<sup>+</sup> Monozyten und DCs, welche in unseren Patienten gemessen haben, Hinweise auf konstante inflammatorische Prozesse nach intestinaler Transplantation. Insgesamt waren die Veränderungen im angeborenen Immunsystem unabhängig von der Art des Transplantats.

Zusätzlich zu Veränderungen im angeborenen Immunsystem zeigten sich bei unseren Patienten auch deutlich mehr aktivierte konventionelle T-Zellen mit dementsprechend hoher Expression von HLA-DR und CD57 (Abbildung 3A). Da Dünndarmtransplantation im Allgemeinen schon ein großes immunologisches Ereignis darstellt, vermuteten wir dadurch bedingt eine erhöhte Chemokin-

Rezeptorexpression, die die Migration von zirkulierenden Immunzellen begünstigt. So untersuchten wir sowohl die Chemokinrezeptorexpression (40, 41) als auch die Chemokinspiegel selbst. Tatsächlich wiesen die aktivierten konventionellen T-Zellen wiederum eine erhöhte Expression verschiedener Chemokinrezeptoren der T-Helferzellensubgruppen mit konstant hohen Anteilen von Th1, Th2 und Th17 im Vergleich zu gesunden Probanden auf (Abbildung 5C). Zudem detektierten wir mehr aktivierte T-Helferzellen abhängig vom Transplantat-Typ. So zeigte sich insbesondere ein höherer Anteil an HLA-DR<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>, oder CD27<sup>-</sup> T-Zellen bei Patienten mit multiviszeraler Transplantation (im Anhang Abbildung 3B). Wenn man zusätzlich die Chemokin- und Zytokinspiegel betrachtet, zeigen sich hohe Spiegel von T-Zell rekrutierenden Chemokinen und Th2- Chemokinen nach intestinaler Transplantation auch noch nach langer Zeit (Abbildung 6A). Dabei war die Erhöhung auch unabhängig von Abstoßungsepisoden. Auch dies unterstützt das Bild der generellen Immunaktivierung nach ITx.

Diese wird wiederum vermeintlich über einen erhöhten Anteil an aktivierten regulatorischen T-Zellen kompensiert, da alle Patienten auch 10 Jahre nach Transplantation deutlich mehr CCR4<sup>+</sup> Tregs, also Tregs mit aktivierten Gedächtniszellen- Phänotyp (42) im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten (Abbildung 5A). Zusätzlich exprimiert die Mehrheit der Zellen zusätzlich CCR6 (Abbildung 5B). Übereinstimmend war der Prozentsatz an CD4<sup>+</sup> Zellen mit demethylierter TSDR und damit stabiler Foxp3 Expression höher in transplantierten Patienten und war dabei auch unbeeinflusst vom Rejektionsstatus (im Anhang Abbildung 5A, C). Unsere Ergebnisse stellen damit die Schlussfolgerung einer erst vor kurzem publizierten Studie in Frage. In dieser waren hohe Anteile an regulatorischen T-Zellen bei intestinal transplantierten Patienten einem immunmodulatorischen Therapieschema zugeschrieben worden und wurden mit langlebigerer Transplantatfunktion assoziiert (43). Dabei wurden ITx-Patienten, die das immunmodulierende Therapieprotokoll erhielten, mit Patienten nach Nierentransplantation und gesunden Kontrollen verglichen. Ein Vergleich zu ITx-Patienten mit anderen immunsuppressiven Therapieprotokollen wurde dabei nicht durchgeführt. Wir vermuten jedoch, dass hohe Anteile an CCR6<sup>+</sup> Tregs eventuell auf eine permanente Rekrutierung zum Ausgleich der ständigen Immunzellaktivierung nach intestinaler Transplantation hindeuten könnten.

Die Anzeichen permanenter T-Zellaktivierung waren unabhängig von einer Sensibilisierung vor Transplantation, da sich in keinem der Patienten Spender-spezifische anti-HLA-Antikörper vor Transplantation nachweisen ließen (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin war trotz höherer Anteile an Chemokin-Rezeptor exprimierenden regulatorischen und konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kein Zusammenhang zu Abstoßungsreaktion in der Vergangenheit erkennbar.

In früheren Studien ließen sich vermehrte Anteile an CD154<sup>+</sup> aktivierten Gedächtnis T-Zellen bei Patienten mit Abstoßungsreaktion nachweisen (16, 23). In unserer Patientenkohorte zeigte sich wiederum eine umfassende und persistierende T-Zellaktivierung, Differenzierung der T-Helferzellen und Ausbildung von Gedächtnis-T-Zellen. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen Patienten mit zellulärer oder humoraler Abstoßung nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich eine Abhängigkeit von der transplantierten Spendermenge. Dieser Effekt der Antigenmenge stimmt mit Ergebnissen vorheriger Studien überein (44). Die meisten Proben der Patienten mit Abstoßungsreaktionen sind Monate bis Jahre nach der letzten Abstoßungsreaktion abgenommen worden, was eventuell die Unstimmigkeiten zu der oben erwähnten Publikation erklären könnte. Allerdings war das Ziel dieser Studie nicht, prädiktive Biomarker zur Früherkennung oder Diagnose von Abstoßungsepisoden zu identifizieren. Im Gegenteil der Fokus lag darauf zu untersuchen, wie die allgemeine Immunzellzusammensetzung und die generelle Immunzellaktivierung nach intestinaler Transplantation einschließlich durch akute klinische Ereignisse wie Abstoßungsreaktionen im generellen verändert werden.

Dabei zeigte sich überraschend und gegensätzlich zu anderen Studien, in denen hohe Anteile an Spender-T-Zellen Chimärismus insbesondere früh nach Transplantation und bei multiviszeral-transplantierten Patienten nachgewiesen wurden (45, 46, 47), kein Nachweis von Spender-Allelen in peripheren CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. Es spielte keine Rolle, ob es sich um aktivierte HLA-DR<sup>+</sup> oder nicht-aktivierte HLA-DR<sup>-</sup> Subpopulationen handelte. Dem entsprechend sind die hohen Anteile an aktivierten T-Zellen bei unseren Patienten kein Zeichen für einen persistierenden Chimärismus.

Um die nachgewiesenen Unterschiede zwischen ITx-Patienten und gesunden Probanden sowie Patienten mit zellulärer Abstoßung im Vergleich zum Rest übersichtlich zu visualisieren, führten wir eine Clusteranalyse inklusive Heatmap-

Darstellung aller unangepassten signifikanten ( $p < 0,05$ ) Werte, die eine Unterscheidung der einzelnen Gruppen je nach Transplantationszeit und Abstoßungsstatus ermöglichen, durch.

Dabei ist eine klare Abtrennung von den intestinal transplantierten Patienten zu den gesunden Probanden erkennbar. Insgesamt zeigt sich bei den ITx-Patienten ein inflammatorisch geprägte Zellzusammensetzung nach Transplantation mit hohen Anteilen an aktivierten und differenzierten Immunzellen wie  $CD16^+$  Monozyten,  $CD56^{\text{high}}$  NK-Zellen und  $CD4^+$  aktivierten,  $CD4^+$  Chemokinrezeptor exprimierenden sowie  $CD4^+$  Gedächtnis-T-Zellen, aber auch  $\gamma\delta^+$ T-Zellen, Interleukin 4 und der B-Zellreihe. Dabei waren B-Zellen im Ganzen und die naiven B-Zellen neben weiteren Subgruppen nach intestinaler Transplantation vermehrt auffindbar. Korrelierend waren die Genmarker MS4A1 (Membrane Spanning 4-Domains A1), CD79B und TCL1A (T-Cell Leukemia/Lymphoma 1A), welche in Transitional- und naiven B-Zellen vermehrt exprimiert werden, nach Transplantation auch erhöht.

Eine zusätzliche Aktivierung von Immunzellen konnte dabei bei Patienten mit zellulärer Abstoßung gesehen werden. Wie oben beschrieben konnten auch hier Patienten mit zellulärer Abstoßung durch einzelne Subgruppen, aber auch Parameter der zusätzlichen Analysen sichtbar abgegrenzt werden. Dem gegenüber zeigten gesunde Kontrollen eine Zellzusammensetzung aus nicht-aktivierten und naiven  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen,  $CD16^-$  Monozyten und  $CD56^{\text{dim}}$  NK-Zellen. Die komplette Liste der zur Separation beitragenden Parameter ist im Anhang aufgeführt.

Es finden sich auch in unserer Studie Einschränkungen. So ist die Patientenkohorte recht klein. Jedoch muss man sagen, dass wir im Bezug zur geringen Transplantationsrate von Dünndarm im Generellen und insbesondere in Deutschland eine der größten Erwachsenen-Kohorten in Europa betrachteten.

Weiterhin wurden keine Untersuchungen der Zellzusammensetzung im Transplantat selbst durchgeführt.

Bedenkt man zusätzlich die hohe Sterblichkeitsrate in den ersten 5 Jahren nach intestinaler Transplantation, zeigt sich bei den vor 4 Jahren transplantierten Patienten (ITx1 und ITx2) eine Verzerrung bezüglich überlebender Patienten. Dies macht jedoch die gesehen Veränderungen in der Zusammensetzung der Immunzellen spät nach Transplantation umso erstaunlicher.

Zusätzlich ist zu betonen, dass dies die erste umfassende Analyse von

zeitabhängigen und abstoßungsbedingten Veränderungen von systemischen Immunzellzusammensetzungen ist. Ein genereller Überblick über die Immunzellzusammensetzung könnte zu neuen Ansätzen und Hypothesen für weiterführende Analysen zur langfristigen Findung neuer Marker führen. Denn um für Abstoßungen prädiktive Zellgruppen zu identifizieren, benötigt man ein besseres Verständnis der „normalen“ durch ITx verursachten Veränderung der Immunzellzusammensetzung. Weiterhin kann man nur Aussagen über die möglichen Ursachen einer chronischen Abstoßung treffen, wenn man generelle zeitliche Veränderungen und durch Akutereignisse wie Abstoßungsreaktionen ausgelöste Langzeitveränderungen untersucht hat. So war das Ziel dieser Studie einen ersten Überblick über solche Langzeitveränderungen zu verschaffen. Unsere Resultate zeigen eine dauerhafte inflammatorische Immunantwort und Aktivierung nach ITx, welche einen ersten Hinweis auf mögliche Ursachen für die unbefriedigenden Langzeitergebnisse nach ITx im Vergleich zu anderen soliden Organen geben. Dies müsste jedoch weiterführend untersucht werden. Für die Zukunft wäre es wichtig, solche umfangreichen Analysen nicht nur bei dieser Patientengruppe zu vertiefen, sondern auch bei Patienten nach Transplantation andere Organe durchzuführen. Das überschreitet jedoch den Schwerpunkt und die Möglichkeiten dieser Arbeit.

## 2.4. Literaturverzeichnis

1. Grant D, Abu-Elmagd K, Mazariegos G, Vianna R, Langnas A, Mangus R, Farmer DG, Lacaille F, Iyer K and Fishbein T. Intestinal transplant registry report: Global activity and trends. *Am J Transplant* 2015; 15: 210–219. doi: 10.1111/ajt.12979
2. Kroemer A, Cosentino C, Kaiser J, Matsumoto CS, Fishbein TM. Intestinal transplant inflammation: the third inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep.* (2016) 18:56. doi: 10.1007/s11894-016-0530-0
3. Annual Report/Eurotransplant International Foundation – Leiden: Eurotransplant Foundation. -III., graf., tab. Published annually Annual report 2018 / ed. by Peter Branger and Undine Samuel ISBN-EAN: 978-90-71658-38-9
4. Powell N, MacDonald TT. Recent advances in gut immunology. *Parasite Immunol.* (2017) 39:1–11. doi: 10.1111/pim.12430
5. Berger M, Zeevi A, Farmer DG, Abu-Elmagd KM. Immunologic challenges in small bowel transplantation. *Am J Transplant.* (2012) 12(Suppl 4): S2–8. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04332.x
6. Garg M, Jones RM, Vaughan RB, Testro AG. Intestinal transplantation: current status and future directions. *J Gastroenterol Hepatol.* (2011) 26:1221– 8. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06783.x
7. Silva JT, San-Juan R, Fernández-Caamaño B, Prieto-Bozano G, Fernández- Ruiz M, Lumbreras C, Calvo-Pulido J, Jiménez-Romero C, Resino-Foz E, López-Medrano F, Lopez-Santamaria M, Maria Aguado J. Infectious complications following small bowel transplantation. *Am J Transplant.* (2016) 16:951–9. doi: 10.1111/ajt.13535
8. Gerlach UA, Lachmann N, Ranucci G, Sawitzki B, Schoenemann C, Pratschke J, Dragun D, Pascher A. Non-HLA antibodies may accelerate immune responses after intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation.* (2017) 101:141–9. doi: 10.1097/TP.00000000000001439
9. Gerlach UA, Lachmann N, Sawitzki B, Arsenic R, Neuhaus P, Schoenemann C, Pascher A. Clinical relevance of the de novo production of anti-HLA antibodies following intestinal and multivisceral transplantation. *Transpl Int.* (2014) 27:280–9. doi: 10.1111/tri.12250
10. Wu GS, Cruz RJ Jr, Cai JC. Acute antibody-mediated rejection after intestinal transplantation. *World J Transplant.* (2016) 6:719–28. doi: 10.5500/wjt.v6.i4.719
11. Loo L, Vrakas G, Reddy S, Allan P. Intestinal transplantation: a review. *Curr Opin Gastroenterol.* (2017) 33:203–11. doi: 10.1097/MOG.0000000000000358

12. Ruiz P, Wepler D, Nishida S, Kato T, Selvaggi G, Levi D, Bejarano P, Khaled A, Tryphonopoulos P, Tuteja S, Garcia M, Tzakis A. International grading scheme for acute rejection in small bowel transplantation: implementation and experience at the University of Miami. *Transplant Proc.* (2006) 38:1683–4. doi: 10.1016/j.transproceed.2006.05.017
13. Wu T, Abu-Elmagd K, Bond G, Nalesnik MA, Randhawa P, Demetris AJ. A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection. *Transplantation.* (2003) 75:1241–8. doi: 10.1097/01.TP.0000062840.49 159.2F
14. Koo J, Dawson DW, Dry S, French SW, Naini BV, Wang HL. Allograft biopsy findings in patients with small bowel transplantation. *Clin Transplant.* (2016) 30:1433–9. doi: 10.1111/ctr.12836
15. Troxell ML, Higgins JP, Kambham N. Evaluation of C4d staining in liver and small intestine allografts. *Arch Pathol Lab Med.* (2006) 130:1489–96. doi: 10.1043/1543-2165(2006)130[1489:EOCSIL]2.0.CO;2
16. Ashokkumar C, Gupta A, Sun Q, Ningappa MB, Higgs BW, Mazariegos G, Fazzolare T, Remaley L, Soltys K, Bond G, Abu-Elmagd K, Sindhi R. Allospecific CD154+ T cells identify rejection-prone recipients after pediatric small-bowel transplantation. *Surgery.* (2009) 146:166–73. doi: 10.1016/j.surg.2009.04.006
17. Ashokkumar C, Soltys K, Mazariegos G, Bond G, Higgs BW, Ningappa M, Sun Q, Brown A, White J, Levy S, Fazzolare T, Remaley L, Dirling K, Harris P, Hartle T, Kachmar P, Nicely M, O'Toole L, Boehm B, Jativa N, Stanley P, Jaffe R, Ranganathan S, Zeevi A, Sindhi R. Predicting cellular rejection with a cell-based assay: preclinical evaluation in children. *Transplantation.* (2017) 101:131–40. doi: 10.1097/TP.0000000000001076
18. Gerlach UA, Klöpfel M, Atanasov G, Polenz D, Vogt K, Ahrlich S, Marksteiner M, Jurisch A, Loddenkemper C, Reutzel-Selke A, Sawitzki B, Pascher A. Intra-graft and systemic immune parameters discriminating between rejection and long-term graft function in a preclinical model of intestinal transplantation. *Transplantation.* (2017) 101:1036–45. doi: 10.1097/TP.0000000000001469
19. Lauro A, Marino IR, Matsumoto CS. Advances in allograft monitoring after intestinal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* (2016) 21:165–70. doi: 10.1097/MOT.0000000000000279
20. Mathew JM, Tryphonopoulos P, DeFaria W, Ruiz P, Miller J, Barrett TA, Tzakis AG, Kato T. Role of innate and acquired immune mechanisms in clinical intestinal transplant rejection. *Transplantation.* (2015) 99:1273–81. doi: 10.1097/TP.0000000000000491
21. Ranganathan S, Ashokkumar C, Ningappa M, Schmitt L, Higgs BW, Sindhi R. The transcription factor, T-bet, primes intestine transplantation rejection and is associated with disrupted mucosal homeostasis. *Transplantation.* (2015) 99:890–4. doi: 10.1097/TP.0000000000000445



22. Talayero P, Alonso-Guirado L, Padilla G, Artaza H, Dopazo A, Sánchez-Cabo F, Rodríguez-Muñoz S, Calvo-Pulido J, Mancebo E, García de Lacoba M, Paz-Artal E. 5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts. *Exp Mol Pathol.* (2017) 103:163–71. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008
23. Sindhi R, Ashokkumar C, Higgs BW, Gilbert PB, Sun Q, Ranganathan S, Jaffe R, Snyder S, Ningappa M, Soltys KA, Bong GJ, Mazariegos GV, Abu-Elmagd K, Zeevi A. Allospecific CD154 + T-cytotoxic memory cells as potential surrogate for rejection risk in pediatric intestine transplantation. *Pediatr Transplant.* (2012) 16:83–91. doi: 10.1111/j.1399-3046.2011.01617.x
24. Gupta A, Ashokkumar C, Ningappa M, Sun Q, Higgs BW, Snyder S, Johnson M, Zeevi A, Abu-Elmagd KM, Thomson AW, Mazariegos GV, Sindhi R. Elevated myeloid: plasmacytoid dendritic cell ratio associates with early acute cellular rejection in pediatric small bowel transplantation. *Transplantation.* (2010) 89:55–60. doi: 10.1097/TP.0b013e3181bc5d9e
25. Danese S, Fiocchi C. Endothelial cell-immune cell interaction in IBD. *Dig Dis.* (2016) 34:43–50. doi: 10.1159/000442925
26. Nakamoto N, Kanai T. Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. *Front Immunol.* (2014) 5:221. doi: 10.3389/fimmu.2014.00221
27. Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol.* (2012) 590:447–58. doi: 10.1113/jphysiol.2011.219691
28. Yapici Ü, Kers J, Bemelman FJ, Roelofs JJTH, Groothoff JW, van der Loos CM, van Donselaar-van der Pant KAMI, Idu MM, Claessen N, ten Berge IJM, Florquin S. Interleukin-17 positive cells accumulate in renal allografts during acute rejection and are independent predictors of worse graft outcome. *Transpl Int.* (2011) 24:1008–17. doi: 10.1111/j.1432-2277.2011.01302.x
29. Kverneland AH, Streit M, Geissler E, Hutchinson J, Vogt K, Boës D, Niemann N, Pedersen AE, Schlickeiser S, Sawitzki B. Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study protocol. *Cytometry A.* (2016) 89:543–64. doi: 10.1002/cyto.a.22855
30. Streit M, Miloud T, Kapinsky M, Reed MR, Magari R, Geissler EK, Hutchinson JA, Vogt K, Schlickeiser S, Kverneland AH, Meisel C, Volk HD, Sawitzki B. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res.* (2013) 2:17. doi: 10.1186/2047-1440-2-17
31. Crespo M, Yelamos J, Redondo D, Muntasell A, Perez-Saéz MJ, López-Montañés M, García C, Torio A, Mir M, Hernández JJ, López-Botet M, Pascual J. Circulating NK-cell subsets in renal allograft recipients with anti-HLA donor-specific antibodies. *Am J Transplant.* (2015) 15:806–14. doi: 10.1111/ajt.13010

32. Halloran PF, Reeve JP, Pereira AB, Hidalgo LG, Famulski KS. Antibody-mediated rejection, T cell-mediated rejection, and the injury-repair response: new insights from the Genome Canada studies of kidney transplant biopsies. *Kidney Int.* (2014) 85:258–64. doi: 10.1038/ki.2013.300
33. Parkes MD, Halloran PF, Hidalgo LG. Evidence for CD16a-mediated NK cell stimulation in antibody-mediated kidney transplant rejection. *Transplantation.* (2017) 101:e102–11. doi: 10.1097/TP.0000000000001586
34. Ashokkumar C, Gabriellan A, Ningappa M, Mazariegos G, Sun Q, Sindhi R. Increased monocyte expression of sialoadhesin during acute cellular rejection and other enteritides after intestine transplantation in children *Transplantation.* (2012) 93:561–4. doi: 10.1097/TP.0b013e3182449189
35. Ramirez R, Carracedo J, Merino A, Soriano S, Ojeda R, Alvarez-Lara MA, Martín-Malo A, Aljama P. CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. *Contrib Nephrol.* (2011) 171:57–61. doi: 10.1159/000327134
36. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* (2005) 5:807–17. doi: 10.1038/nri1702
37. Greer M, Dierich M, De Wall C, Suhling H, Rademacher J, Welte T, Haverich A, Warnecke G, Ivanyi P, Buchholz S, Gottlieb J, Fuehner T. Phenotyping established chronic lung allograft dysfunction predicts extracorporeal photopheresis response in lung transplant patients. *Am J Transplant.* (2013) 13:911–8. doi: 10.1111/ajt.12155
38. Matta BM, Castellaneta A, Thomson AW. Tolerogenic plasmacytoid DC. *Eur J Immunol.* (2010) 40:2667–76. doi: 10.1002/eji.201040839
39. Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Chapman H, Zeevi A, Thomson AW. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant.* (2005) 5:314–22. doi: 10.1111/j.1600-6143.2004.00672.x
40. Benham H, Norris P, Goodall J, Wechalekar MD, FitzGerald O, Szentpetery A, Smith M, Thomas R, Gaston H. Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis Res Ther.* (2013) 15:R136. doi: 10.1186/ar4317
41. Cosmi L, Maggi L, Santarlaschi V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A.* (2014) 85:36–42. doi: 10.1002/cyto.a.22348
42. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jäger E, Sakaguchi S. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2013) 110:17945–50. doi: 10.1073/pnas.1316796110

43. Ceulemans LJ, Braza F, Monbaliu D, Jochmans I, De Hertogh G, Du Plessis J, Emonda MP, Kitade H, Kawai M, Li Y, Zhao X, Koshiba T, Sprangers B, Brouard S, Waer M, Pirenne J. The leuven immunomodulatory protocol promotes T-regulatory cells and substantially prolongs survival after first intestinal transplantation. *Am J Transplant.* (2016) 16:2973–85. doi: 10.1111/ajt.13815
44. Steger U, Denecke C, Sawitzki B, Karim M, Jones ND, Wood KJ. Exhaustive differentiation of alloreactive CD8+ T cells: critical for determination of graft acceptance or rejection. *Transplantation.* (2008) 85:1339–47. doi: 10.1097/TP.0b013e31816dd64a
45. Zuber J, Rosen S, Shonts B, Sprangers B, Savage TM, Richman S, Yang S, Lau SP, DeWolf S, Farber D, Vlad G, Zorn E, Wong W, Emond J, Levin B, Martinez M, Kato T, Sykes M. Macrochimerism in intestinal transplantation: association with lower rejection rates and multivisceral transplants, without GVHD. *Am J Transplant.* (2015) 15:2691–703. doi: 10.1111/ajt.13325
46. Weiner J, Zuber J, Shonts B, Yang S, Fu J, Martinez M, Farber DL, Kato T, Sykes M. Long-term persistence of innate lymphoid cells in the gut after intestinal transplantation. *Transplantation.* (2017) 101:2449–54. doi: 10.1097/TP.0000000000001593
47. Zuber J, Shonts B, Lau SP, Obradovic A, Fu J, Yang S, Lambert M, Coley S, Weiner J, Thome J, DeWolf S, Farber DL, Shen Y, Caillat-Zucman S, Bhagat G, Griesemer A, Martinez M, Kato T, Sykes M. Bidirectional intra-graft alloreactivity drives the repopulation of human intestinal allografts and correlates with clinical outcome. *Sci Immunol.* (2016) 1:eaah3732. doi: 10.1126/sciimmunol.aah3732

### 3. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nadja Luise Stobutzki, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Langfristige Veränderungen in der Immunzellzusammensetzung nach Dünndarmtransplantation und deren Assoziation mit Abstoßungsreaktionen“ 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](http://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

### 3.1 Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation 1: **Stobutzki N**, Schlickeiser S, Streitz M, Stanko K, Truong KL, Akyuez L, Vogt K, Appelt C, Pascher A, Blau O, Gerlach UA, Sawitzki B  
Long-term signs of T cell and myeloid cell activation after intestinal transplantation with cellular rejections contributing to further increase of CD16+ cell subsets  
Front Immunol. 2019 May 7;10:866, DOI: 10.3389/fimmu.2019.00866

Beitrag im Einzelnen:

- Gemeinsame Ideenfindung des Promotionsthemas mit Prof. Dr. Birgit Sawitzki durch vorherige Modularbeit über Forschungsstand bezüglich Dünndarmtransplantation im Rahmen des Moduls „Wissenschaftliches Arbeiten“ (Modul 23, Modellstudiengang)
- Umfassende Literaturrecherche bezüglich bereits untersuchter Zellpopulationen bei Dünndarmtransplantierten und Zellpopulationen und Genmarkern bei anderen Organtransplantationen als Grundlage für die geplante Studie und Promotionsarbeit. Einarbeitung in die ONE Study als Grundlage und Vorlage.
- Gemeinsame Erarbeitung eines Projektplans mit Prof. Dr. Birgit Sawitzki. Dabei wurden die bereits von Frau Prof. Dr. Sawitzki etablierten Experimente aus der ONE Study als Grundlage genommen und für die Fragestellung dieser Arbeit angepasst, wie im Methodenteil beschrieben.
- Anschließend wurden zusammen mit Dr. Undine Gerlach und Dr. Andreas Pascher Ein- und Ausschlusskriterien und grundlegende Fragestellungen, Frequenz der Blutentnahmen und Outcomes diskutiert. Weiterhin wurden gemeinsam Kriterien zur Identifizierung der einzuschließenden ITx-Patienten definiert (ausschließlich ambulant kontrollierte Patienten ohne akute Abstoßung während der Probenentnahme.)
- Erarbeitung von Kriterien zusammen mit Frau Prof. Dr. Birgit Sawitzki zur Identifizierung der einzuschließenden gesunden Kontrollen. Anschließend Rekrutierung von gesunden Probanden über Kollegen, Freundeskreis und Familie im Altersspektrum der ITx-Patienten und von beiden Geschlechtern. Die Einbestellung wurde von mir koordiniert, alle gesunden Kontrollpatienten von mir aufgeklärt, das Einverständnis von mir eingeholt und die Blutproben von mir oder Stefanie Ahrlich abgenommen. Eine EDTA-Probe wurde direkt von mir zum Labor Berlin gebracht.
- Eigenständige Beschaffung aller Patientenakten und dokumentierten Abstoßungsepisoden aller ITx-Patienten während meiner Famulatur in der Transplantationsambulanz Virchow Klinikum Charité. Frau Dr. Undine Gerlach stellte mir die von ihr bereits erstellten Zusammenfassung von Abstoßungsdaten, HLA-Ak prä- und post-Tx, Immunsuppressionsschema und Grunderkrankung der DTx-Patienten aus ihren bereits veröffentlichten Arbeiten zur Verfügung. Diese nahm ich als Grundlage und ergänzte diese um die neu eingeschlossenen Patienten und um die zusätzlichen Parameter, wie Zeit nach Transplantation, Zeitpunkt der letzten Abstoßungsepisode, Messzeitraum. Aus den gesammelten Daten erstand, die von mir erstellte, Tabelle 1 im Paper.

- Die Blutentnahme bei den ITx-Patienten erfolgte durch das Pflegepersonal der Transplantationsambulanz im Rahmen der Check-up-Untersuchungen. Ich wurde nach Abnahme angerufen und holte die Patientenproben ab. Weiterhin koordinierte ich zusammen mit der Transplantationsambulanz, welcher Patient zu welchem Zeitpunkt eine Blutentnahme erhält.
- Alle durchflusszytometrischen und genetischen Experimente sowie die Isolation der PBMCs wurden von mir nach Einarbeitung durch Katrin Vogt und Stefanie Ahrlich eigenständig durchgeführt. In krankheits- oder urlaubsbedingter Abwesenheit erfolgte die Durchführung durch Katrin Vogt, Stefanie Ahrlich oder Christine Appelt. Das Serum zur Zytokin-/Chemokin-Messung wurde von mir aufbereitet und eingefroren. Später erfolgte die eigentliche Zytokin- und Chemokinmessung durch Levent Akyuez bei Schwangerschaft meinerseits. Die Chirmärismusanalyse erfolgte ergänzend im Rahmen des Review-Prozesses durch Katarina Stanko und Olga Blau.
- Alleinige und selbstständige Auswertung der durchflusszytometrischen Daten, der PCR-Ergebnissen und des Methylierungsstatus von Foxp3 nach Einweisung durch Mathias Streitz und Katrin Vogt.
- Selbstständige Zusammenfassung aller Ergebnisse in einer gebündelten Excel-Tabelle. Alle vorbereitenden Berechnungen, wie die des Medians oder der Standardabweichung, wurden in separaten Excel-Tabellen durchgeführt. Aus diesen erfolgte zusammen mit Stephan Schlickeiser die statistische Auswertung und Erstellung der Abbildungen in „R“. Die Auswahl der statistischen Tests und Abbildungen erfolgten in enger Abstimmung mit Prof. Dr. Sawitzki.
- Aus den zusammengefassten Daten und der statistischen Auswertung wurden die Tabellen 3-6 von mir im Anhang generiert. Auch die restlichen Tabellen bezüglich verwendeten Ak und Genen (Tabelle 1-2 im Anhang) wurden ohne fremde Hilfe von mir erstellt.
- Alle in „R“ generierten Abbildungen wurden anschließend von mir in PowerPoint bezüglich Größe, Symbolen und Farbe formatiert. Weiterhin erfolgte hier die Zusammenstellung der einzelnen Grafiken zu gebündelten Abbildungen. Die Auswahl der Grafiken erfolgte auch hier zusammen mit Frau Prof. Dr. Sawitzki. Daraus entstanden die Abbildungen 1-6 und die ergänzenden Abbildungen im Anhang 2-3 und 5-6.
- Die Abbildungen 1 und 4 im Anhang des Papers wurden von mir im PowerPoint mit Grafiken aus Kaluza Version 1.2 (Beckman Coulter) und aus der BD FACS DivaTMSoftware v.6.1. erstellt.
- Alleinige Ausarbeitung der Publikationsniederschrift in enger Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Birgit Sawitzki. Insbesondere erfolgte eine intensive Beratung bezüglich einzuschließender Publikationen und Interpretation der Ergebnisse. Außerdem weiterführende Beratung und Kritik durch die Ko-Autoren.
- Einreichung der Publikation durch Prof. Dr. Birgit Sawitzki bei Fachzeitschriften inkl. Registrierung, Letter to the Editor und Anpassung der Journalanforderungen an das Manuskript.

- Anpassung des Manuskripts im Anschluss an den Peer-Review Prozess der Zeitschrift für Immunologie zusammen mit Prof. Dr. Birgit Sawitzki. Beratung durch die Ko-Autoren.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

#### 4. Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: "Immunology" Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 155 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY	39,215	41.982	0.085360
2	Annual Review of Immunology	17,086	22.714	0.028800
3	NATURE IMMUNOLOGY	41,410	21.809	0.102290
4	IMMUNITY	46,541	19.734	0.136360
5	TRENDS IN IMMUNOLOGY	11,204	14.188	0.026850
6	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY	49,229	13.258	0.083800
7	Lancet HIV	1,476	11.355	0.007950
8	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE	62,537	10.790	0.078310
9	IMMUNOLOGICAL REVIEWS	14,555	9.217	0.028540
10	Cancer Immunology Research	4,361	9.188	0.021180
11	CLINICAL INFECTIOUS DISEASES	61,618	9.117	0.120010
12	AUTOIMMUNITY REVIEWS	8,956	8.745	0.020990
13	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	1,675	8.374	0.007130
14	CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY	9,275	7.932	0.020120
15	JOURNAL OF AUTOIMMUNITY	6,410	7.607	0.015490
16	Cellular & Molecular Immunology	3,633	7.551	0.008300
17	EMERGING INFECTIOUS DISEASES	29,657	7.422	0.057980
18	Mucosal Immunology	6,105	7.360	0.021860
19	SEMINARS IN IMMUNOLOGY	4,552	7.206	0.010950
20	EXERCISE IMMUNOLOGY REVIEW	740	7.105	0.001110
21	Journal of Allergy and Clinical Immunology-In Practice	2,802	6.966	0.009670
22	CLINICAL REVIEWS IN ALLERGY & IMMUNOLOGY	2,741	6.442	0.005880
23	Seminars in Immunopathology	2,967	6.437	0.009290
24	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	12,583	6.306	0.026850
25	ALLERGY	16,476	6.048	0.025790
26	Emerging Microbes & Infections	1,318	6.032	0.005910
27	Advances in Immunology	2,423	5.935	0.004250
28	Current Topics in Microbiology and Immunology	5,633	5.829	0.011740
29	World Allergy Organization Journal	1,352	5.676	0.003800
30	Frontiers in Immunology	16,999	5.511	0.067470





# Long-Term Signs of T Cell and Myeloid Cell Activation After Intestinal Transplantation With Cellular Rejections Contributing to Further Increase of CD16<sup>+</sup> Cell Subsets

Nadja Stobutzki<sup>1</sup>, Stephan Schlickeiser<sup>1,2</sup>, Mathias Streitz<sup>1</sup>, Katarina Stanko<sup>1</sup>, Kim-Long Truong<sup>1</sup>, Levent Akyuez<sup>1,2</sup>, Katrin Vogt<sup>1</sup>, Christine Appelt<sup>1</sup>, Andreas Pascher<sup>3</sup>, Olga Blau<sup>4</sup>, Undine A. Gerlach<sup>3</sup> and Birgit Sawitzki<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Medical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany, <sup>2</sup> Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany, <sup>3</sup> Department of Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany, <sup>4</sup> Department for Hematology, Oncology and Tumor Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Ulrike Koehl,  
Hannover Medical School, Germany

### Reviewed by:

Luíza Guilherme,  
University of São Paulo, Brazil  
Evren Alici,  
Karolinska Institute (KI), Sweden

### \*Correspondence:

Birgit Sawitzki  
birgit.sawitzki@charite.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Alloimmunity and Transplantation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 20 November 2018

**Accepted:** 04 April 2019

**Published:** 07 May 2019

### Citation:

Stobutzki N, Schlickeiser S, Streitz M, Stanko K, Truong K-L, Akyuez L, Vogt K, Appelt C, Pascher A, Blau O, Gerlach UA and Sawitzki B (2019) Long-Term Signs of T Cell and Myeloid Cell Activation After Intestinal Transplantation With Cellular Rejections Contributing to Further Increase of CD16<sup>+</sup> Cell Subsets. *Front. Immunol.* 10:866. doi: 10.3389/fimmu.2019.00866

The intestine mediates a delicate balance between tolerogenic and inflammatory immune responses. The continuous pathogen encounter might also augment immune cell responses contributing to complications observed upon intestinal transplantation (ITx). We thus hypothesized that ITx patients show persistent signs of immune cell activation affecting both the adaptive and innate immune cell compartment. Information on the impact of intestinal grafts on immune cell composition, however, especially in the long-term is sparse. We here assessed activated and differentiated adaptive and innate immune subsets according to time, previous experience of cellular or antibody-mediated rejections or type of transplant after ITx applying multi-parametric flow cytometry, gene expression, serum cytokine and chemokine profiling. ITx patients showed an increase in CD16 expressing monocytes and myeloid dendritic cells (DCs) compared to healthy controls. This was even detectable in patients who were transplanted more than 10 years ago. Also, conventional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells showed persistent signs of activation counterbalanced by increased activated CCR4<sup>+</sup> regulatory T cells. Patients with previous cellular rejections had even higher proportions of CD16<sup>+</sup> monocytes and DCs, whereas transplanting higher donor mass with multi-visceral grafts was associated with increased T cell activation. The persistent inflammation and innate immune cell activation might contribute to unsatisfactory results after ITx.

**Keywords:** intestinal transplantation, T cells, Myeloid cells, flow cytometry, gene expression, cytokines, epigenetics

## INTRODUCTION

Intestinal transplantation is an accepted therapeutic option for patients with life-threatening complications upon home parenteral nutrition after intestinal failure (1). The intestine guarantees nutrient absorption but also serves as a protective barrier with contact to commensals and pathogens. Consequently, an efficient communication between local and infiltrating immune cells is needed to maintain a healthy balance between inflammatory responses preventing pathogen invasion and tolerogenic responses against food antigens and commensals (2). Therefore, the small intestine contains various lymphoid structures and thus compared to other transplanted solid organs has a far higher number of donor immune cells (3). Thus, transplantation of an allogeneic intestine represents a major challenge for this tightly controlled balance and ITx patients are prone to more complications than other solid organ transplant recipients. In addition to a higher rate of acute rejection episodes, ITx patients suffer from invasive infections and GvHD (4, 5). Furthermore, the incidence of antibody-mediated humoral rejections is much higher as compared to other transplantations (6–8).

Due to a lack of serum markers indicating an impaired intestinal graft function, diagnosis of rejection episodes requires a combination of clinical, endoscopic examinations, histological assessment of biopsies, and screening for serum donor-specific HLA or non-HLA antibodies (6, 7, 9–13). However, interventions to obtain biopsies are associated with complications and may also trigger injury-related immune reactions. Furthermore, histological discrimination between rejections and viral infections remains challenging warranting the search for novel and particular non-invasive markers.

Indeed, several studies revealed increased numbers or mediators of intragraft and peripheral Th1 and Th17 cells as well as CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells prior or during rejection (14–21).

Comparatively little is known about the impact on the innate immune cell compartment. Gupta et al. identified a higher myeloid to plasmacytoid DCs balance in pediatric ITx patients with early acute cellular rejection (22).

So far, only individual aspects of the immune system have been studied but no broader assessment of the immune cell composition was performed. In addition, changes in B cell subsets were not analyzed although intestinal grafts contain large numbers of B cells. Also, long-term effects were not studied and no discrimination between cellular and humoral rejections was made.

The intestinal immune compartment especially upon inflammatory challenges is in constant interaction with other immune compartments such as the blood or the liver (23–25). Thus, it appears likely, that in a situation of permanent interaction between self and foreign immune cells major and

long-lasting systemic changes in immune cell composition can be observed. Analyzing which subsets are affected will not only provide a more detailed understanding of the interplay of innate and adaptive immune cells and thus immune responses following intestinal transplantation but also give novel insights into the intestine physiology in general.

Consequently, the present study assessed whether upon intestinal transplantation a long-lasting increase in inflammatory differentiated innate and activated adaptive immune cell subsets can be detected. We also investigated immune cell composition in association with organ type or clinical events such as cellular or antibody-mediated rejections. We show that intestinal transplantation is associated with a long-lasting increase in CD16<sup>+</sup> expressing myeloid mononuclear cells. Conventional T cells showed persistent signs of activation and differentiation, which was counterbalanced by increased levels of activated regulatory T cells. Patients who had experienced cellular rejections showed even higher proportions of CD16<sup>+</sup> monocytes and myeloid DCs. In contrast, the type of organ and thus donor mass being transplanted was associated with T cell activation.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Populations

Samples from 11 isolated intestinal (i-ITx) and 10 multivisceral transplanted (MVTx) ITx patients (Table 1, between April 2014 and February 2015) and 17 healthy controls of similar age range and gender were collected. We collected three to eight consecutive samples per ITx patient and median results were calculated.

ITx patients received induction therapy of thymoglobulin (Thymoglobulin<sup>®</sup>, Genzyme, Cambridge, Mass., USA; 7.5 mg/kg BW total dose) and one dose of infliximab (Remicade<sup>®</sup>, Centocor Inc., Essex Pharma GmbH; 5 mg/kg BW). Maintenance immunosuppressive treatment consisted of tacrolimus and rapamycin (sirolimus/everolimus) or MMF (Cellcept<sup>®</sup>, Hoffmann-LaRoche, Switzerland).

Patients were categorized (i) according to time after transplantation (ITx1  $\geq$  10 years, ITx2 = 4–10 years, ITx3 0–4 years) or (ii) according to occurrence of rejections (no AR = no rejection episodes; AR1 = patients with one or several humoral or mixed cellular and humoral rejections; AR2 = patients with one or several cellular rejections). Rejection was defined based on a combination of clinical symptoms and biopsy assessment according to established histological rejection criteria (10, 11). In addition, for diagnosis of humoral rejections assessment of anti-donor HLA antibodies and C4d-staining was performed as previously described (7). Importantly, the tacrolimus trough level was not different between patient groups studied.

All participants gave their written consent to take part in this study authorized by the local ethics committee (Ethikkommission der Charité—Universitätsmedizin Berlin, EA2/044/08 & EA2-020-14).

### Flow Cytometry

Blood samples were stained within 4 h and analyzed by flow cytometry according to the protocol of the ONE-Study

**Abbreviations:** DCs, dendritic cells; EDTA, ethylenediaminetetraacetate; Foxp3, forkhead box P3; GvHD, graft vs. host disease; HLA, human leukocyte antigen; ITx, intestinal transplantation; MMF, mycophenolate mofetil; NK, natural killer cells; Th1, T helper 1 cells; Th2, T helper 2 cells; Th17, T helper 17 cells; Th22, T helper 22 cells; Treg, T regulatory cells; TSDR, Treg specific demethylation region.

**TABLE 1** | Characteristics of all isolated (i-Tx) and multivisceral (MV/Tx) intestinal transplant patients.

Nr. [Gerlach et al. (7)]	Graft	Year of Tx	Age at Tx years	underlying intestinal failure diseases	Time post Tx (years)	Rejection	last time of rejection	Pre-Tx HLAabs	De novo HLAabs post-Tx DSA in MFI	Average level of immuno-suppressants ng/ml (median [number of tests in time of measurement])	Time of measurement
3	i-Tx	2001	27	Mesenteric infarction	>10	No AR	/	0	/	Tac 4.2 (7); Sir 2.8 (4)	14/06–14/12
5	i-Tx	2001	31	Mesenteric infarction	>10	Humoral/mixed	02/2012	0	DSA A3:1830, A24:2336, DQ7: 7974	Tac 7.9 (11); Eve 1.0 (10)	14/06–14/12
6	i-Tx	2001	33	Adhesive ileus	>10	Cellular	04/2005	0	/	Tac 4.0 (7); Sir 2.3 (4)	14/07–14/12
9	i-Tx	2002	28	Volvulus	>10	No AR	/	0	/	Tac 3.2 (5); MMF 0.8 (3)	14/07–14/11
11	i-Tx	2003	31	Adhesive ileus	>10	Cellular	11/2009	0	/	Tac 5.2 (8); MMF 3.0 (4)	14/08–14/12
12	MV/Tx+K	2003	36	Crohn's disease	>10	Humoral/mixed	12/2011	0	NDSA	Tac 5.9 (6); MMF 1.8 (2)	14/06–15/03
16	i-Tx	2007	31	CiPO	4–10	No AR	/	0	/	Tac 5.2±0.5 (6); Sir 1.9 (5)	14/06–14/12
17	MV/Tx+K	2007	24	Volvulus	4–10	No AR	/	0	/	Tac 4.5 (10); Eve 2.7 (5)	14/06–14/11
18	MV/Tx	2007	36	Polytrauma	4–10	Humoral/mixed	10/2014	0	DSA B8997	Tac 6.2 (8); Sir 1.9 (4)	14/07–14/10
21	MV/Tx	2008	42	Gardner's syndrome	4–10	Humoral/mixed	06/2012	0	NDSA	Tac 5.0 (13); Eve 3.0 (6)	14/07–14/12
22	i-Tx	2008	38	Mesenteric infarction	4–10	Humoral/mixed	03/2013	0	DSA DQ7:6060, DQ8:3338	Tac 4.9 (8); Sir 2.6 (4)	14/06–14/11
23	i-Tx	2009	45	Adhesive ileus	4–10	Humoral/mixed	10/2009	0	DSA A24:1186, DQ7:4278, DQ8: 2457, DR53:4390	Tac 4.1 (8); MMF 0.1 (2)	14/06–14/11
24	i-Tx	2009	44	Mesenteric infarction	4–10	Cellular	10/2009	0	/	Tac 5.9±0.4 (7)	14/06–14/11
26	MV/Tx	2010	49	Desmold fibromatosis	4–10	Humoral/mixed	12/2010	NDSA	DSA B60: 2672	Tac 6.8 (11); Eve 4.1 (7)	14/08–14/12
29	MV/Tx+K	2011	29	Crohn's disease	0–4	No AR	/	NDSA	/	Tac 5.0 (16); Sir 2.7 (5)	14/06–14/12
30	MV/Tx	2011	52	Adhesive ileus	0–4	cellular	12/2011	NDSA	/	Tac 10.5 (3); Eve 2.8 (3)	14/11
31	MV/Tx	2012	52	Gardner's syndrome	0–4	Cellular	07/2012	/	/	Tac 5.6 (15); Eve 3.5 (7)	14/06–14/11
32	MV/Tx	2013	33	Crohn's disease	0–4	No AR	/	/	/	Tac 4.5 (3); Eve 2.3 (3)	15/02
33	MV/Tx	2013	56	Gardner's syndrome	0–4	No AR	/	/	/	Tac 6.0 (22); MMF 5.0 (4)	14/06–14/12
36	i-Tx	2014	45	Adhesive ileus	0–4	/	/	/	/	Tac 7.9 (26); Eve 3.2 (13)	14/06–15/03
37	i-Tx	2014	39	Desmold fibromatosis	0–4	/	/	/	/	Tac 6.6 (21); Eve 1.8 (6)	14/07–15/02

Patient 36 and 37 were not included in rejection analysis.  
 i-Tx, isolated intestinal transplantation; MV/Tx, multivisceral transplantation; K, kidney; Tac, Tacrolimus; Sir, Sirolimus; Eve, Everolimus; MMF, Mycophenolat-Moletil; DSA, donor-specific anti-HLA antibodies; NDSA, non-donor-specific anti-HLA antibodies; MFI, mean fluorescence intensity.



Consortium (27, 28). In addition, we included a chemokine receptor panel for categorization of T helper and Treg cell subsets (panel 6, see Supplementary Figure 1 for gating strategy). All fluorochrome-conjugated antibodies used are listed within Supplementary Table 1. In general, 100  $\mu$ l EDTA blood were directly stained with prepared panel antibody mixes and incubated before lysing erythrocytes with lyse-fix solution composed of Versa Lyse™ and IOTest® Fixative Solution (Beckman Coulter GmbH). For the Treg panel (panel 7) 50  $\mu$ l EDTA blood were used and additionally stained for intracellular expression of Foxp3 using the PerFix-nc Kit (Beckman Coulter), whereas for the B cell panel (panel 4) 300  $\mu$ l EDTA blood was first lysed with Red Blood Cell Lysis Solution (Miltenyi Biotec GmbH) prior to antibody staining. The dendritic cell panel 5 was prepared twice and combined after staining. Samples were measured on a 10 color Navios flow cytometer (Beckman Coulter). Calibration with “Flow-Set Pro Beads” and “Flow Check Pro Beads” (both Beckman Coulter) was performed daily.

### T Cell Chimerism Analysis

PBMC were isolated at room temperature by density gradient centrifugation (Biocoll, Biochrom, Berlin, Germany) of heparinized blood diluted 1:2 in Phosphate-Buffered Saline (PBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK). Cell number was determined using a hemocytometer. Isolated PBMC were cryopreserved until further use. Cryopreserved PBMCs of transplanted patients were first incubated with 3,2 mg/ml human immunoglobulin (Beriglobin, CSL Behring, Germany) for 5 min to block Fc receptors and then stained with anti-TCR $\alpha\beta$ -PE, anti-CD4-APC and anti-HLA-DR-ECD (see Supplementary Table 1 for additional information about the antibodies). After washing, cells were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and sorted on a FACSAria II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) into DAPI<sup>-</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> or -HLA-DR<sup>+</sup> fractions. Please see Supplementary Figure 4 for gating strategy.

Chimerism analyses were based on the discrimination of donor and recipient alleles on short tandem repeats using PCR with fluorescence-labeled primers. DNA was extracted using a standard DNA extraction method (QIA-Amp; QIAGEN), as recommended by the manufacturer. For quantitative chimerism investigation we used AmpFlSTR® Identifier® PCR Amplification KIT (Applied Biosystems) which contains fluorescent-labeled primer pairs for simultaneous amplification of 16 different loci each. For quantification of chimerism, the areas under the curves were calculated using Genemapper Version 3.7 software (Applied Biosystems). The sensitivity of the method is 1%.

### Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR and TSDR-Demethylation Analysis

Blood samples were collected in Tempus Blood RNA Tubes (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany) and RNA was isolated using the MagMAX™ for Stabilized Blood Tubes RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific). Up to 1,000 ng RNA were transcribed into cDNA using the QuantiTect Reverse

Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Gene expression was measured using TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, see Supplementary Table 2), microfluidic cards and TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific) on the ViiA7 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Reactions were run in duplicates using 384-well microfluidic Custom TaqMan® Array Cards. Data were analyzed with ViiA7 Software v 1.2.2. Gene expression was calculated relative to median expression of three reference genes [*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)*, *beta-2-microglobulin (B2M)* and *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*] using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

Genomic DNA was isolated from EDTA blood using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Up to 2  $\mu$ g DNA were used for bisulfite treatment (EpiTect, Qiagen). Real-time PCR was done in a final reaction volume of 20  $\mu$ l with 10  $\mu$ l FastStart Universal Probe Master (ROX, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 100 ng Lambda DNA (NEB, Frankfurt a.M., Germany), 5 pmol methylation or non-methylation specific probe, 30 pmol methylation or non-methylation specific primers and at least 15 ng bisulfite-treated DNA or plasmid standard (all Epiontis GmbH, Berlin, Germany). Samples were analyzed in triplicates on an ABI 7500 Cycler (Thermo Fisher Scientific). The percentage of CD4<sup>+</sup> T cells with demethylated TSDR was calculated by division of non-methylated by total genomic FoxP3 copy-number and normalization to the proportion of total CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells as determined by flow cytometry.

### Luminex Measurement of Cytokines and Chemokines

Samples were prepared with Milliplex® MAP Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to manufacturer's protocol. The Bio Plex® 200 Systems (Luminex, Bio-Rad Laboratories GmbH) was validated every 30 days with the Bio-Plex® Validation Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH) and was calibrated every day with Bio-Plex® Calibration Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH).

### Data Analyses and Statistics

Analysis of flow cytometry data was done with Kaluza version 1.2 (Beckman Coulter). To calculate absolute cell numbers of all reported immune cell subsets, leucocyte cell count was obtained from the clinical chemistry and related to the CD45<sup>+</sup> count within each panel. The corresponding proportions of all reported immune cell subsets were calculated in Excel. In case of multiple samples from ITx patients a median was calculated. Differences in subset proportions and absolute cell counts between healthy donors and ITx patients as well as according to time post-transplant, rejection or organ type were analyzed with Kruskal-Wallis-Test and a Conover *post-hoc* test. Results were considered as significant when a  $p < 0.05$  was reached.  $P$ -values were not adjusted for multiple testing because of an explorative approach.

R was used for generating a heatmap representation of the mean-centered and sigma-normalized data selected for parameters with a  $p < 0.05$  in Kruskal-Wallis-Test, using pairwise euclidean distances and Ward's minimum variance method for hierarchical clustering.

Differences in subset proportions and absolute cell counts between healthy donors and ITx patients as well as according to time post-transplant, rejection or organ type were analyzed with Kruskal-Wallis-Test and a Conover *post-hoc* test. Results were considered as significant when a  $p < 0.05$  was reached.

## RESULTS

To investigate whether indeed intestinal transplantation is accompanied by persistent signs of innate and adaptive immune cell activation, we performed multi-parametric profiling of peripheral blood immune cells. From ITx patients three to eight consecutive samples within the observation period were collected and analyzed. The individual immune cell composition was very stable within the observation period (Supplementary Figure 2). From the obtained data median values were calculated.

We assessed the impact of intestinal transplants according to three main hypotheses:

- 1) The high donor immune cell number and pathogen encounter in ITx grafts triggers persistent immune cell activation resulting in an elevation of activated or inflammatory T and innate immune cell subsets compared to healthy controls.
- 2) ITx patients show a very slow normalization of immune cell composition over time after transplantation. This was investigated by dividing the transplant patients into three groups: (i) long-term >10 years after transplantation (ITx 1), (ii) mid-term 4–10 years (ITx 2), and (iii) short-term 0–4 years (ITx 3).
- 3) Previous episodes of acute humoral/mixed rejection (AR 1) or acute cellular rejections (AR 2) are associated with further increase of activated or inflammatory immune cell subsets compared to patients with no rejections (no AR).

### Increase of CD16<sup>+</sup> Monocytes and DCs in Blood of ITx Patients

First, we investigated differences in proportions and absolute numbers of innate immune cells including granulocytes, monocytes, DCs, NK cells, and their major subsets (Figures 1, 2 and Supplementary Tables 3, 4). We could not detect differences in granulocytes between samples from healthy controls and transplant patients (Figure 1A). However, there was a significant decrease in absolute granulocyte numbers in samples of patients who had experienced cellular rejections (AR2, Figure 1B and Supplementary Tables 3, 4). Total monocytes were increased in long-term transplant patients (Figure 1A). The proportions and absolute numbers of the CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> subset were increased in patient samples especially early after transplantation and proportions of both CD16 expressing monocytes subsets were higher in patients experiencing cellular rejections (Figure 1C and Supplementary Tables 3, 4).

Although samples from transplant patients did not contain more DCs, they were higher in patients with previous cellular rejections (Figure 1B). We also observed an altered balance between plasmacytoid and myeloid DCs in patients (Figure 1A) resulting from an increase in the CD16<sup>+</sup> subset (Figure 1D). This

increase of CD16<sup>+</sup> myeloid DCs was especially prominent for patients who had cellular rejections.

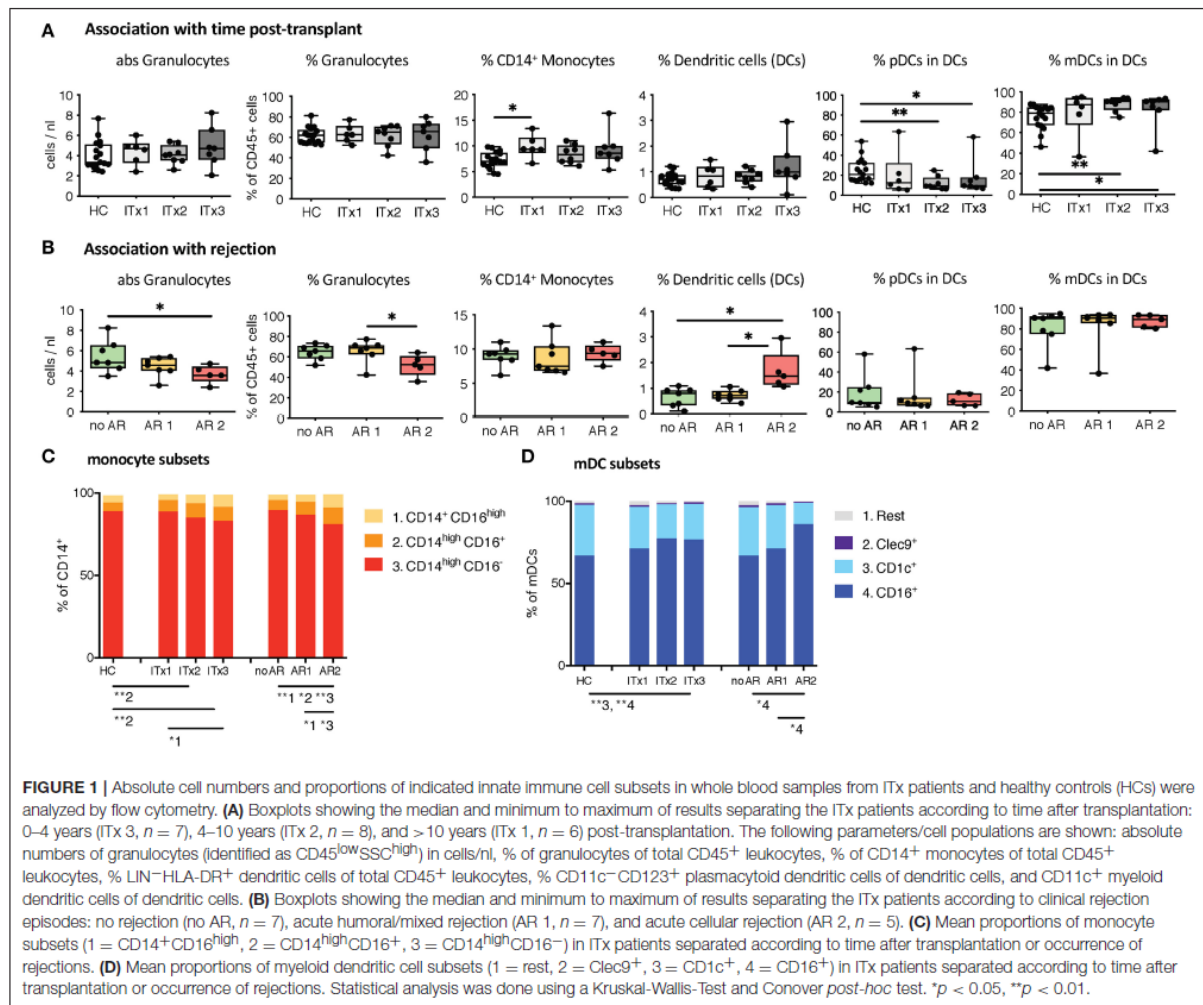
There was a trend toward higher proportions of NK cells early after transplantation (ITx3, Figure 2A), mainly due to an expansion of CD56<sup>high</sup> NK cells normalizing 10 years after transplantation (ITx1). Increase of total CD56<sup>+</sup> NK cells was seen in stable patients without rejection episodes (no AR, Figure 2B), who had similarly low proportions of CD56<sup>high</sup> NK cells compared to healthy controls.

Altogether, ITx patients have major alterations in their systemic innate immune compartment either occurring independently from clinical events or associated with rejections. Changes related to rejections were independent of time since last rejection episode (data not shown). The organ type being transplanted did not influence composition of innate immune cell subsets (Supplementary Figure 3A).

### Increased Proportions of Activated and Differentiated Conventional Recipient T Cell Subsets Also in Patients With No Rejections

T cells are known to play a major role in controlling anti-donor immune responses and eliciting rejections. Therefore, changes in composition of helper and cytotoxic T cells and their activated subsets were assessed. CD4<sup>+</sup> (TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>) T helper cell proportions and absolute numbers were significantly lower in transplant patient samples especially early after transplantation (ITx2 & 3, Figure 3A and Supplementary Tables 3, 4). This was independent of rejections (Figure 3B). Furthermore, a large proportion of the T helper cells showed signs of acute and chronic activation e.g., HLA-DR and CD57 expression, respectively (Figure 3A). Consistently, transplant patients showed a reduction of naïve T cells (Figure 3C) and strong increase of CD27<sup>-</sup> late stage effector like T cells (Figure 4A). Although these changes were especially apparent early after transplantation, they were still detectable in patients who had been transplanted more than 10 years ago (ITx1). Similar observations were made for CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell subsets (Figures 3D, 4A). Much to our surprise, the increase in activated and differentiated T cell subsets was not significantly higher in patients who had experienced rejections Figures 3B,C,E,F and 4B. However, we detected higher proportions of HLA-DR<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>, or CD27<sup>-</sup> T cells in patients who received a multi-visceral transplant (Supplementary Figure 3B). It has been previously shown that ITx patients especially early after transplantation display T cell donor chimerism (29). Therefore, we investigated whether the activated T cells are of donor or recipient origin. We have FACS-sorted CD4<sup>+</sup> T cells from frozen PBMCs of nine different ITx patients (three of each ITx group, mixed balance of isolated and multivisceral transplanted patients) into HLA-DR<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>-</sup> proportions (see also new Supplementary Figure 4). Afterwards, DNA was isolated and the degree of chimerism determined by PCR utilizing fluorescence-labeled primers which discriminate between donor and recipient alleles. Interestingly, in none of the samples, neither in HLA-DR<sup>+</sup> activated nor in HLA-DR<sup>-</sup> non-activated





cells, we could detect donor alleles (0% donor chimerism in all samples).

Thus, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> systemic recipient T cell compartment of ITx patients is heavily altered showing signs of constant T cell activation mostly dependent on donor mass being transferred.

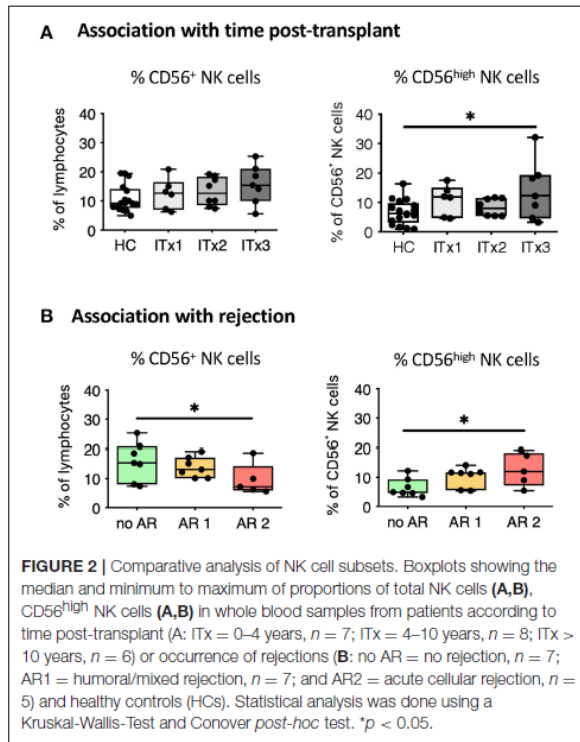
### Increase in Proportions of Chemokine Receptor Expressing Subsets of Conventional T Helper and Regulatory T Cells

With intestinal transplantation representing a major inflammatory event it might trigger upregulation of chemokine receptor expression enhancing the homing potential of circulating T cells. Investigation of chemokine receptor expression was done for regulatory and conventional CD4<sup>+</sup> T cells. Proportions but not absolute numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) were

significantly higher in transplant patients even 10 years after transplantation compared to healthy controls (Figure 5A and Supplementary Tables 3, 4). In accordance, the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells with a demethylation of the TSDR determining stable Foxp3 expressing Tregs were higher in ITx patients but independent of rejections (Supplementary Figures 5A,C). However, we did not observe differences in Foxp3 mRNA expression (Supplementary Figures 5B,D).

Nearly all of the systemic Tregs showed an activated CCR4 expressing phenotype (30). Furthermore, the majority displayed CCR6 co-expression (Figure 5B).

We also assessed proportions and absolute numbers of conventional T cells (CD25<sup>-/+</sup>) expressing a Th1-like (CCR4<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR10<sup>-</sup>), Th2-like (CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR10<sup>-</sup>), Th17-like (CCR4<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR10<sup>-</sup>), Th22-like (CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR10<sup>-</sup>), mixed Th1/Th2-like (CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR10<sup>-</sup>), and pathogenic Th17-like (CCR4<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR10<sup>-</sup>)



chemokine receptor expression profile (Figure 5C and Supplementary Tables 3, 4) (31, 32). CCR10 expressing T cells represented only a minor fraction of conventional CD4<sup>+</sup> T cells. Therefore, we did not capture CCR10 expressing subsets. We did not detect differences in Th1-like T helper cells neither when comparing transplant patients and healthy controls nor according to rejections. Similarly, Th17-like cells occurred at very low numbers and were not different between groups. In contrast, Th2-like cells seem to accumulate over time in ITx patients (ITx1). We also observed a significant increase in proportions of populations expressing several chemokine receptors such as Th22-like, pathogenic Th17-like or Th1/Th2-like cells in transplant patients (Figure 5C).

Thus, ITx patients are characterized by higher proportions of chemokine receptor expressing regulatory and conventional CD4<sup>+</sup> T cells regardless whether they experienced rejections or not.

### High Systemic Chemokine and Cytokine Levels Even in Stable Transplant Patients

As we did detect increased proportions of chemokine receptor expressing T helper cells in ITx patients, we also investigated serum chemokine and cytokine concentrations.

Concentrations of chemokines attracting T cells and macrophages such as CXC3CL1, CXCL10, CCL2, CCL7, CCL3 as well as cytokines released by T helper subsets such as Interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, or interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) were determined. Serum samples from patients early after transplantation (ITx3) contained more CXC3CL1 and

CXCL10 compared to those from healthy controls (Figure 6A). Furthermore, cytokines typically produced by Th2 cells such as IL-4 and IL-5 were significantly elevated also in long-term transplant patients (Figure 6A). Although Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) and Th17 cytokines (IL-17A) showed a tendency to be increased in serum samples of transplant patients, this did not reach significance. We only detected a tendency toward higher fractalkine, IL-2, and IL-4 concentrations in serum samples of patients with cellular rejections (Supplementary Figures 6A,B).

Altogether, we detected high systemic T cell attracting chemokines and Th2 cytokines in ITx patients even long-term after transplantation and independent of rejections.

### Cluster Analysis of Parameters Contributing to Patient Group Separation

To obtain a better overview of parameters contributing to patient group separation according to time and rejection after intestinal transplantation we performed a cluster analysis of all parameters which had an unadjusted  $p < 0.05$  comparing healthy controls to early (ITx3), mid-term (ITx2), and long-term (ITx1) transplant patients (Figure 6B) or comparing patients with regard to occurrence of rejections (Figure 6C). We also included qRT-PCR results of gene markers previously described to be highly expressed in operational tolerant or acutely/chronically rejecting kidney transplant recipients (Supplementary Table 5).

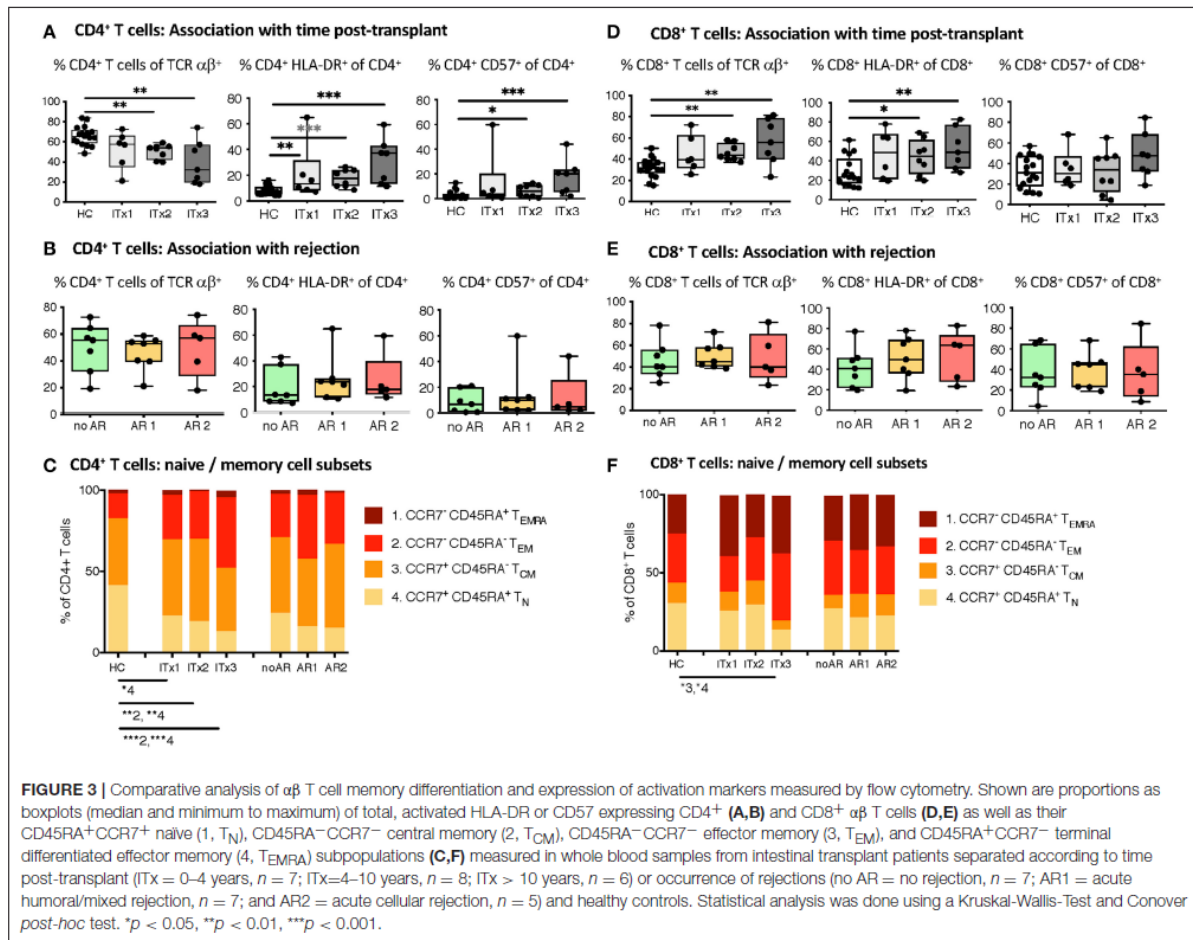
The heatmap shown in Figure 6B confirms, that nearly all ITx patients are distinct to healthy controls. Populations contributing mostly to the separation and being higher in ITx patients were belonging to the B cell lineage (e.g., total B cells, naïve B cells). Indeed, gene markers known to be highly expressed by transitional and naïve B cells such as *Membrane Spanning 4-Domains A1 (MS4A1)*, *CD79B*, and *T-Cell Leukemia/Lymphoma 1A (TCL1A)* were enriched in samples from ITx patients. Further populations and marker contributing to the separation were CD16<sup>+</sup> monocytes, CD56<sup>high</sup> NK cells,  $\gamma\delta^+$  T cells, memory/activated/chemokine receptor expressing CD4<sup>+</sup> T cell subsets as well as IL-4.

In contrast, CD16<sup>-</sup> monocytes, CD56<sup>dim</sup> NK cells as well as naïve/non-activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets were high in healthy controls. A complete list of all cell populations or gene markers contributing to the separation by being either higher (upper main cluster) or reduced (lower main cluster) ITx patients is provided within Supplementary Table 6.

As shown in Figure 6C significant differences in CD16 expressing monocytes and DCs as well as TLR5 expression allowed separation of patients who never experienced rejection episodes (no AR) or humoral rejections (AR1) from all patients who had cellular rejections (AR2). However, separation of patients with humoral rejections (AR1) from stable patients (no AR) was not possible.

### DISCUSSION

We have performed comprehensive assessment of the systemic innate and adaptive immune system according to time, rejections or organ type after intestinal transplantation. Our results revealed



that ITx patient samples contained more CD16 expressing monocytes and myeloid DCs independent of rejections. This was detectable even 10 years after transplantation. Similarly, we observed enhanced proportions of activated conventional recipient T cells which showed a broad T helper cell chemokine expression profile associated with constant high serum Th1, Th2, and Th17 cytokine levels in comparison to healthy control samples. This increase in activated T helper cells was associated with the organ type being transplanted and counterbalanced by enhanced proportions of activated regulatory T cells. Furthermore, the persistent signs of T cell activation were not related to pre-transplant sensitization as none of the patients had DSA prior to transplantation (Table 1).

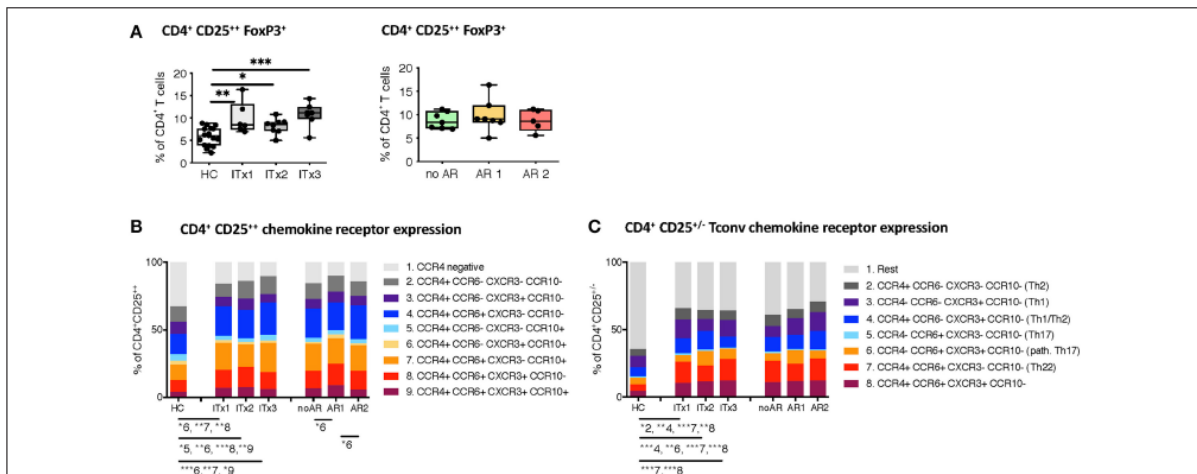
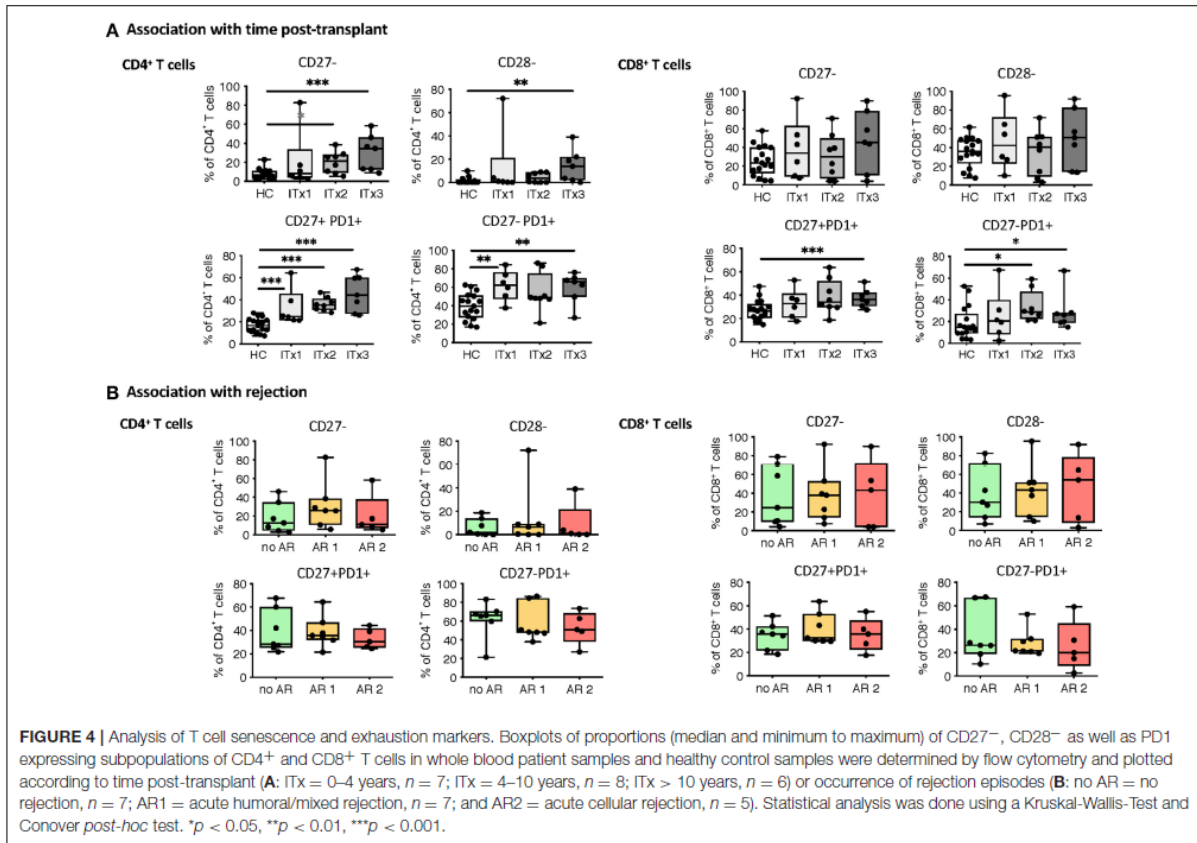
Cellular rejections induced an even more dramatic increase in total DCs, CD16 expressing monocytes and DCs as well as CD56<sup>high</sup> NK cells whereas proportions of total NK cells were reduced. Together with reduced peripheral TLR5 expression this pattern enabled clear separation of patients with previous cellular rejection from stable patients and patients with humoral rejections. Importantly this was not related to differences in IS

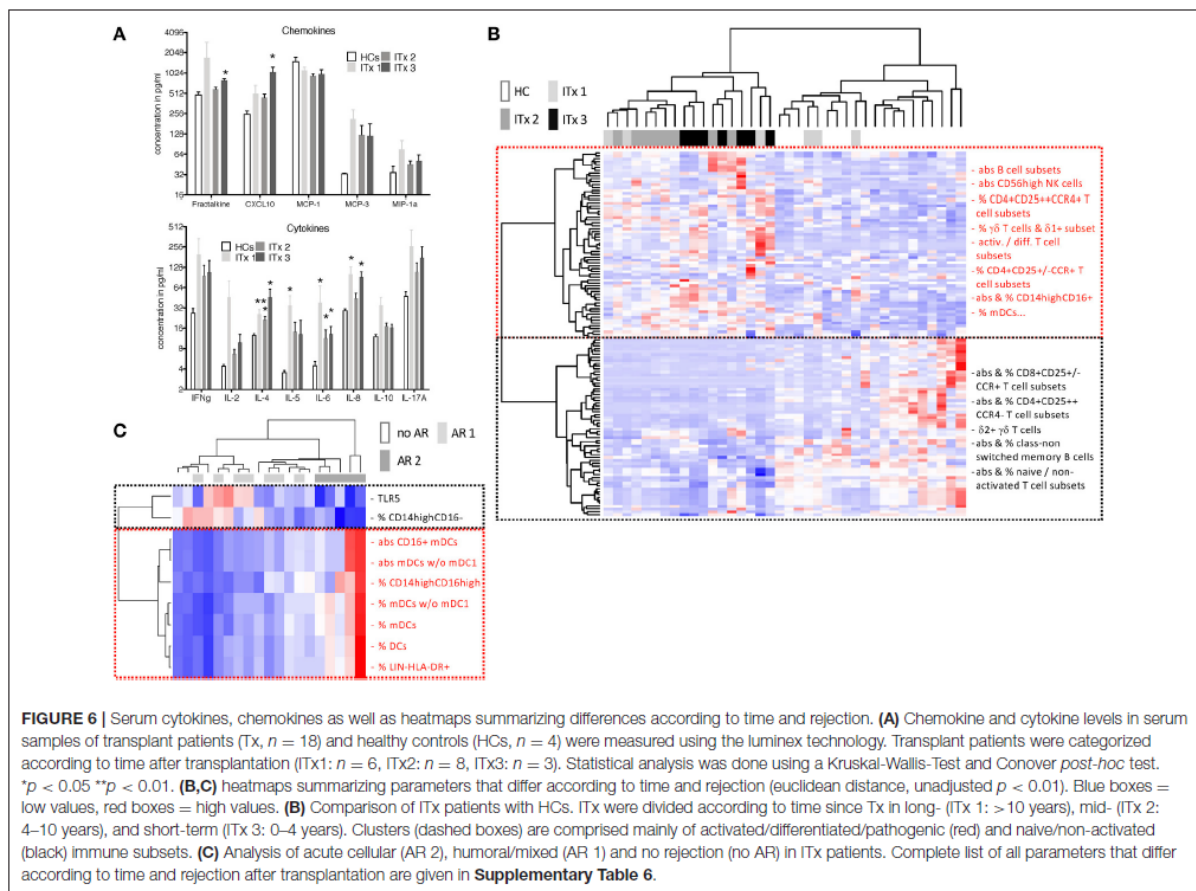
as tacrolimus trough level were not different between all three patient groups.

Previous reports revealed increased proportions of myeloid cells, monocytes and DCs, in pediatric ITx patients experiencing acute rejections (22, 33). In our cohort CD16 expressing monocytes and myeloid DCs were also highest in patients with cellular rejections. Elevated proportions of CD16 expressing monocytes have been observed in patients with ongoing inflammation such as chronic kidney disease patients (CKD) and are discussed to reflect endothelial damage (34).

In previous studies enhanced frequencies of donor-reactive CD154<sup>+</sup> activated memory T cells in rejecting patients have been observed (14, 21). Our analysis revealed a general and persistent high T cell activation, T helper cell differentiation and memory T cell formation with no obvious differences according to previous experience cellular or humoral rejection episodes but rather donor mass being transplanted. The effect of antigen mass is in accordance with other previous investigations (35). Most of the samples from patients experiencing cellular or humoral rejections were collected months or years after the







last rejection episode, which might explain the discrepancies. Also, our main aim was not to identify predictive biomarkers of or diagnose rejection, but to determine how intestinal transplantation including accompanying clinical events such as rejections affects systemic immune cell composition and activation. Surprisingly and in contrast to previous studies that revealed a high degree of donor T cell chimerism especially early after transplantation and in patients receiving multi-visceral transplants (29, 36, 37), we could not detect donor alleles in peripheral blood CD4<sup>+</sup> T helper cells, neither in the activated HLA-DR<sup>+</sup> nor in the non-activated HLA-DR<sup>-</sup> subpopulation. Thus, the constant high proportions of activated T cells are not a sign of persistent chimerism.

Increased pDCs have been associated with development of tolerance upon e.g., liver transplantation (38, 39). Thus, the persistently low pDC/mDC ratio and high proportion of the inflammatory CD16 expressing monocytes and DCs detected in our patient cohort might be an indication of constant inflammation.

We detected a significantly decreased absolute number and proportions of granulocytes in samples of patients with a previous cellular rejection. Indeed, intra-graft sequestration of neutrophils has been described during rejection but for both

cellular (26) and antibody-mediated rejection (40, 41). As the performed blood sample analysis happened long-time after rejection, the sequestration might continue even in the absence of clinical rejection symptoms.

Furthermore, composition of NK subsets was more severely altered in patients who had experienced rejection episodes. Patients with cellular showed lower total NK cells, and a higher proportion displayed a more differentiated CD56<sup>high</sup> phenotype. This might reflect their rejection-dependent activation and intra-graft accumulation. However, this is contrary to previous reports which showed reduced circulating NK cells and elevated proportions of CD56<sup>bright</sup> NK cells in renal allograft recipients with DSA and non-DSA anti-HLA mAbs or NK-cell related transcripts in AMR biopsies (42–44).

Regardless of the time post-transplant or occurrence of rejections ITx patients displayed increased systemic proportions of  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. The majority of the Tregs had a CCR4<sup>+</sup> activated memory phenotype with co-expression of predominantly CCR6. Our results question the conclusions drawn from a recently published study in which high percentages of Tregs upon intestinal transplantation were ascribed to a special immunomodulatory protocol and associated with improved long-term graft function (45). In

this study, ITx patients receiving the immunomodulatory protocol were compared to kidney transplant patient groups and healthy controls but not to ITx patients on other immunosuppressive medications. Thus, high proportions of CCR6<sup>+</sup> Tregs might rather indicate permanent recruitment to counterbalance ongoing immune cell activation following intestinal transplantation.

Our study has some limitations: the patient cohort was relatively small and no intragraft sampling was performed. In addition, given the high mortality rate of intestinal transplant patients within the first years after transplantation, the long-term groups (ITx1 and ITx2) have a bias toward survivors. Therefore, it is even more surprising to observe these alterations in immune cell composition long term after transplantation in the surviving patients.

Furthermore, this is the first comprehensive assessment of time-dependent and rejection-dependent alterations of systemic immune cell composition. Our findings clearly reveal persistent inflammatory responses and activation of immune cells upon intestinal transplantation potentially contributing to unsatisfactory long-term results compared to other solid organ transplants. In future, it will be important to perform comparative investigations in other solid organ graft recipients, but this was clearly beyond the scope of our study.

## ETHICS STATEMENT

All participants gave their written consent to take part in this study authorized by the local ethics committee

## REFERENCES

- Kroemer A, Cosentino C, Kaiser J, Matsumoto CS, Fishbein TM. Intestinal transplant inflammation: the third inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep.* (2016) 18:56. doi: 10.1007/s11894-016-0530-0
- Powell N, MacDonald TT. Recent advances in gut immunology. *Parasite Immunol.* (2017) 39:1–11. doi: 10.1111/pim.12430
- Berger M, Zeevi A, Farmer DG, Abu-Elmagd KM. Immunologic challenges in small bowel transplantation. *Am J Transplant.* (2012) 12(Suppl 4):S2–8. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04332.x
- Garg M, Jones RM, Vaughan RB, Testro AG. Intestinal transplantation: current status and future directions. *J Gastroenterol Hepatol.* (2011) 26:1221–8. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06783.x
- Silva JT, San-Juan R, Fernández-Caamaño B, Prieto-Bozano G, Fernández-Ruiz M, Lumbrecas C, et al. Infectious complications following small bowel transplantation. *Am J Transplant.* (2016) 16:951–9. doi: 10.1111/ajt.13535
- Gerlach UA, Lachmann N, Ranucci G, Sawitzki B, Schoenemann C, Pratschke J, et al. Non-HLA antibodies may accelerate immune responses after intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation.* (2017) 101:141–9. doi: 10.1097/TP.00000000000001439
- Gerlach UA, Lachmann N, Sawitzki B, Arsenic R, Neuhaus P, Schoenemann C, et al. Clinical relevance of the *de novo* production of anti-HLA antibodies following intestinal and multivisceral transplantation. *Transpl Int.* (2014) 27:280–9. doi: 10.1111/tri.12250
- Wu GS, Cruz RJ Jr, Cai JC. Acute antibody-mediated rejection after intestinal transplantation. *World J Transplant.* (2016) 6:719–28. doi: 10.5500/wjt.v6.i4.719
- Loo L, Vrakas G, Reddy S, Allan P. Intestinal transplantation: a review. *Curr Opin Gastroenterol.* (2017) 33:203–11. doi: 10.1097/MOG.0000000000000358
- Ruiz P, Wepler D, Nishida S, Kato T, Selvaggi G, Levi D, et al. International grading scheme for acute rejection in small bowel transplantation: implementation and experience at the University of Miami. *Transplant Proc.* (2006) 38:1683–4. doi: 10.1016/j.transproceed.2006.05.017
- Wu T, Abu-Elmagd K, Bond G, Nalesnik MA, Randhawa P, Demetris AJ. A schema for histologic grading of small intestine allograft acute rejection. *Transplantation.* (2003) 75:1241–8. doi: 10.1097/01.TP.0000062840.49159.2F
- Koo J, Dawson DW, Dry S, French SW, Naini BV, Wang HL. Allograft biopsy findings in patients with small bowel transplantation. *Clin Transplant.* (2016) 30:1433–9. doi: 10.1111/ctr.12836
- Troxell ML, Higgins JP, Kambham N. Evaluation of C4d staining in liver and small intestine allografts. *Arch Pathol Lab Med.* (2006) 130:1489–96. doi: 10.1043/1543-2165(2006)130[1489:EOCSIL]2.0.CO;2
- Ashokkumar C, Gupta A, Sun Q, Ningappa MB, Higgs BW, Mazariegos G, et al. Allospecific CD154<sup>+</sup> T cells identify rejection-prone recipients after pediatric small-bowel transplantation. *Surgery.* (2009) 146:166–73. doi: 10.1016/j.surg.2009.04.006
- Ashokkumar C, Soltys K, Mazariegos G, Bond G, Higgs BW, Ningappa M, et al. Predicting cellular rejection with a cell-based assay: preclinical evaluation in children. *Transplantation.* (2017) 101:131–40. doi: 10.1097/TP.0000000000001076
- Gerlach UA, Klöpfel M, Atanasov G, Polenz D, Vogt K, Ahrlich S, et al. Intragraft and systemic immune parameters discriminating between rejection and long-term graft function in a preclinical model of intestinal transplantation. *Transplantation.* (2017) 101:1036–045. doi: 10.1097/TP.0000000000001469
- Lauro A, Marino IR, Matsumoto CS. Advances in allograft monitoring after intestinal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* (2016) 21:165–70. doi: 10.1097/MOT.0000000000000279

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

NS and KS acquisition and analysis of data, drafting of manuscript. SS data interpretation and statistical analysis. MS analysis of data. OB acquisition and analysis of data and K-LT critical revision of the manuscript. LA, KV, and CA technical support and acquisition of data. AP and UG material support and critical revision of the manuscript. BS study concept and design, obtained funding, and drafting of manuscript.

## FUNDING

The work was supported by the German Research Foundation (DFG) SFB650 and Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF; e:Kid).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the BCRT Flow Cytometry Lab (BCRT-FCL) for assistance with cell sorting.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00866/full#supplementary-material>



18. Mathew JM, Tryphonopoulos P, DeFaria W, Ruiz P, Miller J, Barrett TA, et al. Role of innate and acquired immune mechanisms in clinical intestinal transplant rejection. *Transplantation*. (2015) 99:1273–81. doi: 10.1097/TP.0000000000000491
19. Ranganathan S, Ashokkumar C, Ningappa M, Schmitt L, Higgs BW, Sindhi R. The transcription factor, T-bet, primes intestine transplantation rejection and is associated with disrupted mucosal homeostasis. *Transplantation*. (2015) 99:890–4. doi: 10.1097/TP.0000000000000445
20. Talayero P, Alonso-Guirado L, Padilla G, Artaza H, Dopazo A, Sánchez-Cabo F, et al. 5-gene differential expression predicts stability of human intestinal allografts. *Exp Mol Pathol*. (2017) 103:163–71. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.08.008
21. Sindhi R, Ashokkumar C, Higgs BW, Gilbert PB, Sun Q, Ranganathan S, et al. Allospecific CD154 + T-cytotoxic memory cells as potential surrogate for rejection risk in pediatric intestine transplantation. *Pediatr Transplant*. (2012) 16:83–91. doi: 10.1111/j.1399-3046.2011.01617.x
22. Gupta A, Ashokkumar C, Ningappa M, Sun Q, Higgs BW, Snyder S, et al. Elevated myeloid: plasmacytoid dendritic cell ratio associates with early acute cellular rejection in pediatric small bowel transplantation. *Transplantation*. (2010) 89:55–60. doi: 10.1097/TP.0b013e3181bc5d9e
23. Danese S, Fiocchi C. Endothelial cell-immune cell interaction in IBD. *Dig Dis*. (2016) 34:43–50. doi: 10.1159/000442925
24. Nakamoto N, Kanai T. Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. *Front Immunol*. (2014) 5:221. doi: 10.3389/fimmu.2014.00221
25. Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol*. (2012) 590:447–58. doi: 10.1113/jphysiol.2011.219691
26. Yapici U, Kers J, Bemelman FJ, Roelofs JJ, Groothoff JW, van der Loos CM, et al. Interleukin-17 positive cells accumulate in renal allografts during acute rejection and are independent predictors of worse graft outcome. *Transpl Int*. (2011) 24:1008–17. doi: 10.1111/j.1432-2277.2011.01302.x
27. Kverneland AH, Streitz M, Geissler E, Hutchinson J, Vogt K, Boës D, et al. Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study protocol. *Cytometry A*. (2016) 89:543–64. doi: 10.1002/cyto.a.22855
28. Streitz M, Miloud T, Kapinsky M, Reed MR, Magari R, Geissler EK, et al. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res*. (2013) 2:17. doi: 10.1186/2047-1440-2-17
29. Zuber J, Rosen S, Shonts B, Sprangers B, Savage TM, Richman S, et al. Macrochimerism in intestinal transplantation: association with lower rejection rates and multivisceral transplants, without GVHD. *Am J Transplant*. (2015) 15:2691–703. doi: 10.1111/ajt.13325
30. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, et al. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2013) 110:17945–50. doi: 10.1073/pnas.1316796110
31. Benham H, Norris P, Goodall J, Wechalekar MD, FitzGerald O, Szentpetery A, et al. Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis Res Ther*. (2013) 15:R136. doi: 10.1186/ar4317
32. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*. (2014) 85:36–42. doi: 10.1002/cyto.a.22348
33. Ashokkumar C, Gabriellan A, Ningappa M, Mazariegos G, Sun Q, Sindhi R. Increased monocyte expression of sialoadhesin during acute cellular rejection and other enteritides after intestine transplantation in children. *Transplantation*. (2012) 93:561–4. doi: 10.1097/TP.0b013e3182449189
34. Ramirez R, Carracedo J, Merino A, Soriano S, Ojeda R, Alvarez-Lara MA, et al. CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. *Contrib Nephrol*. (2011) 171:57–61. doi: 10.1159/000327134
35. Steger U, Denecke C, Sawitzki B, Karim M, Jones ND, Wood KJ. Exhaustive differentiation of alloreactive CD8+ T cells: critical for determination of graft acceptance or rejection. *Transplantation*. (2008) 85:1339–47. doi: 10.1097/TP.0b013e31816dd64a
36. Weiner J, Zuber J, Shonts B, Yang S, Fu J, Martinez M, et al. Long-term persistence of innate lymphoid cells in the gut after intestinal transplantation. *Transplantation*. (2017) 101:2449–54. doi: 10.1097/TP.0000000000001593
37. Zuber J, Shonts B, Lau SP, Obradovic A, Fu J, Yang S, et al. Bidirectional intraorgan alloreactivity drives the repopulation of human intestinal allografts and correlates with clinical outcome. *Sci Immunol*. (2016) 1:eah3732. doi: 10.1126/sciimmunol.aah3732
38. Matta BM, Castellaneta A, Thomson AW. Tolerogenic plasmacytoid DC. *Eur J Immunol*. (2010) 40:2667–76. doi: 10.1002/eji.201040839
39. Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Chapman H, Zeevi A, Thomson AW. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant*. (2005) 5:314–22. doi: 10.1111/j.1600-6143.2004.00672.x
40. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol*. (2005) 5:807–17. doi: 10.1038/nri1702
41. Greer M, Dierich M, De Wall C, Suhling H, Rademacher J, Welte T, et al. Phenotyping established chronic lung allograft dysfunction predicts extracorporeal photopheresis response in lung transplant patients. *Am J Transplant*. (2013) 13:911–8. doi: 10.1111/ajt.12155
42. Crespo M, Yelamos J, Redondo D, Muntasell A, Perez-Saéz MJ, López-Montañés M, et al. Circulating NK-cell subsets in renal allograft recipients with anti-HLA donor-specific antibodies. *Am J Transplant*. (2015) 15:806–14. doi: 10.1111/ajt.13010
43. Halloran PF, Reeve JP, Pereira AB, Hidalgo LG, Famulski KS. Antibody-mediated rejection, T cell-mediated rejection, and the injury-repair response: new insights from the Genome Canada studies of kidney transplant biopsies. *Kidney Int*. (2014) 85:258–64. doi: 10.1038/ki.2013.300
44. Parkes MD, Halloran PF, Hidalgo LG. Evidence for CD16a-mediated NK cell stimulation in antibody-mediated kidney transplant rejection. *Transplantation*. (2017) 101:e102–11. doi: 10.1097/TP.0000000000001586
45. Ceulemans LJ, Braza F, Monbaliu D, Jochmans I, De Hertogh G, Du Plessis J, et al. The leuven immunomodulatory protocol promotes T-regulatory cells and substantially prolongs survival after first intestinal transplantation. *Am J Transplant*. (2016) 16:2973–85. doi: 10.1111/ajt.13815

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Stobutzki, Schlickeiser, Streitz, Stanko, Truong, Akyuez, Vogt, Appelt, Pascher, Blau, Gerlach and Sawitzki. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Suppl. table 1: Panel set-up used for multi-parametric flow cytometry

Panel	Target antigen conjugate	Company
1	CD45-KrOrange	Beckman Coulter (B36294)
	CD3-APC-A750	Beckman Coulter (A94680)
	CD4-APC	Beckman Coulter (IM2468)
	CD8-APC-A700	Beckman Coulter (CD)
	CD14-PC7	Beckman Coulter (A22331)
	CD16-FITC	Beckman Coulter (IM0814U)
	CD19-ECD	Beckman Coulter (A07770)
	CD56-PE	Beckman Coulter (A07788)
2	CD45-KrOrange	Beckman Coulter (B36294)
	CD3-APC-A750	Beckman Coulter (A94680)
	CD4-APC	Beckman Coulter (IM2468)
	CD8-APC-A700	Beckman Coulter (CD)
	TCRab-PE	Beckman Coulter (A39499)
	TCRgd-FITC	Beckman Coulter (IM1571U)
	TCR-Vd1-PC7	Beckman Coulter (CD)
	TCR-Vd2-PacBlue	Beckman Coulter (CD)
3	HLA-DR-ECD	Beckman Coulter (IM3636)
	CD45-KrOrange	Beckman Coulter (B36294)
	CD3-APC-A750	Beckman Coulter (A94680)
	CD4-APC	Beckman Coulter (IM2468)
	CD8-APC-A700	Beckman Coulter (CD)
	CD27-PC7	Beckman Coulter (A54823)
	CD28-ECD	Beckman Coulter (6607111)
	CD57-PacBlue	Beckman Coulter (A74779)
	PD1-PC5.5	Beckman Coulter (B36123)
CD45RA-FITC	Beckman Coulter (6603904)	
4	CCR7-PE	Beckman Coulter (B30632)
	CD45-KrOrange	Beckman Coulter (B36294)
	CD19-ECD	Beckman Coulter (A07770)
	CD21-PE	Beckman Coulter (A32536)
	CD24-APC	Beckman Coulter (A87785)
	CD27-PC7	Beckman Coulter (A54823)
	CD38-APC-A700	Beckman Coulter (A86049)
	IgD-FITC	Beckman Coulter (B30652)
IgM-PacBlue	Beckman Coulter (B30656)	
5	CD45-KrOrange	Beckman Coulter (B36294)
	CD1c-PC5.5	Beckman Coulter (CD)
	CD11c-PC7	Beckman Coulter (A80249)
	CD16-FITC	Beckman Coulter (IM0814U)
	CD123-APC-A700	Beckman Coulter (B24028)
	Clec9A-APC	Beckman Coulter (CD)
	HLA-DR-PacBlue	Beckman Coulter (A74781)
	LIN-PE	Beckman Coulter (B29559)
6	CD45-KrOrange	Beckman Coulter (B36294)
	CD3-APC-A750	Beckman Coulter (A94680)
	CD4-APC	Beckman Coulter (IM2468)
	CD8-APC-A700	Beckman Coulter (CD)
	CD25-PC7	Beckman Coulter (A52882)
	CXCR3-PC5.5	BioLegend (353714)
	CCR4-Brilliant Violet	BioLegend (359413)
	CCR6-FITC	BioLegend (353411)
	CCR10-PE	R&D Systems (FAB3478P)
7	CD45-KrOrange	Beckman Coulter (A96416)
	CD3-PacBlue	Beckman Coulter (A93687)
	CD4-PC7	Beckman Coulter (737660)
	CD6-FITC	Beckman Coulter (B16492)
	CD25-PE	Beckman Coulter (A07774)
	CD127-APC-A700	Beckman Coulter (A71116)
	FoxP3-APC	BioLegend (30650, Clone 259D)

**Suppl. table 2: List of TaqMan gene expression assays used for Microfluidic Custom TaqMan® Array Cards.**

No.	Gene Symbol	Assay ID
1	HPRT1	Hs02800695_m1
2	TLR5	Hs01019558_m1
3	PNOC	Hs00918595_m1
4	MS4A1	Hs00544818_m1
5	TCL1A	Hs00172040_m1
6	HS3ST1	Hs01099196_m1
7	SH2D1B	Hs01592483_m1
8	FCRL1	Hs00957541_m1
9	FCRL2	Hs00229156_m1
10	SLC8A1	Hs01062258_m1
11	GAPDH	Hs99999905_m1
12	CD79B	Hs00236881_m1
13	B2M	Hs00984230_m1
14	CD247	Hs00167901_m1
15	FOXP3	Hs00203958_m1
16	MAN1A1	Hs00195458_m1
17	C3orf23	Hs00603313_m1
18	TMEM176B	Hs00962650_m1
19	NAV3	Hs00372108_m1
20	CD274	Hs01125301_m1
21	CXCL10	Hs99999049_m1
22	CD200	Hs01033303_m1
23	HMMR	Hs00234864_m1
24	LAG3	Hs00158563_m1



Suppl. table 3: Means with standard error of mean of all analysed immune cell subset in proportions. The first column shows the collation between healthy controls and the three ITx groups split up according to their time period since transplantation. In the second column, the comparison of the ITx patients among themselves corresponding to their rejection status can be seen. The fitting p-values for each relation are shown. Significant values are highlighted.

Cell subset	Healthy Control vs. Small Bowel Transplantation										Acute Rejection (AR)				
	Mean +/- SEM					Statistics					Mean +/- SEM		Statistics		
	Healthy controls	Tx > 10 years (ITx 1)	Tx 4-10 years (ITx 2)	Tx < 4 years (ITx 3)	Kuskal-Wallis-Test	HC vs. 1	HC vs. 2	HC vs. 3	No AR (0)	Humoral/Mixed AR (1)	Cellular AR (2)	Kuskal-Wallis-Test	0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2
<b>Granulocytes</b>															
CD14 <sup>+</sup> Monocytes	61.60±1.90	63.56±3.31	61.77±3.62	62.19±5.75	0.8922	0.6208	0.6070	0.5393	64.59±2.85	65.60±4.24	51.89±4.74	0.0627	0.6347	0.0577	0.0212
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>high</sup>	7.25±0.39	8.39±0.85	8.39±0.63	9.42±1.30	0.0137	0.0137	0.0646	0.0646	8.94±0.57	8.70±0.95	9.37±0.58	0.1616	0.6195	0.3564	0.3564
CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>+</sup>	4.50±0.43	3.54±0.50	4.99±0.84	7.53±1.61	0.2319	0.2921	0.7034	0.1614	<b>3.28±0.68</b>	<b>4.32±0.66</b>	<b>8.02±1.52</b>	<b>0.0257</b>	0.1502	<b>0.0044</b>	0.0713
CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>+</sup>	5.11±0.64	6.80±1.03	8.80±0.86	8.33±1.19	0.0059	0.0957	0.0010	0.0041	6.08±0.78	7.76±0.80	9.87±1.22	0.0747	0.2031	0.0219	0.2029
CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>+</sup>	88.96±0.98	88.76±1.46	85.01±1.60	83.02±2.50	0.0752	0.9703	0.0532	0.0321	<b>89.55±1.35</b>	<b>86.71±1.42</b>	<b>81.12±1.77</b>	<b>0.0257</b>	0.1502	<b>0.0044</b>	0.0713
Dendritic cells															
pDCs	0.71±0.06	0.83±0.17	0.82±0.09	1.21±0.34	0.3014	0.5511	0.3580	0.0668	0.65±0.14	0.72±0.08	1.24±2.75	0.0071	1.0000	<b>0.0012</b>	0.8839
mDCs	24.35±2.87	20.34±8.30	11.95±2.39	17.65±6.90	0.0184	0.0557	0.0031	0.0321	19.51±7.03	17.10±7.80	12.24±2.75	0.8687	0.6263	0.7644	0.8839
CD16 <sup>+</sup> mDCs	75.65±2.87	79.66±8.30	88.05±2.39	82.35±6.90	0.0184	0.0557	0.0031	0.0321	80.49±7.03	82.90±7.80	87.76±2.75	0.8687	0.6263	0.7644	0.8839
CD16 <sup>+</sup> mDCs	67.03±2.69	71.26±6.08	77.30±3.47	76.60±12.49	0.0239	0.4218	0.0658	0.0025	66.96±11.45	71.30±5.57	86.22±1.69	0.0650	0.7121	<b>0.0467</b>	<b>0.0238</b>
CD1c <sup>+</sup> mDCs	30.64±2.69	25.18±6.35	20.79±3.47	21.72±11.66	0.0249	0.1961	0.0577	0.0028	29.38±11.05	26.36±5.52	12.80±1.64	0.1651	0.4636	0.2096	0.0636
Clec9 <sup>+</sup> mDCs	1.16±0.24	1.02±0.37	0.77±0.18	1.05±0.53	0.4898	0.4990	0.2421	0.2073	1.30±0.50	1.06±0.35	0.48±0.08	0.3205	0.7175	0.1635	0.2482
<b>Lymphocytes</b>															
CD56 <sup>+</sup> NK cells	30.55±1.76	26.24±2.92	28.82±3.32	27.82±5.46	0.5489	0.2999	0.4372	0.2429	25.89±2.70	24.79±3.79	37.85±4.96	0.0599	0.5607	0.0549	<b>0.0188</b>
CD56 <sup>high</sup> NK cells	10.83±1.12	12.45±2.03	13.25±1.72	15.72±2.52	0.2965	0.5923	0.2158	0.0830	15.80±2.47	13.89±1.31	9.55±2.41	0.1169	0.6869	<b>0.0476</b>	0.0957
CD56 <sup>low</sup> NK cells	6.69±1.01	10.81±1.93	8.35±1.01	14.11±3.79	0.1266	0.0793	0.3112	0.0395	6.53±1.21	10.17±1.27	12.63±2.57	0.0728	0.0811	<b>0.0279</b>	0.4828
CD56 <sup>int</sup> NK cells	93.31±1.01	89.19±1.93	91.65±1.01	85.89±3.79	0.1266	0.0793	0.3112	0.0395	93.47±1.21	89.83±1.27	87.37±2.57	0.0728	0.0811	<b>0.0279</b>	0.4828
CD3 <sup>+</sup> T cells	74.09±1.20	71.88±2.14	62.11±2.51	58.87±5.99	0.0015	0.3738	0.0003	0.0006	58.10±4.22	67.38±2.44	67.27±1.82	0.2395	0.1378	0.1834	0.9720
CD56 <sup>+</sup> T cells	10.01±1.52	9.69±3.65	8.03±2.61	14.96±5.02	0.7506	0.8433	0.3599	0.0222	7.51±3.24	12.51±3.24	5.43±1.00	0.2374	0.1265	0.8883	0.2025
TCR ab	91.08±3.76	91.85±2.18	89.44±1.85	88.19±2.75	0.0809	0.5586	0.0432	0.0281	93.29±2.67	87.85±1.95	89.12±2.37	0.1762	0.0917	0.1504	0.9002
TCR gd	5.44±1.27	7.65±3.10	9.18±1.87	11.30±2.66	0.0921	0.8050	0.0889	0.0246	6.02±2.63	11.29±2.27	8.85±2.46	0.2257	0.1056	0.2446	0.7251
CD4 <sup>+</sup>	1.04±0.35	0.79±0.27	0.49±0.20	1.57±1.08	0.7165	1.0000	0.2895	0.6776	1.01±0.33	0.42±0.16	1.82±1.52	0.4376	0.2227	0.5183	0.6256
CD8 <sup>+</sup>	29.85±2.53	31.09±3.73	27.91±6.99	25.44±5.40	0.7313	0.7571	0.4603	0.4979	27.82±7.28	28.17±4.97	26.32±6.44	0.9857	0.8947	0.8971	0.8911
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	69.07±2.55	68.16±3.54	71.23±6.85	73.08±5.01	0.6582	0.7261	0.3865	0.4818	71.11±7.04	71.27±5.00	71.73±5.58	0.9170	0.8594	0.6986	0.8210
Vd1 <sup>+</sup>	25.56±3.93	68.87±9.90	38.04±10.36	51.64±11.06	0.0162	0.0016	0.3467	0.0507	63.00±5.95	41.52±11.42	55.77±18.97	0.5979	0.3939	1.0000	0.4355
Vd2 <sup>+</sup>	61.40±4.76	12.64±8.39	47.04±13.44	38.32±13.12	0.0083	0.0004	0.4540	0.1154	13.77±3.64	45.96±13.63	35.13±20.80	0.4965	0.3202	0.9866	0.3545
CD4 <sup>+</sup> (TCRab)	61.95±2.44	48.96±7.34	46.20±3.14	35.60±7.76	0.0068	0.1103	0.0034	0.0016	47.44±7.37	41.34±5.20	45.19±8.63	0.7188	0.4493	0.7869	0.6707
HLA-DR <sup>+</sup>	8.26±0.85	21.29±8.28	17.62±2.44	31.32±6.71	0.0004	0.0084	0.0004	<0.0001	18.84±5.61	26.08±6.88	24.99±8.70	0.3727	0.1877	0.3945	0.7081
CD27 <sup>+</sup>	8.05±1.23	20.61±11.67	20.08±4.08	30.06±7.17	0.0065	0.3712	0.0088	0.0008	18.04±6.18	31.15±9.56	20.15±9.75	0.4440	0.2577	0.8993	0.3598
CD27 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	39.47±3.50	61.89±6.26	54.19±7.46	59.94±6.29	0.0116	0.0057	0.0667	0.0043	61.89±7.30	57.48±7.38	52.59±7.79	0.5979	0.3939	0.4355	1.0000
CD28 <sup>+</sup>	1.61±0.67	12.99±10.96	4.13±1.51	14.18±5.24	0.0719	0.3326	0.2880	0.0083	6.17±2.82	13.89±9.83	8.84±7.53	0.9786	0.9297	0.9102	0.8467
CD27 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	1.54±0.66	12.70±10.83	3.96±1.48	13.94±5.21	0.0719	0.3278	0.3532	0.0082	6.02±2.85	13.56±9.71	8.65±7.53	0.9946	0.9648	0.9239	0.9551
CD27 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	16.95±1.56	32.78±6.35	36.01±2.18	46.23±6.29	<0.0001	0.0005	<0.0001	<0.0001	38.99±6.91	38.97±5.10	32.92±3.81	0.7973	0.7215	0.7633	0.5328
CD57 <sup>+</sup>	2.94±0.85	12.70±8.76	6.29±1.70	17.53±5.49	0.1033	0.1323	0.0442	0.0007	8.62±3.31	14.37±7.75	11.95±8.10	0.9786	0.9297	0.9102	0.8467
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>H</sub> )	41.38±3.36	22.81±5.47	19.25±3.13	13.04±5.15	0.0011	0.0155	0.0028	<0.0001	24.34±5.72	16.01±4.61	15.23±2.81	0.3891	0.2925	0.2344	0.8119
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>em</sub> )	41.22±3.04	47.02±20.21	50.77±8.24	39.03±14.41	0.1673	0.1801	0.0829	0.7034	46.53±5.01	41.78±6.29	51.71±7.05	0.2528	0.5999	0.2513	0.1126
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>H</sub> )	15.41±1.50	27.11±25.44	28.99±12.03	43.22±18.63	0.0023	0.1744	0.0055	0.0001	26.87±7.82	36.11±7.41	31.38±8.03	0.4130	0.2053	0.5552	0.5552
CD25 <sup>+</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	1.99±1.26	2.85±2.31	1.29±0.63	4.18±1.77	0.0420	0.9693	0.1010	0.1010	2.15±1.82	3.51±2.09	1.29±0.81	0.7938	0.5811	0.5937	0.5811
CD25 <sup>+</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	5.11±0.64	8.38±0.89	6.95±0.91	6.98±1.50	0.1059	0.0206	0.1320	0.2720	8.27±1.22	6.91±1.21	7.65±1.18	0.7365	0.4766	0.8635	0.6303
CD25 <sup>+</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	8.46±0.76	14.02±4.44	8.82±1.37	12.37±3.18	0.5973	0.3672	0.9772	0.2965	8.05±1.33	12.47±4.23	14.12±4.23	0.5538	0.5860	0.3061	0.5901
CD25 <sup>+</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	0.97±0.13	1.12±0.33	1.26±0.22	0.81±0.13	0.5599	0.9768	0.3504	0.4810	1.21±0.29	1.05±0.30	0.88±0.17	0.6421	0.4731	0.4280	0.8884
CD25 <sup>+</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	4.85±0.55	15.82±1.78	11.80±1.48	15.67±3.75	0.0001	<0.0001	0.0002	0.0001	15.86±1.62	12.69±2.77	16.28±4.15	0.8356	0.5948	0.6911	0.9287

CD25 <sup>hi</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup>	6.88±0.80	11.22±1.56	13.64±1.46	8.00±0.67	0.0017	0.0055	<0.0001	0.2029	10.84±1.47	10.22±1.32	13.45±2.45	0.2014	0.1453	0.1203	0.8107
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup> (Th <sub>17</sub> /Th <sub>2</sub> )	4.83±0.64	5.03±1.02	10.63±2.62	7.92±2.56	0.0602	0.7252	0.0074	0.2658	5.66±1.30	10.20±3.30	5.86±0.88	0.3540	0.2012	0.9114	0.2860
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup> (pathogenic Th <sub>17</sub> )	4.62±0.68	10.37±1.40	11.64±0.93	12.39±2.05	0.0006	0.0026	0.0002	0.0002	10.98±1.41	11.87±2.08	12.17±1.25	0.1934	0.2920	0.0796	0.3934
CD25 <sup>hi</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	5.89±0.49	9.97±1.35	8.19±0.61	10.74±1.02	0.0010	0.0025	0.0143	<0.0001	8.76±0.67	9.80±1.33	8.77±1.04	0.7726	0.5053	0.8193	0.7018
CD25 <sup>hi</sup> FoxP3 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> )	67.24±1.90	85.27±3.56	87.13±2.23	90.82±1.51	<0.0001	0.0148	0.0011	0.0001	85.07±3.91	90.90±1.83	87.04±0.62	0.2755	0.1660	0.9930	0.2010
(activated/memory T <sub>reg</sub> )															
CD25 <sup>hi</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup>	9.01±0.92	7.17±1.02	8.27±1.30	5.93±1.04	0.3305	0.3574	0.8448	0.0909	6.83±1.54	8.01±1.03	7.10±1.44	0.8782	0.6902	0.9612	0.6801
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> ; Th <sub>1</sub> )	2.88±0.47	1.98±0.39	2.17±0.44	1.67±0.34	0.5931	0.4740	0.5902	0.2020	1.58±0.30	2.70±0.44	1.48±0.43	0.1071	0.0611	0.9482	0.0750
CD25 <sup>hi</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup>	11.30±0.98	9.89±1.61	12.92±1.77	13.51±2.20	0.5206	0.4607	0.4293	0.4757	11.62±1.31	11.60±1.99	10.80±2.42	0.9295	0.9295	0.7287	0.7899
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> ; Th <sub>2</sub> )	4.79±0.66	3.16±0.54	2.63±0.43	4.20±0.71	0.0776	0.1290	0.0173	0.8548	2.72±0.46	3.47±0.56	2.77±0.39	0.5695	0.3241	0.7651	0.5409
CD25 <sup>hi</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	15.18±1.01	21.76±2.54	21.08±2.24	24.00±1.72	0.0029	0.0148	0.0088	0.0003	21.97±2.44	20.44±2.13	25.19±2.80	0.4016	0.7105	0.3443	0.2056
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> ; Th <sub>2</sub> -2)	11.22±1.55	19.88±2.96	16.38±2.35	21.82±2.59	0.0064	0.0078	0.0518	0.0010	19.93±3.48	18.92±2.52	18.87±3.38	0.9354	0.8250	0.7409	0.8972
CD25 <sup>hi</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	8.94±0.57	13.58±1.52	15.15±1.52	12.64±2.49	0.0049	0.0071	0.0005	0.1022	13.09±2.13	15.90±1.51	14.16±2.42	0.4356	0.2394	0.8197	0.3899
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> ; Th <sub>17</sub> )	3.92±0.63	6.79±1.84	7.42±0.96	5.99±1.10	0.0188	0.0928	0.0023	0.0406	6.51±0.87	8.87±1.51	5.51±1.40	0.2676	0.5071	0.3159	0.1175
CD25 <sup>hi</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	32.21±2.08	43.60±5.62	44.85±2.87	52.83±7.91	0.0087	0.0577	0.0053	0.0022	44.76±6.20	47.83±3.98	46.92±9.68	0.7492	0.4770	0.7439	0.7439
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> ; Th <sub>17</sub> -2)	8.50±4.95	15.92±7.84	12.59±6.66	3.88±0.89	0.3240	0.1857	0.1265	0.7995	4.15±0.89	16.24±7.59	14.51±10.13	0.3480	0.1859	0.3119	0.8305
CD25 <sup>hi</sup> /CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	28.52±3.68	46.73±9.42	40.76±8.06	52.76±8.06	0.0273	0.0612	0.0297	0.0069	41.85±7.47	51.02±7.86	53.24±11.03	0.6485	0.4467	0.4617	0.9671
HLA-DR <sup>+</sup>	25.61±3.79	38.44±12.11	30.76±8.45	47.26±12.13	0.3900	0.3836	0.9049	0.1196	36.78±12.01	38.05±10.81	38.91±16.21	0.9611	0.9648	0.8340	0.8027
CD27 <sup>+</sup>	18.79±3.57	25.34±8.62	33.78±5.06	28.96±6.58	0.0536	0.4123	0.0074	0.1014	34.91±8.64	28.21±4.48	25.49±9.56	0.6996	0.8927	0.4492	0.5245
CD27 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	35.10±3.83	46.96±11.67	34.96±8.64	50.39±11.46	0.5132	0.3836	0.8438	0.1833	39.41±10.73	43.33±10.72	45.49±16.46	0.9146	0.7235	0.7528	0.9935
CD28 <sup>+</sup>	22.94±3.68	35.53±12.24	25.88±8.18	40.68±12.11	0.5676	0.4043	0.9831	0.2390	29.61±11.26	33.32±11.10	36.06±16.14	0.9304	0.7238	0.8717	0.8717
CD27 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	27.06±2.09	32.54±4.76	38.54±5.21	37.45±3.01	0.0404	0.2044	0.0200	0.0136	34.45±4.29	40.25±5.13	35.17±6.24	0.8394	0.6257	0.9935	0.6501
CD27 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	32.17±3.67	32.74±7.47	47.90±8.49	47.90±8.49	0.4176	0.9853	0.8786	0.1369	36.08±8.73	38.69±6.76	37.50±13.04	0.9146	0.7235	0.9935	0.7528
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>H</sub> )	30.58±3.30	25.48±6.63	29.36±5.35	13.42±4.73	0.0983	0.5145	0.8316	0.0148	27.20±8.40	21.46±4.25	22.58±7.13	0.7492	0.4770	0.7439	0.7439
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>EM</sub> )	13.11±1.83	12.33±3.25	15.59±4.05	5.95±2.01	0.1656	0.9378	0.8273	0.0417	8.39±1.94	14.90±5.07	13.37±3.97	0.6166	0.6195	0.3564	0.6326
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>EM</sub> )	31.22±3.37	22.71±4.53	27.82±2.89	42.71±4.78	0.0525	0.1190	0.4024	0.0826	34.85±4.70	27.98±4.36	30.81±9.16	0.6421	0.4731	0.4280	0.8884
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>EM</sub> RA)	25.09±3.68	38.82±11.24	27.51±7.43	37.01±4.70	0.2942	0.2436	0.6696	0.0832	28.78±6.86	36.00±11.09	33.09±8.00	0.8687	0.7228	0.6392	0.8839
B cells	9.71±0.67	9.25±1.22	16.97±3.16	13.91±5.62	0.0967	0.8491	0.0210	0.9537	18.99±4.48	10.82±1.79	15.42±5.46	0.3097	0.1440	0.3983	0.6002
Transitional	2.79±0.37	7.84±3.58	2.55±0.44	3.66±1.38	0.3724	0.1191	0.8902	0.9120	3.12±1.31	6.83±3.35	3.17±1.13	0.2279	0.0969	0.5344	0.3442
Naive	54.76±3.07	54.34±4.88	69.27±4.89	62.90±6.83	0.1315	0.9755	0.0307	0.2112	67.03±7.69	64.61±5.11	63.45±2.89	0.8501	0.5992	0.8077	0.8077
Marginal Zone	13.51±1.78	10.32±0.89	7.76±1.45	7.89±1.78	0.0769	0.6670	0.0277	0.0442	6.76±1.15	9.38±1.46	7.55±1.75	0.4586	0.2408	0.6992	0.4828
Class-non-switched memory	4.08±0.56	2.05±0.65	1.21±0.37	1.23±0.25	0.0006	0.0113	0.0001	0.0002	1.74±0.73	1.06±0.21	1.46±0.30	0.6398	0.8565	0.4862	0.3916
Class-switched memory	15.63±1.79	11.96±3.25	8.21±1.56	8.08±1.84	0.0388	0.2460	0.0096	0.0268	10.48±3.75	7.76±1.02	8.56±0.90	0.8501	0.5951	0.8077	0.8077
Plasmablasts	1.36±0.36	1.86±0.57	1.36±0.25	0.57±0.30	0.8719	0.5640	0.5730	0.5420	1.46±0.53	1.51±0.36	1.54±0.62	0.9146	0.7235	0.9935	0.7528
CD21 <sup>low</sup> CD38 <sup>low</sup>	8.78±1.20	15.26±2.53	9.09±1.69	16.87±4.00	0.0431	0.0161	0.7309	0.0330	8.63±1.27	12.37±2.43	15.37±3.77	0.3226	0.3764	0.1544	0.5158



Suppl. table 4: Means with standard error of mean of all analysed immune cells subsets in absolute cell numbers (/n). The first column shows the collation between healthy controls and the three ITx groups split up according to their time period since transplantation. In the second column, the comparison of the ITx patients among themselves corresponding to their rejection status can be seen. The fitting p-values for each relation are shown. Significant values are highlighted.

Cell subset	Healthy Control vs. Small Bowel Transplantation					Acute Rejection (AR)									
	Mean +/- SEM		Statistics			Mean +/- SEM		Statistics							
	Healthy controls	Tx > 10 years (ITx 1)	Tx 4-10 years (ITx 2)	Tx < 4 years (ITx 3)	Kuskal-Wallis-Test	post-hoc test after Conover	No AR (0)	Humoral/Mixed AR (1)	Cellular AR (2)	Kuskal-Wallis-Test	post-hoc test after Conover				
		HC vs. 1	HC vs. 2	HC vs. 3							0 vs. 1	0 vs. 2	1 vs. 2		
<b>CD45+ Leucocytes</b>	6.546±0.562	6.872±0.576	6.971±0.944	8.191±1.304	0.5129	0.2945	0.5818	0.1990	8.540±0.700	7.127±1.073	7.386±1.354	0.3140	0.1832	0.2411	0.9587
<b>Granulocytes</b>	4.030±0.346	4.392±0.472	4.097±0.328	4.872±0.760	0.6557	0.4401	0.6528	0.2587	5.461±0.602	4.420±0.364	3.685±0.389	0.0919	0.2889	0.0287	0.1800
<b>CD14+ Monocytes</b>	0.481±0.060	0.662±0.078	0.603±0.098	0.708±0.107	0.0738	<b>0.0476</b>	0.1467	<b>0.0256</b>	0.771±0.066	0.629±0.112	0.663±0.085	0.4090	0.2049	0.6662	0.4542
<b>CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup></b>	0.020±0.002	0.023±0.003	0.030±0.007	0.046±0.013	0.1598	0.4180	0.2430	<b>0.0282</b>	0.023±0.005	0.029±0.008	0.055±0.015	0.0679	0.4649	<b>0.0207</b>	0.0778
<b>CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup></b>	<b>0.025±0.004</b>	<b>0.045±0.006</b>	<b>0.051±0.008</b>	<b>0.055±0.011</b>	<b>0.0021</b>	<b>0.0077</b>	<b>0.0009</b>	<b>0.0008</b>	0.045±0.006	0.048±0.009	0.068±0.013	0.2483	0.9236	0.1371	0.1593
<b>Dendritic cells</b>	0.430±0.056	0.576±0.067	0.520±0.081	0.599±0.099	0.1067	<b>0.0433</b>	0.2506	0.0509	0.677±0.062	0.552±0.097	0.541±0.071	0.4440	0.2577	0.3598	0.8993
<b>pDCs</b>	0.047±0.008	0.054±0.009	0.055±0.007	0.096±0.034	0.5226	0.4685	0.2584	0.2331	0.050±0.010	0.050±0.008	0.132±0.038	0.1026	0.8784	<b>0.0483</b>	0.0632
<b>mDCs</b>	0.011±0.001	0.008±0.002	0.006±0.002	0.012±0.006	0.1452	0.2114	<b>0.0266</b>	0.3266	0.0058±0.0005	0.0064±0.0019	0.0164±0.0071	0.7479	0.3803	0.1075	<b>0.0223</b>
<b>CD16<sup>+</sup> mDCs</b>	0.036±0.007	0.045±0.010	0.049±0.007	0.084±0.030	0.1974	0.2124	0.0557	0.1772	<b>0.044±0.011</b>	<b>0.043±0.009</b>	<b>0.114±0.032</b>	<b>0.0416</b>	0.7019	<b>0.0132</b>	<b>0.0273</b>
<b>CD16<sup>+</sup> mDCs</b>	0.025±0.006	0.035±0.010	0.038±0.005	0.066±0.025	0.0606	0.2044	<b>0.0216</b>	<b>0.0298</b>	<b>0.030±0.008</b>	<b>0.032±0.007</b>	<b>0.097±0.025</b>	<b>0.0272</b>	0.9546	<b>0.0108</b>	<b>0.0097</b>
<b>CD1c<sup>+</sup> mDCs</b>	0.010±0.002	0.010±0.003	0.010±0.002	0.011±0.005	0.6432	0.6477	0.5719	0.2197	0.008±0.002	0.011±0.003	0.016±0.006	0.5194	0.6160	0.2790	0.5226
<b>Clec9<sup>+</sup> mDCs</b>	0.004±0.0001	0.0003±0.0001	0.0004±0.0001	0.0005±0.0002	0.9882	0.9886	0.9883	0.7484	0.0004±0.0001	0.0004±0.0001	0.0006±0.0002	0.5788	0.8202	0.3384	0.4490
<b>Lymphocytes</b>	1.998±0.212	1.783±0.205	2.110±0.540	2.369±0.764	0.9710	0.8232	0.6547	0.9423	2.057±0.116	1.953±0.634	2.968±0.940	0.2053	0.1340	0.8942	0.1346
<b>CD56<sup>+</sup> NK cells</b>	0.212±0.026	0.220±0.050	0.247±0.054	0.303±0.060	0.5774	0.8931	0.7287	0.2072	0.323±0.056	0.245±0.064	0.237±0.052	0.3384	0.1713	0.3393	0.7512
<b>CD56<sup>high</sup></b>	<b>0.12±0.002</b>	<b>0.020±0.003</b>	<b>0.034±0.006</b>	<b>0.034±0.006</b>	<b>0.0008</b>	<b>0.0083</b>	<b>0.0048</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.020±0.004	0.030±0.009	0.023±0.009	0.5820	0.6504	0.3266	0.5632
<b>CD56<sup>dim</sup></b>	0.201±0.026	0.201±0.026	0.228±0.052	0.271±0.059	0.7897	0.8339	0.8430	0.3872	0.303±0.055	0.224±0.061	0.207±0.046	0.2327	0.1158	0.2229	0.8057
<b>CD3<sup>+</sup> T cells</b>	1.474±0.154	1.277±0.154	1.356±0.365	1.541±0.685	0.4050	0.6352	0.2057	0.1563	1.229±0.116	1.315±0.423	2.142±0.41	0.2501	0.3001	0.4981	0.1142
<b>CD56<sup>+</sup></b>	0.133±0.019	0.129±0.053	0.089±0.024	0.141±0.043	0.4741	0.4343	0.1564	0.9339	0.096±0.042	0.146±0.050	0.109±0.040	0.7726	0.7018	0.7018	0.8193
<b>TCR ab</b>	1.368±0.163	1.176±0.161	1.200±0.305	1.404±0.649	0.3745	0.6264	0.2281	0.1233	1.145±0.109	1.125±0.351	1.980±0.831	0.1955	0.1571	0.7292	0.1070
<b>TCR gd</b>	0.066±0.011	0.091±0.036	0.135±0.058	0.145±0.055	0.5295	0.9636	0.3104	0.8652	0.0003±0.0001	0.165±0.066	0.169±0.064	0.4217	0.0923	0.0663	0.7410
<b>CD4<sup>+</sup></b>	0.006±0.002	0.002±0.0001	0.0003±0.0001	0.0021±0.0017	0.8799	0.4926	0.8612	0.852	0.0003±0.0001	0.0004±0.0001	0.0028±0.0023	0.7465	0.8578	0.4851	0.5909
<b>CD8<sup>+</sup></b>	0.021±0.005	0.031±0.013	0.051±0.024	0.039±0.020	0.8886	0.7216	0.9929	0.5846	0.023±0.012	0.056±0.026	0.053±0.028	0.3546	0.2387	0.2381	0.9250
<b>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>	0.044±0.007	0.059±0.023	0.086±0.037	0.105±0.038	0.4142	0.9912	0.2219	0.2016	0.052±0.029	0.110±0.042	0.113±0.039	0.1035	0.0735	0.0580	0.7733
<b>Vd1<sup>+</sup></b>	0.014±0.002	0.077±0.034	0.062±0.028	0.092±0.048	0.1271	0.0932	0.5284	<b>0.0367</b>	0.055±0.029	0.087±0.037	0.112±0.060	0.7299	0.7880	0.4599	0.6186
<b>Vd2<sup>+</sup></b>	0.041±0.008	<b>0.004±0.002</b>	<b>0.039±0.011</b>	<b>0.036±0.016</b>	<b>0.0059</b>	<b>0.0003</b>	0.9382	0.4923	0.009±0.004	0.039±0.012	0.036±0.024	0.1731	0.0694	0.5384	0.2678
<b>CD4<sup>+</sup> (TCRab)</b>	<b>0.937±0.115</b>	<b>0.612±0.109</b>	<b>0.565±0.119</b>	<b>0.438±0.138</b>	<b>0.0299</b>	0.1378	<b>0.0375</b>	<b>0.0052</b>	0.581±0.109	0.487±0.142	0.705±0.115	0.1652	0.4636	0.2096	<b>0.0636</b>
<b>HIA-DR<sup>+</sup></b>	0.075±0.011	0.089±0.012	0.099±0.030	0.156±0.078	0.6946	0.2755	0.5392	0.5507	0.079±0.009	0.111±0.034	0.207±0.102	0.4586	0.7472	0.2453	0.3780
<b>CD27<sup>+</sup></b>	0.066±0.009	0.070±0.023	0.110±0.038	0.133±0.070	0.7170	0.9512	0.2783	0.7393	0.069±0.017	0.126±0.044	0.164±0.096	0.6404	0.3958	0.5329	0.8754
<b>CD27<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup></b>	0.026±0.004	0.049±0.021	0.073±0.036	0.085±0.050	0.4880	0.4541	0.2089	0.2447	0.045±0.014	0.090±0.042	0.101±0.069	0.8687	0.7644	0.7644	0.8839
<b>CD28<sup>+</sup></b>	0.012±0.005	0.029±0.022	0.023±0.011	0.065±0.048	0.3762	0.4959	0.5436	0.0891	0.020±0.008	0.040±0.021	0.075±0.068	0.9857	0.8947	0.9871	0.8911
<b>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup></b>	0.011±0.005	0.028±0.021	0.023±0.011	0.064±0.047	0.3553	0.4251	0.5437	0.0844	0.019±0.008	0.040±0.021	0.074±0.068	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
<b>CD27<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup></b>	0.127±0.013	0.131±0.026	0.154±0.029	0.112±0.026	0.6896	0.6294	0.4266	0.6383	0.153±0.022	0.118±0.036	0.161±0.017	0.1290	0.1338	0.5539	0.0575
<b>CD57<sup>+</sup></b>	0.023±0.006	0.037±0.016	0.039±0.016	0.084±0.055	0.4627	0.4620	0.5887	0.1281	0.030±0.009	0.053±0.023	0.102±0.078	0.8687	0.7228	0.6392	0.8839
<b>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>(T<sub>H</sub>)</b>	<b>0.372±0.048</b>	<b>0.161±0.052</b>	<b>0.122±0.037</b>	<b>0.052±0.019</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0030</b>	<b>0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.159±0.050	0.097±0.044	0.095±0.012	0.3857	0.1886	0.4886	0.5935
<b>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>(T<sub>EM</sub>)</b>	0.396±0.069	0.302±0.068	0.264±0.045	0.176±0.068	0.0951	0.5806	0.2726	<b>0.0129</b>	0.284±0.068	0.193±0.053	0.336±0.059	0.1743	0.2487	0.4145	0.0715
<b>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>(T<sub>SCM</sub>)</b>	0.134±0.020	0.111±0.018	0.156±0.043	0.186±0.073	0.9393	0.7981	0.6754	0.8936	0.109±0.019	0.168±0.048	0.239±0.092	0.4149	0.3598	0.2300	0.7036
<b>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>(T<sub>EMnaïv</sub>)</b>	0.014±0.008	0.007±0.005	0.008±0.005	0.014±0.007	0.5113	0.5699	0.4194	0.4235	0.007±0.006	0.013±0.006	0.010±0.007	0.8532	0.9291	0.6737	0.6161
<b>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup></b>	0.0462±0.0077	0.0520±0.0116	0.0415±0.0100	0.0342±0.0140	0.6283	0.6695	0.8215	0.2997	0.0498±0.0117	0.0360±0.0119	0.0528±0.0150	0.4929	0.3419	0.9066	0.3259
<b>CXCR3<sup>+</sup>CCR10<sup>+</sup>(Th<sub>2</sub>)</b>	0.0746±0.0094	0.0648±0.0116	0.0597±0.0223	0.0647±0.0371	0.1648	0.7292	0.1390	<b>0.0439</b>	0.0464±0.0090	0.0584±0.0257	0.1104±0.0458	0.3608	0.7436	0.2939	0.2939
<b>CXCR3<sup>+</sup>CCR10<sup>+</sup>(Th<sub>1</sub>)</b>	0.0081±0.0012	0.0083±0.0036	0.0063±0.0010	0.0034±0.0012	0.1421	0.5043	0.5510	<b>0.0212</b>	0.0087±0.0033	0.0044±0.0011	0.0058±0.0012	0.4929	0.3419	0.9066	0.3259
<b>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup></b>	0.0418±0.0058	0.0556±0.201	0.0542±0.0303	0.0486±0.0259	0.2716	0.7102	0.2110	0.3013	0.0651±0.0158	0.0400±0.0145	0.0722±0.0324	0.3998	0.2370	0.9458	0.3082
<b>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup></b>	0.0621±0.0100	0.0425±0.0105	0.0527±0.0166	0.0516±0.0193	0.5393	0.2631	0.2920	0.3590	0.0486±0.0080	0.0434±0.0188	0.0752±0.0234	0.1877	0.1694	0.6502	0.0948

CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	0.0404±0.0068	0.0300±0.0060	0.0466±0.0046	0.0244±0.0066	0.0709	0.5966	0.0983	0.1327	0.0315±0.0069	0.0384±0.0082	0.0395±0.0056	0.9422	0.7572	0.8275	0.9485
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>-</sup> (pathogenic Th17)	0.0399±0.0066	0.0307±0.0067	0.0474±0.0081	0.0338±0.0103	0.4756	0.6166	0.2911	0.5837	0.0411±0.0063	0.0355±0.0108	0.0499±0.0085	0.4228	0.6116	0.4214	0.2127
CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	0.055±0.008	0.053±0.008	0.043±0.005	0.044±0.012	0.5736	0.7811	0.5224	0.2555	0.0489±0.0067	0.0408±0.0069	0.0616±0.0132	0.4298	0.4356	0.6017	0.2249
CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup>	<b>0.0594±0.0095</b>	<b>0.0219±0.0039</b>	<b>0.0202±0.0026</b>	<b>0.0196±0.0039</b>	<b>0.0006</b>	<b>0.0021</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0002</b>	0.0197±0.0023	0.0206±0.0042	0.0251±0.0037	0.4240	0.8530	0.3061	0.2368
(activated)/memory Treg															
CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup>	<b>0.0075±0.0012</b>	<b>0.0019±0.0004</b>	<b>0.0019±0.0004</b>	<b>0.0014±0.0004</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.0017±0.0005	0.0019±0.0005	0.0020±0.0005	0.8966	0.7904	0.6687	0.8523
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>-</sup>															
(Treg; Th1)															
CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup>	<b>0.0024±0.0005</b>	<b>0.0005±0.0001</b>	<b>0.0005±0.0001</b>	<b>0.0004±0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.0004±0.0001	0.0006±0.0001	0.0004±0.0001	0.3998	0.2370	0.9458	0.3082
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup>															
(Treg; Th1; -2)															
CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup>	<b>0.0096±0.0014</b>	<b>0.0028±0.0005</b>	<b>0.0030±0.0005</b>	<b>0.0028±0.0007</b>	<b>0.0025</b>	<b>0.0079</b>	<b>0.0019</b>	<b>0.0007</b>	0.0030±0.0005	0.0027±0.0006	0.0032±0.0009	0.9088	0.6907	0.7959	0.9162
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>-</sup>															
(Treg; Th2)															
CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>-</sup>	<b>0.0045±0.0011</b>	<b>0.0007±0.0001</b>	<b>0.0006±0.0001</b>	<b>0.0008±0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.0006±0.0001	0.0007±0.0001	0.0008±0.0002	0.6462	0.5893	0.3875	0.7049
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup>															
(Treg; Th2; -2)															
CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	<b>0.0139±0.0027</b>	<b>0.0057±0.0010</b>	<b>0.0051±0.0011</b>	<b>0.0053±0.0013</b>	<b>0.0210</b>	<b>0.0837</b>	<b>0.0057</b>	<b>0.0151</b>	0.0049±0.0005	0.0052±0.0014	0.0072±0.0015	0.3205	0.7775	0.2482	0.1635
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>-</sup>															
(Treg; Th17)															
CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	0.0106±0.0027	0.0049±0.0010	0.0037±0.0007	0.0046±0.0009	0.1223	0.1782	0.0278	0.1458	0.0042±0.0009	0.0040±0.0006	0.0058±0.0014	0.5947	0.9638	0.4030	0.3809
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>+</sup>															
(Treg; Th2; -2)															
CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	<b>0.0076±0.0012</b>	<b>0.0033±0.0006</b>	<b>0.0037±0.0008</b>	<b>0.0031±0.0009</b>	<b>0.0085</b>	<b>0.0125</b>	<b>0.0198</b>	<b>0.0019</b>	0.0033±0.0008	0.0037±0.0009	0.0039±0.0007	0.7072	0.6223	0.4447	0.7493
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>-</sup>															
(Treg; Th1/Th17)															
CD25 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup>	0.0032±0.0007	0.017±0.0004	0.0017±0.0002	0.0013±0.0004	0.1090	0.1481	0.1623	<b>0.0239</b>	0.0016±0.0003	0.0018±0.0002	0.0016±0.0004	0.7286	0.5919	0.8250	0.4795
CXCR3 <sup>+</sup> CCR10 <sup>-</sup>															
(Treg; Th1/Th17; -2)															
CD8 <sup>+</sup> (TCRab)	0.458±0.049	0.573±0.127	0.651±0.213	0.962±0.567	0.8258	0.5642	0.7049	0.6795	0.533±0.076	0.680±0.248	1.293±0.774	0.8966	0.7904	0.8523	0.6687
CD25 <sup>+</sup>	0.035±0.018	0.066±0.025	0.046±0.015	0.020±0.004	0.0593	<b>0.0297</b>	<b>0.0240</b>	0.5434	0.024±0.005	0.056±0.016	0.067±0.032	0.2327	0.1158	0.2229	0.8057
HLA-DR <sup>+</sup>	0.138±0.024	0.316±0.109	0.334±0.150	0.756±0.543	0.2428	0.1908	0.1143	0.1310	0.246±0.072	0.402±0.175	1.021±0.750	0.8734	0.8244	0.6279	0.7768
CD27 <sup>-</sup>	0.111±0.017	0.273±0.118	0.260±0.131	0.742±0.550	0.8795	0.5417	0.9846	0.5888	0.242±0.096	0.325±0.157	0.954±0.770	0.9439	0.7910	0.9742	0.7839
CD27 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	0.018±0.005	0.041±0.020	0.063±0.028	0.155±0.109	0.1609	0.3198	0.0717	0.0639	0.059±0.022	0.071±0.032	0.175±0.157	0.7072	0.7197	0.6469	0.4352
CD28 <sup>-</sup>	0.161±0.024	0.321±0.125	0.275±0.127	0.754±0.559	0.9446	0.6510	0.8803	0.7844	0.248±0.093	0.346±0.152	1.006±0.778	0.9146	0.7235	0.7528	0.9935
CD27 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	0.099±0.017	0.256±0.114	0.225±0.118	0.692±0.536	0.8758	0.6130	0.8000	0.6442	0.200±0.090	0.292±0.144	0.914±0.748	0.8687	0.6263	0.8839	0.7644
CD57 <sup>+</sup>	0.092±0.014	0.075±0.010	0.121±0.025	0.092±0.018	0.3943	0.8293	0.1259	0.6203	0.093±0.006	0.110±0.031	0.112±0.021	0.7072	0.7197	0.6469	0.4352
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>H</sub> )	0.151±0.025	0.223±0.081	0.251±0.114	0.693±0.518	0.8240	0.7060	0.7983	0.4810	0.217±0.079	0.296±0.127	0.886±0.727	0.9955	0.9297	0.9679	0.9679
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>H</sub> )	<b>0.122±0.011</b>	<b>0.114±0.023</b>	<b>0.161±0.054</b>	<b>0.049±0.012</b>	<b>0.0122</b>	0.6228	0.6066	<b>0.0008</b>	0.115±0.035	0.127±0.063	0.100±0.082	0.7286	0.5919	0.8250	0.4795
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>EM</sub> )	0.061±0.013	0.055±0.014	0.066±0.013	0.029±0.008	0.1418	0.8363	0.3276	0.0856	0.039±0.007	0.058±0.018	0.071±0.012	0.0800	0.3067	<b>0.0238</b>	0.1449
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>EM</sub> )	0.148±0.027	0.113±0.020	0.142±0.028	0.550±0.381	0.9308	0.7383	0.8098	0.7063	0.190±0.049	0.137±0.028	0.651±0.542	0.8974	0.9646	0.6864	0.7161
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (T <sub>EM</sub> )	0.113±0.018	0.278±0.117	0.250±0.134	0.326±0.172	0.6540	0.4182	0.8523	0.2829	0.179±0.058	0.330±0.163	0.439±0.247	0.8532	0.9291	0.6737	0.6161
B cells	0.205±0.031	0.161±0.029	0.404±0.140	0.346±0.152	0.6175	0.6785	0.3014	0.6938	0.390±0.092	0.268±0.152	0.400±0.189	0.0788	<b>0.0272</b>	0.5834	0.1164
Transitional	0.0059±0.0011	0.0083±0.0025	0.0098±0.0040	0.0077±0.0026	0.7563	0.4028	0.4090	0.5974	0.0094±0.0026	0.0107±0.0047	0.0079±0.0016	0.7880	0.8234	0.6606	0.5221
Naive	0.1137±0.0188	0.0851±0.0141	0.3109±0.1232	0.2549±0.1121	0.2718	0.6079	0.1213	0.3703	0.2930±0.0986	0.1983±0.1234	0.2671±0.1370	0.2257	0.1056	0.7251	0.2446
Marginal Zone	0.0250±0.0041	0.0172±0.0033	0.0210±0.0037	0.0173±0.0065	0.5601	0.4021	0.7846	0.2033	0.0225±0.0029	0.0163±0.0044	0.0235±0.0069	0.2327	0.1158	0.8057	0.2229
Class-non-switched memory	<b>0.0072±0.0011</b>	<b>0.0038±0.0016</b>	<b>0.0031±0.0013</b>	<b>0.0041±0.0026</b>	<b>0.0152</b>	<b>0.0484</b>	<b>0.0074</b>	<b>0.0067</b>	0.0048±0.0019	0.0018±0.0004	0.0060±0.0033	-0.3962	0.3824	0.6294	0.2081
Class-switched memory	0.0351±0.0085	0.0255±0.0110	0.0261±0.0094	0.0258±0.0150	0.3169	0.3169	0.3442	0.1398	0.0322±0.0114	0.00367±0.0188	0.0367±0.0188	0.3436	0.3543	0.5850	0.1725
Plasmablasts	0.0028±0.0012	0.0033±0.0012	0.0045±0.0019	0.0079±0.0062	0.7002	0.6156	0.2683	0.8754	0.0041±0.0011	0.0040±0.0023	0.0109±0.0086	0.6407	0.3958	0.8754	0.5329
CD21 <sup>low</sup> CD38 <sup>low</sup>	0.0159±0.0024	0.0229±0.0038	0.0283±0.0080	0.0437±0.0228	0.3293	0.1836	0.1289	0.3093	0.0290±0.0034	0.0230±0.0090	0.0600±0.0295	0.1495	0.0967	0.8776	0.0963

Suppl. Table 5: PCR statistics

HC versus Ix groups (0=HC, 1=ITx1, 2=ITx2, 3=ITx3)

	Group 1	Group 2	nr_TOAG	nr_CD79B	nr_CD200	nr_CD3	nr_CD274	nr_CXCL10	nr_FOXL1	nr_FOXL2	nr_HMMR	nr_HSS3T1	nr_LAG3	nr_aMann	nr_MS4A1	nr_NAV3	nr_PNOC	nr_SH2D1B	nr_SLC6A1	nr_TCLLA	nr_TIRS	nr_TOR1D
Kruskal-Wallis-Test			0.006912896	0.007259904	0.051327885	0.001422932	0.0001262	0.989880728	0.014553899	0.116241109	0.22980212	0.00418676	0.35096466	0.000833333	0.023212252	0.095524154	0.949534067	0.004363819	2.79968E-06	0.029486177	1.6223E-05	0.068805493
post-hoc test after Conover	1	0	0.038303329	0.29457875	0.236170061	0.004716779	0.003256784	0.901573066	0.295132774	0.080543317	0.528636766	0.025212668	0.397839554	0.015434984	0.617412091	0.716506787	0.632076948	0.039453217	6.104E-06	0.833222311	2.00627E-05	0.738351365
post-hoc test after Conover	2	0	0.006542289	0.000283086	0.049174814	0.000404915	4.48292E-06	0.793576828	0.000858649	0.416741837	0.092760441	0.000197197	0.149348907	9.61338E-05	0.00415493	0.13401109	0.685266346	0.000462481	1.36221E-09	0.00403883	2.37402E-07	0.154920079
post-hoc test after Conover	3	0	0.032950882	0.25675768	0.416553	0.00070443	4.04E-05	0.947542174	0.464118292	0.279547476	0.978241171	0.084052046	0.159812101	0.000331562	0.934815634	0.037686869	0.752515988	0.006840955	2.3402E-10	0.932857818	1.93462E-07	0.071274892
post-hoc test after Conover	2	1	0.26361353	0.029218675	0.011271059	0.6252587555	0.132389884	0.989441679	0.589441679	0.031992869	0.061611036	0.218584317	0.678376173	0.24351518	0.007109999	0.132695498	0.920689897	0.241078606	0.076603742	0.012238351	0.454447651	0.155946396
post-hoc test after Conover	3	1	0.964340865	0.88203501	0.717071904	0.672542523	0.278240774	0.871731162	0.758541766	0.519817094	0.575414256	0.57795905	0.670462134	0.303231026	0.622520598	0.045152523	0.877117827	0.622826521	0.014011916	0.534275355	0.288659629	0.235548929
post-hoc test after Conover	3	2	0.22546094	0.024626745	0.021530773	0.98762555	0.674016691	0.873071118	0.022758478	0.111367988	0.16790333	0.064346771	0.980247747	0.845269991	0.019357983	0.498538452	0.950391934	0.481661816	0.385523734	0.044511927	0.714065905	0.007940502

noIR versus rejection groups (0=noIR, 1=AR1, 2=AR2)

	Var1	Var2	nr_TOAG	nr_CD79B	nr_CD200	nr_CD3	nr_CD274	nr_CXCL10	nr_FOXL1	nr_FOXL2	nr_HMMR	nr_HSS3T1	nr_LAG3	nr_aMann	nr_MS4A1	nr_NAV3	nr_PNOC	nr_SH2D1B	nr_SLC6A1	nr_TCLLA	nr_TIRS	nr_TOR1D
Kruskal-Wallis-Test			0.648506854	0.597927533	0.878161456	0.718761588	0.788048621	0.540945854	0.66270285	0.458612858	0.985667611	0.81963853	0.908791942	0.31057035	0.941189486	0.429767344	0.111639405	0.513365651	0.224847963	0.809670569	0.031030885	0.668709185
post-hoc test after Conover	1	0	0.44651557	0.393901197	0.658012762	0.449311222	0.82336772	0.322649586	0.39668316	0.240811148	0.894731307	0.69030068	0.69072935	0.213320415	0.757217384	0.926215815	0.041707476	0.280561308	0.472744217	0.964419343	0.575979963	0.755939593
post-hoc test after Conover	2	0	0.967099649	0.433523157	0.961204829	0.670702421	0.522048975	0.424211546	0.754589454	0.699154483	0.987146704	0.916238842	0.916238842	0.198666028	0.948494094	0.353263042	0.164464894	0.511679565	0.283440498	0.576049614	0.007870493	0.401676341
post-hoc test after Conover	2	1	0.465723293	1	0.721844461	0.78693293	0.660569223	0.887314188	0.639800414	0.482786771	0.891114638	0.570861842	0.795901718	0.876621104	0.827533857	0.287916521	0.580677188	0.73213016	0.093865095	0.603756275	0.033011255	0.577406795

**Suppl. Table 6: Information on parameters contributing separation upon cluster analysis**

**HC versus ITx patients**

freq\_BM05\_IgM+ CD27-  
 freq\_BM05\_IgD- IgM+ CD27- CD38dim  
 nr\_HS3ST1  
 nr\_MS4A1  
 nr\_CD79B  
 nr\_TCL1A  
 nr\_FCRL1  
 wbc\_BM02\_CD3+ Vd2+ CD4+ T cells  
 wbc\_BM05\_IgD- IgM+ CD27+ CD38high  
 wbc\_BM05\_IgM+ CD27+ CD38high  
 wbc\_BM05\_IgD- IgM- CD27- CD38high  
 wbc\_BM05\_CD21low CD38high  
 freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6  
 freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6+ CXCR3- CCR10+  
 freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6+ CXCR3+ CCR10-  
 freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6+ CXCR3+ CCR10+  
 freq\_BM02\_CD3+ Vd1+  
 freq\_BM03\_CD4+ CD27- PD1+  
 freq\_BM02\_CD8+ HLA-DR+  
 freq\_BM02\_TCR ab CD8+ T cells  
 freq\_BM01\_CD8+ T cells  
 freq\_BM07\_CD4+CD25-/+CCR4+CCR6-CXCR3+CCR10- (Th1/Th2)  
 freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6+ CXCR3- CCR10-  
 freq\_BM07\_CD4+CD25-/+CCR4+CCR6+CXCR3+CCR10-  
 freq\_BM07\_CD4+CD25-/+CCR4+CCR6+CXCR3-CCR10- (Th22)  
 freq\_BM03\_CD4+ CD27+ CD28-  
 freq\_BM03\_CD4+ CD27+ PD1+  
 freq\_BM03\_CD4+ CCR7- CD45RA-  
 freq\_BM02\_CD4+ HLA-DR+  
 freq\_BM03\_CD4+ CD27-  
 freq\_BM03\_CD4+ CD28-  
 freq\_BM03\_CD4+ CD27- CD28-  
 freq\_BM03\_CD4+ CD57+  
 freq\_BM05\_CD21low CD38high  
 freq\_BM05\_CD21+ CD38high  
 freq\_BM03\_CD8 CCR7- CD45RA-  
 nr\_TOR1D  
 IL-4  
 freq\_BM03\_CD4+ CD27- CD28+  
 freq\_BM03\_CD8+ CD27- CD28+  
 freq\_BM02\_TCR ab CD4- CD8- T cells  
 freq\_BM06\_mDC1  
 freq\_BM06\_pDC in pDCs+mDCs  
 freq\_BM05\_IgD- IgM+ CD27+ CD38high  
 IL-8  
 freq\_BM07\_CD4+ CD25-/+ CCR4- CCR6+ CXCR3+CCR10- (pathogenic Th17)  
 FoxP3dem\_A  
 freq\_BM08\_CD4+ CD25++ FoxP3+  
 freq\_BM08\_CD25++ CD127- AND CD6-  
 freq\_BM08\_CD25++ CD127- OR CD6-  
 freq\_BM08\_CD4+ CD25++ CD127-  
 nr\_TLR5  
 nr\_SLC8A1  
 nr\_aMann  
 nr\_CD274  
 freq\_BM03\_CD8+ CD27- PD1+  
 nr\_SH2D1B  
 nr\_TOAG  
 nr\_CD3  
 freq\_BM01\_CD14high CD16+ Monocytes  
 wbc\_BM01\_CD14high CD16+ Monocytes  
 freq\_BM06\_mDC (TM2)\_in\_LIN-  
 freq\_BM06\_mDC in pDCs+mDCs  
 freq\_BM06\_CD16+ mDC

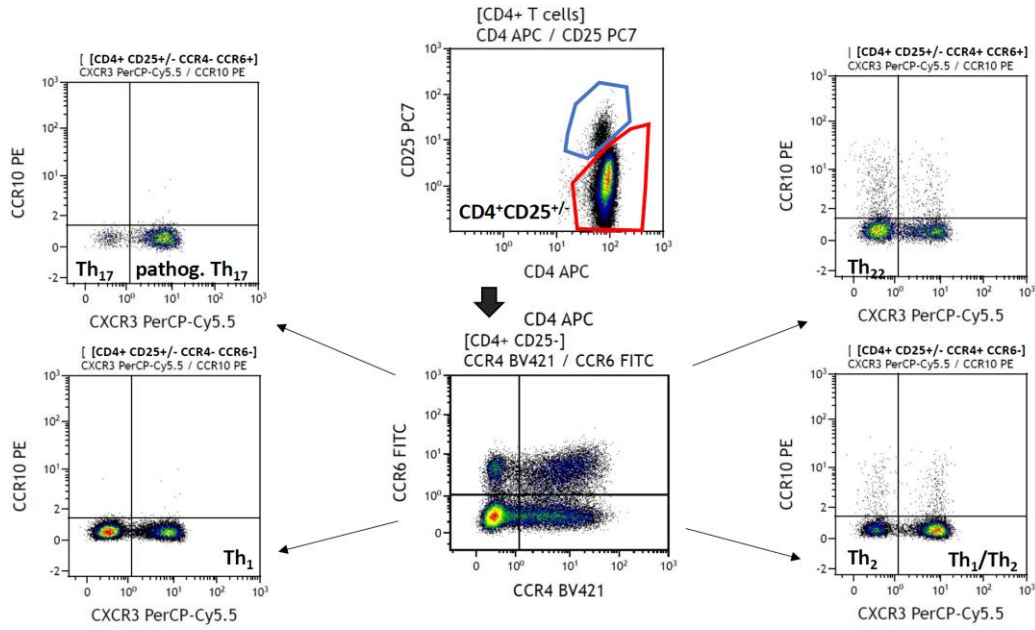
**No rejection & humoral rejection versus cellular rejection**

nr\_TLR5  
 freq\_BM01\_CD14high CD16- Monocytes  
 wbc\_BM06\_CD16+ mDC  
 wbc\_BM06\_mDC wo mDC1  
 freq\_BM01\_CD14+ CD16high Monocytes  
 freq\_BM06\_mDC wo mDC1  
 freq\_BM06\_mDC (TM2)  
 freq\_BM06\_pDCs+mDCs  
 req\_BM06\_LIN-HLA-DR+



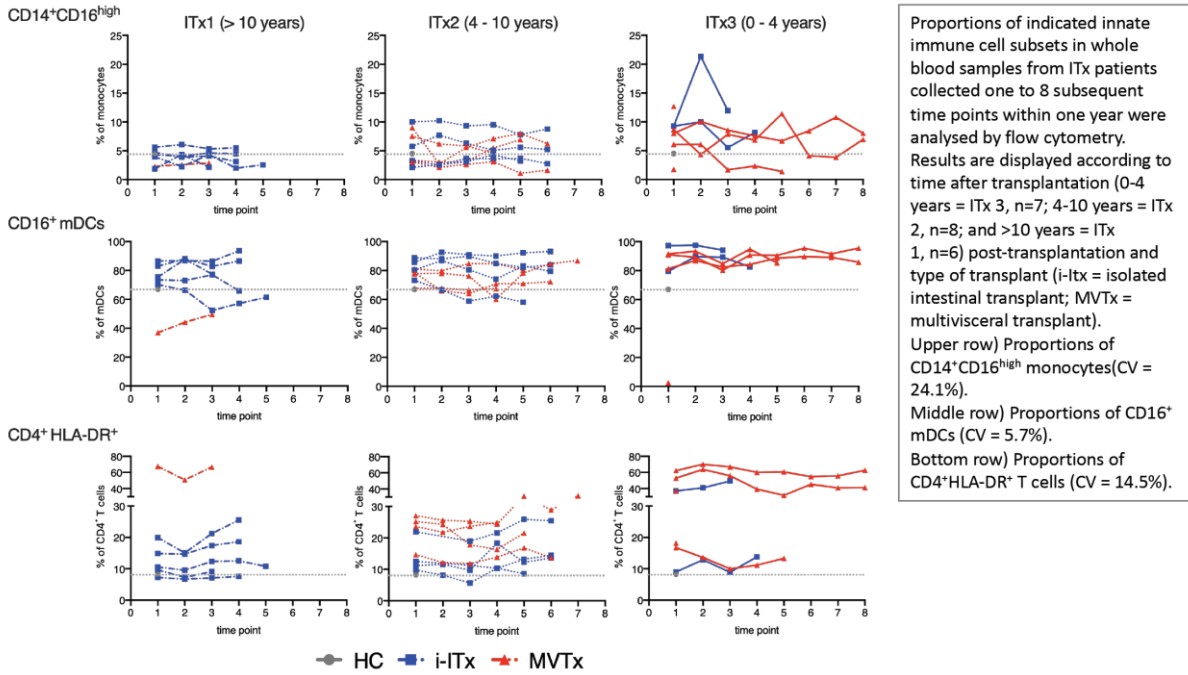
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6- CXCR3- CCR10+  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6+ CXCR3- CCR10+  
wbc\_BM07\_CD8+ CD25- CCR4- CCR6- CXCR3- CCR10+  
freq\_BM07\_CD8+ CD25- CCR4+ CCR6- CXCR3- CCR10+  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6- CXCR3+ CCR10+  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6- CXCR3+ CCR10+  
freq\_BM07\_CD8+ CD25- CCR4- CCR6+ CXCR3+ CCR10+  
freq\_BM07\_CD8+ CD25- CCR4- CCR6+ CXCR3- CCR10+  
wbc\_BM07\_CD8+ CD25- CCR4- CCR6+ CXCR3+ CCR10+  
wbc\_BM07\_CD8+ CD25- CCR4+ CCR6- CXCR3- CCR10+  
wbc\_BM07\_CD8+ CD25- CCR4- CCR6+ CXCR3- CCR10+  
freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6+ CXCR3- CCR10+  
freq\_BM07\_CD8+ CD25- CCR4- CCR6- CXCR3- CCR10+  
freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6- CXCR3+ CCR10+  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6- CXCR3- CCR10+  
freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6- CXCR3- CCR10+  
freq\_BM07\_CD8+ CD25- CCR4- CCR6- CXCR3+ CCR10+  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6- CXCR3- CCR10-  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6- CXCR3+ CCR10-  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6+ CXCR3- CCR10-  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6-  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6- CXCR3- CCR10-  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6+  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6+ CXCR3- CCR10-  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6+ CXCR3+ CCR10+  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6+ CXCR3+ CCR10-  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6- CXCR3- CCR10-  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6+ CXCR3+ CCR10-  
wbc\_BM07\_CD25++CCR4+ (activated/memory Treg)  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4+ CCR6+  
wbc\_BM02\_CD3+ Vd2+ CD8+ T cells  
wbc\_BM02\_CD3+ Vd2+ CD4- CD8- T cells  
wbc\_BM02\_CD3+ Vd2+  
freq\_BM02\_CD3+ Vd2+  
freq\_BM05\_class switched memory B cells  
freq\_BM05\_IgD- CD27+  
freq\_BM07\_CD25++CCR4+ (activated/memory Treg)  
freq\_BM05\_IgM+ CD27+  
freq\_BM05\_IgD- IgM+ CD27+ CD38dim  
freq\_BM05\_class non switched memory B cells  
freq\_BM01\_CD3+ T cells  
freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6- CXCR3+ CCR10-  
freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6- CXCR3- CCR10-  
freq\_BM07\_CD4+ CD25++ CCR4- CCR6-  
freq\_BM03\_CD4+ CD27+  
freq\_BM03\_CD4+ CD27+ CD28+  
freq\_BM03\_CD4+ CD28+  
wbc\_BM03\_CD4+ CCR7+ CD45RA+  
freq\_BM03\_CD4+ CCR7+ CD45RA+  
freq\_BM02\_TCR ab CD4+ T cells  
freq\_BM01\_CD4+ T cells  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25-  
wbc\_BM02\_TCR ab CD4+ T cells  
wbc\_BM01\_CD4+ T cells  
wbc\_BM03\_CD4+ CD28+  
wbc\_BM03\_CD4+ CD27+ CD28+  
wbc\_BM03\_CD4+ CD27+  
wbc\_BM07\_CD4+ CD25-/+ CCR4- CCR6+ CXCR3+CCR10- (pathogenic Th17)  
wbc\_BM05\_class non switched memory B cells  
wbc\_BM03\_CD8 CCR7+ CD45RA+  
freq\_BM05\_CD21+ CD38dim

Suppl. figure 1: Gating strategy chemokine & cytokine panel (panel 7)



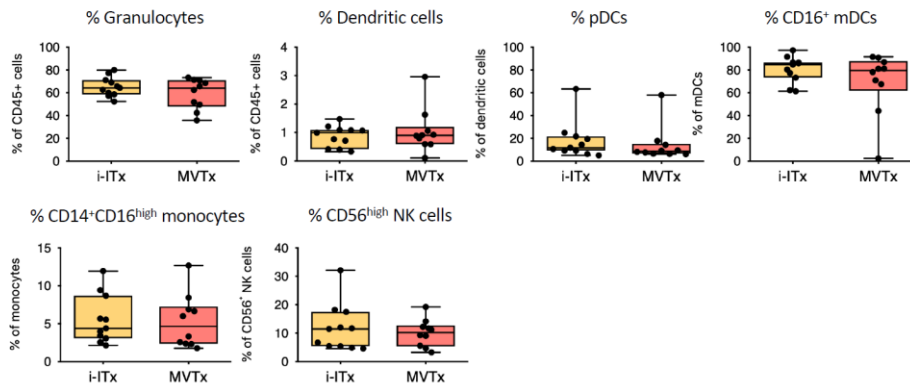
CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were subgated into CD25<sup>+</sup> cells, enriched for regulatory T cells, and CD25<sup>-/+</sup> conventional T helper cells (upper middle dot plot). Subsequently T cells were further subgated according to CCR4 and CCR6 expression as well as CXCR3 and CCR10 expression distinguishing CCR4<sup>-</sup> CCR6<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR10<sup>-</sup> Th17-like cells, CCR4<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR10<sup>-</sup> Th1-like cells, CCR4<sup>-</sup> CCR6<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR10<sup>-</sup> pathogenic Th17-like cells, CCR4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR10<sup>-</sup> Th22-like cells, CCR4<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR10<sup>-</sup> Th2-like cells and CCR4<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR10<sup>-</sup> Th1/Th2-like cells.

Suppl. figure 2: Stability of immune cell subset composition in peripheral blood of ITx patients

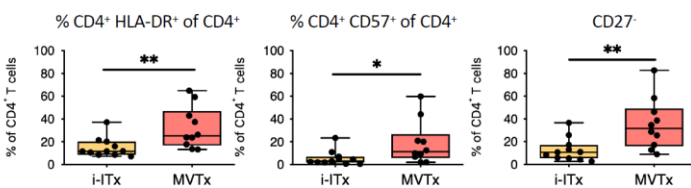


Suppl. figure 3: Differences in immune cell subset composition according to organ type

**A** Innate immune cell subsets



**B** Adaptive immune cell subsets



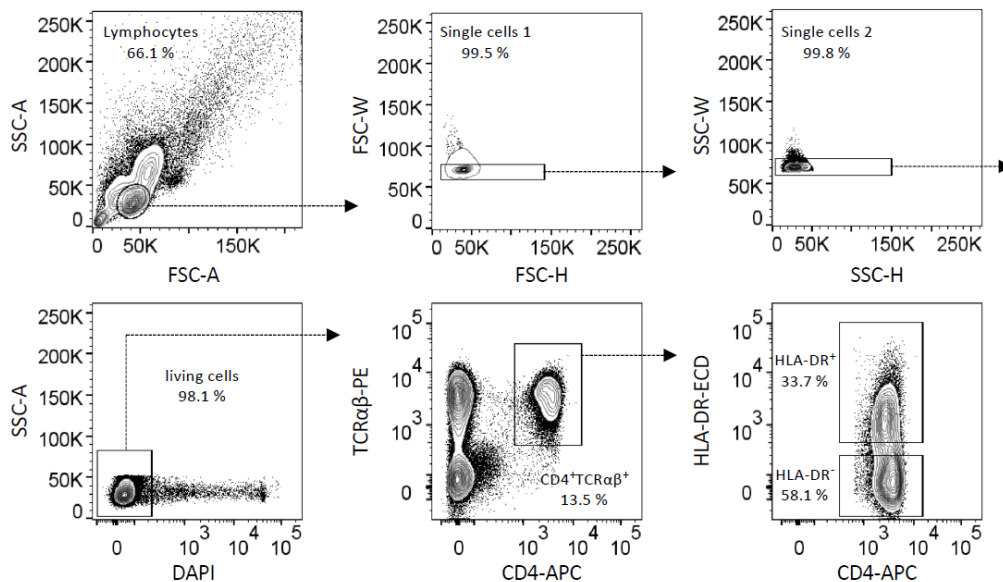
Boxplots showing the median and minimum to maximum of indicated immune cell subsets measured by flow cytometry separating the ITx patients according to type of organ transplant: i-ITx = isolated intestinal transplant; MVTx = multivisceral transplant.

A) Innate immune cells subsets: % of granulocytes of total CD45<sup>+</sup> leukocytes, % LIN<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> dendritic cells of total CD45<sup>+</sup> leukocytes, % CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup> plasmacytoid dendritic cells (pDCs) of dendritic cells, % CD14<sup>+</sup>CD16<sup>high</sup> monocytes of monocytes, CD16<sup>+</sup> myeloid dendritic cells (mDCs), % CD56<sup>high</sup> of CD56<sup>+</sup> NK cells.

B) Activated HLA-DR, CD57 expressing or differentiated CD27- CD4<sup>+</sup> T cells.

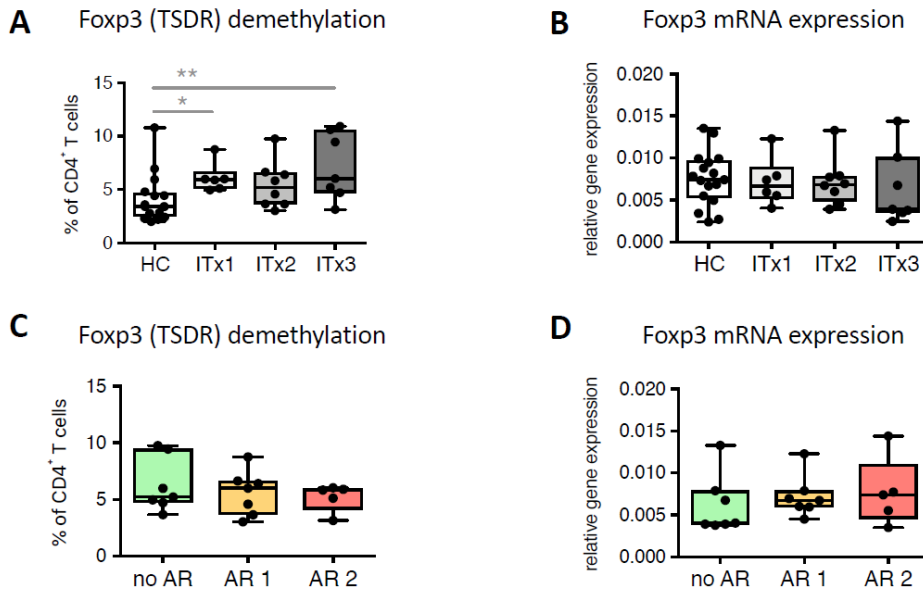
Statistical analysis by Kruskal-Wallis-Test and a Conover post-hoc test. \* p<0.05, \*\* p<0.01

Suppl. figure 4: Gating strategy to enrich cells for chimerism analysis



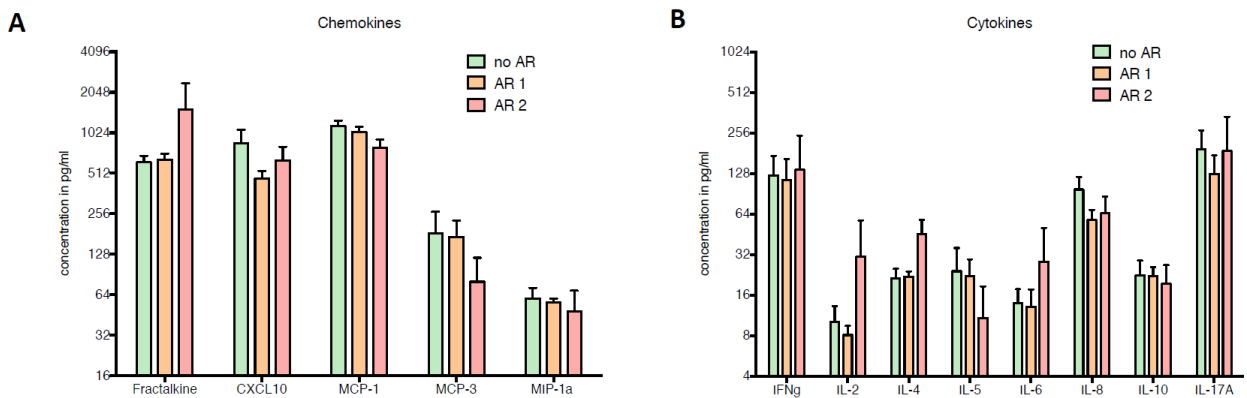
**Exemplary gating strategy for FACS-based isolation of HLA-DR<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells.**  
 Samples were pre-gated on lymphocytes followed by two doublet exclusion gates. Living cells were discriminated from dead cells by viability staining using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). CD4<sup>+</sup> T cells were identified by co-expression of TCRαβ and CD4 and were sorted into HLA-DR<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>-</sup> fractions.

Suppl. figure 5: TSDR demethylation & *Foxp3* mRNA expression



Percentage of CD4+ T cells with demethylation of T reg-specific demethylation region (TSDR, A and C) and *Foxp3* mRNA expression of whole blood samples (B and D) were analysed as described within material and methods. Shown are the results determined according to time after transplantation (A and B, HC: n=, ITx1: n=, ITx2: n=, ITx3: n=) and occurrence of mixed cellular / humoral (AR1) or isolated cellular rejections (C and D, no AR: n=7, AR1: n=7, AR2: n=5). Statistical analysis by Kruskal-Wallis-Test and a Conover post-hoc test. \* p<0.05, \*\* p<0.01

Suppl. figure 6: Serum chemokines & cytokines in association with rejection



Chemokine (A) and cytokine (B) levels in serum samples of transplant patients (Tx, n=18) were measured using the luminex technology. Transplant patients were categorized according to occurrence of humoral / mixed or cellular rejection (no AR: n=7, AR1: n=7, AR2: n=5).



## **6. Curriculum Vitae**

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



## 7. Publikationsliste

- 05/2019 Paper  
**Stobutzki N**, Schlickeiser S, Streitz M, Stanko K, Truong KL, Akyuez L, Vogt K, Appelt C, Pascher A, Blau O, Gerlach UA, Sawitzki B  
Long-term signs of T cell and myeloid cell activation after intestinal transplantation with cellular rejections contributing to further increase of CD16+ cell subsets  
Front Immunol. 2019 May 7;10:866  
DOI: 10.3389/fimmu.2019.00866  
Impact Factor: 6.429
- 05/2019 Paper  
Truong KL, Schlickeiser S, Vogt K, Boës D, Stanko K, Appelt C, Streitz M, Grütz G, **Stobutzki N**, Meisel C, Iwert C, Tomiuk S, Polansky JK, Pascher A, Babel N, Stervbo U, Sauer I, Gerlach U, Sawitzki B  
Killer-like receptors and GPR56 progressive expression defines cytokine production of human CD4+ memory T cells  
Nat Commun. 2019; 10: 2263.  
DOI: 10.1038/s41467-019-10018-1  
Impact Factor: 12.121
- 06/2016: Paper  
Kverneland AH, Streitz M, Geissler E, Hutchinson J, Vogt K, Boës D, **Niemann N**, Pedersen AE, Schlickeiser S, Sawitzki B  
Age and Gender Leucocytes Variances and References Values Generated Using the Standardized ONE-Study Protocol.  
Cytometry Part A \_ 89A: 543\_564, 2016;  
DOI: 10.1002/cyto.a.22855  
Impact Factor: 3.124
- 06/2015: Review  
**Niemann N**, Sawitzki B.  
Treg Therapy in Transplantation: How and when will we do it? Current  
Transplantation Report (2015) 2:233–241,  
Springer-Verlag  
DOI10.1007/s40472-015-0066-5

## 8. Danksagung

Ich danke insbesondere Frau Prof. Dr. Birgit Sawitzki für ihre Geduld, ihre fortwährende Unterstützung und Motivation zu jeder Zeit, ihre Passion für dieses Forschungsthema und die Immunologie im Allgemeinen sowie für die vielen Erfahrungen und Möglichkeiten, die sie mir eröffnet hat.

Ich danke Undine Gerlach für die Unterstützung und die stetige Verbindung zur Klinik sowie das Einbringen eigener Erfahrungen in diesem Forschungsgebiet.

Ich danke dem fantastischen Team bestehend aus Stephan Schlickeiser, Katharina Stanko, Katrin Vogt, Stefanie Ahrlich, Christine Appelt, Kim Troung, David Boes, Julia Schuhmann, Levent Akyuez und Mathias Streitz.

Sie haben mich nicht nur umfangreich und allzeit unterstützt, sondern mich in ihrer Gemeinschaft aufgenommen und jeden Forschungstag zu einem besonderen gemacht.

Ich danke meiner Patentante Elke Pfeil und ihrem Mann Lutz Pfeil sowie meinen Großeltern Hans und Inge Niemann für ihre finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglicht hat für die zeitintensive Forschungsarbeit mein Studium zu reduzieren und zu verlängern.

Zuletzt danke ich meinem Mann Richard, der alle Hochs und Tiefs mitgetragen hat und mich immer uneingeschränkt unterstützt hat sowie meinem Sohn Leonard, der an endlosen Wochenenden viele Stunden lieb im Kinderwagen geschlafen oder gespielt hat, während ich Auswertungen im Institut erledigt habe.