Aus der Zentralabteilung Transfusionsmedizin (Priv.-Doz. Dr. med. J. Riggert) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Modifikation und Analyse der allogenen extrakorporalen Photopherese im Mausmodell der *Graft-versus-Host Disease*

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Miriam Machill

aus Flörsheim am Main

Göttingen 2022

Dekan:

Prof. Dr. med. W. Brück

# Betreuungsausschuss

Betreuer:	Prof. Dr. med. T. J. Legler
Ko-Betreuer:	Prof. Dr. med. R. Dressel

# Prüfungskommission

Referent:	Prof. Dr. med. T. J. Legler
Ko-Referent*in:	Prof. Dr. med. R. Dressel
Drittreferent*in:	Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 16.02.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Modifikation und Analyse der extrakorporalen Photopherese im Mausmodell der *Graft-versus-Host Disease*" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 28.06.2022 .....

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis III			
Tabel	llenverzeichnis	IV	
Abkü	rzungsverzeichnis	V	
1 Ein	leitung	1	
1.1	<ul> <li>Graft-versus-Host Disease (GvHD) bei allogener Stammzelltransplantation (HSCT)</li> <li>1.1.1 Akute GvHD (aGvHD) – Klinik</li> <li>1.1.2 Akute GvHD (aGvHD) – Pathophysiologie</li></ul>	1 3 5 6 7 8 8 9	
	1.2.3 Modifikation der ECP im Mausmodell	10	
1.3	Fragestellung der Arbeit	11	
2 Ma	terial und Methoden	12	
2.1	Ethischer Rahmen	12	
2.2	Versuchstiere. Reagenzien und Arbeitsmaterialien	12	
2.3	Allgemeine Informationen zu den Tierversuchsbedingungen         2.3.1 Tierdaten         2.3.2 Tierhaltung und Beurteilungskriterien         2.3.3 Vorzeitiger Versuchsabbruch	17 17 17 17	
2.4	<ul><li>2.3.4 Einschläferungsverfahren</li><li>2.3.5 Injektionsverfahren</li><li>Allgemeine Informationen zu den Versuchsbedingungen</li></ul>	19 19 19	
2.5	<ul> <li>Induktion der aGvHD im Mausmodell.</li> <li>2.5.1 Konditionierung der Empfängertiere.</li> <li>2.5.2 Gewebeaufbereitung zur Gewinnung der Spenderzellen.</li> <li>2.5.3 Aufreinigung der Spenderzellen .</li> <li>2.5.4 Qualitätskontrolle des Transplantats .</li> <li>2.5.5 Transplantation .</li> </ul>	19 20 21 22 22	
2.6	Versuchsablauf mit allogener ECP im Mausmodell der GvHD	22	
2.7	<ul><li>Vorbereitung und Durchführung einer ECP</li><li>2.7.1 Isolation der Spendersplenozyten</li><li>2.7.2 Apoptoseinduktion mittels 8-MOP und UV-A-Strahlung</li></ul>	24 24 24	
2.8	<ul><li>Färbungen und Durchflusszytometrie</li><li>2.8.1 Erythrozytenlyse</li><li>2.8.2 Färbung der T-Zellen</li></ul>	24 25 25	

		2.8.3	Färbung der NK- und NK-T-Zellen	26
		2.8.4	Färbung regulatorischer T-Zellen	26
		2.8.5	Chimärismusfärbung	27
	2.9	Mixed	l lymphocyte reaction (MLR)	27
		2.9.1	Versuchsaufbau der MLR	27
		2.9.2	Durchführung der MLR	28
		2.9.3	Interleukinfärbung	29
	2.10	) Statis	tik und Softwareprogramme	30
3	Erg	ebnis	se	32
	3.1	Vergl der So	eich der allogenen ECP im Mausmodell der aGvHD anhand des Überlebens, core- und Gewichtsverläufe	32
	3.2	Vergl Zellp	eich der allogenen ECP im Mausmodell der aGvHD anhand verschiedener opulationen	37
		3.2.1	Population der T-Helferzellen im Vergleich	37
		3.2.2	Population der zytotoxischen T-Zellen im Vergleich	39
		3.2.3	CD4/CD8-Quotient	41
		3.2.4	Population der NK-Zellen im Vergleich	41
		3.2.5	Population der NK-T-Zellen im Vergleich	43
		3.2.6	Population der regulatorischen T-Zellen im Vergleich	45
	3.3	Vergl	eich der allogenen ECP in der MLR anhand verschiedener Zytokine	46
4	Dis	kussio	on	48
	4.1	Allog	ene ECP verschiedener genetischer Hintergründe im Vergleich	48
		4.1.1	Bedeutung von MHC und miHA	48
		4.1.2	Bedeutung von Monozyten und DC in der ECP	50
	4.2	Ausw	irkung der allogenen ECP auf spezifische Zellpopulationen	52
		4.2.1	T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen	52
		4.2.2	Regulatorische T-Zellen und NK-T-Zellen	53
		4.2.3	NK-Zellen	53
	4.3	MLR	als Modell zur Untersuchung der Zytokinmuster bei der ECP	56
		4.3.1	MLR zur Untersuchung der ECP in der Literatur	56
		4.3.2	Bedeutung des IL-2 in der GvHD und der ECP	57
		4.3.3	Relevanz spezifischer Zellpopulationen in der MLR	58
	4.4	Stärke	en und Schwächen der Arbeit	59
5	Zus	amm	enfassung	62
6	Lite	eratur	verzeichnis	64

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Kaplan-Meier-Kurve der drei Versuchsgruppen	3
Abbildung 2:	Mittelwerte des Scores im Zeitverlauf	3
Abbildung 3:	Mittelwerte und SD im Score am Tag 14, 26 und im gesamten Zeitverlauf34	1
Abbildung 4:	Mittelwerte des Gewichts im Zeitverlauf	5
Abbildung 5:	Mittelwerte und SD im Gewicht am Tag 29, 38 und im gesamten Zeitverlauf.30	5
Abbildung 6:	Anteil der Splenozyten mit Spenderstammursprung C57BL/6 im Vergleich37	7
Abbildung 7:	Mittelwerte der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Zellen (T-Helferzellen)	3
Abbildung 8:	Mittelwerte der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Zellen (T-Helferzellen) im Vergleich zwischen überlebenden und im Verlauf verstorbenen Versuchstieren	)
Abbildung 9:	Mittelwerte der CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Zellen (zytotoxische T-Zellen)40	)
Abbildung 10:	Mittelwerte der CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Zellen (zytotoxische T-Zellen) im Vergleich zwischen überlebenden und im Verlauf verstorbenen Versuchstieren	)
Abbildung 11:	Mittelwerte der CD4/CD8-Quotienten	l
Abbildung 12:	Mittelwerte der CD3 <sup>-</sup> CD49b <sup>+</sup> Zellen (NK-Zellen)42	2
Abbildung 13:	Mittelwerte der CD3 <sup>-</sup> CD49b <sup>+</sup> Zellen (NK-Zellen) im Vergleich zwischen überlebenden und im Verlauf verstorbenen Versuchstieren	3
Abbildung 14:	Mittelwerte der CD3+ CD49b+ Zellen (NK-T-Zellen)	1
Abbildung 15:	Mittelwerte der CD3 <sup>+</sup> CD49b <sup>+</sup> Zellen (NK-T-Zellen) im Vergleich zwischen überlebenden und im Verlauf verstorbenen Versuchstieren	1
Abbildung 16:	Mittelwerte der CD4+ CD25+ FoxP3+ Zellen (regulatorische T-Zellen)45	5
Abbildung 17:	Mittelwerte der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> Zellen (regulatorische T-Zellen) im Vergleich zwischen überlebenden und im Verlauf verstorbenen Versuchstieren 40	5
Abbildung 18:	Mittelwerte der IL-2- (A), IL-10- (B) und TNF-α- (C) bildenden Zellen im Vergleich	7

# Tabellenverzeichnis

Organstadien der aGvHD nach Harris et al. (2016)
Klinische Grade der aGvHD nach Harris et al. (2016)4
Schweregrade der cGvHD nach dem Konsens des NIH6
Mausstämme
Reagenzien, Lösungen, Medien und Kits12
Antikörper14
Laborgeräte15
Verbrauchsmaterial
Softwareprogramme17
Beurteilungskriterien zur Tierverfassung
Versuchsabbruchskriterien
Färbung der Qualitätskontrolle
Ablauf einer Versuchsreihe
T-Zellfärbung25
NK- und NK-T-Zellfärbung26
Regulatorische T-Zellfärbung
Chimärismusfärbung27
Interleukinfärbung, Schritt 1
Interleukinfärbung, Schritt 2

# Abkürzungsverzeichnis

8-MOP	8-Methoxypsoralen
aGvHD	akute Graft-versus-Host Disease
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle(n)
CD	cluster of differentiation
cGvHD	chronische Graft-versus-Host Disease
CTCL	kutane(s) T-Zell-Lymphom(e)
DC	dendritische Zelle(n)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECP	extrakorporale Photopherese
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GIT	Gastrointestinaltrakt
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvT	Graft-versus-Tumor-Effekt
HLA	humane(s) Leukozytenantigen(e)
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IL	Interleukin
IFN-γ	Interferon-y
МНС	Haupthistokompatibilitätskomplex(e)
MMF	Mycophenolat Mofetil
miHA	Nebenhistokompatibilitätskomplex(e)
MLR	mixed lymphocyte reaction(s)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	phosphat-buffererd saline
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
$T_{\rm H}$ 1-Zellen	T-Helferzellen Typ 1
T <sub>H</sub> 2-Zellen	T-Helferzellen Typ 2
TNF	Tumornekrosefaktor
UV-A-Strahlung	Ultraviolett-A-Strahlung

# 1 Einleitung

# 1.1 *Graft-versus-Host Disease* (GvHD) bei allogener Stammzelltransplantation (HSCT)

Bei einer Therapie mittels hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) wird das bisherige hämatopoetische System der Patient\*innen durch ein neues ersetzt. Dies geschieht, indem die hämatopoetischen Stammzellen der Patient\*innen durch eine sogenannte Konditionierung, bestehend aus einer Chemotherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung, zerstört werden und anschließend neue hämatopoetische Stammzellen implantiert werden (Bazinet und Popradi 2019; Travnik et al. 2011a). Je nach Grunderkrankung können diese Zellen von den Patient\*innen selbst zuvor gewonnene autologe Stammzellen sein oder allogene Stammzellen eines\*einer Spender\*in, die aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut oder aus Nabelschnurblut gewonnen werden können (Gratwohl und Niederwieser 2012). Die Anwendung der Stammzelltransplantation ist in den letzten 20 Jahren stark gestiegen (González et al. 2021; Passweg et al. 2019). Demnach wurde beispielsweise im Jahr 2018 aus 721 Zentren in 43 europäischen und 9 weiteren, überwiegend arabischen Staaten von knapp 47 500 Stammzelltransplantationen berichtet, bei denen es sich in 59% der Fälle um autologe und bei 41% um allogene Verfahren handelte (Passweg et al. 2020). Die Indikationen sind vielfältig und umfassen sowohl maligne Erkrankungen des myeloischen und des lymphatischen Systems, wie beispielsweise die akute myeloische Leukämie (AML), die akute lymphatische Leukämie (ALL), das myeloische dysplastische Syndrom (MDS) oder ein Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), als auch nicht-maligne erworbene oder angeborene Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, etwa eine Knochenmarkinsuffizienz (BMF), eine Thalassämie oder die Sichelzellkrankheit (Bazinet und Popradi 2019; Barriga et al. 2012; Passweg et al. 2020). Mit steigender Zahl der durchgeführten Behandlungen steigt aber auch die Anzahl der Patient\*innen, die auf Grund von schwerwiegenden bis hin zu potenziell tödlichen Nebenwirkungen behandelt werden müssen. Trotz großer Fortschritte und weitreichender Präventionsmaßnahmen stellt die Graft-versus-Host Disease (GvHD) eine Hauptkomplikation der allogenen HSCT dar (Bosi et al. 2005; Lee et al. 2002; Wolf et al. 2012), die neben einem Wiederauftreten der Grunderkrankung Hauptursache für die nach wie vor ernstzunehmende Morbidität und Mortalität dieser Therapie ist (Teshima und Hill 2021; Travnik et al. 2011a; Wolf et al. 2012).

Die GvHD, eine Erkrankung mit variierender Ausprägung von Alloreaktivität, Autoimmunität und Immundefizienz (Travnik et al. 2011a), kann grundsätzlich jedes Gewebe betreffen und wird in eine akute und eine chronische Form eingeteilt. Früher geschah dies anhand des Zeitpunkts des Auftretens nach HSCT, doch auf Grund des besseren Verständnisses der Pathomechanismen wird dies heutzutage auf Basis der vorherrschenden Symptomkomplexe vorgenommen (Filipovich et al. 2005; Jagasia et al. 2015). Die Grundlage der Pathophysiologie stellt die fehlende Übereinstimmung der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) und/oder Nebenhistokompatibilitätskomplexe (miHA) zwischen Spender\*in und Empfänger\*in dar, wodurch immunkompetente Zellen des neu implantierten Immunsystems das Gewebe des\*der Empfänger\*in als fremd erkennen (Ferrara und Deeg 1991; MacDonald et al. 2013). Etwas allgemeingültiger formulierte Billingham bereits 1966 die Grundvoraussetzungen zur Entstehung einer GvHD. Demnach muss erstens das Transplantat immunkompetente Zellen enthalten, zweitens muss der Empfängerorganismus<sup>1</sup> Gewebeantigene präsentieren, welche nicht im Spenderorganismus vorkommen, und drittens muss der Empfängerorganismus unfähig sein, die immunkompetenten fremden Zellen zu zerstören (Ferrara und Deeg 1991; Gratwohl und Niederwieser 2012). Im Rahmen einer HSCT wird der letzte Punkt spätestens durch die Konditionierung erfüllt, grundsätzlich können diese drei Punkte aber auch beispielsweise eine solide Organtransplantation aufweisen (Ferrara und Deeg 1991).

Die allogene Stammzelltransplantation wird nach Möglichkeit mit Zellen von Spender\*innen durchgeführt, die im gesamten humanen Leukozytenantigen(HLA)-System mit denen des\*der Empfänger\*in übereinstimmen. Allerdings findet sich nur in ungefähr 30% der Fälle ein\*eine HLA-identische\*r Spender\*in, sodass in den restlichen Fällen mit einer bestehenden HLA-Inkompatibilität transplantiert wird, obwohl bereits eine fehlende Übereinstimmung in einem HLA-Genlokus zu einem signifikant schlechteren Überleben als bei einem vollständig übereinstimmenden Transplantat führt (Loiseau et al. 2007). Doch selbst bei HLAidentischer allogener HSCT, bei denen die durch das HLA-System kodierten MHC (Klasse-I und -II) bei Spender\*in und Empfänger\*in identisch sind, kommt es im Durchschnitt bei 40% der Fälle auf Grund von fehlender Übereinstimmung in den miHA zu einer akuten GvHD (aGvHD) (Ferrara et al. 2009; Jagasia et al. 2015). Besteht eine HLA-Inkompatibilität bei der HSCT, so tritt eine aGvHD mit einer Wahrscheinlichkeit von 60% bis 80% auf (Ferrara et al. 2009; Travnik et al. 2011a). Bei der chronischen GvHD (cGvHD) liegt die Rate bei 35% bis 45% (Arai et al. 2015; Axt et al. 2019). Dieser Problematik Rechnung tragend, wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Therapie der GvHD mittels extrakorporaler Photopherese (ECP) vorgenommen, um zur Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten dieser schwerwiegenden Komplikation der allogenen HSCT beizutragen.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Bei Begriffen wie "Empfängerorganismus" oder "Spender-T-Zellen", bei denen die sprachliche Unterscheidung zwischen dem biologischen oder sozialen Geschlecht nicht sachdienlich ist und/oder sich die Termini nicht ausschließlich auf den Menschen beziehen, wird von einer gegenderten Ausdrucksform abgesehen.

### 1.1.1 Akute GvHD (aGvHD) – Klinik

Wie bereits beschrieben, wird die aGvHD nicht mehr anhand ihres zeitlichen Auftretens definiert, dennoch tritt sie in den meisten Fällen innerhalb der ersten 100 Tage nach HSCT auf und wird dann als klassische aGvHD bezeichnet. Weitere Formen der aGvHD sind persistierende, rekurrierende oder *late-onset* aGvHD (Filipovich et al. 2005; Jagasia et al. 2015). Obwohl die Zahl der an einer mittleren bis schweren aGvHD erkrankenden Patient\*innen in den letzten Jahrzehnten deutlich abgenommen hat und sich die Behandlungsoptionen gebessert haben, bleibt die aGvHD maßgeblich für die Morbidität und Mortalität einer allogenen HSCT (Gooley et al. 2010; Hülsdünker und Zeiser 2015; Messina et al. 2008).

Stadium	Haut	oberer GIT	unterer GIT	Leber
	(klinisches Bild)	(Beschwerden)	(Stuhl pro Tag <sup>1</sup> E <sup>2</sup> : [ml/d] K <sup>3</sup> : [ml/kg/d])	(Bilirubin [mg/dl])
0	kein frisches Erythem/ Exanthem	keine oder intermittierende Übelkeit, Erbrechen oder Anorexie <sup>4</sup>	E: < 500 oder < 3 x/d K: < 10 oder < 4 x/d	< 2
1	makulopapuläres Exanthem < 25% KOF <sup>5</sup>	persistierende Übelkeit, Erbrechen oder Anorexie	E: 500 – 999 oder 3 – 4 x/d K: 10 – 19,9 oder 4 – 6 x/d	2-3
2	makulopapuläres Exanthem 25 – 50% KOF	/	E: 1000 – 1500 oder 5 – 7 x/d K: 20 – 30 oder 7 – 10 x/d	3,1 – 6
3	generalisiertes makulopapuläres Exanthem (> 50% KOF)	/	E: > 1500 oder > 7 x/d K: > 30 oder > 10 x/d	6,1 – 15
4	generalisiertes Exanthem (> 50% KOF) mit Blasenbildung und Desquamation (> 5% KOF)	/	starke Abdominal- schmerzen mit oder ohne Ileus oder blutiger Stuhl	> 15

Tabelle 1: Organstadien der aGvHD nach Harris et al. (2016)

<sup>1</sup> Ausgeschlossen geformter oder fast geformter Stuhl; Diarrhö ab einem Durchschnittsvolumen von 200 ml pro Stuhlgang. <sup>2</sup> E = Erwachsene. <sup>3</sup> K = Kinder. <sup>4</sup> Bei histologisch gesicherten Zeichen einer GvHD des oberen GIT; ohne histologische Sicherung bei Übelkeit  $\geq$  3 Tagen, Erbrechen  $\geq$  2 x/d über mindestens zwei Tage. <sup>5</sup> KOF = Körperoberfläche, berechnet nach der 9er-Regel. Die akute Form der GvHD zeigt sich hauptsächlich in den drei Organen Haut, Gastrointestinaltrakt (GIT) und Leber (Ferrara et al. 2009; Harris et al. 2016; Travnik et al. 2011a). So gehören makulopapulöse Exantheme, Erythrodermie, Übelkeit, Erbrechen, Abdominalschmerzen, wässrige oder blutige Stühle sowie Hyperbilirubinämie zu wichtigen Symptomen einer aGvHD (Harris et al. 2016; Travnik et al. 2011a). Je nach Ausprägung und Ausmaß erfolgt die Einteilung in klinische Stadien und Grade, welche vom Mount Sinai Acute GvHD International Consortium (MAGIC) in dem Versuch, die Klassifizierung international zu vereinheitlichen, definiert wurden (s. Tabelle 1 und Tabelle 2). Dabei stellt die Haut das am häufigsten betroffene Organ dar, die Beteiligung des unteren GIT besitzt jedoch die stärkste Korrelation mit der remissionsfreien Mortalität (Harris et al. 2016). Die Gradeinteilung des klinischen Erscheinungsbilds stellt demnach einen wichtigen Prognosefaktor dar, denn vor allem Grad III und Grad IV sind mit einer erheblichen Mortalität (ca. 50%) verbunden (Travnik et al. 2011a).

Grad	Haut	oberer GIT	unterer GIT	Leber
0	Stadium 0	Stadium 0	Stadium 0	Stadium 0
Ι	Stadium 1 – 2	Stadium 0	Stadium 0	Stadium 0
тт	Stadium 3	Stadium 0 – 1	Stadium 0 – 1	Stadium 0 – 1
11	Stadium 0	Stadium 0 – 1	Stadium 0 – 1	Stadium 0 – 1
TTT	Stadium $0 - 3$	Stadium 0 – 1	Stadium 2 – 3	Stadium $0 - 3$
111	Stadium $0 - 3$	Stadium 0 – 1	Stadium $0 - 3$	Stadium 2 – 3
IV	Stadium 4	Stadium 0 – 1	Stadium 0 – 4	Stadium 0 – 4

Tabelle 2: Klinische Grade der aGvHD nach Harris et al. (2016)

# 1.1.2 Akute GvHD (aGvHD) – Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der aGvHD kann in drei Phasen gegliedert werden, die Konditionierungs-, Aktivierungs- und Effektorphase (Ferrara et al. 2003). Diesem Ablauf liegen zwei Prinzipien zu Grunde, die auch im gesunden Organismus zentrale Funktionsweisen des Immunsystems darstellen: erstens die Einleitung einer Entzündungsreaktion durch T-Lymphozyten bei der Erkennung fremder Gewebe und zweitens eine gesteigerte Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) bei Gewebeschädigung (Ferrara et al. 2009).

Die Konditionierungsphase umfasst jegliche Behandlungen der Patient\*innen vor der eigentlichen Transplantation, die zu Zell- und Gewebsschädigungen in den verschiedenen Organen führen. Dazu zählen hauptsächlich die konditionierende Chemotherapie und/oder Radiotherapie (Hülsdünker und Zeiser 2015; MacDonald et al. 2013). Dadurch werden proinflammatorische Zytokine, beispielsweise Interleukin(IL)-1, IL-6 und Tumornekrose-faktor(TNF)- $\alpha$ , sowie Chemokine freigesetzt (Ferrara et al. 2009; Hülsdünker und Zeiser 2015; Xun et al. 1994). Zudem werden sowohl vermehrt kostimulatorische Signale als auch

MHC-Komplexe auf den APZ ausgebildet und die Dichte an Adhäsionsmolekülen nimmt zu (Ferrara et al. 2009). Besonders im GIT begünstigt eine durch die Vorbehandlung verursachte endotheliale Apoptose (Paris et al. 2001) eine Störung der natürlichen Barrierefunktion des Darms, wodurch zusätzlich eine Translokation mikrobakterieller Antigene, beispielsweise Lipopolysaccharide, zur Förderung des entzündlichen Milieus und Aktivierung der APZ beitragen (Hill und Ferrara 2000).

Nach durchgeführter HSCT folgt die Aktivierungsphase. In dieser werden reife Spender-T-Zellen, welche im Transplantat enthalten waren, von den aktivierten APZ des\*der Empfänger\*in stimuliert, wodurch sie proliferieren und ausdifferenzieren (Ferrara et al. 2003; 2009). Dass es gerade die T-Lymphozyten sind, welche die GvHD auslösen, konnten bereits Kernan et al. (1986) nachweisen. Dabei führen HLA-Inkompatibilitäten zwischen Spender\*in und Empfänger\*in im MHC-I-Komplex zur Stimulation von *cluster of differentiation*(CD)8<sup>+</sup> T-Zellen, im Falle fehlender Übereinstimmung des MHC-II-Komplexes zur Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Ferrara et al. 2003). Das in der ersten Phase entstandene entzündliche Milieu fördert diesen entzündlichen Prozess (Ferrara et al 2009; Hülsdünker und Zeiser 2015; Travnik et al. 2011a) und es werden intrazelluläre Kaskaden in alloreaktiven T-Zellen, welche in der weiteren Freisetzung der Zytokine IL-2, Interferon(IFN)-γ und TNF-α münden, in Gang gesetzt (Ferrara et al. 2009; Häusermann et al. 2008).

In der dritten Phase, der Effektorphase, führt dieses Zytokinmuster, welches dem der T-Helferzellen Typ 1 ( $T_{\rm H}$ 1-Zellen) entspricht, im Zusammenspiel der durch die APZ ausgeschütteten Mediatoren und weiterhin vorhandenen Chemokine zur Gewebsschädigung und Zellapoptose in den Zielorganen. Sowohl eine Vielzahl an Zellpopulationen, beispielsweise Makrophagen, zytotoxische T-Zellen und neutrophile Granulozyten, als auch direkten physikalischen Einwirkungen von Mediatoren, etwa TNF-a und die Stickstoffmonoxide, haben ihren Anteil daran (Couriel et al. 2004; Ferrara et al. 2009; Schwab et al. 2014; Travnik et al. 2011a). Die Einwirkung weiterer Mediatoren und Zellen ist ebenso komplex und noch nicht vollends geklärt. So gibt es Hinweise darauf, dass das IL-2 keinesfalls ausschließlich ein GvHD-förderndes Zytokin ist, sondern durchaus krankheitsregulierende Effekte aufweist (Ferrara et al. 2009; Sykes et al. 1990; Welniak et al. 2007). Auch die Bedeutung der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Sie werden zwar im Zusammenhang mit den zytokinausschüttenden Zellen der Effektorphase genannt (Ferrara et al. 2009; Travnik et al. 2011a), allerdings deutet einiges darauf hin, dass sie der GvHD eher entgegenwirken, das Anwachsen des Transplantats fördern und zudem den Graft-versus-Tumor-Effekt (GvT) unterstützen (Ruggeri et al. 2002; Ullrich et al. 2016; Welniak et al. 2007).

#### 1.1.3 Chronische GvHD (cGvHD)

Bei der cGvHD handelt es sich im Gegensatz zur aGvHD nicht um eine Aktivierung von adulten T-Zellen im Transplantat, sondern um fehlgeleitete Toleranzmechanismen und ein komplexes Zusammenspiel zwischen T- und B-Zellen (Socié und Ritz 2014). Die genauen Mechanismen sind jedoch unklar und weiterhin aktueller Forschungsgegenstand (Ferrara et al. 2009; Socié und Ritz 2014). Die cGvHD tritt meist in den ersten drei Jahren nach allogener HSCT auf (Filipovich et al. 2005) und ist die Haupttodesursache unter den Langzeitkomplikationen, die nicht mit dem Wiederauftreten der Grunderkrankung einhergeht (Lee et al. 2002; Wingard et al. 2011). Das höchste Risiko für die Entwicklung einer cGvHD stellt neben dem Alter eine vorangegangene aGvHD dar. Die chronische Form kann nach Abheilung der akuten Form auftreten, direkt aus der akuten Form hervorgehen oder auch *de novo* entstehen (Ferrara et al. 2009; Travnik et al. 2011b). Liegen gleichzeitig Symptome einer aGvHD vor, so wird nicht von der klassischen cGvHD, sondern vom *Overlap*-Syndrom gesprochen (Jagasia et al. 2015).

Die Symptome der cGvHD zeigen sich vielgestaltig, imitieren häufig Autoimmunerkrankungen und verteilen sich zumeist auf mehrere Organe (Ferrara et al. 2009; Travnik et al. 2011a). Typische Manifestationen (Beispiele) befinden sich an Haut und Hautanhangsgebilden (Poikilodermie, makulopapuläres Erythem, Haar- und Nagelverlust), Mund (Ulzera, Gingivitis), Augen (Konjunktivitis), GIT (Strikturen, Stenosen), Genitalien (lichenoide Läsionen), Lunge (Bronchiolitis obliterans) und dem muskoloskelettalen System (Fasziitis) (Ferrara et al. 2009; Jagasia et al. 2015). Die cGVHD kann anhand der Anzahl der betroffenen Organe und der symptomalen Ausprägung nach dem Konsens des National Institut of Health (NIH) (Filipovich et al. 2005; Jagasia et al. 2015) in drei Schweregrade eingeteilt werden (s. Tabelle 3).

Schweregrad	mild		moderat		sch	wer
Anzahl der Organe	1 – 2 (ohne Lunge)	≥ 3	mind. 1	Lunge	mind. 1	Lunge
funktionelle Beeinträchtigung	keine	keine	mittel	keine	schwer	mittel – schwer

Tabelle 3: Schweregrade der cGvHD nach dem Konsens des NIH

## 1.1.4 Graft-versus-Tumor-Effekt (GvT)

Nachdem bereits Tierstudien erste Hinweise gegeben hatten, konnte in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts erstmals in Studien an Patient\*innen statistisch nachgewiesen werden, dass Patient\*innen mit allogener HSCT und Ausprägung einer moderaten bis schweren GvHD seltener Tumorrückfälle aufwiesen als syngen Transplantierte oder allogen Transplantierte mit leichter GvHD (Weiden et al. 1979)<sup>2</sup>. Dieser offenbar mit der GvHD einhergehende Effekt wurde *Graft-versus-Leukemia*-Effekt (GvL) beziehungsweise *Graft-versus*-

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> In dem wissenschaftlichen Artikel von Weiden et al. (1979) werden keine expliziten Angaben zum Geschlecht der Studienteilnehmer\*innen gemacht, an dieser Stelle wird daher lediglich von einer gemischtgeschlechtlichen Gruppe ausgegangen.

*Tumor*-Effekt (GvT) genannt. Etwas später wurde nachgewiesen, dass der Effekt infolge einer allogenen HSCT auftritt, bei der das Transplantat nicht T-Zell-depletiert ist (Horowitz et al. 1990). Dabei konnte die geringste Tumorrückfallrate in der Patient\*innengruppe mit der ausgeprägtesten GvHD verzeichnet werden.

Inzwischen wird angenommen, dass der GvT hauptsächlich von reifen, im Transplantat enthaltenen Spender-T-Zellen ausgeht. Diese erkennen auf den gegebenenfalls verbliebenen Tumorzellen bestimmte miHA sowie spezifische Tumorantigene und eliminieren daraufhin die malignen Zellen (Sweeney und Vyas 2019; Zilberberg et al. 2015). Doch auch alloreaktiven Spender-NK-Zellen beziehungsweise bestimmten Untergruppen selbiger konnte bereits ein Beitrag zum GvT nachgewiesen werden (Asai et al. 1998; Meinhardt et al. 2015; Ruggeri et al. 2002).

Die Verzahnung von GvT und GvHD stellt ein Problem dar, denn durch eine T-Zelldepletion des Transplantats wird zwar die Wahrscheinlichkeit einer GvHD deutlich gesenkt, allerdings steigt dadurch auch die Gefahr einer Wiederkehr der Grunderkrankung wegen des fehlenden GvT (Marmont et al. 1991). An der Möglichkeit, das Risiko einer GvHD zu minimieren und gleichzeitig den GvT zu erhalten, wird weiterhin geforscht (Har-Noy und Slavin 2008).

#### 1.1.5 Prophylaxe und Therapie der GvHD

Die wichtigste Prophylaxe der GvHD stellt das Transplantat mit den geringsten genetischen Differenzen zwischen Spender\*in und Empfänger\*in dar (Travnik et al. 2011b). Zudem wird bereits vor der Transplantation eine Immunsuppression begonnen. Diese besteht in der Regel aus einem Calcineurininhibitor (Cyclosporin A oder Tacrolimus) in Kombination mit einem Antimetaboliten (Methotrexat (MTX) oder Mycophenolat Mofetil (MMF)). Bei unverwandten Spender\*innen wird zusätzlich häufig Antithymozytenglobulin (ATG) eingesetzt (Wolff et al. 2009). Speziell auf die chronische Form bezogen, ist die Prophylaxe der aGvHD als Hauptrisikofaktor eminent (Travnik et al. 2011a).

Tritt dennoch eine GvHD auf wird sowohl bei der akuten als auch der chronischen Form in erster Linie mit Steroiden therapiert. Diese werden meist systemisch angewandt, nur bei der aGvHD Grad I oder bei einer milden cGvHD kann stattdessen auch ein topisches Vorgehen gewählt werden (Travnik et al. 2011b; Wolff et al. 2009). Studien konnten bei der aGvHD ein Ansprechen von 45% bis 55% auf Steroide verzeichnen, bei 20% konnte sogar ein vollständiger Rückgang der Erkrankung beobachtet werden (Koc et al. 2002; Wolff et al. 2009). Im Falle der cGvHD liegt die Ansprechrate je nach Studie zwischen 40% und 50%, von denen jedoch die Hälfte innerhalb von zwei Jahren einen teilweisen oder vollständigen Wirkverlust erleiden, steroidabhängig werden und/oder andere Therapien geplant werden müssen (Wolff et al. 2021).

Wird kein Ansprechen auf die Erstlinientherapie (mehr) erreicht, handelt es sich um eine steroidrefraktäre GvHD und es kommen Zweitlinientherapien zum Einsatz (Travnik et al.

2011b). Dazu zählen beispielsweise weitere Immunsuppressiva, etwa Calcineurininhibitoren, MMF und *mechanistic target of rapamycin*(mTor)-Inhibitoren, Antithymozytenglobuline, aber auch die ECP (Travnik et al. 2011b; Wolff et al. 2009), die im Fokus der vorliegenden Arbeit steht. Auf Grund der lückenhaften Studienlage zur Wirksamkeit der verschiedenen Therapien gibt es allerdings keinen Behandlungskonsens über die weitere Auswahl zwischen den verschiedenen Möglichkeiten (Wolff et al. 2009). Im deutschsprachigen Raum wird die Entscheidung über das weitere Vorgehen zumeist auf Grundlage der Expertise des Therapiezentrums entschieden, wobei MMF und die ECP am häufigsten Anwendung finden (Wolff et al. 2013).

# 1.2 Extrakorporale Photopherese (ECP)

Nachdem bereits 1983 die erste Studie zur ECP in der Behandlung kutaner T-Zell-Lymphome (CTCL) abgeschlossen werden konnte, wurde 1988 diese neue Therapiemethode von der U.S. Food and Drug Administration zur Behandlung von CTCL zugelassen (Edelson 2014; Knobler et al. 2020). Auf Grund ihres Therapieerfolgs wurde ihre Wirksamkeit bei weiteren T-Zell-verursachten Erkrankungen, beispielsweise der systemischen Sklerose, dem Morbus Crohn, Abstoßungsreaktionen bei soliden Organtransplantationen und der akuten und chronischen GvHD, erforscht (Knobler et al. 2009; 2020; 2021). Eine internationale Umfrage aus dem Jahr 2016 ergab, dass die GvHD die derzeit häufigste Indikation für die Durchführung einer ECP darstellt (Dunbar et al. 2017).

#### 1.2.1 Ablauf und Wirkweise der ECP

Bei der ECP werden kernhaltige Zellen, überwiegend Leukozyten, über eine Apherese (mechanisches Verfahren zur Auftrennung der Blutbestandteile per Zentrifugation) aus Vollblut von Patient\*innen extrakorporal isoliert. Anschließend werden nach Zugabe des photosensibilisierenden Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Interkalators 8-Methoxypsoralen (8-MOP) die gewonnenen Zellen einer Ultraviolett(UV)-A-Strahlung (meist 2 J/cm<sup>2</sup>) ausgesetzt und abschließend dem\*der Patient\*in reinfundiert (Marshall 2006; Travnik et al. 2011b). In der Regel wird diese Therapie an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in einem Abstand von ein bis vier Wochen durchgeführt, abhängig vom Behandlungsprotokoll und dem Ansprechen des\*der Patient\*in auf die Therapie (Adamski 2018; Travnik et al. 2011b).

Obwohl diese Therapiemethode bereits seit über 35 Jahren angewandt wird, bleibt der genaue Wirkmechanismus bis heute ungeklärt (Knobler et al. 2020). Die Tatsache, dass durch einen Behandlungszyklus (je eine ECP-Einheit an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) 10 – 15% der gesamten zirkulierenden Leukozyten des\*der Patient\*in durch die auf Grund der Behandlung entstandenen DNA-Schäden in Apoptose gehen (Travnik et al. 2011b), reduziert zwar die Zahl der alloreaktiven Immunzellen, erklärt aber nicht die gesamte immunmodulatorische Wirkung der ECP auf die GvHD (Cho et al. 2018). Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass die durch die ECP behandelten Monozyten sich zu unreifen

dendritischen Zellen (DC) weiterentwickeln, welche durch die Phagozytose apoptotischer Zellen aktiviert werden und ausreifen. In dem\*der Patient\*in findet anschließend eine vermehrte Antigenpräsentation durch die aktivierten DC statt, die zudem ein entzündungshemmendes Milieu mit Zytokinen wie IL-10 und TNF-β fördern. Dadurch reifen vermehrt immunmodulierende T-Zellpopulationen, beispielsweise regulatorische T-Zellen, aus und die Proliferation alloreaktiver T-Zellen wird gehemmt (Cho et al. 2018; Goussetis et al. 2012). Auf welche Weise genau dies geschieht und welche weiteren Zellverbände und Zusammenhänge eine Rolle spielen, ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

#### 1.2.2 Bedeutung der ECP als Therapie der GvHD

Die ECP hat als Zweitlinientherapie der GvHD eine hohe Ansprechrate bei geringem Nebenwirkungsprofil und guter Verträglichkeit. So konnte im Rahmen einer Metaanalyse bei 60% bis 80% der Patient\*innen mit cGvHD ein Therapieerfolg beobachtet werden (Bruserud et al. 2014), im Falle der akuten Form konnten in einzelnen Studien ebenfalls Ansprechraten in gleicher Höhe erzielt werden (Greinix et al. 2006). Auch wenn es nur wenige klinische Studien zur ECP gibt und der Vergleich durch verschiedene Angaben erschwert ist, so herrscht doch Einigkeit über das bemerkenswerte Sicherheitsprofil der ECP (Bruserud et al. 2014). Während beispielsweise eine Therapie mit Steroiden oder Calcineurininhibitoren auf Grund ihrer immunsuppressiven Wirkungen sowohl ein höheres Risiko für bakterielle und virale Infektionen mit sich bringt als auch weitere Nebenwirkungen wie beispielsweise Bluthochdruck, Leber-, Nieren- und Knochenmarkstoxizität beachtet werden müssen (Marshall 2006; Travnik et al. 2011b), erscheinen die bisher beobachteten und zudem selten auftretenden Nebenwirkungen einer ECP harmlos. Dazu zählen vorübergehende Hypotonie, Thrombozytopenie und Anämie nach wiederholten Anwendungen (Knobler et al. 2020). Zudem wurde bisher noch von keinen negativen Langzeitfolgen berichtet (Marshall 2006). Im Gegenteil, die ECP führt zu einem steroidsparenden Effekt, wodurch das Risiko für steroidinduzierte Nebenwirkungen reduziert werden kann (Flowers et al. 2008). Auch gibt es bisher keine Anhaltspunkte für einen negativen Einfluss der ECP auf den GvT oder Hinweise auf eine erhöhte Infektanfälligkeit (Bruserud et al. 2014). Deshalb ist es wichtig, die Effektivität der ECP als Kombination mit Steroiden in der Erstlinientherapie weiter zu erforschen (Bruserud et al. 2014).

Allerdings gibt es bei der praktischen Umsetzung der ECP einige Aspekte zu bedenken. Eine Behandlung dauert je nach verwendetem Apheresesystem zwei bis viereinhalb Stunden (Brosig et al. 2016). Dabei wird ein stabiler und großvolumiger venöser Zugang benötigt, der eine ausreichende Flussrate gewährleistet und unter dem negativen Druck der Blutentnahmephasen nicht kollabiert (Adamski 2018). Hierfür wird meist ein periphervenöser Zugang (Armvene) gewählt, jedoch sind diese Venen in einigen Fällen für die vorgesehene Behandlung nicht verwendbar. Narbenbildungen durch regelmäßigen Gebrauch oder grundsätzlich kleinkalibrige Venen (Kinder) können dazu führen, dass die Anforderungen an den venösen Zugang von vornherein oder im Moment der

Anforderungen an den venösen Zugang von vornherein oder im Moment der Therapievorbereitung nicht erfüllt werden (Golestaneh und Mokrzycki 2013). Dies stellt einen der Hauptgründe für die Verschiebung oder den Abbruch einer ECP dar (Dunbar et al. 2017). In solchen Fällen kann auf lange Sicht die Anlage eines zentralen Venenkatheters weiterhelfen, allerdings ist dieser in der Regel mit einer längeren Sitzungsdauer auf Grund von geringeren Flussraten und einem höheren Komplikationsrisiko (Infektionen, Kathetherdysfunktionen, Thrombosen, zentrale Venenstenose) verbunden (Adamski 2018; Hambsch et al. 2019). Die jeweils verwendeten Apheresesysteme unterscheiden sich zudem darin, ob eine kontinuierliche oder diskontinuierliche Blutentnahme stattfindet. Geräte mit kontinuierlicher Blutentnahme benötigen neben dem bereits erwähnten großvolumigen stabilen venösen Zugang einen zweiten venösen Zugang, über den die Rückführung der nicht weiter benötigten Blutbestandteile stattfindet. Apheresesysteme mit nur einem venösen Zugang hingegen geben das zuvor entnommene Blut in regelmäßigen Abständen über den gleichen Zugang zurück, sodass die Blutentnahme diskontinuierlich ist. Bei letzteren Geräten tritt somit allerdings ein nicht unerhebliches extrakorporales Blutvolumen auf, welches gerade bei Patient\*innen mit geringem Körpergewicht (Kindern) eine technische Herausforderung darstellt (Dunbar et al. 2017).

# 1.2.3 Modifikation der ECP im Mausmodell

Den in Abschnitt 1.2.2 dargelegten Anforderungen an die Patient\*innen Rechnung tragend, stellt die ECP nicht für jede\*n Patient\*in eine Therapieoption dar. Das ist auf Grund der beachtlichen Erfolge dieser Behandlungsart bedauerlich, weshalb die Suche nach alternativen Möglichkeiten für die Durchführung einer ECP unter Umgehung der technischen Probleme erstrebenswert ist.

Einen Ansatzpunkt bietet hierbei der Ursprung der mit ECP behandelten Zellen. Eine ECP im Mausmodell kann aus technischen Gründen nicht mit den eigenen Zellen der erkrankten Maus durchgeführt werden. Wohl aber kann der Ablauf der ECP-Behandlung, wie sie derzeit an dem\*der Patient\*in durchgeführt wird, nachempfunden werden. Dazu werden anstatt Leukozyten der an GvHD erkankten und zu behandelnden Maus Splenozyten einer genetisch identischen Maus gewonnen, welche die gleiche HSCT wie die zu therapierenden Maus erhalten hat und somit ebenfalls an der GvHD erkrankt ist. Eine ECP mit Splenozyten solchen Ursprungs entspricht sowohl genetisch als auch in der Zellaktivität den Verhältnissen einer ECP bei Patient\*innen mit von den Patient\*innen selbst stammenden Leukozyten. Die Funktionalität und Effektivität dieses Versuchsaufbaus konnte bereits in zwei verschiedenen Mausmodellen der GvHD gezeigt werden (Budde et al. 2014; Gatza et al. 2008). Darüber hinaus wurde untersucht, ob in einem Mausmodell der aGvHD die Behandlung mittels ECP mit Zellen (Splenozyten), die nicht genau den behandelten Leukozyten bei Patient\*innen entsprechen, Erfolg hat (Budde et al. 2018). Dabei konnte festgestellt werden, dass weder die Gabe von mit 8-MOP und UV-A-Strahlung behandelten

Splenozyten von gesunden Mäusen des Stammzellempfängerstamms noch Splenozyten des Stammzellspenderstamms einen signifikanten Vorteil gegenüber den mit Placebo behandelten Kontrolltieren erbrachten (Budde et al. 2018). Überraschenderweise stellte sich allerdings in der Versuchsgruppe ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber der Kontrollgruppe ein, die mittels einer ECP-Therapie mit Zellen eines dritten Stamms (allogene ECP), der sich in den MHC sowohl vom Spender- als auch vom Empfängerstamm unterschied, behandelt wurde.

# 1.3 Fragestellung der Arbeit

In den Versuchen von Budde et al. (2018) konnte eine signifikant geringere Mortalität bei Mäusen im *Full-Mismatch*-Mausmodell der aGvHD festgestellt werden, wenn diese mittels einer ECP mit Zellen eines Spenderstamms therapiert wurden, die sich in den MHC sowohl vom Empfänger- als auch vom Stammzellspenderstamm der Tiere unterschieden. Ausgehend von diesen Ergebnissen stellt sich die Frage, ob sich dieser Therapieerfolg der somit allogenen ECP mit weiteren genetisch differenten Spenderzellen eines dritten Mausstamms wiederholen lässt und welche neuen Erkenntnisse anhand der Ergebnisse über den Wirkmechanismus der ECP dadurch gewonnen werden können.

Dieser Fragestellung soll in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden. Hierfür wurde der Referenzversuch (Budde et al. 2018) mit Spenderzellen für die ECP von zwei weiteren genetisch differenten Mausstämmen wiederholt. Dabei wurden für den Pathomechanismus der GvHD relevante Zellen am Lebensende der Versuchstiere gemessen, um durch den Vergleich der Zellzahlen in Zusammenschau mit den Überlebensdaten der verschiedenen Therapiegruppen mögliche Hinweise auf die Wirkweise der ECP zu erhalten. Zusätzlich wurde das Ausmaß bestimmter Zytokine in einem *In-vitro*-Versuch, in dem die Therapie mittels ECP im Mausmodell der aGvHD nachgestellt wurde, gemessen, um weitere Einblicke in den Wirkmechanismus der ECP zu gewinnen.

Mit diesen Versuchen soll ein weiterer Beitrag geleistet werden, um der Möglichkeit der allogenen ECP als Therapiemethode für an GvHD erkrankten Patient\*innen näher zu kommen.

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Ethischer Rahmen

Vor Versuchsbeginn wurde ein Tierversuchsantrag gestellt und die nötige Ausnahmegenehmigung nach §16 Abs. 1 Satz 5 der Tierschutzverordnung für Versuche an Wirbeltieren und Kopffüßlern erlangt (Zeichen: 33.9-42502-04-14/1448, Nds. Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit).

Alle Tierversuche wurden nach den Vorschriften und Regeln der zuständigen Behörde (Nds. Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) durchgeführt.

# 2.2 Versuchstiere, Reagenzien und Arbeitsmaterialien

Die nachfolgenden tabellarischen Aufstellungen (Tabelle 4 – Tabelle 9) ergeben eine Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchstiere, Reagenzien und Arbeitsmaterialien.

Mausstamm	Tierzüchter
BALB/cAnNCrl	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
C57BL/6JRj	JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Isle, France
FVB/NRj	JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Isle, France
CBA/JRj	JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Isle, France
C3H/HeNRj	JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Isle, France

Tabelle 4: Mausstämme

Tabelle 5: Reagenzien, Lösungen, Medien und Kits

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Antibiotikum	Neomycintrisulfat (Salz) Hydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Anti-Biotin MicroBeads	→ Bestandteil des Pan T Cell Isolation Kit II, Maus	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
autoMACSEDTA Running Buffer	<ul> <li>MACS Seperations Puffer:</li> <li>→ pH 7,2</li> <li>bovine serum albumin</li> <li>phosphate-buffered saline</li> <li>Ethylendiamintetraacetat</li> <li>0,09% Azide</li> </ul>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
CD90.2 MicroBeads, Maus	/	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Desinfektionsmittel	Alkopharm 80: • Ethanol 80% (V/V) • Butan-2-on	BrüggemannAlcohol GmbH, Heilbronn
Destilliertes Wasser	Aqua	B. Braun, Melsungen
DNA-Interkalator	8-Methoxysporalen-Lösung, 0,02 mg/ml	Universitätsmedizin Göttingen (Apotheke)
Intrazelluläres Fixations- & Permeabilizations-Puffer- Set	<ul> <li>fixation/permeabilization conzentrate</li> <li>fixation/permeabilization diluent</li> <li>permeabilization buffer 10X</li> </ul>	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Ionomycin Calciumsalz (Zytokinstimulator)	Fertiglösung aus <i>Streptomyces</i> <i>conglobatus</i> , 1 mM in DMSO (Dymethylsufloxid), 0,2 µl filtriert	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Lineage Cell Detection Cocktail-Biotin, Maus	<ul> <li>CD5 Antikörper</li> <li>CD11b Antikörper</li> <li>CD45R Antikörper</li> <li>Anti-7-4</li> <li>Anti-Gr-1</li> <li>Anti-Ter-119</li> </ul>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Lysepuffer für rote Blutzellen	<ul> <li>red blood cell lysing buffer.</li> <li>→ pH 7,5 ± 0,2</li> <li>• 8,3 g/l Ammoniumchlorid</li> <li>• 0,01 M Tris-HCl-Puffer</li> </ul>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
MACS Control: MC CD90.2 T Cell Cocktail, Maus	<ul> <li>CD45 Antikörper:         <ul> <li>→ Fluoreszenz: VioBlue</li> <li>→ clone: 30F11</li> </ul> </li> <li>CD90.2 Antikörper:         <ul> <li>→ Fluoreszenz: PE</li> <li>→ clone: 30-H12</li> </ul> </li> </ul>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Monensin-Lösung 1000X	2,0 mM in 70% Ethanol	BioLegend®, San Diego, USA
Pan T Cell Biotin-Antibody Cocktaill, Maus	<ul> <li>→ Bestandteil des Pan T</li> <li>Cell Isolation Kit II, Maus;</li> <li>CD11b Antikörper</li> <li>CD11c Antikörper</li> <li>CD19 Antikörper</li> <li>CD45R Antikörper</li> <li>CD49b Antikörper</li> <li>CD105 Antikörper</li> </ul>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

	• Anti-MHC II • Ter-119 Antikörper	
PBS	PBS (phosphate-buffered saline) → pH 7,4 (1X) • [-]CaCl2 • [-]MgCl2	Gibco, Fischer Scientific GmbH, Schwerte
PMA-Stammlösung (Zellaktivator)	Phorbol-12-myristat-13- acetat, 100 µg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
RPMI-Medium (Nährmedium)	RPMI-Medium 1640 (1X) + GlutaMAXTM-I mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin)	Gibco, Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Novaminsulfon-ratiopharm (Schmerzmittel)	Metamizol-Natrium 1 H <sub>2</sub> O Tropfen, 500 mg/ml	Ratiopharm GmbH, Ulm

# Tabelle 6: Antikörper

Antikörper ( <i>clone</i> ; Konzentration)	Fluoreszenz	Hersteller
Anti-Biotin (Bio3-18E7; 1 Test in 2 μl) [1 Test = 10 <sup>6</sup> Zellen]	FITC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Anti- <i>mouse</i> CD3 (17A2; 0,5 mg/ml)	FITC	eBioscience Inc, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> CD3e (eBio500A2; 0,2 mg/ml)	eFluor®450	eBioscience Inc, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> CD4 (RM4-5; 0,5 mg/ml)	FITC	eBioscience Inc, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> CD8a (53-6.7; 0,2 mg/ml)	АРС	BioLegend®, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> CD16/32 <i>purified</i> (93; 0,5 mg/ml)	farblos	eBioscience Inc, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> CD25 (PC61.5; 0,2 mg/ml)	PE	eBioscience Inc, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> CD45 (30-F11; 0,5 mg/ml)	Pacific Blue <sup>TM</sup>	BioLegend®, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> CD49b [pan-NK cells] (DX5; 0,2 mg/ml)	АРС	BioLegend®, San Diego, USA

Anti- <i>mouse</i> CD69 (H1.2F3; 0,2 mg/ml)	PE	BioLegend®, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> CD117 (3C11; 0,01 mg/ml)	APC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Anti- <i>mouse/ rat</i> FoxP3 (FJK-16s; 0,2 mg/ml)	АРС	eBioscience Inc, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> H-2Db (KH95; 0,2 mg/ml)	PE	BioLegend®, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> H-2Dd (34-2-12; 0,5 mg/ml)	Alexa Flour®647	BioLegend®, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> IL-2 (JES6-5H4; 0,2mg/ml)	APC	BioLegend®, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> IL-10 (JES5-16E3; 0,2mg/ml)	APC	BioLegend®, San Diego, USA
Anti- <i>mouse</i> TNF-α (MP6-XT22; 0,2mg/ml)	АРС	BioLegend®, San Diego, USA

# Tabelle 7: Laborgeräte

Bezeichnung	Material / Modell	Hersteller, Firmensitz
Abzug, mobil	MT 1300 75	Fumex GmbH, Frankfurt a.M.
Bestrahlungsbehälter	Plexiglas	Universitätsmedizin Göttingen
Bestrahlungskammer	Xstrahl RS225	Gulmay Medical Limited, Surray, UK
Durchflusszytometer	BD FACSCantoTM II Flow Cytometer	BD Biosciences, Frankling Lakes (USA)
Durchlichtmikroskop	Lichtmikroskop Axiostar	Zeiss, Jena
Eismaschine	Ice Flaker	Brema® IceMakers, Villa Cortese, Italien
Elektrisches Pipettiergerät	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Gamma-Bestrahlungsanlage	BIOBEAM 8000, Serie 015	STS Steuerungstechnik & Strahlenschutz GmbH, Braunschweig
Gefrierschrank	-20 °C, Comfort	Liebherr, Kirchdorf
Inkubator	Inkubator HERA cell®	Heraeus, Hanau
Infrarotlampe	Sollux® 750	Original Hanau, Hanau
Kühlschrank	8 °C, Premium	Liebherr, Kirchdorf
Laborabzug	Serien-Nr. 711780	Köttermann GmbH, Uetze

Laborflasche	Duran® 1000 ml	Schott AG, Mainz	
MACS Zell-Seperator	MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	
Maus-Restrainer	Eigenanfertigung	Universitätsmedizin Göttingen	
Messzylinder	Duran®, 1000 ml	Schott AG, Mainz	
Mikroliterpipetten	Eppendorf Reference® Eppendorf Research® plus	e® Eppendorf, Hamburg ® plus	
Rollenmixer	IDL TRM-50	IDL, Schmitten	
Sterilbank	Microflow biological saftey cabinet MDH 51426	Nalge Nunc International, New York, USA	
UV-A-Bestrahlungsgerät	Crosslinker Cat.No.3100300	Herolab GmbH, Wiesloch	
Vortexer	Vortex-2 Genie	Scientific Industrie, Inc., New York, USA	
Waage (für Mäuse)	TEE150-1	Kern & Sohn, Balingen	
Waage (für Reagenzien)	BP 41OS	Sartorius AG, Göttingen	
Zählkammer	Neubauer-improved Zählkammer Assistent®	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v.d. Rhön	
Zentrifuge	Rotana 46 RS	Hettich, Tuttingen	

# Tabelle 8: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Material	Hersteller
FACS-Röhrchen	5 ml Polystyrene Round- Bottom-Tube	Falcon, Durham, USA
Insulinspritzen	BD Mikro-Fine +, U-100 Insulin, 30 G, 0,3 ml	BD, Frankling Lakes (USA)
MACS LS Seperationssäulen	/	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikro-Schraubröhre	Mikro-Schraubröhre, 1,5 ml, 2 ml	Sarsted, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Filterspitzen TipOne (steril) 10/20 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen	SafeSeal Tips Premium 2,5 μl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipetten, serologische	10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß	Cellstar® Tube, konischer Boden, steril 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Skalpell	Feather Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co. LTD., Osaka, Japan

Spritze	5 ml Spritze BD, Frankling Lakes	
Zellkulturflasche	Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm², Cellstar®, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflasche	Zellkulturflasche, 25 cm², CytoOne®, steril	Starlab GmbH, Hamburg
Zellkulturschale (Petrischale)	35 x 10 mm CytoOne®, Zellkulturschale, unbehandelt	Starlab GmbH, Hamburg
Zellsieb	EASYstrainer <sup>™</sup> 40 μm, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

# Tabelle 9: Softwareprogramme

Software	Vertreiber
BD FACS Diva Software Version 6.1.2	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Graphpad Prism 9	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA

# 2.3 Allgemeine Informationen zu den Tierversuchsbedingungen

# 2.3.1 Tierdaten

Im gesamten Forschungsprojekt wurde nur an und mit männlichen Mäusen im Alter von 7 <sup>1</sup>/<sub>2</sub> bis 15 Wochen geforscht. Die Empfängertiere entstammten dem Stamm BALB/c mit dem Haplotyp H2-d (das H2-System stellt die MHC bei Mäusen dar). Die Spendertiere zur Herstellung des Modells der GvHD entstammten dem Stamm C57BL/6 mit dem Haplotyp H2-b. Die Spendertiere zur Durchführung der ECP entstammten dem Stamm FVB (Haplotyp H2-q) und CBA (Haplotyp H2-k). In der *mixed lymphocyte reaction* (MLR) wurden zusätzlich Zellen des Mausstamms C3H (Haplotyp H2-k) verwendet.

# 2.3.2 Tierhaltung und Beurteilungskriterien

Alle Mäuse, die Teil dieser Forschungsarbeit waren, wurden in Mikroisolatorkäfigen mit maximal fünf Tiere gehalten. Die anfängliche Zusammensetzung in den Käfigen wurde bis zum Versuchsende beibehalten. Die Grundversorgung der Mäuse übernahm die Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen, wobei den Tieren unbegrenzt Wasser und Futter zur Verfügung standen. Es herrschte ein zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus.

Bei den Empfängertieren wurden folgende Maßnahmen durchgeführt: Dreimal pro Woche wurde das Trinkwasser erneuert. Diesem war bereits einen Tag vor der Knochenmarktransplantation zur Infektionsvermeidung Neomycin in einer Konzentration von 25 µg/ml und Metamizol zur Schmerzbehandlung in einer Konzentration von 1,33 mg/ml beigemengt. In Käfigen mit kränkeren Tieren (höhere Punktwerte) wurde frisches Breifutter (autoklaviertes, pulverisiertes und mit Wasser angerührtes Normalfutter) bereitgestellt.

Bei der täglichen Kontrolle der Versuchstiere wurde jeweils das Gewicht gemessen und pro Maus ein Punktwert anhand der in Tabelle 10 aufgeführten Kriterien ermittelt. Der minimale Score betrug somit null und der maximale acht Punkte.

Kriterium	Grad 0	Grad 1	Grad 1,5	Grad 2
Körperhaltung	Normal	Leichtes Buckeln nur während des Sitzens	Deutliches Buckeln	Starkes Buckeln auch während der Bewegung
Aktivität	Normal	Leicht reduziert	Deutlich reduziert	Bewegungslo- sigkeit außer nach Stimulation
Fellbeschaf- fenheit / Hautintegrität	Normal	Leicht struppiges Fell oder schuppige Haut	Stark struppiges Fell	Stark struppiges Fell und regionaler Fellverlust
Diarrhoe	Keine	Leicht oder Entzündungs- zeichen am After	Mäßig	Stark

Tabelle 10: Beurteilungskriterien zur Tierverfassung

Die Körperhaltung stellte hierbei einen Indikator für das Schmerzlevel der Tiere dar, die Aktivität für die allgemeine Krankheitslast. Mit der Begutachtung des Fells und des Mäusekots wurden mögliche Symptome zweier Organsysteme beobachtet, welche bei der GvHD auch bei Mäusen häufig betroffen sind.

# 2.3.3 Vorzeitiger Versuchsabbruch

Trat mindestens eins der in Tabelle 11 aufgelisteten Kriterien ein, wurde das Empfängertier vorzeitig aus dem Versuch genommen und eingeschläfert.

	Kriterium
1.	Gewichtsverlust von mindestens 20% innerhalb 48 Stunden
2.	Sechs Punkte oder anhaltend fünf Punkte über mehr als drei aufeinanderfolgende Tage
3.	Fehlende klare Aktivität nach Stimulation unabhängig vom Gewichtsverlust oder dem Punktwert

Tabelle 11: Versuchsabbruchskriterien

#### 2.3.4 Einschläferungsverfahren

Das Einschläfern der Tiere geschah mittels CO<sub>2</sub>-Narkose und anschließender zervikaler Dislokation. Hierfür wurde das Tier in einen Käfig gesetzt, in den dann langsam CO<sub>2</sub> einströmte. Das Tier fiel somit erst in Narkose, bevor es schließlich durch hohe CO<sub>2</sub>-Konzentrationen starb. Um den sicheren Tod zu gewährleisten, wurde anschließend eine zervikale Dislokation durchgeführt.

#### 2.3.5 Injektionsverfahren

Um Zellen und Flüssigkeiten in den Blutkreislauf der Empfängertiere zu schleusen, wurde mittels feiner Insulinspritze über eine der beiden lateralen Schwanzvenen des Tiers das Substrat langsam injiziert. Um den Vorgang zu vereinfachen, wurden die Versuchstiere zunächst unter eine Infrarotlampe gesetzt, sodass ihre Körpertemperatur stieg und sich die Schwanzvenen weiteten. Danach wurde das zu behandelnde Tier mittels eines Maus-Restrainers fixiert, sodass der Schwanz frei lag und die Vene gut punktiert werden konnte.

# 2.4 Allgemeine Informationen zu den Versuchsbedingungen

Sowohl die Knochenmarktransplantation, die ECP-Therapie als auch die MLR erforderten bei der Zellpräparation möglichst sterile Bedingungen. Dies wurde bei Arbeitsschritten außerhalb der Sterilbank gewährleistet, indem die Arbeitsflächen vor der Nutzung stets mit Ethanol desinfiziert und steriles Sezierbesteck sowie sterile Verbrauchsmaterialien verwendet wurden. Das Fell der Spendertiere wurde nach ihrer Einschläferung mit Ethanol besprüht, um eine Kontamination der inneren Organe durch Haare während der Gewebepräparation zu vermeiden. Vor jeder Nutzung der Sterilbank wurde sowohl die Arbeitsfläche als auch jeder einzubringende Gegenstand mit Ethanol desinfiziert.

Wenn nicht anders angegeben, wurden Zellen in einer Neubauer Zählkammer bei einer Verdünnung von 1/10 gezählt und die beschriebenen Zentrifugationen von Zellen bei Raumtemperatur sowie einer Beschleunigung und Bremse von R = 9 vorgenommen.

# 2.5 Induktion der aGvHD im Mausmodell

Die Induktion der aGvHD im Mausmodell geschah nach einem im Labor bereits etablierten Protokoll (modifiziert nach Tischner et al. 2011). Hierbei diente der Mausstamm BALB/c als Empfänger- und der Mausstamm C57BL/6 als Spendertier. Innerhalb einer Versuchsreihe waren sowohl Empfänger- als auch Spendertiere gleichen Alters. Dieses betrug bei Knochenmarktransplantation siebeneinhalb bis neun Wochen.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Induktion der aGvHD genauer dargestellt.

### 2.5.1 Konditionierung der Empfängertiere

Um die Proliferationsfähigkeit der hämatopoetischen Stammzellen der Empfängertiere zu unterbinden, wurden die Tiere am Tag -1 (einen Tag vor Knochenmarktransplantation) zunächst mit einer Dosis von je 10 Gy bestrahlt. Dies geschah mittels der Bestrahlungskammer Xstrahl RS225 bei einer Tischhöhe von 470 cm mit einem Filter von 5, 200 kV, 15 kA und einer Strahlendosis von 1 Gy/min. Die Mäuse befanden sich dabei in einer für die Tiere entworfenen Plexiglasbox.

### 2.5.2 Gewebeaufbereitung zur Gewinnung der Spenderzellen

Um ausreichend Spenderzellen zu erhalten, wurden insgesamt sieben Mäuse vom Stamm C57BL/6 verwendet. Diese wurden nach Einschläferung (s. 2.3.4) auf einer OP-Einmalunterlage auf einer Styroporplatte präpariert. Bei jeder Maus wurde wie folgt vorgegangen: Das tote Spendertier wurde auf den Rücken gelegt, an den Extremitäten mittels Kanülen fixiert und mit Ethanol besprüht. Dann wurde die Bauchdecke des Tiers in der Längsachse aufgeschnitten und das Fell wie die Extremitäten aufgespannt und fixiert. Nun wurde die Milz sowie die zervikalen, axialen, mesenterialen und inguinalen Lymphknoten entnommen. Die Milzen und Lymphknoten wurden in jeweils eigenen sterilen Petrischalen mit sterilem MACS-Puffer gesammelt und auf Eis gekühlt. Dann wurden die *Tibiae* und *Femura* vom umliegenden Gewebe befreit und ebenfalls in einer sterilen Petrischale mit sterilem MACS-Puffer auf Eis gekühlt gesammelt.

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Gewebe und Zellsuspensionen wurden auf Eis gekühlt.

Um die Splenozyten möglichst schonend aus dem Milzgewebe zu lösen, wurde mehrfach MACS-Puffer in jede Milz mittels einer feinen Insulinnadel gespritzt, bis die Milzfarbe annähernd weiß war. Die so entstandene Zellsuspension wurde durch ein 40 µm Zellsieb gegeben und in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Daraufhin wurde das verbliebene Milzgewebe mittels Stempel einer 5 ml Spritze im Zellsieb gemörsert (ein Zellsieb pro Milz), mehrfach mit MACS-Puffer nachgespült und ebenfalls in dem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

Je ein Drittel der gesammelten Lymphknoten wurde mit Hilfe einer Pipette in ein 40 µm Zellsieb befördert und mit dem gleichen Vorgehen wie bei den Milzen gemörsert. Abschließend wurde der MACS-Puffer aus der Petrischale der Lymphknoten durch ein 40 µm Zellsieb gegeben und zusammen mit der nun gewonnenen Zellsuspension der Lymphknoten in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

Von den insgesamt 28 Knochen wurden die Epiphysen mittels einer Präparationsschere abgetrennt. Anschließend wurde jeder Knochen mit Hilfe einer 5 ml Spritze und einer Kanüle mit MACS-Puffer durchgespült und das dadurch herausgelöste Knochenmark in einer frischen Petrischale gesammelt. Hiernach wurde die Zellsuspension durch ein 40 µm

Zellsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Um möglichst alle Zellen isolieren zu können, wurde die Petrischale abschließend mit MACS-Puffer gespült und das Spülwasser ebenfalls durch ein Zellsieb ins gleiche Reaktionsgefäß gegeben.

# 2.5.3 Aufreinigung der Spenderzellen

Bei den gewonnenen Zellsuspensionen (Milz-, Lymphknoten-, und Knochenmarkzellen) wurde eine Zellzählung vorgenommen, um anschließend maximal 600\*10<sup>6</sup> Zellen pro Ansatz bei 300 g und 4 °C für zehn Minuten zu zentrifugieren. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in sterilem MACS-Puffer resuspendiert.

Zwecks Isolation der Stammzellen wurden die Knochenmarkzellen in einer Konzentration von 600\*10<sup>6</sup> Zellen/1500 µl aufbereitet und pro 1500 µl 167 µl CD90.2 MicroBeads hinzugefügt. Nach zehnminütiger Inkubationszeit bei ca. 4 °C wurden 5 ml steriler MACS-Puffer zugesetzt, um im Folgenden die Zellsuspension bei 300 g und 4 °C für zehn Minuten zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 ml sterilem MACS-Puffer resuspendiert.

Zwecks Isolation der T-Zellen wurden sowohl die Lymphknotenzellen als auch die Milzzellen in je einer Konzentration von  $10^7$  Zellen/13 µL gelöst. Pro 13 µl wurden 10 µl steriler MACS-Puffer und 6,5 µl Anti-Biotin Beads beiden Zellsuspensionen hinzugefügt. Nach zehnminütiger Inkubationszeit bei ca. 4 °C wurden beiden Reagenzien 4 ml steriler MACS-Puffer zugegeben und die Ansätze bei 300 g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden beide Zellpellets in je 3 ml sterilem MACS-Puffer resuspendiert.

Die so vorbereiteten und markierten Zellen wurden mit einem MACS Zell-Seperator isoliert. Dafür wurde jede MACS LS Seperationssäule zunächst mit 3 ml sterilem MACS-Puffer equilibriert und der Spülpuffer anschließend verworfen. Pro Säule wurden nun 1,5 ml einer Zellsuspension aufpipettiert und mit je 9 ml sterilem MACS-Puffer nachgespült. Sowohl die nun isolierten Stammzellen aus dem Knochenmarkansatz als auch die isolierten T-Zellen aus dem Milz- und Lymphknotenansatz wurden jeweils in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

Abschließend wurde eine Zellzählung bei allen drei Ansätzen durchgeführt, sodass 400\*10<sup>6</sup> Stammzellen und je 40\*10<sup>6</sup> T-Zellen aus dem Lymphknotenansatz und Milzansatz in einem 50 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt werden konnten. Diese Zellsuspension wurde bei 300 g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands das Zellpellet in 6 ml sterilem *phosphat-buffered saline* (PBS) resuspendiert. Das so vorbereitete Transplantat wurde auf drei 2 ml Mikro-Schraubröhren verteilt, auf Eis gekühlt und erst kurz vor der Transplantation auf Raumtemperatur aufgewärmt.

#### 2.5.4 Qualitätskontrolle des Transplantats

Um die Reinheit des Zelltransplantats zu kontrollieren, wurden mittels Analyse durch fluorescence-activated cell sorting (FACS) der Anteil der Stamm- und T-Zellen im Transplantat überprüft. Hierfür wurden aus jeder Zellsuspension vor Zusammenführung zur Transplantatssuspension (s. 2.5.3) je zweimal 100 µl in je ein FACS-Röhrchen gegeben, sodass je ein Kontrollansatz und eine zu färbende Probe der Stammzellen, der T-Zellen aus den Lymphknoten und der T-Zellen aus der Milz bereitstanden. Zunächst wurde der Probe des Stammzellansatzes 10 µl Lineage Cell Detection Cocktail-Biotin (Maus) zugeführt und für zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 1 ml MACS-Puffer aufgefüllt und bei 350 g und 4 °C die Probe für fünf Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl MACS-Puffer resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden alle drei Proben entsprechend ihres Inhalts mit den in Tabelle 12 aufgeführten Substanzen gefärbt und für zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Inkubation mit je 1 ml MACS-Puffer abgestoppt und die Proben bei 350 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des entstandenen Überstands wurden die Zellpellets in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert. Den Kontrollansätzen wurden ebenfalls weitere 100 µl MACS-Puffer hinzugefügt. Abschließend wurden die hergestellten Proben im Durchflusszytometer analysiert.

Tabelle 12	: Färbung	der	Qualitätskontrolle
------------	-----------	-----	--------------------

Stammzellen	T-Zellen aus Lymphknoten	T-Zellen aus der Milz
<ul> <li>10 μl Anti-Biotin</li> <li>10 μl Anti-mouse CD117</li> <li>10 μl MC CD90.2 T Cell</li></ul>	• 10 µl MC CD90.2 T Cell	• 10 µl MC CD90.2 T Cell
Cocktail, Maus	Cocktail, Maus	Cocktail, Maus

#### 2.5.5 Transplantation

Einen Tag nach der Konditionierung (s. 2.6) wurden jedem Empfängertier  $10*10^6$ Stammzellen aus dem Knochenmark und  $2*10^6$  T-Zellen aus Milz und Lymphknoten zu gleichen Teilen in einem Volumen von 150 µl PBS in die laterale Schwanzvene injiziert.

# 2.6 Versuchsablauf mit allogener ECP im Mausmodell der GvHD

Die allogene ECP wurde im Mausmodell der aGvHD (C57BL/6→ BALB/c, *full mismatch*) mit 8-MOP und UV-A-Strahlung behandelten Milzzellen in zwei Gruppen mit Zellen der Mausstämme FVB und CBA durchgeführt. Eine dritte Gruppe erhielt als Kontrollgruppe PBS anstatt Spenderzellen. Dabei waren in jedem Käfig Tiere aus allen drei Gruppen vertreten, um einer möglichen Verzerrung der Versuchsergebnisse durch unterschiedliche soziale Umfelder vorzubeugen. Während der gesamten Beobachtungszeit einer Versuchsreihe von 42 Tagen nach Transplantation wurde täglich der Gesundheitszustand jedes einzelnen Empfängertiers (im Folgenden auch Versuchstier genannt) per Score beurteilt (s. 2.3.2). Trat für ein Versuchstier eins der zuvor definierten Versuchsabbruchkriterien ein (s. 2.3.3), so wurde diese eine Maus eingeschläfert und ihre Milzzellen analysiert. Dieser Schritt wurde ebenso bei allen Empfängertieren am offiziellen Versuchsende (Tag 42) durchgeführt (s. 2.8). Der Score verstorbener Tiere wurde mit dem Punktwert ihres letzten Tages fortgeführt, solange dieser mindestens sechs Punkte betrug (maximal erreichbare Punktzahl: acht). Sollte der Score am Todestag geringer gewesen sein, so erhielt das verstorbene Tier dennoch für den Todestag und alle folgenden Tage den Punktwert sechs. In den Auswertungen, beispielsweise bei der Berechnung der Mittelwerte, gingen stets alle Tiere, sowohl noch lebende als auch bereits verstorbene, ein. Dies barg den Vorteil, dass der Score stets ein Gesamtbild der einzelnen Versuchsgruppen darstellte, anstatt nur den Zustand der noch lebenden Tiere abzuzeichnen.

Insgesamt wurden vier Versuchsreihen mit jeweils 20 Versuchstieren durchgeführt. Die ursprüngliche Planung, über den gesamten *In-vivo*-Versuch je 27 Mäuse mit Zellen des Stamms FVB beziehungsweise des Stamms CBA zu therapieren und folglich die restlichen 26 Mäuse der insgesamt 80 Versuchstiere in die PBS-Kontrollgruppe einzubinden, konnte nicht eingehalten werden. Dies lag daran, dass in der vierten Versuchsreihe zwei der Versuchstiere zwecks eines Informationsgewinns für nachfolgende Forschungsarbeiten anderweitig therapiert wurden. Unter Einhaltung ausgeglichener Gruppenzugehörigkeiten innerhalb der Käfige in der letzten Versuchsreihe sowie der bereits determinierten Aufteilung der Versuchstiere in den vorangegangenen Versuchsreihen führte dies zu uneinheitlichen Gesamtgruppengrößen. Nach Abschluss des *In-vivo*-Versuchs sind 27 Tiere mit Zellen des Mausstamms FVB sowie 26 Tiere mit Zellen des Mausstamms CBA therapiert worden, die Kontrollgruppe mit PBS-Injektionen zählte 25 Tiere. Die Gesamtzahl der in die Auswertung eingebundenen Versuchstiere betrug demnach 78 Tiere.

Der schematische Ablauf einer Versuchsreihe, in der je vier ECP-Therapien per Injektion (s. 2.3.5) durchgeführt wurden, ist in Tabelle 13 dargelegt.

Tag	Vorgehen
-1	Konditionierung der Empfängertiere
0	Allogene Stamm- und T-Zelltransplantation
3	erste ECP
6	zweite ECP
13	dritte ECP
20	vierte ECP
42	Versuchsende

Tabelle 13: Ablauf einer Versuchsreihe

# 2.7 Vorbereitung und Durchführung einer ECP

#### 2.7.1 Isolation der Spendersplenozyten

Alle Spendertiere waren bei Zellentnahme zwischen 8 und 15 Wochen alt. Zur Gewinnung von Splenozyten wurde ein Spendertier eingeschläfert (s. 2.3.4), um ihm die Milz zu entnehmen. Diese wurde anschließend in sterilem MACS-Puffer in einer Petrischale auf Eis gekühlt. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten unter der Sterilbank. Die Splenozyten wurden, wie unter 2.5.2 dargelegt, aus dem Milzgewebe gelöst und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Diese Zellsuspension wurde nun bei 300 g für zehn Minuten zentrifugiert und nach Verwerfen des entstandenen Überstands in 1 ml *red blood cell lysing buffer* resuspendiert. Ziel dieses Schritts war die Reduktion unerwünschter Erythrozyten in der Zellsuspension. Der Ansatz wurde anschließend eine Minute auf dem Rollenmixer gemischt, dann mit 20 ml MACS-Puffer aufgefüllt und bei 300 g für zehn Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert.

#### 2.7.2 Apoptoseinduktion mittels 8-MOP und UV-A-Strahlung

Zwecks Apoptoseinduktion der Splenozyten wurden diese mit dem DNA-Interkalator 8-MOP und UV-A-Strahlung behandelt. Dadurch wurden DNA-Strangbrüche verursacht und die Apoptose der Zellen in den folgenden Tagen eingeleitet.

Hierfür wurden der bisher gewonnenen Probe unter Lichtausschluss 50 µl 8-MOP hinzugegeben, um eine Konzentration von 0,2 µl/ml zu erreichen. Weiterhin unter Lichtausschluss folgte eine zehnminütige Inkubation auf dem Rollenmixer. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben und mit UV-A-Strahlung in einer Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt.

Abschließend wurde der Ansatz mittels 10 ml MACS-Puffer verdünnt und eine Zellzählung durchgeführt. Zur Herstellung der endgültigen Injektionslösung wurde die benötigte Zellzahl bei 300 g für zehn Minuten abzentrifugiert und nach Verwerfen des entstandenen Überstands in 100 µl MACS-Puffer pro 1\*10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert.

# 2.8 Färbungen und Durchflusszytometrie

Die zu untersuchenden Zellen stammten aus der Milz der Versuchstiere, welche nach Einschläferung (s. 2.3.4) entnommen und in MACS-Puffer in eine Petrischale gelegt wurde. Die Splenozyten wurden anschließend nach dem gleichen Verfahren wie in 2.5.2 gewonnen und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. An diesem Punkt erfolgte eine Zellzählung, die nur bei recht klaren Zellsuspensionen ohne Verdünnung vorgenommen wurde, bei starker Rotfärbung wurde vorher eine Erythrozytenlyse durchgeführt (s. 2.8.1). Waren nur sehr wenige Zellen in der Zellsuspension vorhanden, wurden die im Folgenden beschriebenen Färbungen bis zur ersten Zentrifugation mit der doppelten Menge an Ausgangslösung und Reagenzien durchgeführt. Neben den gefärbten Proben wurde stets ein ungefärbter und gegebenenfalls ein mit MACS-Puffer verdünnter Ansatz fertiggestellt. Alle Färbeschritte wurden in FACS-Röhrchen durchgeführt, ebenso die abschließende Analyse per Durchflusszytometrie. Die genauen Angaben der hier verwendeten Antikörper sind Tabelle 6 auf Seite 14 zu entnehmen.

Nach vollständiger Zellfärbung wurden die Proben im Durchflusszytometer gemessen und die gefärbten Zellen als Anteil der insgesamt gemessenen Ereignisse (möglichst 50 000) ermittelt.

# 2.8.1 Erythrozytenlyse

Um eine übermäßige und störende Zahl an Erythrozyten zu eliminieren, wurde die Zellsuspension zunächst bei 300 g für zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der entstandene Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml red blood cell lysing buffer resuspendiert und für eine Minute auf dem Rollenmixer gemischt. Hiernach wurden 20 ml MACS-Puffer zugefügt und für zehn Minuten bei 300 g zentrifugiert. Erneut wurde der entstandene Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert.

# 2.8.2 Färbung der T-Zellen

Zu 100 µl vorher gewonnener Zellsuspension wurden die in Tabelle 14 aufgeführten Antikörper zugefügt und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 2 ml MACS-Puffer abgestoppt und bei 350 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des entstandenen Überstands, wurde das Zellpellet in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert und in der Durchflusszytometrie analysiert. Hierdurch konnte zwischen T-Helferzellen (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) und zytotoxischen T-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) differenziert und der jeweilige Anteil an CD69<sup>+</sup> Zellen (früher Aktivierungsmarker) ermittelt werden.

Antikörper	Fluoreszenz	Menge [µl]
Anti- <i>mouse</i> CD3e <sup>1</sup>	eFluor®450	2,50
Anti-mouse CD4	FITC	0,50
Anti-mouse CD8	АРС	1,00
Anti-mouse CD69	PE	1,00

Tabelle 14: T-Zellfärbung

<sup>1</sup> Mit dem hier verwendeten Antikörper wird das Oberflächenmerkmal CD3 mit dem Fluoreszenzfarbstoff eFluor®450 markiert. Das kleine "e' steht hierbei für die Untereinheit von CD3, in der sich das zu bindende Epitop für den Antikörper befindet. Ähnliche Spezifizierungen der genauen Bindungsstellen anderer Antikörper wurden von den jeweiligen Herstellern lediglich nicht in den Namen der Antikörper übernommen. So wird beispielsweise der andere in dieser Arbeit verwendete Antikörper gegen CD3 (Fluoreszenz: FITC) schlicht als Anti-*mouse* CD3 bezeichnet.

## 2.8.3 Färbung der NK- und NK-T-Zellen

In 100 µl der vorher gewonnenen Zellsuspension wurde zunächst eine Blockade des  $F_c$ -Rezeptors mittels Zugabe von 1,5 µl des Antikörpers Anti-*mouse* CD16/32 durchgeführt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 4 °C wurden die weiteren Antikörper (s. Tabelle 15) hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 2 ml MACS-Puffer abgestoppt und bei 350 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des entstandenen Überstands wurde das Zellpellet in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert und in der Durchflusszytometrie analysiert. Hier konnte zwischen NK-Zellen (CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup>) und NK-T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup>) differenziert und der jeweilige Anteil an CD69<sup>+</sup> Zellen (früher Aktivierungsmarker) ermittelt werden.

Antikörper	Fluoreszenz	Menge [µl]
Anti-mouse CD3	FITC	1,00
Anti-mouse CD49b	АРС	1,25
Anti-mouse CD69	PE	1,00

Tabelle 15: NK- und NK-T-Zellfärbung

# 2.8.4 Färbung regulatorischer T-Zellen

Die Färbung der regulatorischen T-Zellen fand bei Raumtemperatur statt. Zu 100 µl vorher gewonnener Zellsuspension wurden zunächst die Antikörper Anti-*monse* CD4 und Anti*monse* CD25 (s. Tabelle 16) gegeben und für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 2 ml MACS-Puffer aufgefüllt und bei 350 g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des entstandenen Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml *fixation/permeabilization conzentrate* für zehn Minuten inkubiert und die Reaktion anschließend mit 2 ml *permeabilization buffer* abgestoppt. Durch diesen Schritt wurde die Färbung des Transkriptionsfaktors *Forkbead-Box*-Protein P3 (FoxP3) vorbereitet. Nach Zentrifugation der Probe bei 350 g für fünf Minuten und Verwerfen des entstandenen Überstands wurde das Zellpellet in 100 µl *permeabilization buffer* resuspendiert und mit dem Antikörper Anti*monse/rat* FoxP3 versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation wurde die Probe mit 2 ml *permeabilization buffer* aufgefüllt und bei 350 g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des entstandenen Überstands wurde das Zellpellet wieder in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Hierbei konnte der Anteil an regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) ermittelt werden.

Antikörper	Fluoreszenz	Menge [µl]
Anti-mouse CD4	FITC	0,50
Anti-mouse CD25	PE	0,50
Anti- <i>mouse/rat</i> FoxP3	APC	5,00

Tabelle 16: Regulatorische T-Zellfärbung

# 2.8.5 Chimärismusfärbung

Zum Ende einer jeden Versuchsreihe wurde der Grad des durch die Stamm- und T-Zelltransplantation verursachten Chimärismus in den Versuchstieren gemessen. Hierbei wurde zwischen Splenozyten mit genetischem Ursprung der Empfängertiere (BALB/c, CD45<sup>+</sup>, H-2Dd<sup>+</sup>) und Splenozyten mit genetischem Ursprung der Spendertiere (C57BL/6, CD45<sup>+</sup>, H-2Db<sup>+</sup>) differenziert.

Dafür wurde in 100  $\mu$ l der vorher gewonnenen Zellsuspension zunächst eine Blockade des F<sub>c</sub>-Rezeptors mittels Zugabe von 2  $\mu$ l des Antikörpers Anti-*mouse* CD16/32 durchgeführt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 4 °C wurden die in Tabelle 17 aufgeführten Antikörper hinzugegeben und bei 4 °C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 2 ml MACS-Puffer abgestoppt und bei 350 g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des entstandenen Überstands wurde das Zellpellet in 200  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert und in der Durchflusszytometrie analysiert.

Antikörper	Fluoreszenz	Menge [µl]
Anti-mouse CD45	Pacific Blue <sup>TM</sup>	0,50
Anti-mouse H-2Db	PE	2,00
Anti-mouse H-2Dd	Alexa Flour®647	0,50

Tabelle 17: Chimärismusfärbung

# 2.9 Mixed lymphocyte reaction (MLR)

Bei der GvHD spielt die Bildung und Ausschüttung von Zytokinen für die Rekrutierung und Vermehrung von Immunzellen, etwa zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen, eine entscheidende Rolle. Da es während der *In-vivo*-Versuche nicht möglich war, die Zytokinverhältnisse bei den Versuchstieren zu messen, wurde das Modell der MLR zu Hilfe genommen. Hierbei handelt es sich um ein *In-vitro*-Modell, bei dem Leukozytenpopulationen zweier verschiedener genetischer Ursprünge in einem Nährmedium kultiviert werden. Bei einer *one-way* MLR wird einer Zellpopulation durch Bestrahlung oder durch Zugabe von Mytomycin C die Fähigkeit der eigenen Aktivierung genommen. Diese somit reaktionsunfähigen Zellen werden Stimulatorzellen genannt und stimulieren durch Antigenpräsentation die unbehandelte Zellpopulation, deren Zellen wiederum als Responderzellen bezeichnet werden und von denen die zu messenden Zytokine schließlich stammen.

# 2.9.1 Versuchsaufbau der MLR

In der MLR entsprechen die Responderzellen den Zellen der Spendertiere (C57BL/6) und die Stimulatorzellen den Zellen der Empfängertiere (BALB/c) des *In-vivo*-Mausmodells der aGvHD. Die Zellen der ECP-Therapie stellen weitere Stimulatorzellen dar. Es konnte

festgestellt werden, dass die Antwort der Responderzellen bei einem Zellzahlverhältnis von 1:1 bis 1:4 (Stimulatorzellen: Responderzellen) am größten ist (Mangi und Kantor 1975). Um aussagekräftige Werte messen zu können und dennoch möglichst wenig von den Zellverhältnissen des *In-vivo*-Versuchs abzuweichen, wurde hier das Verhältnis 1:1 zwischen den Stimulatorzellen und den Responderzellen in der MLR gewählt. Da die aGvHD von reifen T-Zellen im Transplantat hervorgerufen wird und Stammzellen keinen bekannten Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung in den ersten Tagen nehmen, wurde auf die zusätzliche Verwendung von Stammzellen in der MLR verzichtet.

Demzufolge wurde am Tag null der MLR sowohl die Konditionierung der Empfängertiere als auch die Transplantation der reifen T-Zellen simuliert. Am Tag eins erfolgte die Behandlung mittels allogener ECP und am Tag drei wurde abschließend eine Interleukinfärbung durchgeführt. Von Tag null bis Tag drei erfolgte die Aufbewahrung der Ansätze bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator.

#### 2.9.2 Durchführung der MLR

Zunächst wurde unter sterilen Bedingungen ein nährstoffreiches Zellkulturmedium aus 89% RPMI-Medium 1640 + GlutaMAX<sup>TM</sup>-I, 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C für maximal drei Wochen aufbewahrt.

Am Tag null wurden Splenozyten sowohl des Empfängerstamms (BALB/c) als auch des Spenderstamms (C57BL/6) gewonnen, indem je eine gesunde Maus dieser Stämme eingeschläfert (s. 2.3.4), ihr dann die Milz entnommen und diese anschließend in sterilem MACS-Puffer in eine Petrischale gelegt wurde. Daraufhin wurden unter der Sterilbank die Splenozyten nach dem gleichen Verfahren wie in 2.5.2 gewonnen und die beiden Ansätze in je einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurde eine Erythrozytenlyse (s. 2.8.1) durchgeführt und die zukünftigen Responderzellen (Spenderzellen, C57BL/6) auf Eis gestellt.

Die zukünftigen Stimulatorzellen (Empfängerzellen, BALB/c) wurden indessen entsprechend der Konditionierung der Empfängertiere in der Gamma-Bestrahlungsanlage mit einer Effektivdosis von 25 Gy bestrahlt.

Nun wurden die Zellen beider Suspensionen gezählt und je 40\*10<sup>6</sup> Zellen bei 350 g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen der entstandenen Überstände wurden die Zellpellets in je 20 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Im Folgenden wurden jeweils 10\*10<sup>6</sup> Zellen (5 ml) aus dem Ansatz der Stimulatorzellen und dem Ansatz der Responderzellen in eine gemeinsame 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben, sodass am Ende vier solcher Zellkulturflaschen befüllt waren. Diese wurden anschließend im Brutschrank inkubiert.

Am Tag eins erfolgte die Therapie mittels ECP. Hierfür wurden neben einer zelllosen Kontrolle drei verschiedene Zelllinien, namentlich Splenozyten des Stamms FVB, CBA und
C3H, aufbereitet. Die beiden ersten Stämme entsprachen den im *In-vivo*-Versuch durchgeführten Therapien. Der letztgenannte Stamm wurde mit in die MLR aufgenommen, da mit diesem ein signifikanter Therapieerfolg in der allogenen ECP im Mausmodell der aGvHD bereits gezeigt werden konnte (Budde et al. 2018).

Die benötigten Splenozyten wurden, wie in 2.7 beschrieben, gewonnen und mittels 8-MOP und UV-A-Strahlung behandelt (s. 2.7.2). Abschließend wurden von jedem Ansatz 2\*10<sup>6</sup> Zellen bei 300 g für zehn Minuten zentrifugiert und nach Verwerfen des entstandenen Überstands in je 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Jede der drei vorbereiteten Zellsuspensionen wurde nun in je einen MLR-Ansatz vom Vortag gegeben. Dem vierten MLR-Ansatz wurden als Kontrolle 2 ml reines Zellkulturmedium zugefügt. Die Ansätze wurden weiter im Brutschrank bis zur Interleukinfärbung an Tag drei inkubiert.

#### 2.9.3 Interleukinfärbung

An Tag drei der MLR wurde eine Interleukinfärbung vorgenommen. Hierfür wurde zunächst eine Aktivierung der Interleukine durchgeführt, indem nach Erwärmung aller benötigter Reagenzien auf Raumtemperatur zu jedem Ansatz Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in einer Konzentration von 40 ng/ml (entspricht 0,4 µl/ml der hier verwendeten PMA-Stammlösung [100 µg/ml]), Ionomycin in einer Konzentration von 2 µM (entspricht 2 µl/ml der hier verwendeten Ionomycin-Fertiglösung [1 mM]) und Monensin in einer Konzentration von 2 µM (entspricht 1 µl der hier verwendeten Monensin-Lösung 1000X [2mM]) zuzugeben wurde. Anschließend wurden die Ansätze für weitere vier bis sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Zur Färbevorbereitung wurde jeweils das gesamte Volumen der Zellkulturflaschen bei 350 g für fünf Minuten zentrifugiert und nach Entsorgung der Überstände in je 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Alle Färbeschritte wurden in FACS-Röhrchen durchgeführt, ebenso die abschließende Analyse per Durchflusszytometrie.

Von jedem der vier MLR-Ansätze wurde ein Probengefäß mit 300  $\mu$ l als ungefärbte Kontrolle beiseitegestellt und weitere drei Probengefäße mit je 100  $\mu$ l (im Folgenden Probe 1–3 genannt) vorbereitet. Zudem wurde nach Herstellerangaben eine Fixations-/ Permeabilisationslösung aus den Reagenzien *fixation/permeabilization conzentrate* und *fixation/permeabilization diluent* im Verhältnis 1 : 3 hergestellt und der *permeabilization buffer* 10X mit destilliertem Wasser verbrauchsfertig gemacht. Den Probegefäßen wurden nun im ersten Schritt die in Tabelle 18 notierten Antikörper hinzugegeben und für 15 Minuten inkubiert.

Probe	Antikörper	Fluoreszenz	Menge [µl]
Probe 1 und 2	Anti-mouse CD3e <sup>1</sup>	eFluor®450	2,00
	Anti-mouse H-2Db	PE	2,00
Probe 3	Anti-mouse CD4	FITC	0,50
	Anti-mouse H-2Db	PE	2,00

Tabelle 18: Interleukinfärbung, Schritt 1

<sup>1</sup> s. Legende Tabelle 14

Anschließend wurden je 2 ml MACS-Puffer hinzugefügt und die Proben bei 350 g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des entstandenen Überstands wurden je 0,5 ml Fixations-/Permeabilisationslösung zugegeben und für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben gewaschen, indem je 2 ml *permeabilization buffer* hinzugefügt und die Proben bei 350 g für fünf Minuten zentrifugiert wurden. Dieser Schritt wurde wiederholt. Dann wurden nach Entfernung des Überstands die Zellpellets in je 100 ml p*ermeabilization buffer* resuspendiert und es folgte der zweite Färbeschritt mit den in Tabelle 19 angegebenen Reagenzien.

Tabelle 19: Interleukinfärbung, Schritt 2

Probe	Antikörper gegen	Fluoreszenz	Menge [µl]
Probe 1	Anti-mouse IL-2	APC	1,25
Probe 2	Anti- <i>mouse</i> TNF-α	APC	1,25
Probe 3	Anti-mouse IL-10	APC	1,25

Nach 15-minütiger Inkubationszeit erfolgte, wie oben bereits beschrieben, ein zweimaliger Waschschritt, um danach die Zellpellets nach Entfernung des entstandenen Überstands abschließend in je 200 µl MACS-Puffer zu resuspendieren. Im Anschluss wurden alle Ansätze in der Durchflusszytometrie analysiert. Dadurch konnte in den jeweiligen MLR der Anteil an IL-2(T-Zellwachstumsfaktor)- und TNF- $\alpha$ (Cachectin)-haltigen CD3<sup>+</sup> Responderzellen (C57BL/6, H-2Db<sup>+</sup>) und IL-10(*cytokine synthesis inhibitory factor*)-haltigen CD4<sup>+</sup> Responderzellen (C57BL/6, H-2Db<sup>+</sup>) ermittelt werden.

### 2.10 Statistik und Softwareprogramme

Zur Darstellung der bei der Durchflusszytometrie ermittelten Datensätze wurde das Programm BD FACS Diva Software (Version 6.1.2) verwendet. Die weitere Auswertung sämtlicher Daten wurde mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 9 durchgeführt.

Die Überlebensstatistik wurde mit der Kaplan-Meier Analyse ausgewertet und mittels Log-Rang-Test (Mantel-Cox) auf Signifikanz überprüft.

Weitere Datensätze, die eine metrische Skalierung besaßen, wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Nur bei Vergleichen zwischen Daten überlebender und zuvor gestorbener Versuchstiere wurde eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt. Bei beiden Varianten wurde die Annahme normalverteilter Daten stets mittels QQ-Diagramme (Quantil-Quantil-Diagramme) der Residuen überprüft.

Handelte es sich um ordinalskalierte Daten (Score), wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und multiplen Testens (Bonferroni-Korrektur) auf signifikante Unterschiede zwischen den Datensätzen geprüft.

In jeglicher Auswertung wurde ein Signifikanzniveau von p  $\leq 0,05$  definiert, Mittelwerte und zugehörige Standardabweichung (SD) wurden im Fließtext wie folgt dargestellt: Mittelwert ( $\pm$  SD). Zur graphischen Darstellung wurden Kurvendiagramme aus den Mittelwerten gebildet oder diese samt SD in Säulendiagrammen dargestellt. Teilweise erfolgte die Kennzeichnung der einzelnen Messwerte in Form von Kreisen.

Während der statistischen Analyse wurde das Angebot für Kurzberatungen durch die Wissenschaftliche Serviceeinheit "Medizinische Biometrie und Statistischen Bioinformatik" (MBSB) der Universitätsmedizin Göttingen angenommen, alle Auswertungen und Darstellungen wurden jedoch selbstständig und ohne weitere Hilfe durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

# 3.1 Vergleich der allogenen ECP im Mausmodell der aGvHD anhand des Überlebens, der Score- und Gewichtsverläufe

Die autologe ECP ist eine etablierte Zweitlinientherapie der GvHD. Auf Grund der hohen Anforderungen an einen periphervenösen Zugang beziehungsweise des nicht unerheblich erhöhten Komplikationsrisikos eines alternativen zentralvenösen Zugangs, der langen Dauer einer Therapiesitzung und der Belastung für den Kreislauf der Patient\*innen (s. 1.2.2), wird bereits an möglichen Modifikationen dieses Prozesses geforscht. Darunter fallen beispielsweise auch Versuche zur allogenen ECP.

In der nun vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Therapie der allogenen ECP im Mausmodell der aGvHD positiv auf die Krankheitslast und das Überleben der Versuchstiere auswirkt. Hierzu wurden die Versuchstiere in drei Gruppen aufgeteilt und nach der Implementierung der Erkrankung per Stamm- und T-Zelltransplantation (s. 2.5) entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit mit insgesamt vier Therapieeinheiten behandelt (s. 2.6). Die erste Gruppe erhielt bei jeder ECP-Therapie eine Injektionslösung in die Schwanzvene, die zuvor mittels 8-MOP und UV-A-Strahlung behandelte und somit apoptoseinduzierte Splenozyten des Spenderstamms FVB (Haplotyp H2-q) enthielt (s. 2.7). Bei der zweiten Gruppe handelte es sich um Splenozyten des Spenderstamms CBA (Haplotyp H2-k), die ebenso mittels 8-MOP und UV-A-Strahlung vorbehandelt waren. Die dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe und erhielt bei jeder Therapieeinheit nur eine PBS-Injektion und keine Spenderleukozyten. Im Folgenden werden die Gruppen auch mit PBS-Kontrollgruppe, FVB-ECP- und CBA-ECP-Therapiegruppe benannt, in den Abbildungen wurden zu Übersichtszwecken die kürzeren Bezeichnungen PBS-Kontrolle, FVB-ECP und CBA-ECP gewählt.

Insgesamt wurden vier Versuchsreihen mit jeweils 20 Versuchstieren durchgeführt. Am Ende umfasste der In-vivo-Versuch jedoch Datensätze von 78 Versuchstieren, von denen 27 zur FVB-ECP-Therapiegruppe, 26 zur CBA-ECP-Therapiegruppe und 25 zur PBS-Kontrollgruppe gehörten. Der Ausschluss der Daten zweier Versuchstiere war der späten Entscheidung, in der vierten Versuchsreihe zwei Versuchstiere zwecks eines Informationsgewinns für nachfolgende Forschungsarbeiten anderweitig zu therapieren, geschuldet. Die oben beschriebenen unausgeglichenen Gruppengrößen ergaben sich demzufolge durch die Einhaltung einer ausgeglichenen Versuchstierverteilung unterschiedlicher Gruppenzugehörigkeiten innerhalb der Käfige in der vierten Versuchsreihe sowie durch die bereits determinierten Verteilungen in den vorangegangenen Versuchsreihen.

Die in dem soeben dargelegten In-vivo-Versuch beobachteten Ergebnisse zum Überleben der Versuchstiere wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier Kurve in Abbildung 1 dargestellt. Von

anfangs 25 Tieren in der PBS-Kontrollgruppe lebten 6 (24,0%) bis zum Versuchsende, aus der Therapiegruppe der FVB-ECP waren es 9 von zu Beginn 27 Tieren (33,3%) und in der CBA-ECP-Therapiegruppe überlebten 7 von 26 Tieren (26,9%). Die Auswertung mittels Log-Rang-Test ergab keinen signifikanten Überlebensvorteil einer der drei Gruppen (p = 0,53) bei einem mittleren Überleben von 27 (PBS-Kontrollgruppe), 31 (FVB-ECP-Therapiegruppe) und 27 (CBA-ECP-Therapiegruppe) Tagen.



**Abbildung 1: Kaplan-Meier-Kurve der drei Versuchsgruppen.** Die Anzahl der Tiere (n) zu Beginn/Ende des Versuchs betrug 25/6 (PBS-Kontrolle), 27/9 (FVB-ECP) und 26/7 (CBA-ECP).

Um auf mögliche Unterschiede in der Krankheitslast rückschließen zu können, wurden die Unterschiede im Score überprüft. Abbildung 2 zeigt die Tagesmittelwerte gegen die Zeit aufgetragen.



**Abbildung 2: Mittelwerte des Scores im Zeitverlauf.** Es ist jeweils der Tagesmittelwert des Scores innerhalb einer Versuchsgruppe über die Zeit dargestellt. Dabei wurden an jedem Tag sowohl die noch lebenden als auch bereits verstorbenen Versuchstiere berücksichtigt, weshalb die Anzahl (n) über die gesamte Zeit 25 (PBS-Kontrolle), 27 (FVB-ECP) und 26 (CBA-ECP) betrug.

Deutlich zu erkennen war hierbei die erste Krankheitswelle der aGvHD um den achten Tag, die erste Tiere nicht überlebten. Der Mittelwert innerhalb einer Gruppe, der stets mit den Datenwerten aller Tiere, auch der bereits verstorbenen, berechnet wurde (s. 2.6), lag zu diesem Zeitpunkt zwischen 4,2 ( $\pm$  1,5) und 4,3 ( $\pm$  1,4) Punkten. Ab Tag acht zeichnete sich zudem eine leichte Divergenz der FVB-ECP-Therapiegruppe mit etwas niedrigeren Mittelwerten gegenüber den anderen beiden Gruppen ab. Ab Tag 28 waren zudem Unterschiede bezügliche der Mittelwerte zwischen der deutlichere CBA-ECP-Therapiegruppe und der PBS-Kontrollgruppe zu sehen. Am letzten Beobachtungstag (Tag 42) betrug der Mittelwert in der FVB-ECP-Therapiegruppe 5,2 (± 1,4) Punkte, in der CBA-ECP-Therapiegruppe 5,3 ( $\pm$  1,8) Punkte und in der PBS-Kontrollgruppe 5,6 ( $\pm$  1,1) Punkte. Die Daten der drei Gruppen wurden an jedem einzelnen Tag mittels Varianzanalyse miteinander verglichen (s. 2.10). Es konnte jedoch an keinem Tag ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, auch nicht an den Tagen 14 und 26, die Tage mit den größten Unterschieden zwischen den Mittelwerten (maximale Differenz von 1,1 Punkten an Tag 14 (PBS-Kontrollgruppe: 2,5 ( $\pm$  2,4) zu FVB-ECP-Therapiegruppe: 1,4 ( $\pm$  2,0)) und 1,0 Punkten an Tag 26 (CBA-ECP-Therapiegruppe:  $4,5 (\pm 2,0)$  zu FVB-ECP-Therapiegruppe:  $3,5 (\pm 2,3)$ ). Bildlich lässt sich dies mit Hilfe von Säulendiagrammen samt SD, wie in Abbildung 3A dargestellt, veranschaulichen. Abbildung 3B gibt einen graphischen Hinweis auf die fehlende Signifikanz in den Gruppenunterschieden, indem, stellvertretend für die in allen Therapiegruppen vorherrschende große Streuung, die Fläche innerhalb der SD der FVB-ECP-Therapiegruppe eingefärbt wurde.



Abbildung 3: Mittelwerte und SD im Score am Tag 14, 26 und im gesamten Zeitverlauf. (A) Mittelwerte und SD des Scores innerhalb einer Therapiegruppe am Tag 14 und 26 im Vergleich. Dargestellt werden die Mittelwerte des Scores mit zugehöriger SD. (B) Darstellung der Tagesmittelwerte des Scores aller drei Therapiegruppen über die Zeit mit Einfärbung der Fläche innerhalb der SD des Scores der FVB-ECP.

Bei der Betrachtung der Gewichtsverläufe, gemessen in Prozent vom Startgewicht und dargestellt als Mittelwert der noch lebenden Versuchstiere, zeigt sich ein gegensätzlicher Verlauf im Vergleich zum Score (s. Abbildung 4).



**Abbildung 4: Mittelwerte des Gewichts im Zeitverlauf.** Es ist jeweils der Tagesmittelwert des Gewichts der noch lebenden Versuchstiere innerhalb einer Versuchsgruppe dargestellt. Die Anzahl der Tiere (n) am Tag 0/Tag 42 betrug 25/6 (PBS-Kontrolle), 27/9 (FVB-ECP) und 26/7 (CBA-ECP).

Die erste Krankheitswelle der aGvHD war auch im Gewichtsverlauf anhand von größeren Gewichtverlusten rund um den achten Tag deutlich zu sehen. Ebenfalls fingen die Durchschnittswerte der drei Gruppen um diese Zeit zu divergieren an. Allerdings gab es mehr Überschneidungen der Kurven als beim Score. Erst ab Tag 18 zeichnete sich stabil ein geringerer Gewichtsverlust der CBA-ECP-Therapiegruppe gegenüber den anderen beiden Gruppen ab. Verlief der Gewichtsverlust der PBS-Kontrollgruppe anfangs milder, so war er am Versuchsende am größten unter den drei Gruppen. Das Gewicht der Mäuse, gemessen am Ausgangswert zu Beginn der Versuchsreihe, betrug an Tag 42 im Mittel 76,6 ( $\pm$  13,4)% in der CBA-ECP-Therapiegruppe (n = 7), 70,7 ( $\pm$  10,5)% in der FVB-ECP-Therapiegruppe (n = 9) und 69,7 (± 6,0)% in der PBS-Kontrollgruppe (n = 6). Der statistische Vergleich aller drei Gruppen an jedem einzelnen Tag mittels Varianzanalyse zeigte an keinem Tag einen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen. Graphisch verdeutlicht dies Abbildung 5A anhand eines Säulendiagramms der zwei Tage mit den größten Differenzen zwischen den Gewichtsmittelwerten, Tag 29: 7,4% (CBA-Therapiegruppe (n = 12):  $78,9 (\pm 13,9)\%$  zu PBS-Kontrollgruppe (n = 12):  $71,5 (\pm 7,7)\%$ ) und Tag 38: 8,3% (CBA-Therapiegruppe (n = 12): 79,9 ( $\pm$  14,1)% zu PBS-Kontrollgruppe (n = 12):71,6 ( $\pm$  5,0)%). Abbildung 5B gibt wiederum für die gesamte Beobachtungszeit einen graphischen Hinweis auf die fehlende Signifikanz in den Gruppenunterschieden, indem, stellvertretend für die in allen Therapiegruppen vorherrschende große Streuung, die Fläche innerhalb der SD der FVB-ECP-Therapiegruppe eingefärbt wurde.



Abbildung 5: Mittelwerte und SD im Gewicht am Tag 29, 38 und im gesamten Zeitverlauf. (A) Mittelwerte und SD des Gewichts am Tag 29 und 38 im Vergleich. Dargestellt sind die Mittelwerte des Gewichts der noch lebenden Tiere innerhalb einer Therapiegruppe samt zugehöriger SD. (B) Darstellung der Tagesmittelwerte des Gewichts der noch lebenden Tiere aller drei Therapiegruppen über die Zeit mit Einfärbung der Fläche innerhalb der SD des Gewichts der FVB-ECP.

Um eine mögliche Verzerrung der Ergebnisse, die auf ein unterschiedlich gutes Anwachsen des Transplantats bei den Tieren der verschiedenen Therapiegruppen zurückzuführen wäre, auszuschließen, wurde eine Chimärismusfärbung der Splenozyten aller überlebender Versuchstiere an Tag 42 vorgenommen. Hierbei konnte durch die Markierung spezifischer Oberflächenproteine auf den Splenozyten des Empfänger- (BALB/c) und Spenderstamms (C57BL/6) (s. 2.8.5) in der Durchflusszytometrie der jeweilige Anteil an den gesamt gemessenen Zellen ermittelt werden. Im statistischen Vergleich mittels Varianzanalyse konnte kein signifikanter Unterschied im Chimärismus zwischen den Tieren der drei Versuchsgruppen festgestellt werden. Wie in Abbildung 6 dargestellt, betrug der Durchschnitt des Chimärismus der Spenderstammzellen (C57BL/6) in der FVB-ECP-Therapiegruppe 68,7 ( $\pm$ 24,3)% (n = 9), in der CBA-ECP-Therapiegruppe 70,1 ( $\pm$ 17,8)% (n = 7) und in der PBS-Kontrollgruppe 71,1 ( $\pm$  6,9)% (n = 6). Im Mittel aller transplantierten Tiere konnte ein Wert von 69,8 ( $\pm$  18,1)% festgestellt werden.



Abbildung 6: Anteil der Splenozyten mit Spenderstammursprung C57BL/6 im Vergleich. Anteile der Splenozyten mit genetischem Ursprung des Transplantats (C57BL/6) der überlebenden Versuchstiere an Tag 42. Dargestellt werden die Mittelwerte des prozentualen Anteils samt zugehöriger SD.

# 3.2 Vergleich der allogenen ECP im Mausmodell der aGvHD anhand verschiedener Zellpopulationen

Um einen näheren Einblick in die Verhältnisse verschiedener Zellpopulationen der Versuchstiere zum Todeszeitpunkt zu erhalten, wurden die Splenozyten eines jeden eingeschläferten Versuchstiers gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (s. 2.8). Hierbei ist zu beachten, dass keine Datensätze von bereits im Käfig tot aufgefundenen Tieren erhoben werden konnten. Zudem reichte die Anzahl der isolierten Splenozyten nicht immer aus, um alle zu untersuchenden Zellen analysieren zu können. Daher variiert die Anzahl der Messpunkte (n) in den Datensätzen. Von besonderem Interesse waren T-Helferzellen (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), zytotoxische T-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), NK-Zellen (CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>), NK-T-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>) und regulatorische T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), deren Anteil an den gemessenen Splenozyten im Folgenden je mittels Varianzanalyse (s. 2.10) auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen untersucht wurden. Zudem konnte innerhalb der genannten Zellpopulationen - die regulatorischen T-Zellen ausgenommen - eine weitere Differenzierung zwischen den Zellen vorgenommen werden. Hierbei handelte es sich um die Unterscheidung zwischen Zellen mit oder ohne den Aktivitätsmarker CD69. Dieser stellt eine frühe Aktivierung der Zellen dar und kann gesonderte Hinweise auf die Funktionalität der Zellen liefern. Als wichtiges Verhältnis wurde zudem der CD4/CD8-Quotient betrachtet.

#### 3.2.1 Population der T-Helferzellen im Vergleich

T-Helferzellen sind CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen, die die MHC-Klasse-II-Komplexe auf APZ erkennen können. Sie werden weiter unterteilt in T-Helferzellen Typ 1 ( $T_{\rm H}$ 1-Zellen) und T-Helferzellen Typ 2 ( $T_{\rm H}$ 2-Zellen) und spielen eine wichtige Rolle in der adaptiven Immunität. Sie helfen bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene, indem sie B-Zellen zur Antikörperproduktion aktivieren können ( $T_H1$ -Zellen,  $T_H2$ -Zellen). Ebenso unterstützen sie die Abwehr intrazellulärer Bakterien durch Aktivierung befallener Zellen, etwa Makrophagen, (nur  $T_H1$ -Zellen).

Im Rahmen des *Full-Mismatch*-Mausmodells der aGvHD spielen die T-Helferzellen eine maßgebliche Rolle bei der Ausprägung der aGvHD, indem sie bei Erkennung fremder Antigene eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Um die Auswirkung der Therapie mittels allogener ECP auf diese Zellpopulation prüfen zu können, wurden die Zellen im Folgenden analysiert.

Zum Todeszeitpunkt betrug der Anteil der T-Helferzellen unter den gemessenen Splenozyten im Mittel zwischen 2,1 ( $\pm$  1,2)% und 3,3 ( $\pm$  3,1)%. Von diesen betrug der Mittelwert der mit dem Aktivitätsmarker CD69 versehenen T-Helferzellen zwischen 66,9 ( $\pm$  23,8)% und 68,6 ( $\pm$  18,2)% (s. Abbildung 7). In der Varianzanalyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Hinblick auf die T-Helferzellen festgestellt werden.



Abbildung 7: Mittelwerte der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen (T-Helferzellen). (A) Anteil der T-Helferzellen an allen Splenozyten (B) Anteil der aktivierten T-Helferzellen (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>) an den gemessenen T-Helferzellen. Es sind jeweils die Mittelwerte samt zugehöriger SD der T-Helferzellpopulationen dargestellt.

Auch bei der Differenzierung zwischen überlebenden und bereits im Verlauf verstorbenen Versuchstieren konnte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied, weder zwischen den Überlebenden und Verstorbenen im Allgemeinen noch zwischen den Therapiegruppen für die T-Helferzellen, festgestellt werden (s. Abbildung 8).



Abbildung 8: Mittelwerte der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen (T-Helferzellen) im Vergleich zwischen überlebenden und im Verlauf verstorbenen Versuchstieren. (A) Anteil der T-Helferzellen an allen Splenozyten differenziert in überlebende und vorzeitig verstorbene Versuchstiere (B) Anteil der aktivierten T-Helferzellen (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>) an den gemessenen T-Helferzellen differenziert in überlebende und vorzeitig verstorbene Versuchstiere. Es werden die Mittelwerte samt zugehöriger SD der T-Helferzellpopulationen dargestellt.

#### 3.2.2 Population der zytotoxischen T-Zellen im Vergleich

Zytotoxische T-Zellen sind CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen, welche MHC-Klasse-I-Komplexe, die auf jeder Körperzelle ausgebildet werden, erkennen können. Ihre Rolle für die adaptive Immunität besteht vor allem darin, Proteine von intrazellulären Pathogenen, die ihnen auf den MHC-Klasse-I-Komplexen präsentiert werden, als fremd zu erkennen und die befallenen Zellen abzutöten.

Auch diese Zellpopulation ist im Mausmodell der aGvHD durch ihre entzündungsfördernden Eigenschaften entscheidend an der Krankheitslast beteiligt. Eine mögliche Auswirkung der durchgeführten allogenen ECP-Therapie auf diese Zellpopulation wurde nachfolgend analysiert.

In den stattgefundenen Versuchen betrug der Anteil der zytotoxischen T-Zellen unter den gemessenen Splenozyten zum Todeszeitpunkt der Tiere im Mittel zwischen  $3,9 (\pm 1,9)\%$  und  $5,1 (\pm 4,3)\%$ . Hiervon prägten im Mittel  $39,4 (\pm 19,2)\%$  und  $42,6 (\pm 22,2)\%$  der Zellen den Aktivitätsmarker CD69 aus (s. Abbildung 9). In der Varianzanalyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Hinblick auf die zytotoxischen T-Zellen festgestellt werden.



Abbildung 9: Mittelwerte der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen (zytotoxische T-Zellen). (A) Anteil der zytotoxischen T-Zellen an allen Splenozyten (B) Anteil der aktivierten zytotoxischen T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>) an den gemessenen zytotoxischen T-Zellen. In der Graphik sind die Mittelwerte samt zugehöriger SD der jeweiligen zytotoxischen T-Zellpopulation dargestellt.

In der Analyse etwaiger Unterschiede zwischen überlebenden und bereits im Verlauf verstorbenen Versuchstieren konnte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die zytotoxischen T-Zellen, weder der Überlebenden gegenüber den Verstorbenen noch zwischen den Therapiegruppen, festgestellt werden (s. Abbildung 10).



Abbildung 10: Mittelwerte der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen (zytotoxische T-Zellen) im Vergleich zwischen überlebenden und im Verlauf verstorbenen Versuchstieren. (A) Anteil der zytotoxischen T-Zellen an allen Splenozyten differenziert in überlebende und vorzeitig verstorbene Versuchstiere (B) Anteil der aktivierten zytotoxischen T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>) an den gemessenen zytotoxischen T-Zellen differenziert in überlebende und vorzeitig verstorbene Versuchstiere. Dargestellt sind die Mittelwerte samt zugehöriger SD der einzelnen zytotoxischen T-Zellpopulationen.

#### 3.2.3 CD4/CD8-Quotient

Da der CD4/CD8-Quotient bei chronisch immunologischen Erkrankungen häufig verändert ist, wurde dieser im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung durch die Therapie mittels ECP analysiert. Dabei konnte in der Auswertung mittels Varianzanalyse kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden, weder im allgemeinen Vergleich noch bei der Unterscheidung zwischen überlebenden und vorzeitig verstorbenen Versuchstieren. Im Mittel betrug der CD4/CD8-Quotient zwischen  $0,57 (\pm 0,33)$  (FVB-ECP-Therapiegruppe) und  $0,65 (\pm 0,40)$  (CBA-ECP-Therapiegruppe) im allgemeinen Vergleich (s. Abbildung 11).



Abbildung 11: Mittelwerte der CD4/CD8-Quotienten. Es werden die Mittelwerte samt zugehöriger SD der jeweiligen CD4/CD8-Quotienten dargestellt. (A) Alle Tiere einer Gruppe im Vergleich.
(B) Differenzierung zwischen überlebenden und vorzeitig verstorbenen Versuchstieren.

#### 3.2.4 Population der NK-Zellen im Vergleich

NK-Zellen sind CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> Zellen, die als Bestandteil der unspezifischen Immunität in einer frühen Infektionsphase Zellen, die mit intrazellulären Pathogenen infiziert sind, abtöten können. Sie fördern eine Differenzierung der T-Helferzellen in die T<sub>H</sub>1-Zellen.

Der Anteil der NK-Zellen zeigte sich unter den gemessenen Splenozyten zum Todeszeitpunkt der Tiere im Mittel zwischen  $1,7 (\pm 1,3)\%$  und  $1,9 (\pm 1,5)\%$ . Der Aktivitätsmarker CD69 ließ sich unter diesen Zellen im Mittel bei  $11,3 (\pm 5,5)\%$  und  $14,0 (\pm 6,1)\%$  der Zellen finden (s. Abbildung 12). In der Varianzanalyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Hinblick auf die Population der NK-Zellen festgestellt werden.



**Abbildung 12: Mittelwerte der CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup> Zellen (NK-Zellen).** (A) Anteil der NK-Zellen an allen Splenozyten (B) Anteil der aktivierten NK-Zellen (CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>) an den gemessenen NK-Zellen. Es werden die Mittelwerte samt zugehöriger SD der jeweiligen NK-Zellpopulation dargestellt.

Bei der Differenzierung zwischen überlebenden und bereits im Verlauf verstorbenen Versuchstieren konnte allerdings mittels zweifaktorieller Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dementsprechend war der Anteil der CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup> Zellen in der Gruppe aller Überlebenden gegenüber der Gruppe aller vorzeitig Verstorbenen signifikant höher (p = 0,014) (s. Abbildung 13A). In nachfolgenden multiplen Vergleichen im Rahmen der zweifaktoriellen Varianzanalyse konnte jedoch kein weiterer signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ebenso wenig zeigte die zweifaktorielle Varianzanalyse zwischen den aktivierten NK-Zellen (CD69<sup>+</sup>) signifikante Unterschiede auf (s. Abbildung 13B).



Abbildung 13: Mittelwerte der CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup> Zellen (NK-Zellen) im Vergleich zwischen
überlebenden und im Verlauf verstorbenen Versuchstieren. (A) Anteil der NK-Zellen an allen
Splenozyten differenziert in überlebende und vorzeitig verstorbene Versuchstiere. (B) Der Vergleich mittels
zweifaktorieller Varianzanalyse ergab signifikant höhere Anteile der NK-Zellen an den gesamt gemessenen
Splenozyten in der Gruppe aller Überlebenden gegenüber der Gruppe aller Verstorbenen (p = 0,014).
(C) Anteil der aktivierten NK-Zellen (CD3<sup>-</sup> CD49b<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>) an den gemessenen NK-Zellen differenziert in
überlebende und vorzeitig verstorbene Versuchstiere. Dargestellt werden die Mittelwerte samt zugehöriger
SD der jeweiligen NK-Zellpopulation.

#### 3.2.5 Population der NK-T-Zellen im Vergleich

NK-T-Zellen sind  $CD3^+CD49b^+T$ -Zellen, die somit zur adaptiven Immunität gehören, aber ähnlich wie Zellen der angeborenen Immunität agieren. Durch eine schnelle Zytokinausschüttung in der Anfangsphase einer Infektion fördern sie die Differenzierung der T-Helferzellen hin zu den T<sub>H</sub>2-Zellen.

Im Versuch zeigte sich zum Todeszeitpunkt der Versuchstiere der Anteil der NK-T-Zellen unter den gemessenen Splenozyten im Mittel zwischen  $2,4 (\pm 1,3)\%$  und  $2,9 (\pm 1,9)\%$ . Aktivierte NK-T-Zellen, die den Aktivitätsmarker CD69 ausbildeten, waren im Mittel zwischen  $73,4 (\pm 19,1)\%$  und  $78,9 (\pm 6,2)\%$  vertreten (s. Abbildung 14). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Hinblick auf diese Zellpopulation mittels Varianzanalyse feststellen.



**Abbildung 14: Mittelwerte der CD3<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> Zellen (NK-T-Zellen).** (A) Anteil der NK-T-Zellen an allen Splenozyten (B) Anteil der aktivierten NK-T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>) an den gemessenen NK-T-Zellen. Es werden die Mittelwerte samt zugehöriger SD der jeweiligen NK-T-Zellpopulation dargestellt.

In einer zweifaktoriellen Varianzanalyse der Daten der NK-T-Zellen zur genaueren Differenzierung zwischen den überlebenden und bereits im Verlauf verstorbenen Versuchstieren konnten auch keine signifikanten Unterschiede in jeglicher Hinsicht festgestellt werden (s. Abbildung 15).



Abbildung 15: Mittelwerte der CD3<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> Zellen (NK-T-Zellen) im Vergleich zwischen überlebenden und im Verlauf verstorbenen Versuchstieren. (A) Anteil der NK-T-Zellen an allen Splenozyten, differenziert in überlebende und vorzeitig verstorbene Versuchstiere (B) Anteil der aktivierten NK-T-Zellen (CD3<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>) an den gemessenen NK-T-Zellen, differenziert in überlebende und vorzeitig verstorbene Versuchstiere. Die Ergebnisdarstellung erfolgt in Form der Mittelwerte samt zugehöriger SD der jeweiligen NK-T-Zellpopulation.

#### 3.2.6 Population der regulatorischen T-Zellen im Vergleich

Regulatorische T-Zellen sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen, die zudem den Transkriptionsfaktor FoxP3 ausbilden. Sie dienen der Regulation einer überschießenden Immunantwort und spielen eine Rolle bei der Verhinderung von Autoimmunität. Demzufolge wurde auch bei dieser Zellpopulation im Folgenden die Auswirkung der ECP-Therapie im Mausmodell der aGvHD untersucht.

Im Mittel betrug der Anteil der gemessenen regulatorischen T-Zellen zum Todeszeitpunkt der Versuchstiere zwischen  $3,5 (\pm 2,1)\%$  und  $3,6 (\pm 2,4)\%$  (s. Abbildung 16). Wie durch die Abbildung bereits absehbar, ergab die Varianzanalyse nicht den Nachweis eines signifikanten Unterschieds zwischen den Gruppen.



Abbildung 16: Mittelwerte der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Zellen (regulatorische T-Zellen). Anteil der regulatorischen T-Zellen an allen Splenozyten. Dargestellt werden die Mittelwerte samt zugehöriger SD der jeweiligen regulatorischen T-Zellpopulation.

Dies war auch nicht bei der Differenzierung zwischen überlebenden und bereits im Verlauf verstorbenen Versuchstieren der Fall. In der zweifaktoriellen Varianzanalyse konnte kein signifikanter Unterschied, weder der Überlebenden gegenüber den Verstorbenen noch zwischen den Therapiegruppen, für die Zellpopulation der regulatorischen T-Zellen festgestellt werden (s. Abbildung 17).



Abbildung 17: Mittelwerte der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Zellen (regulatorische T-Zellen) im Vergleich zwischen überlebenden und im Verlauf verstorbenen Versuchstieren. Es werden die Mittelwerte samt zugehöriger SD der jeweiligen regulatorischen T-Zellpopulation dargestellt.

# 3.3 Vergleich der allogenen ECP in der MLR anhand verschiedener Zytokine

Ergänzend zu den klinischen Daten wurde der In-vivo-Versuch in einer MLR nachgestellt, um auf unterschiedliche Zytokinausbildungen in Abhängigkeit von den verschiedenen Therapiegruppen prüfen zu können (s. 2.9.1). Hierfür wurden zuvor bestrahlte Splenozyten (Stimulatorzellen) des Mausstamms BALB/c (Haplotyp H2-d) zusammen mit unbehandelten Splenozyten (Responderzellen) des Mausstamms C57BL/6 (Haplotyp H2-b) in einem Zellkulturmedium inkubiert, um am Folgetag mit dem DNA-Interkalator 8-MOP und UV-A-Strahlung behandelte Splenozyten (entsprechend der ECP-Therapie; weitere Stimulatorzellen) (s. 2.7.2) hinzuzufügen. Bei letztgenannten Splenozyten handelte es sich um Zellen der Mausstämme FVB (Haplotyp H2-q), CBA (Haplotyp H2-k) und C3H (Haplotyp H2-k). Letzterer Stamm wurde im Verlauf zusätzlich gewählt, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Therapie mittels allogener ECP des Mausstamms C3H im Mausmodell der aGvHD signifikante Überlebensvorteile aufweist (Budde et al. 2018). Einem Ansatz wurde als Kontrollgruppe stets nur zellfreies Zellkulturmedium zugesetzt. Nach weiteren zwei Inkubationstagen wurde am dritten Tag nach Versuchsansatz die Färbung von Responderzellen (C57BL/6), welche die Interleukine IL-2 (CD3<sup>+</sup> Zellen), IL-10 (CD4<sup>+</sup> Zellen) und das Zytokin TNF- $\alpha$  (CD3<sup>+</sup> Zellen) ausprägten, vorgenommen (s. 2.9.3). Diese Moleküle waren deswegen von besonderer Bedeutung, da IL-2, auch T-Zellwachstumsfaktor genannt, für die Proliferation von T-Zellen wichtig ist, IL-10 einige Funktionen von Makrophagen hemmt und TNF-α allgemein entzündungsfördernd ist. Die erhobenen Daten wurden im Folgenden miteinander verglichen und auf signifikante Unterschiede geprüft. Auch hier variiert die Anzahl der Einzelwerte (n) teilweise, da nicht in jeder Versuchsreihe alle vier Ansätze durchgeführt oder alle Zelltypen gefärbt werden konnten.

In der Varianzanalyse konnte bei keiner Zellgruppe ein signifikanter Unterschied zwischen den vier verschiedenen MLR-Gruppen festgestellt werden. Dies lässt sich allein im Hinblick auf die Spannbreite der Mittelwerte nachvollziehen. So lagen diese in der Untersuchung auf IL-2-haltige CD3<sup>+</sup> Responderzellen zwischen 9,4 ( $\pm$  3,3)% (C3H-ECP) und 11,7 ( $\pm$  2,5)% (FVB-ECP), in der Untersuchung auf IL-10-haltige CD4<sup>+</sup> Responderzellen zwischen 21,4 ( $\pm$  1,6)% (PBS-Kontrolle) und 26,3 ( $\pm$  3,8)% (C3H-ECP) und in der Untersuchung auf TNF- $\alpha$ -haltige CD3<sup>+</sup> Responderzellen zwischen 11,4 ( $\pm$  6,3)% (C3H-ECP) und 12,5 ( $\pm$  3,0)% (PBS-Kontrolle). Trotz fehlender Signifikanz in den Unterschieden fiel auf, dass stets die MLR der C3H-ECP den höchsten (IL-10-Untersuchung) oder den niedrigsten (IL-2- und TNF- $\alpha$ -Untersuchung) Mittelwert einnahm. In Abbildung 18 sind die Mittelwerte innerhalb einer Gruppe, die SD und die einzelnen Messpunkte in Form von Säulendiagrammen dargestellt.



**Abbildung 18: Mittelwerte der IL-2- (A), IL-10- (B) und TNF-α- (C) bildenden Zellen im Vergleich.** Es sind jeweils die Mittelwerte samt ihrer zugehörigen SD und die einzelnen Messpunkte als Kreise dargestellt.

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass die allogene ECP mit Splenozyten eines dritten, in den MHC weder mit dem Stammzellspender noch mit dem Stammzellempfänger übereinstimmenden Stamms (C3H, H2-k) im Mausmodell der aGvHD (C57BL/6  $\rightarrow$ BALB/c, full mismatch) einen signifikanten Überlebensvorteil aufwies (Budde et al. 2018), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich bei weiteren genetisch unterschiedlichen Spenderstämmen ein solcher Therapieerfolg reproduzieren lässt. Hierfür wurden die Mausstämme FVB (H2-q) und CBA (H2-k) zur Zellspende für die ECP ausgewählt. Diese unterscheiden sich wie auch bereits der Stamm C3H in den Haplotypen der MHC sowohl vom Empfängerstamm (BALB/c, H2-d) als auch vom Stamm der Stammund T-Zellspende (C57BL/6, H2-b). Die Versuchstiere erhielten vier ECP-Therapien in einem wöchentlichen Abstand. Die erste ECP erfolgte drei Tage nach Stamm- und T-Zelltransplantation. Bei Versuchsende, 42 Tage nach Transplantation, konnte weder bei der Versuchsgruppe der FVB-ECP noch der CBA-ECP ein signifikanter Überlebensvorteil oder eine mildere Krankheitslast gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Zudem konnte - mit Ausnahme der Population der NK-Zellen - kein signifikanter Unterschied in den untersuchten Immunzellpopulationen bei Lebensende der Versuchstiere festgestellt werden.

In einer MLR wurde die Zytokinausprägung von Splenozyten des Stamms C57BL/6 (entspricht dem Transplantat im *In-vivo*-Versuch) nach Stimulation durch Splenozyten des Stamms BALB/c (Empfängerstamm) und einer Behandlung mittels allogener ECP durch den Stamm FVB, CBA und C3H, letztere als weitere Kontrolle, ausgewertet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung IL-2-, IL-10- oder TNF- $\alpha$ -exprimierender CD3<sup>+</sup> beziehungsweise CD4<sup>+</sup> Zellen festgestellt werden.

# 4.1 Allogene ECP verschiedener genetischer Hintergründe im Vergleich

#### 4.1.1 Bedeutung von MHC und miHA

Capitini et al. (2011) konnten bereits zeigen, dass in einem nicht-tödlichen Mausmodell der GvHD, basierend auf einer fehlenden Übereinstimmung der miHA bei gleichzeitiger Übereinstimmung der MHC (C57BL/6  $\rightarrow$  C3H.SW, Haplotyp H2-b), sowohl die Therapie mittels einer ECP mit Zellen des Spenderstamms (C57BL/6), des Empfängerstamms (C3H.SW) als auch mit Zellen zweier genetisch unverwandter Stämme (BALB/c, Haplotyp H2-b; C3H.HeNcr, Haplotyp H2-k) zu einer signifikanten Minderung der Krankheitssymptome (Gewichtsverlust) führen konnte. Besonders letzterer Mausstamm ist mit seinem abweichenden Haplotyp im MHC hervorzuheben, da es den Therapieerfolg in Abhängigkeit von der Übereinstimmung des MHC bereits in Frage stellt. Zudem wurden in

\_\_\_\_\_

49

dieser Studie wie auch in der vorliegenden Arbeit nicht-alloreaktive Zellen für die Durchführung der ECP verwendet. Das ist insofern relevant, als dies eine Abweichung zum bisherigen Therapieablauf bei Patient\*innen darstellt, bei dem durch die Leukapherese des Patient\*innenbluts stets alloreaktive Zellen zur Therapie gewonnen werden. Der hier Anwendung gefundene Ansatz stellt allerdings die Grundlage von Therapien mit nichtaktivierten Zellen gesunder Spender\*innen dar.

Dass eine ECP im Mausmodell, die den derzeitigen Abläufen einer ECP bei den Patient\*innen entspricht, signifikante Therapieerfolge aufweist, konnten bereits Gatza et al. (2008) in einem Mausmodell mit MHC-Kompatibilität bei gleichzeitiger miHA-Inkompatibilität nachweisen. Budde et al. (2014) wiederum zeigten die Effektivität einer ECP-Therapie für das auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Full-Mismatch-Mausmodell der aGvHD. Dabei wurden die Zellen für die ECP zwar nicht durch ein technisch bisher unmögliches Aphereseverfahren für Mäuse gewonnen, allerdings von Mäusen des gleichen Modells der aGvHD. Die somit gewonnenen Zellen waren ebenso wie bei den Patient\*innen alloreaktiv. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Capitini et al. (2011) wurde in den nachfolgenden Untersuchungen kein signifikanter Therapieerfolg im Full-Mismatch-Mausmodell der aGvHD mittels einer ECP mit nicht-alloreaktiven Zellen des Stammzellspender- oder des Stammzellempfängerstamms von gesunden Mäusen festgestellt (Budde et al. 2018). Dass wiederum die Therapie mit den nicht-alloreaktiven Zellen des Stamms C3H in diesem Mausmodell einen signifikanten Therapieerfolg gegenüber der Kontrollgruppe aufweisen konnte, blieb bis dato ungeklärt (Budde et al. 2018). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen allerdings darauf hin, dass der Therapieerfolg einer ECP mit nicht-alloreaktiven Zellen nicht maßgeblich von der fehlenden oder vorhandenen Übereinstimmung des MHC abhängig ist. Darauf deutet ebenso die Tatsache hin, dass die Stämme C3H und CBA den gleichen Haplotyp (H2-k) vorweisen und dennoch der eine Stamm wesentlich erfolgreicher als der andere Stamm in der ECP-Therapie war. Der fehlende signifikante Therapieerfolg der Behandlung mittels CBA-ECP und FVB-ECP in dieser Arbeit stellt klar, dass nicht grundsätzlich von höheren Erfolgsaussichten mit Zellen von Drittzellspendern im Mausmodell der aGvHD ausgegangen werden kann, wie es möglicherweise nach den Ergebnissen von Budde et al. (2018) hätte gemutmaßt werden können. In diesem Zusammenhang bleibt allerdings die Frage, welche Mechanismen zum Therapieerfolg beziehungsweise dessen Fehlen geführt haben könnten, besonders im Hinblick auf die unterschiedlichen Ergebnisse mit den Zellen des Stamms C3H und CBA. Zudem bleibt vor all diesen Ergebnissen unklar, welche Rolle alloreaktive Zellen in dem vorliegenden Versuchsaufbau spielen.

Wenn der MHC keine ausschlaggebende Rolle zu spielen scheint, welche Bedeutung tragen dann die miHA im *Full-Mismatch*-Mausmodell der aGvHD? Die Stämme C3H und CBA unterscheiden sich darin jeweils sowohl zum Empfängerstamm (BALB/c) des verwendeten Mausmodells als auch zum Stammzellspenderstamm (C57B/6). Bereits Capitini et al. (2011) vermuteten auf Grundlage ihrer Versuche im oben erwähnten Mausmodell der GvHD einen maßgeblichen Einfluss auf den Erfolg der ECP in Abhängigkeit vom Vorhandensein bestimmter miHA. Hierzu bedarf es weiterer systematischer Forschung, um die Bedeutung und Einflussnahme dieser Antigene besser erfassen zu können.

#### 4.1.2 Bedeutung von Monozyten und DC in der ECP

Werden noch einmal unabhängig von obigen Überlegungen die bisherigen Erkenntnisse und Theorien zum Wirkmechanismus der ECP beleuchtet, fällt auf, dass darin Monozyten und DC eine zentrale Rolle übernehmen (Edelson 2014; Hackstein et al. 2021; Maeda et al. 2005). So beobachteten Maeda et al. (2005) bereits, dass der Erfolg durch die Therapie mittels ECP in einem Kontakthypersensitivitäts-Mausmodell ausblieb, wenn CD11c<sup>+</sup> Zellen, zu denen sowohl Monozyten als auch DC gehören, aus der therapeutischen Injektion zuvor depletiert wurden. Hackstein et al. (2021) stützten diese Erkenntnisse durch weitere Versuche in einem solchen Mausmodell, in denen bereits geringe Dosen aufgereinigter und mittels ECP behandelter CD11c<sup>+</sup> DC einen Therapieerfolg herbeiführten. Auch in diesen Experimenten ging der therapeutische Effekt bei Depletion dieser DC verloren. Maeda et al. (2005) beobachteten zudem, dass der Therapieeffekt mit Milz- und Lymphknotenzellen, die drei Wochen vor Injektion mit 8-MOP und UV-A-Strahlung behandelt wurden, ausblieb. Dies wurde auf die zwar langsamer als bei den Lymphozyten fortschreitende, aber durchaus vorhandene Apoptose der CD11c<sup>+</sup> DC zurückgeführt.

Die These, dass alle CD11c<sup>+</sup> Zellen durch die ECP schlussendlich in Apoptose gehen, wird allerdings nicht grundsätzlich angenommen. Eher finden sich Hinweise darauf, dass Monozyten durch die ECP-Behandlung nicht in Apoptose gehen (Yoo et al. 1996), sondern dass ein Reiz zur Ausdifferenzierung zu (unreifen) DC mit variablen Überlebenszeiten gesetzt wird (Berger et al. 2001; Edelson 2014; Goussetis et al. 2012). Berger et al. (2010) fanden heraus, dass Monozyten in Blutproben von sowohl gesunden als auch von an CTCL oder GvHD erkrankten Personen durch die Behandlung mit 8-MOP und UV-A-Strahlung sich bereits in den ersten Stunden danach zu voll funktionsfähigen DC weiterentwickelten. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es zumindest für die Generierung von DC keinen Unterschied darstellt, ob zur ECP bereits alloreaktive Zellen von Patient\*innen oder nicht-alloreaktive Zellen von gesunden Spender\*innen – wie in der vorliegenden Arbeit – verwendet werden. Eine Aussage über die grundsätzliche Notwendigkeit alloreaktiver apoptotischer T-Zellen, die phagozytiert werden und deren Antigene dadurch dem Immunsystem präsentiert werden können, ist hieraus für den Therapieerfolg einer autologen oder allogenen ECP allerdings nicht ableitbar.

Unreife DC, wie sie durch die ECP aus Monozyten vermehrt gebildet werden, haben eine hohe Phagozytosekapazität (Lutz und Schuler 2002) und können vermehrt apoptotische Zellen aufnehmen, wodurch sie zu halbreifen DC heranwachsen (Oliven und Shechter 2001). Goussetis et al. (2012) vermuteten, dass diese halbreifen DC nach Abschluss der ECP und Reinfusion in die subkortikalen Regionen von Lymphknoten auswandern, wo sie in Kontakt zu naiven T-Zellen gelangen. Auf Grund ihres Reifestatus präsentierten sie zwar viele Antigene und Ko-Stimulationssignale, sie schütteten allerdings keine proinflammatorischen Zytokine aus. Stattdessen schafften sie ein immuntoleranzförderndes Milieu durch bestimmte Mediatoren, beispielsweise IL-10 (Goussetis et al. 2012; Lutz und Schuler 2002). Dies fördere unter anderem die Ausreifung regulatorischer T-Zellen, welche wiederum den Ausprägungen und Mechanismen der GvHD entgegenwirkten (Gatza et al. 2008; Goussetis et al. 2012, Pillai et al. 2009).

Vor diesem Hintergrund kommt der Zahl der mittels ECP behandelten Monozyten und DC eine maßgebliche Rolle zu. Doch ebenso wie bereits Gatza et al. (2008) annahmen, dass die Verteilung der verschiedenen Leukozyten in der Milz denen im Serum gleiche, wurde auch in der vorliegenden Arbeit von diesem Verhältnis ausgegangen und demzufolge keine weitere Differenzierung zwischen den zur Behandlung gewonnenen Splenozyten vorgenommen. Weder im Vergleich von Serum zu Milz noch im Vergleich zwischen den Mausstämmen FVB, CBA und C3H wurde eine Zellanalyse durchgeführt. Allerdings stellten Hensel et al. (2019) fest, dass es bisher keinen Konsens zu den Immunzellprofilen von Knochenmark und Milz präklinischer Mäuse gibt. Daraufhin fanden sie heraus, dass sich der prozentuale Anteil verschiedener Zellpopulationen in der Milz von Mausstamm zu Mausstamm, teilweise sogar bereits von weiblichen zu männlichen Exemplaren, signifikant unterscheiden kann. Daher stellt sich die Frage, ob es auch zwischen den drei Mausstämmen FVB, CBA und C3H größere Unterschiede in ihrem Anteil an CD11c<sup>+</sup> DC und Monozyten in der Milz gibt, die unterschiedliche Konzentrationen dieser Zellen in der ECP zur Folge haben. Ob diese möglichen Differenzen die hiesigen Versuchsergebnisse und die aus der Arbeit von Budde et al. (2018) bereits vorgestellten erklären können, bleibt abzuwarten.

Nach den bisherigen Erläuterungen ist auch nicht ausgeschlossen, dass der Erfolg einer ECP vor allem vom Anteil der behandelten Monozyten, die dann erst zu DC ausreifen, abhängt (Edelson 2014). Monozyten kommen allerdings vorwiegend im zirkulierenden Blut vor und differenzieren aus, sobald sie in ein Gewebe migrieren. Somit ist anzunehmen, dass die Anzahl der in den vorliegenden Versuchen behandelten Monozyten verschwindend gering gewesen sein müsste, da sich diese eher zufällig während der Präparation der Milz der Spendertiere im gerade durchfließenden Blutvolumen befunden haben müssten. Die unterschiedlichen Therapieerfolge der drei Spenderstämme FVB, CBA und C3H könnten dann dem Zufall überlassen gewesen sein. Zur Klärung dieser Theorie bedarf es weiterer Versuche.

Schließlich soll noch ein kurzer Blick auf die konkrete Durchführung der ECP selbst geworfen werden. Zur Transformation der behandelten Monozyten in DC scheint die Wechselwirkung zwischen Kunststoffoberflächen, Thrombozyten und Monozyten eine entscheidende Rolle zu spielen (Edelson 2014). Da im Mausmodell eine Leukapherese nicht möglich ist und die Zellen zur ECP aus der Milz mit entsprechend anderen Verfahren gewonnen werden, muss gegebenenfalls von anderen Aktivierungsraten von Monozyten im Mausversuch gegenüber denen bei den Patient\*innen ausgegangen werden. Da die konkrete Durchführung der ECP in der vorliegenden Arbeit allerdings für alle Therapiegruppen gleich war und sie sich ebenfalls nicht im Protokoll zur Therapiegruppe mit den Zellen des Mausstamms C3H unterschieden (Budde et al. 2018; Papert 2016), kann hierin keine Erklärung für das unterschiedliche Therapieansprechen der allogenen ECP gefunden werden.

### 4.2 Auswirkung der allogenen ECP auf spezifische Zellpopulationen

#### 4.2.1 T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Bezug auf Unterschiede in der Ausprägung der T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>), zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) und regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) decken sich mit den Beobachtungen anderer Forschungsarbeiten. So konnten zum Beispiel Budde et al. (2018) im Mausmodell weder bei den ECP-Therapiegruppen ohne noch mit signifikantem Überlebensvorteil gegenüber den Kontrollgruppen einen nennenswerten Unterschied in der Anzahl der genannten Zellgruppen feststellen. Der Frage, ob sich möglicherweise die Verhältnisse der Zellpopulationen direkt nach den ECP-Therapieeinheiten deutlicher unterscheiden und sich diese Differenzen, je größer der zeitliche Abstand zur Behandlung wird, wieder minimieren, wurde in der hiesigen Arbeit nicht nachgegangen und bleibt weiterhin unbeantwortet.

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sich die Anzahl der CD3<sup>+</sup> Zellen bei einem\*einer Patient\*in mit aGvHD nicht unbedingt von der eines\*einer Patient\*in nach allogener HSCT ohne Entwicklung einer aGvHD unterscheidet. So konnten Ullrich et al. (2016) in einer Studie mit 107 Patient\*innen feststellen, dass sich die Zahl der CD3<sup>+</sup> Zellen während der 200 Tage Beobachtungszeit nach allogener HSCT nicht signifikant zwischen den Gruppen derer, die eine aGvHD entwickelten (58%) und derer, die von dieser Komplikation verschont blieben (42%), unterschied. Nur um die zwölfte Woche nach Transplantation konnte eine Tendenz zu etwas niedrigeren CD4<sup>+</sup> Zellen in ersterer Gruppe beobachtet werden. Dementsprechend scheint eine erfolgreiche ECP-Therapie der aGvHD nicht zwingend anhand der Zellpopulation der CD3<sup>+</sup> T-Zellen messbar zu sein.

Doch auch im Hinblick auf andere Zellgruppen gibt es Folgendes zu beachten: Solange keine zwingende Korrelation zwischen einzelnen Zellgruppen und einem Therapieerfolg nach heutigem Forschungsstand festgestellt werden konnte, können mit dem Fehlen einer signifikanten Veränderung in den hier gemessenen Zellpopulationen weder das Gesamtergebnis des *In-vivo*-Versuchs erklärt noch das etwas bessere Therapieansprechen der FVB-ECP-Therapiegruppe auf Grundlage von Unterschieden in den gemessenen Zellpopulationen gut interpretiert werden.

#### 4.2.2 Regulatorische T-Zellen und NK-T-Zellen

Wie bereits angedeutet, ist noch nicht endgültig geklärt, welchen Veränderungen bestimmte Zellpopulationen durch ein ECP-Therapieansprechen bei akuter oder chronischer GvHD unterliegen. Bruserud et al. (2014) hielten im Rahmen einer systematischen Übersichtsarbeit fest, dass in klinischen Studien zur cGvHD sowohl gleichbleibende als auch gestiegene Level an regulatorischen T-Zellen bei gleichzeitigem Therapieansprechen gefunden wurden. Dessen ungeachtet gelten gerade erhöhte Level dieser Zellart als ein Zeichen für das Therapieansprechen, wie es auch bereits in verschiedenen Versuchen im Tiermodell beobachtet werden konnte (Capitini et al. 2011; Gatza et al. 2008). Auf Grund der Konstellation in der vorliegenden Arbeit, die weder einen signifikanten Überlebensvorteil noch eine erhöhte Anzahl der regulatorischen T-Zellen in einer der Versuchsgruppen feststellen konnte, kann kein weiterer Schluss über die Folge oder die Ursache eines Therapieansprechens einer ECP im Zusammenhang mit erhöhten oder gleichbleibenden Zahlen regulatorischer T-Zellen gezogen werden.

Ähnlich steht es um die Aussagekraft der Anzahl der NK-T-Zellen in dieser Arbeit. Diese Zellart wird sowohl allein als auch durch das Zusammenwirken mit regulatorischen T-Zellen als die GvHD eindämmend gewertet (Leveson-Gower et al. 2011; Pillai et al 2009; Zeng et al. 1999). Bisher gibt es keine spezifischen Untersuchungen zu der Auswirkung einer ECP-Therapie auf die Zellpopulation der NK-T-Zellen, weswegen an dieser Stelle kein weiterführender Vergleich möglich ist. Es bleibt allein festzuhalten, dass die hier vorliegenden Ergebnisse obige Darstellungen zwar nicht weiter unterstützen können, aber auch nicht gegen sie sprechen.

#### 4.2.3 NK-Zellen

Die einzige statistisch signifikante Auffälligkeit in den durchgeführten Versuchen betrifft die Population der NK-Zellen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Anzahl an diesen Zellen in den überlebenden Versuchstieren höher war als in den zuvor verstorbenen Versuchstieren, unabhängig davon, ob eine ECP-Therapie durchgeführt wurde oder nicht.

In den letzten Jahrzehnten wandelte sich das Bild der NK-Zellen. Ursprünglich als Zellen der angeborenen Immunität betrachtet, deren Hauptfunktion in der Abwehr von Tumoren und Viren und der Mediation von Zellen des adaptiven Immunsystems durch Mediatorausschüttung besteht, zeigt sich das heutige Bild komplexer. So mehren sich die Hinweise, dass diese Zellart gewissen Reifungsprozessen unterliegt und anhand von Oberflächenmarkern in mehrere Subpopulationen mit sowohl inflammatorischen als auch immunmodulierenden Eigenschaften eingeteilt werden kann (Campbell und Hasegawa 2013; Ni et al. 2019; Vivier et al. 2008).

Auch die Bedeutung der NK-Zellen im Zusammenhang des Therapieansprechens auf eine ECP ist jüngst untersucht worden. So konnten Iniesta et al. (2018) beobachten, dass ein Anstieg der spezifischen Subpopulation der CD56<sup>bright+</sup> NK-Zellen (= unreif) recht früh im

Verlauf einer Behandlung mittels ECP sowohl bei der akuten als auch der chronischen Form der GvHD mit einem Therapieansprechen korreliert. Zudem verändert sich das Verhältnis von CD56<sup>bright+</sup> NK-Zellen zu CD56<sup>dim+</sup> NK-Zellen (= reif) zugunsten ersterer. Ni et al. (2019) differenzierten diese zwei NK-Zellsubpopulationen noch weiter und konnten somit einen Anstieg an regulatorischen NK-Zellen innerhalb der CD56<sup>brigh+</sup> NK-Zellpopulation messen.

Da in der vorliegenden Arbeit keine weitere Differenzierung der NK-Zellen zwischen unreifen (CD56<sup>bright+</sup>) und reifen (CD56<sup>dim+</sup>) vorgenommen werden konnte, gestaltet sich vor diesem Hintergrund die Interpretation der erhöhten NK-Zellen bei den überlebenden Tieren als schwierig. Auf Grundlage der Analysen von Vivier et al. (2008) ließen sich zwar Vermutungen anstellen, welche Subpopulationen der NK-Zellen eher in der Milz vorzufinden sind und somit in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich gemessen wurden, aber es fehlen dazu Voruntersuchungen zu den hier verwendeten Mausstämmen. Zudem besitzen Mäuse andere NK-Zellsubpopulationen als Menschen (Vivier et al. 2008). Dadurch wird sowohl die Übertragung von Erkenntnissen über diese Zellpopulation aus Mausstudien auf den Menschen als auch die umgekehrte Übertragungsrichtung erschwert. Ob bei den durchgeführten Versuchen bestimmte Subpopulationen der NK-Zellen vermehrt auftraten und ob es Unterschiede zwischen den mittels ECP behandelten Versuchstieren und der Kontrollgruppe innerhalb der NK-Zellsubpopulationen gab, ist rückblickend nicht eruierbar und bedarf weiterer Untersuchungen.

An dieser Stelle kann nur vermutet werden, dass eine erhöhte Zahl an NK-Zellen in dem hiesigen Mausmodell der aGvHD einen Überlebensvorteil darstellt, unabhängig davon, ob eine ECP-Therapie durchgeführt wurde oder nicht. Diese Interpretation wird von den Beobachtungen durch Ruggeri et al. (2002) gestützt. Sie konnten nachweisen, dass bei vollständig HLA-inkompatibel transplantierten Mäusen (MHC-Haplotyp H2-d  $\rightarrow$  H2-b), die zuvor mit alloreaktiven NK-Zellen behandelt wurden, keine Symptome einer GvHD bis zum Versuchsende (120 Tage nach Transplantation) auftraten. Weiterhin beobachteten sie, dass durch die Behandlung mit alloreaktiven NK-Zellen die Zahl der APZ im Knochenmark, in der Milz und im Darm abnahm. Daraufhin schlussfolgerten sie, dass die protektive Wirkung allogener NK-Zellen vor einer GvHD durch die Elimination von APZ vermittelt würde.

Auch Asai et al. (1998) konnten bereits feststellen, dass mit IL-2 aktivierte NK-Zellen einen protektiven Einfluss gegen die Entwicklung einer GvHD in einem *Full-Mismatch*-Mausmodell haben. Sie führten den Effekt auf die Induktion des *transforming growth factor*(TGF)-β durch die NK-Zellen zurück. Zusätzlich beobachteten sie, dass der Zeitpunkt der Aktivierung der NK-Zellen mit IL-2 einen maßgeblichen Einfluss auf die Prävention einer GvHD hatte. Wurde IL-2 zusammen mit NK-Zellen vor dem dritten Tag nach Transplantation verabreicht, so konnte ein GvHD vorbeugender Effekt festgestellt werden. Wurde IL-2 allerdings nach dem dritten Tag mit oder ohne NK-Zellen gegeben, so wurden kürzere Überlebenszeiten der Versuchstiere auf Grund einer sich bildenden GvHD gemessen.

Beobachtungsstudien an Patient\*innen stützen ebenfalls die These, dass niedrigere NK-Zellpopulationen das Risiko zur Entwicklung einer aGvHD erhöhen. So stellten Ullricht et al. (2016) fest, dass Patient\*innen, die keine aGvHD nach HSCT entwickelten, höhere Anteile an NK-Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum (200 Tage) aufwiesen als Patient\*innen, bei denen sich innerhalb dieser Zeit die Erkrankung ausprägte.

Die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse zu den NK-Zellen korrelieren mit den Forschungsergebnissen von Olson et al. (2010). Auch sie bemerkten, dass in einem *Full-Mismatch*-Mausmodell der GvHD das Auftreten einer GvHD bei den Versuchstieren durch IL-2-aktivierte NK-Zellen verhindert oder deutlich abgeschwächt werden kann. Sie vermuteten die Ursache dieser Beobachtung in der Interaktion zwischen Spender-T-Zellen und Spender-NK-Zellen in den ersten Tagen nach Transplantation. Das Forschungsteam konnte zudem feststellen, dass durch die Anwesenheit von NK-Zellen die Proliferation von alloreaktiven T-Zellen kurz nach Transplantation gehemmt wurde, da die Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen am vierten Tag nach Transplantation bei den mit NK-Zellen behandelten Versuchstieren deutlich geringer war als bei den Kontrolltieren. Zusätzlich wurden sowohl weniger IFN-γ-produzierende CD4<sup>+</sup> Zellen als auch IL-2-produzierdende Zellen am vierten Tag nach Transplantation bei den Versuchstieren gemessen. Diese Differenzen zwischen den Versuchstieren und den Kontrolltieren ließen sich allerdings bereits am zehnten Tag nach Transplantation nicht mehr feststellen.

Die Daten von Olson et al. (2010) weisen deutlich darauf hin, dass die frühe Zeit nach Transplantation eine kritische Phase für die Entwicklung oder Abwendung einer GvHD darstellt. Angenommen, Unterschiede in den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellpopulationen zwischen an GvHD erkrankten und diese Erkrankung nicht entwickelnden Mäusen des gleichen Mausmodells ließen sich wie bei Olson et al. (2010) nur in den frühen Tagen nach Transplantation messen, dann hieße dies im Umkehrschluss, dass eine erfolgreiche (ECP-)Therapie der GvHD im Mausmodell nicht zwangsweise zu Unterschieden in diesen Zellpopulationen von therapierten Tieren und Kontrolltieren zu einem späteren Zeitpunkt führen würde und daran feststellbar wäre. Diese Überlegung bietet im Rahmen des Mausmodells der aGvHD eine Erklärung für die im Abschnitt 4.2.1 bereits diskutierten fehlenden Unterschiede zwischen den Ergebnissen der gemessenen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellpopulationen der erfolgreichen ECP-Therapiegruppe mit Zellen des Mausstamms C3H (Budde et al. 2018) und den Ergebnissen dieser Zellgruppen der nicht-erfolgreichen ECP-Therapiegruppen (Mausstämme FVB und CBA) der vorliegenden Arbeit. Dass diese Entwicklung der Zellverhältnisse auch im Menschen gelten könnte, legen die Beobachtungen von Rezvani et al. (2006) nahe, die ebenfalls keinen Unterschied in der Anzahl CD4<sup>+</sup> Zellen zwischen an GvHD und nicht daran erkrankten Patient\*innen nach HSCT zeigten.

# 4.3 MLR als Modell zur Untersuchung der Zytokinmuster bei der ECP

#### 4.3.1 MLR zur Untersuchung der ECP in der Literatur

Das Modell der MLR ist eine bekannte Methode, die regelmäßig in verschiedenen Forschungsprojekten Anwendung findet. So gibt es bereits Arbeiten, in denen Auswirkungen einer ECP im Rahmen einer MLR mit Mauszellen überprüft wurden. Gatza et al. (2008) untersuchten zum Beispiel, welchen Effekt die Zugabe von mittels ECP behandelter Splenozyten bereits transplantierter Mäuse (B6→B6D2F1) (Stimulatorzellen, s. 2.9) zu einer Kultur (MLR) aus T-Zellen des Stamms B6-Ly5.2 (Responderzellen, s. 2.9) und DC des allogenen Stamms B6D2F1 (Stimulatorzellen) ausübte. Hierbei konnte festgestellt werden, dass nach 60 Stunden Inkubationszeit die Anzahl der IFN-y-ausbildenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Responderzellen deutlich geringer war als in der Kontrollgruppe, zu der unbehandelte Splenozyten aus B6→B6D2F1 transplantierten Mäusen hinzugegeben worden waren, und dass die T-Zellproliferation der Responderzellen nach erneutem allogenen Stimulus um 50% geringer ausfiel im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem konnten nach 72 Stunden Inkubationszeit eine deutlich gestiegene Zahl an CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Responderzellen (regulatorische T-Zellen) gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Im Unterschied zu den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden als Stimulatorzellen keine bestrahlten Splenozyten des Empfängerstamms verwendet, sondern DC aus dem Knochenmark der Tiere des Empfängerstamms. Zudem handelte es sich bei den Responderzellen nicht um unvorbehandelte Splenozyten des Spenderstamms, sondern um bereits alloreaktive T-Zellen einer transplantierten Maus (B6→ B6D2F1). Nur die ECP mit Zellen eines dritten Stamms stimmt bei genauerer Betrachtung in den beiden Forschungsarbeiten überein.

Wie im Abschnitt 4.1 bereits diskutiert, konnten Gatza et al. (2008) mit dieser speziellen Konstellation der MLR einen weiteren Hinweis dafür finden, dass DC eine große Rolle in dem Wirkmechanismus der ECP spielen. Auch wenn eine Messung des IL-2 während dieser Versuche nicht erwähnt wurde, so könnte doch eine niedrigere IL-2-Produktion der mit ECP behandelten Spenderzellen (Responderzellen) auf Grund der geminderten T-Zellproliferation nach erneutem allogenen Stimulus vermutet werden. Erniedrigte Werte dieses T-Zellwachstumsfaktors in den hier durchgeführten MLR wären dann ein deutlicher Hinweis für eine positive ECP-Wirkung, ähnlich dem vorgestellten Versuch. Allerdings zeigten die in dieser Arbeit erhobenen Messungen keine signifikant niedrigeren IL-2-Werte der Therapiegruppen gegenüber der Kontrollgruppe. Das gilt sowohl für die MLR-Ansätze mit den ECP-Therapien der Stämme FVB und CBA als auch mit dem Stamm C3H. Da letzterer Stamm allerdings in den *In-vivo*-Versuchen von Budde et al. (2018) einen signifikanten Therapievorteil gegenüber der Kontrollgruppe erzielte, stellt sich die Frage, ob sich die Wirksamkeit einer ECP im Mausmodell der GvHD überhaupt anhand der festgestellten

IL-2-Level in der MLR messen lässt. Dafür ist zunächst ein Überblick über die Rolle des IL-2 als Mediator zwischen einzelnen Zellpopulationen und dessen Auswirkung wichtig.

#### 4.3.2 Bedeutung des IL-2 in der GvHD und der ECP

Neben der seit langem bekannten Funktion als Wachstums- und Proliferationsfaktor für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielt das IL-2 auch eine wichtige Rolle sowohl bei der Aktivierung regulatorischer T-Zellen als auch bei der Aktivierung von NK-Zellen. Den eben genannten Zellpopulationen konnte bereits ein protektiver Effekt gegenüber der Ausbildung einer GvHD nachgewiesen werden und möglicherweise sind für die Aktivierung dieser Zellen unterschiedlich hohe IL-2-Level von Vorteil. Da die bisherigen Erkenntnisse zur Bedeutung von IL-2 im Zusammenhang der NK-Zellaktivierung und ihrer GvHD-entgegenwirkenden Effekte bereits im Abschnitt 4.2.3 betrachtet wurden, sollen sie an dieser Stelle nicht erneut erörtert werden.

Die schützende Wirkung vor einer GvHD, ausgehend von regulatorischen T-Zellen, konnte derweil in vielen Studien beobachtet werden. So wiesen beispielsweise Hoffmann et al. (2002) nach, dass im gleichen Mausmodell der aGvHD, wie es auch in dieser Arbeit verwendet wurde, eine Behandlung der transplantierten Versuchstiere mit regulatorischen T-Zellen des Spenderstamms Schutz vor einer tödlichen GvHD boten. Ebenso zeigten Rezvani et al. (2006) in humanen Studien, dass Patient\*innen, die ein Stammzelltransplantat mit geringer Anzahl an regulatorischen T-Zellen erhielten, ein größeres Risiko für die Entwicklung einer GvHD aufwiesen. Unabhängig von der Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Transplantat konnte zusätzlich festgestellt werden, dass bei Patient\*innen, die an einer aGvHD nach Transplantation litten, weniger regulatorische T-Zellen nachweislich im Blut zirkulierten als bei Patient\*innen, die keine oder nur eine aGvHD Grad I ausbildeten.

Doch ohne die Regulation durch IL-2 würden diese Ergebnisse wohl nicht beobachtet werden können. Malek und Bayer (2004) fassten die Erkenntnisse vieler Studien zusammen, die zeigen, dass in Abwesenheit von IL-2 oder funktionaler IL-2-Rezeptoren auf den regulatorischen T-Zellen keine normale Entwicklung und somit keine immunologische Toleranz der regulatorischen T-Zellen möglich ist. Doch über die Höhe der IL-2-Konzentration, die für eine günstige Funktionalität der regulatorischen T-Zellen im Falle der GvHD nötig ist, gibt es bisher wenige Studien. Allerdings fanden Zorn et al. (2006) heraus, dass eine Therapie mittels niedrigdosiertem IL-2 bei Patient\*innen mit GvHD einen positiven Einfluss auf die Expansion der regulatorischen T-Zellen hatte<sup>3</sup>.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob die erhöhten Level an regulatorischen T-Zellen, die in manchen Studien mit einem Therapieansprechen auf eine ECP bei GvHD-

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Aus dem wissenschaftlichen Artikel von Zorn et al. (2006) gehen keine Informationen zum Geschlecht der Studienteilnehmer\*innen hervor, an dieser Stelle wird daher lediglich von einer gemischtgeschlechtlichen Gruppe ausgegangen.

Patient\*innen einhergehen, von einer durch die ECP bewirkten Veränderung der IL-2-Level der Patient\*innen hervorgerufen wird oder ob andere Mechanismen zur Proliferation der regulatorischen T-Zellen führen. In den meisten Studien, die von erhöhten regulatorischen T-Zell-Leveln im Zusammenhang einer ECP berichten, findet sich kein Anhalt für diesen Mechanismus (Biagi et al. 2007; Rubegni et al. 2007; Quaglino et al. 2009). Allerdings konnten Di Biaso et al. (2009) feststellen, dass die mit der ECP einhergehenden erhöhten Level regulatorischer T-Zellen häufiger Phosphorylierungen des Transkriptionsfaktors STAT5 in diesen Zellen aufwiesen. Dieser Faktor, durch die Phosphorylierung offenbar vermehrt in Gebrauch, ist Teil der Signalkaskade des IL-2-Rezeptors der regulatorischen T-Zellen (Malek und Bayer 2004). Diese Beobachtungen geben einen Hinweis darauf, dass die ECP zur Behandlung der GvHD über IL-2 zu einer erhöhten Anzahl an regulatorischen T-Zellen beiträgt. Ob dies über eine Sensibilisierung der Zellen für IL-2 geschieht oder über eine höhere Konzentration an IL-2, ausgeschüttet durch beispielsweise andere T-Zellpopulationen oder DC (Malek und Bayer 2004), bleibt unklar und bedarf weiterer Forschung. Um mit diesem Gedankengang abschließend noch einmal Bezug auf die vorliegenden Ergebnisse der IL-2-Level der MLR in dieser Arbeit zu nehmen, lässt sich festhalten, dass allein in den fehlenden signifikanten Unterschieden in der Konzentration dieses Zytokins zwischen den verschiedenen Therapiegruppen und der Kontrollgruppe kein Hinweis auf eine fehlende Wirksamkeit der ECP gesehen werden kann.

#### 4.3.3 Relevanz spezifischer Zellpopulationen in der MLR

Bei der Interpretation der hiesigen Ergebnisse der MLR muss ein weiterer Aspekt berücksichtigt werden. Sollten in der Therapie mittels ECP die DC die entscheidenden Zellen sein, die nach Phagozytose apoptotischer T-Zellen durch die Ausschüttung bestimmter Mediatoren, etwa IL-10 (Goussetis et al. 2012; Lutz und Schuler 2002), die Reifung naiver T-Zellen im Hinblick auf eine Abschwächung einer GvHD günstig beeinflussen, dann stellt sich, wie bereits unter 4.1.2 diskutiert, die Frage nach der Anzahl der DC in den Zellsuspensionen der hiesigen MLR. Ob durch den gleichen Versuch mit definierter Zahl an DC oder Monozyten gegebenenfalls ein signifikanter Unterschied in den Zytokinmustern zwischen den ECP-Therapieansätzen und der Kontrollgruppe festzustellen ist oder eventuell sogar Unterschiede zwischen den einzelnen Spenderzellstämmen zu sehen wären, lässt sich nur durch weitere Untersuchungen mit Fokus auf genau diese Zellen feststellen. Diese Versuche hätten den Vorteil, dass eine Reduktion zuvor unbekannter Größen zu einer größeren Aussagekraft führen könnte.

Gleichwohl kann festgehalten werden, dass der MLR-Ansatz mit der ECP-Therapie, die in den *In-vivo*-Versuchen die besten Ergebnisse erzielte (C3H-ECP) (Budde et al. 2018), zwar keinen statistisch signifikant höheren Anteil, aber dennoch deutlich mehr CD4<sup>+</sup> IL-10-haltige Responderzellen aufwies als der Kontrollansatz. Dies kann als schwacher Hinweis auf ein besseres Therapieansprechen dieser allogenen ECP gedeutet werden.

Bei all den Überlegungen wurde bis jetzt stets angenommen, dass die Nachstellung der Zellverhältnisse und damit auch immunologischen Prozesse der GvHD in dem Aufbau der hiesigen MLR-Ansätze ausreicht, um die Wirkung einer ECP auf Zytokinebene untersuchen zu können. Allerdings finden sich Hinweise, die diese Grundannahme in Frage stellen. Zunächst können hier die Beobachtungen von Budde et al. (2018) angeführt werden. Dort wurde festgestellt, dass zwar die ECP mittels nicht-alloreaktiver Splenozyten des Stamms C3H im auch hier verwendeten Mausmodell der aGvHD einen signifikanten Therapieerfolg hervorrief, nicht aber die Therapie mit durch eine MLR präaktivierten Splenozyten des gleichen Stamms (C3H). Die Splenozyten (Responderzellen) wurden für die Präaktivierung mit bestrahlten Splenozyten (Stimulatorzellen) des Empfängerstamms (BALB/c) inkubiert. Anschließend wurden sie mittels 8-MOP und UV-A-Strahlung behandelt und den erkrankten Empfängertieren injiziert. Welche genauen Veränderungen an den Splenozyten durch diese Behandlung stattgefunden und zu den unterschiedlichen Therapieergebnissen im gleichen Mausmodell geführt haben, bleibt derzeit unklar.

Sowohl bei der MLR zur Präaktivierung von Zellen für die ECP in den Versuchen von Budde et al. (2018) als auch in der hier durchgeführten MLR ist auf Grund des Ursprungs der Stimulatorzellen (Milz) anzunehmen, dass sich APZ des Empfängerstamms in den Zellsuspensionen befunden haben. Diese sind laut Shlomchik et al. (1999) für die durch CD8<sup>+</sup> Zellen getragene GvHD (fehlende Übereinstimmung im MHC-Klasse-II-Komplex) von entscheidender Bedeutung, da sie durch ihre Präsentation von Antigenen und Ko-Stimulationssignalen die Alloreaktivität der Spender-T-Zellen (entspricht den Responderzellen in der MLR) maßgeblich fördern. Allerdings stellten Koyama et al. (2012) im Mausmodell der GvHD, ebenfalls getragen durch CD8<sup>+</sup> Zellen, fest, dass APZ im Gewebe des Empfängertiers um 100 bis 1000fach potenter in der Auslösung der aGvHD im Gegensatz zu hämatogenen APZ sind. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden zwar die Stimulatorzellen der MLR aus den Milzen der Mäuse vom Stamm BALB/c gewonnen, allerdings wurde nicht überprüft, wie hoch der Anteil an nicht-hämatopoetischen APZ in der verwendeten Zellsuspension war. Ob die Aktivierung der Responderzellen folglich ausreichte, um an ihnen die Wirkung einer ECP auf Zytokinebene zu messen, bleibt offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

#### 4.4 Stärken und Schwächen der Arbeit

Auf die Fragestellung der Arbeit konnten die durchgeführten Versuche viele Antworten geben, jedoch wurde die Aussagekraft mancher Beobachtungen durch verschiedene Faktoren geschwächt und der Transfer auf die Situation der Patient\*innen erschwert. Einen solchen Faktor stellt die Anzahl der Versuchstiere pro Versuchsgruppe dar. So wäre es wünschenswert gewesen, mehr als 25 – 27 Tiere in den einzelnen ECP-Versuchsgruppen beziehungsweise in der Kontrollgruppe zu untersuchen. Allerdings lassen sich mit dieser Gruppengröße bereits solide statistische Aussagen treffen und da die GvHD eine sehr

60

belastende Erkrankung darstellt, sollte unnötiges Leid der Tiere vermieden werden. Vor diesem Hintergrund wurde sich auch dagegen entschieden, eine ECP mit Zellen des Stamms C3H im Mausmodell der aGvHD nochmals durchzuführen, da die Ergebnisse bereits von Budde et al. (2018) festgehalten wurden. Dennoch konnte auf diese Weise kein direkter statistischer Vergleich zwischen den drei Spendermausstämmen FVB, CBA und C3H vorgenommen werden, welcher gegebenenfalls weitere Unterschiede zwischen diesen Gruppen beleuchtet hätte.

Weiterhin ist die Kontrollgruppe der beiden ECP-Therapiegruppen mit den Zellen der Stämme FVB und CBA nicht optimal. Denn obwohl auch an den Kontrolltieren eine unangenehme und gegebenenfalls kreislaufbelastende Injektion in die Schwanzvene zu den gleichen Zeitpunkten wie an den Tieren der anderen Gruppen durchgeführt wurde, so enthielten diese nur ein Placebo in Form von PBS. Die Zellen zur ECP-Therapie stammten allerdings von Spenderstämmen (FVB und CBA), die in ihren MHC weder mit den MHC des Empfängerstamms (BALB/c) noch mit denen des Stammzellspenderstamms (C57BL/6) übereinstimmten. Ein Vergleich dieser Versuchsreihen zu der Standard-ECP, wie sie an Patient\*innen mit GvHD etabliert ist (s. 1.2.1 und 1.2.3), wäre direkter und gegebenenfalls aussagekräftiger gewesen. Allerdings ist die Nachstellung dieses ECP-Ablaufs im Mausmodell nur über Umwege durchführbar. Denn eine Leukapherese ist bei Mäusen technisch bisher nicht realisierbar und so müssten ersatzweise Splenozyten einer zweiten Kohorte stammzelltransplantierter Mäuse des gleichen Modells der aGvHD als Quelle für die Zellen zur ECP dienen. Da die aGvHD allerdings mit einer hohen Letalität verbunden ist und zusätzlich die Zahl der Splenozyten in der Milz mit Zunahme der GvHD abnimmt, hätten pro Therapieeinheit eventuell zwei Mäuse für die Zellgewinnung getötet und zudem von vornherein eine sehr große Kohorte transplantiert werden müssen, damit mit Sicherheit genügend Zellspender bis zur vierten ECP am zwanzigsten Tag nach Transplantation überlebt hätten. Diese Planung hätte zusätzliches Tierleid verursacht, welches weder vor dem Hintergrund, dass Budde et al. (2014) die Wirksamkeit dieser Behandlung im auch hier verwendeten Mausmodell bereits zeigen konnten, noch vor der Tatsache, dass eine Aussage über die Effektivität der hier durchgeführten Versuchsreihen bereits auch gegen eine Placebogruppe möglich ist, ethisch vertretbar gewesen wäre. Zudem lag das primäre Ziel der hiesigen Versuche nicht darin, herauszufinden, ob eine allogene ECP besser wirkt als die bereits etablierte, sondern ob sie überhaupt eine positive Auswirkung ausübt.

Eine klare Stärke der Arbeit in Bezug auf die Erforschung der Auswirkungen einer allogenen ECP-Therapie zeigt sich im hier verwendeten Mausmodell der aGvHD. Dieses bietet den Vorteil, dass die Effekte der ECP-Therapie gut anhand der Symptome der Versuchstiere feststellbar sind. Damit waren Veränderungen der Krankheitslast durch die Therapie grundsätzlich graduiert messbar, auch ohne die genaue Kenntnis des Wirkmechanismus und ohne um die genaue Bedeutung einzelner Zellen, Zytokine und anderer Messgrößen zu wissen. Wenngleich sich die Analyse der gemessenen Zellpopulationen des *In-vivo*-Versuchs, bei denen sich kein signifikant besseres Überleben oder eine geringere Krankheitslast in einer

der drei Versuchsgruppen feststellen ließ, schwierig gestaltete, so konnten, wie bereits im Abschnitt 4.2 diskutiert, die hier gemessenen Daten bisherige Beobachtungen anderer Forschungsgruppen stützen.

Dennoch ist festzuhalten, dass, obwohl sich die Auswirkungen der allogenen ECP im Mausmodell der aGvHD gut beobachten lassen und - abgesehen von der fehlenden Übereinstimmung der MHC bei der HSCT – versucht wurde, die Versuchsbedingungen zu der tatsächlichen Situation der Patient\*innen möglichst ähnlich zu gestalten, manch eine verbleibende Differenz ihren Einfluss auf die Ergebnisse und Übertragbarkeit der Versuche genommen hat. Hierzu gehört beispielsweise die unterschiedliche Herkunft der Zellen für die ECP (periphere Leukozyten aus dem Blut von Patient\*innen gegenüber Splenozyten im Mausmodell), welche gegebenenfalls unterschiedlich große Anteile verschiedener Zellpopulationen enthalten. Weiterhin besteht zum Teil der bereits von Hülsdünker und Zeiser (2015) beschriebene Unterschied in den Konditionierungsverfahren. So werden Patient\*innen wesentlich häufiger mittels Chemotherapie konditioniert, anstatt wie in den hiesigen Versuchen mit alleiniger Ganzkörperbestrahlung. Diese Differenz mag zunächst nicht von Bedeutung sein, da sie primär der Elimination von Tumorzellen dient und ein Anwachsen des Transplantats ermöglichen soll. Dass die Ganzkörperbestrahlung der Versuchstiere zu letzterem ausreichte, beweist der durchschnittlich gemessene Chimärismus von 69,8 (± 18,1)% (s. 3.1). Allerdings spielt das Ausmaß der Konditionierung, wie einleitend erwähnt (s. 1.1.2), auch eine große Rolle für die Initiierung der GvHD. Da weder die Pathomechanismen der GvHD noch die der ECP vollends verstanden sind, ist ein Einfluss durch die Art der Konditionierung auf die Wirkung der ECP nicht auszuschließen.

Vor dem Hintergrund des gender data gap, welcher die Problematik beschreibt, dass sowohl in der präklinischen Forschung als auch in klinischen Studien vorwiegend an männlichen Individuen Daten erhoben werden und deren Analyseergebnisse häufig ohne Überprüfung mittels gleichwertiger Versuche auf das andere Geschlecht übertragen werden, ist auch die hier durchgeführte Forschungsarbeit kritisch zu betrachten. Gerade die Immunologie betreffend ist seit langem bekannt, dass es einige Unterschiede zwischen dem weiblichen und männlichen Immunsystem gibt (Shames 2002). Im Rahmen der Literaturrecherche zu dieser Arbeit fiel auf, dass zwar in klinischen Studien zur GvHD und ECP sowohl Männer als auch Frauen eingebunden wurden und bereits ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer GvHD bei der Kombination aus weiblicher Stammzellspende und männlichem Empfänger festgestellt wurde (Filipovich et al. 2005; Socié und Ritz 2014; Travnik et al. 2011a), jedoch lassen sich keine zufriedenstellenden Daten zu möglichen Unterschieden im Therapieansprechen zwischen den Geschlechtern finden. In Bezug auf vorklinische Studien zur ECP wurden Versuche im Mausmodell überwiegend an männlichen Tieren durchgeführt. Diesem bisherigen Standard folgend, wurde auch in dieser Arbeit ausschließlich an männlichen Mäusen geforscht und sie kann demnach keinen Beitrag zur Minderung des gender data gap erbringen. Weitere Studien sind nötig, um diese Datenlücke zu schließen und einen möglichen Unterschied feststellen oder ausschließen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die *Graft-versus-Host Disease* ist auch heute noch eine der Hauptursachen für eine hohe Morbidität und Mortalität nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Unterschiede sowohl in den Haupt- als auch in den Nebenhistokompatibilitätskomplexen sind bei haploidenten hämatopoetischen Stammzelltransplantationen für die Ausprägung einer *Graft-versus-Host Disease* verantwortlich, sodass nach heutigem Forschungsstand bei der akuten Form vor allem alloreaktive T-Zellen, bei der chronischen Form hingegen sowohl alloreaktive T- als auch B-Zellen eine wichtige Rolle im Pathomechanismus einnehmen. Eine Transplantation von T-Zell-depletierten Stammzellen senkt zwar das Risiko für eine akute *Graft-versus-Host Disease*, steigert wegen des fehlenden *Graft-versus-Tumor*-Effekts allerdings gleichzeitig das Risiko eines Rezidivs der Grunderkrankung.

Beide Formen der *Graft-versus-Host Disease* werden in erster Linie mittels Steroiden behandelt, jedoch ist häufig eine Zweitlinientherapie auf Grund fehlenden Ansprechens oder einer nachlassenden Wirkung der Erstlinientherapie nötig. In so einem Fall stellt die extrakorporale Photopherese eine gut etablierte Therapiemethode dar. Hierbei werden Spenderleukozyten über ein Aphereseverfahren gewonnen, außerhalb des Körpers mittels 8-Methoxypsoralen und Ultraviolett-A-Strahlung behandelt und anschließend dem\*der Patient\*in reinfundiert. Nach bisherigen Erkenntnissen tritt die dadurch hervorgerufene immunmodulierende Wirkung auf Basis eines Zusammenspiels zwischen apoptotischen alloreaktiven T-Zellen, aktivierten antigenpräsentierenden Zellen und verschiedenen entzündungshemmenden Mediatoren ein. Jedoch können nicht alle Patient\*innen die Voraussetzung des Aphereseverfahrens – ein großlumiger stabiler venöser Zugang – erfüllen, weshalb die Erforschung des Therapiepotentials einer allogenen extrakorporalen Photopherese wichtig ist.

Aufbauend auf erste Forschungserfolge mit einer allogenen extrakorporale Photopherese im Mausmodell der akuten *Graft-versus-Host Disease* (C57BL/6, H2-b  $\rightarrow$  BALB/c, H2-d; *full mismatcb*) mit Splenozyten eines genetisch inkompatiblen Spenderstamms (C3H, H2-k), wurden in der vorliegenden Arbeit zwei weitere im gleichen Maße inkompatible Spenderstämme (FVB, H2-q und CBA, H2-k) in dem bereits erprobten Mausmodell auf ihre Effektivität als Zellen für die allogene extrakorporale Photopherese überprüft. Alle Versuchstiere erhielten in den ersten 20 Tagen nach erfolgreicher Stamm- und T-Zelltransplantation vier Therapieeinheiten. Gleichzeitig wurde ihre gesundheitliche Verfassung jeden Tag des insgesamt 42 Tage dauernden Versuchs dokumentiert. Am Versuchsende sowie bei der vorzeitigen Einschläferung eines Tieres aus Tierwohlgründen wurde der Anteil bestimmter Zellpopulationen an den Splenozyten gemessen. Ergänzend hierzu wurde in einer *mixed lymphocyte reaction* der Tierversuch *in vitro* nachgestellt und nach einer extrakorporalen Photopherese mit entweder FVB-, CBA- oder C3H-Zellen die Ausprägung an IL-2-, TNF- $\alpha$ - und IL-10-bildenden CD3<sup>+</sup> beziehungsweise CD4<sup>+</sup> Zellen gemessen. Die Auswertung der Versuche ergab, dass keine der beiden zu testenden Spenderstämme in der Therapie der extrakorporalen Photopherese zu einem signifikant besseren Überleben oder einer signifikant geminderten Krankheitslast gegenüber der Kontrollgruppe führte. Auch konnten keine nennenswerten Unterschiede in den gemessenen Zellpopulationen festgestellt werden – mit einer Ausnahme. Diese stellte die Gruppe der natürlichen Killerzellen dar, bei der signifikant mehr Zellen in den bis zum Versuchsende überlebenden Versuchstieren gegenüber den vorher verstorbenen festgestellt werden konnte – allerdings unabhängig von der erhaltenen Behandlung. In der *mixed lymphocyte reaction* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen beobachtet werden.

Anhand des hier durchgeführten Versuchs im Mausmodell der akuten Graft-versus-Host Disease konnte gezeigt werden, dass die allogene extrakorporale Photopherese mit genetisch differenten Spenderzellen in der hier durchgeführten Weise nicht zum erhofften Therapieerfolg führt. Sowohl auf Grund der genetischen Übereinstimmungen als auch der Unterschiede der Stämme FVB, CBA und C3H verdeutlicht der hiesige Versuch, dass neben den Haupthistokompatibilitätskomplexen noch weitere Oberflächenmarker, etwa die Nebenhistokompatibilitätskomplexe, eine wichtige Rolle in der Wirkweise der extrakorporalen Photopherese spielen müssen. In Zusammenschau mit dem bisherigen Kenntnissstand zur Wirkweise der extrakorporalen Photopherese und im Vergleich mit der bereits erfolgreichen allogenen extrakorporalen Photopherese mit Zellen des Stamms C3H, deuten die hier erzielten Ergebnisse darauf hin, dass es einer genaueren Zelldifferenzierung der zur Behandlung mittels extrakorporalen Photopherese gewonnenen Splenozyten bedarf. Der Vergleich der natürlichen Killerzellen zwischen den überlebenden Versuchstieren und den im Verlauf verstorbenen bekräftigt die Funktion der natürlichen Killerzellen als immunmodulatorische Zellen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Auf Grundlage der Ergebnisanalyse der mixed lymphocyte reaction vor dem Hintergrund des Pathomechanismus der Graft-versus-Host Disease kann festgehalten werden, dass es weiterer grundlegender Untersuchungen bedarf, inwieweit dieses Modell zur Erforschung von Zytokinmustern bei einer Therapie mittels extrakorporaler Photopherese geeignet ist.

Die nun vorliegende Arbeit leistet somit einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der Modifikation der extrakorporalen Photopherese als Therapie der *Graft-versus-Host Disease*. Weitere Versuche mittels allogener extrakorporaler Photopherese im Mausmodell der *Graft-versus-Host Disease*, bei denen der Vergleich unterschiedlicher Spenderstämme mit Fokus auf die Anzahl dendritischer Zellen im Infundat im Mittelpunkt steht, sind nötig, um weitere Erkenntnisse auf dem Weg zur allogenen extrakorporalen Photopherese für Patient\*innen zu erhalten.

### 6 Literaturverzeichnis

- Adamski J (2018): Vascular access considerations for extracorporeal photopheresis. Transfusion <u>58</u>, 590–597
- Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, Urbano-Ispizua A, Cutler CS, Bacigalupo AA, Battiwalla M et al. (2015): Increasing Incidence of Chronic Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Transplantation: A Report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Biol Blood Marrow Transplant <u>21</u>, 266–274
- Asai O, Longo DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, Murphy WJ (1998): Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. J Clin Invest <u>101</u>, 1835–1842
- Axt L, Naumann A, Toennies J, Haen SP, Vogel W, Schneidawind D, Wirths S, Moehle R, Faul C, Kanz L et al. (2019): Retrospective single center analysis of outcome, risk factors and therapy in steroid refractory graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant <u>54</u>, 1805–1814
- Barriga F, Ramírez P, Wietstruck A, Rojas N (2012): Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. Biol Res <u>45</u>, 307–316
- Bazinet A, Popradi G (2019): A General Practitioner's Guide to Hematopoietic Stem-cell Transplantation. Curr Oncol <u>26</u>, 187–191
- Berger CL, Xu AL, Hanlon D, Lee C, Schechner J, Glusac E, Christensen I, Snyder E, Holloway V, Tigelaar R, Edelson RL (2001): Induction of human tumor-loaded dendritic cells. Int J Cancer <u>91</u>, 438–447
- Berger CL, Hoffmann K, Vasquez JG, Mane S, Lewis J, Filler R, Lin A, Zhao H, Durazzo T, Baird A et al. (2010): Rapid generation of maturationally synchronized human dendritic cells: contribution to the clinical efficacy of extracorporeal photochemotherapy. Blood <u>116</u>, 4838– 4847
- Biagi E, Di Biaso I, Leoni V, Gaipa G, Rossi V, Bugarin C, Renoldi G, Parma M, Balduzzi A, Perseghin P, Biondi A (2007): Extracorporeal Photochemotherapy Is Accompanied by Increasing Levels of Circulating CD4+CD25+GITR+Foxp3+CD62L+ Functional Regulatory T-Cells in Patients With Graft-Versus-Host Disease. Transplantation <u>84</u>, 31–39
- Bosi A, Bartolozzi B, Guidi S (2005): Allogeneic Stem Cell Transplantation. Transplant Proc <u>37</u>, 2667–2669
- Brosig A, Hähnel V, Orsó E, Wolff D, Holler E, Ahrens N (2016): Technical comparison of four different extracorporeal photopheresis systems. Transfusion <u>56</u>, 2510–2519
- Bruserud Ø, Tvedt THA, Paulsen PQ, Ahmed AB, Gedde-Dahl T, Tjønnfjord GE, Slåstad H, Heldal D, Reikvam H (2014): Extracorporeal photopheresis (photochemotherapy) in the treatment of acute and chronic graft versus host disease: immunological mechanisms and the results from clinical studies. Cancer Immunol Immunother <u>63</u>, 757–777
- Budde H, Kolb S, Tejedor LS, Wulf G, Reichardt HM, Riggert J, Legler TJ (2014): Modified Extracorporeal Photopheresis with Cells from a Healthy Donor for Acute Graft-versus-Host Disease in a Mouse Model. PLoS One <u>9</u>, e105896
- Budde H, Papert S, Reichardt HM, Jarry H, Riggert J, Legler TJ (2018): An alternative for extracorporeal photopheresis: 8-methoxypsoralen and UVA-treated leucocytes from allogeneic donors improve graft-versus-host disease in mice. Vox Sang <u>113</u>, 803–810
- Campbell KS, Hasegawa J (2013): Natural killer cell biology: An update and future directions. J Allergy Clin Immunol <u>132</u>, 536–544
- Capitini CM, Davis JPE, Larabee SM, Herby S, Nasholm NM, Fry TJ (2011): Extracorporeal Photopheresis Attenuates Murine Graft-versus-Host Disease via Bone Marrow–Derived Interleukin-10 and Preserves Responses to Dendritic Cell Vaccination. Biol Blood Marrow Transplant <u>17</u>, 790–799
- Cho A, Jantschitsch C, Knobler R (2018): Extracorporeal Photopheresis—An Overview. Front Med (Lausanne) <u>5</u>, 236
- Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K (2004): Acute graft-versus-host disease: Pathophysiology, clinical manifestations, and management. Cancer <u>101</u>, 1936–1946
- Di Biaso I, Di Maio L, Bugarin C, Gaipa G, Dander E, Balduzzi A, Parma M, D'Amico G, Perseghin P, Biondi A, Biagi E (2009): Regulatory T Cells and Extracorporeal Photochemotherapy: Correlation With Clinical Response and Decreased Frequency of Proinflammatory T Cells. Transplantation <u>87</u>, 1422–1425
- Dunbar NM, Raval JS, Johnson A, Abikoff CM, Adamski J, Cooling LL, Grossman B, Kim HC, Marques MB, Morgan S et al. (2017): Extracorporeal photopheresis practice patterns: An international survey by the ASFA ECP subcommittee. J Clin Apher <u>32</u>, 215–223
- Edelson RL (2014): Mechanistic insights into extracorporeal photochemotherapy: Efficient induction of monocyte-to-dendritic cell maturation. Transfus Apher Sci <u>50</u>, 322–329
- Ferrara JLM, Deeg HJ (1991): Graft-versus-Host Disease. N Engl J Med 324, 667-674
- Ferrara JLM, Cooke KR, Teshima T (2003): The Pathophysiology of Acute Graft-versus-Host Disease. Int J Hematol <u>78</u>, 181–187
- Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009): Graft-versus-host disease. Lancet <u>373</u>, 1550– 1561
- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socié G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D et al. (2005): National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. Biol Blood Marrow Transplant <u>11</u>, 945–956
- Flowers MED, Apperley JF, van Besien K, Elmaagacli A, Grigg A, Reddy V, Bacigalupo A, Kolb HJ, Bouzas L, Michallet M et al. (2008): A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. Blood <u>112</u>, 2667–2674

- Gatza E, Rogers CE, Clouthier SG, Lowler KP, Tawara I, Liu C, Reddy P, Ferrara JLM (2008): Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. Blood <u>112</u>, 1515–1521
- Golestaneh L, Mokrzycki MH (2013): Vascular access in therapeutic apheresis: Update 2013. J Clin Apher <u>28</u>, 64–72
- González MJ, Urizar E, Urtaran-Laresgoiti M, Nuño-Solinís R, Lázaro-Pérez E, Vázquez L, Pascual-Cascón MJ, Solano C, Kwon M, Gallego C, Fernández-Avilés F (2021): Hospital and outpatient models for Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A systematic review of comparative studies for health outcomes, experience of care and costs. PLoS One <u>16</u>, e0254135
- Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorror ML, Boeckh M, Martin PJ, Sandmaier BM, Marr KA, Appelbaum FR et al. (2010): Reduced Mortality after Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. N Engl J Med <u>363</u>, 2091–2101
- Goussetis E, Varela I, Tsirigotis P (2012): Update on the mechanism of action and on clinical efficacy of extracorporeal photopheresis in the treatment of acute and chronic graft versus host disease in children. Transfus Apher Sci <u>46</u>, 203–209
- Gratwohl A, Niederwieser D (2012): History of Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Evolution and Perspectives. Curr Probl Dermatol <u>43</u>, 81–90
- Greinix HT, Knobler RM, Worel N, Schneider B, Schneeberger A, Hoecker P, Mitterbauer M, Rabitsch W, Schulenburg A, Kalhs P (2006): The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. Haematologica <u>91</u>, 405–408
- Hackstein H, Kalina A, Dorn B, Keil IS, Baal N, Michel G, Brendel C, Neubauer A, Jakob T, Bein G (2021): CD11c+ dendritic cells mediate antigen-specific suppression in extracorporeal photopheresis. Clin Exp Immunol <u>203</u>, 329–339
- Hambsch J, Büttner S, Heck M, Nicolay JP, Felcht M, Booken N, Klemke CD (2019): Unizentrische, retrospektive Analyse der praktischen Durchführung der extrakorporalen Photopherese. Hautarzt <u>70</u>, 193–203
- Har-Noy M, Slavin S (2008): The anti-tumor effect of allogeneic bone marrow/stem cell transplant without graft vs. host disease toxicity and without a matched donor requirement? Med Hypotheses <u>70</u>, 1186–1192
- Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, Chanswangphuwana C,
  Efebera YA, Holler E, Litzow M et al. (2016): International, multi-center standardization of
  acute graft-versus-host disease clinical data collection: a report from the MAGIC consortium.
  Biol Blood Marrow Transplant <u>22</u>, 4–10
- Häusermann P, Walter RB, Halter J, Biedermann BC, Tichelli A, Itin P, Gratwohl A (2008): Cutaneous Graft-versus-Host Disease: A Guide for the Dermatologist. Dermatology <u>216</u>, 287–304

- Hensel JA, Khattar V, Ashton R, Ponnazhagan S (2019): Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations. Lab Invest <u>99</u>, 93–106
- Hill GR, Ferrara JLM (2000): The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. Blood <u>95</u>, 2754–2759
- Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S (2002): Donor-type CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. J Exp Med <u>196</u>, 389–399
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B et al. (1990): Graft-Versus-Leukemia Reactions After Bone Marrow Transplantation. Blood <u>75</u>, 555–562
- Hülsdünker J, Zeiser R (2015): Insights into the pathogenesis of GvHD: what mice can teach us about man. Tissue Antigens <u>85</u>, 2–9
- Iniesta P, Revilla N, Chen-Liang TH, Hurtado AM, Vicente V, Heras I, Jerez A, Lozano ML (2018): An early increase of CD56bright natural killer subset as dominant effect and predictor of response to extracorporeal photopheresis for graft-versus-host disease. Transfusion <u>58</u>, 2924–2932
- Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, Palmer J, Weisdorf D, Treister NS, Cheng GS et al. (2015): National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. Biol Blood Marrow Transplant <u>21</u>, 389–401
- Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ (1986): Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graftv-host disease. Blood <u>68</u>, 770–773
- Knobler R, Barr ML, Couriel DR, Ferrara JLM, French LE, Jaksch P, Reinisch W, Rook AH, Schwarz T, Greinix H (2009): Extracorporeal photopheresis: Past, present, and future. J Am Acad Dermatol <u>61</u>, 652–665
- Knobler R, Arenberger P, Arun A, Assaf C, Bagot M, Berlin G, Bohbot A, Calzavara-Pinton P, Child F, Cho A et al. (2020): European dermatology forum – updated guidelines on the use of extracorporeal photopheresis 2020 – part 1. J Eur Acad Dermatol Venereol <u>34</u>, 2693–2716
- Knobler R, Arenberger P, Arun A, Assaf C, Bagot M, Berlin G, Bohbot A, Calzavara-Pinton P, Child F, Cho A et al. (2021): European dermatology forum: Updated guidelines on the use of extracorporeal photopheresis 2020 – Part 2. J Eur Acad Dermatol Venereol <u>35</u>, 27–49
- Koc S, Leisenring W, Flowers MED, Anasetti C, Deeg HJ, Nash RA, Sanders JE, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR, Martin PJ (2002): Therapy for chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. Blood <u>100</u>, 48–51

- Koyama M, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Wilson YA, Don ALJ, Lineburg KE, Cheong M, Robb RJ, Markey KA et al. (2012): Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. Nat Med <u>18</u>, 135–142
- Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY, Carabasi MH, Gale RP, Giralt S, Hale GA et al. (2002): Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. Blood <u>100</u>, 406–414
- Leveson-Gower DB, Olson JA, Sega EI, Luong RH, Baker J, Zeiser R, Negrin RS (2011): Low doses of natural killer T cells provide protection from acute graft-versus-host disease via an IL-4–dependent mechanism. Blood <u>117</u>, 3220–3229
- Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, Gebuhrer L, Dubois V, Jollet I, Bois M et al. (2007): HLA Association with Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome: The Number of Mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 Is Strongly Associated with Overall Survival. Biol Blood Marrow Transplant <u>13</u>, 965–974
- Lutz MB, Schuler G (2002): Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? Trends Immunol <u>23</u>, 445–449
- MacDonald KP, Shlomchik WD, Reddy P (2013): Biology of Graft-versus-Host Responses: Recent Insights. Biol Blood Marrow Transplant <u>19</u>, S10–S14
- Maeda A, Schwarz A, Kernebeck K, Gross N, Aragane Y, Peritt D, Schwarz T (2005): Intravenous Infusion of Syngeneic Apoptotic Cells by Photopheresis Induces Antigen-Specific Regulatory T Cells. J Immunol <u>174</u>, 5968–5976
- Malek TR, Bayer AL (2004): Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. Nat Rev Immunol <u>4</u>, 665–674
- Mangi RJ, Kantor FS (1975): The Multiple Mixed Lymphocyte Reaction: Variables Important in the Test as a Measure of Lymphocyte Competence in Man1 2. Yale J Biol Med <u>48</u>, 217–228
- Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good R (1991): T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. Blood <u>78</u>, 2120–2130
- Marshall SR (2006): Technology Insight: ECP for the treatment of GvHD—can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? Nat Clin Pract Oncol <u>3</u>, 302–314
- Meinhardt K, Kroeger I, Bauer R, Ganss F, Ovsiy I, Rothamer J, Büttner M, Atreya I, Waldner M, Bittrich M et al. (2015): Identification and characterization of the specific murine NK cell subset supporting graft-versus-leukemia- and reducing graft-versus-host-effects. OncoImmunology <u>4</u>, e981483
- Messina C, Faraci M, de Fazio V, Dini G, Calò MP, Calore E (2008): Prevention and treatment of acute GvHD. Bone Marrow Transplant <u>41</u>, S65–S70
- Ni M, Wang L, Yang M, Neuber B, Sellner L, Hückelhoven-Krauss A, Schubert ML, Luft T, Hegenbart U, Schönland S et al. (2019): Shaping of CD56bri Natural Killer Cells in Patients With Steroid-Refractory/Resistant Acute Graft-vs.-Host Disease via Extracorporeal Photopheresis. Front Immunol <u>10</u>, 547

- Oliven A, Shechter Y (2001): Extracorporeal photopheresis: a review. Blood Rev 15, 103-108
- Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS (2010): NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. Blood <u>115</u>, 4293–4301
- Papert S: New approaches to improve Extracorporeal Photopheresis for the treatment of Graftversus-Host Disease. Mol. Med. Diss. Göttingen 2016
- Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R (2001): Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice. Science <u>293</u>, 293–297
- Passweg JR, Baldomero H, Basak GW, Chabannon C, Corbacioglu S, Duarte R, Kuball J, Lankester A, Montoto S, de Latour RP et al. (2019): The EBMT activity survey report 2017: a focus on allogeneic HCT for nonmalignant indications and on the use of non-HCT cell therapies. Bone Marrow Transplant <u>54</u>, 1575–1585
- Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, Corbacioglu S, Duarte R, Dolstra H, Lankester AC, Mohty M, Montoto S et al. (2020): The EBMT activity survey on hematopoietic-cell transplantation and cellular therapy 2018: CAR-T's come into focus. Bone Marrow Transplant <u>55</u>, 1604–1613
- Pillai AB, George TI, Dutt S, Strober S (2009): Host natural killer T cells induce an interleukin-4– dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. Blood <u>113</u>, 4458–4467
- Quaglino P, Comessatti A, Ponti R, Peroni A, Mola F, Fierro MT, Savoia P, Novelli M, Bernengo MG (2009): Reciprocal Modulation of Circulating CD4+CD25+bright T Cells Induced by Extracorporeal Photochemotherapy in Cutaneous T-Cell Lymphoma and Chronic GRAFT-Versus-Host-Disease Patients. Int J Immunopathol Pharmacol <u>22</u>, 353–362
- Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, Keyvanfar K, Montero A, Hensel N, Kurlander R, Barrett AJ (2006): High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. Blood <u>108</u>, 1291–1297
- Rubegni P, Sbano P, Cevenini G, Perari MG, Marotta G, Risulo M, Carcagnì MR, D'Ascenzo G, De Aloe G, Fimiani M (2007): CD4+CD25+ Lymphocyte Subsets in Chronic Graft versus Host Disease Patients Undergoing Extracorporeal Photochemotherapy. Int J Immunopathol Pharmacol <u>20</u>, 801–807
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F et al. (2002): Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. Science <u>295</u>, 2097–2100
- Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A, Reichardt W, Karlsson FJ, Radhakrishnan SV, Hanke K et al. (2014): Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. Nat Med 20, 648–654

- Shames RS (2002): Gender differences in the development and function of the immune system. J Adolesc Health <u>30</u>, 59–70
- Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG (1999): Prevention of Graft Versus Host Disease by Inactivation of Host Antigen-Presenting Cells. Science <u>285</u>, 412–415
- Socié G, Ritz J (2014): Current issues in chronic graft-versus-host disease. Blood 124, 374-384
- Sweeney C, Vyas P (2019): The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. Front Oncol 2, 1217
- Sykes M, Romick ML, Sachs DH (1990): Interleukin 2 prevents graft-versus-host disease while preserving the graft-versus-leukemia effect of allogeneic T cells. Proc Natl Acad Sci U S A <u>87</u>, 5633–5637
- Teshima T, Hill GR (2021): The Pathophysiology and Treatment of Graft-Versus-Host Disease: Lessons Learnt From Animal Models. Front Immunol <u>12</u>, 715424
- Tischner D, Theiss J, Karabinskaya A, Brandt J van den, Reichardt SD, Karow U, Herold MJ, Lühder F, Utermöhlen O, Reichardt HM (2011): Acid Sphingomyelinase Is Required for Protection of Effector Memory T Cells against Glucocorticoid-Induced Cell Death. J Immunol <u>187</u>, 4509–4516
- Travnik R, Beckers M, Wolff D, Holler E, Landthaler M, Karrer S (2011a): Graft-versus-Host-Disease (GvHD) – ein Update. Hautarzt <u>62</u>, 139–155
- Travnik R, Beckers M, Wolff D, Holler E, Landthaler M, Karrer S (2011b): Graft-versus-Host-Disease (GvHD) – ein Update. Hautarzt <u>62</u>, 229–239
- Ullrich E, Salzmann-Manrique E, Bakhtiar S, Bremm M, Gerstner S, Herrmann E, Bader P, Hoffmann P, Holler E, Edinger M, Wolff D (2016): Relation between Acute GVHD and NK Cell Subset Reconstitution Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Front Immunol <u>7</u>, 595
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008): Functions of natural killer cells. Nat Immunol <u>9</u>, 503–510
- Weiden PL, Flournoy N, Thomas D, Prentice R, Fefer A, Buckner D, Storb R (1979): Antileukemic Effect of Graft-versus-Host Disease in Human Recipients of Allogeneic-Marrow Grafts. N Engl J Med <u>300</u>, 1068–1073
- Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ (2007): Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Annu Rev Immunol <u>25</u>, 139–170
- Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R, Wang Z, Sobocinski KA, Jacobsohn D, Sorror ML, Horowitz MM, Bolwell B, Rizzo JD, Socié G (2011): Long-Term Survival and Late Deaths After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. J Clin Oncol <u>29</u>, 2230–2239
- Wolf D, von Lilienfeld-Toal M, Wolf AM, Schleuning M, von Bergwelt-Baildon M, Held SAE, Brossart P (2012): Novel treatment concepts for graft-versus-host disease. Blood <u>119</u>, 16–25

- Wolff D, Steiner B, Hildebrandt G, Edinger M, Holler E (2009): Pharmaceutical and Cellular Strategies in Prophylaxis and Treatment of Graft-Versus-Host Disease. Curr Pharm Des <u>15</u>, 1974–1997
- Wolff D, Ayuk F, Elmaagacli A, Bertz H, Lawitschka A, Schleuning M, Meyer R-G, Gerbitz A, Hilgendorf I, Hildebrandt GC et al. (2013): Current Practice in Diagnosis and Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Results from a Survey among German-Austrian-Swiss Hematopoietic Stem Cell Transplant Centers. Biol Blood Marrow Transplant <u>19</u>, 767–776
- Wolff D, Fatobene G, Rocha V, Kröger N, Flowers ME (2021): Steroid-refractory chronic graftversus-host disease: treatment options and patient management. Bone Marrow Transplant <u>56</u>, 2079–2087
- Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB (1994): Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2incompatible transplanted SCID mice. Blood <u>83</u>, 2360–2367
- Yoo EK, Rook AH, Elenitsas R, Gasparro FP, Vowels BR (1996): Apoptosis Induction by Ultraviolet Light A and Photochemotherapy in Cutaneous T-Cell Lymphoma: Relevance to Mechanism of Therapeutic Action. J Invest Dermatol <u>107</u>, 235–242
- Zeng D, Lewis D, Dejbakhsh-Jones S, Lan F, García-Ojeda M, Sibley R, Strober S (1999): Bone Marrow NK1.1– and NK1.1+ T Cells Reciprocally Regulate Acute Graft versus Host Disease. J Exp Med <u>189</u>, 1073–1081
- Zilberberg J, Feinman R, Korngold R (2015): Strategies for the Identification of T Cell–Recognized Tumor Antigens in Hematological Malignancies for Improved Graft-versus-Tumor Responses after Allogeneic Blood and Marrow Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant <u>21</u>, 1000– 1007
- Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, Bellucci R, Raderschall E, Canning C, Soiffer RJ et al. (2006): IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. Blood <u>108</u>, 1571–1579

## Danksagung

Ohne die Unterstützung einer Vielzahl von Personen wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich nochmals meinen Dank aussprechen:

An die Zentralabteilung Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. J. Riggert, mit deren Bereitstellung von Labor und weiterer Ressourcen diese Arbeit überhaupt erst möglich wurde.

An meinen Betreuer Herrn Prof. Dr. T. J. Legler und meinen Ko-Betreuer Herrn Prof. Dr. R. Dressel, die mir konstruktive Rückmeldungen und Anregungen für weitere Forschungsaspekte meiner Arbeit sowie wertvolle Hinweise zu manch einem Detail meiner Dissertationsschrift gaben.

An Herrn Dr. H. Budde, der mich durch alle Abschnitte des Dissertationsprozesses begleitete. Vielen Dank für die stete Unterstützung im Labor, die zahlreichen Einführungen in verschiedene Gerätschaften und Versuchsmethoden, die Hilfe bei Arbeitsabläufen, die mit zwei Händen allein kaum umsetzbar gewesen wären, und ganz besonders für den wissenschaftlichen Austausch und die konstruktiven Rückmeldungen während der Verschriftlichung meiner Arbeit.

An Dr. F. Kück und Dr. J. Wiedenhöft von der Wissenschaftlichen Serviceeinheit "Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik" (MBSB) der Universitätsmedizin Göttingen, die mir im Rahmen der statistischen Kurzberatung hilfreiche Hinweise gaben.

An die Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen, welche die Grundversorgung der in dieser Arbeit eingesetzten Versuchs- und Spendertiere übernahm.