

Aus der Zentralabteilung für Transfusionsmedizin
(PD Dr. med. J. Riggert)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Extrakorporale Photopherese mit
UVC-behandelten Leukozyten im Vergleich
zu 8-MOP/UVA-behandelten Leukozyten
zur Therapie der akuten *graft-versus-host*
disease im Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Carla Marie Zwerenz

aus Lübben

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. T. J. Legler

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. I. Bogeski

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. med. T. J. Legler

Ko-Referent: Prof. Dr. med. I. Bogeski

Datum der mündlichen Prüfung: 02.03.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Extrakorporale Photopherese mit UVC-behandelten Leukozyten im Vergleich zu 8-MOP/UVA-behandelten Leukozyten zur Therapie der akuten *graft-versus-host disease* im Mausmodell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 05.12.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Stammzelltransplantation.....	1
1.2 GvHD	2
1.2.1 Prophylaxe	5
1.2.2 Therapie von akuter GvHD	5
1.3 ECP.....	6
1.3.1 Verfahren und Wirkmechanismen.....	6
1.3.2 ECP mit Ultraviolettstrahlung-C (UVC) statt 8-MOP/UVA	8
1.3.3 Qualitätskontrolle von ECP-Präparaten mit Proliferationsmarkern.....	9
1.4 Mausmodelle für akute GvHD und ECP.....	10
1.5 Ziele der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Arbeitsmaterialien und Reagenzien	12
2.2 Allgemeine Versuchsbedingungen.....	18
2.3 Zellkultur	19
2.3.1 Bestimmung der Leukozytenzahl mit Neubauer Zählkammer.....	19
2.3.2 Gewinnung von humanen MNZ.....	19
2.3.3 Gewinnung von murinen Splenozyten	20
2.3.4 Anlegen der Zellkultur.....	20
2.3.5 Behandlung der Zellkultur	20
2.3.6 Antikörperfärbung der Zellsuspensionen.....	21
2.4 Mausmodell zur akuten GvHD.....	23
2.4.1 Bestrahlung.....	23
2.4.2 Induktion von akuter GvHD durch HSZT	23
2.4.3 Venöse Injektion in die laterale Schwanzvene.....	26
2.4.4 ECP.....	26
2.4.5 Analyse des Gesundheitszustandes der Versuchstiere	27
2.4.6 Bestimmung der Leukozytenpopulationen	28
2.5 Statistische Auswertung.....	31
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Zellkultur humaner MNZ.....	33
3.1.1 Entwicklung der Zellzahl.....	34
3.1.2 Apoptoserate von TH-Zellen.....	34
3.1.3 Proliferationsrate von T-Zellen.....	37
3.2 Zellkulturen muriner Splenozyten	38

3.3	Einfluss der ECP auf die akute GvHD im Mausmodell.....	38
3.3.1	Überleben, Gewicht und klinischer Score.....	39
3.3.2	Immunologie.....	40
3.3.3	Immunologie in verschiedenen Krankheitsphasen.....	44
4	Diskussion.....	50
4.1	Auswirkung von 8-MOP/UVA oder UVC auf die Zellzahl in Zellkulturen.....	51
4.2	Auswirkung von 8-MOP/UVA oder UVC auf die Apoptoserate von CD3 ⁺ CD4 ⁺ TH-Zellen.....	51
4.3	Auswirkung von 8-MOP/UVA oder UVC auf die Proliferationsrate von CD3 ⁺ T-Zellen.....	53
4.4	ECP mit UVC-behandelten Splenozyten im Vergleich zu 8-MOP/UVA-behandelten Splenozyten im Mausmodell.....	55
4.4.1	Überleben, Gewicht und klinischer Score.....	55
4.4.2	Immunologie.....	55
4.5	Fazit und Ausblick.....	58
5	Zusammenfassung.....	60
6	Literaturverzeichnis	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gating-Strategie für durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate von CD3 ⁺ CD4 ⁺ TH-Zellen mit dem Marker Annexin V.....	22
Abbildung 2: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung der Proliferationsrate von CD3 ⁺ T-Zellen mit dem Proliferationsmarker CD71.....	23
Abbildung 3: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg von allen Splenozyten.....	29
Abbildung 4: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der CD3 ⁺ CD49b ⁺ NKT-Zellen von allen Splenozyten und deren Aktivierungsrate mit dem Marker CD69.....	30
Abbildung 5: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der CD3 ⁺ CD8 ⁺ zytotoxischen T-Zellen und der CD3 ⁺ CD4 ⁺ TH-Zellen von allen Splenozyten und deren Aktivierungsrate mit dem Marker CD69.....	31
Abbildung 6: Versuchsplan zur Messung der Apoptose- und Proliferationsrate an vier Zeitpunkten.	33
Abbildung 7: Anzahl der Leukozyten in den Zellkulturen zur Bestimmung der Apoptose- und Proliferationsrate in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	34
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate von CD3 ⁺ CD4 ⁺ TH-Zellen nach Behandlung mit UVC.	35
Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate von CD3 ⁺ CD4 ⁺ TH-Zellen nach Behandlung mit 8-MOP/UVA oder UVC.	36
Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der Proliferationsrate von CD3 ⁺ T-Zellen nach Behandlung mit 8-MOP/UVA oder UVC.	37
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate von murinen CD3 ⁺ CD4 ⁺ TH-Zellen und der Proliferationsrate von murinen CD3 ⁺ T-Zellen nach Behandlung mit UVC.	38
Abbildung 12: ECP-Therapie mit 8-MOP/UVA- oder UVC-behandelten Splenozyten einer C3H-Maus bei akuter GvHD.	40
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen bei akuter GvHD nach ECP mit 8-MOP/UVA- oder UVC-behandelten Splenozyten von C3H-Mäusen.....	42
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der Aktivierungsrate der Immunzellen bei akuter GvHD nach ECP mit 8-MOP/UVA- oder UVC-behandelten Splenozyten von C3H-Mäusen.....	43
Abbildung 15: Analyse des CD4/CD8-Quotienten bei akuter GvHD nach ECP mit 8-MOP/UVA- oder UVC-behandelten Splenozyten von C3H-Mäusen.....	44
Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen bei akuter GvHD in verschiedenen Krankheitsphasen.	46
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der Aktivierungsrate der Immunzellen bei akuter GvHD in verschiedenen Krankheitsphasen.....	48
Abbildung 18: Analyse des CD4/CD8-Quotienten bei akuter GvHD in verschiedenen Krankheitsphasen.	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Organstadien der akuten GvHD	3
Tabelle 2: Gesamtschweregrad der akuten GvHD	4
Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	12
Tabelle 4: Chemikalien.....	15
Tabelle 5: Humane AK für die Durchflusszytometrie	16
Tabelle 6: Murine AK für die Durchflusszytometrie.....	16
Tabelle 7: AK für die Wachstumsstimulation.....	17
Tabelle 8: AK für die Zellseperation.....	17
Tabelle 9: Lösungen	18
Tabelle 10: Mauslinien	18
Tabelle 11: Software.....	18
Tabelle 12: Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Transplantatlösungen.....	26
Tabelle 13: Beurteilung des klinischen Scores der akuten GvHD im Mausmodell.....	28

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zellen
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
ECP	extrakorporale Photopherese
FTTC	Fluoresceinisothiocyanat
GK	Glukokortikoide
GvHD	<i>graft-versus-host disease</i>
GvT	<i>Graft-versus-Tumor-Effekt</i>
HLA	humane Leukozytenantigene
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexe, <i>major histocompatibility complex</i>
miHA	minor Histokompatibilitätsantigene
MNZ	mononukleären Zellen
NaCi	Natriumcitrat
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PUVA	Psoralen-plus-UVA-Therapie
RT	Raumtemperatur
S-Phase	Synthese-Phase
TH-Zelle	T-Helferzelle
Treg	regulatorische T-Zellen
UVA	Ultraviolettstrahlung-A
UVC	Ultraviolettstrahlung-C
8-MOP	8-Methoxypsoralen

1 Einleitung

1.1 Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist eine etablierte Methode zur Behandlung von verschiedenen hereditären und erworbenen Erkrankungen des blutbildenden Systems und vieler Tumorerkrankungen (Copelan 2006). Die erste HSZT wurde 1957 von Thomas und seinem Team (1957) bei einem Patienten mit akuter Leukämie durchgeführt. Bis heute hat sich die Methode der HSZT stetig weiterentwickelt, jedoch geht das Verfahren immer noch mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher (Juric et al. 2016).

Vor der Transplantation findet eine Konditionierung statt. Diese besteht aus einer Chemotherapie, einer Bestrahlung oder einer Kombination aus beidem. Sie hat das Ziel, die malignen Zellen zu zerstören. Bei allogener HSZT wird zusätzlich das Immunsystem geschwächt, damit die neuen Stammzellen sich besser ansiedeln können. Hämatopoetische Stammzellen sind multipotent, besitzen die Eigenschaft, sich selbst zu erneuern und sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren. Haben sich die Stammzellen nach der Transplantation erfolgreich angesiedelt, beginnen sie mit der Blutbildung sowie mit der Bildung eines neuen Immunsystems (Copelan 2006).

Je nach Art der Erkrankung und des Gesundheitszustands besteht die Möglichkeit der autologen HSZT. Dabei werden dem Patienten eigene Stammzellen entnommen und zu einem späteren Zeitpunkt reinfundiert. Seltener findet in der Praxis die allogene HSZT Anwendung (Passweg et al. 2012). Hier werden die Stammzellen von einem verwandten oder unverwandten Fremdspender gewonnen. Voraussetzung dafür ist eine möglichst hohe Übereinstimmung der humanen Leukozytenantigene (HLA) von Spender und Empfänger. Hämatopoetische Stammzellen können aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut und dem Nabelschnurblut gewonnen werden. Die am häufigsten angewendete Methode ist die Gewinnung aus dem Blut. Um den Anteil der Stammzellen im Blut zu erhöhen, erhalten die Spender vor der Spende den Wachstumsfaktor *granulocyte colony-stimulating factor* (Passweg et al. 2012). Stammzellen aus dem peripheren Blut benötigen eine kürzere Zeit zum Anwachsen als Stammzellen aus dem Knochenmark (Holtick et al. 2014; Wu et al. 2015). Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs ist geringer. Dies ist damit zu erklären, dass in Transplantaten aus dem peripheren Blut mehr T-Zellen enthalten sind, die den nützlichen *Graft-versus-Tumor-Effekt* (GvT), auch *Graft-versus-Leukämie-Effekt* genannt, vermitteln. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer *graft-versus-host disease* (GvHD) erhöht (Passweg et al. 2012). In einer Studie von Anasetti et al. (2012) war die 2-Jahres-Überlebensrate nach allogener HSZT von einem unverwandten Spender bei der Spende aus

dem Knochenmark vergleichbar mit der Überlebensrate nach der Spende peripherer Stammzellen und betrug ca. 50 %.

1.2 GvHD

Die GvHD ist eine spezielle Komplikation der allogenen HSZT. Es handelt sich um eine systemische Erkrankung. Ursächlich sind Spender-T-Zellen, welche Alloantigene des Empfängers als fremd erkennen und eine Entzündungsreaktion verursachen. Billingham (1966) postulierte drei Bedingungen, die erfüllt sein müssten, damit eine GvHD entstehen kann: Das Transplantat enthalte immunkompetente Zellen, der Empfänger sei immungeschwächt und könne das Transplantat nicht abstoßen und Spender und Empfänger seien immuninkompatibel.

Die Immunkompatibilität wird unter anderem durch die Haupthistokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complex*, MHC) bestimmt. Diese umfassen eine Gruppe von Genen, deren Produkt die Histokompatibilitätsantigene sind. Beim Menschen werden sie als HLA bezeichnet. Stimmen die HLA des Spenders und des Empfängers überein (8 von 8 Gewebemerkmale), können auch sog. minor Histokompatibilitätsantigene (miHA), Proteine welche am MHC gebunden sind, die Ursache für eine GvHD sein (Ferrara et al. 2009).

Die Pathophysiologie von akuter GvHD lässt sich in drei Schritten beschreiben. An erster Stelle steht die Konditionierung für die HSZT und die damit einhergehende Entzündungsreaktion, durch die Entzündungsmediatoren freigesetzt und antigenpräsentierende Zellen (APZ) aktiviert werden. Danach folgen die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der T-Zellen. Im letzten Schritt kommt es zur Entzündung und Zerstörung des Gewebes (Reddy und Ferrara 2003; Ferrara et al. 2009).

Die GvHD ist eine der Hauptkomplikationen nach allogener HSZT und ist die häufigste Todesursache bei Patienten ohne Rezidiv (Dignan et al. 2012). Eine verlässliche Aussage über die Häufigkeit des Auftretens der Erkrankung zu treffen ist schwierig, da in aktuellen Studien verschiedene Einschlusskriterien verwendet wurden und sich die Zahlen unterschieden. Es ist nachgewiesen, dass ein Zusammenhang zwischen Histoinkompatibilität und Auftreten von GvHD besteht (Ferrara et al. 2009). In Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren tritt die akute GvHD bei 10-80 % der Patienten auf. Die ersten Symptome zeigen sich normalerweise zwei bis drei Wochen nach HSZT (Garnett et al. 2013).

In der Vergangenheit wurde die GvHD anhand der Zeit, die zwischen Transplantation und Einsetzen der Krankheit verging, in akute und chronische GvHD eingeteilt (Martin et al. 1990). Treten die Symptome innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auf, handelt es sich um eine akute GvHD, danach um die chronische Form. Diese Einteilung wurde durch eine Einteilung nach klinischen Symptomen abgelöst, da Symptome der akuten GvHD auch noch nach 100 Tagen auftreten können, wenn zum Beispiel die Behandlung mit

Glukokortikoiden (GK) ausgeschlichen wird (Garnett et al. 2013). Das Krankheitsbild der akuten GvHD manifestiert sich vor allem in der Haut, der Leber und dem Darm (Jacobsohn und Vogelsang 2007). Der Gesamtschweregrad der Erkrankung ergibt sich aus den Schweregraden der betroffenen Organe (Tabelle 1 und 2).

Tabelle 1: Organstadien der akuten GvHD

	Haut	Darm	Leber
Schweregrad	klinisches Bild	Diarrhoe* [ml/d]	Bilirubin [mg/dl]
0	kein Erythem/Exanthem	< 500	< 2
1	makulopapulöses Exanthem < 25 % der Körperoberfläche ¹	500-1000 ² oder 3-6 Stühle/d oder Übelkeit ³	2-3
2	makulopapulöses Exanthem 25-50 % der Körperoberfläche	1000-1500 oder > 6 Stühle/d ³	3-6
3	generalisiertes Exanthem	> 1500 oder > Stühle/d ³	6-15
4	generalisiertes Exanthem mit Blasenbildung und Desquamation > 5 % KO	„akuter Bauch“ mit oder ohne paralytischen Ileus blutige Diarrhoe	> 15

*Es gelten anderen Werte für Kinder.

¹Berechnung der Körperoberfläche (KO) nach 9er-Regel

²Stuhlmenge pro Stuhlgang mindestens 100-200 ml

³anhaltende Übelkeit mit histologischen Zeichen einer GvHD in Magen- oder Duodenalbiopsien

Modifiziert nach Harris et al. (2016), die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Tabelle 2: Gesamtschweregrad der akuten GvHD

Grad	Haut	Leber	Darm
0	0	0	0
I (leicht)	1-2	0	0
	0	0-1	0-1
II (moderat)	0	0-1	1
	1-3	1	0-1
	3	0	0
III (schwer)	2-3	2-3	2-3
IV (lebensbedrohlich)	2-4	2-4	2-4

Modifiziert nach Glucksberg et al. (1974), die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc.

Ungefähr die Hälfte der Patienten, die an einer akuten GvHD erkranken, entwickeln im späteren Verlauf eine chronische GvHD (Jacobsohn und Vogelsang 2007). Die Symptome und deren Ausprägung können divers sein. Dabei ähnelt eine chronische GvHD einer Autoimmunerkrankung (Jagasia et al. 2015). Normalerweise manifestiert sich die Erkrankung in einem oder mehreren der folgenden Organe bzw. Organsysteme: Lunge, Leber, Gastrointestinaltrakt, Mund, Auge, Genitalien oder Haut. Die chronische GvHD wird in drei Schweregrade eingeteilt: leicht, moderat und schwer. Der Schweregrad zeigt an, wie viele Organe und zu welchem Grad sie von GvHD betroffen sind. Die Beteiligung der Lunge wird gesondert berücksichtigt (Filipovich et al. 2005).

Neben der HLA-Kompatibilität sind unter anderem die Art der Konditionierung, die Herkunft und die Art der Gewinnung des Transplantats, das Geschlecht und das Alter Faktoren, die das Risiko für die Entstehung einer GvHD beeinflussen.

Je stärker die Konditionierung und die damit einhergehende Schädigung des Gewebes ist, desto höher ist das Risiko an GvHD zu erkranken. Stammt das Transplantat von einem Verwandten und ist HLA-kompatibel, so ist das Risiko zu erkranken geringer als bei einem kompatiblen, nicht verwandten Spender. Die Wahrscheinlichkeit, an einer GvHD zu erkranken, ist am niedrigsten, wenn die Stammzellen aus Nabelschnurblut gewonnen wurden. Darüber hinaus ist das Risiko bei aus dem Knochenmark gewonnenen Stammzellen geringer als bei peripheren Stammzellen. Das Risiko zu erkranken steigt, wenn Spender und Empfänger unterschiedliche Geschlechter haben. Männer haben ein höheres Risiko zu erkranken, wenn sie Stammzellen von einer Spenderin erhalten. Mit steigendem Alter von Empfänger und Spender steigt das Risiko, eine GvHD zu entwickeln. Zudem kann eine niedrige Anzahl regulatorischer T-Zellen (Treg) die Entstehung einer GvHD begünstigen (Jacobsohn und Vogelsang 2007; Zeiser und Blazar 2017).

1.2.1 Prophylaxe

Für die Prophylaxe wie auch die Therapie einer GvHD gibt es keine Standardverfahren. Es wurden jedoch verschiedene Leitlinien herausgegeben, welche die Grundlage für die Handlungspläne der Kliniken liefern (Ruutu et al. 2014; Zeiser et al. 2020). Eine besondere Schwierigkeit bei der Prävention und Behandlung von GvHD besteht darin, den gewünschten und nützlichen GvT beizubehalten. Hierbei handelt es sich um einen Anti-Tumor-Effekt, der von den im Transplantat enthaltenen T-Zellen vermittelt wird. Diese erkennen Tumorzellen, welche durch die vorherige Behandlung und Konditionierung nicht zerstört wurden und eliminieren diese (Kolb 2008).

Eine Option zur Vermeidung der Entstehung einer GvHD ist die Reduktion oder Depletion der T-Zellen im Transplantat. Die Depletion der T-Zellen verhindert das Entstehen einer GvHD, aber auch den GvT. Außerdem kommt es vermehrt zu Infektionen, Rezidiven und Transplantatversagen. Insgesamt verbessert sich die Überlebenschance der Patienten mit dieser Behandlung nicht (Goker et al. 2001).

Der wichtigste Schritt bei der Prävention der GvHD besteht darin, die Risikofaktoren (siehe 1.2) möglichst gering zu halten. Zusätzlich wird in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, zum Beispiel der Art der Grunderkrankung, dem Verwandtschaftsgrad von Spender und Empfänger und deren Alter eine immunsuppressive Prophylaxe verabreicht. Dabei wird ein Calcineurin-Antagonist, wie zum Beispiel Cyclosporin A, meist in Kombination mit Methotrexat, einem Folsäureantagonisten, angewendet. Durch den Calcineurin-Antagonisten wird die Interleukin-2 Produktion gesenkt, in Kombination mit Methotrexat wird die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten vermindert (Zeiser und Blazar 2017). Zusätzlich zur immunsuppressiven Therapie kann Antithymozytenglobulin verabreicht werden. In einer Zusammenfassung mehrerer Studien zeigte dies zwar keine Verringerung der Inzidenz von akuter GvHD oder eine höhere Überlebensrate, allerdings war die akute GvHD bei den Patienten weniger stark ausgeprägt (Theurich et al. 2012).

1.2.2 Therapie von akuter GvHD

Trotz der Maßnahmen zur Prävention erkranken viele Menschen nach einer allogenen HSZT an einer GvHD. Nachdem andere Ursachen für das Krankheitsbild ausgeschlossen wurden, muss der Schweregrad der GvHD bestimmt werden. Bei akuter und chronischer GvHD ist der Goldstandard für die Erstlinientherapie eine Behandlung mit GK. Deren genaue Wirkung auf die GvHD ist nicht bekannt. Man geht davon aus, dass der Effekt durch die Suppression von Zytokinen und die Senkung der Lymphozytenaktivität vermittelt wird. Ist nur die Haut von der GvHD betroffen (Grad I), reicht zunächst eine lokale Therapie sowie eine Anpassung der Prophylaxe aus. Bei einer GvHD \geq Grad II wird eine systemische Therapie mit GK empfohlen (Murray et al. 2018). Auf die Therapie mit GK sprechen circa 40 % der Patienten an (Weisdorf et al. 1990). Je geringer die GvHD ausgeprägt ist, desto

wahrscheinlicher ist eine erfolgreiche Erstlinientherapie (MacMillan et al. 2002). Die Therapie mit GK bringt eine Reihe an Nebenwirkungen mit sich wie Hyperglykämie, Osteoporose und ein erhöhtes Infektionsrisiko. Patienten werden unter dieser Therapie besonders für Virus- und Pilzinfektionen anfällig. Dem kann mit einer entsprechenden Begleitmedikation entgegengewirkt werden. Dennoch muss bei der Therapie eine Balance zwischen Nutzen und Risiko gefunden werden.

Verschlechtert sich der Zustand des Patienten über drei Tage oder zeigt sich keine Verbesserung der Symptome fünf Tage nach Therapiebeginn, sollte eine Zweitlinientherapie eingeleitet werden (Dignan et al. 2012). In Deutschland, Österreich und der Schweiz werden am häufigsten Mycophenolat-Mofetil oder eine extrakorporale Photopherese (ECP) angewendet (Wolff et al. 2013). Man spricht von einer steroidrefraktären GvHD.

1.3 ECP

1.3.1 Verfahren und Wirkmechanismen

Die ECP ist ein Therapieverfahren, das Leukapherese und Fotochemotherapie verbindet. Es wurde von Edelson et al. (1987) zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms entwickelt. Dies ist bis heute die einzige Indikation für welche die ECP von der *US Food and Drug Administration* zugelassen ist (Pre-market Approval). Als sogenannte *off-label* Therapie wird die ECP heute zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation und bei GvHD eingesetzt (Hart et al. 2013).

Die ECP läuft in drei Schritten ab: Leukapherese, Fotoaktivierung und Reinfusion. Im ersten Schritt werden mononukleären Zellen (MNZ) aus dem Blut des Patienten gewonnen. Dazu wird dem Patienten ein peripherer venöser Zugang gelegt. Bei schlechter Venensituation kann auch ein zentralvenöser Zugang genutzt werden. Durch Zentrifugation werden die verschiedenen Blutbestandteile voneinander getrennt und der sogenannte Buffy-Coat gewonnen. Dieser besteht hauptsächlich aus MNZ, zu denen auch die Leukozyten und die Blutplättchen gehören. Bei der ECP werden 10-15 % der zirkulierenden Leukozyten behandelt (Just und Knobler 2015). Dafür sind circa 240 ml Buffy-Coat notwendig, die in drei bis sechs Apheresezyklen gewonnen werden (Hart et al. 2013). Im zweiten Schritt wird der Fotoaktivator 8-Methoxypsoralen (8-MOP) (z.B. UVADEX 20 µg/ml, Therakos Inc., UK) als sterile Lösung zum Buffy-Coat gegeben. Anschließend folgt die Bestrahlung mit Ultraviolettstrahlung-A (UVA) bei einer Wellenlänge von 352 nm mit einer Dosis von 2 J/cm². Die Bestrahlung dauert circa 25-45 min (Ward 2011; Hart et al. 2013). Im dritten Schritt wird dem Patienten der behandelte Buffy-Coat reinfundiert.

Die ECP ist einer Weiterentwicklung der Psoralen-plus-UVA-Therapie (PUVA). Bei dieser wird 8-MOP oral verabreicht und anschließend die Haut mit UVA bestrahlt. Diese Form der Therapie wirkt vor allem auf und in der Haut (Knobler et al. 2009) und wird beispielsweise

zur Behandlung von Psoriasis eingesetzt (Ward 2011). Zu Beginn der ECP-Therapie wurde das 8-MOP, wie bei der PUVA, oral eingenommen. Dies war mit kurzfristigen Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen verbunden. Zudem bestand langfristig ein erhöhtes Risiko für Hautkrebs (Knobler et al. 2009). Außerdem wurde das 8-MOP von den Patienten unterschiedlich gut aufgenommen, sodass die Konzentration im Blut schwankte. Aus diesen Gründen wurde fünf Jahre nach Einführung der ECP das 8-MOP direkt in den Apheresebeutel gegeben. Dadurch konnte die benötigte Menge an 8-MOP um das 200-fache reduziert werden (Ward 2011).

Es gibt zwei verschiedene Systeme, mit denen eine ECP durchgeführt werden kann. In einem offenen System, auch Offline-Verfahren genannt, wird ein Gerät verwendet, um den Buffy-Coat zu gewinnen, das 8-MOP wird manuell hinzugefügt und eine separate Kammer wird für die Bestrahlung genutzt. In dem geschlossenen System, auch Inline-Verfahren genannt, finden alle Arbeitsschritte in einem Gerät statt. Marktführend sind die Geräte Therakos Uvar XTS und Therakos Cellex von Therakos Inc. (Westchester, PA, USA). In den meisten Zentren wird das geschlossene System genutzt, da das Infektionsrisiko und das Risiko, die Apheresebeutel zu vertauschen, geringer sind (Dunbar et al. 2017).

Obwohl die ECP seit über 30 Jahren zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen genutzt wird, ist die genaue Wirkungsweise nicht abschließend geklärt. Nach dem aktuellen Stand der Forschung sind mehrere zelluläre Mechanismen für die Wirkung von Bedeutung. Während der Leukapherese ändert sich die Umgebung der Zellen im Buffy-Coat. Sie haben Kontakt zu körperfremden Oberflächen, die Temperatur und der pH-Wert ändern sich. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Monozyten. Diese differenzieren zu unreifen dendritischen Zellen (Cho et al. 2018; Edelson et al. 2018).

Die Behandlung mit 8-MOP und UVA löst Apoptose in einigen Zellen aus. 8-MOP wird durch die UVA aktiviert, verursacht DNA *cross-linking* und Doppelstrangbrüche, was zur Einleitung des programmierten Zelltods führt (Heshmati 2003). Dieser tritt in etwa innerhalb von 48 h ein (Voss et al. 2010). Vor allem T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehen in Apoptose (Wolnicka-Glubisz et al. 2010). Wenn die Bestrahlung mit UVA beendet ist, geht 8-MOP in seine inaktive Form zurück und verursacht keine weiteren Schäden in den Zellen.

Nach der Reinfusion werden die apoptotischen Zellen von unreifen dendritischen Zellen phagozytiert. Diese differenzieren zu aktiven APZ und präsentieren die Antigene der phagozytierten Zellen auf ihrer Oberfläche. Dies wird als Transimmunisierung bezeichnet (Girardi et al. 2006). Die APZ wandern in Lymphknoten und Milz ein und präsentieren den reifenden T-Zellen ihre Antigene. Im Fall der GvHD entstehen dadurch Treg spezifisch gegen die alloreaktiven T-Zell-Linien (Biagi et al. 2007; Hart et al. 2013). Diese können die alloreaktiven T-Zellen supprimieren und tragen zur Regulation der Immunantwort bei. Langfristig führt eine ECP bei GvHD-Patienten zu einer gesteigerten Produktion inhibitorischer Zytokine wie Interleukin-10. Zudem konnte bei einigen GvHD-Patienten nach ECP eine Normalisierung des CD4/CD8-Quotienten sowie der Wechsel von einer

T-Helferzell-Immunantwort-Typ-1 zu einer Typ-2-Antwort beobachtet werden (Gorgun 2002).

Im Gegensatz zu anderen Therapien ist die ECP spezifisch für die pathogenen T-Zell-Klone des Patienten (Edelson et al. 2018). Außerdem kann eine ECP immunisierend wirken, zum Beispiel bei der Behandlung von Tumorerkrankungen. Sie kann aber auch zur Toleranzentwicklung führen bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Dabei hat die Therapie ein geringes Nebenwirkungsprofil und ist risikoarm (Edelson et al. 2018). Dennoch ist die Durchführung einer ECP nicht immer möglich. Kontraindikationen sind eine Unverträglichkeit gegen 8-MOP, eine Schwangerschaft, eine heparininduzierte Thrombozytopenie oder Aphakie (Therakos, Inc.). Ein weiterer limitierender Faktor ist das Gewicht des Patienten. Für einige Geräte wird ein Mindestgewicht empfohlen, um den Volumenverlust bei der Apherese zu tolerieren. Dies stellt vor allem bei Kindern ein Problem dar. Je nach verwendetem Gerät sollten auch Referenzwerte für die Blutplättchen und den Hämatokrit eingehalten werden (Ward 2011; Just und Knobler 2015; Dunbar et al. 2017). Eine weitere Limitation ist der Gesundheitszustand der Patienten. Bei Patienten mit einer schweren akuten GvHD kann die körperlich anstrengende Apherese teilweise nicht durchgeführt werden.

Für die Zweitlinientherapie von akuter GvHD wird die ECP initial drei Mal pro Woche und anschließend zwei Mal pro Woche bis zum Ansprechen auf die Therapie empfohlen. Danach können die Abstände weiter vergrößert werden (Greinix et al. 2014). Bei akuter GvHD sprechen 82 % der Patienten mit Manifestation in der Haut, 61 % mit Manifestation in der Leber und 60 % mit Manifestation im Gastrointestinaltrakt auf die Therapie an (Greinix et al. 2014). Spricht ein Patient mit akuter GvHD auf die ECP an, verbessert sich die Überlebenschance (Greinix et al. 2006). Aktuell wurde in einer Studie von Malard et al. (2018) die ECP auch als Erstlinientherapie für die GvHD getestet. Am besten sprachen die Patienten mit einer GvHD Grad I-II an. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass bei Patienten nach Diagnose so früh wie möglich mit einer ECP begonnen werden sollte.

1.3.2 ECP mit Ultraviolettstrahlung-C (UVC) statt 8-MOP/UVA

Bei der ECP werden MNZ des Patienten mit 8-MOP behandelt und anschließend mit UVA bestrahlt. Das 8-MOP wird dem Apheresebeutel manuell zugeführt. In diesem Moment wird das geschlossene System geöffnet. Dies bietet eine potentielle Eintrittspforte für Keime und Erreger. Trotz der geringen Nebenwirkungen der ECP kann das 8-MOP zu einer hohen Lichtempfindlichkeit, besonders der Augen, führen. Bei einer Unverträglichkeit gegen 8-MOP kann eine ECP nicht angewendet werden. Um diesen Limitierungen des ECP-Verfahrens entgegenzuwirken, wurde in einer früheren Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe die Therapie *in vitro* mit UVC durchgeführt (Barrios-Bussmann 2020). UVC besitzt eine Wellenlänge von 100-280 nm und hat damit eine geringere Eindringtiefe als UVA mit einer Wellenlänge von 315-380 nm. Dafür ist die UVC energiereicher. Schon lange ist bekannt,

dass UVC keimtötend wirkt. Durch die UVC entstehen in der DNA mutagene und zytotoxische Läsionen, die wiederum zum programmierten Zelltod führen. Diese Eigenschaft der UVC wird zum Beispiel bei Operationen genutzt. Es wurde gezeigt, dass die Bestrahlung der Wunden mit UVC das Infektionsrisiko senken kann (Ritter et al. 2007; Narita et al. 2018b). Barrios-Bussmann (2020) konnte zeigen, dass die energiereichere UVC allein ausreicht, um Apoptose in verschiedenen MNZ zu induzieren. Die Wirkung in einem Zellkulturmodell war mit der Kombination aus 8-MOP und UVA vergleichbar.

1.3.3 Qualitätskontrolle von ECP-Präparaten mit Proliferationsmarkern

Für die Wirkung der ECP ist die Induktion der Apoptose der behandelten Leukozyten ein entscheidender Schritt. Aus diesem Grund wird in Studien entweder die Apoptose- und/oder die Proliferationsrate der betreffenden Zellen zur Qualitätskontrolle der ECP-Präparaten bestimmt (Evrard et al. 2010; Cervio et al. 2015; Faivre et al. 2015; Taverna et al. 2015). Bis heute gibt es weder vom führenden Hersteller der geschlossenen ECP-Einheiten Therakos Inc. (Dunbar et al. 2017) noch von einer Fachgesellschaft Empfehlungen zur Qualitätskontrolle der Präparate.

Bei der Messung der Proliferationsrate wird nach erfolgreichem Einsatz von 8-MOP/UVA eine deutliche Reduktion über die Zeit erwartet. Bei den meisten Verfahren wird die Proliferationsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Sofern möglich sollten im Speziellen die CD3⁺ Zellen untersucht werden, da diese für den immunmodulatorischen Effekt hauptsächlich verantwortlich sind (Arora und Setia 2017).

In Studien zu ECP-Präparaten wurden in der Vergangenheit folgende Methoden zur Bestimmung der Proliferationsrate verwendet:

1. Der Zytoplasmafarbstoff Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE), er überwindet die Zellmembran und kann die Zelle anschließend nicht mehr verlassen. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzelle weitergegeben. Durch die Abnahme der Konzentration des Farbstoffes in der Zelle lässt sich die Proliferationsrate bestimmen. Auf den Zellzyklus bezogen, lässt sich mit dieser Färbung die Zytokinese nachweisen (Evrard et al. 2010; Cervio et al. 2015; Faivre et al. 2015; Romar et al. 2016).
2. Die Nukleosid-Analoga tritiiertes Thymidin und Bromdesoxyuridin, sie werden während der Synthesephase (S-Phase) bei der Verdopplung der DNA in diese eingebaut und können dann nachgewiesen werden. Von Nachteil ist, dass die Nukleosid-Analoga oftmals mit einem radioaktiven Label versehen werden (Faivre et al. 2015; Romar et al. 2016; Szczepiorkowski et al. 2018).
3. Der Oberflächenmarker CD71, es handelt sich um einen Transferrinrezeptor. Er wird auf ruhenden Lymphozyten in geringem Maß exprimiert. Bei Aktivierung und Proliferation findet man ihn vermehrt auf der Zelloberfläche. CD71 kann durch einen Antikörper (AK), welcher an ein Fluorochrom gekoppelt ist, nachgewiesen werden (Wieland und Shipkova 2016).

1.4 Mausmodelle für akute GvHD und ECP

Tiermodelle tragen maßgeblich zum Verständnis der Pathophysiologie von GvHD bei. Bereits 1978 fanden Korngold und Sprent (1978) in einem Mausmodell, dass alloreaktive T-Zellen der Auslöser für GvHD sind. Für die Forschung an GvHD werden meistens Inzuchtmauslinien verwendet. Die Form der GvHD, also akut oder chronisch, wird in Tiermodellen vor allem durch den sichtbaren Phänotyp definiert und beruht auf unterschiedlicher Beteiligung von T-Helferzellen (TH-Zelle) und zytotoxischen T-Zellen (Schroeder und DiPersio 2011).

Zur Untersuchung der akuten GvHD wird meistens ein Mausmodell mit komplettem MHC-*mismatch* verwendet, bei dem Knochenmarks- und T-Zellen von C57BL/6-Mäusen in mit Bestrahlung konditionierte BALB/c-Mäuse transplantiert werden (Schroeder und DiPersio 2011). Bei einem vollständigen MHC-*mismatch* entsteht die GvHD hauptsächlich durch die Reaktion der CD4⁺ TH-Zellen, wobei CD8⁺ zytotoxische T-Zellen auch an der Entstehung beteiligt sein können. Die Immunantwort der CD4⁺ TH-Zellen ist gekennzeichnet durch einen sog. Zytokinsturm, der eine *Graft-versus-Host*-Reaktion in den verschiedenen Zielgeweben auslösen kann. Die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen verursachen GvHD vornehmlich durch zytolytische Prozesse (Reddy et al. 2008).

Der Verlauf und die Schwere der GvHD im Modell lässt sich durch folgende Faktoren modulieren: den Anteil und die Art der Subpopulation von T-Zellen im Stammzelltransplantat, die Bestrahlungsdosis, den Grad der genetischen Unterschiede zwischen Spender- und Empfängertier und äußere Faktoren wie Umweltpathogene (Schroeder und DiPersio 2011). Dabei ist die Bestrahlungsdosis proportional zum entstehenden Gewebeschaden und dem folgenden Zytokinsturm. Dieser wiederum ist proportional zur Mortalität der transplantierten Tiere (Schwarte et al. 2007).

Mausmodelle bilden die Grundlage für die Erforschung neuer Behandlungsmethoden und die Verbesserung bereits etablierter Behandlungen. Die Nutzung von Mausmodellen bietet den Vorteil, dass oben genannte Faktoren kontrolliert und dem gewünschten Krankheitsbild angepasst werden können. Außerdem kann eine ausreichende Anzahl an Tieren gleichzeitig transplantiert werden und die Modelle sind kosteneffektiv. Von Nachteil ist, dass Unterschiede zum Transplantationsverfahren und der Therapie beim Menschen bestehen. In den Modellen werden meist gesunde Tiere transplantiert, um eine GvHD auszulösen. Als Konditionierung wird nur Bestrahlung angewandt, selten Chemotherapie. Nach der Transplantation werden die Empfängertiere nicht mit GK behandelt (Markey et al. 2014).

Um den Effekt einer ECP im Mausmodell untersuchen zu können, übertrugen Gatza et al. (2008) das in der Klinik genutzte Verfahren in ein Mausmodell und konnten einen therapeutischen Effekt bei akuter GvHD nachweisen. Auch Budde et al. (2014) konnten diese Wirkung in einem Mausmodell zur akuten GvHD mit totalem MHC-*mismatch* zeigen. Außerdem konnten Budde et al. (2018) zeigen, dass eine ECP-Therapie mit Splenozyten

einer dritten unbeteiligten Mauslinie bei einem MHC-*mismatch*-Modell für akute GvHD zu einer Verbesserung der Überlebenszeit und des klinischen Krankheitsbilds führt.

1.5 Ziele der Arbeit

Eine allogene HSZT ist oft die einzige Behandlungsmöglichkeit für viele maligne und immunologische Erkrankungen. Die Überlebensrate nach der Behandlung liegt seit der Entdeckung der Methode zwischen 40-50 %. Eine GvHD ist die häufigste Komplikation und ein Grund für die hohe Mortalität (Juric et al. 2016).

Als Zweitlinientherapie wird häufig die ECP eingesetzt. In einer Studie wurde diese Therapie bereits als Erstlinientherapie verwendet (Malard et al. 2018), was das große Potential der ECP untermauert. Sie bringt wenige Nebenwirkungen mit sich und wird als risikoarm eingestuft. In dieser Arbeit wurde die Fragestellung behandelt, ob eine ECP mit UVC-behandelten Splenozyten im Mausmodell vergleichbare Effekte erzielt wie eine konventionelle ECP mit 8-MOP- und UVA-behandelten Splenozyten. Diese Fragestellung ergab sich aus einer zuvor durchgeführten Doktorarbeit, in der die Wirkung von UVC im Zellkulturmodell mit der Kombination aus 8-MOP/UVA vergleichbar war (Barrios-Bussmann 2020).

Um die Qualität der Präparate zu kontrollieren, wurden die Apoptoserate der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen und die Proliferationsrate der CD3⁺ T-Zellen bestimmt. Es gibt keine einheitliche Empfehlung zur Qualitätskontrolle der ECP-Präparate. Als relativ neuer Marker wurde in diesem Versuch der Proliferationsmarker CD71 verwendet. Dieser wurde von Schwab und Kollegen (2018) als schnelle und einfache Technik zur Qualitätskontrolle von ECP-Präparaten vorgestellt. Hier wurden die optimalen Bedingungen für die Nutzung von CD71 untersucht. Einfache, einheitliche Tests zur Bestimmung der Qualität der Präparate wären sinnvoll, um vergleichende Studien durchführen zu können und eine Vergleichbarkeit der Präparate in den verschiedenen Behandlungszentren zu garantieren.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmaterialien und Reagenzien

Die folgenden Tabellen (Tabelle 3 - Tabelle 11) geben eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Arbeitsmaterialien. Die Reagenzien wurden zur besseren Nachvollziehbarkeit in Untergruppen aufgelistet.

Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Gerät	Hersteller
Pipettierhilfe	Accu Jet, Accu Jet pro	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Erbstadt
Zentrifuge	Rotana 46 RS	Hettich, Kirchlegern
Tischzentrifuge	ProFuge™ 10 K	Hettich, Kirchlegern
Zählkammer	Neubauer- <i>improved</i> Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön
Eiswanne	Magic Touch™ Iceware	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Tischkühlbehälter	NALGENE® labtop cooler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer	BD FACS CANTO II™ <i>Flow Cytometer</i>	BD Biosciences, San Jose, USA
Chirurgische Klemme	Arterienklemme nach Pean	Fine Sience Tools, Heidelberg
Schere	Chirurgische Schere	Fine Sience Tools, Heidelberg
Tiefkühlschrank	-20 °C, Comfort	Liebherr, Kirchdorf
	GFD 14AG0	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München
Inkubator	Hera Cell ®	Heraeus, Hanau
Infrarotlampe	Sollux 750	Original Hanau, Hanau
Bestrahlungseinheit	Xstrahl RS255	Gulmay Medical Limited, Surray, UK

Bezeichnung	Gerät	Hersteller
Mausinjektionsröhre		Werkstatt UMG, Göttingen
Rollermischer	IDL TRM-50	IDL GmbH & Co KG, Nidderau
Kunststoffbox		Werkstatt UMG, Göttingen
Taschenwaage	TEE 150-1	Kern&Sohn, Balingen
Kühlschrank	Premium 4 °C	Liebherr, Kirchdorf
	Comfort 4 °C	Liebherr, Kirchdorf
Waage	N3300-500	Accuris Instruments, Edison, USA
	Kern EMP 1200-I	Kern&Sohn, Balingen
sterile Werkbank	<i>microflow biological safety cabinet MDH 51426</i>	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Durchlichtmikroskop	Axiostar	ZEISS, Göttingen
Inverses Auflichtmikroskop	Axiovert 25	ZEISS, Göttingen
MACS-Zellseparator	QuadoMACS™ separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Separationssäulen	<i>LS Columns</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Vakuumpumpe	LABOPORT® N86 NK.18	KNF, Village-Neuf, Frankreich
UV-Bestrahlungssystem	Crosslinker, 254 nm, Cat.No.3100100	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
	Crosslinker, 365 nm, Cat.No.3100300	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Zellschaber	Cell Scraper 25 cm	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
50-ml-Reaktionsgefäß	Cellstar®, konisch, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
15-ml-Reaktionsgefäß	Cellstar®, konisch, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Bezeichnung	Gerät	Hersteller
Eppendorfggefäß	Eppendorf <i>Safe-Lock-Tubes</i> , 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen	5 ml, <i>Round-Bottom-Tube</i> , Polystyrene	Falcon, Durham, USA
Glaspasteurpipetten		Brand GmbH&Co. KG, Wertheim
Pipetten	Research, Reference, Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	10/20 µl, 100 µl, 1000 µl <i>TipOne Filter Tip (sterile)</i>	STARLAB International GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen	2,5 µl <i>Safe-Seal-Tips®</i> Premium	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Serologische Pipetten	10 ml, 25 ml	STARLAB International GmbH, Hamburg
25-cm ² -Zellkulturflaschen	25 cm ² T-25 Flask, CytoOne, steril	STARLAB International GmbH, Hamburg
75-cm ² -Zellkulturflaschen	75 cm ² , Cellstar®, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischale	Durchmesser: 5 cm, 10 cm	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Zellsieb	40 µm Nylon, EASY <i>strainer</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalhandschuhe	Nitril	Th.Geyer GmbH&Co.KG, Renningen
Einmal OP-Haube	Barrier 42013	Mölnlycke Health Care, Göteborg, Sweden
Mundschutz		Farsted medical GmbH, Barsbüttel
Einwegspritze mit Nadel	1 ml, 26 GA 3/4 IN, 0.45 x 10 mm	BD, Durham, USA
Insulinspritze	U-100 Insulin, 30 G, 0,3 ml	BD, Durham, USA
Skalpell	FEATHER <i>disposable scalpel</i>	pfm medical ag, Köln

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Methoxypsoralen-Lösung 0,02 mg/ml	UMG Apotheke, Göttingen
Alkopharm 80	Brüggemann Alcohol Heilbronn GmbH, Heilbronn
<i>Annexin-Binding-Buffer</i>	BioLegend, San Diego, USA
<i>AutoMACS Running Buffer - MACS Seperation Buffer</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
FoxP3/Transkriptionsfaktor Fixations- /Permeabilisationskonzentrat and Diluent	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Neomycintrisulfatsalzhydrat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Novaminsulfon - ratiopharm Tropfen (500 mg/ml)	ratiopharm GmbH, Ulm
Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate- buffered saline</i> , PBS) pH 7,4 (1x)	Gibco Life Technologies Corporation, Paisley, UK
<i>Red Blood Cell Lysis Buffer</i> (10X)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrate	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Aqua	B.Braun, Melsungen
<i>fetal calf serum</i>	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies Corporation, Gran Island, USA
RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX	Gibco Life Technologies Limited, Paisly, UK
<i>Pan T Cell Isolation Kit II</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Tabelle 5: Humane AK für die Durchflusszytometrie

Antigen	Flouorchrom	Klon	Hersteller
Annexin V	FITC	-	BioLegend, San Diego, USA
CD4	PE	Okt 14	BioLegend, San Diego, USA
CD3	Pacific Blue	Okt 03	BioLegend, San Diego, USA
CD71	APC	CY1G4	BioLegend, San Diego, USA

Tabelle 6: Murine AK für die Durchflusszytometrie

Antigen	Flouorchrom	Klon	Hersteller
Annexin V	FITC	-	BioLegend, San Diego, USA
CD117	APC	3C1	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
CD25	PE	PC61.5	eBioscience, Inc., San Diego, USA
CD3e	Pacific Blue	eBio500A2	Invitrogen, Carlsbad, USA
CD4	FITC	RM4-5	eBioscience, Inc., San Diego, USA
CD49b (pan-NK cell marker)	APC	DX5	BioLegend, San Diego, USA
CD3	FITC	17A2	BioLegend, San Diego, USA
CD8a	APC	53-6.7	BioLegend, San Diego, USA
FoxP3	APC	FJK-16s	eBioscience, Inc., San Diego, USA

Antigen	Flouorchrom	Klon	Hersteller
<i>Lineage Cell Detection Cocktail-Biotin</i>		CD3 (SK7); CD16 (3G8); CD19 (SJ25C1); CD20 (L27); CD14 (MOP9); CD56 (NCAM 16.2)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
<i>MACS Control CD90.2 T Cell Cocktail</i>	PE, VioBlue	30-H12; 30F11	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
CD69	PE	H1.2F3	BioLegend, San Diego, USA
CD4	PE	RM4-5	BioLegend, San Diego, USA
CD71	APC	RI7217	BioLegend, San Diego, USA
TruStain FcX™ (CD16/32)		93	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Biotin	FITC	Bio3-18E7	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach

Tabelle 7: AK für die Wachstumsstimulation

Antigen	Klon	Hersteller
CD28	CD28.2	BioLegend, San Diego, USA
CD3	OKT3	BioLegend, San Diego, USA

Tabelle 8: AK für die Zellseparation

Antigen	Isotyp	Hersteller
CD90.2 <i>Micro Beads</i>	Rat IgG2b	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach

Tabelle 9: Lösungen

Lösung	Inhalt
Trinkwasser für Mäuse	100 ml Neomycin-Lösung, 900 ml H ₂ O, 2,7 ml Metamizol
Fixations- + Permeabilisationspuffer (1x)	1 Teil Fixation-/Permeabilisationskonzentrat (4x), 3 Teile Fixations- /Permeabilisationsdiluent
MACS-Puffer	AutoMACS Running Buffer
Permeabilisationspuffer (1x)	1 Teil Permeabilisationspuffer (10x), 9 Teile destilliertes H ₂ O
Natriumcitrat (NaCi)- Lösung	73,5 g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, 1 l destilliertes H ₂ O
NaCi-Puffer	1 Teil NaCi-Lösung, 1 Teil PBS
Neomycin-Lösung	250 mg Neomycintrisulfatsalzhydrat in 1 l H ₂ O
Zellkulturmedium	450 ml RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 50 ml <i>fetal calf serum</i>

Tabelle 10: Mauslinien

Linie / Stamm	Züchter
BALB/cAnNCrl	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
C3H/HeNRj	JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Ilse, France
C57BL/6JRj	JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Ilse, France

Tabelle 11: Software

Software	Hersteller
BD FACS Diva Software Version 6.1.2	BD Biosciences, New York, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA
Microsoft Office 2010 & 2019	Microsoft Coporation, Redmond, USA

2.2 Allgemeine Versuchsbedingungen

Vor der Durchführung der Versuche wurden der Arbeitsplatz, die sterile Werkbank, Geräte und Chemikalien für die Nutzung unter der sterilen Werkbank mit 80-prozentigem Ethanol desinfiziert. Es wurden, soweit möglich, sterile Lösungen verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, fanden die Zentrifugationen bei Raumtemperatur (RT) mit einer Beschleunigung von 9 und mit der Bremsfunktion R = 9 statt.

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde das Durchflusszytometer BD FACS CANTO II von BD Biosciences und die Software BD FACS Diva Software Version 6.1.2 verwendet. Nach Möglichkeit wurden 50.000 Ereignisse (Zellen) pro Färbung gemessen. Die Auswertung der Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism 6 durchgeführt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Bestimmung der Leukozytenzahl mit Neubauer Zählkammer

Die Zellzahl wurde manuell mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops und einer Neubauerzählkammer bestimmt. Vor Benutzung wurden die Oberfläche der Zählkammer sowie das Deckgläschen mit 80-prozentigem Ethanol gereinigt. Das Deckgläschen wurde auf die Zählkammer geschoben und 20 μ l der Lösung seitlich aufpipettiert. Es wurden mindestens zwei große Eckquadrate ausgezählt. Die Anzahl der ermittelten Leukozyten wurde durch die Anzahl der ausgezählten Quadrate dividiert und mit zehn multipliziert, um die Zellzahl pro 1 μ l zu erhalten. Nach einer vorangegangenen Verdünnung der Lösung musste der Verdünnungsfaktor einberechnet werden. Die Leukozytenzahl wurde immer von mir ausgezählt.

2.3.2 Gewinnung von humanen MNZ

Die humanen Leukozyten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus einem Buffy-Coat isoliert. Der Buffy-Coat wurde von der Blutbank der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt (Ethikvotum 26/9/17). Als Erstes wurde der Buffy-Coat im Blutbeutel vorsichtig durchmischt. Anschließend wurden die ersten 10 ml des Buffy-Coats verworfen und 25 ml in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 25 ml NaCl-Puffer gegeben. Das Gemisch wird als Buffy-Lösung bezeichnet. Der NaCl-Puffer wurde unter der sterilen Werkbank hergestellt (siehe Tabelle 9). In ein weiteres 50-ml-Reaktionsgefäß wurden 20 ml Ficoll-Paque-Plus-Lösung pipettiert. Diese wurden mit 25 ml Buffy-Lösung überschichtet. Zu beachten war, dass sich die beiden Schichten nicht vermischen. Es folgte eine Zentrifugation bei 600 g für 30 min ohne Bremse ($R = 0$). Durch die spezifische Osmolarität und Dichte der Ficoll-Paque-Plus-Lösung war es möglich, den Buffy-Coat in seine einzelnen Bestandteile aufzutrennen. Nach der Zentrifugation fand man auf dem Boden des Reaktionsgefäßes ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten. Darauf folgten von unten nach oben eine Schicht aus Ficoll-Lösung, eine Schicht aus MNZ und eine Plasmaschicht. Die oberste Schicht wurde mit einer Glaspasteurpipette teilweise abgesaugt. Die mittlere Schicht aus MNZ wurde mit einer 1000- μ l-Pipette in ein neues 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen betrug 3-6 ml. Es wurde mit dem 3-fachen Volumen an NaCl-Puffer vermischt und danach bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt. Das entstandene Pellet wurde zuerst in 1 ml NaCl-Puffer gelöst und dann mit weiteren 9 ml NaCl-Puffer vermischt. Es folgte ein weiterer

Zentrifugationsschritt bei 200 g für 10 min. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 2 ml NaCl-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl in der Zellsuspension wurde mit einer Zählkammer ermittelt. Hierzu wurde die Zellsuspension 1:100 mit NaCl-Puffer verdünnt.

2.3.3 Gewinnung von murinen Splenozyten

Eine Eiswanne wurde mit Eis befüllt und unter die Sterilbank gestellt. Dort wurde eine Petrischale mit 5 cm Durchmesser mit 10 ml sterilem, gekühltem MACS-Puffer befüllt und auf Eis gestellt. Der Eisbehälter wurde anschließend auf den Arbeitsplatz gebracht. Nach Tötung der Maus (C3H) wurde der Bauchraum mit einer sterilen Schere geöffnet und die Milz entnommen. Die Milz wurde unverzüglich in die Petrischale gelegt und mit dem Eisbehälter unter die sterile Werkbank gestellt. Dort wurde ein 40- μ m-Zellsieb auf einem 50-ml-Reaktionsgefäß angebracht und mit 2 ml MACS-Puffer gespült. Die Milz wurde auf das angefeuchtete Zellsieb gelegt, mit dem Stempel einer 5-ml-Spritze zerkleinert und durch das Sieb gemörsert. Während des Zerkleinerungsprozesses wurden das Sieb und der Stempel immer wieder mit 1 ml MACS-Puffer gespült. War nur noch ein farbloser Geweberest auf dem Sieb zu sehen, wurde es abschließend mit 2 ml MACS-Puffer gespült. Danach wurde die Zellzahl der Suspension mit Hilfe einer Zählkammer ermittelt. Die Zellsuspension wurde 1:10 mit MACS-Puffer verdünnt.

2.3.4 Anlegen der Zellkultur

Die Herstellung des Zellkulturmediums erfolgte unter der sterilen Werkbank aus sterilen Lösungen (siehe Tabelle 9). Nach der Herstellung wurde es für maximal 4 Wochen im Kühlschrank gelagert und verwendet. Abhängig von der vorhandenen Zellzahl wurden 75-cm²-Zellkulturflaschen oder 25-cm²-Zellkulturflaschen verwendet. In 75-cm²-Zellkulturflaschen wurden in 10 ml Medium 10⁷ Zellen ausgesät, in 25-cm²-Zellkulturflaschen in 5 ml Medium 5 x 10⁶ Zellen. Das entspricht einer Millionen Zellen pro 1 ml Medium. Die Zellen wurden in Medium mit RT ausgesät. Zum Aussähen der Zellen wurde die benötigte Anzahl der Zellen stets in 100 μ l Medium gelöst. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % inkubiert.

2.3.5 Behandlung der Zellkultur

Für die Untersuchungen der Apoptoserate und Proliferationsrate wurden Zellkulturen entweder mit 8-MOP/UVA oder mit UVC behandelt. Dazu wurde pro Behandlungsform eine 25-cm²-Zellkulturflasche unter der sterilen Werkbank mit 5 ml MACS-Puffer befüllt. Die benötigte Anzahl von Zellen mit einer Zugabe von 30 % wurde nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 500 μ l MACS-Puffer pro Zellkulturflasche gelöst und in die Zellkulturflaschen überführt. Für die Behandlung mit 8-MOP/UVA wurden in die Zellkulturflasche 50 μ l 8-MOP-Lösung hinzugegeben und die Zellkulturflasche mehrmals geschwenkt. Die Bestrahlung erfolgte mit dem UVA-Bestrahlungssystem mit einer UVA-

Dosis von $2,2 \text{ J/cm}^2$. Das entspricht einer effektiven Energie von 2 J auf die Zellen (die Bestimmung erfolgte in diesem Labor durch Testreihen von Barrios-Bussmann (2020)). Nach der Bestrahlung wurden 10 ml MACS-Puffer in die Zellkulturflasche gegeben. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren erfolgte eine Überführung der Zellen in ein 50-ml-Reaktionsgefäß. Für die Behandlung mit UVC wurde die Zellkulturflasche unter dem UVC-Bestrahlungssystem mit einer Dosis von $6,7 \text{ J/cm}^2$ bestrahlt. Dies entspricht ebenfalls einer effektiven Energie von 2 J auf die Zellen (Barrios-Bussmann 2020). Nach der Bestrahlung wurde die Suspension in der Zellkulturflasche mehrmalig auf- und abpipettiert und anschließend in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. Eine erneute Bestimmung der Zellzahl erfolgte bei einer Verdünnung von 1:10. Nach einer Zentrifugation bei 200 g für 10 min wurden die Zellpellets in $100 \mu\text{l}$ MACS-Puffer pro vorgesehener Zellkulturflasche gelöst.

2.3.6 Antikörperfärbung der Zellsuspensionen

Für die Färbung der Zellen aus den Zellkulturen wurden die Zellen zuerst aus der Zellkulturflasche in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. Dafür wurden die Zellen mit einem Zellschaber von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurde das Medium einige Male in der Flasche auf- und abpipettiert. Dabei wurde der Boden der Flasche gespült. Danach wurde die Anzahl der Zellen ermittelt. Das Medium mit den Zellen wurde bei 350 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert. Das Puffervolumen war abhängig von der Zellzahl. Das verwendete Volumen betrug $100 \mu\text{l}$ MACS-Puffer pro eine Millionen Zellen.

Die Apoptoserate der Zellen wurde bei humanen Zellkulturen an vier verschiedenen Zeitpunkten, bei murinen Zellen an drei Zeitpunkten gemessen.

Die Apoptoserate wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie und fluoreszenzmarkierten AK gemessen. Um die Apoptoserate zu bestimmen, war ein 2-stufiges Färbeverfahren notwendig. Im ersten Schritt wurde der für T-Zellen spezifische Rezeptor CD3 mit dem Farbstoff Pacific Blue markiert. Um die TH-Zellen abgrenzen zu können, musste zusätzlich ein AK gegen das Glykoprotein CD4 mit dem Farbstoff Phycoerythrin (PE) verwendet werden. Im zweiten Schritt wurde Annexin V gekoppelt an den Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) als Apoptoseindikator benutzt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches sich bei intakten Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet (Abbildung 1). Geht die Zellintegrität verloren, zum Beispiel durch Apoptose der Zelle, ist Phosphatidylserin auch auf der Außenseite der Zellmembran zu finden, so dass Annexin V binden kann. Für die Messung der Apoptose wurden $100 \mu\text{l}$ der vorbereiteten Zellsuspension in ein 5-ml-FACS Röhrchen überführt und $200 \mu\text{l}$ in ein weiteres Röhrchen als Kontrolle. Zu der Kontrolle wurden $200 \mu\text{l}$ MACS-Puffer hinzugegeben und diese anschließend bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank gelagert. In das Röhrchen für die Färbung wurden $2,5 \mu\text{l}$ CD3-AK Pacific Blue und $0,75 \mu\text{l}$ CD4-AK PE pipettiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT im Dunkeln wurden 2 ml MACS-Puffer hinzugefügt und es folgte eine Zentrifugation bei 350 g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $100 \mu\text{l}$

Annexin-Puffer gelöst. Danach wurde der Lösung mit 2,5 µl Annexin V FITC für 15 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden weitere 400 µl Annexin-Puffer hinzugefügt und die Probe wurde sofort mit dem Durchflusszytometer gemessen.

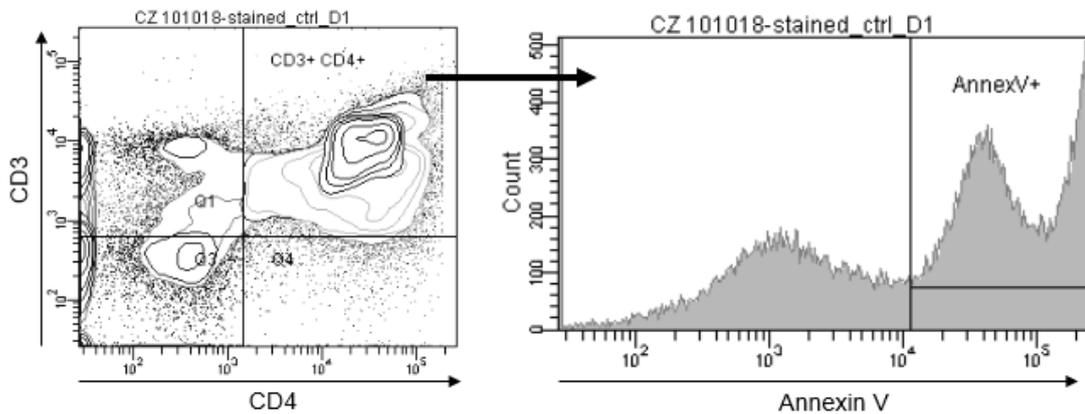


Abbildung 1: Gating-Strategie für durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate von CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen mit dem Marker Annexin V.

Die Proliferationsrate der Zellen wurde bei humanen Zellkulturen an vier verschiedenen Zeitpunkten gemessen, bei murinen Zellen an drei Zeitpunkten.

Um die Proliferationsrate bestimmen zu können, mussten die T-Zellen mit AK aktiviert werden. Dafür wurde den Zellkulturen nach Aussäen der Zellen 2,5 µg/ml Anti-CD28 zugefügt. Es folgte eine Inkubationszeit von 24 h, 48 h und 72 h. Ein bis zwei Stunden vor der Messung der Proliferationsrate wurden 5 µg/ml Anti-CD3 unter sterilen Bedingungen in die Zellkultur gebracht und diese anschließend weiter inkubiert. Zur Bestimmung der Proliferationsrate der T-Zellen wurden zwei fluoreszierende AK verwendet. Um die T-Zellen zu markieren, wurde der spezifische T-Zell-Rezeptor CD3 mit dem Farbstoff Pacific Blue markiert. CD71 ist ein Transferrin-Rezeptor, der vermehrt auf proliferierenden Zellen exprimiert wird. Dieser wurde mit dem Farbstoff Allophycocyanin (APC) markiert, um den Anteil der proliferierenden T-Zellen zu bestimmen (Abbildung 2). Für die Messung der Proliferationsrate wurden 100 µl der vorbereiteten Zellsuspension in ein 5-ml-FACS-Röhrchen überführt und 200 µl in ein weiteres Röhrchen als Kontrolle. Zu der Kontrolle wurden 200 µl MACS-Puffer hinzugegeben und diese anschließend bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. In das Röhrchen für die Färbung wurden 4 µl CD3-AK Pacific Blue und 5 µl CD71-AK APC pipettiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT im Dunkeln wurden 2 ml MACS-Puffer hinzugefügt. Es folgte eine Zentrifugation bei 350 g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl MACS-Puffer gelöst. Anschließend wurde die Proliferationsrate mit dem Durchflusszytometer bestimmt.

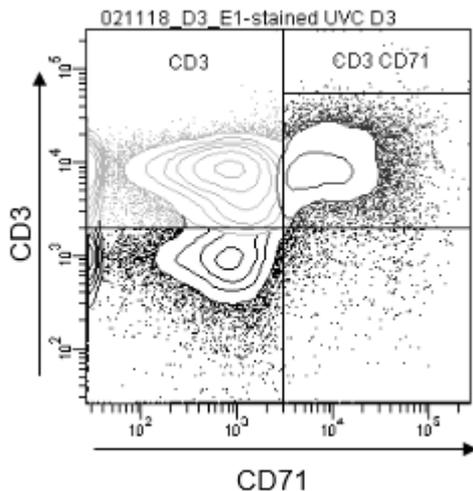


Abbildung 2: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung der Proliferationsrate von CD3⁺ T-Zellen mit dem Proliferationsmarker CD71.

2.4 Mausmodell zur akuten GvHD

Die Versuchstiere (Tierversuchsantrag/Antragsnummer 33.9-42502-04-14/1448) wurden in Gruppen von maximal fünf Tieren in IVC (*individually ventilated cage*)-Käfigen gehalten. Die Käfige waren in der Tierhaltung der Universitätsmedizin Göttingen untergebracht. Der Hell-Dunkel-Rhythmus setzte sich aus 12 h Helligkeit und 12 h Dunkelheit zusammen. Die Tiere wurden *ad libitum* mit Futter und Trinkwasser versorgt. Ab dem ersten Tag nach HSZT erhielten die Tiere Trinkwasser mit dem Zusatz von Schmerzmittel und Antibiotika (siehe Tabelle 9). Bei Durchfall oder einem Gewicht von unter 18 g erhielten die Tiere zusätzlich Breifutter. Dieses wurde mit der Trinkwasserlösung hergestellt. Schieden die Tiere aus dem Versuch aus oder der Versuch wurde beendet, erfolgte die Tötung der Tiere durch Inhalation von CO₂. Anschließend wurde zusätzlich eine zervikale Dislokation durchgeführt.

2.4.1 Bestrahlung

Einen Tag vor der allogenen HSZT wurden die Versuchstiere (BALB/c) bestrahlt. Dazu wurden jeweils zehn Mäuse in einen durchsichtigen Kunststoffbehälter gesetzt und gleichzeitig mit der Dosis 1 Gy/min bestrahlt. Die Mäuse erhielten eine Gesamtdosis von 9,5-10 Gy. Zur Bestrahlung wurde das RS 255 X-Ray Research System mit folgenden Einstellungen verwendet: 200 kV, 15 mA, Tischhöhe 470 und Filter fünf.

2.4.2 Induktion von akuter GvHD durch HSZT

Als Empfängertiere wurden pro Versuchsserie 18 männliche BALB/c-Mäuse verwendet. Zu Beginn des Versuchs betrug deren Alter neun Wochen. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden den Empfängermäusen Knochenmark und T-Zellen transplantiert, um die akute GvHD auszulösen. Als Spendertiere wurden sieben männliche C57BL/6-Mäuse benutzt. Nach der Tötung erfolgte die Entnahme von Lymphknoten, Milz, Femur und Tibia. Das

Knochenmark wurde aus Femur und Tibia gewonnen. Aus Milz und Lymphknoten wurden T-Zellen isoliert. Aus den Zellsuspensionen wurde das Transplantat mit 10^7 Knochenmarkszellen und 2×10^6 T-Zellen pro 150 μ l PBS hergestellt, wobei das angestrebte Verhältnis aus Lymphknotenzellen und Milzzellen 1:1 betrug. Das Transplantat wurde durch die laterale Schwanzvene injiziert.

Für die Gewinnung und Aufreinigung von murinen T-Zellen wurde vorbereitend eine Eiswanne mit Eis befüllt und unter die sterile Werkbank gestellt. Anschließend wurden zwei Petrischalen mit 10 cm Durchmesser mit MACS-Puffer befüllt und auf Eis gestellt. Nach der Tötung der Maus wurden die Lymphknoten (inguinal, zervikal, axial, intestinal) und die Milz mit Hilfe von chirurgischem Besteck entnommen und in eine Petrischale mit kaltem MACS-Puffer überführt. Die Petrischale wurde auf Eis gestellt. Unter der sterilen Werkbank wurden Zellsuspensionen hergestellt. Hierzu wurde über ein 50-ml-Reaktionsgefäß ein 40- μ m-Zellsieb gelegt und dieses mit 2 ml MACS-Puffer gespült. Dann wurden einige Lymphknoten oder eine Milz auf das Sieb gelegt und mit dem Stempel einer 5-ml-Spritze durch das Sieb gemörsert. Unterdessen wurde das Sieb immer wieder mit MACS-Puffer gespült. Die Milz und die Lymphknoten wurden solange gemörsert, bis ein farbloser Geweberest auf dem Sieb zurückblieb. Ein Zellsieb wurde für zwei Milzen nacheinander verwendet.

Die Zellzahl der Zellsuspensionen wurde durch Zählen mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. Dazu wurden die Suspensionen im Verhältnis 1:10 (Lymphknoten) und 1:100 (Milz) mit MACS-Puffer verdünnt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen bei 300 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt.

Die T-Zellen wurden durch *magnetic cell separation* isoliert. Dabei können Zellen aufgrund ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle vom Rest der Zellen getrennt werden. AK, die mit magnetischen *beads* konjugiert wurden, werden dem Zellgemisch zugefügt und binden an die dazugehörigen Antigene. Wird die Lösung anschließend durch eine magnetische Säule in einem starken Magnetfeld geleitet, werden alle mit AK markierten Zellen zurückgehalten. In der Lösung befinden sich nur noch unmarkierte Zielzellen. Die T-Zell Isolation erfolgte mit dem *Pan T Cell Isolation Kit II* nach Anweisungen des Herstellers.

Die Zellpellets wurden in je 13 μ l MACS-Puffer pro 10^7 Zellen gelöst und nach der Zugabe von 3 μ l *Pan-T-Cell-Isolation-Kit-II*-Lösung pro 10^7 Zellen für 10 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden jeweils 10 μ l MACS-Puffer pro 10^7 Zellen und 6,5 μ l *Anti-Biotin-Beads* pro 10^7 Zellen hinzugegeben und für weitere 15 min bei gleicher Temperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen und bei 300 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Pellet in 4 ml MACS-Puffer gelöst.

Die Zellseparation erfolgte bei 4 °C mit Hilfe des magnetischen MACS-Separators. Es wurden zwei MACS-Separationssäulen in dem MACS-Separator befestigt und jeweils mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Der MACS-Puffer wurde in einem 15-ml-Reaktionsgefäß aufgefangen. Anschließend wurden neue 15-ml-Reaktionsgefäße unter die Säulen gestellt und jeweils die Hälfte einer Zellsuspension (Milz/Lymphknoten) in eine Säule pipettiert. Zum

Schluss wurden die Separationssäulen mit 3 ml Puffer gespült. Die Schritte zur Zellseparation wurden für die zweite Hälfte der Zellsuspension wiederholt. Die separierten Zellen wurden in dem gleichen 15-ml-Reaktionsgefäß aufgefangen, sodass ca. 10 ml unmarkierte Zielzellenlösung pro Zellsuspension entstand. Die Zellzahl wurde durch Zählen mit einer Zählkammer ermittelt. Der Anteil von T-Zellen im Endvolumen wurde durch Durchflusszytometrie ermittelt.

Für die Gewinnung und Aufreinigung von murinem Knochenmark wurden wie zuvor eine Wanne mit Eis und das chirurgische Besteck vorbereitet. Nach der Tötung der Maus wurden die Knochen der Hinterbeine soweit möglich von Fell und Muskeln befreit und anschließend am Übergang zum Becken mit einer Schere abgetrennt. Weitere Muskelreste wurden mit einem Skalpell entfernt. Tibia und Femur wurden von den übrigen Knochen getrennt und in eine Petrischale gelegt. Die Petrischale wurde auf Eis gestellt und unter der sterilen Werkbank wurde eine Zellsuspension hergestellt. Dafür wurden zuerst die Enden von Tibia und Femur vorsichtig mit einer Schere abgetrennt. Mit einer 1-ml-Spritze wurde MACS-Puffer aufgenommen und damit das Knochenmark aus dem Knochenschaft in eine Petrischale gespült. Das Gemisch aus Knochenmark und Puffer wurde in der Petrischale mit der 1-ml-Spritze einige Male auf- und abgezogen, bis eine homogene Zellsuspension entstand. Über ein 50-ml-Reaktionsgefäß wurde ein 40- μ m-Zellsieb gelegt und dieses mit 2 ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde durch das Sieb pipettiert und das Sieb anschließend noch einmal mit 2 ml Puffer gespült. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Zählkammer. Dazu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit MACS-Puffer verdünnt. Nach einer Zentrifugation bei 300 g für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1500 μ l MACS-Puffer gelöst. Die Knochenmarkszellen wurden durch *magnetic cell separation* von T-Zellen befreit. Es wurde ein CD90.2-AK mit magnetischen *beads* genutzt. Diese binden spezifisch, sodass alle markierten T-Zellen im Magnetfeld zurückgehalten werden. In der Lösung befinden sich anschließend nur noch nicht markierte Zielzellen. In diesem Versuch wurden 180 μ l CD90.2-*Micro-Beads* der Zellsuspension zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Probe mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen und erneut bei 300 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 4 ml Puffer gelöst. Die Zellseparation erfolgte bei 4 °C mit Hilfe des magnetischen MACS-Separators analog zu der Vorgehensweise bei der Gewinnung von T-Zellen. Das Endprodukt waren 10 ml unmarkierte Zielzellen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer ermittelt. Der Anteil von T-Zellen und Stammzellen im Endvolumen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Qualitätskontrolle für die Milz- und die Lymphknotensuspension wurde nach dem gleichen Schema durchgeführt. Für die Färbung wurden 100 μ l der Suspension in ein 5-ml-FACS-Röhrchen gegeben und 5 μ l CD90.2-Cocktail wurden hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4 °C im Dunkeln wurde das Gemisch mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation bei 350 g für 5 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 μ l MACS-Puffer gelöst. Als Kontrolle wurden 100 μ l der

Zellsuspension in ein 5-ml-FACS-Röhrchen pipettiert und die gleiche Menge MACS-Puffer hinzugefügt. Die Färbung und die Kontrolle wurden bis zur Messung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Qualitätskontrolle der Knochenmarksuspension wurden in zwei 5-ml-FACS-Röhrchen jeweils 100 µl der Suspension pipettiert. Dem einen Röhrchen wurden 100 µl MACS-Puffer beigelegt und es anschließend bei 4 °C gelagert, damit es als Kontrolle verwendet werden konnte. Das andere Röhrchen wurde mit 5 µl Lineage-Cocktail befüllt. Das Gemisch wurde für 10 min bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 350 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl MACS-Puffer gelöst. Dazu wurden 5 µl Anti-Biotin, 5 µl CD117-AK APC und 5 µl CD90.2-Cocktail geben. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4 °C wurden 2 ml MACS-Puffer hinzugegeben und das Gemisch bei 350 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Ergebnisse der Qualitätskontrollen sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Transplantatlösungen

Versuchsreihe	Anteil der CD90.2 ⁺ Zellen in [%]			Anteil der CD117 ⁺ Zellen in [%]
	Milz	Lymphknoten	Knochenmark	
1	86,9	97,6	0,3	0,8
2	85,7	83,8	0,6	0,4
3	88,4	96,2	0,6	0,6

2.4.3 Venöse Injektion in die laterale Schwanzvene

Zur Vorbereitung wurden die Mäuse mit Hilfe einer Infrarotlampe vorsichtig erwärmt. Die zu injizierende Maus wurde in einer Injektionsröhre fixiert. Die Injektionsröhre wurde seitlich gekippt, sodass eine der lateralen Schwanzvene nach oben zeigte. Der Schwanz wurde mit zwei Fingern einer Hand gerade gezogen und mit der anderen Hand wurde die Injektionslösung verabreicht. Für die Injektion wurde eine Insulinspritze verwendet. Mit dieser wurde die Lösung aus einem 2-ml-Schraubgefäß aufgenommen und anschließend von Luftblasen befreit. Direkt nach der Injektion wurde die Injektionsröhre für die Maus geöffnet und die Einstichstelle für einige Sekunden abgedrückt, um das Infektionsrisiko zu minimieren.

2.4.4 ECP

Für die Gewinnung der Lymphozyten, die für die ECP-Therapie nötig waren, wurden die Zellen aus der Milz von einer C3H-Maus verwendet. Für die Behandlung von zwölf Therapietieren (BALB/c) wurde eine Spendermilz benötigt. Vorbereitend wurde ein Eisbehälter mit Eis befüllt. In eine Petrischale mit 5 cm Durchmesser wurden 10 ml steriler

MACS-Puffer pipettiert und auf Eis gestellt. Nach Tötung des Spendertiers wurde die Milz entnommen und in die Petrischale gelegt. Die Petrischale wurde unter die sterile Werkbank gestellt. Dort wurden mit Hilfe einer 1-ml-Spritze die Splenozyten aus der Milz gespült. Hierzu wurde 1 ml Puffer mit der Spritze aufgezogen, dann die Nadel in das Milzgewebe gestochen und die Spritze entleert. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die Milz fixiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis sich die Milz weiß färbte. Auf ein 50-ml-Reaktionsgefäß wurde ein 40- μ m-Zellsieb gelegt und mit 2 ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde anschließend durch das Sieb pipettiert. Unter regelmäßigem Spülen mit MACS-Puffer wurde der Rest der Milz mit dem Stempel einer 5-ml-Spritze durch das Sieb gerieben. Danach wurde das Sieb erneut gespült. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 ml *Red-Blood-Cell-Lysis*-Puffer gelöst und für 1 min mit dem Rollermischer durchmischt. Im Anschluss wurde die Lösung mit 20 ml MACS-Puffer gewaschen und erneut bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml Puffer gelöst. Jeweils 5 ml wurden in eine Zellkulturflasche mit 25 cm² Fläche überführt. In die erste Zellkulturflasche wurden 50 μ l 8-MOP hinzugefügt. Diese Zellkulturflasche wurde mit einer UVA-Dosis von 2,2 J/cm² bestrahlt. Die zweite Zellkulturflasche wurde mit einer UVC-Dosis von 6,7 J/cm² bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde die Zellsuspension, die 8-MOP enthielt, mit 10 ml MACS-Puffer verdünnt. Beide Zellsuspensionen wurden durch ein Zellsieb in jeweils ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellzahl ermittelt. Es wurde von beiden Suspensionen das Volumen bestimmt, das $1,8 \times 10^7$ Zellen enthielt. Dieses Volumen wurde jeweils in ein neues 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. Um Gewichtsunterschiede zwischen den beiden Reaktionsgefäßen auszugleichen, wurde im leichteren Röhrchen das Volumen mit MACS-Puffer aufgefüllt. Es folgt eine Zentrifugation bei 300 g für 10 min. Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets in 1800 μ l MACS-Puffer gelöst. Jedem Empfängertier wurden 150 μ l Injektionslösung in die laterale Schwanzvene injiziert. Die Tiere erhielten entweder $1,5 \times 10^6$ mit 8-MOP und UVA behandelte Zellen oder $1,5 \times 10^6$ Zellen, die mit UVC behandelt wurden. Tiere aus der Kontrollgruppe erhielten nur MACS-Puffer. Die ECP-Therapie wurde fünf Mal durchgeführt, beginnend drei Tage nach der Transplantation. Die nächste ECP folgte am sechsten Tag nach Transplantation und anschließend wöchentlich.

2.4.5 Analyse des Gesundheitszustandes der Versuchstiere

Vor der Bestrahlung wurde das Ausgangsgewicht der Empfängertiere ermittelt. Ab einem Tag nach der Transplantation wurde das Gewicht der Mäuse täglich gemessen. Um den Gewichtsverlust besser beobachten zu können, wurde das Gewicht der Tiere, gemessen am Ausgangsgewicht in Prozent umgerechnet.

Der Verlauf der Krankheit wurde anhand von vier Kriterien analysiert: Körperhaltung, Aktivität, Fellbeschaffenheit sowie Hautintegrität und Diarrhoe (siehe Tabelle 13). Die Körperhaltung wurde vor allem an der Krümmung des Rückens bzw. des Buckelns bewertet.

Die Aktivität wurde anhand der Bewegung der Maus im Käfig bewertet. Die Fellbeschaffenheit und Hautintegrität wurde durch Inspektion des Fells und der Haut beurteilt, mit einem besonderen Augenmerk auf Fellverlust. Die Diarrhoe wurde durch Inspektion des Afters der Maus bewertet. Für jedes Kriterium konnten zwischen null und zwei Punkte vergeben werden, wobei null Punkte keine Symptome und zwei Punkte starke Symptome bedeuteten.

Tabelle 13: Beurteilung des klinischen Scores der akuten GvHD im Mausmodell

Kategorie Punkte*	Körperhaltung	Aktivität	Fellbeschaffen- heit und Hautintegrität	Diarrhoe
0	normal	normal	normal	keine
1	leichtes Buckeln, nur während des Sitzens	leicht reduziert	leicht struppiges Fell oder schuppige Haut	leichte Diarrhoe oder Entzündungs- zeichen am After
1,5	deutliches Buckeln	deutlich reduziert	stark struppiges Fell	mäßige Diarrhoe
2	starkes Buckeln, auch bei Bewegung	Bewegungslosig- keit, außer nach Stimulation	regionaler Fellverlust	starke oder blutige Diarrhoe

*Die Punkte aus den einzelnen Kategorien werden addiert.

Versuchstiere mit einem Score ≥ 6 scheiden aus dem Versuch aus.

Insgesamt konnten maximal acht Punkte vergeben werden. Erreichte ein Versuchstier sechs oder mehr Punkte, verlor innerhalb von 48 h mehr als 20 % an Gewicht oder wog weniger als 16 g, wurde das Tier aus dem Versuch genommen.

2.4.6 Bestimmung der Leukozytenpopulationen

Schied ein Versuchstier aus dem Versuch aus, wurde das Tier getötet und anschließend die Milz entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellzahl wurde ermittelt. Betrug die Zellzahl 6×10^6 oder mehr, wurden Färbungen für Treg, NK-Zellen und natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) sowie TH-Zellen und zytotoxische T-Zellen durchgeführt. Waren weniger als 6×10^6 Zellen vorhanden, wurde die Färbung für Treg nicht durchgeführt. Nach der Zählung wurde die Zellsuspension bei 350 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 100 μ l MACS-Puffer pro $1-2 \times 10^6$ Zellen resuspendiert. Für die Bestimmung der verschiedenen Zellpopulationen mit Hilfe der

Durchflusszytometrie wurde insgesamt eine Kontrolle angelegt. Dazu wurden 100-200 μl der Zellsuspension in ein 5-ml-FACS-Röhrchen überführt und mit der gleichen Menge MACS-Puffer verdünnt. Bis zur Messung wurde die Kontrolle bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Bestimmung des Anteils der Treg wurden fluoreszenzmarkierte AK verwendet. Dabei wurden zwei Oberflächenmarker und ein intranukleär vorkommendes Protein angefärbt. CD4 ist ein Glykoprotein, das vor allem auf der Oberfläche von TH-Zellen vorkommt, aber auch auf anderen Zellen des Immunsystems. Es wurde mit dem Farbstoff FITC markiert. Mit dem Farbstoff PE wurde CD25 markiert, welches auf aktivierten T-Zellen sowie auf Treg vorkommt (Abbildung 3). Das im Zellkern vorkommende Protein FoxP3 ist spezifisch für Treg und wurde mit dem Farbstoff APC gekennzeichnet. Um das intrazellulär liegende Protein zu markieren, musste die Zellmembran mit Hilfe des Permabilisationspuffers durchlässig gemacht werden.

Für die Färbung von Treg wurden 200-300 μl der Zellsuspension mit $1-2 \times 10^6$ Zellen in ein 5-ml-FACS-Röhrchen überführt. Es wurden jeweils 1 μl CD25-AK PE und CD3-AK FITC in das Röhrchen pipettiert und für 10 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und bei 350 g für 5 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Fixation + Permeabilisationspuffer gelöst. Nach mindestens 20 min Inkubation bei RT in Dunkelheit wurde die Probe mit 2 ml Permeabilisationspuffer gewaschen und bei 350 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 μl Permeabilisationspuffer resuspendiert. Im Anschluss wurden 2,5 μl FoxP3-AK APC hinzugefügt und die Probe für mindestens 20 min unter Lichtausschluss inkubiert. Danach folgte eine erneute Waschung mit 2 ml Permeabilisationspuffer und eine Zentrifugation bei 350 g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 200 μl MACS-Puffer gelöst. Bis zur Messung wurde die Probe bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

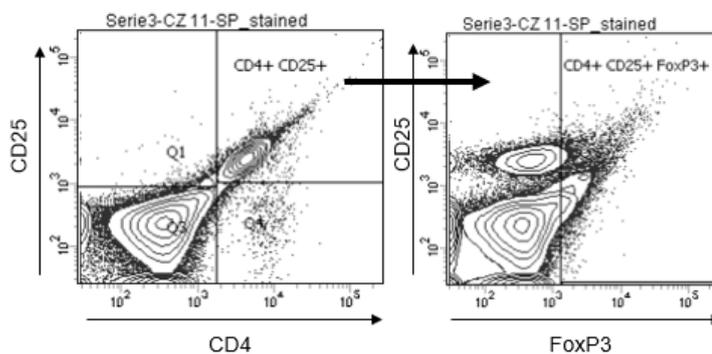


Abbildung 3: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg von allen Splenozyten.

Für die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der NK- und NKT-Zellen und deren Aktivierungsrate wurden drei verschiedene AK eingesetzt. Mit dem CD49b-AK werden NK- und NKT-Zellen markiert. Dazu wurde der Farbstoff APC verwendet. CD3 kommt nur auf den NKT-Zellen vor, sodass sie durch diese Markierung von den NK-Zellen unterschieden werden können. Der CD3-AK war mit dem Farbstoff FITC gekoppelt. CD69 ist ein Aktivierungsmarker, der auf verschiedenen Zellen der Immunsystems exprimiert wird. Dieser wurde mit dem Farbstoff PE markiert (Abbildung 4). Für die Färbung wurden 100 μ l der Zellsuspension in ein 5-ml-FACS-Röhrchen überführt. In das Röhrchen wurden 1,5 μ l CD16/32 TruStain hinzugefügt. CD16/32 TruStain blockiert nicht spezifische Bindungsstellen für AK an Fc-Rezeptoren. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 1,25 μ l CD49b-AK APC und jeweils 1 μ l CD69-AK PE und CD3-AK FITC hinzugegeben. Die Probe wurde für 10 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurde die Probe mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und es folgte eine Zentrifugation bei 350 g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 μ l MACS-Puffer gelöst. Die Probe wurde bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

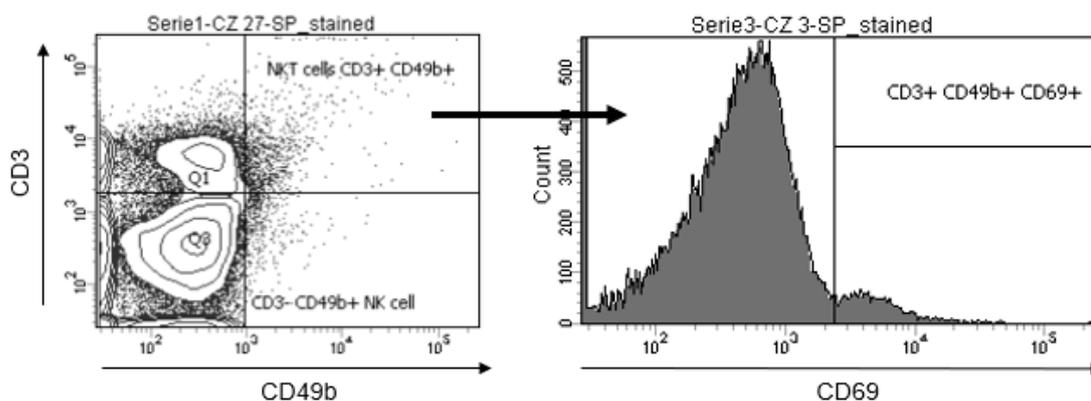


Abbildung 4: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der CD3⁺ CD49b⁺ NKT-Zellen von allen Splenozyten und deren Aktivierungsrate mit dem Marker CD69.

Um den Anteil von TH-Zellen und zytotoxischen T-Zellen sowie deren Aktivierungsrate zu bestimmen, wurde eine durchflusszytometrische Messung mit fluoreszenzmarkierten AK durchgeführt. Zur Markierung der T-Zellen wurde ein Teil des T-Zell-Rezeptors (CD3) mit dem Farbstoff Pacific Blue markiert. Zur Unterscheidung der TH-Zellen von den zytotoxischen T-Zellen wurden die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 verwendet. CD4 wurde mit dem Farbstoff FITC und CD8 mit dem Flouorchrom APC markiert. Wie bei der Aktivierungsrate der NK- und NKT-Zellen wurde CD69 mit dem Farbstoff PE gekennzeichnet (Abbildung 5).

Für die Färbung wurden 100 μ l der Zellsuspension mit $1-2 \times 10^6$ Zellen in ein 5-ml-FACS-Röhrchen überführt. Es wurden 2,5 μ l CD3-AK Pacific Blue und jeweils 1 μ l CD69-AK PE, CD4-AK FITC und CD8-AK APC hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei RT unter Lichtausschluss. Anschließend wurde die Probe mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und es folgte eine Zentrifugation bei 350 g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und

das Pellet in 200 μ l MACS-Puffer gelöst. Bis zur Messung wurde die Probe bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

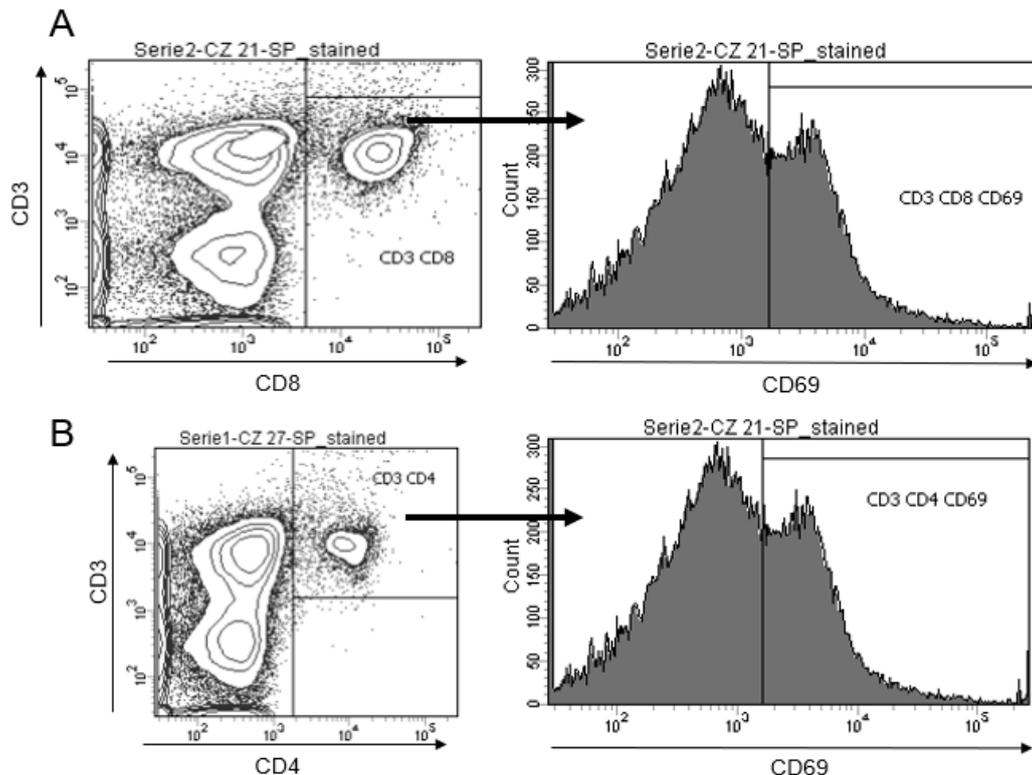


Abbildung 5: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen von allen Splenozyten und deren Aktivierungsrate mit dem Marker CD69. (A) zytotoxische T-Zellen (B) TH-Zellen

2.5 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 6 analysiert. Die Daten zur Veränderung der Zellzahl wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA ausgewertet und die Gruppen an den einzelnen Tagen mit dem Turkey-Test verglichen. Zur Veranschaulichung wurde ein Säulendiagramm erstellt, welches die Mittelwerte \pm Standardabweichung zeigt. Die Daten zur Apoptose von TH-Zellen und der Proliferationsrate von T-Zellen wurden ebenfalls mit einer zweifaktoriellen ANOVA ausgewertet. Als post-hoc-Test wurde bei zwei Vergleichsgruppen der Sidak-Test und bei drei Vergleichsgruppen der Turkey-Test angewendet. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Liniendiagramme verwendet. Diese zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Zur Auswertung der Überlebenszeit im Mausmodell wurde der Logrank-Test verwendet. Die Daten sind in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die Daten zur Gewichtsveränderungen und Score wurden durch Liniendiagramme visualisiert. Diese zeigen die Mittelwerte. Zur Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA genutzt. Um die immunologischen Abläufe auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden aus den Splenozyten der Mäuse verschiedene Zellpopulationen untersucht. Für deren Auswertung wurde der Kruskal-Wallis-Test

verwendet. Um innerhalb der jeweiligen Zellpopulation die Behandlungsgruppen einzeln miteinander zu vergleichen, wurde der Dunn-Test verwendet. Graphisch wurden die Ergebnisse in Box-Whisker-Plots dargestellt. Diese bilden den Median, das 25 %- und 75 %-Quantil sowie das Maximum und Minimum ab. Die Stichprobe n variiert stark. Dies hat mehrere Gründe. In Abhängigkeit der gewonnenen Zellzahl aus der Milz wurde die Färbung für Treg nur bei Zellzahl $\geq 6 \times 10^6$ Zellen durchgeführt. Bei Tieren, die an einem natürlichen Tod innerhalb des Experiments verstorben sind, konnten keine Färbungen durchgeführt werden. Zudem konnten einige Ergebnisse aufgrund von Fehlern bei der Messung oder der Färbung nicht verwertet werden. Als Signifikanzniveau für alle Tests wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur humaner MNZ

In Zellkulturen, angelegt aus MNZ, die aus Buffy-Coats gewonnen wurden, wurde die Apoptoserate der TH-Zellen ($CD3^+ CD4^+$) und die Proliferationsrate der T-Zellen ($CD3^+$) über die Zeit bestimmt (Abbildung 6). Dazu wurde für jede Messung eine Zellkultur angelegt. Die erste Messung (Tag null) fand vor Behandlung der Zellen statt. Die folgenden Messungen fanden nach einer Inkubationszeit von 24 h (Tag eins), 48 h (Tag zwei) und 72 h (Tag drei) statt. Dabei wurden unbehandelte Zellkulturen (Kontrollgruppe), mit 8-MOP und UVA behandelte Zellkulturen (8-MOP/UVA-Gruppe) und mit UVC behandelte Zellkulturen (UVC-Gruppe) verglichen. Die Zellen der 8-MOP/UVA-Gruppe wurden vor der Aussaat mit $0,2 \mu\text{g/ml}$ 8-MOP und einer UVA-Dosis von $2,2 \text{ J/cm}^2$ (effektive Dosis 2 J/cm^2) behandelt. Die Zellen der UVC-Gruppe wurden vor der Aussaat mit $6,7 \text{ J/cm}^2$ (effektive Dosis 2 J/cm^2) bestrahlt. Für die Messung der Proliferationsrate wurde den Zellkulturen nach der Aussaat $2,5 \mu\text{g/ml}$ Anti-CD28 hinzugefügt. Außerdem wurden 1-2 h vor der Messung $5 \mu\text{g/ml}$ Anti-CD3 dazugegeben. Anti-CD28 und Anti-CD3 dienen der Stimulation der Proliferation. Die Apoptoserate wurde in Zellkulturen ohne die Zugabe von Anti-CD28 und Anti-CD3 gemessen. Die Zellkulturen, die als unbehandelte Kontrolle dienten, wurden direkt nach dem Aussäen inkubiert, während die anderen Zellkulturen bestrahlt wurden.

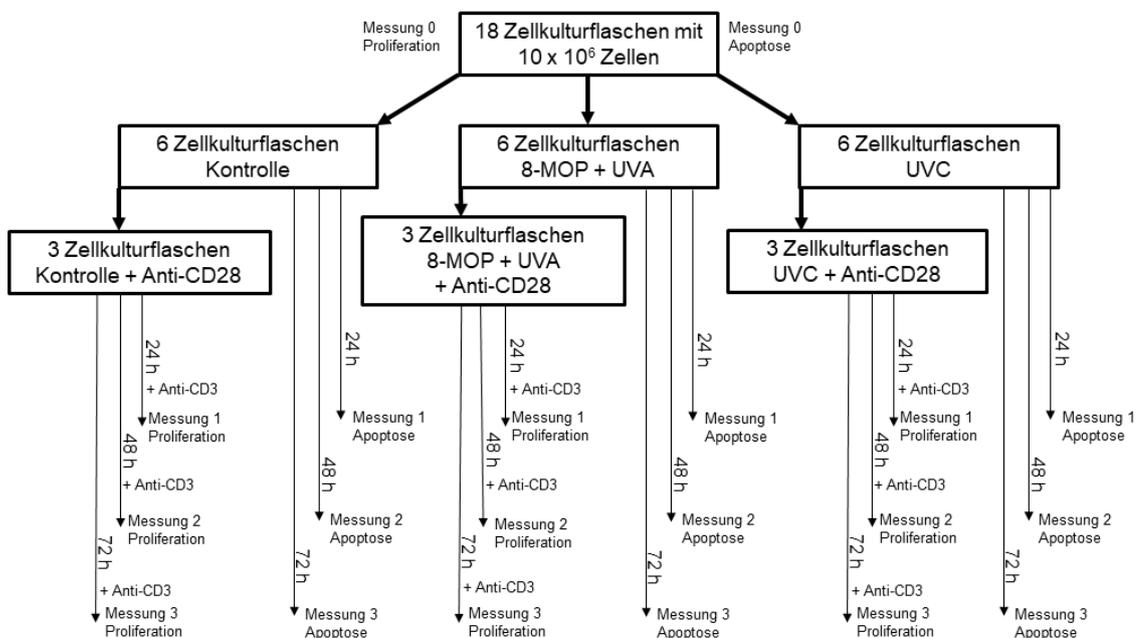


Abbildung 6: Versuchsplan zur Messung der Apoptose- und Proliferationsrate an vier Zeitpunkten.

3.1.1 Entwicklung der Zellzahl

Vor der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptose- und Proliferationsrate in den verschiedenen Zellkulturen wurde die Zellzahl ermittelt und der Zellverlust über die Zeit untersucht. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde die Zellzahl an den Tagen eins, zwei und drei, gemessen an der angenommenen Ausgangszellzahl in Prozent umgerechnet (Abbildung 7). Betrachtet wurden pro Tag jeweils die Kontrolle, die 8-MOP/UVA-Gruppe, die UVC-Gruppe und die Zellkulturen, die parallel mit Anti-CD28 und Anti-CD3 inkubiert wurden. Zuerst wurden die sechs Gruppen an Tag eins bis drei miteinander verglichen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied über die Zeit festgestellt werden (ANOVA, $p < 0,001$). Vergleich man die Gruppen pro Tag miteinander, ergaben sich keine Unterschiede. Aus diesem Grund wurden die Gruppen tageweise zusammengefasst, um den durchschnittlichen Zellverlust zu ermitteln. Vom Messzeitpunkt null zu Tag drei kam es zu einer durchschnittlichen Abnahme der Zellzahl von 50,27 % (t-Test, $p \leq 0,001$), dabei trat die stärkste Abnahme der Zellzahl vom Zeitpunkt null zu Tag eins auf. Betrachtet man nur den Zeitraum von Tag eins zu Tag drei nimmt der Mittelwert um 14,6 % ab (t-Test, $p \leq 0,001$).

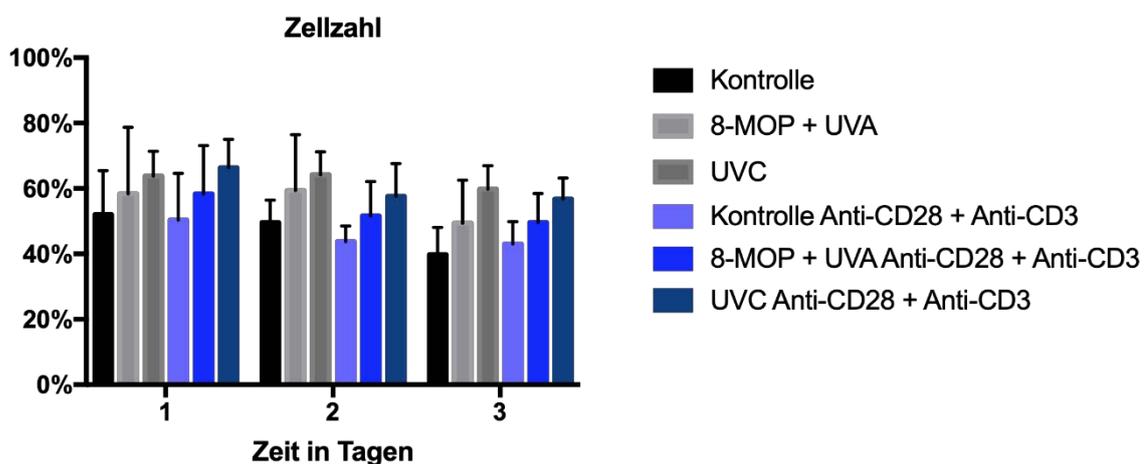


Abbildung 7: Anzahl der Leukozyten in den Zellkulturen zur Bestimmung der Apoptose- und Proliferationsrate in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. MNZ wurden aus einem Buffy-Coat gewonnen, behandelt und ausgesät ($n = 5$). Die Kontrolle wurde nicht behandelt und sofort nach der Aussaat inkubiert. Vor der Aussaat wurden die Zellen der 8-MOP/UVA-Gruppe mit $0,2 \mu\text{g/ml}$ 8-MOP und einer effektiven UVA-Dosis von 2 J/cm^2 behandelt. Die Zellen der UVC-Gruppe wurden ebenfalls mit einer effektiven Dosis von 2 J/cm^2 bestrahlt. Für die Messung der Proliferationsrate wurde parallel angelegten Zellkulturen nach der Aussaat $2,5 \mu\text{g/ml}$ Anti-CD28 hinzugefügt. Außerdem wurden 1-2 h vor der Messung $5 \mu\text{g/ml}$ Anti-CD3 dazugegeben. Die Zellzahl wurde täglich vor der durchflusszytometrischen Messung mit einer Neubauerzählkammer ermittelt und auf die Zellzahl vom Startzeitpunkt bezogen (Angabe in Prozent bezogen auf die Ausgangszellzahl).

3.1.2 Apoptoserate von TH-Zellen

Die Apoptoserate der $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ TH-Zellen wurde mit dem Marker Annexin V bestimmt. In einem Vorversuch wurde die Apoptose- und Proliferationsrate parallel aus einer Zellkultur bestimmt. Aus diesem Grund enthielten die Zellkulturen bei dieser Apoptosemessung

Anti-CD28 und Anti-CD3. Es wurde nur die Wirkung von UVC untersucht. Des Weiteren fand die erste Messung (Tag null) der Kontrolle erst nach Ablauf der Bestrahlungszeit statt. Während dieser Zeit wurde die Kontrolle bei RT stehen gelassen.

Die Apoptoserate stieg in beiden Zellkulturen über die Zeit an (ANOVA, $p \leq 0,001$). Dabei war die Apoptoserate an Tag eins bis drei in der Behandlungsgruppe höher (ANOVA, $p \leq 0,001$). Der größte Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen war an Tag drei zu beobachten. Der Mittelwert war in der UVC-Gruppe 70 % höher als in der Kontrolle (Post-hoc-Test, $p \leq 0,001$) (Abbildung 8).

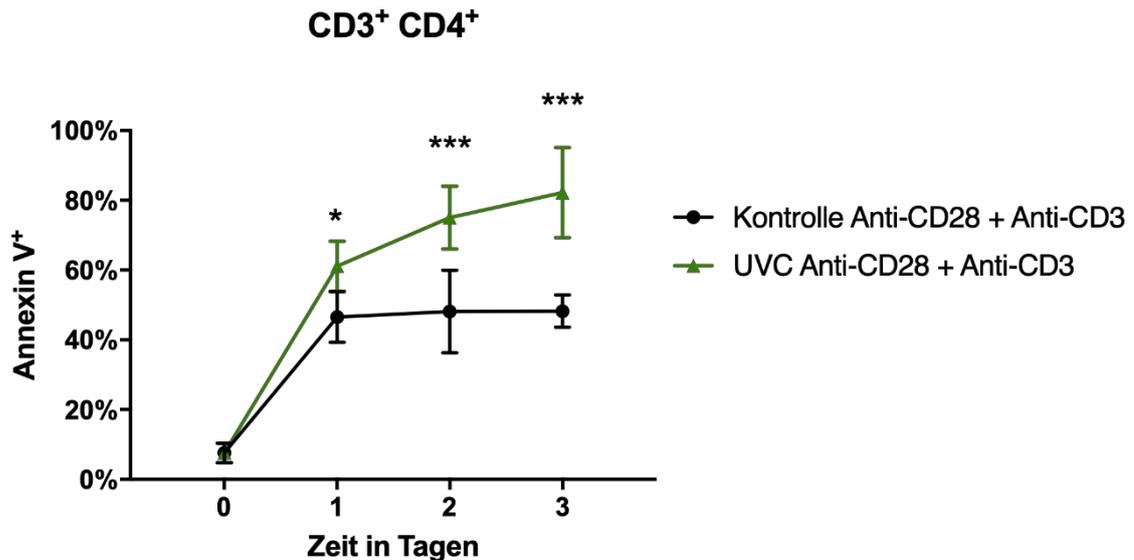


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate von CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen nach Behandlung mit UVC. MNZ wurden aus einem Buffy-Coat gewonnen und Zellkulturen angelegt ($n = 5$). Die Zellen der UVC-Gruppe wurden vor der Aussaat mit einer effektiven Dosis von 2 J/cm² bestrahlt. Während der Bestrahlungszeit wurde die Kontrolle bei RT stehen gelassen. Die Kontrolle und die UVC-Gruppe enthielten 2,5 µg/ml Anti-CD28 und 5 µg/ml Anti-CD3 zur Stimulation der Proliferation. Bei der Analyse wurde der Anteil der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen bestimmt und deren Annexin V⁺ Anteil, was der Apoptoserate entspricht. * ($p \leq 0,05$), *** ($p \leq 0,001$)

Im Versuch unter 3.1 beschrieben stieg die Apoptoserate in allen drei Gruppen über die Zeit an (ANOVA, $p \leq 0,001$). Die Apoptoserate war in der UVC-Gruppe (Post-hoc-Test, $p \leq 0,001$) und der 8-MOP/UVA-Gruppe (Post-hoc-Test, $p \leq 0,001$) an allen drei Tagen signifikant höher als in der Kontrollgruppe, wobei die Apoptoserate in der UVC-Gruppe stets am höchsten war. An Tag drei war der Unterschied der 8-MOP/UVA-Gruppe und der UVC-Gruppe zur Kontrolle am größten (Post-hoc-Test, $p \leq 0,001$), zwischen den beiden Behandlungsgruppen bestand kein Unterschied mehr (Post-hoc-Test, $p = 0,31$) (Abbildung 9).

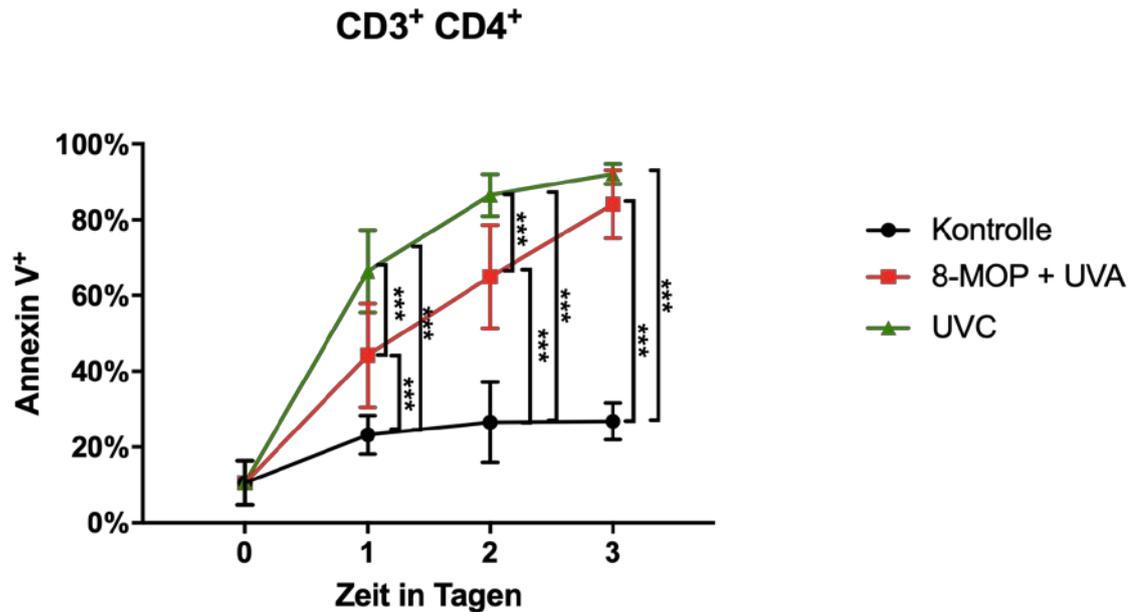


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate von CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen nach Behandlung mit 8-MOP/UVA oder UVC. MNZ wurden aus einem Buffy-Coat gewonnen und aus diesem Zellkulturen angelegt (n = 5). Die Zellen der Kontrolle wurden ausgesät und direkt inkubiert. Vor der Aussaat wurden die Zellen der 8-MOP/UVA-Gruppe mit 0,2 µg/ml 8-MOP und einer effektiven UVA-Dosis von 2 J/cm² behandelt. Die Zellen der UVC-Gruppe wurden ebenfalls mit einer effektiven Dosis von 2 J/cm² bestrahlt. Bei der Analyse der MNZ wurde der Anteil der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen bestimmt und deren Annexin V⁺ Anteil, was der Apoptoserate entspricht. *** (p ≤ 0,001)

Um die Kinetik der Apoptoserate besser untersuchen zu können, wurde der Anstieg der Apoptoserate pro Tag, bezogen auf den Wert der Messung an Tag null, für jede Gruppe ermittelt und miteinander verglichen. Der Anstieg der Apoptoserate in der UVC-Gruppe war stets am größten und unterschied sich stark von der Kontrolle (Post-hoc-Test, p ≤ 0,001). Auch der Anstieg in der 8-MOP/UVA-Gruppe war signifikant höher als in der Kontrolle (Post-hoc-Test, p₁ ≤ 0,01, p_{2/3} ≤ 0,001). Zu Beginn war der Anstieg der Apoptoserate der mit 8-MOP/UVA behandelten Zellen kleiner als der mit UVC behandelten Zellen (Post-hoc-Test, p ≤ 0,01). Bis Tag drei näherte sich der Anstieg der 8-MOP/UVA-Gruppe dem der UVC-Gruppe an (Post-hoc-Test, p = 0,43).

Verglich man die Kontrolle aus dem Vorversuch (Kontrolle eins), welche während der Bestrahlungszeit bei RT gelagert wurde, mit der Kontrolle aus dem Versuch wie unter 3.1 beschrieben (Kontrolle zwei), bei dem die Kontrolle direkt inkubiert wurde, ließen sich signifikante Unterschiede erkennen (ANOVA, p ≤ 0,01). Ab Tag eins war die Apoptoserate in der Kontrolle eins höher als in Kontrolle zwei (Post-hoc-Test, p ≤ 0,001). Der größte Unterschied bestand an Tag zwei. Dort war die Apoptoserate in Kontrolle eins im Mittel 82 % höher als in Kontrolle zwei.

3.1.3 Proliferationsrate von T-Zellen

Die Proliferationsrate der CD3⁺ T-Zellen wurde mit dem Marker CD71 bestimmt. Die Kontrollgruppe und die Behandlungsgruppen enthielten Anti-CD28 und Anti-CD3 zur Stimulation der Proliferation.

Über den Beobachtungszeitraum von drei Tagen stieg die Proliferationsrate insgesamt in allen drei Gruppen an (ANOVA, $p \leq 0,001$). Die Kontrollgruppe wies im Vergleich zur 8-MOP/UVA-Gruppe (Post-hoc-Test, $p \leq 0,01$) und zur UVC-Gruppe (Post-hoc-Test, $p \leq 0,001$) die stärkste Proliferationsrate auf. Zwischen den beiden Behandlungsgruppen gab es keinen signifikanten Unterschied ($p_1 = 0,4$, $p_2 = 0,12$, $p_3 = 0,31$) (Abbildung 10).

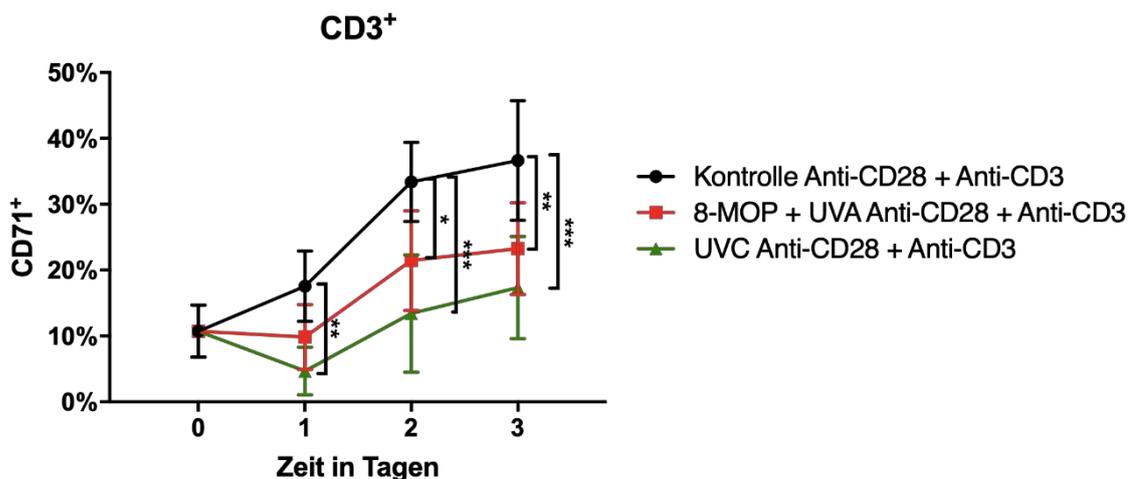


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der Proliferationsrate von CD3⁺ T-Zellen nach Behandlung mit 8-MOP/UVA oder UVC. MNZ wurden aus einem Buffy-Coat gewonnen und daraus Zellkulturen angelegt ($n = 5$). Die Zellen der Kontrolle wurden ausgesät und direkt inkubiert. Vor der Aussaat wurden die Zellen der 8-MOP/UVA-Gruppe mit 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 8-MOP und einer effektiven UVA-Dosis von 2 J/cm^2 behandelt. Die Zellen der UVC-Gruppe wurden ebenfalls mit einer effektiven Dosis von 2 J/cm^2 bestrahlt. Direkt nach der Aussaat wurde den Zellkulturen 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Anti-CD28 hinzugefügt. Zusätzlich wurden 1-2 h vor der Messung 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Anti-CD3 hinzugefügt. Bei der Analyse wurde der Anteil der CD3⁺ T-Zellen bestimmt und deren CD71⁺ Anteil, was der Proliferationsrate entspricht
* ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$)

Um den Unterschied in der Proliferationsrate, zum Beispiel für einen diagnostischen Test zu nutzen, wurden die Unterschiede am Tag drei weiter untersucht. Tag drei wurde gewählt, da hier der größte Unterschied zwischen Kontrolle und 8-MOP/UVA-Gruppe zu beobachten war (t-Test, $p \leq 0,05$). Die Proliferationsrate der Behandlungsgruppen wurde auf die Proliferationsrate der Kontrolle bezogen (Angabe in Prozent der Proliferationsrate in der dazugehörigen Kontrollflasche). Die Proliferationsrate der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt. Die Mittelwertdifferenz betrug $34,2 \pm 9,76$ (t-Test, $p \leq 0,01$) zwischen der Kontroll- und der 8-MOP/UVA-Gruppe. Zwischen der Kontrolle und der UVC-Gruppe war die Mittelwertdifferenz größer, sie betrug $53,2 \pm 7,91$ (t-Test, $p \leq 0,001$).

3.2 Zellkulturen muriner Splenozyten

Die Apoptoserate der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen stieg in der Kontrolle und in der Behandlungsgruppe über die Zeit an (ANOVA, $p \leq 0,001$). Dabei war die Apoptoserate in der Behandlungsgruppe höher als in der Kontrolle. Der Unterschied war nur an Tag eins signifikant (Post-hoc-Test, $p \leq 0,01$). Der Anstieg der Apoptoserate war in der Behandlungsgruppe vom Ausgangszeitpunkt zu Tag eins am größten. Die Apoptoserate stieg auf mehr als das Doppelte an. Der Anstieg in der Kontrolle war dagegen von Tag eins zu Tag zwei am größten. Die Apoptoserate stieg um 56,62 % (Abbildung 11 A).

Die Proliferationsrate der CD3⁺ T-Zellen in der Kontrolle und der Behandlungsgruppe stieg über die Zeit an (ANOVA, $p \leq 0,001$). Insgesamt betrachtet, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe. Tendenziell war der Anstieg der Proliferationsrate in der Kontrolle etwas höher. Betrachtet man die Tage einzeln, war der größte Unterschied der Proliferationsrate zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe am Tag zwei zu beobachten und betrug 21 Prozentpunkte (Post-hoc-Test, $p \leq 0,05$) (Abbildung 11 B).

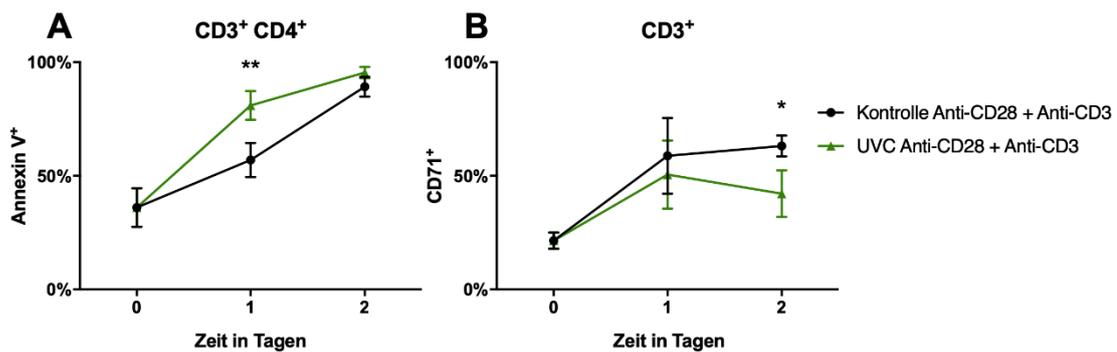


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate von murinen CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen und der Proliferationsrate von murinen CD3⁺ T-Zellen nach Behandlung mit UVC.

Splenozyten wurden aus der Milz einer männlichen C3H-Maus gewonnen und aus diesen Zellkulturen angelegt ($n = 5$). Die Zellen der UVC-Gruppe wurden mit einer effektiven Dosis von 2 J/cm² bestrahlt. Die Kontrolle wurde während der Bestrahlungszeit bei RT aufbewahrt. Direkt nach der Aussaat wurde den Zellkulturen 2,5 µg/ml Anti-CD28 hinzugefügt. Zusätzlich wurden 1-2 h vor der Messung 5 µg/ml Anti-CD3 hinzugefügt. Anti-CD28 und Anti-CD3 dienen der Stimulation der Proliferation. (A) Apoptoserate (Annexin V⁺) der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen. (B) Proliferationsrate (CD71⁺) der CD3⁺ T-Zellen.

* ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$)

3.3 Einfluss der ECP auf die akute GvHD im Mausmodell

Für den Versuch wurde ein Mausmodell zur akuten GvHD gewählt, welches dem *mismatch* von MHC-Klasse I und II sowie miHAs zugrunde liegt. Männliche BALB/cAnNCrl-Mäuse wurden mit einer Dosis von 9,5-10 Gy bestrahlt und erhielten Transplantate von gleichaltrigen männlichen C57BL/6JRj-Mäusen. Zur ECP-Therapie wurden Splenozyten männlicher C3H/HeNRj Mäuse verwendet. Eine Gruppe wurde mit $1,5 \times 10^6$ 8-MOP/UVA-

behandelten Splenozyten in 150 μ l PBS therapiert, eine Gruppe mit $1,5 \times 10^6$ UVC-behandelten Splenozyten in 150 μ l PBS. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge PBS analog zur ECP. Die Therapie der Mäuse fand wöchentlich über einen Zeitraum von fünf Wochen statt, beginnend am dritten Tag nach HSZT. Über einen Zeitraum von 42 Tagen nach der HSZT wurden das Gewicht, der Krankheitsschweregrad anhand eines klinischen Scores und die Mortalität bestimmt.

3.3.1 Überleben, Gewicht und klinischer Score

In Abbildung 12 A ist das Überleben der Tiere in Gruppen als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Zwischen den Gruppen ließ sich über den Zeitraum von 42 Tagen kein Unterschied der Überlebensrate feststellen (Logrank-Test, $p = 0,28$). Die mediane Überlebenszeit war in der UVC-Gruppe am größten und betrug 28,5 Tage. In der Kontrollgruppe lag die mediane Überlebenszeit bei 27 Tagen und in der 8-MOP/UVA-Gruppe bei 23 Tagen.

Die Entwicklung des klinischen Scores (Abbildung 12 B) wies über die Zeit keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf (ANOVA, $p = 0,59$). Die Therapien führten über den gesamten Zeitraum betrachtet nicht zu einer signifikanten Reduktion des Gewichtsverlusts (Abbildung 12 C, ANOVA, $p = 0,09$). Ab Tag 35 ist zwischen der Behandlungsgruppe mit UVC und der Kontrollgruppe ein leichter Unterschied zu beobachten (Post-hoc-Test, $p \leq 0,05$), wobei die Tiere in der Kontrollgruppe ein höheres Gewicht aufweisen.

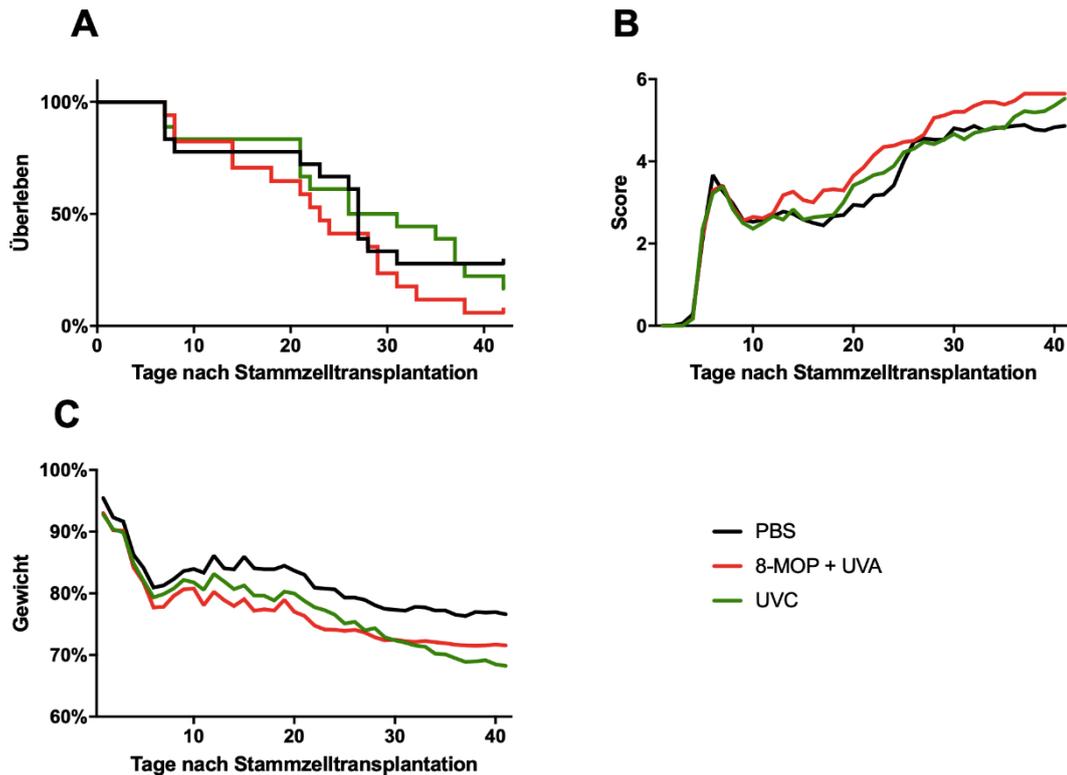


Abbildung 12: ECP-Therapie mit 8-MOP/UVA- oder UVC-behandelten Splenozyten einer C3H-Maus bei akuter GvHD. BALB/c-Mäuse wurden bestrahlt und erhielten ein Transplantat von C57BL/6-Mäusen, bestehend aus Knochenmark- und T-Zellen. Die Empfängertiere erhielten fünf ECP-Therapien im Abstand von einer Woche, beginnend drei Tage nach Transplantation. Für die ECP wurden Splenozyten männlicher C3H-Mäuse verwendet. Einer Gruppe wurden $1,5 \times 10^6$ 8-MOP/UVA-behandelte Splenozyten in 150 μ l PBS injiziert (rote Linie, $n = 17$), einer anderen Gruppe wurden $1,5 \times 10^6$ UVC-behandelte Splenozyten in 150 μ l PBS injiziert (grüne Linie, $n = 18$). Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge PBS analog zur ECP (schwarze Linie, $n = 18$).

3.3.2 Immunologie

Nach dem Ausscheiden der Tiere aus dem Versuch ($\text{Score} \geq 6$) oder nach Beendigung der Beobachtungszeit wurden verschiedene Zellpopulationen innerhalb der in der Milz enthaltenen Zellen mittels Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Dies ermöglicht einen besseren Einblick in die zellulären Mechanismen der akuten GvHD. Es wurden der Anteil der $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{FoxP3}^+$ Treg, der $\text{CD3}^- \text{CD49b}^+$ NK-Zellen, der $\text{CD3}^+ \text{CD49b}^+$ NKT-Zellen, der $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ TH-Zellen und der $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$ zytotoxischen T-Zellen bestimmt. Zusätzlich wurde bei den $\text{CD3}^- \text{CD49b}^+$ NK-Zellen, den $\text{CD3}^+ \text{CD49b}^+$ NKT-Zellen, den $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ TH-Zellen und den $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$ zytotoxischen T-Zellen deren Anteil an CD69^+ Zellen bestimmt (Abbildung 13).

Es gab keinen Unterschied im Anteil der $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{FoxP3}^+$ Treg (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,63$), der $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ TH-Zellen (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,14$) und der $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$ T-Zellen (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,32$) zwischen den Gruppen. Der Anteil der $\text{CD3}^- \text{CD49b}^+$ NK-Zellen war in den mit UVC behandelten Tieren höher, als in den mit 8-

MOP/UVA behandelten Tieren (Post-hoc-Test, $p \leq 0,05$). Zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen gab es keine Unterschiede (Post-hoc-Test, 8-MOP/UVA $p > 0,99$, UVC $p = 0,08$). Der Anteil der CD3⁺ CD49b⁺ NKT-Zellen war bei den Tieren mit UVC-Behandlung größer als in der mit 8-MOP/UVA behandelten Gruppe (Post-hoc-Test, $p \leq 0,01$) und der Kontrollgruppe (Post-hoc-Test, $p \leq 0,05$). Zwischen der Kontrollgruppe und der 8-MOP/UVA-Gruppe bestand kein Unterschied (Post-hoc-Test, $p > 0,99$).

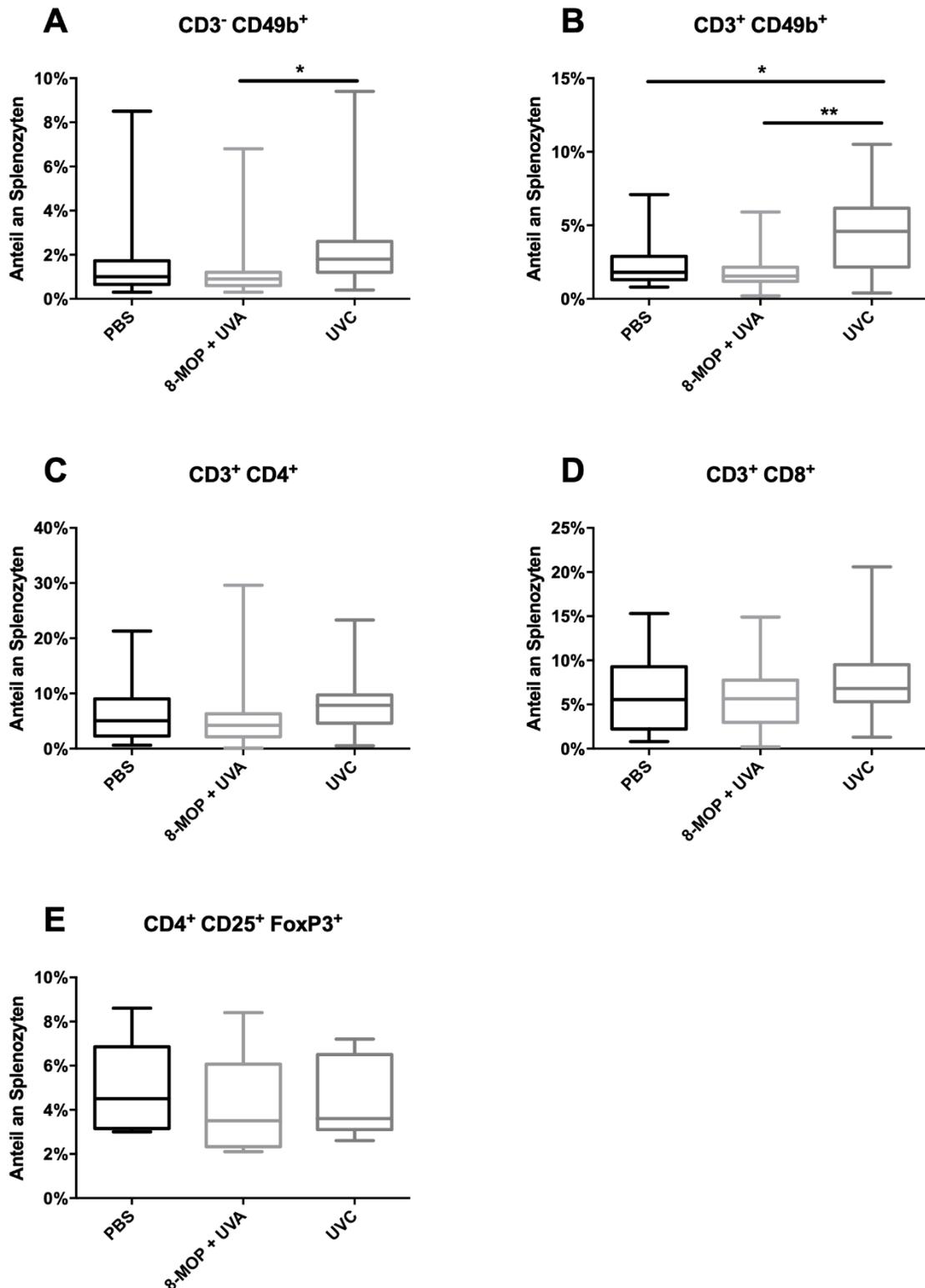


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen bei akuter GvHD nach ECP mit 8-MOP/UVA- oder UVC-behandelten Splenozyten von C3H-Mäusen. Die ECP wurde insgesamt fünfmal durchgeführt, beginnend drei Tage nach Stammzelltransplantation und anschließend im wöchentlichen Abstand. Die Kontrollgruppe erhielt 150 μ l PBS analog zur ECP (n = 9-16). Eine Behandlungsgruppe erhielt $1,5 \times 10^6$ 8-MOP/UVA-behandelte Splenozyten in 150 μ l PBS (n = 8-15), die anderen Behandlungsgruppe erhielt $1,5 \times 10^6$ UVC-behandelte Splenozyten in 150 μ l PBS (n = 5-19). Der Anteil der CD3⁻ CD49b⁺ NK-Zellen (A), der CD3⁺ CD49b⁺ NKT-Zellen (B), der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen

(C), der CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (D) und der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg (E) von allen Splenozyten wurde bestimmt. Die Tiere wurden getötet, wenn sie einen Score ≥ 6 erreichten, ihr Gewicht um mehr als 20 % innerhalb von zwei Tagen sank oder 42 Tage nach Stammzelltransplantation.

* ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$)

Betrachtet man den Anteil der CD69⁺ Zellen der verschiedenen Zellpopulationen, konnten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 14).

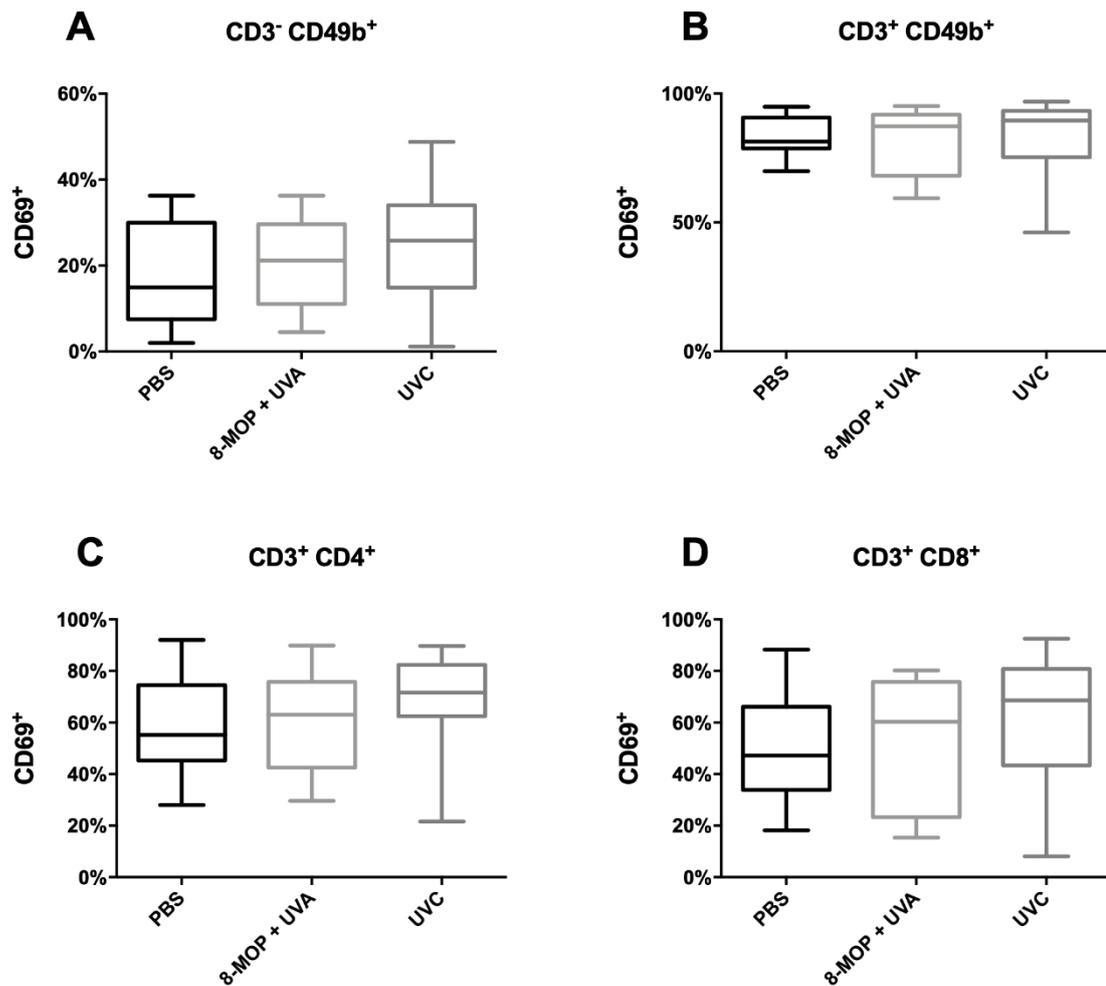


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der Aktivierungsrate der Immunzellen bei akuter GvHD nach ECP mit 8-MOP/UVA- oder UVC-behandelten Splenozyten von C3H-Mäusen. Die ECP fand im wöchentlichen Abstand fünfmal statt, beginnend drei Tage nach Stammzelltransplantation. Eine Behandlungsgruppe erhielt $1,5 \times 10^6$ 8-MOP/UVA-behandelte Splenozyten in 150 μ l PBS ($n = 11-13$), die andere Behandlungsgruppe erhielt $1,5 \times 10^6$ UVC-behandelte Splenozyten in 150 μ l PBS ($n = 16-18$). Die Kontrollgruppe erhielt 150 μ l PBS analog zur ECP ($n = 15-16$). Die Aktivierungsrate wurde mit dem Marker CD69 ermittelt. Der Anteil der CD69⁺ Zellen wurde bei den CD3⁻ CD49b⁺ NK-Zellen (A), den CD3⁺ CD49b⁺ NKT-Zellen (B), den CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen (C) und den CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (D)

bestimmt. Die Tiere wurden getötet, wenn sie einen Score ≥ 6 erreichten, ihr Gewicht um mehr als 20 % innerhalb von zwei Tagen sank oder 42 Tage nach Stammzelltransplantation.

Das CD4/CD8-Verhältnis gibt den Quotienten aus $CD3^+ CD4^+$ TH-Zellen und $CD3^+ CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen an. Dieses war in den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe ähnlich (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,56$). Zusätzlich wurde das CD4/CD8-Verhältnis der aktivierten $CD3^+ CD4^+ CD69^+$ TH-Zellen und $CD3^+ CD8^+ CD69^+$ T-Zellen berechnet. Hier zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,84$) (Abbildung 15).

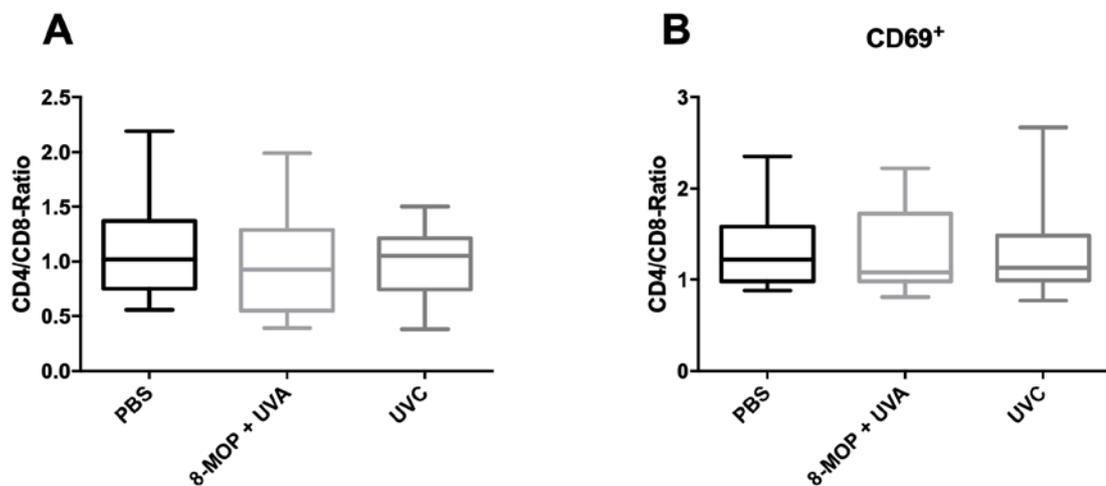


Abbildung 15: Analyse des CD4/CD8-Quotienten bei akuter GvHD nach ECP mit 8-MOP/UVA- oder UVC-behandelten Splenozyten von C3H-Mäusen. Die ECP fand wöchentlich beginnend drei Tage nach Stammzelltransplantation fünfmal statt. Eine Behandlungsgruppe erhielt $1,5 \times 10^6$ 8-MOP/UVA-behandelte Splenozyten in $150 \mu\text{l}$ PBS ($n = 13-14$), die andere Behandlungsgruppe erhielt $1,5 \times 10^6$ UVC-behandelte Splenozyten in $150 \mu\text{l}$ PBS ($n = 17-18$). Die Kontrollgruppe erhielt $150 \mu\text{l}$ PBS analog zur ECP ($n = 15-16$). Der Anteil der $CD3^+ CD4^+$ TH-Zellen und der $CD3^+ CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen von allen Splenozyten und deren Anteil an $CD69^+$ Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Der CD4/CD8-Quotient wurde für die $CD3^+ CD4^+$ TH-Zellen und die $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen (A) und die $CD3^+ CD4^+ CD69^+$ TH-Zellen und die $CD3^+ CD8^+ CD69^+$ zytotoxischen T-Zellen (B) berechnet. Die Tiere wurden getötet, wenn sie einen Score ≥ 6 erreichten, ihr Gewicht um mehr als 20 % innerhalb von zwei Tagen sank oder 42 Tage nach Stammzelltransplantation.

3.3.3 Immunologie in verschiedenen Krankheitsphasen

Der Krankheitsverlauf der akuten GvHD kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden. Ungefähr sieben Tage nach der HSZT beginnt der erste starke Krankheitsschub. Der zweite starke Krankheitsschub ist circa 21 Tage nach HSZT zu beobachten. Beide Krankheitsphasen dauern einige Tage an, bis die starken Symptome nachlassen. Um zu untersuchen, ob sich der Anteil der vorhandenen Zellpopulationen während der Krankheitsphasen verändert, wurden die Daten aller Tiere über die Zeit analysiert. Dabei wurden alle Tiere, die bis einschließlich Tag 14 aus dem Versuch ausschieden, zum Versuchsabschnitt eins gezählt. Alle Tiere, die danach aus dem Versuch ausschieden, wurden

zum Versuchsabschnitt zwei gezählt. Die Tiere, die bis zum Versuchsende überlebten, wurden als Gruppe Überlebende eingestuft.

Der Anteil der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg war bei Tieren, die während des zweiten Abschnitts aus dem Versuch ausgeschieden sind, höher als bei den Tieren aus Abschnitt eins (Post-hoc-Test, $p \leq 0,05$). Zu den Überlebenden gab es keinen Unterschied (Post-hoc-Test, $p > 0,99$). Bei den CD3⁻ CD49b⁺ NK-Zellen (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,67$), den CD3⁺ CD49b⁺ NKT-Zellen (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,12$), den CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen (ANOVA, $p = 0,36$) und den CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,18$) gab es keine Unterschiede in der Größe der Populationen zwischen den verschiedenen Versuchsabschnitten (Abbildung 16).

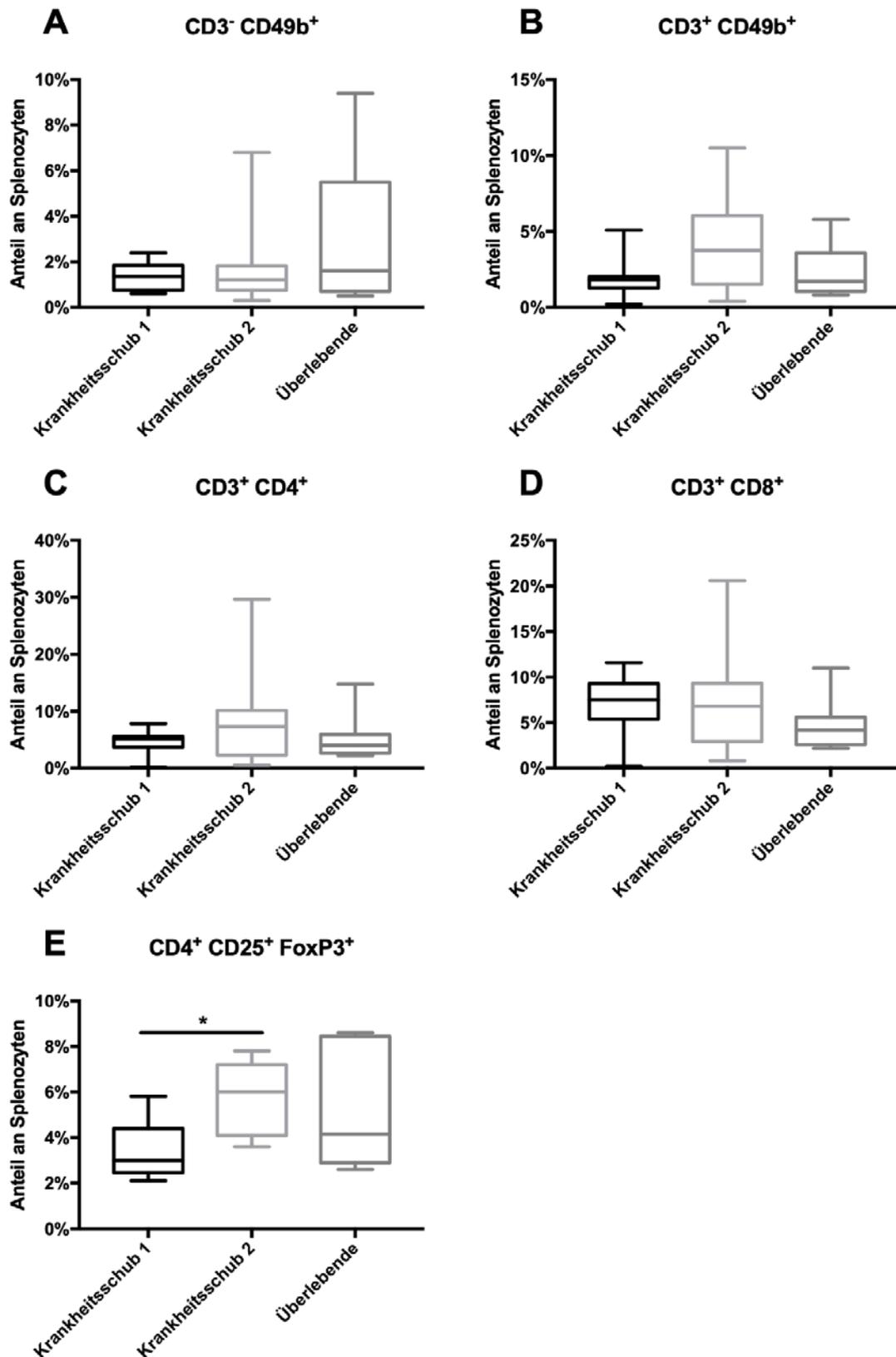


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen bei akuter GvHD in verschiedenen Krankheitsphasen. BALB/c-Mäuse wurden bestrahlt und erhielten ein Transplantat von C57BL/6-Mäusen, bestehend aus Knochenmark- und T-Zellen, um eine akute GvHD zu induzieren. Die Tiere wurden getötet, wenn sie einen Score ≥ 6 erreichten, ihr Gewicht um mehr als 20 % innerhalb von zwei Tagen sank oder 42 Tage nach Stammzelltransplantation. Abhängig von ihrem Todestag wurden die Tiere in verschiedene

Gruppen eingeteilt. Als ersten Krankheitsschub wurde der Zeitraum Tag 1-14 nach Stammzelltransplantation definiert (n = 9-10), als zweiter Krankheitsschub Tag 15-42 nach Stammzelltransplantation (n = 7-30). Die Tiere, die bis einschließlich Tag 42 überlebten, wurden als Überlebende betrachtet (n = 6-9). Der Anteil der CD3⁻ CD49b⁺ NK-Zellen (A), der CD3⁺ CD49b⁺ NKT-Zellen (B), der CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen (C), der CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen (D) und der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg (E) von allen Splenozyten wurde bestimmt.

* ($p \leq 0,05$)

Betrachtet man die CD69⁺ Anteile dieser Populationen, lassen sich Unterschiede erkennen. Die Tiere, die im ersten Krankheitsabschnitt aus dem Versuch ausschieden, zeigten einen höheren Anteil an CD3⁻ CD49b⁺ CD69⁺ NK-Zellen als die überlebenden Tiere (Post-hoc-Test, $p \leq 0,01$). Außerdem waren bei den Tieren, die im ersten Abschnitt ausschieden, der Anteil der CD3⁺ CD49b⁺ CD69⁺ NKT-Zellen (Post-hoc-Test, $p \leq 0,01$) und der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ zytotoxischen T-Zellen (Post-hoc-Test, $p \leq 0,05$) im Vergleich zu den Überlebenden minimiert. Die Tiere, welche während des zweiten Krankheitsabschnitts aus dem Versuch ausschieden, hatten einen erhöhten Anteil der CD3⁺ CD49b⁺ CD69⁺ NKT-Zellen, der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ TH-Zellen und der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ zytotoxischen T-Zellen im Vergleich zu den Tieren, die während des ersten Krankheitsschubs ausschieden (Post-hoc-Test, $p \leq 0,001$). Zu den Überlebenden gab es keinen Unterschied (Abbildung 17).

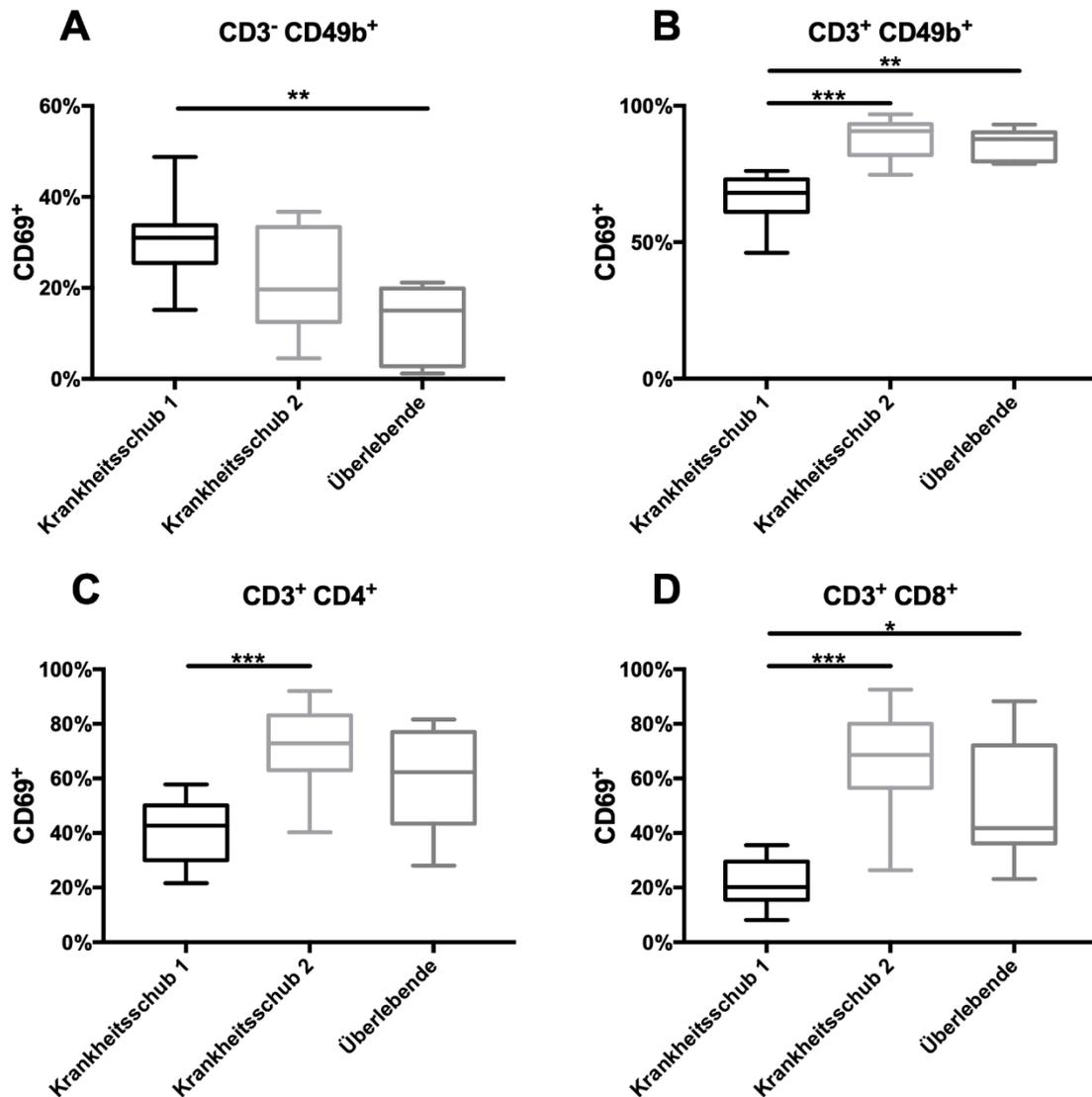


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der Aktivierungsrate der Immunzellen bei akuter GvHD in verschiedenen Krankheitsphasen. Um die akute GvHD zu induzieren, wurden BALB/c-Mäuse bestrahlt und erhielten ein Transplantat von C57BL/6-Mäusen, bestehend aus Knochenmark- und T-Zellen. Die Tiere wurden aus dem Versuch genommen und getötet, wenn sie einen Score ≥ 6 erreichten, ihr Gewicht um mehr als 20 % innerhalb von zwei Tagen sank oder 42 Tage nach Stammzelltransplantation. In Abhängigkeit von ihrem Todestag wurden die Tiere den verschiedenen Krankheitsphasen zugeteilt. Als erster Krankheitsschub wurde der Zeitraum Tag 1-14 nach Stammzelltransplantation definiert ($n = 9$), als zweiter Krankheitsschub Tag 15-42 nach Stammzelltransplantation ($n = 24-29$). Die Tiere, die bis einschließlich Tag 42 überlebten, wurden als Überlebende betrachtet ($n = 9$). Der Anteil der CD69⁺ Zellen der CD3⁻ CD49b⁺ NK-Zellen (A), der CD3⁺ CD49b⁺ NKT-Zellen (B), der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen (C) und der CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (D) wurde bestimmt. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$)

Tiere, die während des ersten Versuchsabschnitts aus dem Versuch ausgeschieden sind, hatten ein niedrigeres CD4/CD8-Verhältnis im Vergleich zu den Tieren, welche im zweiten Abschnitt ausschieden (Post-hoc-Test, $p \leq 0,01$) und den Überlebenden (Post-hoc-Test, $p \leq 0,05$). Das Verhältnis der CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ TH-Zellen zu den CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ zytotoxischen T-Zellen war hingegen erhöht bei den Tieren, die im ersten Abschnitt ausschieden (Post-hoc-Test, Krankheits Schub 2 $p \leq 0,001$, Überlebende $p \leq 0,01$) (Abbildung 18).

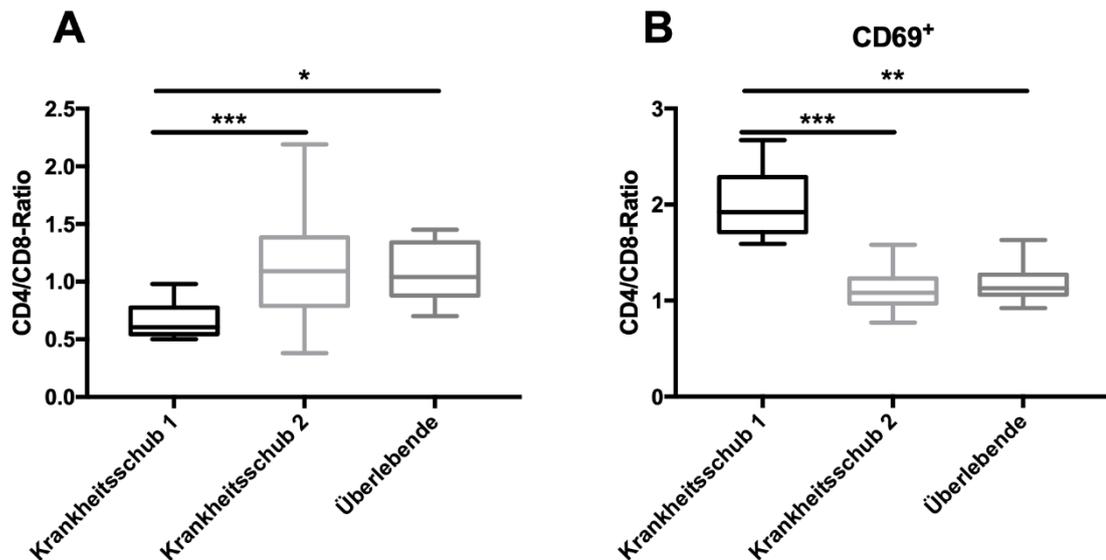


Abbildung 18: Analyse des CD4/CD8-Quotienten bei akuter GvHD in verschiedenen

Krankheitsphasen. BALB/c-Mäuse wurden bestrahlt und erhielten ein Transplantat von C57BL/6-Mäusen, bestehend aus Knochenmark- und T-Zellen, um die akute GvHD zu induzieren. Die Tiere wurden getötet, wenn sie einen Score ≥ 6 erreichten, ihr Gewicht um mehr als 20 % innerhalb von zwei Tagen sank oder 42 Tage nach Stammzelltransplantation. Abhängig von ihrem Todestag wurden die Tiere den verschiedenen Krankheitsphasen zugeteilt. Als erster Krankheitsschub wurde der Zeitraum Tag 1-14 nach Stammzelltransplantation definiert ($n = 9-10$), als zweiter Krankheitsschub Tag 15-42 nach Stammzelltransplantation ($n = 27-29$). Die Tiere, die bis einschließlich Tag 42 überlebten, wurden als Überlebende betrachtet ($n = 9$). Der Anteil der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen und der CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen von allen Splenozyten und deren Anteil an CD69⁺ Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Das CD4/CD8-Verhältnis wurde für die CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen und die CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (A) und die CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ TH-Zellen und die CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ zytotoxischen T-Zellen (B) berechnet. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$)

4 Diskussion

Seit der Entwicklung der ECP in den 1980er Jahren als Behandlung für das kutane T-Zell-Lymphom wuchs das Anwendungsfeld stetig. Heute wird die ECP zur Behandlung und Prävention verschiedener T-Zell-vermittelter Erkrankungen, wie der systemischen Sklerose, Morbus Crohn, GvHD und auch gegen Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen, vor allem von Lunge und Herz, angewendet (Knobler et al. 2014). Die Behandlung mit einer ECP ist wenig invasiv und zeigt nur wenige Nebenwirkungen. Zudem ist die Therapie oft erfolgreich (Greinix et al. 2006), wobei der genaue Wirkmechanismus noch nicht abschließend erklärt ist. Diese Eigenschaften führen dazu, dass die Therapieform an Aufmerksamkeit gewinnt und Thema der aktuellen Forschung bleibt (Knobler et al. 2009).

Für die Durchführung einer ECP sind entsprechend ausgestattete Behandlungszentren nötig, die über ein speziell ausgebildetes ärztliches und pflegerisches Personal sowie die nötige räumliche Ausstattung und das Spezialequipment verfügen (Schiller et al. 2011). Die hygienischen Standards, insbesondere bei der Verarbeitung von Blutprodukten, steigen ständig und werden durch das Qualitätsmanagement engmaschig kontrolliert. Für die ECP muss 8-MOP in den Apheresebeutel gegeben werden. An dieser Stelle wird ein geschlossenes System geöffnet, was ein erhöhtes Kontaminationsrisiko mit sich bringt. Um diese Schwachstelle zu beseitigen, ist es denkbar, dass dieser Schritt zukünftig in einem *good-manufacturing-practice*-Bereich unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden muss. Dies würde einen hohen organisatorischen, strukturellen, personellen und finanziellen Mehraufwand bedeuten, der gerade von kleinen und mittelgroßen Kliniken mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht geleistet werden kann.

UVA besitzt eine Wellenlänge von 315-380 nm und eine für UV-Strahlung geringe Energie. Da die Energie der Strahlung allein nicht ausreicht, um Apoptose in Zellen auszulösen, wird 8-MOP als DNA-Interkalator benötigt (Heshmati 2003). Die Grundüberlegung dieser Arbeit war, die energiereichere UVC zu verwenden und das Hinzufügen eines Fotoaktivators zu umgehen. UVC besitzt eine Wellenlänge von 100-280 nm und kann allein DNA-Läsionen auslösen (Narita et al. 2018a). In einer vorangegangenen Arbeit wurde bereits das Apoptoseverhalten verschiedener Zellpopulationen nach einer konventionellen ECP mit 8-MOP/UVA und nach einer ECP mit UVC *in vitro* untersucht und verglichen (Barrios-Bussmann 2020). Die ECP mit UVC zeigte vielversprechende Ergebnisse.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Behandlung einer Zellkultur aus MNZ mit UVC die gleichen Auswirkungen auf die Apoptoserate der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen hat, wie eine Behandlung mit 8-MOP/UVA. Zusätzlich wurden die Auswirkungen der Behandlung auf die Proliferationsrate der CD3⁺ T-Zellen untersucht. Die Behandlung der Zellen mit 8-MOP/UVA erfolgte nach dem Modell einer konventionellen ECP. Für die Messung der Proliferationsrate wurde der Marker CD71 genutzt, um die Modalitäten für eine optimale Nutzung des Markers zu ermitteln.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die gewonnen Erkenntnisse in ein Mausmodell übertragen und untersucht, ob eine ECP mit UVC-bestrahlten Splenozyten den gleichen Effekt auf den Krankheitsverlauf, das Gewicht und das Überleben der Tiere hat, wie eine ECP mit 8-MOP/UVA behandelten Splenozyten bei akuter GvHD.

4.1 Auswirkung von 8-MOP/UVA oder UVC auf die Zellzahl in Zellkulturen

Für die Untersuchungen zur Apoptose- und Proliferationsrate über drei Tage wurden parallel Zellkulturen angelegt. Es gab eine unbehandelte Kontrolle, eine mit 8-MOP/UVA und eine mit UVC behandelte Zellkultur, jeweils mit und ohne AK zur Stimulation der Proliferation. Nach ein, zwei und drei Tagen konnten keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl zwischen den Zellkulturen festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die Arten der Behandlung keinen wesentlichen Einfluss auf die Zellzahl haben. Fasste man die verschiedenen Zellkulturen tageweise zusammen, zeigte sich, dass die Zellzahl vom Zeitpunkt der Aussaat bis zur Messung nach drei Tagen um 50,27 % abnahm. Dabei fand die stärkste Abnahme der Zellzahl vom Zeitpunkt der Aussaat bis zur Messung nach einem Tag statt. Von Tag eins bis Tag drei sank die Zellzahl nur um 14,6 %. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die genaue Zellzahl bei der Aussaat unter der gezählten Zahl liegt. Zwischen der letzten Auszählung der Zellen vor der Aussaat und der Aussaat selbst wird die Zellsuspension in ein anderes Gefäß pipettiert und zentrifugiert. Dabei können Zellen verloren gehen. Des Weiteren bleiben bei der Überführung der Zellen in ein Gefäß für die Färbung, trotz der Benutzung eines Zellschabers, einige Zellen in der Zellkulturflasche zurück. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Großteil des Zellverlusts auf den Versuchsaufbau zurückzuführen ist und nicht auf die Behandlung, da der größte Verlust vom Ausgangszeitpunkt bis zum Tag eins zu verzeichnen war. Für weitere Untersuchungen wäre eine zusätzliche Zellzahlbestimmung nach der Zentrifugation sinnvoll, um den durchschnittlichen Verlust an dieser Stelle zu ermitteln. Die Zellzahl sollte dementsprechend angepasst werden.

4.2 Auswirkung von 8-MOP/UVA oder UVC auf die Apoptoserate von CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen

Die Zellkulturen für die Messung wurden aus MNZ angelegt, die mittels Ficoll-Aufreinigung aus einem Buffy-Coat gewonnen wurden. Die Apoptoserate der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde der verbreitete Marker Annexin V eingesetzt (Demchenko 2013). Andere Arbeitsgruppen nutzten zusätzlich Propidiumiodid (Taverna et al. 2015; Szczepiorkowski et al. 2018) oder 7-Aminoactinomycin (Cervio et al. 2015), um zwischen früher und später Apoptose oder Apoptose und Nekrose unterscheiden zu können.

Die Behandlung der Zellen mit einer UVA- oder UVC-Dosis von 2 J/cm^2 dauert circa 25 min. In den Vorversuchen wurden die unbehandelten Kontrollen während dieser Zeit unter der sterilen Werkbank bei RT stehen gelassen. Nach einem Tag war die Apoptoserate in den unbehandelten Zellkulturen bereits größer als 40 %. In einer früheren Publikation mit ähnlichem Versuchsaufbau stieg die Apoptoserate der $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ TH-Zellen in der Kontrolle nicht über 25 % (Budde et al. 2017a). Daraufhin wurde die Kontrolle direkt nach der Aussaat der Zellen in den Inkubator gestellt. Die Kontrolle soll das Verhalten der Zellen mit möglichst geringer äußerer Einwirkung zeigen. Da bereits die Änderung der Temperatur ein äußerer Reiz ist, der zur Veränderung des Apoptoseverhaltens beiträgt, wurde dieser durch die Anpassung des Protokolls reduziert. Diese Anpassung führte zu einer Senkung der Apoptoserate in der Kontrolle, dennoch war die Apoptoserate noch höher als bei den Experimenten von Budde et al. (2017a).

Die Apoptoserate der mit 8-MOP/UVA behandelten Zellen war ab dem ersten Tag signifikant höher als in der Kontrolle. Bei Untersuchungen von ECP-Präparaten zeigten sich vergleichbare Ergebnisse (Taverna et al. 2015; Szczepiorkowski et al. 2018). In vorangegangenen Projekten unserer Arbeitsgruppe wurde ebenfalls das Apoptoseverhalten von $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ TH-Zellen aus Buffy-Coats nach ECP-Behandlung *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeiten stimmen mit denen der vorangegangenen Untersuchungen überein (Budde et al. 2017a; Barrios-Bussmann 2020).

Als Alternative zur ECP mit 8-MOP/UVA wurden die Zellen in dieser Versuchsreihe mit UVC behandelt. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass UVC Apoptose in verschiedenen Zelltypen auslösen kann (Godar 1996; Gottlieb et al. 1996; Radziszewska et al. 2000; Widel et al. 2014). In diesem Experiment zeigte sich ein starker Anstieg der Apoptoserate der $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ TH-Zellen nach Behandlung mit UVC. Nach einem Tag war die Apoptoserate signifikant größer als in der Kontrolle und auch größer als bei den mit 8-MOP/UVA behandelten Zellen. Erst am Tag drei nähert sich die Apoptoserate der 8-MOP/UVA-behandelten Zellen der mit UVC behandelten Zellen an. Ein anderes Ergebnis zeigte die Untersuchung von Barrios-Bussmann (2020), bei der die Apoptoserate der UVC-bestrahlten $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ TH-Zellen etwas geringer war als die mit 8-MOP/UVA behandelten Zellen. An den Tagen eins und zwei war dort die Apoptoserate der 8-MOP/UVA- und UVC-Gruppe ähnlich. Am Tag drei war die Apoptoserate der mit UVC behandelten Zellen geringer. Die Experimente in dieser Arbeit und der von Barrios-Bussmann fanden in dem gleichen Labor mit den gleichen Materialien statt, nur die Bestrahlungsdosis wurde angepasst. Die Dosis war in diesem Experiment bei UVA um $0,2 \text{ J/cm}^2$ und bei UVC um $0,6 \text{ J/cm}^2$ höher als in dem vorangegangenen Experiment. Diese Änderung wurde vorgenommen, um die effektive Dosis von $1,8 \text{ J/cm}^2$ auf 2 J/cm^2 zu erhöhen, wie bei einer ECP in der Klinik. Beide Experimente zeigen eine veränderte Kinetik der Apoptoserate nach Bestrahlung mit UVC im Vergleich zu 8-MOP/UVA. Da die Reinfundierung von apoptotischen Zellen als ein Teil des Wirkmechanismus der ECP gilt (Voss et al. 2010), ist es denkbar, dass eine veränderte Kinetik der Apoptose die Wirkung der ECP beeinflusst (Grodzicky und Elkon 2002).

Die Apoptoserate nach Bestrahlung mit UVC wurde auch bei murinen Splenozyten untersucht. Dazu wurden die Splenozyten der C3H-Maus benutzt, die in weiteren Experimenten als Spenderzellen für die ECP genutzt wurden. Die Zellkulturen aus murinen Splenozyten wurden nur über zwei Tage beobachtet. Die Apoptoserate in der Kontrolle stieg am zweiten Tag bereits auf über 85 %, sodass eine weitere Beobachtung nicht sinnvoll gewesen wäre. Außerdem verringerte sich die Zellzahl in den Zellkulturen so stark, dass eine Messung am dritten Tag nicht möglich gewesen wäre. Da aus einer murinen Zellkultur gleichzeitig die Apoptoserate und die Proliferationsrate gemessen wurde, enthielten die Zellkulturen die Proliferationsaktivatoren Anti-CD28 und Anti-CD3. Es ist nicht bekannt, inwieweit dies die Apoptoserate beeinflusst. Nach einem Tag war die Apoptoserate der mit UVC behandelten Zellen ebenfalls größer als in der Kontrolle, jedoch fanden sich an Tag zwei keine Unterschiede. Es ist wahrscheinlich, dass der starke Anstieg der Apoptoserate in der Kontrolle in Zusammenhang mit der schlechten Kultivierbarkeit von murinen Splenozyten steht. Dass die Bestrahlung mit UVC von murinen Zellen zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt, zeigten auch Radziszewska et al. (2000).

4.3 Auswirkung von 8-MOP/UVA oder UVC auf die Proliferationsrate von CD3⁺ T-Zellen

Zur Qualitätskontrolle von ECP-Präparaten wurden in der Vergangenheit Proliferationsmarker wie CFSE (Evrard et al. 2010; Faivre et al. 2015; Taverna et al. 2015), tritiiertes Thymidin (Faivre et al. 2015) oder Bromdesoxyuridin (Szczepiorkowski et al. 2018) genutzt. Jüngste Ergebnisse aus der Forschung zeigten, dass sich auch CD71 als Proliferationsmarker für T-Zellen zur Qualitätskontrolle von ECP-Präparaten eignet (Schwab et al. 2018). CD71 ist ein Transferrinrezeptor, der sich auf der Zelloberfläche befindet und bei Aktivierung und Proliferation vermehrt exprimiert wird. In der Literatur finden sich verschiedene Angaben, ob es sich um einen Proliferations- oder Aktivierungsmarker handelt (Shipkova und Wieland 2012; Wei et al. 2015; Wieland und Shipkova 2016). Da aus der Aktivierung der T-Zelle eine Proliferation folgt, ist eine klare Abgrenzung nicht möglich. Die verschiedenen bis jetzt eingesetzten Methoden zur Messung der Proliferationsrate als Qualitätskontrolle spiegeln unterschiedliche Abschnitte des Zellzyklus wider. CFSE weist die Zytokinese nach, tritiiertes Thymidin und Bromdesoxyuridin treten in der S-Phase auf und Ki-67 wird während der G1-, S-, G2- und M-Phase exprimiert (Romar et al. 2016). Bei humanen und murinen T-Zellen wurde eine Korrelation der Expression von Ki-67 und CD71 beschrieben (Motamedi et al. 2016). Dieser Zusammenhang wurde auch bei anderen Zellarten gezeigt (Wei et al. 2015).

Um die Proliferationsrate messen zu können, müssen die T-Zellen aktiviert werden. In dem hier genutzten Versuchsaufbau wurden Anti-CD28 und Anti-CD3 als Stimulatoren für die Proliferation eingesetzt. Damit werden speziell die T-Zell-Rezeptoren (CD3-Komplexe) aktiviert, das notwendige kostimulatorische Signal wird durch Anti-CD28 vermittelt (Trickett

und Kwan 2003). Diese Art der Stimulation simuliert eher den natürlichen Weg der Aktivierung als der in anderen Experimenten verwendete Aktivator Phytohämagglutinin (PHA) (Evrard et al. 2010; Taverna et al. 2015; Szczepiorkowski et al. 2018), welcher antigenunspezifisch T-Zellen aktiviert. Nach Anweisungen des Herstellers (BioLegend) wurden die Zellen 24 h, 48 h und 72 h mit Anti-CD28, aber nur 2 h mit Anti-CD3 inkubiert. In anderen Versuchen zur Proliferation von T-Zellen wurden Anti-CD3 und Anti-CD28 gleich lang inkubiert, um die Proliferation zu stimulieren. Möglicherweise würde eine Verlängerung der Inkubationszeit von Anti-CD3 zu einer Verstärkung der Proliferationsrate führen.

Schwab et al. (2018) wiesen bei der Nutzung des CD71 Markers bereits 7-16 h nach ECP eine signifikant niedrigere Proliferationsrate der T-Zellen in den ECP-Präparaten nach. Dieses Ergebnis konnte in den Messungen zu dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Hier zeigten sich erst nach zwei Tagen signifikante Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen der Kontrolle und den mit 8-MOP/UVA behandelten CD3⁺ T-Zellen.

Die in der Vergangenheit genutzten Proliferationsmarker zeigten zuverlässig eine Reduktion der Proliferation nach ECP-Therapie an, allerdings erst nach einer längeren Inkubationszeit. Auffällig ist, dass die relative Reduktion der Proliferation stets ausgeprägter war als in diesem Versuch (Faivre et al. 2015; Taverna et al. 2015; Szczepiorkowski et al. 2018). Das könnte sowohl an der Nutzung unterschiedlicher Proliferationsmarker als auch an der Nutzung verschiedener Aktivatoren liegen. Bei Taverna et al. (2015) zeigten sich beispielsweise größere Unterschiede in der Reduktion der Proliferationsrate nach ECP bei der Nutzung von PHA als bei Anti-CD28 und Anti-CD3.

Die mit UVC bestrahlten Zellen wiesen ebenfalls eine Inhibition der Proliferation auf. Hier fanden sich bereits nach einem Tag signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Bei murinen CD3⁺ T-Zellen, die mit UVC bestrahlt wurden, konnte eine Reduktion der Proliferationsrate zwei Tage nach Bestrahlung gemessen werden.

Insgesamt betrachtet konnte mit CD71 ein Unterschied in der Proliferationsrate zwischen mit einer ECP behandelten Zellen und der Kontrolle nachgewiesen werden. Anders als bei Schwab et al. (2018) erwies sich in diesem Experiment der Zeitpunkt drei Tage nach ECP als zuverlässigster Zeitpunkt, um einen Unterschied zwischen ECP-Präparat und Kontrolle nachzuweisen. Der Einsatz von CD71 als Marker zur Qualitätskontrolle hätte verschiedene Vorteile. Erstens könnte die Qualitätsprüfung eher stattfinden. Bei bisher üblichen Markern war eine längere Inkubationszeit nötig, beispielsweise ca. fünf Tage bei der Nutzung von CFSE. Zweitens ist die Färbung mit CD71 mit vergleichsweise wenig zeitlichem Aufwand verbunden. Da es sich um einen auf der Zelloberfläche vorkommenden Marker handelt, ist das Protokoll für die Färbung kurz. Die gefärbte Probe lässt sich außerdem im Kühlschrank aufbewahren, was dem Zeitpunkt der Messung zusätzliche zeitliche Flexibilität gibt. Das Verfahren ist insgesamt zeitlich sehr effizient. Drittens kann auf radioaktive Gefahrenstoffe verzichtet werden, die bei älteren Messverfahren zum Einsatz kamen.

4.4 ECP mit UVC-behandelten Splenozyten im Vergleich zu 8-MOP/UVA-behandelten Splenozyten im Mausmodell

4.4.1 Überleben, Gewicht und klinischer Score

Als Mausmodell wurde das C57BL/6 → BALB/c Modell genutzt, dem ein *mismatch* der MHC-Klassen I und II sowie der miHAs zugrunde liegt. Es ist ein gut untersuchtes Modell für die akute GvHD mit einem ausgeprägten klinischen Krankheitsbild und einer geringen Überlebensrate (Schroeder und DiPersio 2011). Die ECP wurde mit den Splenozyten einer C3H-Maus durchgeführt. Die Nutzung von Splenozyten einer dritten unabhängigen Mauslinie für die ECP zeigte in Untersuchungen von Budde et al. (2018) einen therapeutischen Effekt. Bisher wurden die Splenoytzen von ebenfalls mit akuter GvHD induzierten und erkrankten Tieren verwendet (Budde et al. 2014). Die Nutzung einer dritten Mauslinie ist von Vorteil, da bei weniger Tieren eine akute GvHD induziert werden muss und insgesamt weniger Tiere für den Versuch benötigt werden. Allerdings ist dieses Modell neu und es liegen bisher nur wenige Daten für einen Vergleich vor.

Die Tiere, die eine ECP mit UVC-behandelten Splenozyten erhielten, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensrate, dem Gewichtsverlust und dem klinischen Score im Vergleich zu denen, die eine ECP mit 8-MOP/UVA-behandelten Splenozyten erhielten. Zu der Kontrollgruppe wiesen die Behandlungsgruppen ebenfalls keine Unterschiede auf. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Budde et al. (2018), die eine Verbesserung des klinischen Score, eine verlängerte Überlebenszeit und ein höheres Gewicht nach ECP mit 8-MOP/UVA zeigten. Es gibt mehrere Faktoren, die für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein können. Budde et al. (2018) haben ein anderes Gerät für die Bestrahlung der ECP-Präparate verwendet. Obwohl die Ergebnisse der Qualitätskontrolle der in diesem Experiment verwendeten ECP-Präparate sowohl eine Erhöhung der Apoptoserate als auch einer Verminderung der Proliferationsrate zeigten, kann beispielsweise eine veränderte Kinetik der Apoptoserate die Wirksamkeit der Therapie beeinflussen (Birge und Ucker 2008). Außerdem können veränderte äußere Einflüsse, wie Umweltpathogene, aber auch ein verändertes Mikrobiom, das Ergebnis des Experiments verändern (Lee et al. 2019). Darüber hinaus kann es bei der Zucht der Mäuse mit der Zeit zu einem Gendrift kommen, was den Krankheitsverlauf der GvHD beeinflussen kann (Schroeder und DiPersio 2011).

4.4.2 Immunologie

Für die Entstehung der GvHD sind verschiedene Zellen des Immunsystems von Bedeutung (Reddy und Ferrara 2003). Aus diesem Grund wurden die Anteile von unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen und der Anteil der NK-Zellen von allen Splenozyten der Tiere aus dem Mausmodell untersucht. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse einmal in Behandlungsgruppen unterteilt und einmal nach dem Zeitpunkt des Ausscheidens aus dem

Versuch unterteilt betrachtet. Bei der Betrachtung der immunologischen Untersuchungen muss beachtet werden, dass es zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Krankheitsverlaufs, des Gewichtsverlusts und der Sterberate gab. Demzufolge war es nur begrenzt möglich, den immunologischen Befund mit dem Ausprägungsgrad der Krankheit in Verbindung zu bringen.

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Immunsystems. In einem Experiment von Taylor et al. (2002) wurde im Mausmodell gezeigt, dass eine Erhöhung der Treg zu einer Verlängerung des Überlebens bei GvHD führt. Mit diesem Ergebnis im Einklang steht, dass die Tiere, die während der ersten 14 Tage nach HSZT aus dem hier durchgeführten Versuch ausschieden, einen signifikant niedrigeren Anteil an CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg aufwiesen als Tiere, die während des zweiten Krankheitsschubs aus dem Versuch ausschieden. Zu den überlebenden Tieren bestand jedoch kein Unterschied. In diesem Experiment zeigte weder die ECP mit 8-MOP/UVA noch die ECP mit UVC einen Einfluss auf den Anteil der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Papert (2016), die ebenfalls keinen Unterschied nach einer ECP mit 8-MOP/UVA feststellte. Demgegenüber steht das Ergebnis aus einer Studie mit Patienten, bei denen der Anteil der Treg nach ECP erhöht war (Biagi et al. 2007).

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie können virusinfizierte Zellen und Tumorzellen erkennen und bekämpfen (Claus et al. 2009). Im Zusammenhang mit GvHD konnte gezeigt werden, dass eine Infusion von NK-Zellen die GvHD deutlich reduzieren kann. Ein möglicher Mechanismus dahinter ist, dass die NK-Zellen die APZ der Empfänger erkennen und eliminieren (Ruggeri et al. 2002). Zwischen den verschiedenen Krankheitsphasen konnten keine signifikanten Unterschiede des Anteils der CD3⁻ CD49b⁺ NK-Zellen festgestellt werden. Jedoch waren während des ersten Krankheitsschubs mehr CD3⁻ CD49b⁺ NK-Zellen aktiviert als bei den überlebenden Tieren. Tiere, die eine ECP mit UVC erhielten, zeigten einen höheren Anteil an CD3⁻ CD49b⁺ NK-Zellen, als die Tiere, die mit 8-MOP/UVA behandelt wurden. Zu den Tieren der Kontroll-Gruppe bestand kein Unterschied.

NKT-Zellen sind eine spezielle Untergruppe der T-Zellen, die sowohl Eigenschaften von T-Zellen als auch NK-Zellen besitzen (Jerud et al. 2006). In der Vergangenheit konnte sowohl in Mausmodellen als auch beim Menschen gezeigt werden, dass eine Erhöhung der NKT-Zellen durch verschiedene Behandlungsformen einen protektiven Faktor für die GvHD darstellt, ohne den GvT zu beeinflussen (Mavers et al. 2017). Die Analyse des Anteils der CD3⁺ CD49b⁺ NKT-Zellen zeigte, dass der Anteil bei den Tieren nach einer ECP mit UVC erhöht war, im Vergleich zu den Tieren, die eine ECP mit 8-MOP/UVA erhielten und zur Kontrollgruppe gehörten. In den verschiedenen Krankheitsphasen zeigten sich keine Unterschiede im Anteil der CD3⁺ CD49b⁺ NKT-Zellen. Allerdings war der Anteil der aktivierten CD3⁺ CD49b⁺ CD69⁺ NKT-Zellen bei Tieren, die während des zweiten Krankheitsschubs ausschieden und den Überlebenden erhöht im Vergleich zu den Tieren,

die innerhalb der ersten 14 Tage aus dem Versuch ausschieden. Dass die Aktivierungsrate bei den länger überlebenden Tieren erhöht war, könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch die Aktivierungsrate der NKT-Zellen einen positiven Einfluss auf den Verlauf der GvHD hat.

Die CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen und CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen wurden untersucht, da sie eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der GvHD haben. Unabhängig voneinander können beide T-Zelluntergruppen in Abhängigkeit von der Art des MHC-*mismatches* zwischen Spender und Empfänger eine GvHD auslösen (Reddy und Ferrara 2003). Hier wurde ein Mausmodell mit MHC-I-, MHC-II- und miHA-*mismatch* gewählt, sodass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an der Entstehung der Erkrankung beteiligt waren (Reddy et al. 2008).

Zwischen den Behandlungsgruppen wurde kein Unterscheid von den Anteilen der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen festgestellt. Auch zwischen den verschiedenen Zeitabschnitten und den Überlebenden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Bei Patienten mit chronischer GvHD wurde gezeigt, dass bei Patienten, die auf eine ECP ansprachen, die Anzahl der CD3⁺ CD4⁺ TH-Zelle am Anfang erhöht war und über die Zeit abnahm (Akhtari et al. 2010). Der Anteil der CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen war in den Experimenten der vorliegenden Arbeit in allen Behandlungsgruppen gleich. Ein ähnliches Ergebnis fanden Gorgan et al. (2011) bei dem Vergleich der absoluten Anzahl der CD8⁺ T-Zellen von Patienten nach HSZT mit chronischen GvHD, toleranten Patienten und gesunden Kontrollen. Im Gegensatz dazu beschrieben Abrahamsen et al. (2005) eine Erhöhung der CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen bei Patienten, die nach einer HSZT an chronischer GvHD erkrankten. Grogan et al. (2011) beobachteten außerdem, dass der Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen bei Patienten mit chronischer GvHD erhöht war. In diesem Experiment war der Anteil der CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in den verschiedenen Krankheitsphasen und bei den Überlebenden ähnlich. Allerdings war der Anteil der CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺ T-Zellen bei Tieren, die während des zweiten Krankheitsschubs aus dem Experiment genommen wurden, und den Überlebenden deutlich höher, als bei den Tieren, die während des ersten Krankheitsschubs aus dem Experiment ausschieden. Es ist denkbar, dass bei einer GvHD ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Anteil der aktivierten bzw. proliferierenden CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen besteht.

Neben dem Anteil der verschiedenen Zellpopulationen wurde der CD4/CD8-Quotient untersucht. Der CD4/CD8-Quotient wird genutzt, um die Funktion des Immunsystems bei verschiedenen Erkrankungen zu überwachen, unter anderem bei Virusinfektionen oder nach Transplantationen (Amadori et al. 1995). In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass der CD4/CD8-Quotient bei Patienten nach HSZT, die an akuter GvHD erkrankten, erhöht ist (Huttunen et al. 2015; Budde et al. 2017b). Budde et al. (2017b) sehen in dem CD4/CD8-Quotienten einen potentiellen Marker für die frühzeitige Erkennung von GvHD. In diesem Experiment zeigten Tiere, die während der ersten 14 Tage aus dem Versuch ausschieden, einen deutlich niedrigeren CD4/CD8-Quotienten als Tiere, die später aus dem Versuch ausschieden oder ihn überlebten. Interessant ist, dass der CD4/CD8-Quotient aus

den CD69⁺ Zellen bei den Tieren, die zeitig aus dem Versuch ausschieden, erhöht war im Vergleich zu den anderen Tieren.

4.5 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse von Barrios-Bussmann (2020) dahingehend bestätigt, dass UVC bei den CD3⁺ CD4⁺ TH-Zellen Apoptose induziert. Die Apoptoserate stieg initial stärker an als in der mit 8-MOP/UVA behandelten Zellkultur. Allerdings näherten sich die Werte der Apoptoserate nach drei Tagen aneinander an. Dies lässt den Schluss zu, dass UVC ähnlich gut für die ECP geeignet ist wie 8-MOP/UVA. Das vergleichbare Verhalten der Proliferationsrate nach den beiden Behandlungsformen stützt diesen Schluss.

Der Proliferationsmarker CD71 zeigte nach zwei Tagen einen signifikanten Unterschied zwischen ECP-Präparat und Kontrolle an. Anders als bei Schwab (2018) war ein sicherer Unterschied zwischen Präparat und Kontrolle erst nach 72 h statt nach 7-16 h möglich. Trotzdem liefert dieser Marker schneller Ergebnisse als bisher genutzte Methoden und durch seine Eigenschaft als Oberflächenmarker ist der Arbeits- und Zeitaufwand gering. Um eine optimale Nutzung und Qualitätskontrolle zu gewährleisten, sollten weiterführend die Ergebnisse verschiedener Protokolle, insbesondere bezüglich der Nutzung der Aktivationsantikörper, verglichen werden.

Die Untersuchungen im Mausmodell zeigten keine Verbesserung oder Verschlechterung der akuten GvHD durch die verschiedenen Formen der ECP im Vergleich zur Kontrolle. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Budde et al. (2018), die im gleichen Modell eine deutliche Verbesserung des Krankheitszustands durch eine ECP mit 8-MOP/UVA zeigten. Mit dem gleichen Modell konnte somit ein neutrales und ein positives Ergebnis für die Therapie gezeigt werden. Die UVC-Therapie war in diesem Versuch vergleichbar mit der ECP mit 8-MOP/UVA. Da das genutzte Modell neu ist, sollten weitere Versuche durchgeführt werden, um die Anzahl der insgesamt untersuchten Tiere zu erhöhen. Alternativ könnte die ECP mit UVC auch an einem anderen Modell untersucht werden. Zudem wäre es denkbar, dass die veränderte Apoptosekinetik der TH-Zellen in den ersten Tagen nach ECP einen Einfluss auf das Ergebnis hat. Daraus abgeleitet könnte es sinnvoll sein, die effektive Dosis der Bestrahlung mit UVC bei weiteren Versuchen anzupassen. Die Nutzung von UVC für die ECP hätte mehrere Vorteile. Auf der einen Seite würden die Nebenwirkungen von 8-MOP wegfallen, beispielsweise eine erhöhte Fotosensitivität der Haut und besonders der Augen. Außerdem könnten Patienten mit einer Unverträglichkeit für 8-MOP trotzdem eine ECP in Anspruch nehmen. Auf der anderen Seite würde die Nutzung von UVC die Verarbeitung der Präparate erleichtern, da kein Medikament mehr zugefügt werden müsste und damit das Risiko der Kontamination der Präparate sinkt.

Die Auswirkung und die Abhängigkeit von akuter GvHD und ECP auf Immunzellen sollte weiterhin untersucht werden. Zu zahlreichen Zellpopulationen finden sich unterschiedliche

Angaben in der Literatur, sodass es schwerfällt, eine verlässliche Korrelation zwischen Ausprägung der Zellpopulation und dem Krankheitsverlauf herzustellen. In diesem Sinne wäre es interessant, bei weiteren Analysen der Immunzellen beispielsweise eine Subgruppenanalyse in Abhängigkeit vom klinischen Krankheitsscore durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Die GvHD ist eine Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation. Als Ursache werden alloreaktive T-Zellen aus dem Transplantat gesehen, die eine Immunreaktion gegen den Empfängerorganismus vermitteln. Bei der akuten GvHD sind vor allem die Leber, die Haut und der Magen-Darm-Trakt betroffen. Als Standardtherapie werden Glukokortikoide eingesetzt. Werden Patienten steroidrefraktär oder sprechen nicht auf die Therapie an, ist ein verbreitetes Verfahren für die Zweitlinientherapie die extrakorporale Photopherese. Hierbei werden Leukozyten des Patienten mittels Apherese gewonnen, mit 8-MOP und UVA-Strahlung behandelt und dem Patienten reinfundiert. Die behandelten Leukozyten gehen in Apoptose und werden durch reife dendritische Zellen phagozytiert. Man vermutet, dass es zur Transimmunisierung kommt. Außerdem entstehen durch die Antigenpräsentation spezifische regulatorische T-Zellen.

Die manuelle Injektion von 8-MOP in den Apheresebeutel stellt ein potentielles Kontaminationsrisiko dar. Zudem verbleibt das 8-MOP im Präparat und kann zu Nebenwirkungen führen. Um das Behandlungsverfahren sicherer zu gestalten, wurde in dieser Arbeit ein alternatives Verfahren untersucht, bei dem die ECP-Präparate nur mit der energiereicheren UVC-Strahlung bestrahlt wurden.

In diesem sowie einem vorangegangenen Projekt konnte *in vitro* gezeigt werden, dass UVC-Strahlung ein ähnliches Apoptoseverhalten in CD3⁺ CD4⁺ T-Helferzellen induziert wie eine Behandlung mit 8-MOP/UVA-Strahlung. Dazu wurden Zellkulturen aus mononukleären Zellen angelegt, welche aus Buffy-Coats gewonnen wurden. Die Apoptoserate wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchflusszytometrisch bestimmt.

Zusätzlich konnte eine Reduktion der Proliferationsrate bei CD3⁺ T-Zellen nach Behandlung mit 8-MOP/UVA-Strahlung und UVC-Strahlung gezeigt werden. Es wurde der Proliferationsmarker CD71 verwendet. Zur Stimulation der Proliferation wurden Anti-CD28 und Anti-CD3 eingesetzt.

Für die Qualitätskontrolle von ECP-Präparaten existiert kein einheitliches Verfahren. Der Proliferationsmarker CD71 hat in dieser Hinsicht großes Potential. Da es sich um einen oberflächlichen Transferrinrezeptor handelt, ist das Verfahren zur Färbung mit einem geringen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden. Zudem zeigte der Marker bereits nach zwei Tagen einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Präparat an. Fraglich bleibt, ob durch die Nutzung anderer Aktivator der Proliferation, beziehungsweise eine längere Inkubationszeit dieser, die Qualitätskontrolle noch zeitiger durchgeführt werden könnte.

Die Erkenntnisse über die Wirkung von UVC-Strahlung wurden in ein Mausmodell zur akuten GvHD (C57BL/6 → BALB/c) übertragen. Die ECP wurde mit den Splenozyten einer unabhängigen dritten Mauslinie (C3H) durchgeführt. Die ECP mit UVC-Strahlung wurde direkt mit der konventionellen ECP sowie mit einer Kontrollgruppe verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Überlebensrate, dem Gewichtsverlust und dem klinischen Score zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe.

Nach dem Ausscheiden der Tiere aus dem Versuch wurde die Milz entnommen und der Anteil verschiedener T-Zell-Subpopulationen sowie natürliche Killerzellen mit Hilfe von Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Ein Vergleich der Ergebnisse erfolgte nach Behandlungsgruppe und in Gruppen nach Überlebenszeit. Zwischen den Behandlungsgruppen fanden sich weitestgehend keine signifikanten Unterschiede, nur die natürlichen Killer- sowie natürlichen Killer-T-Zellen waren bei Tieren nach UVC-Behandlung erhöht. Auch in der Auswertung nach Überlebenszeit zeigten die einzelnen Immunzellsubpopulationen nur geringe Differenzen, jedoch unterschieden sich die Aktivierungsraten an verschiedenen Zeitpunkten signifikant. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Aktivierungsrate der Immunzellen eine Rolle im Krankheitsverlauf der GvHD spielt. In der Literatur finden sich unterschiedliche, teils widersprüchliche Angaben zur Entwicklung von Immunzellpopulationen während einer GvHD. Dies macht es schwer, einen konkreten Zusammenhang zwischen Ausprägung der Zellpopulation und dem Verlauf der GvHD herzustellen. Um dies weiter zu untersuchen, wären Experimente mit einer größeren Stichprobe und unter Einbeziehung eines klinischen Scores sinnvoll.

Zusammenfassend waren die Ergebnisse der ECP mit UVC-Strahlung vergleichbar mit denen der ECP mit 8-MOP/UVA. Das genutzte Modell zur ECP ist relativ neu und es gibt wenig Daten, die zum Vergleich herangezogen werden können. Aus diesem Grund sollten weitere Versuche durchgeführt werden, um die Wirksamkeit des Verfahrens zu gewährleisten.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamsen IW, Somme S, Heldal D, Egeland T, Kvale D, Tjønnfjord GE (2005): Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica* 90, 86–93
- Akhtari M, Giver CR, Ali Z, Flowers CR, Gleason CL, Hillyer CD, Kaufman J, Khoury HJ, Langston AA, Lechowicz MJ et al. (2010): Receiver operating characteristic curve analysis of circulating blood dendritic cell precursors and T cells predicts response to extracorporeal photopheresis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Transfusion* 50, 2424–31
- Amadori A, Zamarchi R, de Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Daniele GA, Clementi M, Chiecobianchi L (1995): Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1, 1279–83
- Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, Cutler CS, Westervelt P, Woolfrey A, Couban S et al. (2012): Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med* 367
- Arora S, Setia R (2017): Extracorporeal photopheresis: Review of technical aspects. *Asian J Transfus Sci* 11, 81–86
- Barrios-Bussmann C: UVC als Alternative zur 8-MOP/UVA-Behandlung in der extrakorporalen Photopherese humaner Leukozyten im in-vitro Versuch. Med. Diss. Göttingen 2020
- Biagi E, di Biaso I, Leoni V, Gaipa G, Rossi V, Bugarin C, Renoldi G, Parma M, Balduzzi A, Perseghin P et al. (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* 84, 31–39
- Billingham RE (1966): The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 62, 21–78
- BioLegend Protocol - T Cell Activation with anti-CD3 Antibodies Protocol - Human. <https://www.biolegend.com/protocols/t-cell-activation-with-anti-cd3-antibodies-protocol-human>; Zugriff am 16.07.2019
- Birge RB, Ucker DS (2008): Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death Differ* 15, 1096–102
- Budde H, Kolb S, Salinas Tejedor L, 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* 9, e105896
- Budde H, Berntsch U, Riggert J, Legler TJ (2017a): In vitro effects of different 8-methoxypsoralen treatment protocols for extracorporeal photopheresis on mononuclear cells. *Cent Eur J Immunol* 42, 1–9
- Budde H, Papert S, Maas JH, Reichardt HM, Wulf G, Hasenkamp J, Riggert J, Legler TJ (2017b): Prediction of graft-versus-host disease: a biomarker panel based on lymphocytes and cytokines. *Ann Hematol* 96, 1127–33
- 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* 113, 803–10

- Cervio M, Scudeller L, Viarengo G, Fante CD, Perotti C (2015): Quality control on mononuclear cells collected for extracorporeal photochemotherapy: comparison between two UV-A irradiation devices. *Vox Sang* 109, 403–5
- Cho A, Jantschitsch C, Knobler R (2018): Extracorporeal Photopheresis - An Overview. *Front Med (Lausanne)* 5, 236
- Claus M, Greil J, Watzl C (2009): Comprehensive analysis of NK cell function in whole blood samples. *J Immunol Methods* 341, 154–64
- Copelan EA (2006): Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 354, 1813–26
- Demchenko AP (2013): Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* 65, 157–72
- Dignan FL, Clark A, Amrolia P, Cornish J, Jackson G, Mahendra P, Scarisbrick JJ, Taylor PC, Hadzic N, Shaw BE et al. (2012): Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 158, 30–45
- 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* 32, 215–23
- Edelson R, Berger C, Gasparro F, Jegasothy B, Heald P, Wintroub B, Vonderheid E, Knobler R, Wolff K, Plewig G (1987): Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med* 316, 297–303
- Edelson R, Wu Y, Schneiderman J (2018): American council on ECP (ACE): Why now? *J Clin Apher* 33, 464–68
- Evrard B, Dosgilbert A, Jacquemot N, Demeocq F, Gilles T, Chassagne J, Berger M, Tridon A (2010): CFSE flow cytometric quantification of lymphocytic proliferation in extracorporeal photopheresis: Use for quality control. *Transfus Apher Sci* 42, 11–19
- Faivre L, Lecouflet L, Liu W-Q, Khadher I, Lahaie C, Vidal M, Legouvello S, Beaumont JL, Bierling P, Rouard H et al. (2015): Quality control of extracorporeal photochemotherapy: Proliferation assay using CFSE validated according to ISO 15189:2007 standards. *Cytometry B Clin Cytom* 88, 30–39
- Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009): Graft-versus-host disease. *Lancet* 373, 1550–61
- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie 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* 11, 945–56
- Garnett C, Apperley JF, Pavlù J (2013): Treatment and management of graft-versus-host disease: improving response and survival. *Ther Adv Hematol* 4, 366–78
- 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* 112, 1515–21
- Girardi M, Berger CL, Wilson LD, Christensen IR, Thompson KR, Glusac EJ, Edelson RL (2006): Transimmunization for cutaneous T cell lymphoma: a phase I study. *Leuk Lymphoma* 47, 1495–503

- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED (1974): Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* **18**, 295–304
- Godar DE (1996): Preprogrammed and programmed cell death mechanisms of apoptosis: UV-induced immediate and delayed apoptosis. *Photochem Photobiol* **63**, 825–30
- Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ (2001): Acute graft-vs-host disease: Pathobiology and management. *Exp Hematol* **29**, 259–77
- Gorgun G (2002): Immunologic mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Blood* **100**, 941–47
- Gottlieb RA, Nordberg J, Skowronski E, Babior BM (1996): Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 654–58
- 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* **91**, 405–8
- Greinix HT, Worel N, Just U, Knobler R (2014): Extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease. *Transfus Apher Sci* **50**, 349–57
- Grodzicky T, Elkon KB (2002): Apoptosis: a case where too much or too little can lead to autoimmunity. *Mt Sinai J Med* **69**, 208–19
- Grogan BM, Tabellini L, Storer B, Bumgarner TE, Astigarraga CC, Flowers MED, Lee SJ, Martin PJ, Warren EH, Hansen JA (2011): Activation and expansion of CD8(+) T effector cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **17**, 1121–32
- Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, Chanswangphuwana C, Efebera YA, Holler E, Litzow M et al. (2016): International, multicenter standardization of acute graft-versus-host disease clinical data collection: A report from the mount sinai acute GVHD international consortium. *Biol Blood Marrow Transplant* **22**, 4–10
- Hart JW, Shiue LH, Shpall EJ, Alousi AM (2013): Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease: evidence and opinion. *Ther Adv Hematol* **4**, 320–34
- Heshmati F (2003): Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus Apher Sci* **29**, 61–70
- Holtick U, Albrecht M, Chemnitz JM, Theurich S, Skoetz N, Scheid C, von Bergwelt-Baildon M (2014): Bone marrow versus peripheral blood allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for haematological malignancies in adults. *Cochrane Database Syst Rev* **4**, CD010189
- Huttunen P, Taskinen M, Siitonen S, Saarinen-Pihkala UM (2015): Impact of very early CD4(+)/CD8(+) T cell counts on the occurrence of acute graft-versus-host disease and NK cell counts on outcome after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* **62**, 522–28
- Jacobsohn DA, Vogelsang GB (2007): Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* **2**, 35
- Jerud ES, Bricard G, Porcelli SA (2006): CD1d-Restricted Natural Killer T Cells: Roles in Tumor Immunosurveillance and Tolerance. *Transfus Med Hemother* **33**, 18–36

- Juric MK, Ghimire S, Ogonek J, Weissinger EM, Holler E, van Rood JJ, Oudshoorn M, Dickinson A, Greinix HT (2016): Milestones of hematopoietic stem cell transplantation – from first human studies to current developments. *Front Immunol* 7, 470
- Just U, Knobler R (2015): Update zur extrakorporalen Photopherese. *Hautarzt* 66, 804–9
- 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* 61, 652–65
- Knobler R, Berlin G, Calzavara-Pinton P, Greinix H, Jaksch P, Laroche L, Ludvigsson J, Quaglino P, Reinisch W, Scarisbrick J et al. (2014): Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 28, 1–37
- Kolb HJ (2008): Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 112, 4371–83
- Korngold R, Sprent J (1978): Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp Med* 148, 1687–1698
- Lee SE, Lim JY, Ryu D-B, Kim TW, Park SS, Jeon YW, Yoon JH, Cho BS, Eom KS, Kim YJ et al. (2019): Alteration of the intestinal microbiota by broad-spectrum antibiotic use correlates with the occurrence of intestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 25, 1933–43
- MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NKC, Davies SM, Blazar BR (2002): Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems. *Biol Blood Marrow Transplant* 8, 387–94
- Malard F, Sestili S, Eder S, Belhocine R, Ruggeri A, Battipaglia G, Brissot E, Mediavilla C, Dulery R, Mohty M (2018): Extracorporeal photopheresis for first line treatment of acute graft versus host disease. *Blood* 132, 2114
- Markey KA, MacDonald KPA, Hill GR (2014): The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. *Blood* 124, 354–62
- Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, Beatty PG, Doney K, McDonald GB, Sanders JE (1990): A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 76, 1464–72
- Mavers M, Maas-Bauer K, Negrin RS (2017): Invariant natural killer T cells as suppressors of graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol* 8, 900
- Motamedi M, Xu L, Elahi S (2016): Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J Immunol Methods* 437, 43–52
- Murray J, Stringer J, Hutt D: Graft-Versus-Host Disease (GvHD). In: Kenyon M, Babic A (Hrsg.): *The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses: Under the Auspices of EBMT*. Springer, Cham (CH) 2018, 221–51
- Narita K, Asano K, Morimoto Y, Igarashi T, Nakane A (2018a): Chronic irradiation with 222-nm UVC light induces neither DNA damage nor epidermal lesions in mouse skin, even at high doses. *PLoS ONE* 13, e0201259

- Narita K, Asano K, Morimoto Y, Igarashi T, Hamblin MR, Dai T, Nakane A (2018b): Disinfection and healing effects of 222-nm UVC light on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mouse wounds. *J Photochem Photobiol B* 178, 10–18
- Papert S: New approaches to improve extracorporeal photopheresis for the treatment of graft-versus-host disease. *Biol. Diss.* 2016
- Passweg JR, Halter J, Bucher C, Gerull S, Heim D, Rovó A, Buser A, Stern M, Tichelli A (2012): Hematopoietic stem cell transplantation: a review and recommendations for follow-up care for the general practitioner. *Swiss Med Wkly* 142, w13696
- Premarket Approval.
https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?start_search=1&applicant=&tradename=&productcode=&pmanumber=P860003&supplementnumber=&advisorycommittee=&docketnumber=&supplementtype=&expeditedreview=&ivdproducts=off&combinationproducts=off&decisiondatefrom=&decisiondateto=¬icedatefrom=¬icedateto=&PAGENUM=500&sortcolumn=an_asc; Zugriff am 14.08.2019
- Radziszewska E, Piwocka K, Bielak-Zmijewska A, Skierski J, Sikora E (2000): Effect of aging on UVC-induced apoptosis of rat splenocytes. *Acta Biochim Pol* 47, 339–47
- Reddy P, Ferrara JLM (2003): Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev* 17, 187–94
- Reddy P, Negrin R, Hill GR (2008): Mouse models of bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 129–35
- Ritter MA, Olberding EM, Malinzak RA (2007): Ultraviolet lighting during orthopaedic surgery and the rate of infection. *J Bone Joint Surg Am* 89, 1935–40
- Romar GA, Kupper TS, Divito SJ (2016): Research Techniques Made Simple: Techniques to Assess Cell Proliferation. *J Invest Dermatol* 136, e1–e7
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassonni F, Aversa F et al. (2002): Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097–2100
- Ruutu T, Gratwohl A, de Witte T, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, Dazzi F, Dreger P, Duarte R, Finke J et al. (2014): Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT–ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant* 49, 168–73
- Schiller M, Klemke CD, Arnold A, Booken N, Hanneken S, Hölzle E, Kaatz M, Schwarz T, Weichenthal M, Hillen U (2011): S1 Leitlinie - Extrakorporale Photopherese (Leitlinie im Auftrag der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie).
<https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/013-072.html>; Zugriff am 12.08.2019
- Schroeder MA, DiPersio JF (2011): Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech* 4, 318–33
- Schwab L, Michel G, Hackstein H (2018): A novel simple and rapid quality control test for analysis of T cell proliferation inhibition after extracorporeal photopheresis. *Transfus Med Hemother* 45, (supplement 1), 6
- Schwarte S, Bremer M, Fruehauf J, Sorge Y, Skubich S, Hoffmann MW (2007): Radiation protocols determine acute graft-versus-host disease incidence after allogeneic bone marrow transplantation in murine models. *Int J Radiat Biol* 83, 625–36

- Shipkova M, Wieland E (2012): Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta* **413**, 1338–49
- Szczepiorkowski ZM, Burnett CA, Dumont LJ, Abhyankar SH (2018): Apheresis buffy coat collection without photoactivation has no effect on apoptosis, cell proliferation, and total viability of mononuclear cells collected using photopheresis systems. *Transfusion* **58**, 943–50
- Taverna F, Coluccia P, Arienti F, Birolini A, Terranova L, Mazzocchi A, Rini F, Mariani L, Melani C, Ravagnani F (2015): Biological quality control for extracorporeal photochemotherapy: Assessing mononuclear cell apoptosis levels in ECP bags of chronic GvHD patients. *J Clin Apher* **30**, 162–70
- Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR (2002): The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* **99**, 3493–99
- Therakos, Inc. - The Global Leader in Autologous Immune Cell Therapy.
<https://www.therakos.com>; Zugriff am 14.08.2019
- Theurich S, Fischmann H, Shimabukuro-Vornhagen A, Chemnitz JM, Holtick U, Scheid C, Skoetz N, von Bergwelt-Baildon M (2012): Polyclonal anti-thymocyte globulins for the prophylaxis of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell or bone marrow transplantation in adults. *Cochrane Database Syst Rev* **2**, CD009159
- Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW (1957): Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* **257**, 491–96
- Trickett A, Kwan YL (2003): T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods* **275**, 251–55
- Voss CY, Fry TJ, Coppes MJ, Blajchman MA (2010): Extending the horizon for cell-based immunotherapy by understanding the mechanisms of action of photopheresis. *Transfus Med Rev* **24**, 22–32
- Ward DM (2011): Extracorporeal photopheresis: how, when, and why. *J Clin Apher* **26**, 276–85
- Wei YY, Zhang XZ, Zhang F, Li ZB, Wang NN, Liu S, Yue BH (2015): Expression of CD71 on cell proliferation in hematologic malignancy and its correlation with Ki-67. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **23**, 234–40
- Weisdorf D, Haake R, Blazar B, Miller W, McGlave P, Ramsay N, Kersey J, Filipovich A (1990): Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood* **75**, 1024–30
- Widel M, Krzywon A, Gajda K, Skonieczna M, Rzeszowska-Wolny J (2014): Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **68**, 278–87
- Wieland E, Shipkova M (2016): Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin Biochem* **49**, 347–54
- 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* **19**, 767–76

- Wolnicka-Glubisz A, Fraczek J, Skrzeczynska-Moncznik J, Friedlein G, Mikolajczyk T, Sarna T, Pryjma J (2010): Effect of UVA and 8-methoxypsoralen, 4, 6, 4'-trimethylangelicin or chlorpromazine on apoptosis of lymphocytes and their recognition by monocytes. *J Physiol Pharmacol* 61, 107–14
- Wu S, Zhang C, Zhang X, Xu Y, Deng T (2015): Is peripheral blood or bone marrow a better source of stem cells for transplantation in cases of HLA-matched unrelated donors? A meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 96, 20–33
- Zeiser R, Blazar BR (2017): Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med* 377, 2167–2179
- Zeiser R, Wolff D, Scheid C, Luft T, Greinix H, Dreger P, Finke J, Holler E (2020): Onkopedia-Leitlinie: Graft-versus-Host Erkrankung, akut (für die Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V.). <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/graft-versus-host-erkrankung-akut>; Zugriff am 30.01.2020

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei der Zentralabteilung für Transfusionsmedizin, die es mir ermöglicht hat, in einem strukturierten Rahmen an meiner Dissertation zu arbeiten.

Ein besonderer Dank gilt hierbei meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. med. T. Legler und Herrn Prof. Dr. med. I. Bogeski für die Begleitung meiner Arbeit mit kritischen und hilfreichen Anregungen.

Vielen Dank an Holger Budde für die gute Betreuung bei der Arbeit im Labor und die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen.

Danke an das Evangelische Studienwerk Villigst e.V., mit deren Unterstützung ich mein Studium um diese wertvolle Erfahrung erweitern konnte.