

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN III  
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE ROLLE DONORSTÄMMIGER TREG-ZELLEN IM MURINEN MODELL DER  
AUTOLOGEN UND ALLOGENEN KNOCHENMARKTRANSPLANTATION

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

vorgelegt von  
Nikolai Benkowitsch

2020



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN III  
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIE ROLLE DONORSTÄMMIGER TREG-ZELLEN IM MURINEN MODELL DER  
AUTOLOGEN UND ALLOGENEN KNOCHENMARKTRANSPLANTATION

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

vorgelegt von  
Nikolai Benkowitsch

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Edinger  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Hehlhans  
Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2021

# Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 1 Einleitung .....   | 6  |
| 1.1. Allogene Stammzelltransplantation.....  | 6  |
| 1.2. Akute und chronische Graft-versus-Host-Disease (GvHD) .....                                       | 9  |
| 1.3. Prophylaxe und Therapie der Graft-versus-Host-Disease .....                                       | 11 |
| 1.4. Immunsuppression und Immuntoleranz durch regulatorische T-Zellen.....                             | 13 |
| 1.5. Regulatorische T-Zellen und Graft-versus-Host-Disease.....  | 17 |
| 1.6. Zielsetzung.....  | 19 |
| 2 Material & Methoden .....  | 21 |
| 2.1. Material.....   | 21 |
| 2.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....   | 21 |
| 2.1.2. Medien, Puffer, Lösungen.....   | 21 |
| 2.1.3. Verbrauchsmaterialien .....   | 22 |
| 2.1.4. Geräte .....  | 23 |
| 2.2. Arbeiten mit Mäusen und murinen Zellen.....   | 23 |
| 2.2.1. Mausstämme .....  | 23 |
| 2.2.2. Organentnahme .....   | 24 |
| 2.2.3. Isolierung muriner Knochenmarkzellen.....   | 24 |
| 2.2.4. Isolierung muriner Milzzellen.....  | 25 |
| 2.2.5. Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer .....  | 25 |
| 2.2.6. Anreicherung CD90.2 <sup>+</sup> Zellen mittels MACS .....                                      | 26 |
| 2.2.7. Depletion CD90.1-/TCR $\beta$ -exprimierender Zellen mittels FACS .....                         | 27 |
| 2.2.8. Transplantatherstellung, Konditionierung der Empfängertiere und Durchführung<br>der .....       | 28 |
| Knochenmarktransplantation .....   | 28 |
| 2.2.9. Venöse Blutentnahme und Chimerismusanalyse .....  | 28 |
| 2.2.10. In vivo Depletion DTR-exprimierender Spender-Treg durch Injektion von<br>Diphtherie-Toxin..... | 29 |
| 2.2.11. Anfertigung und Beurteilung histologischer Präparate von Dünn- und Dickdarm<br>.....           | 29 |
| 2.2.12. Klinische Beurteilung der Mäuse.....   | 30 |
| 2.3. Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....   | 30 |
| 2.3.1. Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von Zellen .....                                 | 30 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3.2. Zellfärbung für die FACS-Analyse.....   | 31 |
| 2.3.3. Verwendete FACS-Antikörper .....  | 32 |
| 2.3.4. Identifikation von Zellen in der FACS-Analyse.....  | 34 |
| 2.4. Quantifizierung von Zytokinen mittels quantitativer Real-time PCR.....  | 36 |
| 2.4.1. Isolierung von RNA aus Darmgewebe .....   | 36 |
| 2.4.2. Bestimmung von Konzentration und Reinheit isolierter RNA.....   | 36 |
| 2.4.3. Überprüfung der Integrität isolierter RNA mittels Gelelektrophorese .....   | 37 |
| 2.4.4. Transkription von RNA in cDNA.....  | 37 |
| 2.4.5. cDNA-Quantifizierung mittels Real-time PCR .....  | 38 |
| 2.5. Statistik.....  | 40 |
| 2.6. Software.....   | 40 |
| 3 Ergebnisse .....   | 41 |
| 3.1. Eliminierung reif transplantiertes, donorstämmiger Treg nach allogener und syngener HSZT .....  | 41 |
| 3.1.1. Erzeugung des Transplantats, Transplantation und Treg-Eliminierung .....  | 42 |
| 3.1.2. Zelluläre Zusammensetzung von KM und Milz der Empfängertiere vor Treg-Depletion an Tag 26.....  | 44 |
| 3.2. Klinische Langzeitbeobachtung und serielle Blutanalysen der Empfängertiere nach gezielter Eliminierung reif transplantiertes, donorstämmiger Treg.....      | 51 |
| 3.3. Durchflusszytometrische Analyse von KM und Milz nach gezielter Eliminierung reif transplantiertes, donorstämmiger Treg .....                                | 58 |
| 3.3.1. Zellularität von Knochenmark und Milz.....  | 58 |
| 3.3.2. T-Zellen.....   | 59 |
| 3.3.2.1. T-Zellen im Knochenmark.....  | 59 |
| 3.3.2.2. T-Zellen in der Milz.....   | 65 |
| 3.3.3. B-Zellen .....  | 70 |
| 3.3.3.1. B-Zellen im Knochenmark.....  | 70 |
| 3.3.3.2. B-Zellen in der Milz.....   | 72 |
| 3.3.4. Granulozyten und Monozyten.....   | 73 |
| 3.3.4.1. Granulozyten und Monozyten im Knochenmark.....  | 74 |
| 3.3.4.2. Granulozyten und Monozyten in der Milz.....   | 75 |
| 3.4. Histologische und molekularbiologische Analyse von Dün- und Dickdarm .....  | 76 |
| 3.4.1. Histopathologische Untersuchung von Dünndärmen transplantiertes Mäuse vor und nach gezielter Eliminierung reif transplantiertes, donorstämmiger Treg..... | 76 |
| 3.4.2. Histopathologische Untersuchung von Dickdärmen transplantiertes Mäuse vor und nach gezielter Eliminierung reif transplantiertes, donorstämmiger Treg..... | 78 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.4.3. Expression von FoxP3 und immunmodulierenden Zytokinen im Dünndarm ..... | 79  |
| 3.4.4. Expression von FoxP3 und immunmodulierenden Zytokinen im Dickdarm ..... | 81  |
| 4 Diskussion .....   | 83  |
| 5 Zusammenfassung .....  | 97  |
| 6 Literaturverzeichnis .....   | 99  |
| 7 Abkürzungsverzeichnis .....  | 109 |
| 8 Danksagung   |     |
| 9 Lebenslauf   |     |

# 1 Einleitung

## 1.1. Allogene Stammzelltransplantation

Vor über 50 Jahren führte Georges Mathé die erste erfolgreiche allogene Knochenmarktransplantation (HSZT) am Menschen durch.<sup>1</sup> Er erbrachte damit den Grundsatzbeweis für das Verfahren zu einer Zeit, in der es nach zahlreichen Misserfolgen kritischer denn je betrachtet wurde – wenngleich das Potential der Behandlung außer Frage stand: tierexperimentell bereits erfolgreich angewandt, bot das Konzept erstmals die Möglichkeit, maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems kurativ zu behandeln.<sup>2,3</sup> In seiner Schrift *Adoptive immunotherapy of acute leukemia*<sup>3</sup> von 1965 beschrieb Mathé eine klinische Studie mit zehn Patienten, die eine allogene HSZT nach konditionierender Radiotherapie zur Behandlung einer akuten Leukämie erhielten. Der Erfolg stellte damals die Ausnahme dar: drei Patienten starben wenige Wochen nach HSZT aufgrund einer Knochenmarkaplasie bei mangelndem Transplantatanwachsen und vier weitere im gleichen Zeitraum aufgrund eines „akuten und sehr schweren sekundären Syndroms“ – später als ‚graft-versus-host-disease‘ (GvHD) bezeichnet. Drei der Patienten überlebten zunächst – zwei von ihnen entwickelten eine milde Form des „sekundären Syndroms“, erlitten jedoch innerhalb eines Jahres einen letalen Rückfall der Leukämie; der Dritte entwickelte vorübergehend eine schwere Form des „sekundären Syndroms“, blieb allerdings dauerhaft frei von Leukämie und zeigte einen 100%-Chimerismus des Donortransplantats. Zwanzig Monate nach HSZT verstarb er an den Folgen einer Herpesenzephalitis.

Heute ist die allogene HSZT als Therapieverfahren für eine Vielzahl maligner und teilweise nicht-maligner Erkrankungen etabliert. Die häufigsten Indikationen in Deutschland stellen akute Leukämien vor myelodysplastischen Syndromen und Non-Hodgkin-Lymphomen dar.<sup>4</sup> Weltweit werden jährlich über 10.000 allogene HSZT durchgeführt.<sup>5,6</sup> Abhängig von ursächlicher Erkrankung, Krankheitsstadium, Patientenalter, Grad der HLA-Übereinstimmung von Spender und Empfänger und weiteren Faktoren beträgt die langfristige Überlebenswahrscheinlichkeit nach allogener HSZT heute rund 50%. Unter optimalen Bedingungen wird eine mittlere Überlebensrate von bis zu 70% erreicht, teilweise – insbesondere bei später Indikationsstellung oder schlechtem Allgemeinzustand – jedoch von nur 25%.<sup>5</sup> Bei Vorliegen einer malignen Grunderkrankung zeichnen in erster Linie Krankheitsrückfälle für die hohe Mortalität verantwortlich, gefolgt von GvHD und Infektionen.<sup>7,8</sup> Trotz der hohen verfahrensassoziierten Mortalität erweist sich die allogene



HSZT in vielen Fällen als alternativlos, sodass die Risiken des Verfahrens – insbesondere Rückfälle, GvHD, Infektionen – in Kauf genommen werden müssen.

Voraussetzung für die Durchführbarkeit einer allogenen HSZT ist das Finden eines passenden Spenders, der mit dem Empfänger in wesentlichen zellulären Merkmalen, den sogenannten MHC („major histocompatibility complex“) Antigenen, übereinstimmt. MHC-Moleküle, die beim Menschen auch HLA („human leukocyte antigens“ oder Haupthistokompatibilitätsantigene) genannt werden, sind Proteinstrukturen, die auf der Oberfläche kernhaltiger Körperzellen exprimiert werden und dem Immunsystem die Unterscheidung von „körpereigen“ und „fremd“ ermöglichen.<sup>9</sup> Die HLA des Menschen liegen auf dem Chromosom 6 und werden unterteilt in Klasse I (HLA-A, -B,- C) und Klasse II (HLA-DR, -DP, -DQ) Genkomplexe. Väterliches und mütterliches Allel werden jeweils kodominant exprimiert. Für eine HLA-Typisierung im Vorfeld einer HSZT werden für die drei Klasse I Gene sowie die beiden Klasse II Genloci HLA-DRB1 und HLA-DBQ1 die jeweils zwei vorhandenen Genvarianten bestimmt – folglich insgesamt zehn antigene Strukturen. Idealerweise sollten sich Spender und Empfänger in sämtlichen zehn erhobenen HLA-Hauptmerkmalen gleichen; eine solche Übereinstimmung wird ‚10/10 match‘ genannt.<sup>10</sup> Übereinstimmungen in nur acht oder neun der zehn Merkmale führen zu einer deutlichen Steigerung transplantationsassoziierter Morbidität und Mortalität.<sup>11</sup> Neben - bevorzugt - Geschwistern kommen als Spender auch fremde Personen in Betracht. Die Einrichtung großer, internationaler Spenderkarteien ermöglichte zuletzt deutliche Fortschritte in der Suche passender Donoren.

Zur Vorbereitung auf eine allogene HSZT erhalten Empfänger zunächst eine Konditionierungstherapie mit den Zielen, möglichst viele maligne Zellen zu eliminieren, eine Immunsuppression zur besseren Transplantatannahme herbeizuführen und durch Myeloablation eine Nische für das Transplantat zu schaffen.<sup>12</sup> Die Konditionierung kann nach verschiedenen Schemata erfolgen und besteht in der Regel aus Ganzkörperirradiation und Chemotherapie. Für viele Jahre stellte die Konditionierungstherapie eine Limitation für die Durchführbarkeit einer HSZT dar, nachdem die vormals stets angestrebte vollständige Myeloablation bei Vorliegen eines schlechten Allgemeinzustands ein hohes Letalitätsrisiko barg. Durch die Verwendung intensitätsreduzierter, nicht-myeloablativer Konditionierungsregimes mit entsprechend geringerer Toxizität wurde die allogene HSZT in den vergangenen Jahren auch älteren und kränkeren Menschen zugänglich.<sup>13</sup>

Nach der HSZT beginnt im Körper mit dem Transplantatanwachsen ein kritischer Prozess: das Transplantat muss die durch die Konditionierungstherapie geschaffene Knochenmarknische besetzen und fortan eine suffiziente Hämatopoese gewährleisten. Um dies zu verfolgen, werden in regelmäßigen Abständen Chimerismusanalysen durchgeführt und so die genotypische Zusammensetzung der Hämatopoese analysiert. Dabei wird überprüft, welche Anteile der Hämatopoese jeweils auf Spender und Empfänger zurückgehen. Angestrebt wird ein Zustand des vollständigen Chimerismus, bei dem sämtliche blutbildende Zellen vom Donor stammen. Verbleibende Anteile eines empfängereigenen, blutbildenden Systems bergen durch möglicherweise enthaltene, maligne Zellen die Gefahr eines frühzeitigen Krankheitsrückfalls.<sup>14</sup> Ein mögliches Instrument zur frühzeitigen Erkennung von Rezidiven ist die Bestimmung der ‚minimal residual disease‘ (MRD). Dabei wird mit Hilfe molekularbiologischer Methoden, wie der ‚polymerase chain reaction‘ (PCR) oder ‚fluorescence-in-situ-hybridisation‘ (FISH), das Vorhandensein bzw. Wiederauftreten krankheitsspezifischer Mutationen erfasst, sodass Krankheitsrezidive noch vor einer klinischen Manifestation erkannt und therapiert werden können.<sup>14,15</sup>

Besonders riskant stellen sich für Patienten die ersten Wochen nach der HSZT dar: eine mehrwöchige Immundefizienz trägt ebenso wie die Toxizität der Konditionierungstherapie oder das Vorhandensein invasiver Katheter zum gehäuften Auftreten von Infektionen und weiteren Komplikationen bei.<sup>16</sup> In breiten statistischen Erhebungen konnte gezeigt werden, dass Transplantatempfänger nach zwei krankheitsfreien Jahren eine hohe Wahrscheinlichkeit besitzen, langfristig zu überleben – die 10-Jahre-Überlebensrate unter 2-Jahre-Überlebenden liegt bei ca. 85%.<sup>7</sup> Dennoch sind häufig auch diese Patienten von Spätfolgen der HSZT betroffen: endokrine – insbesondere gonadale – Funktionsstörungen, Lebererkrankungen wie Steatose oder Zirrhose, Polyneuropathie, Osteoporose oder Fatigue stellen häufige Probleme dar. Insbesondere bei Vorliegen einer chronischen GvH-Erkrankung treten oft Augen- und Mundtrockenheit, Infektanfälligkeit oder Hautveränderungen auf.<sup>4</sup> Eine engmaschige, klinische Langzeitnachsorge der Patienten ist dementsprechend unabdingbar.

Neben den bereits genannten Risiken wie Krankheitsrückfall, Transplantatabstoßung oder dem Auftreten schwerer Infektionen stellt die GvHD – in ihrer akuten oder chronischen Form – eine besondere Herausforderung nach allogener HSZT dar.

## 1.2. Akute und chronische Graft-versus-Host-Disease (GvHD)

Was George Mathé seinerzeit als „sekundäres Syndrom“ bezeichnete, ist heute als GvHD oder ‚Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion‘ bekannt. Im weitesten Sinne handelt es sich dabei um eine inflammatorische Erkrankung, die auf einer Immunreaktion von Spender-T-Lymphozyten gegen Gewebe des Empfängers beruht.

Unterschieden werden grundsätzlich akute und chronische Form der GvHD. Während vormals der Zeitpunkt des ersten Auftretens von Krankheitssymptomen – früher oder später als 100 Tage nach HSZT – als Unterscheidungskriterium herangezogen wurde, werden beide Formen mittlerweile eher anhand ihrer unterschiedlichen Pathogenese und Symptomatik voneinander getrennt.<sup>17</sup>

Basis der akuten GvHD (aGvHD) stellt eine Gewebeschädigung des Patienten durch die vorausgegangene Konditionierungstherapie dar. Die damit verbundene Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 oder IL-6 führt zu einer Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen (APC). Gleichzeitig werden die transplantierten Donor-T-Zellen durch Erkennung von Rezipienten-spezifischen HLA/Peptid-Komplexen und Bindung kostimulatorischer Moleküle auf den APC aktiviert und reagieren nach Differenzierung in Th1-Zellen mit einer weiteren Ausschüttung proinflammatorischer Interleukine und Interferone, sodass letztlich auch CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen, Granulozyten und Makrophagen in die inflammatorische Kaskade einbezogen werden. Resultat der sich selbst aufrechterhaltenden, entzündlichen Reaktion ist eine ausgedehnte Schädigung von Geweben und Organen mit erneuter Freisetzung inflammatorischer Zytokine.<sup>17-19</sup> Zielorgane der aGvHD sind insbesondere Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber. Die Ausprägung der Symptome reicht von leicht- bis schwerstgradig; schwerste Krankheitsverläufe innerhalb von Tagen sind möglich. An der Haut können sich Beschwerden in Form makulopapulöser Exantheme bis hin zur bullösen Epidermiolyse darstellen, im Gastrointestinaltrakt von Durchfällen bis hin zu schmerzhaften Schleimhautulzerationen und -nekrosen; eine Beteiligung der Leber kann sich durch serologische Auffälligkeiten ebenso wie durch Cholangitiden und Gallengangsdestruktionen äußern.<sup>18,20</sup> Seltener sind weitere Organe wie Lunge, Knochenmark oder Thymus involviert. Die Prävalenz der aGvHD nach allogener HSZT liegt abhängig von HLA-Match und weiteren Faktoren zwischen 35% und 80%.<sup>20</sup>

Demgegenüber erweist sich die Pathophysiologie der chronischen GvHD (cGvHD) bis heute als weitgehend unklar, nicht zuletzt aufgrund des Mangels geeigneter Tiermodelle. Als ursächlich werden Störungen der thymusgesteuerten zentralen Immuntoleranz sowie aberrante

T- und B-Zell-Interaktionen diskutiert.<sup>21</sup> Erstere Theorie geht davon aus, dass Schäden am Thymusepithel durch Konditionierung oder vorausgegangene aGvHD zu einer mangelhaften Positiv- und Negativ-Selektion unreifer T-Zellen führen, sodass letztlich autoreaktive T-Zellen in die Peripherie entlassen werden und Symptome einer autoimmunologischen Erkrankung herbeiführen. Letztere Theorie hebt eine gestörte B- und T-Zellinteraktion hervor, die die Entstehung autoreaktiver B- und T-Zellen triggert und dadurch zur Erkrankung führt.<sup>22</sup> Tierexperimentell zeigte sowohl die Verabreichung von Thymus-protectivem Keratinozyten-Wachsumtsfaktor, als auch die Gabe von Rituximab zur B-Zell-Depletion positiven Einfluss auf das Auftreten einer cGvHD oder ihren Verlauf.<sup>22</sup> Klinisch zeigt die cGvHD Ähnlichkeiten zu diversen Autoimmunerkrankungen; eine Manifestation an nahezu sämtlichen Organsystemen ist möglich. Ähnlich wie bei der aGvHD sind sehr häufig Haut oder Hautanhangsgebilde, Leber und Gastrointestinaltrakt betroffen. Viele Patienten leiden an Beteiligungen von Tränen- und Speicheldrüsen, die zu Keratokonjunktivitis sicca respektive Xerostomie führen können. Rheumatische Beschwerden oder fibrosierende und obstruierende Lungenerkrankungen sind ebenso möglich wie lichenoide oder ulzerierende Veränderungen an den Genitalien. Mitunter können sich Störungen diverser Hormonachsen, Kardiomyopathien oder neurologische Defizite bemerkbar machen. Die Ausprägung der einzelnen Symptome ist dabei ausgesprochen variabel.<sup>4,20,23</sup> Die Prävalenz der cGvHD liegt langfristig bei bis zu 70%.<sup>4</sup>

Sowohl akute als auch chronische GvHD können mit weitreichenden Veränderungen des Blutbilds einhergehen. Das Auftreten einer GvHD geht mit einer starken Expansion alloreaktiver, konventioneller CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Spender-T-Zellen einher. Ein großer Teil dieser Effektor-T-Zellen stirbt anschließend durch Apoptose ab, während eine kleine Population alloreaktiver CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zellen persistiert und die GvH-Reaktion auch langfristig aufrechterhalten kann.<sup>24</sup> B-Zellen können einerseits eine Rolle als Mediatoren der (chronischen) GvHD einnehmen, erweisen sich zugleich aber als Ziel ablaufender GvH-Prozesse. Während eine aGvHD die B-Zell-Rekonstitution üblicherweise etwa drei Monate bis ein Jahr nach HSZT beeinträchtigt, beeinflusst eine cGvHD die B-Zell-Genese in einem Zeitraum von ein bis zwei Jahren nach HSZT negativ. Als Ursache der B-Zell-Rekonstitutionsstörung wurde nicht nur die Zerstörung peripherer Lymphorgane wie Milz oder Lymphknoten durch GvH-Reaktion ausgemacht<sup>25</sup>, sondern auch die Beeinträchtigung der Differenzierung von B-Vorläuferzellen im Knochenmark.<sup>26,27</sup> Der resultierende Mangel an B-Zellen trägt zur Immundefizienz der Patienten bei.<sup>28</sup>

Der klinische Verlauf einer aGvHD kann transient oder schwielend – d.h. therapeutisch kontrollierbar – sein, kann aber auch in ein therapierefraktäres Krankheitsstadium münden. Letzteres ist häufig mit einer infausten Prognose assoziiert – die mittlere Überlebensrate liegt in diesem Fall bei etwa 15% nach zwei Jahren.<sup>18</sup> Eine cGvHD wiederum kann sich entweder nach ausgeheilter aGvHD ausprägen, sich aus einer bestehenden aGvHD entwickeln, oder aber „de novo“, d.h. ohne vorausgegangene Episode einer aGvHD, entstehen.<sup>20</sup> Eine durchlebte aGvHD stellt neben fortgeschrittenem Patientenalter einen Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer cGvHD dar.<sup>4</sup> Jederzeit besteht darüber hinaus das Risiko, einen Krankheitsrückfall zu erleiden. Diesbezüglich stellt die cGvHD sogar einen protektiven Faktor dar: bei Bestehen einer milden oder moderaten Form der Erkrankung ist das Risiko eines Rezidivs der Grunderkrankung geringer als bei gänzlicher Abwesenheit einer cGvHD. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens gleichen sich beide Verlaufsvarianten, nachdem sich die höhere krankheitsbezogene Mortalität bei Vorliegen einer moderaten cGvHD und die höhere rezidivbedingte Mortalität bei Abwesenheit einer cGvHD in etwa aufwiegen.<sup>23</sup>

Akute und chronische GvHD stellen auch heute noch größte Herausforderungen in der Behandlung dar. Nachfolgend werden einige gängige Behandlungskonzepte vorgestellt.

### 1.3. Prophylaxe und Therapie der Graft-versus-Host-Disease

Die genaue Ausgestaltung der medikamentösen GvHD-Prophylaxe hinsichtlich Wahl der Medikamente, Dosis und Applikationszeitraum richtet sich nach dem individuellen Risikoprofil der Patienten und hängt mitunter vom Grad des HLA-Mismatches, Patientenalter, Zahl der T-Lymphozyten im Transplantat, Quelle der Stammzellen und weiteren Faktoren ab.<sup>29</sup> Den gängigen Regimes ist gemeinsam, dass sie ihre Wirkung über eine breite Immunsuppression entfalten. Häufig zur Anwendung kommt eine Kombination aus Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A oder Tacrolimus und einerseits dem Folsäureantagonisten Methotrexat oder andererseits dem Guanosinsynthesehemmer Mycophenolatmofetil.<sup>29,30</sup> Prinzipiell werden dadurch Signalkaskaden des Immunsystems unterbrochen und eine Proliferationshemmung, insbesondere von T- und B-Lymphozyten, herbeigeführt. Die exakte Kombination der verschiedenen Wirkstoffe ist Gegenstand zahlreicher klinischer Studien. Während sich die Applikation der Immunsuppressiva positiv auf die Inzidenz der aGvHD auswirkt, erweist sich der präventive Effekt gegenüber der cGvHD als begrenzt. Günstige Auswirkungen auf beide Formen der Erkrankung zeigte eine in-vivo T-Zell-Depletion mittels Anti-Thymozyten-Globulin, deren Gewinn hinsichtlich des

Gesamtüberlebens jedoch kontrovers diskutiert wird – vorrangig aufgrund des möglicherweise erhöhten Infektionsrisikos sowie des durch T-Zell-Depletion gleichzeitig verminderten Transplantat-versus-Leukämie-Effekts mit erhöhtem Rezidivrisiko.<sup>20,29,30</sup> Ursprünglich nur im Rahmen haploidenter HSZT verwendet, erweist sich Cyclophosphamid als alkylierendes Zytostatikum auch bei HLA-identer HSZT hinsichtlich Prophylaxe akuter und chronischer GvHD als wirkungsvoll.<sup>30</sup> Der Nachteil einer breit wirksamen Immunsuppression zur GvHD-Prophylaxe ist das damit einhergehende, erhöhte Risiko für verschiedene Infektionserkrankungen. Bakterielle Infektionen können sich auf dem Boden eingebrachter Katheter entwickeln, latente Virusinfektionen reaktiviert werden oder mykotische Infektionen durch ubiquitär verbreitete Pilzsporen entstehen.<sup>20</sup> Das Risiko, ein lebensbedrohliches, septisches Krankheitsbild zu entwickeln, ist entsprechend groß. Gängige Regimes zur GvHD-Prophylaxe bewegen sich damit im Spannungsfeld zwischen günstigen und schädlichen Auswirkungen der Immunsuppression.

In der Therapie der manifesten aGvHD stellen Glucocorticoide die Basis jeder Erstlinientherapie dar. Der Einsatz der Glucocorticoide hängt von der bestehenden Symptomatik ab. Während bei alleiniger Grad-I-Hautbeteiligung im Sinne eines begrenzten makulopapulösen Exanthems Glucocorticoide in der Regel topisch appliziert werden, kommen bei höhergradigen, kutanen Krankheitssymptomen oder jeder viszeralen Beteiligung Glucocorticoide systemisch zum Einsatz. Zur Optimierung der Ansprechrate werden Glucocorticoide im Rahmen von Studien teils mit Immunsuppressiva wie Mycophenolatmofetil kombiniert; eine klare Überlegenheit gegenüber der alleinigen Steroidtherapie konnte bislang jedoch nicht demonstriert werden.<sup>18,20</sup> Für den weiteren Verlauf nach Erstlinientherapie bestehen verschiedene Möglichkeiten. Die initiale GvHD-Symptomatik kann sich vollständig zurückbilden, sodass eine gute Immunrestitution möglich ist und Spätschäden an Organen ausbleiben. Diese komplette Remission kann bei etwa einem Drittel aller betroffenen Patienten erzielt werden.<sup>31</sup> Bei einem weiteren Teil der Betroffenen zeigt sich ein partielles Ansprechen, das sich etwa in Form eines stagnierenden klinischen Zustands bei gleichzeitig verzögerter Immunrestitution und anhaltender Zytopenie äußern kann. Mitunter besteht in diesem Fall ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung einer cGvHD. Zuletzt sind steroidrefraktäre Verläufe möglich, in denen kein oder allenfalls ein geringes Ansprechen auf die Steroidtherapie zu beobachten ist. Fehlende Therapiealternativen führen dann häufig zu einem letalen Ausgang.<sup>18</sup> Erfolge lassen sich in einigen Fällen steroidrefraktärer GvHD mittels extrakorporaler Photopherese erzielen: bei einer Leukapherese entnommene, weiße Blutkörperchen werden dabei in Anwesenheit des

Photosensitizers 8-Methoxypsoralen UV-A Strahlung ausgesetzt und dem Patienten wieder zugeführt. Mitunter über eine Induktion regulatorischer T-Zellen lassen sich positive Einflüsse auf entzündliche Prozesse in Haut, Leber und Darm beobachten, die selbst bei hochgradiger aGvHD zur Verbesserung von klinischem Zustand und Überlebensrate der Patienten führen können.<sup>30,32</sup> Auch bei der Therapie der cGvHD stellen Glucocorticoide die Basis der Therapie dar, Kombinationen mit Immunsuppressiva, extrakorporaler Photopherese oder Antikörperblockaden von T-Zellen, B-Zellen oder Signalkaskaden die Eskalation.<sup>20,30</sup> Nachteil der Langzeit-Glucocorticoid-Therapie ist deren breites Nebenwirkungsprofil: der anhaltende Hyperkortisolismus führt zu diabetischer Stoffwechsellage, hypnatriämer sowie hypokaliämer Hypertonie, kataboler Stoffwechsellage mit Muskel- und Bindegewebsatrophie, Stammfettsucht und weiteren unerwünschten Erscheinungen.<sup>33</sup>

Zusammengefasst entsteht bei den gängigen Therapiekonzepten zur Prophylaxe und Therapie der GvHD ein Antagonismus: die erwünschten Effekte der Immunsuppression können nur unter Inkaufnahme einer Vielzahl unerwünschter Begleiteffekte der Immunsuppression erzielt werden. Um diesem Dilemma zu entgehen, werden zunehmend Möglichkeiten gesucht, Pathomechanismen der GvHD gezielt zu unterbinden. Einige Ansätze greifen auf die Hemmung bedeutender proinflammatorischer Zytokinsignalwege zurück, beispielsweise durch Blockade der Interleukine 21<sup>34</sup> oder 23<sup>35</sup>, respektive Inhibition der Janus-Kinase<sup>36</sup>. Darüber hinaus werden zelluläre Therapien erforscht und etabliert. Vielversprechende Ergebnisse in der Prävention und Therapie der GvHD wurden mit Hilfe regulatorischer T-Zellen als physiologischen Immunsuppressoren erzielt.<sup>30,37,38</sup> Nach einem Abriss über die biologischen Eigenschaften regulatorischer T-Zellen wird näher auf deren Potential bei der Behandlung immundysregulierter Erkrankungen eingegangen.

#### 1.4. Immunsuppression und Immuntoleranz durch regulatorische T-Zellen

1982 beschrieben Powell et al. ein familiäres Syndrom, das sich durch Durchfälle, Stoffwechselstörungen, hämolytische Anämien, sowie durch Hautausschläge, Immunschwäche und autoreaktive Antikörper präsentierte.<sup>39</sup> Aus den Kardinalsymptomen Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie und dem postulierten X-chromosomalen Erbgang ergab sich das Akronym „IPEX“ als Bezeichnung für das Syndrom. Der genetische Hintergrund des Syndroms blieb zunächst unklar. 1996 legten Sakaguchi et al. durch Thymektomieversuche an neonatalen Mäusen dar, dass einerseits die Thymektomie zu einem Verlust peripherer CD25<sup>+</sup> T-Zellen und zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen

fürte und andererseits eine postinterventionelle Inokulation von CD25<sup>+</sup> T-Zellen aus syngen Mäusen zur Vermeidung dieser. Sakaguchi postulierte entsprechend eine entscheidende Rolle von CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Aufrechterhaltung der peripheren Immuntoleranz.<sup>40</sup> Im Jahr 2001 konnte das IPEX-Syndrom auf eine genetische Mutation im Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead box P3) zurückgeführt werden<sup>41</sup>, ebenso der Phänotyp sogenannter ‚scurfy‘-Mäuse auf eine Rasterschubmutation im orthologen FoxP3-Gen. ‚Scurfy‘-Mäuse sind gezeichnet von schuppender, schorfiger (‚scurfy‘) Haut infolge einer Dermatitis, zudem besitzen die Tiere eine auf wenige Wochen begrenzte Lebensdauer aufgrund eines lymphoproliferativen Syndroms.<sup>42</sup> Die spätere Verknüpfung der Ergebnisse von Sakaguchi et al., die eine konstitutiv CD25-exprimierende und immunregulierende T-Zellpopulation beschrieben<sup>43</sup>, mit der Erkenntnis, dass die FoxP3-Expression ein liniendefinierendes Spezifikum ebendieser Zellpopulation ist<sup>44</sup>, führte zur Definierung und Entdeckung der regulatorischen T-Zellen (Treg).<sup>45,46</sup> Die beschriebenen, schwerstgradigen immunologischen Dysregulationen als Folge einer Fehlfunktion der Treg bei FoxP3-Mutationen belegten deren Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase.<sup>47</sup> Zahlreiche sich anschließende Forschungsbemühungen trugen dazu bei, die Physiologie der Treg besser zu verstehen.

Ursprünglich wurden Treg vor allem anhand ihrer konstitutiven Expression von CD25, dem hochaffinen Rezeptor von IL-2, charakterisiert.<sup>43</sup> In Treg sind – wie auch bei anderen T-Zellen – verschiedene Gene des basalen Zellstoffwechsels von der IL-2 Signalkaskade abhängig. Externes IL-2 stellt damit einen überlebensnotwendigen Stimulus für die Zellen dar, nachdem Treg im Vergleich zu anderen T-Zell-Subpopulationen IL-2 nicht selbst produzieren können.<sup>48</sup> Unter anderem führt IL-2 auch zu einer Hochregulation des Transkriptionsfaktors FoxP3 in den Zellen<sup>49</sup>, der insgesamt mehr als 700 Gene reguliert und Treg ihre supprimierenden Eigenschaften verleiht.<sup>47</sup>

Zur Ausübung ihrer suppressiven Tätigkeit müssen Treg zunächst aktiviert werden. Dies geschieht über eine antigenspezifische Stimulation des TCR im Beisein von Kostimulantien, insbesondere IL-2.<sup>50,51</sup> Die Hemmung inflammatorischer Prozesse durch Treg findet anschließend auf verschiedenen Ebenen statt. Unter den Mechanismen kann grob zwischen einer direkten Hemmung durch Einwirkung auf T-Zellen und einer indirekten Hemmung über die Modulation dendritischer und anderer antigenpräsentierender Zellen unterschieden werden. Experimentell bestehen Hinweise dafür, dass Treg sowohl Tconv gleicher als auch



unterschiedlicher Antigenspezifität supprimieren können.<sup>52,53</sup> Die gängigsten Mechanismen direkter und indirekter Hemmung durch Treg werden im Folgenden vorgestellt.

Einen möglichen, direkten Wirkmechanismus stellt die IL-2-Deprivation dar. *In vitro* Experimente deuten darauf hin, dass über eine Zellkontakt-abhängige Herabregulation der IL-2-Transkription in Tconv, ggf. auch über eine kompetitive Hemmung mittels einer IL-2-Absorption, den Tconv IL-2 entzogen und letztlich eine Apoptose in den Zielzellen induziert wird.<sup>54,55</sup> Analog zu zytotoxischen T-Zellen könnte abseits davon durch Sekretion von Perforin und der Granzyme A und B eine Lyse aktivierter Tconv erzielt werden.<sup>56</sup> Tconv können auch durch eine aktive Sekretion immunsuppressiver Zytokine durch Treg unterdrückt werden; als Effektoren werden hierbei insbesondere IL-9, IL-10, TGF $\beta$  und IL-35 diskutiert.<sup>57,58</sup> Inwieweit die genannten Mechanismen abseits von Tconv oder auch weitere Zellen des Immunsystems adressieren, ist unklar.<sup>59</sup> Bedeutend für die indirekte Hemmung von Tconv ist die Interaktion zwischen dem auf der Oberfläche von Treg konstitutiv exprimierten Protein CTLA-4 und den kostimulatorischen Proteinen CD80/86 auf antigenpräsentierenden Zellen. CD80/86 trägt nach Bindung des Kostimulators CD28 auf Tconv zu deren Aktivierung bei. Ein Kontakt zwischen CTLA-4 und CD80/86 führt zur Herabregulation letzterer, sodass insgesamt die Aktivierung von T-Zellen gehemmt wird.<sup>59,60</sup> Die Funktion dendritischer Zellen (DC) wird auch durch die hochaffine Bindung des CD4-homologen LAG3 (lymphocyte activation gene-3) von Treg an MHC-II-Moleküle der DCs gehemmt, nachdem in DCs hierdurch ein hemmender, interner Signalweg aktiviert wird, der deren Reifung und immunstimulatorisches Potenzial beeinflusst.<sup>57,61</sup> Ein weiterer, indirekter Hemmungsmechanismus basiert auf einer Deprivation von ATP. Das Nukleotid ATP als wesentlicher Energieträger im Körper liegt intrazellulär konzentriert vor; eine Ausschüttung dessen stellt für das Immunsystem ein Signal für einen stattgehabten Zelluntergang dar. Die von Treg exprimierten Ektoenzyme CD39 und CD73 hydrolysieren die Spaltung von ATP oder ADP in AMP sowie die Spaltung von AMP in Adenosin und Phosphat, sodass den DCs ein proinflammatorischer Stimulus entzogen wird.<sup>59,61</sup> Ein weiteres Oberflächenmolekül der Treg, TIGIT (T cell immunoglobulin ITIM domain), regt in dendritischen Zellen die Bildung der immunsuppressiven Zytokine TGF $\beta$  und IL-10 an.<sup>58</sup> Über den Rezeptor Neuropilin werden langanhaltende Interaktionen zwischen Treg und DCs begünstigt, wodurch der Kontakt zwischen Tconv und DCs gestört wird. Hierdurch kann insbesondere der Beginn einer Immunantwort verzögert werden.<sup>62</sup> Zur Selbstbegrenzung der suppressiven Aktivität von Treg wird die Expression von GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) diskutiert: bei gleichzeitigem Vorhandensein eines TCR-Signals scheint das Protein eine

Unempfindlichkeit der Effektor-T-Zellen gegenüber suppressiven Signalen herbeizuführen oder die Aktivität der Treg selbst zu dämpfen.<sup>63</sup> Auch die oben beschriebene IL-2-Deprivation wird als Mechanismus einer negativen Rückkopplung zwischen Treg und Tconv gewertet, nachdem Tconv IL-2 produzieren, Treg auf IL-2 angewiesen sind und Treg durch die IL-2-Deprivation eine Apoptose in Tconv induzieren.<sup>63,64</sup>

Unterschieden wird zwischen „thymus-stämmigen“ (tTreg) und „peripher-induzierten“ (pTreg) regulatorischen T-Zellen.<sup>65</sup> Erstere reifen im Thymus und verlassen diesen als vollständig differenzierte tTreg mit einem stabilen, großteils durch FoxP3 geformten, genetisch und epigenetisch festgelegten Phänotyp. Dennoch zeigen sie *in vitro* und *in vivo* eine gewisse Plastizität, die unter bestimmten Umständen, z.B. stark inflammatorischen Zuständen *in vivo* oder repetitiven Stimulationen *in vitro* zum Verlust der FoxP3-Expression und damit des suppressiven Phänotyps führen kann.<sup>66,67</sup> Im Gegensatz zu tTreg differenzieren pTreg erst in der Peripherie aus CD4<sup>+</sup> Tconv unter dem Einfluss bestimmter Stimuli, z.B. durch Interaktion mit spezialisierten DCs oder in Abhängigkeit eines lokalen Zytokinmilieus.<sup>57</sup> Nachdem eine experimentelle Unterscheidung zwischen tTreg und pTreg in Ermangelung spezifischer Marker bislang nicht möglich ist, sind Funktion und Dynamik der pTreg unter physiologischen Bedingungen nach wie vor unklar, wenngleich sie grundsätzlich am ehesten zur Immuntoleranz im Gastrointestinaltrakt beizutragen scheinen.<sup>68,69</sup> *In vitro* kann in CD4<sup>+</sup> Tconv durch die Zugabe von TGFβ ebenfalls die Expression von FoxP3 und damit einhergehend eine suppressive Aktivität induziert werden. Im Gegensatz zu tTreg und pTreg zeigen diese iTreg („induzierte Treg“) jedoch kein spezifisches DNA-Hypomethylierungsmuster im FoxP3-Gen und besitzen damit keine stabile FoxP3-Expression und keinen stabilen Phänotyp.<sup>47,66</sup>

Wesentliche Aufgabe der Treg ist, wie schon in den ersten Experimenten von Sakaguchi und Kollegen deutlich wurde, die Gewährleistung und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Bei der Heranreifung im Thymus werden die meisten autoreaktiven T-Zellen bereits über negative Selektion eliminiert. Trotz dieses sogenannten zentralen Toleranzmechanismus verlassen jedoch vereinzelt auch autoreaktive T-Zellen den Thymus, reagieren in der Peripherie mit ihren Antigenen und könnten dadurch Autoimmunerkrankungen verursachen.<sup>70</sup> Aus ihrer aktiven Rolle in der peripheren Toleranz ergibt sich eine Verbindung zwischen Treg und der GvHD: wenn der GvHD eine Hyperreaktivität von Tconv zu Grunde liegt und Treg im Stande sind, Tconv-Aktivität zu kontrollieren, kann der therapeutische Einsatz von Treg einen sinnvollen Ansatz zur Prävention oder Therapie der GvHD darstellen.

## 1.5. Regulatorische T-Zellen und Graft-versus-Host-Disease

Im Rahmen der GvHD entsteht eine Imbalance zwischen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Tconv einerseits und Treg andererseits. Die akute GvHD führt dabei in der Regel zu einer überproportionalen Zunahme von Tconv. Während Treg sowohl beim Menschen als auch bei der Maus unter physiologischen Bedingungen etwa 10% aller peripheren  $CD4^+$  T-Zellen ausmachen, kann sich deren Anteil im Krankheitsfall auf weniger als 2,5% aller  $CD4^+$  T-Zellen reduzieren.<sup>71</sup> In diesem Missverhältnis ist es den Treg nicht mehr möglich, die alloreaktiven Reaktionen der Tconv zu kontrollieren. Im Gegensatz dazu wird bei chronischer GvHD oftmals eine Expansion regulatorischer T-Zellen beschrieben, wodurch deren Anteil unter  $CD4^+$  T-Zellen auf bis zu 30% ansteigen kann. Darin spiegelt sich offenbar eine – vor dem Hintergrund entstehender Krankheit insuffiziente – Antwort des Immunsystems auf die überschießende Aktivität der Tconv wider.<sup>71</sup>

Nach der Entdeckung der Treg und ihrer immunsuppressiven Aktivität entwickelten mehrere Arbeitsgruppen Konzepte, diese Wirkung der Zellen präventiv oder therapeutisch bei GvHD nach allogener HSZT zu nutzen.

Diesbezüglich stellten zunächst die zuverlässige und reproduzierbare Identifizierung und Isolierung von Treg sowie ihre Gewinnung in ausreichender Zahl die größten Schwierigkeiten dar. Zwar stellt FoxP3 als liniendefinierendes Gen einen spezifischen Marker für die durchflusszytometrische oder immunhistochemische Erkennung von Treg dar<sup>72</sup>, die intrazelluläre Lokalisation des Proteins macht jedoch eine Verwendung des Markers für funktionelle Untersuchungen oder Zellexpansions-Experimente unmöglich.<sup>73</sup> Die alleinige Verwendung von CD4 und CD25 als Surrogatmarker ließ zunächst keine zuverlässige Unterscheidung zwischen Treg und aktivierten Tconv beim Menschen zu. Erst die zusätzliche Einbeziehung einer niedrigen oder fehlenden CD127-Expression machte im humanen Setting eine sichere Identifizierung und Isolierung von Treg möglich.<sup>73,74</sup> Hinsichtlich der erforderlichen Quantität der Treg gibt es prinzipiell die Möglichkeit einer *in vitro* oder einer *in vivo* Expansion der Zellen. Bei der *in vitro* (bzw. *ex vivo*) Expansion werden möglichst reine Isolate von Donor-Treg mittels FACS gewonnen und zur Vermehrung anschließend mit CD3/CD28-Antikörpern und IL-2 inkubiert und kulturiert. Alternativ können MACS-angereicherte Treg kulturiert werden, dies jedoch unter Zusatz von Rapamycin oder TGFβ, um einer Kontamination durch Tconv vorzubeugen. Bei gelingender Kultivierung können die Zellen nach ein bis drei Wochen verabreicht werden.<sup>38</sup> Ein Risiko des Verfahrens besteht darin, dass Treg durch repetitive Stimulation ihren suppressiven Phänotyp verlieren können

und gleichzeitig in der Zellkultur enthaltene Tconv zur Expansion gebracht werden können.<sup>38,75</sup> Zwischenzeitlich wurden wirkungsvolle Protokolle entwickelt, um dieses Risiko zu minimieren. Bei humanen Treg zeigte sich, dass die Zellen nach *in vitro* Expansion einen suppressiven Phänotyp bewahren können, wenn als Ausgangspopulation naive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> Zellen verwendet werden. Zellkulturen auf Basis von CD45RA<sup>-</sup> Gedächtnis-T-Zellen präsentierten einen raschen Abfall von FoxP3-Expression und suppressivem Phänotyp und eignen sich daher nicht für eine *in vitro* Kultivierung.<sup>76</sup> Analog dazu führt auch im murinen System die Kultivierung naiver CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T-Zellen zu einem stabileren Treg-Phänotyp nach Expansion.<sup>77</sup> Alternativ kann zur Vermehrung und Aktivierung der Treg das Prinzip einer *in vivo* Expansion verwendet werden, indem ein zeitlicher Abstand zwischen der präventiven Verabreichung von Treg und der Verabreichung therapeutischer Tconv gelassen wird. Im MHC-differenten, murinen HSZT-Modell wurde gezeigt, dass das Zahlenverhältnis zwischen transplantierten Treg und Tconv zur Vermeidung einer aGvHD von 1:1 auf 1:10 reduziert werden kann, wenn die Treg zwei Tage vor den Tconv transplantiert werden.<sup>78</sup> Auch im humanen Setting wurde dieses Prinzip bereits im Rahmen haploidentischer HSZT angewandt, indem Patienten, die an High-risk-Leukämien erkrankt waren, nach Konditionierungstherapie Spender-Treg vier Tage vor entsprechenden Spender-Tconv transplantiert wurden.<sup>79</sup>

Ein wichtiger Aspekt beim Einsatz der Treg-Zellen in der GvHD-Prophylaxe ist ihre potenzielle Wirkung auf den erwünschten, Tconv-vermittelten Graft-versus-Leukämie/Tumor-Effekt. Im murinen Modell konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass das Potential von Tconv, Tumorzellen effektiv zu zerstören, auch in Anwesenheit von Treg erhalten bleibt.<sup>80</sup> Ein Grund hierfür ist, dass Treg zwar die Proliferation von Tconv hemmen, nicht jedoch grundsätzlich deren Aktivierung. So zeigte die Analyse von Spender-Tconv-Zellen, die nach allogener Transplantation aus Empfängertieren reisoliert wurden, dass das Vorhandensein typischer Aktivitätsmarker ebenso wie die Produktion immunmodulierender Zytokine unbeeinflusst blieb von der Anwesenheit kotransplantiertes Treg.<sup>75,80</sup> Beim experimentellen Transfer muriner Treg zusammen mit Tconv und Lymphom- bzw. Leukämiezellen in murine Empfängertiere<sup>80</sup> bzw. Transfer humaner Treg, Tconv und Leukämiezellen in ein NOD/SCID/IL2-Mausmodell<sup>81</sup> überlebten jeweils sämtliche Versuchsmäuse frei von Malignomen und GvHD. Ähnliches wurde im humanen Setting im Rahmen haploidenter HSZT bei Hochrisiko-AML bzw. -ALL gezeigt: der Kotransfer von regulatorischen und konventionellen Spender-T-Zellen zusätzlich zum

Transplantat führte zu Krankheitskontrolle bei nur geringer Rate höhergradiger GvH-Erkrankungen.<sup>79</sup>

Der therapeutische Einsatz von Treg bei bereits manifester aGvHD im Menschen stellt eine besondere Herausforderung dar und ist Gegenstand aktueller, klinischer Studien (vgl. Diskussion). Als schwierig erweist sich insbesondere die aufwändige Gewinnung der Zellen in Verbindung mit dem hohen Zeitdruck im akuten Krankheitsfall.

Eine zentrale Frage bei der therapeutischen Anwendung von Treg ist, welche Abstammung die Zellen besitzen müssen, um eine effektive Immunsuppression herbeiführen zu können. Im MHC-differenten, allogenen HSZT-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass donorstämmige Treg erforderlich sind, um eine durch alloreaktive, donorstämmige Tconv getriggerte, systemische Inflammation im Empfänger zu unterbinden, während der therapeutische Einsatz rezipienteneigener Treg demgegenüber kaum Einfluss auf Entstehung und Verlauf einer aGVHD zeigte.<sup>82</sup> Ebenfalls nahmen bei in-vitro Experimenten mit C57BL/6-Tconv als Responder-Zellen und MHC-identen, miHC-differenten, bestrahlten BALB/b-Splenozyten als Aktivatoren nur C57BL/6-Treg als donorstämmige Zellen suppressierenden Einfluss auf die Responder-Tconv, nicht jedoch BALB/b-Treg als hoststämmige Zellen.<sup>83</sup> Während im genannten in-vitro-Versuchsansatz Drittpender-Treg ebenfalls eine suppressive Wirkung auf Responder-Tconv entfalteteten, war deren therapeutische Wirkung im murinen MHC-identen HSZT-Modell gleichen Aufbaus im Vergleich zur Wirkung donorstämmiger Treg unterlegen.<sup>83</sup> Die Bedeutung des MHC-Hintergrunds von Treg in Bezug auf deren suppressives Potenzial in der HSZT ist bislang noch nicht abschließend geklärt.

Der Einsatz von Treg zur Immunregulation im Rahmen von Knochenmark- bzw. Organtransplantationen stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar. Die Möglichkeit, Immuntoleranz ohne generalisierte Immunsuppression herbeiführen zu können, bedeutet jedoch eine Chance, um das verfahrensbedingte Risiko der allogenen HSZT weiter zu senken.

## 1.6. Zielsetzung

Ein Mangel an Treg führt zur Dysregulation des Immunsystems – im Rahmen kongenitaler Immundefekte<sup>42,47</sup> oder experimenteller Depletion<sup>84,85</sup> zu Autoimmunerkrankungen, im Rahmen allogener HSZT zu Alloimmunreaktionen bzw. GvHD. Ausschlaggebend für das immunregulatorische Potenzial von Treg nach allogener HSZT scheint die Abstammung der Zellen zu sein: im Gegensatz zu reif transplantierten, donorstämmigen Treg können

rezipientenstämmige Treg im Rahmen allogener HSZT die Entwicklung einer GvHD nicht relevant beeinflussen.<sup>82</sup> Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass nach allogener HSZT sowohl eine vollständige Treg-Depletion als auch eine selektive Depletion nur der im Transplantat enthaltenen Spender-Treg zu letaler GvHD im Empfängertier führt (unveröffentlichte Ergebnisse; vgl. 4.).

Vor dem Hintergrund, dass ein absoluter Treg-Mangel in nicht-transplantierten Mäusen zu schweren Autoimmunerkrankungen führt und dass nach einer allogenen HSZT sogar schon eine selektive Depletion von Spender-Treg in schwerer GvHD mündet, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die nach allogener HSZT und Ausschalten der Spender-Treg auftretende Inflammationserkrankung tatsächlich Folge einer Spender-Tconv-induzierten Allo-Immunreaktion ist oder lediglich aus einer Alloantigen-unabhängigen, immunologischen Dysregulation infolge eines relativen Treg-Mangels resultiert. Dazu wird untersucht, welche Auswirkungen die selektive Depletion donorstämmiger Treg nach einer allogenen im Vergleich zu einer syngenen HSZT hat. Im Rahmen des Versuchsaufbaus werden zunächst allogene und syngene HSZT an murinen Modellen durchgeführt und die Tiere nach Transplantatanwachsen gezielt von der Population der transplantatstämmigen Donor-Treg befreit. Anschließend werden die Versuchstiere auf die Entstehung immunologischer Dysregulation hin untersucht, insbesondere mittels klinischer Langzeitbeobachtung, durchflusszytometrischen Analysen von peripherem Blut, Knochenmark und Milz sowie histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen von Dün- und Dickdarm.

## 2 Material & Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

| <b>Chemikalien und Reagenzien</b>           | <b>Hersteller</b>                                       |
|---|---|
| 2-Mercaptoethanol (Lsg., 50 $\mu$ M)        | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Agarose                                     | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| DAPI (Lsg., 1 mg/ml)                        | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                   |
| DPBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline) | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                   |
| EDTA  | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                   |
| Ethidiumbromid                              | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| FACSClean                                   | BD Heidelberg, Deutschland                              |
| FACSRinse                                   | BD Heidelberg, Deutschland                              |
| Fixierungs- und Permeabilisierungskit       | eBioscience, Frankfurt, Deutschland                     |
| Formaldehyd                                 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                   |
| Fötales Kälberserum (FCS)                   | PAA, Pasching, Österreich                               |
| Heparin 25.000 I.E./5ml                     | Rotexmedica, Trittau, Deutschland                       |
| Permeabilisierungspuffer (10x)              | eBioscience, Frankfurt, Deutschland                     |
| RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)          | Lonza, Verviers, Belgien                                |
| Türcks-Lösung                               | MERCK, Darmstadt, Deutschland                           |

#### 2.1.2. Medien, Puffer, Lösungen

| <b>Medium</b>    | <b>Zusammensetzung</b>   |
|------------------|--|
| 5 % RPMI-Medium  | RPMI 1640 Medium<br>5 % FCS<br>(100 U/ml Penicillin; 100 $\mu$ g/ml Streptomycin)  |
| 10 % RPMI-Medium | RPMI 1640 Medium<br>10 % FCS<br>(100 U/ml Penicillin; 100 $\mu$ g/ml Streptomycin) |

|                       |  |
|-----------------------|--|
|                       | Streptomycin)  |
| ACK-Puffer (6x)       | 0,155 M NH <sub>4</sub> CL<br>0,1 M KHCO <sub>3</sub><br>0,1 mM EDTA-Dinatriumsalz<br>pH 7,3, ad 500 ml aqua bidest, 0,2 µm<br>sterilfiltriert |
| DEPC-H <sub>2</sub> O | 1ml DEPC<br>11 H <sub>2</sub> O dest.  |
| FACS-Puffer           | DPBS<br>2 % FCS  |
| MACS-Puffer (entgast) | DPBS<br>2 mM EDTA<br>1 % FCS   |
| MOPS-Puffer (20x)     | 50 mM MOPS<br>50 mM TrisBase<br>0,1% SDS<br>1 mM EDTA<br>pH 7,7, 400 ml aqua bidest  |

### 2.1.3. Verbrauchsmaterialien

| <b>Materialien</b>                      | <b>Hersteller</b>                                  |
|---|--|
| 5 ml FACS-Röhrchen steril oder unsteril | Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ USA                  |
| 96-well-Rundbodenplatten [für qPCR]     | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                    |
| Einbettkassetten                        | KABE, Nümbrecht, Deutschland                       |
| Einmalskalpelle (No.10)                 | Feather, Osaka, Japan                              |
| Gewebeschwamm                           | KABE, Nümbrecht, Deutschland                       |
| Kanülen (0,4; 0,9 mm)                   | BD Heidelberg, Deutschland                         |
| Kombitips                               | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                    |
| MACS-Separation Säulen (LS, LD)         | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach,<br>Deutschland |
| Mini Cups RNA-free                      | Qiagen, Hilden, Deutschland                        |
| Petrischalen (100x15 mm)                | Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA                 |
| Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)    | Corning/Costar, NY, USA                            |



|  |   |
|--|---|
| Pre-Separation Filter 30µm             | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| Spritzen (1ml, 10 ml)                  | BD Heidelberg, Deutschland                      |
| Zellsiebe (70 µm)                      | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| Zentrifugationsröhrchen (15 ml, 50 ml) | Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA              |

#### 2.1.4. Geräte

| Gerät                                  | Hersteller                                      |
|--|---|
| BD LSR II™ Durchflusszytometer         | BD, Heidelberg, Deutschland                     |
| BD FACSAria™ Zellsorter                | BD, Heidelberg, Deutschland                     |
| Eppendorf Centrifuge 5810R             | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                 |
| Gammacell 40 Exactor Bestrahlungsgerät | Theratronics, Ottawa, Kanada                    |
| GentleMACS                             | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| MasterCycler Nexus                     | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                 |
| Mikro 200R Zentrifuge                  | Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland    |
| Mikroskop Nikon Eclipse TS100          | Nikon, Düsseldorf, Deutschland                  |
| NanoDrop 1000 Spectrophotometer        | Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland        |
| Sterilbank                             | Heraeus, Hanau, Deutschland                     |
| Typhoon 9400 Fluoreszenzscanner        | GE Healthcare, München, Deutschland             |

## 2.2. Arbeiten mit Mäusen und murinen Zellen

### 2.2.1. Mausstämme

| Mausstamm   | Herkunft                             |
|---|--------------------------------------|
| BALB/c Wildtyp                                    | Charles River, Sulzbach, Deutschland |
| C57BL/6 Wildtyp                                   | Charles River, Sulzbach, Deutschland |
| C57BL/6_Thy1.1                                    | Eigenzucht UKR                       |
| FoxP3 <sup>DTR</sup> _Ly5.1 (C57BL/6-Hintergrund) | Eigenzucht UKR                       |

### 2.2.2. Organentnahme

In der Arbeit wurden Zellen aus der Milz und aus dem Knochenmark der Hinterläufe der Tiere für durchflusszytometrische Analysen verwendet sowie Dünn- und Dickdarm jeweils anteilig für RNA-Diagnostik und anteilig für histologische Untersuchungen herangezogen.

Die Mäuse werden unter Einhaltung von Tierschutzbestimmungen mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation oder Genickbruch getötet, auf einer Styroporplatte fixiert, mit 70% Ethanol-Lösung besprüht und beidseits des Brustbeins, entlang der Medianlinie der Bauchhöhle und der ventralen Gelenkachse der Hinterläufe eröffnet. Nach Beiseitenahme des Darmgekröses wird die Milz von Gefäßen und Bindegewebe befreit, entnommen und bis zur weiteren Verwendung in RPMI-Medium gelagert. Die Hinterläufe werden von Muskelgewebe befreit, proximal des Hüftkopfes und distal des Sprunggelenkes abgesetzt, entnommen und in RPMI-Medium gegeben. Der Dickdarm wird auf Höhe des Rektums und aboral des Blinddarms abgesetzt; dessen distaler Zentimeter wird abgetrennt, längs eröffnet, in PBS-Medium gewaschen und in eine Histologiekassette gebettet. Der proximale Rest wird längs gespalten, von Kot befreit, in PBS-/2%-RNAlater-Medium gewaschen und in RNAlater-Medium bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Dünndarm wird aboral des Magens und proximal des Blinddarms abgesetzt. Die für die Histologie vorgesehene proximale Hälfte wird zur Entfernung von Kotresten ausgestrichen, in PBS-Medium gewaschen und in einer Histologiekassette aufgerollt. Die distale Dünndarmhälfte für die RNA-Analyse wird analog zum Dickdarm verarbeitet: das Darmstück wird längs eröffnet, von Kotresten befreit, in PBS-/2%-RNAlater-Medium gewaschen und in RNAlater-Medium gegeben. Nach Befüllung werden die Histologiekassetten jeweils in 5%-Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur gelagert, die Tubes mit den in RPMI- respektive RNAlater-Medium gebetteten Organen bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt.

### 2.2.3. Isolierung muriner Knochenmarkzellen

Die in RPMI-Medium gelagerten Hinterläufe werden unter sterilen Bedingungen in Femur und Tibia getrennt und von sämtlichem Muskel- und Bindegewebe befreit. Die Knochenenden von Femur und Tibia werden mittels einer Schere entfernt, das Knochenmark aus der eröffneten Diaphyse mit RPMI/5%FCS-Medium und einer 1,0ml-Spritze mit 0,4mm-Kanülenauflauf in eine Petrischale ausgespült und mit einer 5ml-Autopipette vereinzelt. Die Suspension wird über einen 70µm-Zellfilter in ein 50ml-Tube gegeben, um größere Zellklumpen, Muskel- und Bindegewebsreste zu entfernen; die Petrischale wird zweimal mit

RPMI/5%FCS-Medium nachgespült, die Flüssigkeit ebenfalls über den Zellfilter gegeben. Das Tube wird mit RPMI/5%FCS-Medium aufgefüllt und zentrifugiert (4°C, 1200rpm, 10min). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 2ml RPMI/5%FCS-Medium aufgenommen und mit 3ml ACK-1x-Puffer zur Erythrozytolyse versetzt, das Tube nach einer Minute Inkubationszeit mit RPMI/10%FCS-Medium aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum verworfen, das Zellpellet in 2ml RPMI/10%FCS-Medium gelöst und zu Abscheidung von Zellklumpen über einen 70µm-Zellfilter in ein neues 50ml-Tube gegeben. Das Tube wird mit RPMI/10%FCS-Medium aufgefüllt und zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in FACS-Puffer aufgenommen. Der Einzelzellsuspension wird eine Probe zur Ermittlung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer entnommen.

#### 2.2.4. Isolierung muriner Milzzellen

Die Milz wird in einer Petrischale mit 7ml RPMI/5%FCS-Medium bedeckt, mit Hilfe zweier gebogener Pinzetten an einer Kapselseite eröffnet und das Parenchym vorsichtig ausgestrichen. Die Suspension wird mittels 5ml-Autopipette vermischt und über einen 70µm-Zellfilter in ein 50ml-Tube gegeben, mögliche Zellaggregate mit einem weichen Spritzenstempel durch den Filter massiert. Das Tube wird mit RPMI/5%-Medium aufgefüllt und zentrifugiert (4°C, 1200rpm, 10min). Die weitere Verarbeitung verläuft analog zur Vereinzelung von Knochenmarkszellen (siehe 2.2.3.): nach Erythrolyse mittels ACK-Puffer erfolgt ein erneuter Filtervorgang über einen 70µm-Zellfilter, nach einem Waschschriff mit RPMI/10%FCS (4°C, 1200rpm, 10min) die Aufnahme in eine definierte Menge FACS-Puffer, schließlich die Entnahme eines Aliquots zur Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer.

#### 2.2.5. Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer

Ein Aliquot aus einer Einzelzellsuspension wird mit 0,15%-Trypanblaulösung in einer 96-Well-Platte 1:10 verdünnt. Die Zugabe von Trypanblau erlaubt die Unterscheidung vitaler und toter Zellen: das Plasma avitaler Zellen wird aufgrund deren defekter Membranstruktur durch den Farbstoff angefärbt und erscheint unter dem Lichtmikroskop blau, während vitale Zellen ein helles Zytoplasma aufweisen. Die Neubauer-Zählkammer wird mit einem Deckglas versehen und mit einigen Mikrolitern der Verdünnung beimpft. Anschließend werden die

vitalen Zellen je zweier gegenüberliegender Zählquadrate bei 10-facher Vergrößerung mikroskopisch ausgezählt.

Die Zellzahl der Ausgangszellsuspension errechnet sich gemäß nachfolgender Formel:

$$\text{Zellzahl}_{\text{Suspension}} = X/2 * Y \text{ ml} * 1/V_{\text{Zellsuspension/Trypanblaulösung}} * \text{Neubauer-Faktor}$$

X: gezählte Zellen auf zwei diagonal gegenüberliegenden Zählquadraten

Y: Gesamtvolumen der Ausgangssuspension der gezählten Zellpopulation

V: Verdünnungsverhältnis

Neubauer-Faktor: =  $10^4$

#### 2.2.6. Anreicherung CD90.2<sup>+</sup> Zellen mittels MACS

Die CD90.2-Anreicherung wurde verwendet, um T-Zellen aus dem Knochenmark von FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1(CD90.2)-Mäusen anzureichern. Dazu wurde das MACS-System (Magnetic Activated Cell Sorting) der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) verwendet. Bei der Methode werden antikörpertragende Magnetpartikel (MicroBeads) zielgerichtet an gewünschte Oberflächenantigene von Zellen konjugiert. Die entstandenen Konjugate können daraufhin an Säulen in einem starken Magnetfeld gebunden und so von den nicht-markierten Restzellen der Suspension getrennt werden.

Dazu wird zunächst eine Einzelzellsuspension aus Knochenmarkzellen hergestellt. Die Zellsuspension wird in einem 50ml-Tube auf eine Konzentration von  $10 \times 10^6$  Zellen pro 90µl FACS-Puffer eingestellt, mit 1µl F<sub>c</sub>-Block (anti-CD16/32, unmarkiert) pro  $10 \times 10^6$  Zellen versetzt, gründlich resuspendiert und 5min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend werden 10µl anti-CD90.2-Beads (CD90.2 MicroBeads, mouse; Miltenyi Biotec; Bergisch-Gladbach) pro  $10 \times 10^6$  Zellen zugegeben, die Suspension vermennt und 20min auf Eis inkubiert. Danach wird die Suspension mit MACS-Puffer versetzt und über einen 70µm-Zellfilter in ein neues 50ml-Tube gegeben; dieses wird mit MACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (4°C, 1200rpm, 10min). Zwischenzeitlich wird eine LS-Säule in einem MACS-Magneten mit 3ml MACS-Puffer äquilibriert und das Eluat verworfen. Der Überstand der zentrifugierten Zellsuspension wird abgesaugt, das Zellpellet in 500µl MACS-Puffer pro  $100 \times 10^6$  Zellen aufgenommen und mittig auf die LS-Säule gegeben; das Tube wird nochmals mit 1ml MACS-Puffer gespült und das Volumen auf die LS-Säule gegeben. Anschließend wird die LS-Säule im Magneten mit 3 x 3ml MACS-Puffer gespült. Im Anschluss wird die LS-Säule aus dem MACS-Magneten genommen, auf ein 15ml-Tube (15ml Conical Centrifuge Tube, Falcon®)

aufgesetzt und mit 5,1ml MACS-Puffer befüllt. Der Flüssigkeitsüberstand wird mit Hilfe des zugehörigen Stempels gleichmäßig und schaumfrei durch die Säule gepresst. Das Eluat (CD90.2(+)-Fraktion) wird in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt; einige Aliquots davon werden zur durchflusszytometrischen Analyse der CD90.2-Anreicherung – insbesondere Bestimmung des T-Zell-Gehalts – entnommen. Die Zellsuspension wird bis zur weiteren Verwendung mit RPMI/10% FCS aufgefüllt und auf Eis gelagert.

#### 2.2.7. Depletion CD90.1-/TCR $\beta$ -exprimierender Zellen mittels FACS

Details und Hintergründe zu Zellanalyse und –separation mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) werden unter 2.3. erläutert.

Die Methode der Fluoreszenz-basierten Zellseparation wurde im Rahmen der Transplantaterzeugung verwendet, um das Knochenmark von C57BL/6\_Thy1.1(CD90.1)-Mäusen möglichst vollständig von T-Zellen zu befreien.

Hierzu wird die Einzelzellsuspension des Knochenmarks in einem 50ml-Tube auf eine Verdünnung von 100 $\mu$ l FACS-Puffer pro  $10 \times 10^6$  Zellen eingestellt, mit 1 $\mu$ l Fc-Block (anti-CD16/32, unmarkiert) pro  $10 \times 10^6$  Zellen versetzt, gründlich resuspendiert und 5min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend werden 10 $\mu$ l anti-TCR $\beta$ -APC und 0,5 $\mu$ l anti-CD90.1-PE pro  $10 \times 10^6$  Zellen zugegeben, die Suspension gründlich vermischt und 20min im Kühlschrank inkubiert. Nach Inkubation wird das Tube mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (4°C, 1200rpm, 10min). Die Zellen werden auf eine Konzentration von  $25 \times 10^6$ /ml Zellen eingestellt und zu gleichen Teilen jeweils über einen 30 $\mu$ m Zellfilter in mehrere sterile FACS-Tubes (maximal 4ml Suspension pro Tube) gegeben.

Die Depletion der CD90.1<sup>+</sup> und/oder TCR $\beta$ <sup>+</sup> Zellen erfolgt am FACSAria™ Hochgeschwindigkeitszellsorter. Die CD90.1-/TCR $\beta$ -depletierte Zellpopulation wird dabei in 15ml-Tubes mit 1 ml FCS aufgefangen. Diese werden anschließend zentrifugiert (4°C, 1300rpm, 10min) und der Überstand wird abgesaugt. Die 15ml-Tubes werden zentrifugiert (4°C, 1300rpm, 10min) und der Überstand abgesaugt. Die Zellpellets werden in jeweils 200 $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und vereinigt. Sämtliche Tubes werden mit 200 $\mu$ l FACS-Puffer nachgespült, die Volumina ebenfalls dem Sammel-Tube zugeführt. Die vereinigte Zellsuspension wird in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und zur Transplantatherstellung verwendet.

## 2.2.8. Transplantatherstellung, Konditionierung der Empfängertiere und Durchführung der Knochenmarktransplantation

Das Transplantat enthielt CD90.2-angereichertes (stark T-Zell-haltiges) Knochenmark aus FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Mäusen (CD90.2(+)-Suspension) und CD90.1-/TCR $\beta$ -depletiertes (T-Zell-freies) Knochenmark aus C57BL/6\_Thy1.1.-Mäusen (CD90.1-/TCR $\beta$ -(-)-Suspension). Die Knochenmarksuspensionen wurden mit RPMI/5%FCS-Medium auf folgende Zellkonzentrationen eingestellt:

- CD90.2(+)-Suspension:  $0,75 \times 10^6$  T-Zellen/ml (gemäß FACS-Reanalyse)
- CD90.1-/TCR $\beta$ -(-)-Suspension:  $25 \times 10^6$  Zellen/ml

Der injektionsfertige Transplantatcocktail bestand pro Aliquot aus 100 $\mu$ l RPMI/5%FCS, 100 $\mu$ l CD90.2(+)-Suspension und 100 $\mu$ l CD90.1-/TCR $\beta$ -(-)-Suspension. Entsprechend enthielt das chimäre Knochenmarktransplantat zum Zeitpunkt der HSZT 3% T-Zellen.

Die Empfängertiere (BALB/c- und C57BL/6-Wildtyp-Mäuse) wurden am Tag der HSZT zur Konditionierung einer myeloablativen Ganzkörperbestrahlung unterzogen. C57BL/6-Mäuse wurden dabei mit 2 x 6 Gy bestrahlt, BALB/c-Mäuse mit 1 x 8 Gy.

Das Transplantat wurde den Empfängertieren intravenös über die laterale Schwanzvene appliziert. Zur Förderung der peripheren Durchblutung wurden die Tiere vorab mittels Infrarotlampe angewärmt. Zur Venenpunktion wurde eine sterile 0,4mm-Kanüle verwendet.

## 2.2.9. Venöse Blutentnahme und Chimerismusanalyse

Zur Förderung der peripheren Durchblutung werden die Mäuse zunächst mittels Infrarotlampe und Heizplatte leicht angewärmt. Nach Fixierung der Tiere in einer PVC-Röhre wird die laterale Schwanzvene leicht angeritzt, um 6-8 Tropfen Blut in einem mit 5ml PBS und 10 $\mu$ l Heparin befüllten FACS-Tube aufzufangen.

Nach Zentrifugation der Röhrchen (1200rpm, 4°C, 6min) und Absaugen des Überstands wird 1ml ACK-Puffer zur Erythrozytolyse in jedes Röhrchen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 8 min folgen zwei Waschschrte mit PBS-Puffer (1200rpm, 4°C, 6min). Anschließend werden die Proben mit Fc-Block versetzt, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (analog zu 2.3.2.).

### 2.2.10. In vivo Depletion DTR-exprimierender Spender-Treg durch Injektion von Diphtherie-Toxin

T-Zellen aus Foxp3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1 Mäusen exprimieren den humanen Rezeptor für Diphtherie-Toxin unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors. Zur selektiven Depletion der Foxp3<sup>+</sup> Spender-Treg (DTR<sup>+</sup>-Treg) wird den Versuchstieren insgesamt dreimal Diphtherie-Toxin verabreicht, im vorliegenden Versuchsaufbau an den Tagen 26, 28 und 30 nach KMT. Hierfür werden die Mäuse händisch an Nacken und Rücken fixiert, bevor 0,5µg Diphtherie-Toxin im flachen Winkel mittels einer sterilen Kanüle intraperitoneal injiziert werden. Mäuse der Kontrollgruppen erhalten in gleicher Weise volumenäquivalent PBS-Puffer anstelle von Diphtherie-Toxin.

### 2.2.11. Anfertigung und Beurteilung histologischer Präparate von Dünn- und Dickdarm

Nach Bettung der entnommenen Organe in Histologiekassetten werden die Kassetten zur Gewebefixierung für mindestens 24h in 5% Formaldehydlösung belassen. Nach Entwässerung der Gewebe (durch Mitarbeiter des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) werden die Proben mit heißem Paraffin übergossen und nach insgesamt 24h Aushärtung und Kühlung mit einem Schlittenmikrotom in Scheiben von 5µm Dicke geschnitten. Zur histologischen Begutachtung erfolgt eine Färbung der Präparate mit Hämatoxylin/Eosin. Das histologische Grading des Darms erfolgte durch eine erfahrene Mitarbeiterin des Instituts für Pathologie (Frau Dr. E. Huber) nach dem Score nach Kaplan et al.<sup>86</sup> Der Score berücksichtigt das Vorliegen von Apoptosen und Inflammation (vgl. Tab. 2.1). Der Gesamtwert des Scores ist die Summe aus den Einzelwerten für Apoptose und Inflammation.

|                     | <b>0</b> | <b>1</b>                            | <b>2</b>  | <b>3</b>  | <b>4</b>  |
|---------------------|----------|-------------------------------------|---|---|---|
| <b>Apoptose</b>     | keine    | vereinzelte apoptotische Körperchen | apoptotische Körperchen in weniger als der Hälfte der Krypten | apoptotische Körperchen in der Mehrzahl der Krypten | mehrere apoptotische Körperchen in der Mehrzahl der Krypten |
| <b>Inflammation</b> | keine    | leicht                              | moderat   | stark, ohne Ulzeration                              | stark, mit Ulzeration                                       |

Tab. 2.1: Histologisches Bewertungsschema des Darms nach Kaplan et. al<sup>86</sup>

## 2.2.12. Klinische Beurteilung der Mäuse

Transplantierte Empfängertiere werden zweimal wöchentlich klinisch beurteilt. Dazu wird das klinische Bewertungsschema nach Cooke et al.<sup>87</sup> verwendet. In den Score gehen Haut- und Fellbeschaffenheit, das Vorliegen einer pathologischen Körperhaltung sowie Aktivitäts- und Körpergewichtsverlust der Tiere ein. Jedes Kriterium erlaubt eine Einordnung zwischen 0 (nicht vorhanden) und 2 (stark ausgeprägt) Punkten; die Werte werden addiert. Maximal ist somit ein Wert von 10 Punkten möglich. Gemäß Tierschutzrichtlinie der Universität Regensburg werden die Tiere bei Erreichen eines Summenscores von  $\geq 6$  Punkten oder bei Auftreten eines Körpergewichtsverlusts von  $> 25\%$  des Ausgangswertes euthanasiert. Abseits des Scores wird das Auftreten von Durchfällen dokumentiert.

|            | <b>Fell</b>  | <b>Haut</b>                   | <b>Körperhaltung</b>                         | <b>Aktivität</b>                                 | <b>Gewichtsverlust</b>   |
|------------|--|-------------------------------|--|--|--------------------------|
| <b>0,5</b> | struppiges Fell ventral                            | Schuppung an Pfoten und Ohren | leichte Kyphose, nur in Ruhe                 | Aktivität reduziert                              | -                        |
| <b>1,0</b> | ventrale Querlinien, leicht struppiges Fell dorsal | Erythem an Schwanz und Anus   | leichte Kyphose auch bei Bewegung            | $>50\%$ des Beobachtungszeitraums keine Bewegung | 10-25% Gewichtsverlust   |
| <b>1,5</b> | struppiges Fell $> 50\%$ der Körperoberfläche      | offene Läsion                 | Kyphose                                      | Bewegung nur nach Stimulation                    | -                        |
| <b>2,0</b> | gesamtes Fell betroffen, Fellverlust               | multiple offene Läsionen      | starke Kyphose, eingeschränkte Beweglichkeit | keine Bewegung, auch nicht nach Stimulation      | $> 25\%$ Gewichtsverlust |

Tab. 2.2.: **Klinisches Bewertungsschema nach Cooke et al.**<sup>87</sup>

## 2.3. Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

### 2.3.1. Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von Zellen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Charakterisierung und Sortierung von Zellen anhand ihrer optischen Emissionen bei Passage eines Laserstrahls. Die Zellen werden dazu vorab mit fluoreszierenden Antikörpern konjugiert.

Bei der Messung passieren Zellen einzeln eine Mikrokapillare, in der sie von einem Laser angestrahlt werden. Das dabei entstehende Streulicht wird von verschiedenen Dioden detektiert. Fluoreszenzunabhängig werden dabei das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) und das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) aufgefangen. Das Vorwärtsstreulicht bezeichnet die Beugung des Lichtstrahls in der Achse der Einfallsrichtung und bildet das Volumen einer Zelle ab, das Seitwärtsstreulicht bezeichnet die Brechung des Lichts



rechtwinklig zur Einfallsrichtung und ist abhängig von Granularität und Oberflächenbeschaffenheit der Zelle. Beide Parameter erlauben eine grobe morphologische Einordnung der Zellen.

Zur exakten Identifizierung der Zellen können abseits von FSC und SSC auch Fluoreszenzeigenschaften analysiert werden. Nachdem Zellen per se keine Fluoreszenz aufweisen, werden Oberflächen- oder intrazelluläre Antigene der Zellen dazu vorab mit Antikörpern konjugiert, die ihrerseits wiederum mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Bei Passage des Laserstrahls absorbieren und emittieren die Fluoreszenzfarbstoffe Licht verschiedener Wellenlängen, das von mehreren Detektoren aufgefangen wird, um so eine Charakterisierung der Zellen in Abhängigkeit der erfassten Antigene zu ermöglichen. Bei gleichzeitiger Konjugation einer Zelle mit verschiedenen Fluorochromen ist simultan die Bestimmung mehrerer Antigene möglich.

Im Rahmen der Arbeit wurde der *LSR II<sup>TM</sup>* Durchflusszytometer der Firma Beckton Dickinson (BD) zur Zellanalyse verwendet. Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe verfügt das Gerät über Laser vier verschiedener Wellenlängen (355 nm (UV Laser), 409nm (violetter Laser), 488nm (blauer Laser), 633nm (roter Laser)). Die Fluoreszenzmarkierung der Zellen erfolgte mit Hilfe sieben verschiedener Fluorochrome (FITC, PE, PerCP, APC, PacificBlue, PE-Cy7, APC-Cy7). Proben, die ausschließlich oberflächengefärbt sind, wurden vor der Messung zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff DAPI versehen. Der Farbstoff kann nur in Zellen mit strukturellen Defekten eindringen und dort an die DNA binden, wodurch eine Unterscheidung lebender und toter Zellen ermöglicht wird

Die CD90.1-/TCR $\beta$ -Depletion im Rahmen der Transplantaterzeugung wurde mit Hilfe des BD *FACSaria<sup>TM</sup>* Zellsorters vorgenommen. Die Funktionsweise ist jener des *LSR II* ähnlich. Anders als dort können Zellen hier jedoch nicht nur vereinzelt und hydrodynamisch fokussiert, sondern auch polarisiert und dadurch voneinander separiert werden. Dadurch können Zellgemische gezielt von einer gewissen Zellpopulation befreit bzw. diese hochreich isoliert werden.

### 2.3.2. Zellfärbung für die FACS-Analyse

Fluorochrome können mithilfe antigenspezifischer Antikörper an oberflächliche oder intrazelluläre Antigene von Zellen gebunden werden. Letzteres erfordert zunächst die

Permeabilisierung der Zellmembran, um die entsprechenden Proteine für Farbstoffe zugänglich zu machen.

Zur Oberflächenfärbung wird einer Zellsuspension nach Zählung in der Neubauer-Zählkammer ein Aliquot von  $1 \times 10^6$  Zellen entnommen. Die Zellen werden in ein mit FACS-Puffer befülltes FACS-Tube gegeben, zentrifugiert (1200rpm, 4°C, 6min) und in 50µl FACS Puffer resuspendiert. Dem Gemisch wird 1µl F<sub>c</sub>-Block (anti-Maus CD16/32, unmarkiert) zur Blockade einer unspezifischen AK-Bindung an Fc-Rezeptoren und nach fünfminütiger Inkubationszeit die Fluorochrom-markierten Färbeantikörper zugegeben. Nach gründlicher Resuspension werden die Zellen weitere 20min inkubiert. Nach einem Waschschrift werden die gefärbten Zellen in 200µl FACS-Puffer zur FACS-Analyse aufgenommen. Unmittelbar vor Beginn der Durchflusszytometrie werden die einzelnen Tubes mit 20µl DAPI (1 ng/ml) versetzt.

Der Oberflächenfärbung kann sich bei Bedarf eine intrazelluläre Färbung anschließen. Dazu werden die gewaschenen Zellen zunächst auf dem Vortex mit 1ml Fixierungs-/Permeabilisierungs-Lösung versetzt. Nach halbstündiger Inkubation folgen zwei Waschschriffe mit jeweils 2ml Permeabilisierungspuffer (1200rpm, 4°C, 6min). Die Zellsuspension wird mit intrazellulären Färbeantikörpern versetzt und 30min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 2ml Permeabilisierungspuffer schließt sich ein Waschschrift mit FACS-Puffer an. Zuletzt werden die Zellen zur Messung in 200µl FACS-Puffer aufgenommen. Intrazellulär gefärbten Proben darf vor dem Messen kein DAPI zugefügt werden, da die Membran der Zellen zuvor perforiert wurde.

Die Inkubationsschritte erfolgen jeweils bei 4°C im Kühlschrank.

### 2.3.3. Verwendete FACS-Antikörper

| Konjugat | Spezifität | Hersteller* | Klon      | Herkunft | Isotyp |
|----------|------------|-------------|-----------|----------|--------|
| FITC     | B220       | BD          | RA3-62B   | Ratte    | IgG2a  |
|          | CD127      | eBioscience | A7R34     | Ratte    | IgG2a  |
|          | IgD        | BD          | 11-26c.2a | Ratte    | IgG2a  |
| PE       | CD11b      | BD          | M1/70     | Ratte    | IgG2b  |
|          | CD11b      | BD          | M1/70     | Ratte    | IgG2b  |
|          | CD23       | BioLegend   | B3B4      | Ratte    | IgG2b  |
|          | CD43       | BioLegend   | S11       | Ratte    | IgG2b  |

|              |                                       |                 |          |                      |       |
|--------------|---------------------------------------|-----------------|----------|----------------------|-------|
|              | CD45                                  | BD              | 30F-11   | Ratte                | IgG2b |
|              | CD45-1                                | BioLegend       | A20      | Maus                 | IgG2a |
|              | CD90.1                                | Miltenyi Biotec | His51    | Maus                 | IgG2a |
|              | FLT3                                  | eBioscience     | A2F10    | Ratte                | IgG2a |
|              | FoxP3                                 | eBioscience     | Fj616s   | Ratte                | IgG2a |
| <b>PerCP</b> | CD4                                   | BD              | RM4-5    | Ratte                | IgG2a |
|              | CD8a                                  | BD              | 53-6.7   | Ratte                | IgG2a |
|              | CD19 bio                              | BD              | 1D3      | Ratte                | IgG2a |
|              | CD45-1 bio                            | BioLegend       | A20      | Maus                 | IgG2a |
|              | ICOS bio                              | eBioscience     | C398.4A  | Armenian<br>Hamster  | IgG   |
| <b>APC</b>   | CD3/CD8/Gr<br>1                       | BioLegend       | 145-2C11 | Armenian<br>Hamster  | IgG   |
|              | CD21                                  | BioLegend       | 7E09     | Ratte                | IgG2a |
|              | CD25                                  | BioLegend       | PC61     | Ratte                | IgG1  |
|              | CD45-1                                | BD              | A20      | Maus                 | IgG2a |
|              | Gr1                                   | BD              | RB6-8C5  | Ratte                | IgG2b |
|              | Ki67                                  | eBioscience     | SolA15   | Ratte                | IgG2a |
|              | Lineage Cell<br>Detection<br>Cocktail | Miltenyi Biotec | -        | Ratte                | IgG2a |
|              | TCR $\beta$                           | Miltenyi Biotec | REA318   | recombinant<br>human | IgG1  |
|              | Ter119                                | BioLegend       | Ter-119  | Ratte                | IgG2b |
| <b>PECy7</b> | B220                                  | BioLegend       | RA3-6B2  | Ratte                | IgG2a |
|              | CD19                                  | BD              | 1D3      | Ratte                | IgG2a |
|              | CD24                                  | BioLegend       | M1/69    | Ratte                | IgG2b |
|              | CD90-2                                | eBioscience     | 53-2.1   | Ratte                | IgG2a |
|              | c-kit                                 | BD              | 2B8      | Ratte                | IgG2b |
| <b>PB</b>    | BP-1 bio                              | BioLegend       | 6C3      | Ratte                | IgG2a |
|              | CD4                                   | BD              | RM4-5    | Ratte                | IgG2a |
|              | CD45-1 bio                            | BioLegend       | A20      | Maus                 | IgG2a |
|              | IgM bio                               | BD              | II/41    | Ratte                | IgG2a |
|              | Nk1-1                                 | BD              | PK136    | Maus                 | IgG2a |

|                 |             |           |          |                     |       |
|-----------------|-------------|-----------|----------|---------------------|-------|
|                 | BV421       |           |          |                     |       |
|                 | Sca-1       | BioLegend | D7       | Ratte               | IgG2a |
| <b>APCCy7</b>   | CD3         | BioLegend | 145-2C11 | Armenian<br>Hamster | IgG   |
|                 | TCR $\beta$ | BioLegend | H57-597  | Armenian<br>Hamster | IgG   |
| <b>Purified</b> | CD16/CD32   | BioLegend | 93       | Ratte               | IgG2a |

\*Hersteller: BD, Heidelberg, Deutschland  
BioLegend, Eching, Deutschland  
eBioscience, Frankfurt, Deutschland  
Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

#### 2.3.4. Identifikation von Zellen in der FACS-Analyse

| <b>Benennung</b>  | <b>FACS Antikörpermarkierung</b>   |
|---|--|
| T-Zellen<br>CD4 <sup>+</sup> Regulatorische T-Zellen / Treg<br>CD4 <sup>+</sup> konventionelle (CD4 <sup>-</sup> )T-Zellen / Tconv<br>CD8 <sup>+</sup> konventionelle (zytotoxische) T-Zellen<br>Doppelt-negative (DN) T-Zellen | TCR $\beta$ <sup>+</sup><br>FoxP3 <sup>+</sup> (gfp <sup>+</sup> ) CD4 <sup>+</sup> (CD8 <sup>-</sup> ) TCR $\beta$ <sup>+</sup><br>FoxP3 <sup>-</sup> (gfp <sup>-</sup> ) CD4 <sup>+</sup> (CD8 <sup>-</sup> ) TCR $\beta$ <sup>+</sup><br>CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> TCR $\beta$ <sup>+</sup><br>CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> TCR $\beta$ <sup>+</sup>   |
| B-Zellen (Knochenmark) *<br>Fraktion A<br>Fraktion B<br>Fraktion C<br>Fraktion D<br>Fraktion E<br>Fraktion F  | CD19 <sup>+</sup><br>BP1 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup> B220 <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup><br>BP1 <sup>-</sup> CD24 <sup>+</sup> B220 <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup><br>BP1 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> B220 <sup>+</sup> CD43 <sup>+</sup><br>IgD <sup>-</sup> IgM <sup>-</sup> B220 <sup>+</sup> CD43 <sup>-</sup><br>IgD <sup>low</sup> IgM <sup>+</sup> B220 <sup>+</sup> CD43 <sup>-</sup><br>IgD <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup> B220 <sup>+</sup> CD43 <sup>-</sup> |
| B-Zellen (Milz) **<br>Unreife ( <i>immature</i> ) B-Zellen<br>Marginalzonen ( <i>marginal zone</i> )-B-Zellen<br>Follikuläre ( <i>follicular</i> ) B-Zellen   | CD19 <sup>+</sup><br>CD19 <sup>+</sup> CD21 <sup>-</sup> CD23 <sup>-</sup><br>CD19 <sup>+</sup> CD21 <sup>high</sup> CD23 <sup>-</sup><br>CD19 <sup>+</sup> CD21 <sup>low</sup> CD23 <sup>+</sup>  |
| CLP1  | Lin <sup>-</sup> FLT3 <sup>+</sup> CD127 <sup>+</sup>  |

|                              |                    |
|------------------------------|--------------------|
| CLP2                         | Lin- FLT3- CD127+  |
| LSK                          | Lin- c-Kit+ Sca-1+ |
| Granulozyten                 | Gr1+ CD11b+        |
| Monozyten                    | Gr1- CD11b+        |
| NK-Zellen                    | NK1.1+             |
| NKT-Zellen                   | NK1.1+ TCRβ+       |
| Erythropoide Vorläuferzellen | Ter119+ CD45-      |

\* Im Knochenmark (\*) werden B-Zellen in die Fraktionen A-F nach Hardy<sup>88</sup> unterteilt. Ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen durchschreiten B-Zellen einen von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen abhängigen Reifungsprozess, in dessen Verlauf verschiedene Oberflächenmoleküle exprimiert werden. Dadurch können die Zellen hierarchischen Reifungsstadien zugeordnet werden. Initial gehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (LSK-Zellen) sogenannte CLP-Zellen (common lymphoid progenitor cells) hervor, die sich zu Prä-Pro-B-Zellen (entsprechend Stadium A nach Hardy) differenzieren, bevor nach mindestens fünf weiteren Differenzierungsschritten reife B-Zellen (entsprechend Stadium F nach Hardy) entstehen.

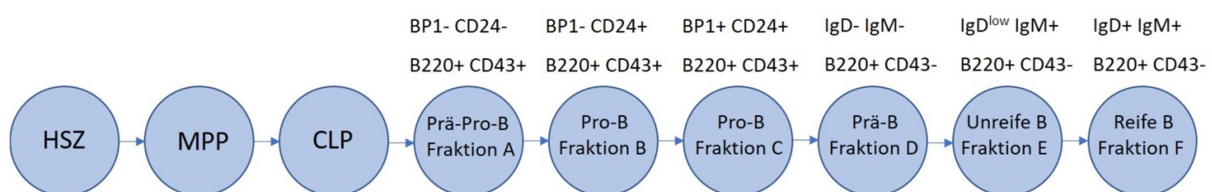


Abb. 2.1: **Reifungsstadien der B-Zellen ausgehend von Hämatopoetischen Stammzellen.** Im Reifungsprozess der B-Zellen, ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle bis hin zur reifen Zelle, werden verschiedene Stadien durchlaufen, die jeweils mit einer charakteristischen Expression von Oberflächenantigenen einhergehen und sich entsprechend immunphänotypisch erfassen lassen. Modifiziert nach Ludenberg (2012).<sup>89</sup>

\*\* In der Milz (\*\*) werden drei Anteile der B-Zell-Population unterschieden. Unreife B-Zellen aus dem Knochenmark können sich in der Milz zu Marginalzonen-B-Zellen oder folliculären B-Zellen differenzieren.

## 2.4. Quantifizierung von Zytokinen mittels quantitativer Real-time PCR

Die Expression verschiedener immunmodulierender Zytokine in Dün- und Dickdarm wird durch Quantifizierung der entsprechenden mRNA bestimmt. Dazu wird RNA aus Dün- und Dickdärmen der Versuchstiere gewonnen, in cDNA transkribiert und mit Hilfe des Real-time PCR-Verfahrens quantifiziert.

### 2.4.1. Isolierung von RNA aus Darmgewebe

Zur RNA-Isolation aus Dün- und Dickdarm wird das RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Alle benötigten Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien sind in dem Kit enthalten.

Maximal 250mg einer Gewebeprobe werden in einem Tube mit 20µl RLT-Puffer pro 1mg Gewebe versetzt und mit Hilfe des GentleMACS (Programm: RNA\_1.01) geschreddert. Nach einminütiger Zentrifugation werden 350µl des Überstands auf ein Shredder-Tube gegeben und zentrifugiert (5min, 10000rpm). Das Zentrifugat wird mit 350µl einer 70%-Ethanollösung bei Raumtemperatur vermenget. Das gesamte Volumen wird auf eine Mini Kit Säule plus RNeasy-Tube pipettiert und zentrifugiert (10s, 3500rpm; danach 15s, 10000rpm); der Unterstand wird verworfen. Die Säule wird auf ein neues Tube gegeben, mit 350µl RW1-Puffer versetzt und erneut zentrifugiert (15s, 10000rpm). Auf die Säule werden anschließend 80µl DNase-Mix gegeben. Nach halbstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wird zunächst mit 350µl RW1-Puffer gewaschen (15s, 10000rpm), anschließend mit 500µl RPE-Puffer (15s, 10000rpm), schließlich nochmals mit 500µl RPE-Puffer (2min, 10000rpm). Nach einer Trockenzentrifugation (1min, 10000rpm) werden 40µl RNase-freies H<sub>2</sub>O auf das Tube gegeben, dieses verschlossen und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei einem weiteren Zentrifugationsschritt (1min, 10000rpm) wird das Eluat in einem RNase-freien Cup aufgefangen und sofort eisgekühlt. Hierin befindet sich die RNA, gelöst in 40µl RNase-freiem Wasser.

### 2.4.2. Bestimmung von Konzentration und Reinheit isolierter RNA

Konzentration und Reinheit der RNA-Proben werden photometrisch mit Hilfe des NanoDrop Spectrophotometers bestimmt.

Von jeder RNA-Probe wird 1µl entnommen und auf das geeichte Spectrophotometer gegeben. Sämtliche RNAs absorbieren im Wellenlängenbereich 260nm. Proteine, Phenole und weitere

kontaminierende Stoffe besitzen Absorptionsmaxima im Wellenlängenbereich von 230nm bzw. 280nm. Anhand der Bestimmung der maximalen Absorption bei verschiedenen Wellenlängen und Bildung der 260/280- bzw. 260/230-Ratio kann die Reinheit einer RNA-Probe bestimmt werden. Als rein gelten Proben mit Werten der 260/280- bzw. 260/230-Ratio von etwa 2,0.

Gleichzeitig kann photometrisch anhand der optischen Dichte einer Probe deren RNA-Konzentration (ng/µl) bestimmt werden.

#### 2.4.3. Überprüfung der Integrität isolierter RNA mittels Gelelektrophorese

Anhand des Bandenmusters in der Gelelektrophorese kann die strukturelle Integrität von RNA beurteilt werden.

Zur Herstellung des Gelbetts (1%iges Agarosegel) werden in einem Erlenmeyerkolben Agarose (0,5g), DEPC-H<sub>2</sub>O (38ml) und 20x-MOPS-Puffer (2,5ml) vereinigt und in einer Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlung des Gemischs auf 60°C unter stetigem Rühren werden 8,8ml Formaldehyd hinzugefügt. Bei Erreichen einer Temperatur von 50°C wird die Flüssigkeit in einen mit Kämmen und Begrenzern versehenen Gelbettrahmen gegossen. Nach Erstarren des Gels wird dieses mit 1x MOPS-Puffer geflutet und danach die Kämmen entfernt.

Jeder RNA-Probe werden absolut 500ng RNA entnommen, mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 2µl Zielvolumen aufgefüllt und bei 37°C für 30min inkubiert. Anschließend wird die Suspension mit 4µl Ethidiumbromid-Probenpuffer pro 1µl RNA-Probe versetzt, kurz abzentrifugiert und 20min bei 65°C inkubiert. Die Probe wird anschließend in eine Tasche des flüssigkeitsbedeckten Gelbetts pipettiert und bei 76V Gleichspannung elektrisch separiert. Das im Gelbett entstandene Bandenmuster wird mit Hilfe des *Typhoon 9400* Fluoreszenzscanners visualisiert und überprüft.

#### 2.4.4. Transkription von RNA in cDNA

Die Transkription von RNA zu cDNA wird mit dem M-MLV Reverse Transcriptase Set von Promega (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Bei der *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) handelt es sich um eine RNA-abhängige DNase. Alle Puffer sind im Set von Promega enthalten, die benötigten Nukleotide und Primer werden separat gekauft.

Jeweils 1000ng RNA werden in ein RNA-freies Mini-Cup überführt und mit RNA-freiem H<sub>2</sub>O zu einem Zielvolumen von 12,5µl aufgefüllt.

Zwei Puffergemische werden zur Vorbereitung der Transkription hergestellt:

- MasterMix I
  - o Random Hexamere (Random Primers): 1µl / RNA-Probe
  - o dNTPS (PCR Nucleotid Mix): 1µl / RNA-Probe
- MasterMix II
  - o M-MLV (5x)-Buffer: 4µl / RNA-Probe
  - o RNasin: 0,5µl / RNA-Probe

Nach Zugabe von jeweils 2µl MasterMix I werden die RNA-Proben zentrifugiert, inkubiert (5min, 65°C im Heizblock) und anschließend 1-2min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von jeweils 4,5µl MasterMix II werden die Proben 2min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor jeweils 1µl der M-MLV RT zugefügt wird. Die Proben werden gut gemischt, kurz abzentrifugiert und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend findet im Thermocycler die cDNA-Synthese statt (50min bei 42°C, 15min bei 70°C). Nach Abschluss der Transkription werden die Proben zur Lagerung umgehend bei -20°C tiefgekühlt.

#### 2.4.5. cDNA-Quantifizierung mittels Real-time PCR

Die Real-time PCR (RT-PCR) ermöglicht es, die Quantifizierung von cDNA in Echtzeit zu verfolgen. Die Polymerasekettenreaktion verläuft in Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green. Der Farbstoff fluoresziert nach Bindung an doppelsträngige DNA um Faktor 1000 stärker als in ungebundener Form. Die photometrische Signalintensität verhält sich proportional zur Menge vorhandener DNA und wird fortlaufend bestimmt.

Je nach verwendeten Primern lässt sich die cDNA (und damit die ursprünglich im Gewebe vorhandene mRNA) verschiedener Zytokine quantifizieren. Die erhaltenen Werte werden jeweils in Relation zum Wert eines Haushaltsgens (*housekeeping gene*) (z.B. aus dem zellulären Grundstoffwechsel) gesetzt, das konstitutiv exprimiert wird. In Dünndarm und Dickdarm neben IL-6, IL-10, IL-17, IL-22, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , CCL2 und MIP2 auch der Transkriptionsfaktor FoxP3 quantifiziert, im Dünndarm zusätzlich Reg3 $\gamma$ . Haushaltsgen ist jeweils HPRT.

Je 1000ng der Proben und der je nach zu untersuchendem Gen unterschiedlichen Standards werden zunächst mit RNase-free H<sub>2</sub>O 1:6 verdünnt und die Standards zusätzlich noch in einer



1:10-Verdünnungsreihe als Referenz weiterverdünnt. Für jedes Primerpaar werden so Werte und gleichzeitig mittels dem *housekeeping gene* HPRT Referenzwerte ermittelt. In einer 96-Well-Platte werden in jedem Well 8µl MasterMix, bestehend aus 5µl SYBR Green, 2µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O und 0,5µl je Primer (forward + reverse) vorgelegt und mit jeweils 2µl der cDNA-Proben (experimentell bzw. Stanrard) beimpft. Die Wells werden mit einer Folie verschweißt, bevor die Amplifikation im Thermocycler beginnt.

Sämtliche Primer stammen von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland), der SYBR Green Farbstoff von Agilent (Waldbronn, Deutschland). Die nachfolgende Tabelle zeigt die für die qRT-PCR verwendeten Primer (F: forward; R: reverse). Die Oligonukleotidsequenzen werden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe mithilfe der frei verfügbaren Software „Primer3“ erstellt (S), der Literatur (L) entnommen oder freundlicherweise von Prof. James Ferrara (JF) (Hess Center for Science and Medicine, New York, USA) zur Verfügung gestellt. Die Schmelztemperatur der Primer sollte optimalerweise bei 60°C liegen.

| Zielstruktur   | Quelle          | Primer-Sequenz (5' → 3')   |
|----------------|-----------------|----------------------------|
| <b>FoxP3 F</b> | S               | CCCATCCCCAGGAGTCTTGC       |
| <b>FoxP3 R</b> | S               | ACCATGACTAGGGGCACTGTA      |
| <b>CCL2 F</b>  | L <sup>90</sup> | GCCTGCTGTTCACAGTTGCC       |
| <b>CCL2 R</b>  | L <sup>90</sup> | AGCCTACTCATTGGGATCATCTTGCT |
| <b>IL-10 F</b> | L <sup>91</sup> | GGTTGCCAAGCCTTATCGGA       |
| <b>IL-10 R</b> | L <sup>91</sup> | ACCTGCTCCACTGCCTTGCT       |
| <b>IL-6 F</b>  | S               | GAGGATAACCACTCCCAACAGACC   |
| <b>IL-6 R</b>  | S               | AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA  |
| <b>IL-17 F</b> | JF              | GCTCCAGAAGGCCCTCAGA        |
| <b>IL-17 R</b> | JF              | AGCTTCCCTCCGCATTGA         |
| <b>IL-22 F</b> | JF              | GCTGGACTCCCTTGTGTGT        |
| <b>IL-22 R</b> | JF              | CACATGGCCTCAGTCTCAA        |
| <b>IFN-γ F</b> | L <sup>92</sup> | TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA   |
| <b>IFN-γ R</b> | L <sup>92</sup> | TGGCTCTGCAGGATTTTCATG      |
| <b>MIP-2 F</b> | S               | GGCTGTTGTGGCCAGTGAA        |
| <b>MIP-2 R</b> | S               | GCTTCAGGGTCAAGGCAAAC       |
| <b>Reg3γ F</b> | JF              | ATGGCTCCTATTGCTATGCC       |

|                |                 |                          |
|----------------|-----------------|--------------------------|
| <b>Reg3γ R</b> | JF              | GATGTCCTGAGGGCCTGTT      |
| <b>TNF F</b>   | L <sup>93</sup> | CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA |
| <b>TNF R</b>   | L <sup>93</sup> | TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC  |

## 2.5. Statistik

Die dargestellten Ergebnisse werden jeweils als Mittelwerte plus/minus Standardfehler (SEM) angegeben. Die Überprüfung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen jeweils zwei Kohorten erfolgt mittels unabhängigem, ungepaartem Student's t-test. Ab einem Signifikanzwert von  $p < 0,05$  werden die Ergebnisse als statistisch signifikant unterschiedlich gewertet. Die statistischen Berechnungen werden mit GraphPad Prism 6 (vgl. 2.6.) durchgeführt.

## 2.6. Software

Die Aufnahme der durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgte mit der BD FACS DIVA Software (BD, Heidelberg). Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde das Programm FlowJo (Tree Star Inc., Ashland) verwendet. Die abgebildeten Graphen wurden mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1. Eliminierung reif transplantiertes, donorstämmiger Treg nach allogener und syngener HSZT

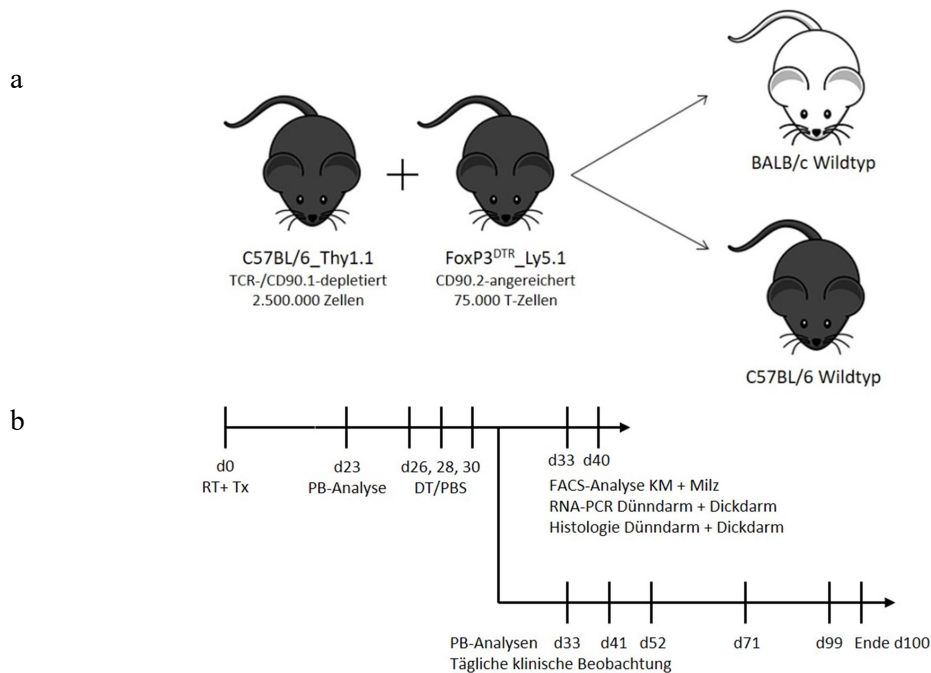


Abb. 3.1: **Schema der Transplantation und Skizzierung des Versuchsablaufs.** a) BALB/c-WT- und C57BL/6-WT-Mäusen wurden gemischte Knochenmarkstransplantate, bestehend aus 1. T-Zell-depletiertem KM (C57BL/6\_Thy1.1, je  $2,5 \times 10^6$  Zellen) und 2. T-Zell-angereichertem KM (FoxP3DTR\_Ly5.1, je  $75 \times 10^3$  T-Zellen plus zellulärem Umfeld (vgl. Tab. 3.1.)), verabreicht. b) An d0 wurden die Empfängertiere letal bestrahlt und transplantiert. Anhand der d23-Analyse des peripheren Bluts (PB) wurden die Mäuse vergleichbaren Gruppen (DT/PBS) zugeordnet. Nach DT-/PBS-Injektionen wurden die Versuchstiere entweder an d7 und d14 nach Intervention analysiert oder bis d100 beobachtet und regelmäßigen PB-Analysen unterzogen.

Ziel der Arbeit ist es, zu untersuchen, ob die selektive Depletion kotransplantiertes, reifer Treg nach allogener HSZT im murinen Modell durch fehlende Suppression alloreaktiver Tconv eine GvHD induziert. Als Kontrollen werden autologe Transplantationen durchgeführt, um Alloreaktivität von Autoimmunphänomenen unterscheiden zu können. Im Rahmen des Versuchsaufbaus werden nur die reifen Treg-Zellen des ursprünglichen Knochenmarkstransplantats eliminiert, während die nach HSZT aus Stammzellen regenerierte Treg-Population oder residuelle rezipientenstämmige Treg nicht manipuliert werden. Hierfür werden allogene und syngene Knochenmarkstransplantationen im murinen Modell vorgenommen, anschließend in den Empfängern nach Engraftment gezielt die Population kotransplantiertes, donorstämmiger Treg interventionell ausgeschaltet und im Verlauf die Tiere auf die Entstehung von GvHD bzw. immunologischer Dysregulation hin untersucht. Die

Untersuchungen umfassen eine klinische Langzeitbeobachtung der Versuchsmäuse, durchflusszytometrische Analysen des peripheren Bluts über 100 Tage sowie durchflusszytometrische Analysen von Knochenmark und Milz hinsichtlich GvHD-typischer Veränderungen 7 und 14 Tage nach Treg-Eliminierung, zudem eine Erhebung der inflammatorischen Aktivität in Dünn- und Dickdarm mittels Quantifizierung pro- und antiinflammatorischer Zytokine und histopathologischer Beurteilung von Darmpräparaten (vgl. Abb. 3.1).

### 3.1.1. Erzeugung des Transplantats, Transplantation und Treg-Eliminierung

Um die isolierte Ausschaltung reif transplantiertes, donorstämmiger Treg des Transplantats zu ermöglichen, wurde ein gemischtes Transplantat aus zwei kongenen Mausstämmen erzeugt: T-Zell-depletiertes Knochenmark aus C57BL/6\_Thy1.1-Mäusen (CD45.2, CD90.1; „BM“) wurde hierbei mit Knochenmark-T-Zellen aus FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Mäusen (CD45.1, CD90.2; „DTR“) versetzt (vgl. Abb. 3.1 und 3.2). Die Treg-Zellen der FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Mäuse (DTR-Treg) tragen Oberflächenrezeptoren für Diphtherie-Toxin (DT); repetitive DT-Gaben führen zu einer Lyse dieser FoxP3<sup>+</sup> DTR-Treg-Zellen. DTR-Treg, die als bereits ausdifferenzierte Spender-Treg transplantiert wurden, stellten in dem gewählten Versuchsaufbau die einzige Treg-Population dar, die depletiert wird, während konventionelle T-Zellen des Knochenmarks kein DTR exprimieren und überleben. Treg, die sich im Versuchsverlauf aus Stammzellen des Knochenmarks entwickeln (BM-Treg) oder residuelle Empfänger-Treg (Host-Treg) durchlaufen die Selektionsprozesse der zentralen Toleranz und besitzen deshalb keine Reaktivität gegen den Empfänger. Rezipienten des gemischten Transplantats waren im allogenen Modell BALB/c\_Wildtyp (WT)-Mäuse (CD45.2, CD90.2, „Host“), im syngenen Modell C57BL/6\_WT-Mäuse (CD45.2, CD90.2, „Host“). Am Tag der HSZT wurden die Empfängertiere zur Konditionierung letal bestrahlt. In den anschließenden Untersuchungen ermöglichten die je nach Inzuchtstamm unterschiedlichen kongenen Marker eine Unterscheidung der T-Zellen nach ihrer Herkunft; dabei wird CD90 nur auf Thymozyten und T-Zellen exprimiert, CD45 dagegen auf sämtlichen Leukozyten. Von FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Mäusen abstammende Zellen werden nachfolgend als „DTR“ bezeichnet, C57BL/6\_Thy1.1-stämmige als „BM“ (bone marrow); Zellen, die auf die jeweiligen Wildtyp-Empfängertiere zurückgehen, als „Host“.

Von insgesamt vier Versuchsansätzen dienten einer der klinischen Langzeitbeobachtung der Mäuse und drei der durchflusszytometrischen Analyse der Mäuse an Tag 26 nach KMT –

unmittelbar vor Eliminierung der DTR-Treg – sowie an Tag 33 und Tag 40 nach KMT bzw. Tag 7 und Tag 14 nach erster DT- bzw. PBS-Gabe. Die jeweilige zelluläre Zusammensetzung der aus C57BL/6\_Thy1.1-Mäusen und FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Mäusen stammenden Transplantatanteile ist in Tab. 3.1. abgebildet. Das zusammengesetzte Transplantat wurde so vermengt, dass der finale T-Zell-Gehalt bei jeweils 3% lag. Entsprechend erhielt jedes Empfängertier 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen des T-Zell-depletierten C57BL/6-Thy1.1-Knochenmarks sowie 75 x 10<sup>3</sup> T-Zellen als Bestandteil des T-Zell-angereicherten FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Knochenmarks.

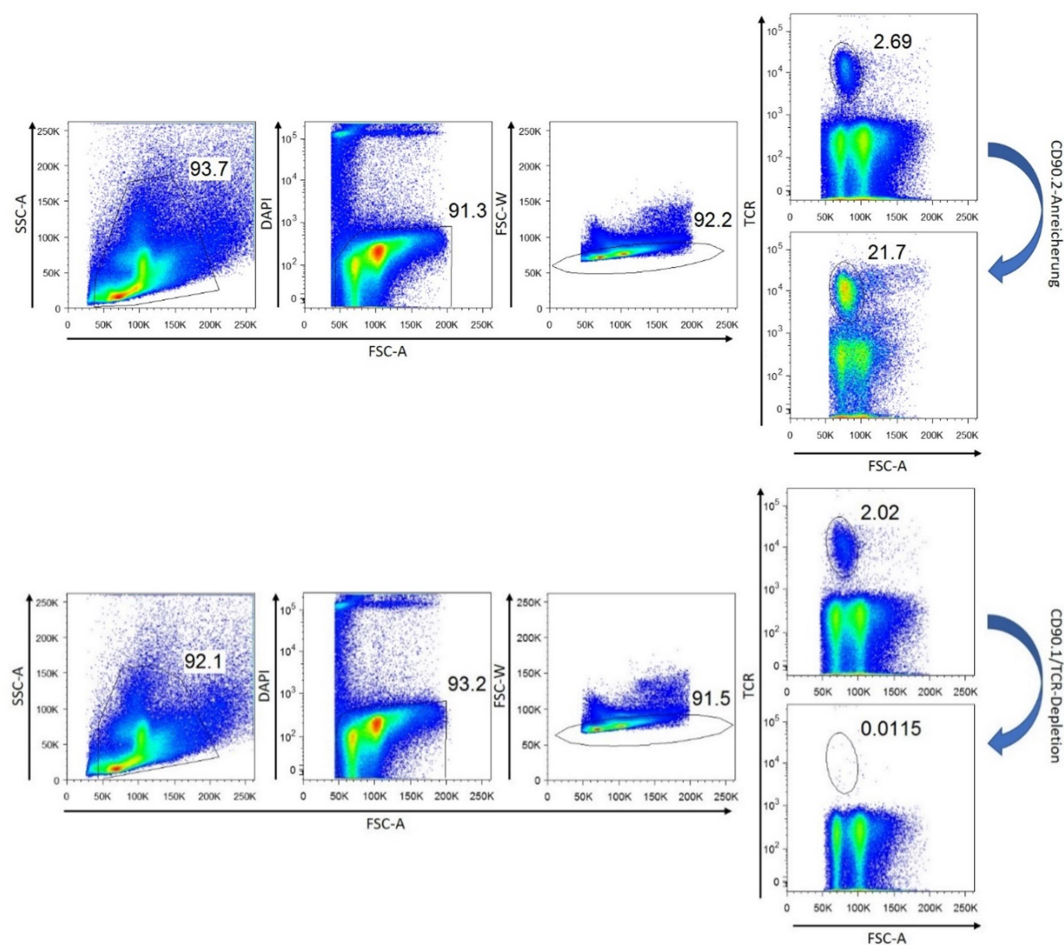


Abb. 3.2: FACS-Reanalysen der MACS-basierten CD90.2-Anreicherung (oben) und FACS-basierten TCR/CD90.1-Depletion (unten). Gezeigt sind die durchflusszytometrisch erfassten T-Zellfrequenzen unter lebenden MNC (definiert über FSc/SSc Eigenschaften (1. Plot) nach Ausschluss toter Zellen (DAPI+; 2. Plot) und Ausschluss von Doubletten (3. Plot)). Der FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Anteil des Transplantats wurde mittels MACS CD90.2-angereichert, der C57BL/6\_Thy1.1.-Anteil des Transplantats mittels FACS T-Zell-depletiert. Die T-Zell-Depletion sollte gewährleisten, dass im Transplantat möglichst ausschließlich ausschaltbare, reife Treg aus FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Mäusen enthalten sind. Die CD90.2+ Anreicherung im FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Transplantatanteil diente dazu, den FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Anteil von Nicht-T-Zellen im gemischten Transplantat zu minimieren.

| Zelllinie    | C57BL/6_Thy1.1 KM | FoxP3 <sup>DTR</sup> _Ly5.1 KM |
|--------------|-------------------|--------------------------------|
| T-Zellen     | <0,03 %           | 25,8 ± 5,0 %                   |
| B-Zellen     | 28,8 ± 3,6 %      | 21,0 ± 3,1 %                   |
| NK-Zellen    | 0,7 ± 0,1 %       | 10,0 ± 2,7 %                   |
| Granulozyten | 35,6 ± 2,6 %      | 6,0 ± 1,8 %                    |
| Monozyten    | 13,4 ± 1,3 %      | 7,0 ± 2,1 %                    |

Tab. 3.1: **Zelluläre Zusammensetzung der Transplantatbestandteile.** Gezeigt werden die im Rahmen durchflusszytometrischer Reanalysen erhobenen Frequenzen verschiedener Zellreihen in beiden gewonnenen Transplantatanteilen vor Vermengung. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± SEM aus allen vier Versuchsansätzen. Die Transplantate wurden jeweils auf eine T-Zell-Frequenz von 3% eingestellt.

### 3.1.2. Zelluläre Zusammensetzung von KM und Milz der Empfängertiere vor Treg-Depletion an Tag 26

In den ersten Wochen nach HSZT zeigten sämtliche Tiere klinisch einen im Wesentlichen unauffälligen Verlauf (vgl. 3.2.). An Tag 26, unmittelbar vor der ersten DT- bzw. PBS-Gabe, wurden Knochenmark und Milz von BALB/c- und C57BL/6-Empfängermäusen durchflusszytometrisch analysiert, um die zelluläre Zusammensetzung der Kompartimente als präinterventionellen Referenzpunkt zu erfassen.

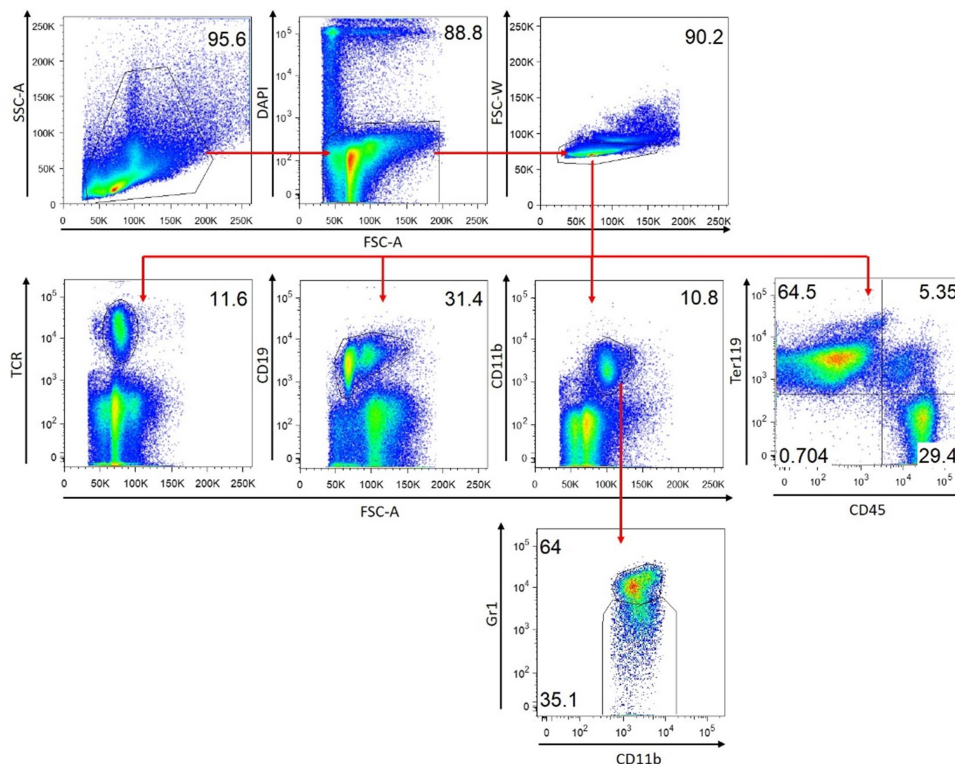


Abb. 3.3: **Durchflusszytometrische Erfassung von T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten, Monozyten und erythropoiden Vorläuferzellen.** Exemplarisch dargestellt ist die Gating-Strategie für Milzzellen am Beispiel einer syngen transplantierten Maus an d26. Gezeigt sind prozentuale Anteile von T-Zellen (TCR $\beta^+$ ), B-Zellen (CD19 $^+$ ), Granulozyten (CD11b $^+$ Gr1 $^+$ ), Monozyten (CD11b $^+$ Gr1 $^+$ ), erythropoiden Vorläuferzellen (Ter119 $^+$ CD45 $^-$ ) und Leukozyten (Ter119 $^-$ CD45 $^+$ ) unter lebenden MNC (definiert über FSC/SSc Eigenschaften (1. Plot) nach Ausschluss toter Zellen (DAPI $^+$ ; 2. Plot) und Ausschluss von Doubletten (3. Plot)).

Verschiedene Aspekte deuteten auf ein langsames Transplantatanwachsen im allogenen HSZT-Modell im Vergleich zum syngenem HSZT-Modell hin. Die Gesamtzellzahlen von Knochenmark und Milz der transplantierten BALB/c- und C57BL/6-Mäuse unterschieden sich an d26 deutlich voneinander (vgl. Abb. 3.4). Während aus transplantierten BALB/c-Mäusen nur  $9,7 \pm 0,8 \times 10^6$  Knochenmarkszellen und  $41,3 \pm 10,5 \times 10^6$  Milzzellen isoliert werden konnten, waren es bei transplantierten C57BL/6-Mäusen  $28,4 \pm 2,4 \times 10^6$  Knochenmarkszellen und  $68,1 \pm 9,5 \times 10^6$  Milzzellen. Transplantierte BALB/c-Mäuse besaßen im Knochenmark und insbesondere in der Milz ein großes Maß an erythropoiden Vorläuferzellen: während der Anteil dieser Population im allogenen HSZT-Modell im Mittel 30% im KM und 55% in der Milz betrug, lag er im syngenem HSZT-Modell bei durchschnittlich 15% im KM und 30% in der Milz. Nicht-transplantierte (naive) BALB/c- bzw. C57BL/6-Mäuse besaßen dagegen kaum erythropoide Vorläuferzellen in der Milz (vgl. Abb. 3.13).

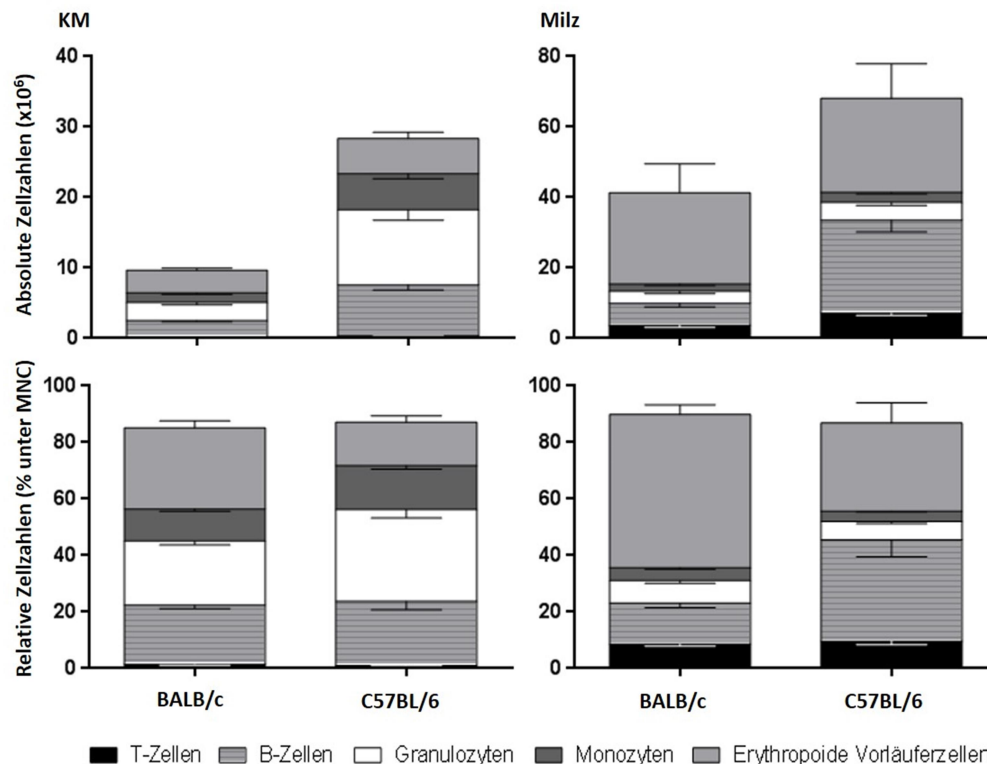


Abb. 3.4: **Absolute Zellzahlen und relative zelluläre Zusammensetzung von Knochenmark und Milz in Empfängertieren an d26 nach HSZT.** KM- und Milzzellen von BALB/c- und C57BL/6-Empfängertieren wurden an d26 nach HSZT durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die absoluten Zellzahlen sowie die relative zelluläre Zusammensetzung beider Kompartimente mit Darstellung von T-Zellen (TCR $\beta$ +), B-Zellen (CD19+), Granulozyten (CD11b+Gr1+), Monozyten (CD11b+Gr1-) und erythropoiden Vorläuferzellen (Ter119<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>). Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SEM von n=4(BALB/c) bzw. n=5(C57BL/6) Einzeltieren/Kohorte.

Allogenes und syngenes HSZT-Modell unterschieden sich auffallend im Chimerismus von Spender- und Empfängerhämatopoese. Während sich in BALB/c-Empfängertieren an d26 nach KMT neben BM- und DTR-stämmigen – d.h. transplantatstämmigen – T-Zellen im

Wesentlichen keine Host-stämmigen T-Zellen fanden, konnten bei C57BL/6-Empfängertieren noch große Anteile Host-stämmiger T-Zellen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf (vgl. Abschnitt 3.2) nahm deren Anteil zwar stetig ab, an d26 jedoch stellten Host-stämmige T-Zellen die größte Subpopulation unter CD4<sup>+</sup> Tconv und Treg dar (vgl. Abb. 3.6). Für andere Zellpopulationen konnte aufgrund der zur Verfügung stehenden Marker keine Differenzierung nach Abstammung erfolgen.

Die Gesamt-T-Zell-Frequenz in Knochenmark und Milz erwies sich jeweils als vergleichbar zwischen transplantierten BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. Im Knochenmark stellten T-Zellen bei BALB/c-Empfängertieren 1,4±0,2% aller Zellen dar, bei C57BL/6-Empfängertieren 1,0±0,1% aller Zellen; in der Milz lag der T-Zell-Gehalt bei ersteren bei 8,6±0,6%, bei letzteren bei 9,7±1,3% aller Zellen (vgl. Abb. 3.4). Damit unterschieden sich beide HSZT-Modelle deutlich von entsprechenden, nicht-transplantierten Tieren: bei nicht-transplantierten BALB/c-Mäusen stellten T-Zellen ca. 40% aller Splenozyten dar, bei nicht-transplantierten C57BL/6-Mäusen ca. 30% (Daten nicht gezeigt).

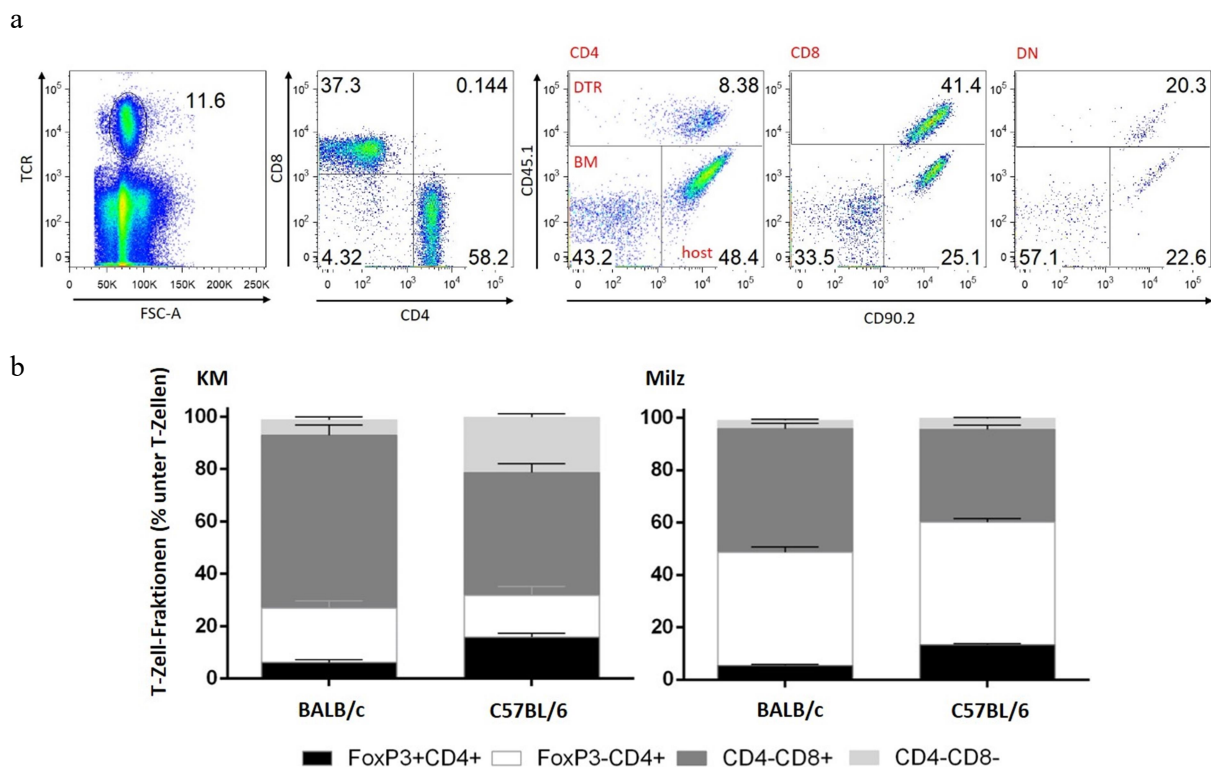


Abb. 3.5: Relative Zusammensetzung der T-Zell-Kompartimente von Knochenmark und Milz in Empfängertieren an d26 nach HSZT. KM- und Milzzellen von BALB/c- und C57BL/6-Empfängertieren wurden an d26 nach HSZT durchflusszytometrisch analysiert. a) Exemplarisch dargestellt sind die durchflusszytometrische Gatingstrategie von T-Zell-Subpopulationen und die Analyse der Abstammung der Zellen (DTR, BM, Host) je nach Expression der kongenen CD45/CD90-Marker am Beispiel der Milz eines syngenen Empfängertiers. b) Dargestellt ist die relative Zusammensetzung der T-Zell-Kompartimente von Knochenmark und Milz mit Unterteilung in CD4<sup>+</sup>Treg (FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>Tconv (FoxP3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup>Tconv (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) und DN-T-Zellen (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Die Daten zeigen Mittelwerte±SEM von n(BALB/c) = 4 bzw. n(C57BL/6) = 5 Einzeltieren/Kohorte.



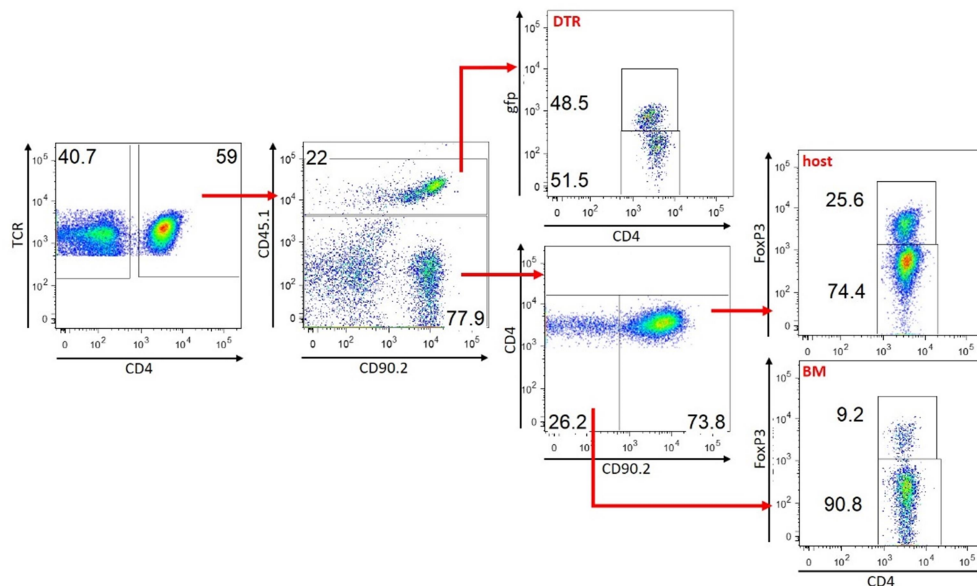
Im Knochenmark der Empfängertiere dominierte innerhalb der T-Zell-Population die Subpopulation der CD4<sup>-</sup> T-Zellen mit einem Anteil von 72% aller T-Zellen bei transplantierten BALB/c-Mäusen und 68% aller T-Zellen bei transplantierten C57BL/6-Mäusen, wobei sich allo- und syngenes HSZT-Modell in den jeweiligen Anteilen von CD8<sup>+</sup> Tconv und DN-T-Zellen leicht unterschieden (vgl. Abb. 3.5). In der Milz lag der Anteil von CD4<sup>-</sup> T-Zellen in BALB/c-Empfängertieren bei 50%, in C57BL/6-Empfängertieren bei 40%. Im syngenen HSZT-Modell waren sowohl in der Milz als auch im Knochenmark CD4<sup>-</sup> T-Zellen zu etwa gleichen Teilen DTR-, BM- bzw. Host-stämmig; im allogenen HSZT-Modell fanden sich dagegen jeweils keine Host-stämmigen CD4<sup>-</sup> T-Zellen mehr, sodass im Mittel im Knochenmark jener Mäuse 80% der CD4<sup>-</sup> T-Zellen DTR-stämmig und 20% BM-stämmig waren, in der Milz 50% der CD4<sup>-</sup> T-Zellen DTR-stämmig und 50% BM-stämmig (Daten nicht gezeigt).

Der relative Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter allen T-Zellen war bei allo- und syngenen Empfängertieren in Knochenmark und Milz ebenfalls jeweils vergleichbar (vgl. Abb. 3.5).

Differenzen zwischen dem allogenen und syngenen HSZT-Modell ergaben sich jedoch hinsichtlich der Anteile von CD4<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup> Tconv innerhalb der Fraktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Durch residuelle, Host-stämmige Treg erwies sich die Treg-Frequenz in Knochenmark und Milz syngen transplantierte C57BL/6-Mäuse an Tag 26 (KM: 16%, Milz: 13%) als höher im Vergleich zu allogenen transplantierten BALB/c-Mäusen (KM und Milz je 6%). Die Anteile transplantatstämmiger Treg – mit BM- oder DTR-Hintergrund – waren in beiden Mausmodellen dagegen ähnlich (vgl. Abb. 3.6).

Dem geringeren Treg-Anteil entsprechend besaßen allogenen transplantierte BALB/c-Mäuse im Knochenmark einen leicht höheren Anteil an CD4<sup>+</sup> Tconv als syngenen transplantierte C57BL/6-Mäuse (21% versus 16% unter allen T-Zellen). In der Milz präsentierten sich die CD4<sup>+</sup> Tconv-Frequenzen zwischen beiden Mausmodellen (BALB/c: 43%; C57BL/6: 47%) als vergleichbar, wenngleich im syngenen HSZT-Modell im Unterschied zum allogenen HSZT-Modell Host-stämmige CD4<sup>+</sup> Tconv in beiden Kompartimenten den größten Teil dieser Subpopulation ausmachten (vgl. Abb. 3.6).

a



b

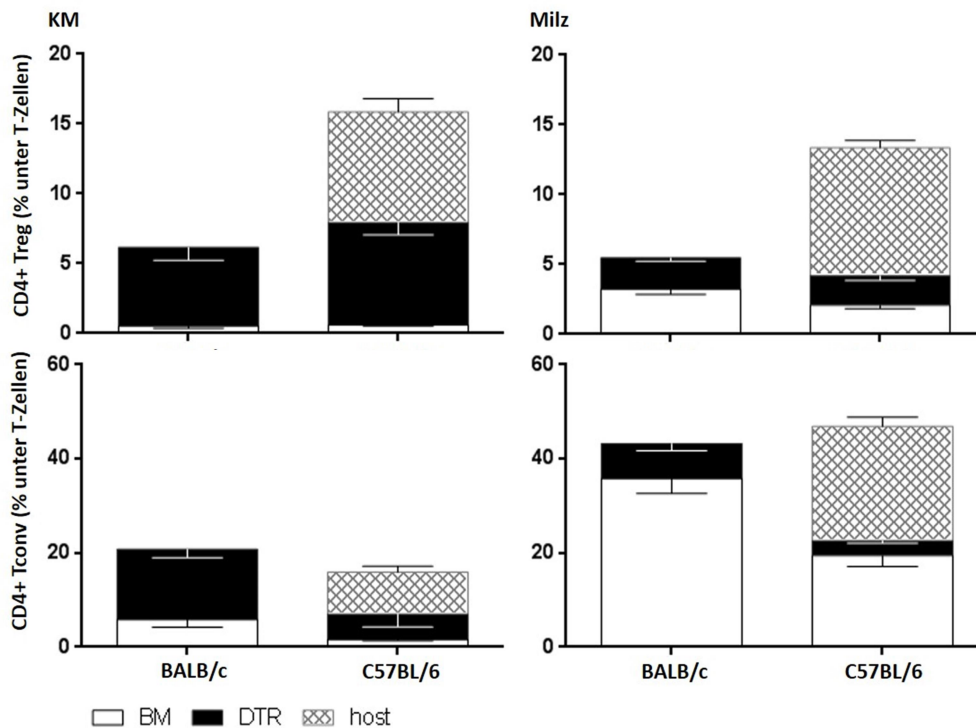
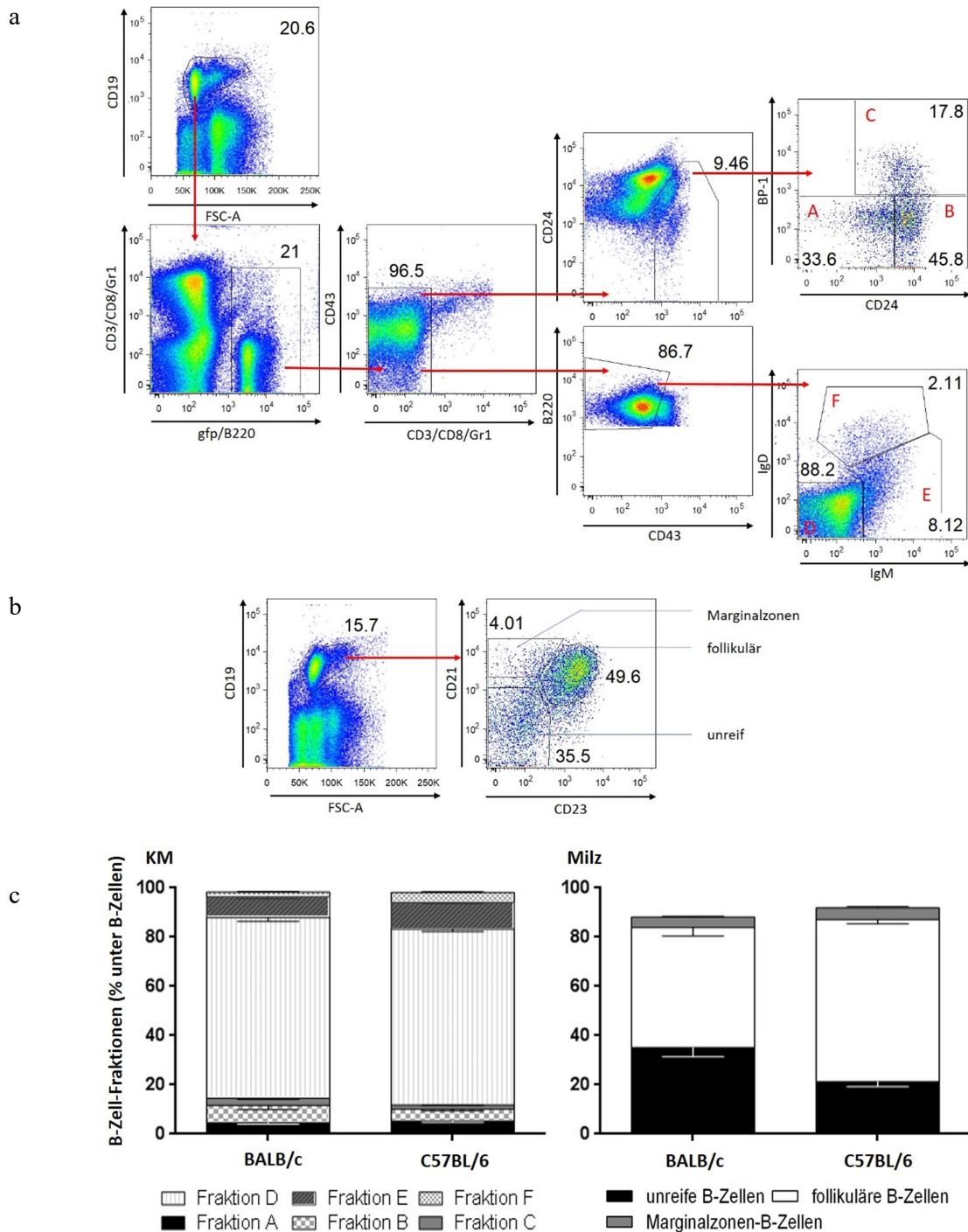


Abb. 3.6: **Durchflusszytometrische Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Empfängertieren an Tag 26 nach HSZT.** KM- und Milzzellen von BALB/c- und C57BL/6-Empfängertieren wurden an d26 nach HSZT durchflusszytometrisch analysiert. a) Exemplarisch dargestellt sind die durchflusszytometrische Identifizierung von CD4<sup>+</sup> Treg und Tconv sowie die Analyse der Abstammung der Zellen (DTR, BM, Host) je nach Expression der kongenen CD45/CD90-Marker am Beispiel der Milz eines syngen Empfängertiers. b) Gezeigt sind jeweils die prozentualen Anteile von CD4<sup>+</sup> Treg und CD4<sup>+</sup> Tconv an der Gesamtheit TCRβ<sup>+</sup> Zellen in Knochenmark und Milz der Empfängertiere mit graphischer Darstellung der Herkunft der Zellen (DTR, BM, Host). Die Daten stellen Mittelwerte±SEM von n(BALB/c) = 4 bzw. n(C57BL/6) = 5 Einzeltieren/Kohorte dar.

Die B-Zell-Frequenz unter MNC war im Knochenmark allogenen transplantierte BALB/c-Mäuse mit 21,0±1,1% und syngen transplantierte C57BL/6-Mäuse mit 22,8±3,0% vergleichbar (vgl. Abb. 3.4). Die Detailanalyse der medullären B-Zell-Populationen

hinsichtlich Vorkommen und Verteilung der einzelnen Reifungsstadien (Fraktionen nach Hardy et al.<sup>88</sup>) ergab ebenfalls eine vergleichbare Zusammensetzung zwischen beiden HSZT-Modellen. In den Frühstadien A, B und C (Prä-Pro- und Pro-B-Zellen) befanden sich jeweils zwischen 2% und 5% aller heranreifenden B-Zellen im Knochenmark, im Stadium D (Prä-B-Zellen) 70%, im Stadium E (unreife B-Zellen) 10% und im Stadium F (reife, rezirkulierende B-Zellen) wiederum 5% der Zellen (vgl. Abb. 3.7c). Die Verteilung der Reifungsstadien glich damit jener in nicht-transplantierten Tieren (vgl. Abb. 3.23).

In der Milz fand sich an Tag 26 nach HSZT bei allogenen transplantierten BALB/c-Mäusen – vornehmlich aufgrund des großen Anteils erythropoider Vorläuferzellen – ein mit  $14,6 \pm 1,6\%$  deutlich geringerer B-Zell-Anteil als bei syngen transplantierten C57BL/6-Mäusen mit  $35,9 \pm 6,1\%$  (vgl. Abb. 3.3). In allogenen transplantierten BALB/c-Mäusen setzte sich die splenische B-Zellpopulation im Mittel aus 35% unreifen, transitionellen Zellen, 49% folliculären und 4% Marginalzonen-B-Zellen zusammen. Demgegenüber bestand die splenische B-Zell-Population in syngen transplantierten C57BL/6-Mäusen nur zu durchschnittlich 21% aus unreifen, dafür aber zu 66% aus folliculären und zu ca. 5% aus Marginalzonen-B-Zellen (vgl. Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: Durchflusszytometrische Analyse der medullären und splenischen B-Zell-Subpopulationen in Empfängertieren an Tag 26 nach HSZT.** An Tag 26 nach HSZT wurden Knochenmark und Milz von Empfängertieren durchflusszytometrisch analysiert. a) Exemplarisch dargestellt ist die Gating-Strategie für medulläre B-Zell-Subpopulationen unter  $CD19^+$  Zellen am Beispiel der Knochenmarkprobe einer syngen transplantierten Maus. A-F bezeichnet die entsprechenden Fraktionen nach Hardy et al.<sup>88</sup>. b) Exemplarisch dargestellt ist die Gating-Strategie für splenische B-Zell-Subpopulationen unter  $CD19^+$  Zellen am Beispiel der Milz einer syngen transplantierten Maus. c) Gezeigt sind jeweils die prozentualen Anteile der B-Zell-Subpopulationen an der Gesamtheit der  $CD19^+$  Zellen in Knochenmark resp. Milz syngener und allogener Empfängertiere an Tag 26 nach KMT. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von  $n=4$ (BALB/c) bzw.  $n=5$ (C57BL/6) Einzeltieren/Kohorte.

Die Gesamtfrequenz von Granulozyten und Monozyten im Knochenmark präsentierte sich bei transplantierten C57BL/6-Mäusen mit 48% als höher im Vergleich zu transplantierten BALB/c-Mäusen mit 34%, vorwiegend aufgrund des höheren Granulozytenanteils in C57BL/6-Mäusen (vgl. Abb. 3.8). In der Milz erwiesen sich die addierten, prozentualen Anteile beider Zelllinien an der Gesamtheit lebender MNC als vergleichbar zwischen beiden Mausmodellen (BALB/c: 13%; C57BL/6: 10%).

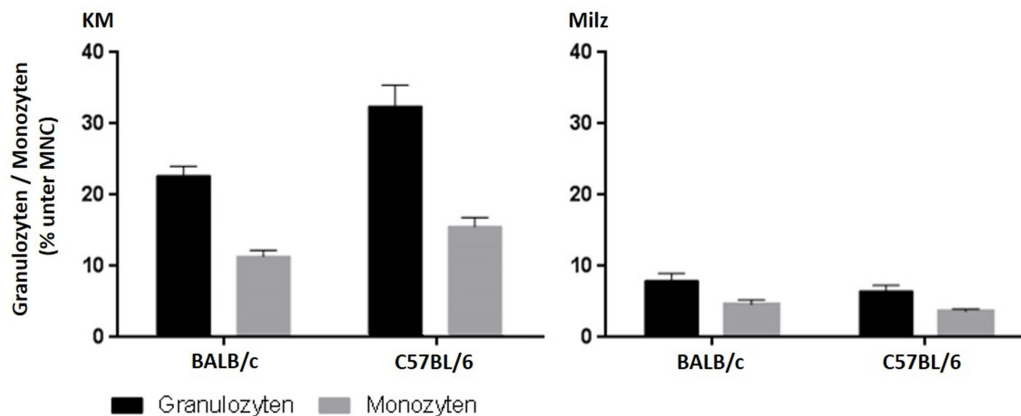


Abb. 3.8: Anteil von Granulozyten und Monozyten unter MNC in Knochenmark und Milz von Empfängertieren an Tag 26 nach HSZT. KM- und Milzzellen von BALB/c- und C57BL/6-Empfängertieren wurden an d26 nach HSZT durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die relativen Anteile von Granulozyten und Monozyten unter lebenden MNC in KM und Milz. Die Daten zeigen Mittelwerte±SEM von n(BALB/c) = 4 bzw. n(C57BL/6) = 5 Einzeltieren/Kohorte.

### 3.2. Klinische Langzeitbeobachtung und serielle Blutanalysen der Empfängertiere nach gezielter Eliminierung reif transplantiertes, donorstämmiger Treg

Allogene und syngene Empfängertiere wurden an Tag 23 nach HSZT einer durchflusszytometrischen Analyse des peripheren Bluts unterzogen und in Abhängigkeit der peripheren T-Zell- und B-Zell-Frequenzen und Spenderanteile unter den T-Zellen vergleichbaren Kohorten zugeteilt. Jeweils der Hälfte der transplantierten BALB/c- respektive C57BL/6-Mäuse wurde zur gezielten Depletion transplantatstämmiger Treg an den Tagen 26, 28 und 30 nach HSZT intraperitoneal je 0,5µg Diphtherie-Toxin injiziert, der anderen Hälfte volumenäquivalent isotonischer PBS-Puffer. Gewicht und klinischer Zustand (Score nach Cooke et al.<sup>87</sup>) der Versuchstiere wurden zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 100 Tagen ab HSZT erhoben. Zudem wurden an den Tagen 33, 42, 54, 71 und 99 nach HSZT weitere durchflusszytometrische Analysen des peripheren Bluts vorgenommen. Klinisch wurde auf Anzeichen einer GvHD bzw. systemisch-entzündlichen Erkrankung geachtet. Die

durchflusszytometrischen Analysen des peripheren Bluts erlaubten einerseits, die Veränderung des Chimerismus zwischen Empfänger- und Spender-stämmigen Zellen zu verfolgen, andererseits, die Dynamik der peripheren T- und B-Zell-Frequenzen vor dem Hintergrund einer möglichen, systemischen Inflammation zu untersuchen.

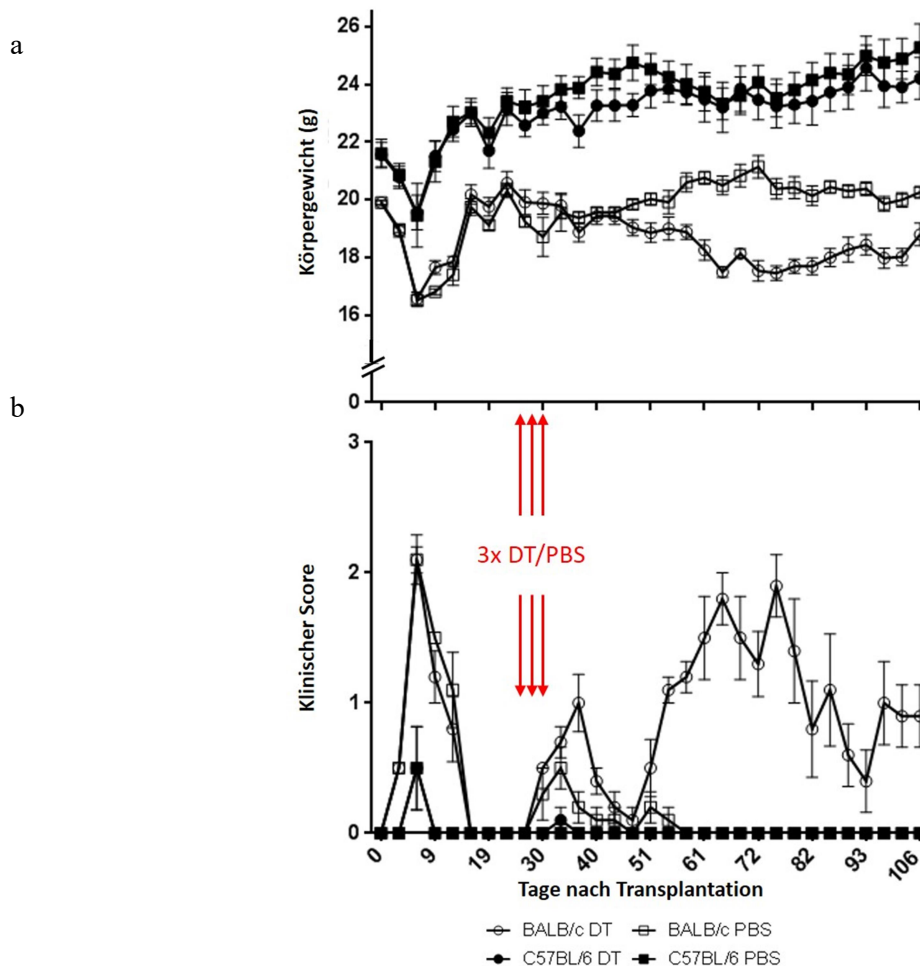


Abb. 3.9: Körpergewicht und GvHD-Score der Empfängertiere nach HSZT und Depletion kotransplantierte Donor-Treg. BALB/c- und C57BL/6-Mäuse wurden allogene bzw. syngene transplantiert und anschließend zweimal pro Woche (a) gewogen und (b) klinisch beurteilt. An den Tagen 26, 28, 30 nach KMT erhielten die Interventionsgruppen DT i.p. (BALB/c DT bzw. C57BL/6 DT), während die Kontrollgruppen PBS i.p. erhielten (BALB/c PBS bzw. C57BL/6 PBS). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von n=5 Einzeltieren/Kohorte.

Nach HSZT boten zunächst sämtliche allogenen Empfängertiere einen Gewichtsverlust von etwa 17% des Ausgangsgewichts, begleitet von transientem, klinischem Score, bevor sich der Gewichtsverlauf in Interventions- und Kontrollgruppe stabilisierte und die Tiere zu einem unauffälligen, klinischen Erscheinungsbild zurückkehrten (vgl. Abb. 3.9). Nach DT-/PBS-Gabe an den Tagen 26, 28 und 30 nach HSZT unterschied sich der weitere Verlauf von Kontroll(PBS)- und Interventions(DT)-Gruppe der BALB/c-Empfängertiere. Während

BALB/c-PBS-Mäuse einen konstanten Gewichtsverlauf präsentierten und einen – abseits eines transienten klinischen Scores nach dreimaliger, intraperitonealer Injektion – unauffälligen klinischen Verlauf, büßten die BALB/c-DT-Mäuse anhaltend über 10% ihres Körpergewichts ein und entwickelten erneut einen klinischen Score von etwa 2 Punkten. Die Ausprägung der Krankheitserscheinungen unterschied sich zwischen den einzelnen Tieren, einige zeigten leichtere, andere ausgeprägtere Symptome. Von Tag 75 bis zum Ende des Beobachtungszeitraums trat bei BALB/c-DT-Mäusen eine Zustandsverbesserung mit steigendem Körpergewicht und fallendem Score ein. Letale Verläufe wurden nicht beobachtet.

Unter den syngenem Empfängertieren stellte sich nach Konditionierungstherapie und HSZT zunächst auch ein Gewichtsverlust von etwa 10% des Ausgangsgewichts ein, bevor sich das Körpergewicht ab Tag 19 wieder normalisierte und im Verlauf weiter anstieg. Selbst nach selektiver Depletion transplantatstämmiger Treg in der syngenem Interventionsgruppe traten gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikanten Differenzen hinsichtlich des Gewichtsverlaufs oder klinischen Scores auf.

In regelmäßigen Abständen wurde den Versuchstieren venöses Blut über die Schwanzvene abgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Initial glichen sich die Kohorten der BALB/c-Empfängertiere in der Treg-Gesamtfrequenz unter peripheren T-Zellen (vgl. Abb. 3.10). Während bei BALB/c-PBS-Mäusen im Verlauf eine Reduktion des Anteils DTR-stämmiger Zellen unter den Treg auftrat – am ehesten erklärbar durch Abwanderung der Zellen in Organe –, wurden DTR-Treg in BALB/c-DT-Mäusen durch DT-Injektionen nahezu vollständig, wenn auch nur transient, eliminiert. Zusätzlich kam es nach interventioneller Treg-Depletion unter BALB/c-DT-Mäusen gegenüber BALB/c-PBS-Mäusen zu einer zunehmenden Verringerung der peripheren Treg-Gesamtfrequenz unter T-Zellen bei gleichbleibender T-Zell-Gesamtfrequenz (nicht abgebildet), die an Tag 71 Signifikanzniveau erreichte (BALB/c-PBS:  $6,4 \pm 0,3\%$ ; BALB/c-DT:  $4,5 \pm 0,8\%$ .  $p < 0,05$ ). Zwischen Tag 50 und Tag 70 nach HSZT war erneut ein geringer Anteil an DTR-Treg im peripheren Blut der BALB/c-DT-Mäuse nachweisbar. Parallel dazu regenerierte sich das periphere Gesamt-Treg-Kompartiment der BALB/c-DT-Mäuse, sodass an Tag 99 der Anteil der Treg unter T-Zellen (BALB/c-PBS:  $5,6 \pm 0,4\%$ ; BALB/c-DT:  $5,5 \pm 0,5\%$ ) und die Zusammensetzung der Treg zwischen BALB/c-Interventions- und Kontrollgruppe vergleichbar waren.

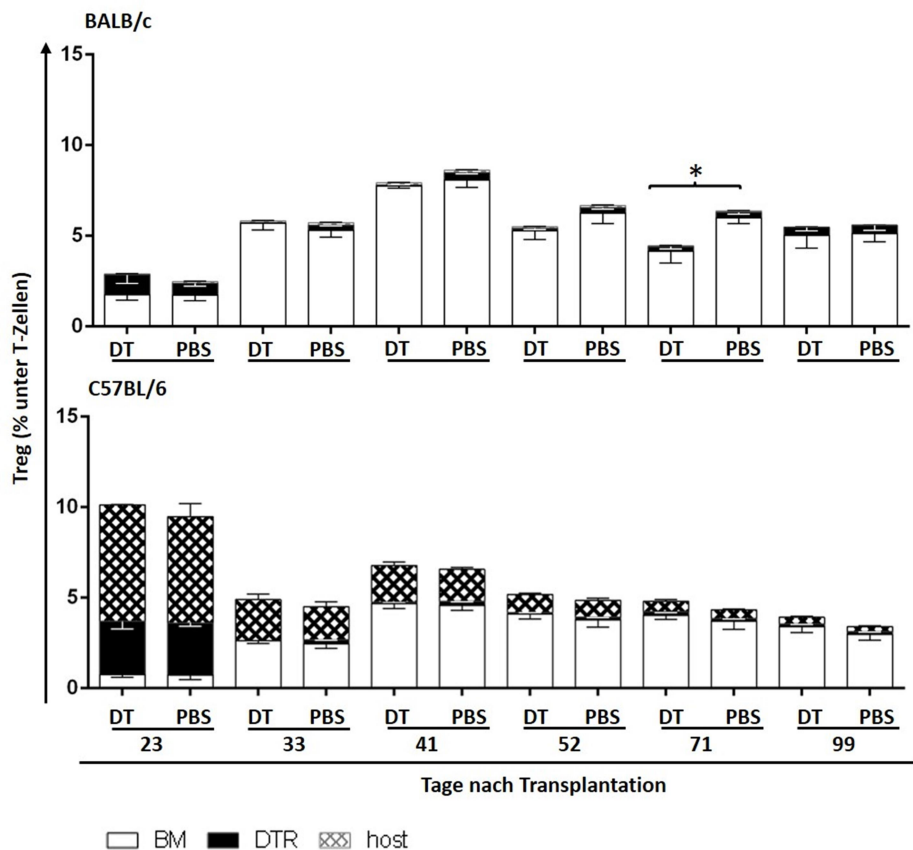


Abb. 3.10: Anteil von CD4<sup>+</sup> Treg unter T-Zellen im peripheren Blut von Empfängertieren nach HSZT und Depletion kotransplantiert Donor-Treg. Nach HSZT resp. DT-/PBS-Gabe (an d26, 28, 30) wurden in Empfängertieren zu den dargestellten Zeitpunkten durchflusszytometrische Analysen des peripheren Bluts vorgenommen. Gezeigt ist die relative Frequenz von Treg (CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) unter peripheren T-Zellen (TCRβ<sup>+</sup>) mit Darstellung der Abstammung der Zellen (DTR, BM, Host) je nach Expression der kongenen CD45/CD90-Marker (DTR: CD45.1<sup>+</sup>/CD90.2<sup>+</sup>; BM: CD45.2<sup>+</sup>/CD90.1<sup>+</sup>; Host: CD45.2<sup>+</sup>/CD90.2<sup>+</sup>). An d71 besaßen BALB/c-DT-Mäuse eine signifikant geringere Treg-Frequenz im peripheren Blut als BALB/c-PBS-Mäuse; \*, p<0,05 (unabhängiger, ungepaarter Student's t-Test). Die Daten stellen Mittelwerte±SEM von n=5 Einzeltieren/Kohorte dar.

Gegenüber allogenen transplantierten BALB/c-Empfängertieren ließen sich in syngen transplantierten C57BL/6-Empfängertieren noch Host-stämmige, periphere Treg an Tag 23 nach HSZT detektieren. Zwischen Tag 23 und Tag 33 kam es allerdings zu deutlichen Änderungen in der Zusammensetzung des Treg-Kompartiments im peripheren Blut der C57BL/6-Kohorten: im Rahmen einer generellen Abnahme der Gesamt-Treg-Frequenz trat insbesondere eine deutliche Reduktion des Host-Anteils, aber auch des DTR-Anteils, zugunsten des BM-Anteils auf. Im Vergleich zu transplantierten BALB/c-Mäusen lag der Anteil DTR-stämmiger Treg an Tag 23 deutlich höher, glich sich aber innerhalb der nächsten 10 Tage an. In C57BL/6-DT-Mäusen wurden DTR-Treg durch DT-Injektionen an den Tagen 26, 28 und 30 nach KMT dann erwartungsgemäß eliminiert. Zwar kam es auch hier im weiteren Verlauf zu einem geringen Wiederauftreten DTR-stämmiger Treg zwischen Tag 50



und Tag 70 nach KMT, allerdings stellten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Differenzen hinsichtlich der Treg-Gesamtfrequenz unter T-Zellen zwischen Interventions- und Kontrollgruppe transplantiert C57BL/6-Mäuse ein (Tag 99: C57BL/6-PBS  $3,9 \pm 0,5\%$ ; C57BL/6-DT  $3,4 \pm 0,6\%$ ). Zuletzt war der überwiegende Teil peripherer Treg BM-stämmig (vgl. Abb. 3.10).

Bezüglich des Anteils von  $CD4^+$  Tconv unter allen T-Zellen des peripheren Bluts ergaben sich zwischen DT- und PBS-Gruppe der transplantierten BALB/c-Mäuse keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 3.11). Über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg nahmen die Populationen der  $CD4^+$  Tconv jeweils 60% bis 70% aller peripheren T-Zellen ein. Darüber hinaus glichen sich die Kohorten des allogenen HSZT-Modells auch in der Zusammensetzung des peripheren  $CD4^+$  Tconv-Kompartiments hinsichtlich der Herkunft der Zellen: der größte Teil der Zellen war BM-stämmig, nur ein kleiner Teil DTR-stämmig; Host-stämmige Zellen waren nicht vorhanden (vgl. Abb. 3.11).

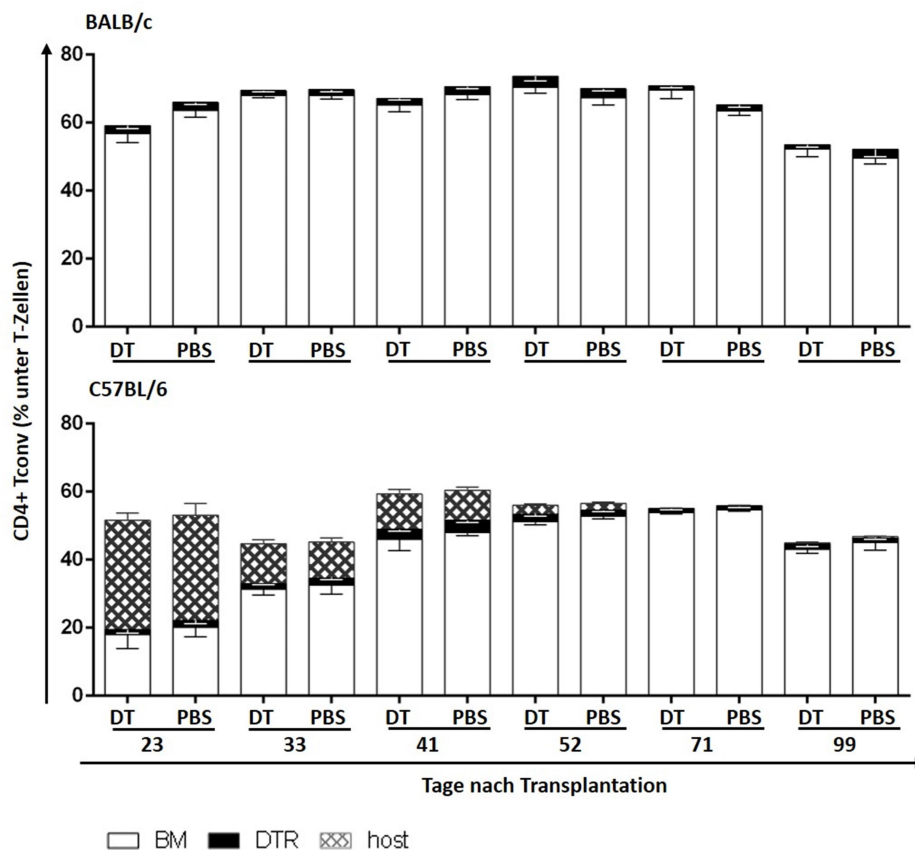


Abb. 3.11: Anteil von  $CD4^+$  Tconv unter T-Zellen im peripheren Blut von Empfängertieren nach HSZT und Depletion kotransplantiert Donor-Treg. Nach HSZT resp. DT/PBS-Gabe an d26, 28, 30 wurden in Empfängertieren zu den dargestellten Zeitpunkten durchflusszytometrische Analysen des peripheren Blutes vorgenommen. Gezeigt ist die relative Frequenz von  $CD4^+$  Tconv ( $CD4^+$  FoxP3<sup>+</sup>) unter peripheren T-Zellen ( $TCR\beta^+$ ) mit Darstellung der Abstammung der Zellen (DTR, BM, Host) je nach Expression der kongenen CD45/CD90-Marker (DTR:  $CD45.1^+/CD90.2^+$ ; BM:  $CD45.2^+/CD90.1^+$ ; Host:  $CD45.2^+/CD90.2^+$ ). Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM von n=5 Einzeltieren/Kohorte dar.

Ähnlich wie bei allogenen transplantierten BALB/c-Tieren bewegte sich auch bei syngen transplantierten C57BL/6-Tieren der Tconv-Gehalt im peripheren Blut über den gesamten Beobachtungszeitraum zwischen 50% und 60%. Allerdings zeigten letztere initial noch einen großen Anteil host-stämmiger CD4<sup>+</sup> Tconv (vgl. Abb. 3.11), der über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich abnahm und ab Tag 71 nicht mehr nachweisbar war. Ähnlich wie beim allogenen HSZT-Modell entwickelten sich BM-stämmige CD4<sup>+</sup> Tconv im Verlauf zur jeweils größten Population bei gleichbleibend geringem Anteil DTR-stämmiger Tconv.

Der Gehalt an CD8<sup>+</sup> Tconv im peripheren Blut präsentierte sich im Verlauf vergleichbar zu dem peripherer CD4<sup>+</sup> Tconv (nicht abgebildet). Bei DT- und PBS-Gruppe der allogenen transplantierten BALB/c-Mäuse machten CD8<sup>+</sup> Tconv zwischen 20% und 40% aller T-Zellen im peripheren Blut aus; signifikante Unterschiede zwischen beiden Kohorten traten zu keinem Zeitpunkt auf. Ähnlich wie bei der Population peripherer CD4<sup>+</sup> Tconv waren im allogenen HSZT-Modell keine Host-stämmigen CD8<sup>+</sup> Tconv auszumachen. Mit Ausnahme von Tag 23 nach KMT, wo 31±5% der CD8<sup>+</sup> Tconv DTR-stämmig und 68±5% BM-stämmig waren, waren zu sämtlichen übrigen Zeitpunkten über 90% der peripheren CD8<sup>+</sup> Tconv BM-stämmig. Auch zwischen den Kohorten des syngen HSZT-Modells wurden keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz peripherer CD8<sup>+</sup> Tconv erfasst, die im Verlauf 30% bis 50% aller peripheren T-Zellen darstellten. Die Zusammensetzung der CD8<sup>+</sup> Tconv-Population in C57BL/6-DT- und -PBS-Gruppe glich jener der CD4<sup>+</sup> Tconv: an Tag 23 nach KMT stellten Host-stämmige Zellen die größte CD8<sup>+</sup> Tconv-Subpopulation mit einem Anteil von 47±4% dar, bevor nach kontinuierlicher Abnahme ab Tag 71 keine Host-stämmigen Zellen mehr nachweisbar waren. Die fortan größte CD8<sup>+</sup> Tconv-Subpopulation stellten in den C57BL/6-Gruppen ab Tag 33 jeweils BM-stämmige Zellen dar, die zuletzt in beiden Gruppen über 90% aller CD8<sup>+</sup> Tconv ausmachten (nicht abgebildet).

Interessanterweise kam es zwischen Tag 23 und Tag 33 nach allogener HSZT sowohl in BALB/c-DT- als auch BALB/c-PBS-Tieren zu einem transienten Abfall des relativen Anteils von B-Zellen unter MNC im peripheren Blut (vgl. Abb. 3.12). Im Gegensatz zu dem nachfolgenden, konstanten Wiederanstieg des B-Zell-Anteils in BALB/c-PBS-Mäusen auf 46±4% an d99 kam es bei den BALB/c-DT-Mäusen nach vorübergehender Zunahme zu einem weiteren Abfall der B-Zell-Frequenz auf 15±3% unter MNC bis Tag 71, sodass die Tiere zu diesem Zeitpunkt signifikant weniger B-Zellen besaßen als BALB/c-PBS-Mäuse ( $p < 0,001$ ).

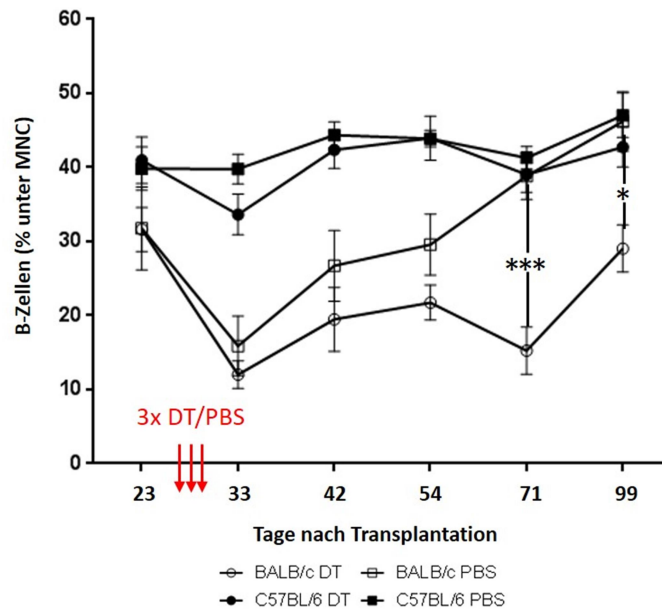


Abb. 3.12: Anteil von B-Zellen unter MNC im peripheren Blut in Empfängertieren nach HSZT und Depletion kotransplantierte Donor-Treg. Nach HSZT resp. DT-/PBS-Gabe an d26, 28, 30 wurden in Empfängertieren zu den dargestellten Zeitpunkten durchflusszytometrische Analysen des peripheren Blutes vorgenommen. Gezeigt ist die relative Frequenz von CD19<sup>+</sup> B-Zellen unter lebenden MNC im peripheren Blut der Tiere. An d71 und d99 ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen BALB/c-DT- und -PBS-Mäusen. \*, p<0,05; \*\*\*, p<0,001 (unabhängiger, ungepaarter Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte±SEM von n=5 Einzeltieren/Kohorte.

Parallel zum Wiederauftreten DTR-stämmiger Treg (vgl. Abb. 3.10) nahm die B-Zell-Frequenz in BALB/c-DT-Mäusen wieder zu und erreichte an Tag 99 mit 29±3% unter MNC einen deutlich höheren, wenngleich gegenüber den PBS-Tieren weiterhin signifikant verminderten Wert (p < 0,05). Im Gegensatz dazu traten unter syngen transplantierten C57BL/6-Mäusen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen auf – der B-Zell-Gehalt lag über den gesamten Beobachtungszeitraum zwischen 35% und 50% unter peripheren MNC.

Zusammenfassend zeigte sich, dass reif transplantierte, donorstämmige DTR-Treg durch Injektion von Diptherie-Toxin transient ausgeschaltet werden konnten, bevor zwischen Tag 54 und 71 nach HSZT ein Wiederauftreten der Zellpopulation zu verzeichnen war. Während der Absenz der DTR-Treg zeigten allogene transplantierte BALB/c-DT-Mäuse als einzige Kohorte klinische und hämatologische Anzeichen einer systemischen Erkrankung mit Gewichtsverlust, klinischem Krankheitsscore und Verzögerung der B-Zell-Rekonstitution. Parallel zum Wiederauftreten von DTR-Treg besserten sich die Symptome. Hinsichtlich der Frequenzen peripherer, konventioneller T-Zellen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Letale Verläufe traten in keiner Kohorte auf.

### 3.3. Durchflusszytometrische Analyse von KM und Milz nach gezielter Eliminierung reif transplantiertes, donorstämmiger Treg

An den Tagen 7 und 14 nach erster DT-/PBS-Gabe (d.h. Tag 33 und Tag 40 nach KMT) wurden Knochenmark und Milz der transplantierten Mäuse durchflusszytometrisch analysiert, um nach gezielter Ausschaltung der reif transplantierten, donorstämmigen DTR-Treg – ohne Manipulation übriger Treg-Populationen – das Auftreten von Allo- bzw. Autoimmunität zu untersuchen. Durchflusszytometrisch erfasst wurden die Auswirkungen der DTR-Treg-Eliminierung auf Treg und Tconv, B-Zellen und B-Vorläuferzellen, sowie Granulozyten und Monozyten in Knochenmark und Milz.

#### 3.3.1. Zellularität von Knochenmark und Milz

Ausgehend von den Werten der Tag-26-Analyse vor gezielter Treg-Eliminierung zeigten die allogenen transplantierten BALB/c-Mäuse 7 Tage später lediglich eine diskrete Zunahme der absoluten Zahl isolierbarer Knochenmarkzellen von  $10 \times 10^6$  auf  $11 \times 10^6$  (DT) respektive  $14 \times 10^6$  (PBS) (vgl. Abb. 3.13). Weitere 7 Tage später (an Tag 40 nach KMT) konnten aus den Mäusen der BALB/c-PBS-Gruppe (ohne Treg-Eliminierung) bereits durchschnittlich  $24 \times 10^6$  Knochenmarkzellen und damit eine zu nicht-transplantierten BALB/c-Mäusen vergleichbare Zellmenge isoliert werden (vgl. Abb. 3.13). Demgegenüber stagnierte der Wert bei Mäusen der BALB/c-DT-Gruppe auch 14 Tage nach Treg-Eliminierung noch bei durchschnittlich  $14 \times 10^6$ . Aus den Milzen der BALB/c-Mäuse ließen sich unabhängig von einer vorangegangenen Treg-Elimination nur ca.  $20 \times 10^6$  bzw.  $30 \times 10^6$  Zellen isolieren. Dieser Rückgang gegenüber dem an Tag 26 erfassten Wert von im Mittel  $40 \times 10^6$  isolierbaren Milzzellen (vgl. Abb. 3.4) war insbesondere auf eine geringere Zahl an B-Zellen und erythropoiden Vorläuferzellen zurückzuführen. Damit blieben die Werte zu diesem Zeitpunkt auch deutlich hinter denen nicht-transplantiertes BALB/c-Mäuse (durchschnittlich  $63 \times 10^6$  Milzzellen) zurück.

Syngene transplantierte C57BL/6-Mäuse sowohl der Interventions- als auch der Kontrollgruppe zeigten an den Tagen 7 und 14 nach Intervention Zellzahlen von durchschnittlich  $30 \times 10^6$  im Knochenmark und  $70 \times 10^6$  in der Milz; die Werte befanden sich damit auf vergleichbarem Niveau zu den an Tag 26 nach KMT erfassten Werten transplantiertes C57BL/6-Mäuse und den Werten nicht-transplantiertes C57BL/6-Mäuse. In der C57BL/6-PBS- und insbesondere der C57BL/6-DT-Gruppe fanden sich an Tag 7 nach Intervention noch erhöhte Zahlen erythropoider Vorläuferzellen in der Milz, die sich in beiden Gruppen in den folgenden sieben Tagen jedoch normalisierten (vgl. Abb. 3.13).

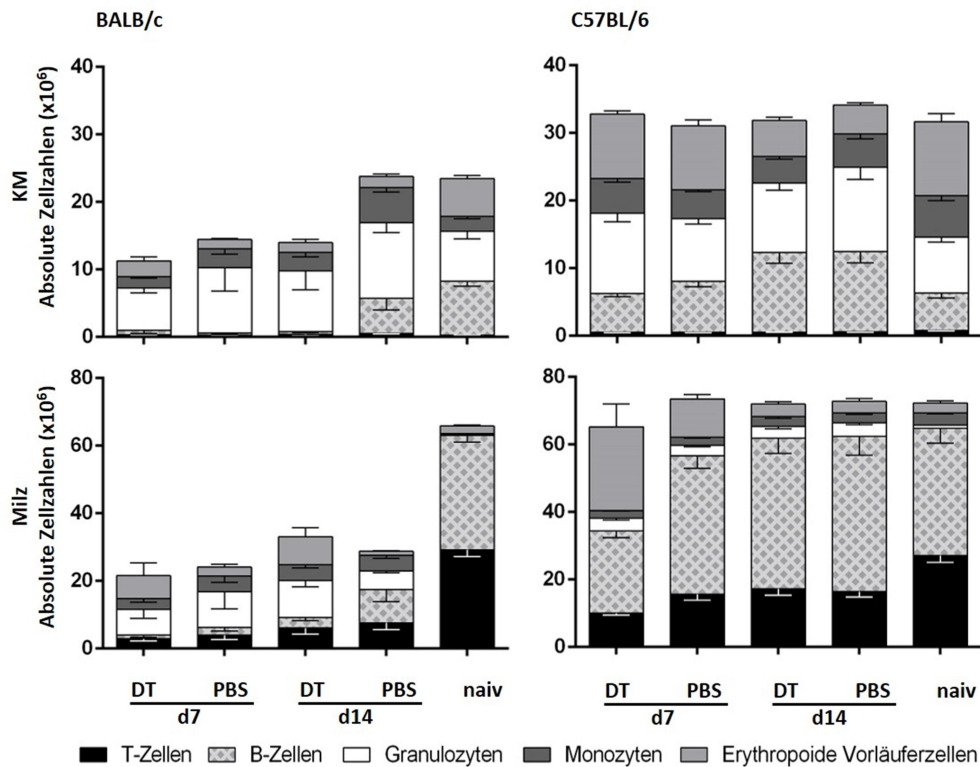


Abb. 3.13: **Absolute Zellzahlen in Knochenmark (KM) und Milz der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse.** Knochenmark und Milz der Versuchstiere wurden 7 und 14 Tage nach Treg-Eliminierung bzw. PBS-Gabe durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die absoluten Zellzahlen der Kompartimente mit graphischer Darstellung der enthaltenen Populationen von T-Zellen ( $\text{TCR}\beta^+$ ), B-Zellen ( $\text{CD}19^+$ ), Granulozyten ( $\text{CD}11b^+ \text{Gr}1^+$ ), Monozyten ( $\text{CD}11b^+ \text{Gr}1^+$ ) und erythropoide Vorläuferzellen ( $\text{Ter}119^+ \text{CD}45^+$ ). Zum Vergleich dargestellt sind entsprechende Werte nicht-transplantierte (naiver) Mäuse. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SEM von  $n(\text{BALB}/c) = 5$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{C}57\text{BL}/6) = 8$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{naiv}=\text{nicht-transplantiert}) = 4$  Einzeltiere/Kohorte.

In den folgenden Abschnitten werden die behandlungsabhängigen Veränderungen in den einzelnen Zellreihen in KM und Milz der allo- und syngen transplantierten Mäuse im Detail beschrieben.

### 3.3.2. T-Zellen

#### 3.3.2.1. T-Zellen im Knochenmark

Der Anteil der T-Zellen an den MNC des Knochenmarks betrug in transplantierten BALB/c-Mäusen an Tag 7 in der DT-Gruppe  $2,7\pm 0,3\%$  und in der PBS-Gruppe  $2,4\pm 0,3\%$ , an Tag 14 in der DT-Gruppe  $2,0\pm 0,3\%$  und in der PBS-Gruppe  $2,0\pm 0,2\%$ . Nicht-transplantierte BALB/c-Mäuse verfügten über  $1,0\pm 0,2\%$  T-Zellen im KM. Unter transplantierten C57BL/6-Mäusen besaßen die Tiere der DT-Gruppe im KM demgegenüber  $1,5\pm 0,1\%$  T-Zellen zu beiden Zeitpunkten, die Tiere der PBS-Gruppe  $1,6\pm 0,1\%$  T-Zellen an Tag 7 und  $1,7\pm 0,2\%$  T-

Zellen an Tag 14 nach Intervention. Nicht-transplantierte C57BL/6-Mäuse verfügten über  $2 \pm 0,2\%$  T-Zellen im Knochenmark.

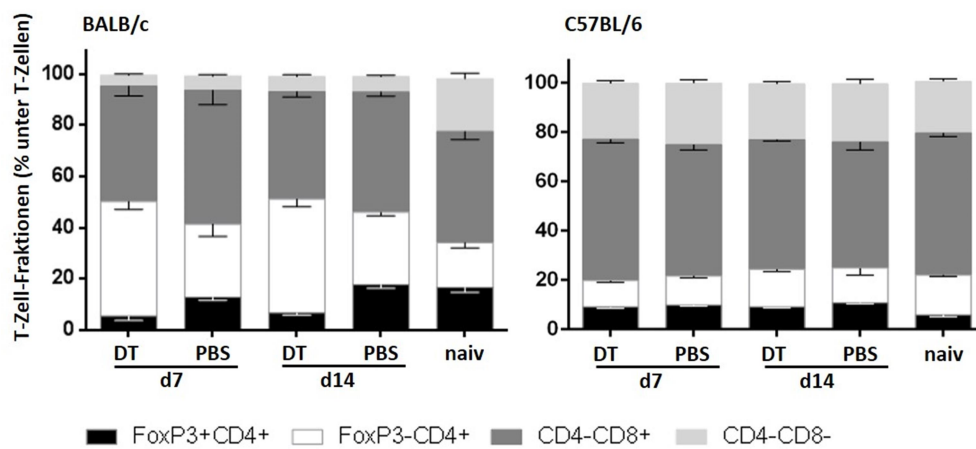


Abb. 3.14: **Relative Verteilung von T-Zell-Subpopulationen im KM der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse.** Das Knochenmark von BALB/c- und C57BL/6-Empfängertieren wurde 7 und 14 Tage nach Treg-Eliminierung bzw. PBS-Gabe durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die relativen Zusammensetzungen der medullären T-Zell-Population mit Darstellung der T-Zell-Subpopulationen  $CD4^+Treg$  (FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>),  $CD4^+Tconv$  (FoxP3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>),  $CD8^+Tconv$  (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) und DN-T-Zellen (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Gezeigt werden Mittelwerte $\pm$ SEM von n(BALB/c) = 5 Einzeltiere/Kohorte, n(C57BL/6) = 8 Einzeltiere/Kohorte, n(naiv=nicht-transplantiert) = 4 Einzeltiere/Kohorte.

An den Tagen 7 und 14 nach gezielter Treg-Elimination unterschieden sich die medullären T-Zell-Populationen der allogenen transplantierten BALB/c-DT- und BALB/c-PBS-Mäuse hinsichtlich des Verhältnisses von Treg zu  $CD4^+$  Tconv: im Vergleich zu BALB/c-PBS-Mäusen präsentierten BALB/c-DT-Mäuse einen geringeren Anteil von Treg und höheren Anteil von  $CD4^+$  Tconv unter allen T-Zellen im Knochenmark (vgl. Abb. 3.14). DT- und PBS-Kohorte syngenen transplantierte C57BL/6-Mäuse wiesen dagegen eine einheitliche Verteilung der T-Zell-Subpopulationen auf, die weitgehend derjenigen nicht-transplantierte Tiere entsprach (vgl. Abb. 3.14). Die Details der Veränderungen in den T-Zell-Kompartimenten werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

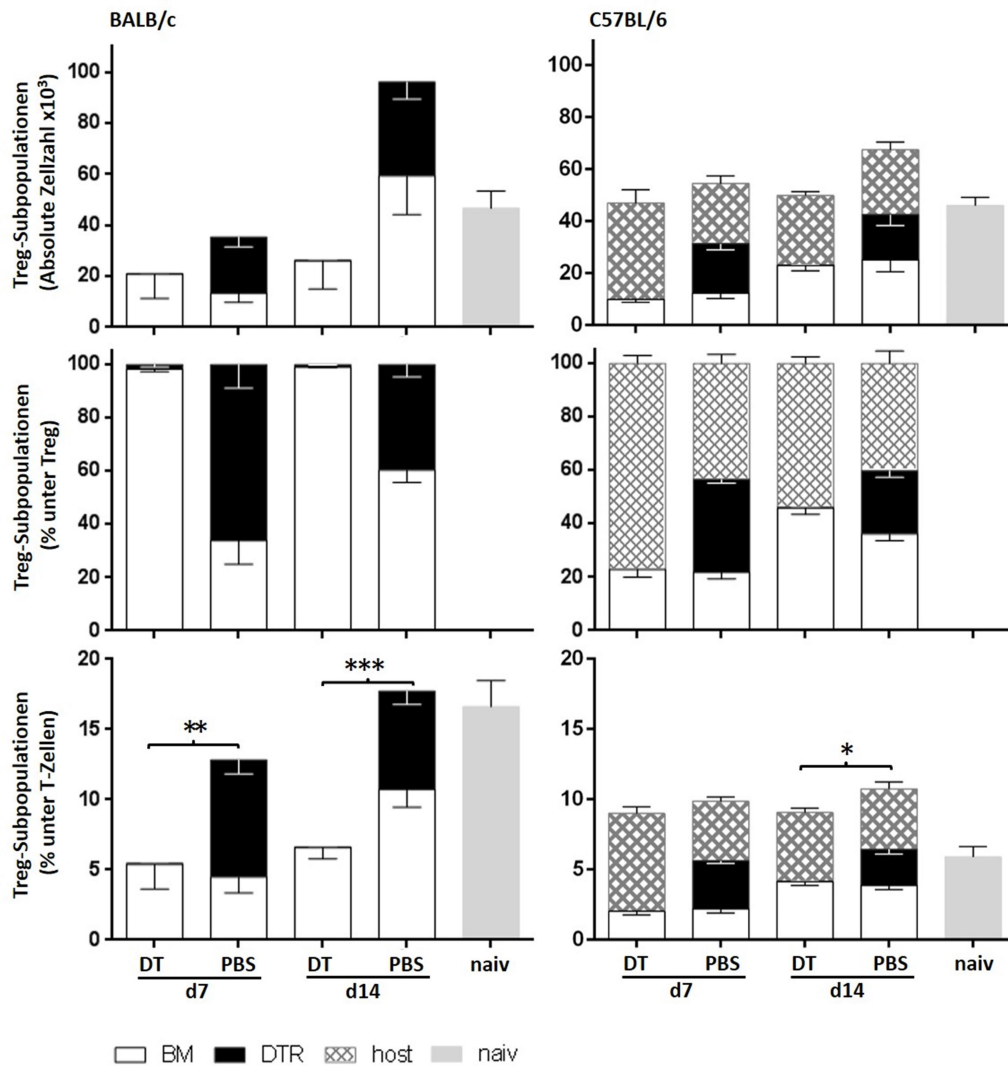


Abb. 3.15: Absolute Anzahl und relativer Anteil von Treg im KM der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse. Das Knochenmark der Versuchstiere wurde 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Eliminierung bzw. PBS-Gabe durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt sind die medullären Treg-Populationen mit Darstellung absoluter Zellzahlen, Abstammung der Treg je nach Expression der kongenen CD45/CD90-Marker (DTR, BM, Host) und relativer Treg-Frequenz unter T-Zellen ( $\text{TCR}\beta^+$ ). An Tag 7 und 14 bestanden signifikante Unterschiede hinsichtlich der relativen Treg-Frequenzen (% unter T-Zellen) zwischen BALB/c-DT- und BALB/c-PBS-Mäusen, an Tag 14 auch zwischen C57BL/6-DT- und C57BL/6-PBS-Mäusen. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (unabhängiger, ungepaarter Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n(\text{BALB/c}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{C57BL/6}) = 8$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{naiv}=\text{nicht-transplantiert}) = 4$  Einzeltiere/Kohorte.

BALB/c-PBS-Mäuse zeigten zu allen Untersuchungszeitpunkten eine suffiziente Produktion von Treg. An Tag 7 nach Intervention besaßen BALB/c-PBS-Mäuse durchschnittlich  $35 \times 10^3$  Treg im KM, an Tag 14 nach Intervention sogar  $96 \times 10^3$  Treg und damit deutlich mehr als nicht-transplantierte Tiere. Die Frequenz regulatorischer unter allen T-Zellen im KM war an Tag 14 mit jener nicht-transplantierte Mäuse allerdings vergleichbar (vgl. Abb. 3.15). Der relative Anteil BM-stämmiger Treg im KM der BALB/c-PBS-Mäuse nahm im Verlauf stetig zu und lag zuletzt bei durchschnittlich 60%, wodurch sich der Anteil DTR-stämmiger Treg

von 66% an Tag 7 auf 40% an Tag 14 verringerte, wenngleich die Zahl DTR-stämmiger Treg absolut betrachtet weiter zunahm. Host-Treg waren in diesen Empfängertieren nicht mehr vorhanden. Demgegenüber blieb in BALB/c-DT-Mäusen nach Ausschaltung transplantatstämmiger DTR-Treg eine Proliferation verbliebener BM-Treg weitgehend aus, sodass diese Tiere an den Tagen 7 und 14 gegenüber BALB/c-PBS-Mäusen sowohl einen signifikant geringeren absoluten als auch relativen Treg-Gehalt im KM aufwiesen (vgl. Abb. 3.15).

Dagegen verfügten C57BL/6-DT-Mäuse an beiden Untersuchungstagen sowohl absolut als auch relativ nur über geringfügig weniger Treg-Zellen als entsprechende C57BL/6-PBS-Mäuse, wobei die relativen Unterschiede an Tag 14 nach Intervention mit  $9,1 \pm 0,5\%$  vs.  $10,7 \pm 0,5\%$  Treg unter allen T-Zellen statistische Signifikanz erreichten. Nach Ausschaltung der DTR-Treg setzte bei C57BL/6-DT-Mäusen bis Tag 7 zunächst eine schnelle, homöostatische Proliferation host-stämmiger Treg ein, wodurch diese vorübergehend bis zu 80% aller Treg ausmachten. Danach nahm bei beiden C57BL/6-Kohorten bei gleichbleibender absoluter und relativer Treg-Frequenz der Anteil BM-stämmiger Treg zu.

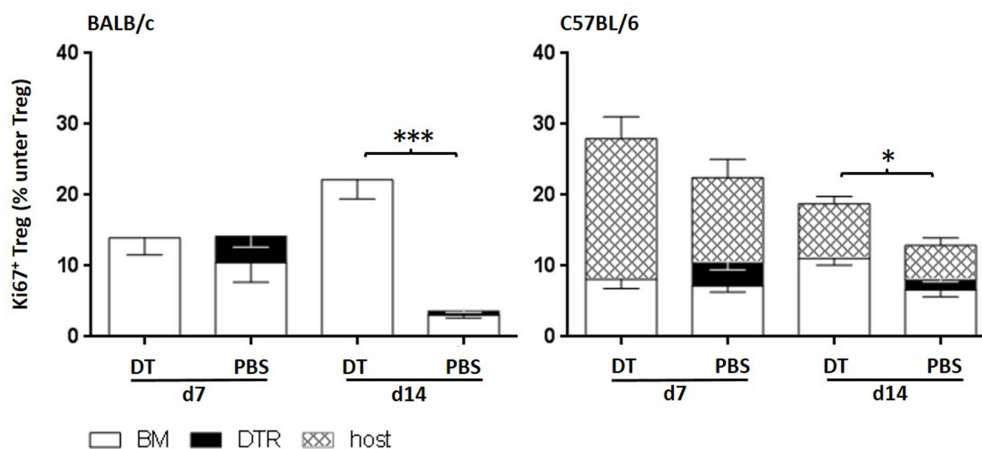


Abb. 3.16: Anteil proliferationsaktiver Treg im KM der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe. Das Knochenmark der Versuchstiere wurde 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Eliminierung bzw. PBS-Gabe durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die prozentualen Anteile proliferationsaktiver  $Ki67^+$  Treg ( $CD4^+ FoxP3^+ Ki67^+$ ) unter allen medullären Treg ( $CD4^+ FoxP3^+$ ) mit graphischer Darstellung der Abstammung der Zellen je nach Expression der kongenen CD45/CD90-Marker (DTR, BM, Host). An Tag 14 nach Intervention bestanden sowohl bei allogenen als auch syngenen Transplantationsmodell signifikante Unterschiede zwischen DT- und PBS-Gruppe. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (unabhängiger, ungepaarter Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n(\text{BALB/c}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{C57BL/6}) = 8$  Einzeltiere/Kohorte.

Die Dynamik der Treg spiegelte sich in den Anteilen proliferationsaktiver Treg-Subpopulationen unter der Gesamtheit der medullären Treg wider (vgl. Abb. 3.16). Dazu



wurden die Zellen auf den proliferationsassoziierten Marker Ki67 gefärbt und analysiert. Sowohl beim allogenen als auch beim syngenem HSZT-Modell führte die gezielte Treg-Depletion zu einer reaktiven Verstärkung der Treg-Proliferation innerhalb der nächsten 14 Tage. Die bei BALB/c-DT-Mäusen als einzige Treg-Entität verbleibende Population BM-stämmiger Treg zeigte bis Tag 7 nach Intervention zunächst keinen nennenswerten Anstieg der Proliferationsaktivität (vgl. Abb. 3.16), sodass absolute und relative Treg-Frequenzen (vgl. Abb. 3.15) im Knochenmark im Verlauf annähernd stagnierten. An Tag 14 nach Intervention schließlich war eine im Vergleich zur BALB/c-PBS-Mäusen signifikant erhöhte Proliferationsaktivität BM-stämmiger Treg im Sinne eines Kompensationsversuchs nach Treg-Verlust zu verzeichnen (vgl. Abb. 3.16). Bei C57BL/6-DT-Mäusen trat bereits an Tag 7 nach Intervention eine beginnende Kompensation des Treg-Verlusts ein, die sich zunächst durch eine schnelle, homöostatische Proliferation Host-stämmiger Treg äußerte. Diese wurden bis Tag 14 nach Intervention jedoch zunehmend durch später reagierende, donorstämmige BM-Treg verdrängt, wobei die Treg-Proliferation in C57BL/6-DT-Mäusen gegenüber C57BL/6-PBS-Mäusen zu diesem Zeitpunkt statistisch signifikant erhöht war.

Sowohl der relative, als auch der absolute Anteil von  $CD4^+$  Tconv war im allogenen HSZT-Modell höher als im syngenem Modell (vgl. Abb. 3.17). Innerhalb des allogenen HSZT-Modells führte die Ausschaltung transplantatstämmiger DTR-Treg zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils von  $CD4^+$  Tconv unter T-Zellen im Vergleich zu Kontroll-PBS-Mäusen, sowohl an Tag 7 (DT: 45%; PBS: 29%;  $p < 0,05$ ) als auch an Tag 14 (DT: 44%; PBS: 28%,  $p < 0,01$ ) (vgl. Abb. 3.17). Grund hierfür war interessanterweise die deutliche Zunahme BM-stämmiger  $CD4^+$  Tconv, während der Anteil DTR-stämmiger  $CD4^+$  Tconv jeweils vergleichbar blieb zu jener in PBS-Mäusen. Die Zunahme BM-stämmiger  $CD4^+$  Tconv in BALB/c-DT-Mäusen spiegelte sich auch in den absoluten Zellzahlen von Tag 7 und Tag 14 nach Intervention wider (vgl. Abb. 3.17). Demgegenüber traten im syngenem HSZT-Modell nach Treg-Elimination keine signifikanten Unterschiede im Anteil von  $CD4^+$  Tconv unter T-Zellen zwischen Interventions- und Kontrollgruppe auf. Zwischen Tag 7 und Tag 14 nach Intervention proliferierten in beiden Kohorten homogen überwiegend donorstämmige BM- $CD4^+$  Tconv.

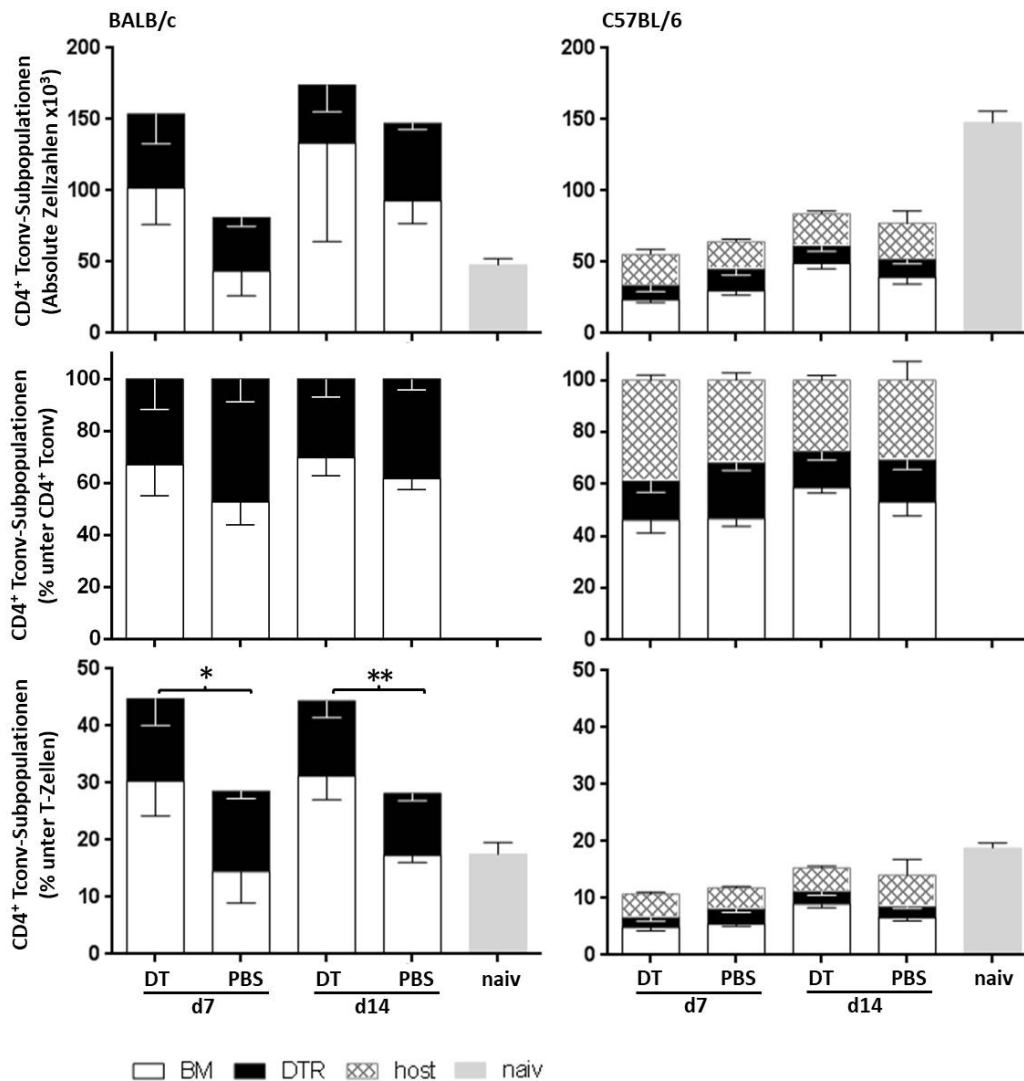


Abb. 3.17: Absolute Anzahl und relativer Anteil von  $CD4^+$  Tconv im KM der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse. Das Knochenmark der Versuchstiere wurde 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Eliminierung bzw. PBS-Gabe durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die medullären  $CD4^+$  Tconv-Populationen mit Darstellung absoluter Zellzahlen, Abstammung der Tconv je nach Expression der kongenen  $CD45/CD90$ -Marker (DTR, BM, Host) und relativen Tconv-Frequenzen unter T-Zellen ( $TCR\beta^+$ ). An Tag 7 und 14 bestanden signifikante Unterschiede hinsichtlich der relativen  $CD4^+$  Tconv-Frequenzen (% unter T-Zellen) zwischen BALB/c-DT- und BALB/c-PBS-Mäusen. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  (unabhängiger, ungepaarter Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n(\text{BALB/c}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{C57BL/6}) = 8$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{naiv} = \text{nicht-transplantiert}) = 4$  Einzeltiere/Kohorte.

Hinsichtlich der  $CD4^-$  Tconv ( $CD4^-CD8^+$  T-Zellen und  $CD4^-CD8^-/DN$ -T-Zellen) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen BALB/c- oder C57BL/6-Gruppen (vgl. Abb. 3.18). Im allogenen HSZT-Modell schwankten die relativen Anteile der  $CD4^-$  Tconv um 50% aller T-Zellen, im syngenen HSZT-Modell um 80% aller T-Zellen. Auch ergaben sich zwischen keiner der Kohorten statistisch signifikante Unterschiede in der  $CD4^+/CD8^+$ -Ratio der T-Zellen im Knochenmark.

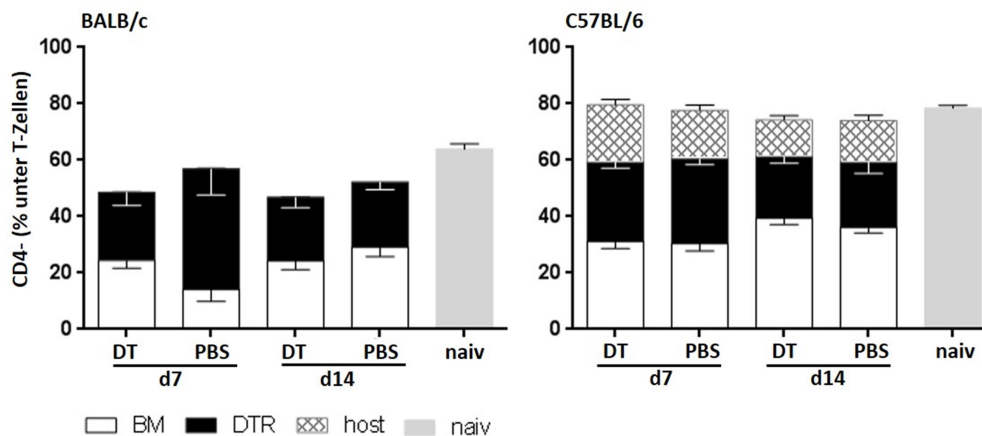


Abb. 3.18: Relativer Anteil von CD4<sup>+</sup> Tconv im KM der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse. Das Knochenmark der Versuchstiere wurde 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Eliminierung bzw. PBS-Gabe durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die relativen Anteile von CD4<sup>+</sup> Tconv (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>) unter medullären T-Zellen (TCRβ<sup>+</sup>) mit Darstellung der Abstammung der Tconv je nach Expression der kongenen CD45/CD90-Marker (DTR, BM, Host). Die Population der CD4<sup>+</sup> Tconv wurde betrachtet, ohne zwischen CD8<sup>+</sup> Tconv und DN-T-Zellen zu differenzieren. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM von n(BALB/c) = 5 Einzeltiere/Kohorte, n(C57BL/6) = 8 Einzeltiere/Kohorte, n(naiv=nicht-transplantiert) = 4 Einzeltiere/Kohorte.

### 3.3.2.2. T-Zellen in der Milz

Neben dem Knochenmark wurden auch die Milzen der transplantierten Mäuse durchflusszytometrisch analysiert. BALB/c-DT-Mäuse besaßen an Tag 7 und Tag 14 nach Intervention jeweils einen etwas geringeren T-Zell-Anteil in der Milz als BALB/c-PBS-Mäuse (vgl. Abb. 3.13), an Tag 7 von 10,5±3,0% versus 17,7±2,8% und an Tag 14 von 16±3,5% versus 22,6±3,0%. Die Mäuse beider Kohorten unterschieden sich hinsichtlich des relativen T-Zell-Gehalts unter splenischen MNC damit deutlich von nicht-transplantierten BALB/c-Mäusen mit einem T-Zell-Anteil von durchschnittlich 40% in der Milz (nicht abgebildet). Die Unterschiede wurden auch bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen insofern deutlich, als transplantierte BALB/c-Mäuse nur über jeweils 2-10x10<sup>6</sup> T-Zellen, nicht-transplantierte BALB/c-Mäuse dagegen über ca. 30x10<sup>6</sup> T-Zellen in der Milz verfügten (vgl. Abb. 3.13). C57BL/6-DT- und -PBS-Mäuse erreichten trotz eines unterschiedlichen T-Zell-Anteils an Tag 7 (C57BL/6-DT: 14,4±1,0%; C57BL/6-PBS: 18,3±1,1%) bis Tag 14 jeweils vergleichbare Werte (C57BL/6-DT: 21,5±1,1%; C57BL/6-PBS: 19,8±0,5%). Auch diese lagen unter denen nicht-transplantierte C57BL/6-Mäuse, die einen T-Zell-Anteil von durchschnittlich 30% aufwiesen.

Trotz dieser teilweise unterschiedlichen T-Zell-Anteile zeigten Interventions- und Kontrollgruppen beider Mausmodelle jeweils ähnliche Verteilungen der T-Zell-Subpopulationen in der Milz (vgl. Abb 3.19).

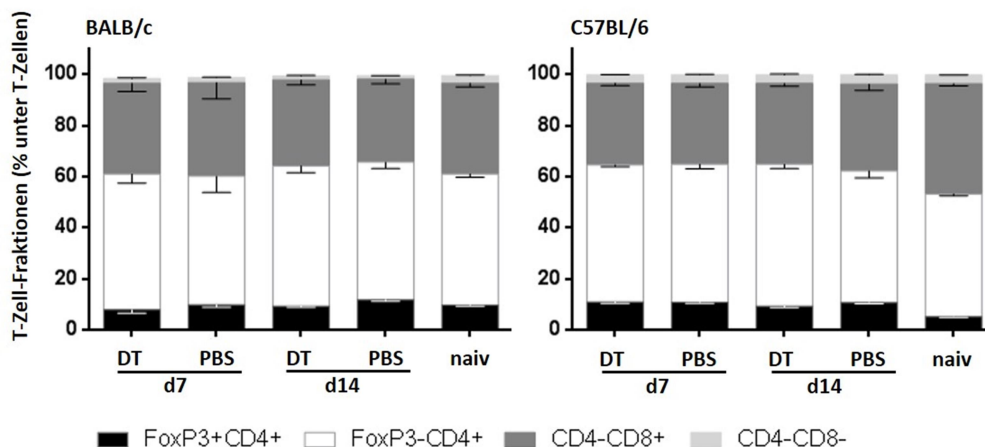


Abb. 3.19: **Zusammensetzung der T-Zellpopulation in der Milz der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse.** Die Milzen der Versuchstiere wurden 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Eliminierung bzw. PBS-Gabe durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die relativen Zusammensetzungen der splenischen T-Zell-Populationen mit Darstellung der T-Zell-Subpopulationen CD4<sup>+</sup>Treg (FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>Tconv (FoxP3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup>Tconv (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) und DN-T-Zellen (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Gezeigt werden Mittelwerte±SEM von n(BALB/c) = 5 Einzeltiere/Kohorte, n(C57BL/6) = 8 Einzeltiere/Kohorte, n(naiv=nicht-transplantiert) = 4 Einzeltiere/Kohorte.

Hinsichtlich der Treg-Nische in der Milz besaßen allogene transplantierte BALB/c-Mäuse im Vergleich zu syngen transplantierten C57BL/6-Mäusen – der niedrigeren Zellularität in der Milz entsprechend (vgl. Abb. 3.13) – geringere Absolutzellzahlen an Treg; der relative Treg-Gehalt unter T-Zellen war zwischen den HSZT-Modellen jedoch vergleichbar (vgl. Abb. 3.20). Sowohl bei der DT- als auch bei der PBS-Gruppe der allogene transplantierten BALB/c-Mäuse stiegen der absolute und relative Treg-Gehalt in der Milz zwischen Tag 7 und Tag 14 nach Intervention weiter leicht an. Während bei BALB/c-PBS-Mäusen DTR-stämmige Treg im Verlauf bis Tag 14 nach Intervention zunehmend von BM-stämmigen Treg verdrängt wurden, proliferierten nach gezielter Treg-Eliminierung ausschließlich BM-stämmige Treg als einzige verbleibende Treg-Entität. Eine vollständige Kompensation der in der Treg-Nische nach Intervention entstandenen Lücke gelang BALB/c-DT-Mäusen dennoch nicht, sodass die Tiere an Tag 7 und Tag 14 mit 7,8±0,7% bzw. 9,2±0,4% geringere Treg-Anteile unter T-Zellen besaßen als BALB/c-PBS-Mäuse mit 9,8±0,9% bzw. 11,8±0,4% (vgl. Abb. 3.20). Bei syngen transplantierten C57BL/6-Kontrolltieren zeigten sich zwischen Tag 7 und 14 nach Intervention keine Änderungen des relativen Treg-Anteils unter T-Zellen mehr, wobei auch hier im Verlauf Host-Treg zunehmend durch donorstämmige BM-Treg ersetzt wurden. Die oben erwähnte, zeitliche Verzögerung der T-Zell-Rekonstitution in C57BL/6-DT-Mäusen gegenüber C57BL/6-Kontrolltieren zeigte sich in Form nicht-signifikant erniedrigter absoluter Treg-Zellzahlen an Tag 7 nach Intervention, die sich jedoch nicht im relativen Treg-Anteil unter T-Zellen widerspiegeln. Bei C57BL/6-DT-Mäusen schlossen nach Eliminierung der

DTR-Treg – analog zu den Beobachtungen im Knochenmark – initial Host-Treg die im Treg-Kompartiment entstandene Lücke, bevor bis Tag 14 eine zunehmende Proliferation BM-stämmiger Treg mit Verdrängung der Host-stämmigen Treg auftrat. An Tag 14 bestand bei C57BL/6-DT-Mäusen eine gegenüber C57BL/6-PBS-Kontrolltieren nicht signifikant verringerte Treg-Frequenz unter T-Zellen (DT: 9,3%; PBS: 10,6%).

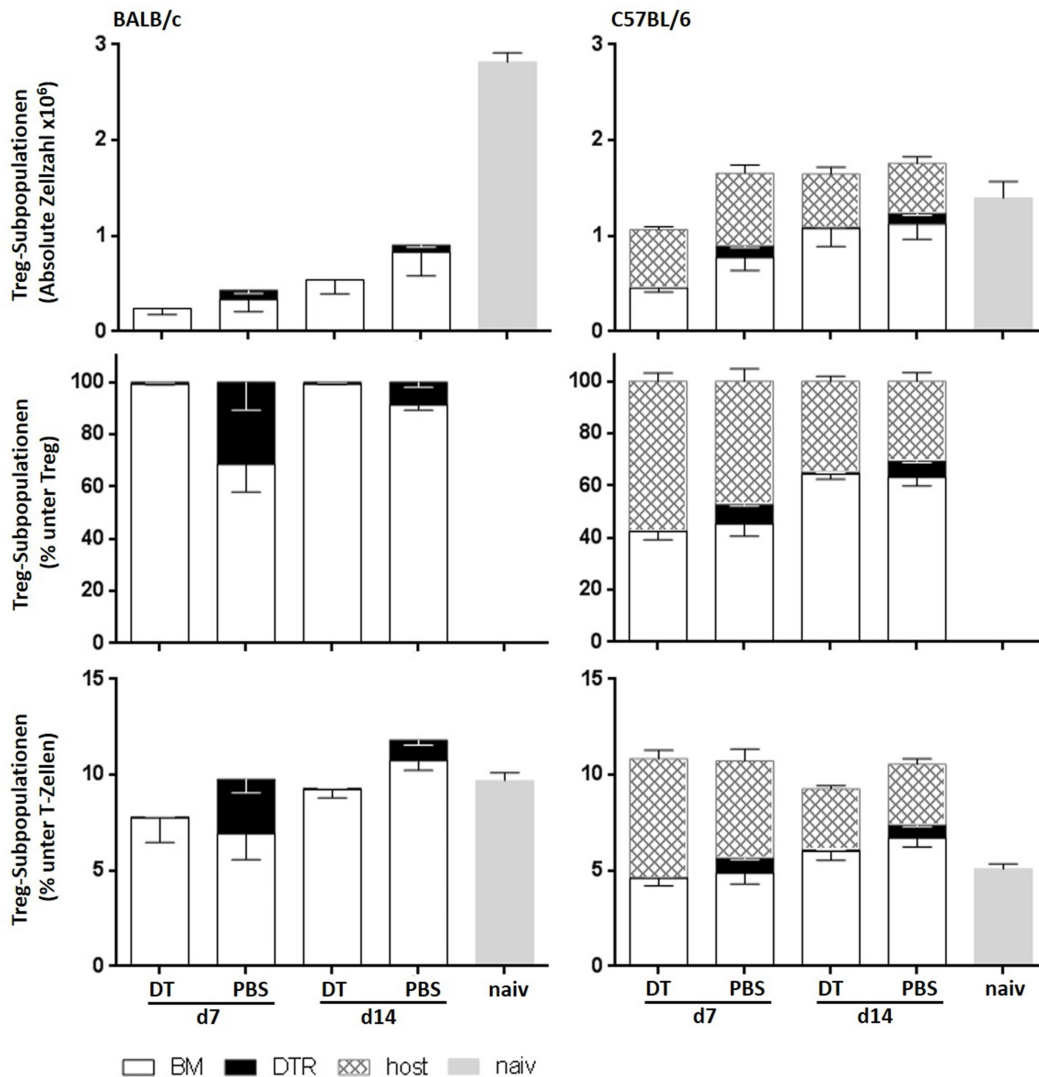


Abb. 3.20: Absolute Anzahl und relativer Anteil von Treg in der Milz der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse. Die Milzen der Versuchstiere wurden 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Eliminierung bzw. PBS-Gabe durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die splenischen Treg-Populationen mit Darstellung absoluter Zellzahlen, Abstammung der Treg je nach Expression der kongenen CD45/CD90-Marker (DTR, BM, Host) und relativer Treg-Frequenz unter T-Zellen (TCR $\beta^+$ ). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von n(BALB/c) = 5 Einzeltiere/Kohorte, n(C57BL/6) = 8 Einzeltiere/Kohorte, n(naiv=nicht-transplantiert) = 4 Einzeltiere/Kohorte.

Während BALB/c-DT-Mäuse an Tag 7 nach Intervention noch eine signifikant geringere Frequenz proliferierender Ki67<sup>+</sup> Treg in der Milz aufwiesen (13,7 $\pm$ 3,3% vs. 29,6 $\pm$ 1,1%; p<0,01), war diese an Tag 14 gegenüber BALB/c-PBS-Mäusen signifikant erhöht (26,2 $\pm$ 2,9%

vs.  $6,3 \pm 0,3\%$ ;  $p < 0,001$ ) (vgl. Abb. 3.21). Die Beobachtung deutet möglicherweise auf den Versuch einer Kompensation der in der Treg-Nische entstandenen Lücke hin.

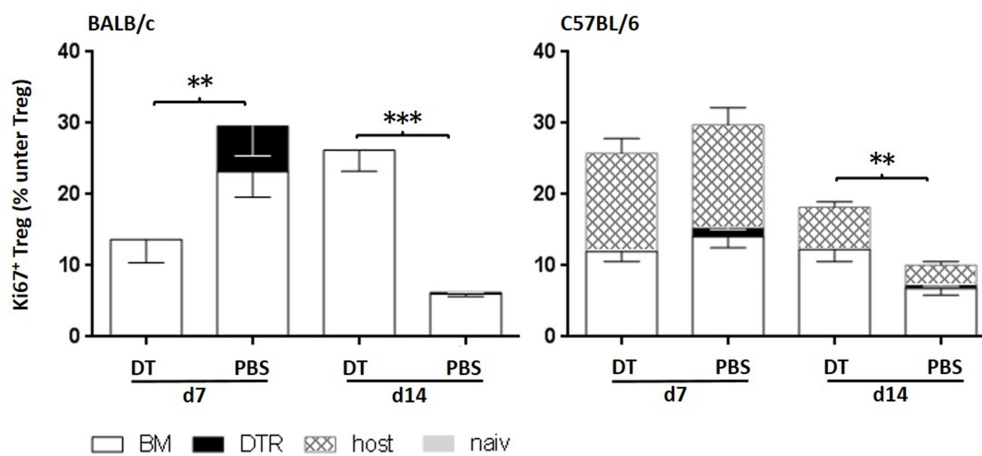


Abb. 3.21: Anteil proliferationsaktiver Treg in der Milz der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe. Die Milzen der Versuchstiere wurden 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Eliminierung bzw. PBS-Gabe durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die prozentualen Anteile proliferationsaktiver  $Ki67^+$  Treg unter allen splenischen Treg mit graphischer Darstellung der Abstammung der Zellen je nach Expression der kongenen CD45/CD90-Marker (DTR, BM, Host). \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (unabhängiger, ungepaarter Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n(\text{BALB/c}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{C57BL/6}) = 8$  Einzeltiere/Kohorte.

In C57BL/6-PBS-Mäusen war zwischen den Tagen 7 und 14 nach Intervention - ebenso wie in BALB/c-PBS Tieren - eine starke Abnahme des Anteils proliferierender Treg zu verzeichnen, am ehesten als Ausdruck einer gefüllten Treg-Nische und der Abwesenheit von Inflammationsreizen (vgl. Abb. 3.21). Im Gegensatz dazu ging der Anteil proliferierender Treg in C57BL/6-DT-Mäusen von Tag 7 bis Tag 14, vermutlich hervorgerufen durch die vorangegangene Treg-Eliminierung, nicht ganz so stark zurück und war damit an d14 noch signifikant höher als in C57BL/6-PBS Mäusen ( $18,2 \pm 2,3\%$  vs.  $10 \pm 1,2\%$ ;  $p < 0,01$ ).

Sowohl bei allogenen transplantierten BALB/c- als auch bei syngen transplantierten C57BL/6-Mäusen bewegten sich die Anteile konventioneller  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen in der Milz unabhängig von einer gezielten Treg-Elimination auf einem vergleichbaren Niveau, wobei der DTR-Anteil mit zunehmender Versuchsdauer in allen Kohorten zugunsten des BM-Anteils abnahm (vgl. Abb. 3.22). Die Frequenzen von  $T_{conv}$  entsprachen dabei jenen nicht-transplantierten Mäuse.

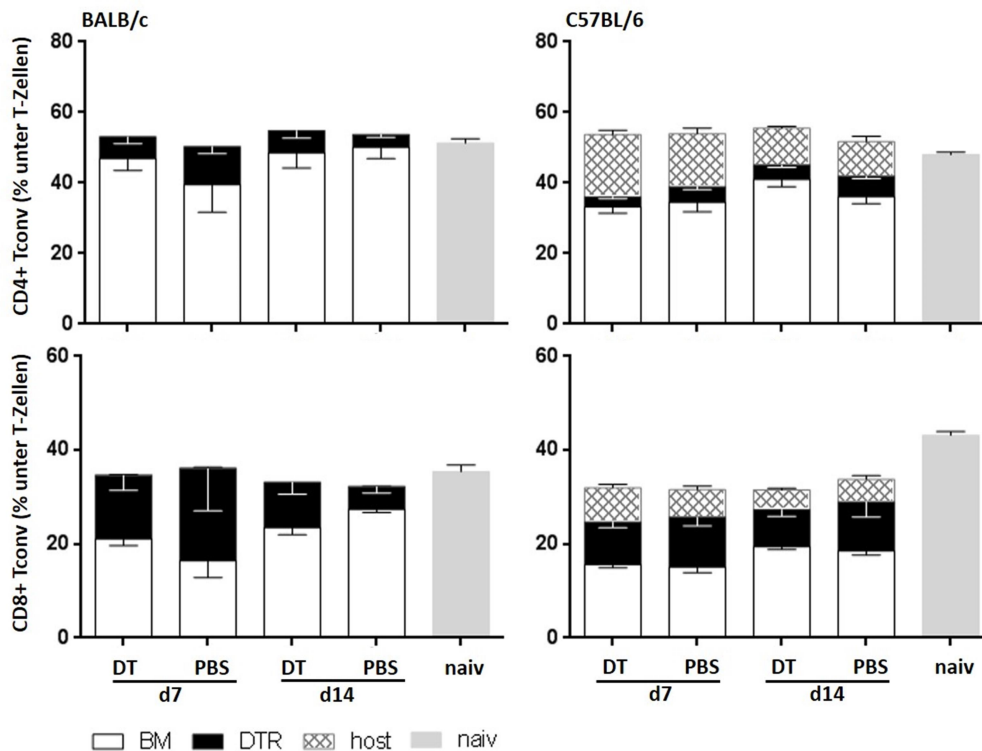


Abb. 3.22: Relativer Anteil von CD4<sup>+</sup> Tconv und CD8<sup>+</sup> Tconv unter T-Zellen in der Milz der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse. Die Milzen der Versuchstiere wurden 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Eliminierung bzw. PBS-Gabe durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Tconv-Populationen unter allen T-Zellen in der Milz mit Darstellung der Abstammung der Tconv je nach Expression der kongenen CD45/CD90-Marker (DTR, BM, Host). Dargestellt sind Mittelwerte±SEM von n(BALB/c) = 5 Einzeltiere/Kohorte, n(C57BL/6) = 8 Einzeltiere/Kohorte, n(naiv=nicht-transplantiert) = 4 Einzeltiere/Kohorte.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die gezielte Ausschaltung transplantatstämmiger Treg in allogenen transplantierten BALB/c-Mäusen zu einer Dysregulation der T-Zell-Nische führte: die verbliebenen, regulatorischen T-Zellen zeigten keine adäquate Proliferationsaktivität, konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen – insbesondere BM-stämmige – proliferierten dagegen überschießend. Der Effekt war im Untersuchungszeitraum im Knochenmark wesentlich deutlicher ausgeprägt als in der Milz. Die im Knochenmark veränderte CD4<sup>+</sup> Tconv:Treg-Ratio bei BALB/c-DT-Mäusen ist in Tab. 3.2 dargestellt. Dieses Missverhältnis trat in syngen transplantierten C57BL/6-Mäusen nicht auf: durch rasche, homöostatische Proliferation rezipientenstämmiger oder im Rezipienten nachreifender Treg nach Eliminierung der donorstämmigen Treg blieb die Gesamtfrequenz regulatorischer T-Zellen in Knochenmark und Milz annähernd konstant, ebenso die Frequenz konventioneller T-Zellen.

| <b>Tconv : Treg</b> | <b>d7 DT</b> | <b>d7 PBS</b> | <b>d14 DT</b> | <b>d14 PBS</b> |
|---------------------|--------------|---------------|---------------|----------------|
| BALB/c              | <b>8,45</b>  | 2,23          | <b>6,83</b>   | 1,59           |
| C57BL/6             | 1,19         | 1,20          | 1,68          | 1,32           |

Tab. 3.2.: **CD4<sup>+</sup>-Tconv:Treg-Ratio im KM der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe.** Grundlage der Berechnung bildeten die relativen Frequenzen von CD4<sup>+</sup> Tconv und Treg unter TCRαβ<sup>+</sup> T-Zellen im Knochenmark allogener (BALB/c) bzw. syngener (C57BL/6) transplantierte Mäuse 7 bzw. 14 Tage nach Treg-Eliminierung durch DT-Injektion (DT) oder Gabe von PBS (PBS; Kontrollen). In den DT-Gruppen des allogenen Mausmodells ergab sich an Tag 7 und Tag 14 nach Intervention eine pathologische Erhöhung der CD4<sup>+</sup>-Tconv:Treg-Ratio.

### 3.3.3. B-Zellen

Das Auftreten inflammatorischer Systemerkrankungen kann zu Störungen der B-Zell-Reifung führen, gleichzeitig sind im Rahmen autoimmunologischer Dysregulation auch überschießende B-Zell-Reaktionen möglich. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass das Auftreten einer aGvHD u.a. mit einer Inhibition von B-Vorläuferzellen im Knochenmark und damit einer Dysregulation der B-Zell-Reifung einhergeht. Die B-Zell-Reihe stellt somit im murinen Modell ein empfindliches Indikatorsystem für die GvHD dar.<sup>27</sup>

#### 3.3.3.1. B-Zellen im Knochenmark

In der Kontrollgruppe des allogenen HSZT-Modells ohne Treg-Manipulation fanden sich erst an Tag 40 nach KMT (Tag 14 nach Intervention) relevante Zellzahlen medullärer B-Zellen ( $5,2 \times 10^6$  / 19% unter MNC), die allerdings weiterhin hinter den Vergleichswerten nicht-transplantierte Mäuse ( $16,6 \times 10^6$  / 30% unter MNC) zurückblieben (vgl. Abb. 3.23). Der Grund für diese ungewöhnlich späte B-Zell-Rekonstitution blieb unbekannt und war unter Umständen der Anzahl der untersuchten Tiere (n = 5) eines singulären Experiments geschuldet. Ungeachtet der Absolutzellzahlen präsentierte sich die Verteilung der B-Zell-Subpopulationen zwischen transplantierten BALB/c-PBS-Mäusen an Tag 40 nach KMT und nicht-transplantierten BALB/c-Mäusen als vergleichbar: in den Frühstadien A, B und C (Prä-Pro- und Pro-B-Zellen) befanden sich insgesamt jeweils zwischen 15% und 20% aller heranreifenden B-Zellen im Knochenmark, im Stadium D ca. 65% (PBS) bzw. 60% (nicht-transplantiert), im Stadium E 15% (PBS) bzw. 20% (nicht-transplantiert) und im Stadium F jeweils zwischen 3% und 5% der Zellen (vgl. Abb. 3.23).



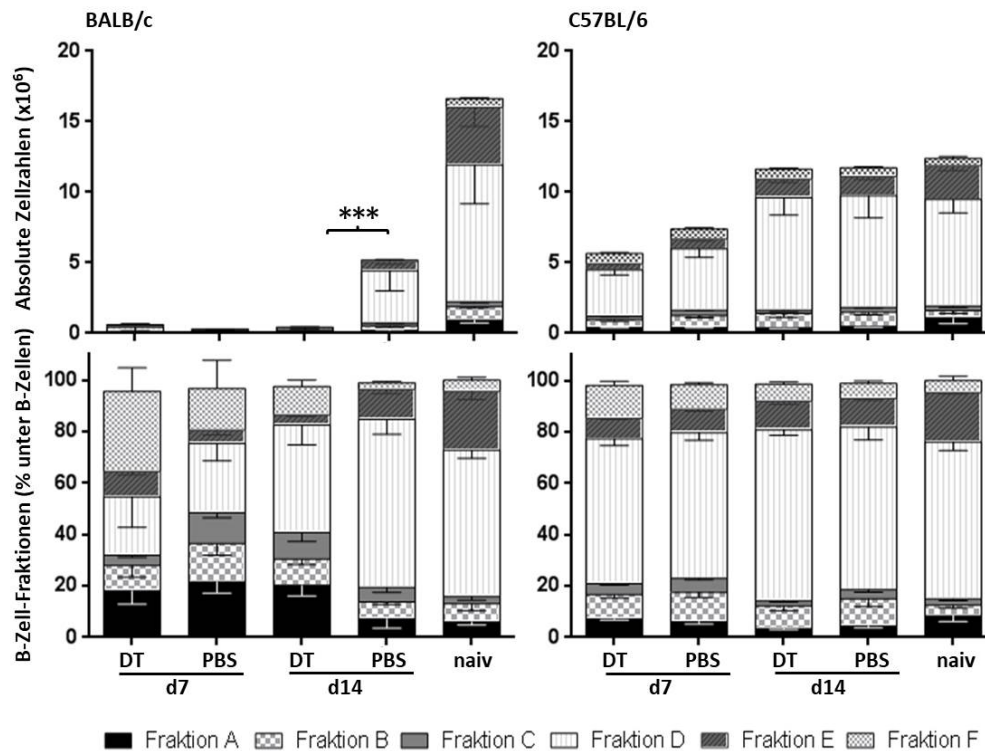


Abb. 3.23: B-Zell-Subpopulationen im KM der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse. Das Knochenmark der Versuchstiere wurde 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Elimination durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt werden die medullären B-Zell-Subpopulationen mit Darstellung absoluter Zellzahlen und relativer Anteile einzelner B-Zell-Reifungsstadien. Die Unterscheidung in die Fraktionen A-F nach Hardy et al.<sup>88</sup> erfolgte anhand der durchflusszytometrischen Erfassung der Oberflächenmarker BP-1, CD24, B220, CD43, IgD und IgM. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM von n(BALB/c) = 5 Einzeltiere/Kohorte, n(C57BL/6) = 8 Einzeltiere/Kohorte, n(naiv=nicht-transplantiert) = 4 Einzeltiere/Kohorte.

Demgegenüber fand bei BALB/c-DT-Mäusen nach gezielter Eliminierung transplantatstämmiger Treg auch bis Tag 14 nach Intervention keinerlei nennenswerte B-Zell-Rekonstitution statt, sodass sie zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu BALB/c-PBS-Mäusen absolut ( $0,3 \times 10^6$  vs.  $5,2 \times 10^6$ ;  $p < 0,001$ ; vgl. Abb. 3.23) und relativ (2,4% vs 19,1% B-Zellen unter MNC;  $p < 0,05$ ) betrachtet ein signifikant geringeres Maß an B-Zell besaßen. Gleichzeitig deutete die Zusammensetzung der B-Zell-Population in BALB/c-DT-Mäusen auf einen möglichen Reifungsstopp hin, da die frühen B-Zell-Stadien A-C bis zu einem Anteil von 40% akkumulierten (vgl. Abb. 3.23).

Im Gegensatz zum allogenen HSZT-Modell lag der B-Zell-Gehalt im Knochenmark der Kohorten des syngenem HSZT-Modells an Tag 33 nach KMT (Tag 7 nach Intervention) bereits auf der Hälfte des Niveaus nicht-transplantierte Vergleichsmäuse, bevor bis Tag 40 nach HSZT vergleichbare Werte erreicht wurden (vgl. Abb. 3.23). Die gezielte Treg-Elimination führte nur anfänglich zu einer transienten Verzögerung der B-Zell-Rekonstitution, sodass C57BL/6-DT-Mäuse an Tag 7 nach Intervention mit 15,2% B-Zellen

unter MNC einen signifikant geringeren B-Zell-Gehalt als C57BL/6-PBS-Mäuse mit 21,1% unter MNC aufwiesen ( $p < 0,05$ ; nicht abgebildet). Die Unterschiede erreichten in absoluten Zellzahlen gemessen keine statistische Signifikanz und verschwanden bis Tag 14 nach Intervention vollständig. Hinsichtlich der Zusammensetzung der B-Zell-Populationen ergab sich in den DT- und PBS-Gruppen des syngenen HSZT-Modells kein Anhalt für ein Vorliegen von Reifungsstörungen.

### 3.3.3.2. B-Zellen in der Milz

Die B-Zell-Rekonstitution in der Milz transplantierter BALB/c-Mäuse zeigte Parallelen zu der Entwicklung im Knochenmark. Nach einer Verzögerung der B-Zell-Rekonstitution in beiden BALB/c-Gruppen bis Tag 7 nach DT- bzw. PBS-Gabe wiesen nur BALB/c-PBS-Mäuse bis Tag 14 nach Intervention eine signifikante B-Zell-Population in der Milz auf ( $9,9 \times 10^6$  / 26% unter MNC), ohne dabei die Werte von nicht-transplantierten BALB/c-Mäusen zu erreichen ( $38,0 \times 10^6$  / 46% unter MNC). Auffallend war ein noch relativ hoher Anteil unreifer B-Zellen zu diesem Zeitpunkt (vgl. Abb. 3.24). Im Gegensatz dazu stagnierten die B-Zell-Zahlen von BALB/c-DT-Mäusen auch an Tag 14 nach Intervention bei  $2,6 \times 10^6$  (8,3% unter MNC;  $p < 0,05$ ; nicht abgebildet).

Die B-Zell-Rekonstitution in der Milz der C57BL/6-DT-Mäuse verlief analog zu den Befunden im Knochenmark langsamer als in C57BL/6-PBS-Mäusen. So traten an Tag 7 zwischen C57BL/6-DT- und PBS-Tieren signifikante Unterschiede im relativen B-Zell-Anteil unter MNC (35,2% vs. 48,1%;  $p < 0,01$ , vgl. Abb. 3.13) bzw. den absoluten B-Zell-Zahlen ( $22,8 \times 10^6$  vs.  $38,0 \times 10^6$ ; vgl. Abb. 3.24) auf, die jedoch bis Tag 14 nach Intervention vollständig verschwanden. In den relativen Anteilen von unreifen, folliculären und Marginalzonen-B-Zellen glichen sich DT- und PBS-Tiere zu beiden Zeitpunkten (vgl. Abb. 3.24).

Zusammenfassend trat in allogenen transplantierten BALB/c-Mäusen nach Eliminierung transplantatstämmiger Treg eine Störung der B-Zell-Reifung auf. Sowohl im Knochenmark, als auch in der Milz besaßen BALB/c-DT-Mäuse an Tag 14 signifikant weniger B-Zellen als BALB/c-PBS-Mäuse. Die Akkumulation früher B-Zell-Stadien im Knochenmark der BALB/c-DT-Tiere verdeutlichte das Vorliegen einer Ausreifungsstörung. In syngenen transplantierten C57BL/6-Mäusen führte die gezielte Treg-Elimination zwar zu einer Verzögerung der B-Zell-Reifung bis Tag 7 nach Intervention, dennoch erreichten

Interventions- und Kontrollgruppe bis Tag 14 nach Intervention jeweils vergleichbare Anteile von B-Zellen und B-Zell-Subpopulationen in Knochenmark und Milz.

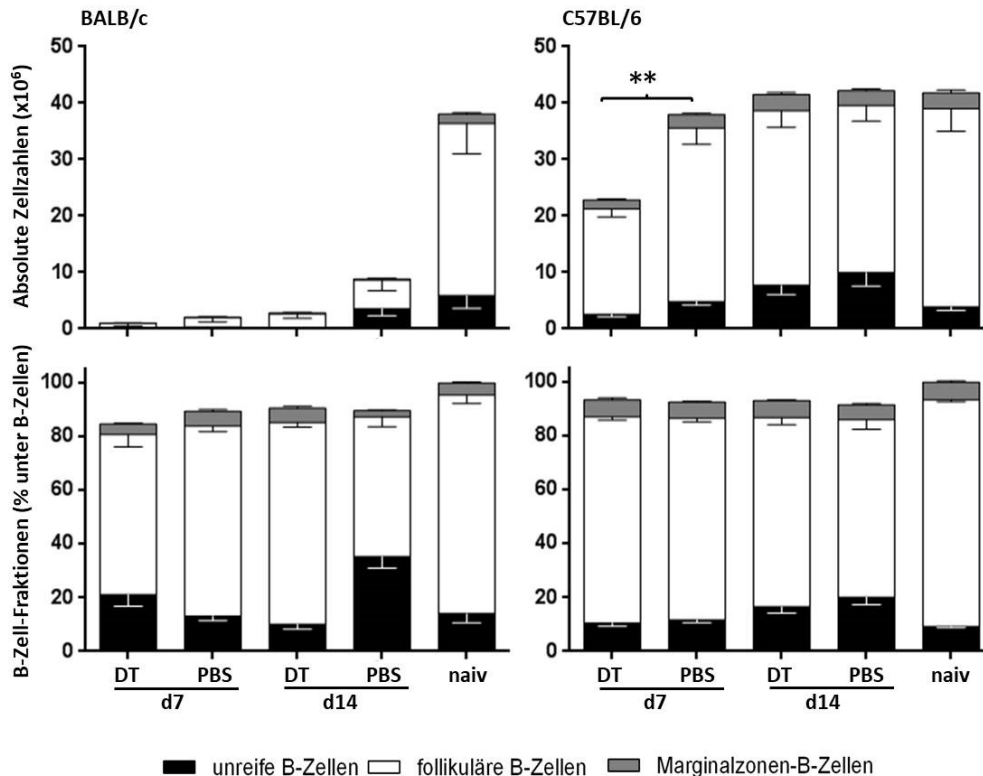


Abb. 3.24: **B-Zell-Subpopulationen in der Milz der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse.** Die Milzen der Versuchstiere wurden 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Eliminierung durchflussytometrisch analysiert. Gezeigt sind die splenischen B-Zell-Subpopulationen mit Darstellung absoluter Zellzahlen und relativer Anteile einzelner B-Zell-Reifungsstadien. Anhand der Oberflächenmarker CD21 und CD23 wurden unreife B-Zellen (CD21<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>) von folliculären (CD21<sup>low</sup>CD23<sup>+</sup>) und Marginalzonen-B-Zellen (CD21<sup>high</sup>CD23<sup>-</sup>) abgegrenzt. Dargestellt sind Mittelwerte±SEM von n(BALB/c) = 5 Einzeltiere/Kohorte, n(C57BL/6) = 8 Einzeltiere/Kohorte, n(naiv=nicht-transplantiert) = 3 Einzeltiere/Kohorte.

### 3.3.4. Granulozyten und Monozyten

Granulozyten und Monozyten sind als Bestandteile des angeborenen Immunsystems in inflammatorische Prozesse involviert. Ein Eindringen pathogener Keime in einen Organismus stellt ebenso wie auftretende Auto- oder Alloimmunität eine mögliche Ursache für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit Expansion von Granulozyten und Monozyten dar.

### 3.3.4.1. Granulozyten und Monozyten im Knochenmark

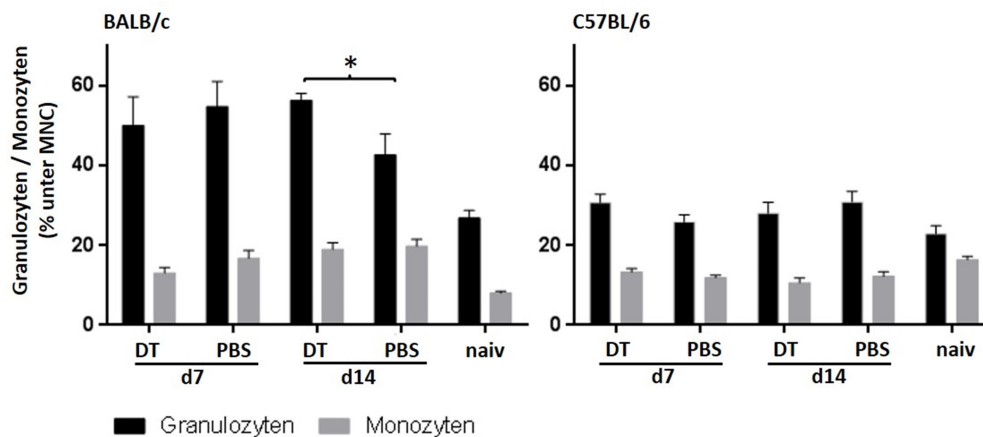


Abb. 3.25: **Relativer Anteil von Granulozyten und Monozyten im KM der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse.** Das Knochenmark der Versuchstiere wurde 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Eliminierung durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt werden die relativen Anteile von Granulozyten und Monozyten unter MNC im Knochenmark. An Tag 14 trat ein signifikanter Unterschied zwischen Interventions- und Kontrollgruppe der allogenen transplantierten BALB/c-Mäuse auf. \*,  $p < 0,05$  (ungepaarter, unabhängiger Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n(\text{BALB/c}) = 5$  Einzeltieren/Kohorte,  $n(\text{C57BL/6}) = 8$  Einzeltieren/Kohorte;  $n(\text{naiv}=\text{nicht-transplantiert}) = \text{je } 4$  Einzeltieren.

In transplantierten BALB/c-Mäusen fand sich vor dem Hintergrund der allogenen Transplantationssituation im Vergleich zu autolog transplantierten C57BL/6-Mäusen ein deutlich höherer Gehalt an Granulozyten im Knochenmark; der Monozytengehalt war dagegen in beiden Ansätzen (allogene und autologe Transplantation) vergleichbar. Während sich der medulläre Granulozytengehalt in der Kontrollgruppe des allogenen HSZT-Modells an Tag 40 nach KMT (Tag 14 nach Intervention) dem der nicht-transplantierten Mäuse annäherte, blieb er in der Interventionsgruppe nach gezielter Eliminierung transplantatstämmiger Treg signifikant erhöht (56% vs 43% unter MNC;  $p < 0,05$ ).

Im Gegensatz dazu zeigte die gezielte Treg-Eliminierung im syngenem HSZT-Modell keine relevanten Auswirkungen auf das schon weitgehend normalisierte Vorkommen von Granulozyten und Monozyten im Knochenmark.

### 3.3.4.2. Granulozyten und Monozyten in der Milz

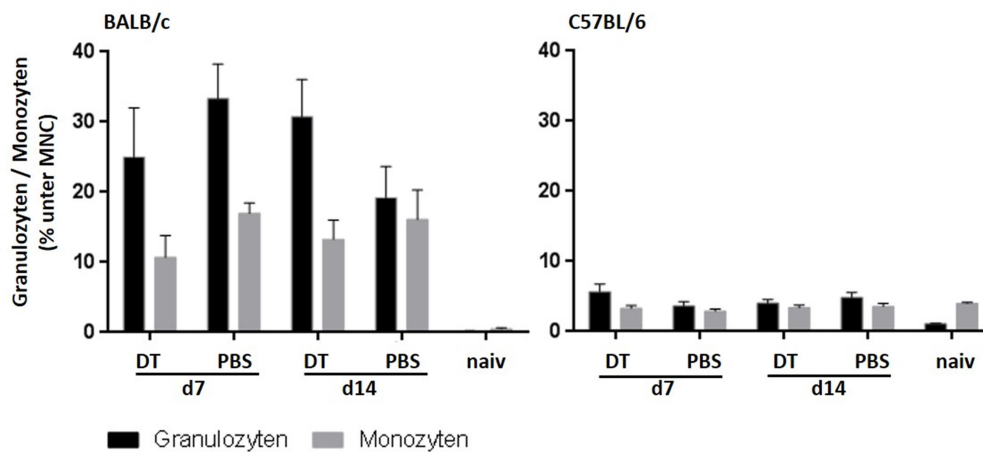


Abb 3.26: **Relativer Anteil von Granulozyten und Monozyten in der Milz der Empfängertiere an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe und Vergleichswerte nicht-transplantierte Mäuse.** Die Milzen der Versuchstiere wurden 7 und 14 Tage nach gezielter Treg-Elimination durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt werden die relativen Anteile von Granulozyten und Monozyten unter MNC in der Milz. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von n(BALB/c) = 5 Einzeltiere/Kohorte, n(C57BL/6) = 8 Einzeltiere/Kohorte, n(naiv=nicht-transplantiert) = 4 Einzeltiere/Kohorte.

Analog zu den Befunden im Knochenmark erwies sich auch der splenische Granulozyten- und Monozytengehalt in allogenen transplantierten BALB/c-Mäusen gegenüber syngen transplantierten C57BL/6-Mäusen als deutlich erhöht. Innerhalb des allogenen Modells präsentierte sich die durchschnittliche Granulozytenfrequenz in der Milz der Kontrolltiere bis Tag 40 nach KMT (Tag 14 nach Intervention) als rückläufig – im Sinne einer nachlassenden Inflammation nach allogener HSZT –, während die Granulozytenfrequenz in Interventionstieren nach gezielter Treg-Eliminierung auf höherem Niveau verblieb (30,8% vs 19,2%; vgl. Abb. 3.26). Diese Unterschiede zwischen Interventions- und Kontrollgruppe des allogenen HSZT-Modells im Granulozytengehalt in der Milz an Tag 40 nach HSZT wurden auch anhand absoluter Zellzahlen deutlich (DT:  $10,9 \pm 1,8 \times 10^6$ ; PBS:  $5,5 \pm 0,5 \times 10^6$ ) und erreichten hier statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ; nicht abgebildet). Zwischen den Kohorten transplantierte C57BL/6-Mäuse ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in der Granulozyten- und Monozytenfrequenzen in der Milz; beide Gruppen zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu Normalwerte.

Insgesamt führte die Ausschaltung transplantatstämmiger Treg in allogenen transplantierten BALB/c-Mäusen bis Tag 14 nach Intervention zu einer Zunahme des Granulozytengehalts in den untersuchten Kompartimenten; im Knochenmark waren die Unterschiede bei Betrachtung der relativen Zellzahlen (% unter MNC) statistisch signifikant, in der Milz bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen. Bezüglich der Monozytenfrequenz ergaben sich keine signifikanten

Unterschiede zwischen den BALB/c-Kohorten. In syngen transplantierten C57BL/6-Mäusen blieb die Treg-Eliminierung ohne relevante Auswirkungen auf die Granulozyten- und Monozytenfrequenzen in Knochenmark und Milz.

### 3.4. Histologische und molekularbiologische Analyse von Dünn- und Dickdarm

Der Darm ist ein Haupt-Zielorgan allo- oder autoimmunologischer Erkrankungen.<sup>94</sup> Der im Rahmen akuter GvHD am Gastrointestinaltrakt entstehende Schaden trägt entscheidend zur Morbidität und Mortalität betroffener Patienten nach allogener HSZT bei.<sup>95</sup> Strukturelle Schädigungen des Darmepithels lassen sich anhand histologischer Schnittpräparate nachweisen; humorale Veränderungen, beispielsweise eine Verschiebung hin zu einem proinflammatorischen Zytokinmilieu, können molekularbiologisch mittels quantitativer RT-PCR erfasst werden.

Bei der Aufarbeitung der Versuchstiere vor bzw. an Tag 7 und 14 nach gezielter Treg-Elimination wurde daher jeweils Darmgewebe für histologische und molekularbiologische Untersuchungen gewonnen. Histologische Schnitte von Dünn- und Dickdärmen wurden verblindet pathologisch begutachtet und auf das Vorliegen von Nekrosen und Entzündungszeichen (Score nach Kaplan<sup>86</sup>) hin untersucht. Die aus den einzelnen Darmabschnitten isolierte RNA wurde dazu verwendet, die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3, des antimikrobiellen Proteins Reg3 $\gamma$ , der pro- und antiinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-17 und IL-22 sowie der Chemokine CCL2 und MIP2 zu quantifizieren.

#### 3.4.1. Histopathologische Untersuchung von Dünndärmen transplantierte Mäuse vor und nach gezielter Eliminierung reif transplantierte, donorstämmiger Treg

Die mittels Kaplan-Score bestimmte entzündliche Aktivität in den Dünndärmen der transplantierten BALB/c-Mäuse zeigte Unterschiede zwischen allogener Interventions- und Kontrollgruppe.

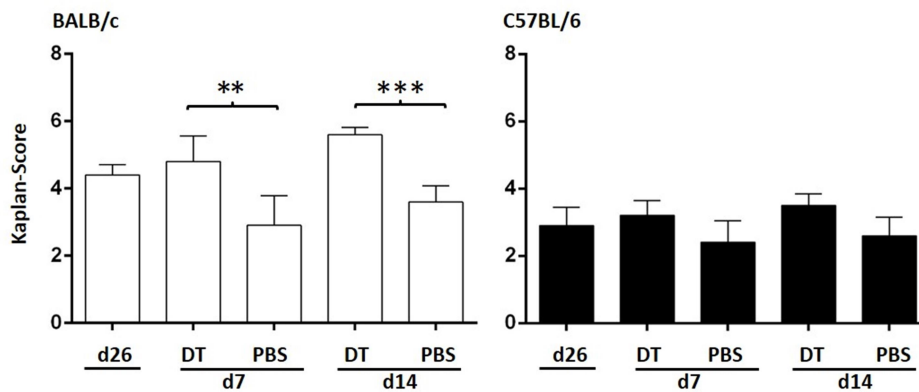


Abb. 3.27: **Histopathologischer Score des Dünndarms der Empfängertiere vor sowie 7 und 14 Tage nach DT-/PBS-Gabe.** Unmittelbar vor gezielter Treg-Elimination mittels DT-Gabe sowie 7 und 14 Tage nach erster DT-Gabe wurde den Versuchstieren der Dün- und Dickdarm entnommen und nach histologischer Aufarbeitung begutachtet. Gezeigt ist der histopathologische Score (nach Kaplan et al.) der Dünndärme der Versuchstiere. An den Tagen 7 und 14 nach Intervention zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Interventions- und Kontrollgruppe des allogenen Transplantationsmodells. \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (ungepaarter, unabhängiger Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n(\text{BALB/c}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte und  $n(\text{C57BL/6}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte.

Innerhalb der BALB/c-DT-Gruppe war nach Eliminierung der reif transplantierten, donorstämmigen Treg an Tag 26 eine stetige Zunahme der Inflammation über Tag 33 und Tag 40 (resp. Tag 7 und Tag 14 nach Intervention) hinweg zu beobachten, während der Wert innerhalb der BALB/c-PBS-Gruppe bis Tag 7 nach Intervention deutlich abnahm und anschließend stagnierte, sodass an beiden Untersuchungstagen signifikant unterschiedliche histopathologische Scores zwischen den Kohorten auftraten (vgl. Abb. 3.27). Die Zunahme der Inflammation in BALB/c-DT-Mäusen wurde als Zeichen von Alloimmunität mit Affektion des Darms nach gezielter Depletion der transplantatstämmigen Treg gewertet. Klinisches Korrelat war das Auftreten von Durchfällen bei einigen der BALB/c-DT-Mäusen.

Derartige Unterschiede waren zwischen den C57BL/6-Kohorten nicht zu verzeichnen. Zwar zeigte der Kaplan-Score an Tag 7 und Tag 14 eine angedeutete Erhöhung der inflammatorischen Aktivität in den Dünndärmen der C57BL/6-DT-Mäuse im Vergleich zu C57BL/6-PBS-Mäusen, allerdings erreichten die Unterschiede kein Signifikanzniveau. Klinisch erwiesen sich sämtliche C57BL/6-Mäuse als unauffällig; Durchfälle traten bei keinem der Tiere auf.

Die Vermessung der Dünndarmlängen zeigte weder bei BALB/c- noch bei C57BL/6-Mäusen signifikante Unterschiede zwischen Interventions- und Kontrollgruppen (nicht abgebildet).

### 3.4.2. Histopathologische Untersuchung von Dickdärmen transplantiertter Mäuse vor und nach gezielter Eliminierung reif transplantiertter, donorstämmiger Treg

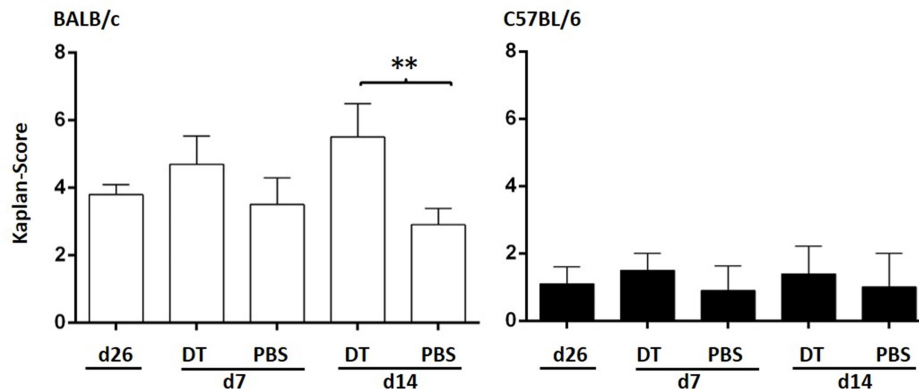


Abb. 3.28: **Histopathologischer Score des Dickdarms der Empfängertiere vor sowie 7 und 14 Tage nach DT-/PBS-Gabe.** Unmittelbar vor gezielter Treg-Eliminierung mittels DT-Gabe sowie 7 und 14 Tage nach erster DT-Gabe wurde den Versuchstieren der Dün- und Dickdarm entnommen und nach histologischer Aufarbeitung begutachtet. Gezeigt ist der histopathologische Score (nach Kaplan et al.) der Dickdärme der Versuchstiere. Am Tag 14 nach Intervention zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Interventions- und Kontrollgruppe des allogenen HSZT-Modells. \*\*,  $p < 0,01$  (ungepaarter, unabhängiger Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n(\text{BALB/c}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte und  $n(\text{C57BL/6}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte.

Unabhängig davon, ob die Mäuse der Interventions- oder Kontrollgruppe angehörten, fanden sich in den Dickdärmen allogenen transplantiertter BALB/c-Mäuse mehr Anzeichen von Inflammation als in den Dickdärmen syngenen transplantiertter C57BL/6-Mäuse (vgl. Abb. 3.28). Beide Mausmodelle unterschieden sich dabei deutlich in der Dynamik der Inflammation nach stattgehabter Intervention. Ausgehend von dem Zustand an Tag 26 nach HSZT war, analog zu den Befunden im Dünndarm, das Ausmaß der Inflammation im Dickdarm von BALB/c-PBS-Mäusen an Tag 7 und 14 nach Intervention konstant rückläufig. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei BALB/c-DT-Mäusen nach Ausschaltung transplantatstämmiger Treg eine stetige Zunahme der inflammatorischen Aktivität, sodass an Tag 14 ein signifikant erhöhtes Maß an pathologischen Veränderungen im Vergleich zu BALB/c-PBS-Mäusen bestand (vgl. Abb. 3.28). Wie bereits erwähnt, entwickelten einige der BALB/c-DT-Mäuse Durchfälle.

Bei C57BL/6-DT-Mäusen zeigte sich an Tag 7 und 14 nach Intervention im Vergleich zu Tag 26 keine relevante Zunahme der inflammatorischen Aktivität im Dickdarm. Auch zwischen C57BL/6-DT- und PBS-Mäusen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Hinsichtlich der vermessenen Dickdarmlängen ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Interventions- und Kontrollgruppen transplantiertter BALB/c- respektive C57BL/6-Mäuse (nicht abgebildet).



### 3.4.3. Expression von FoxP3 und immunmodulierenden Zytokinen im Dünndarm

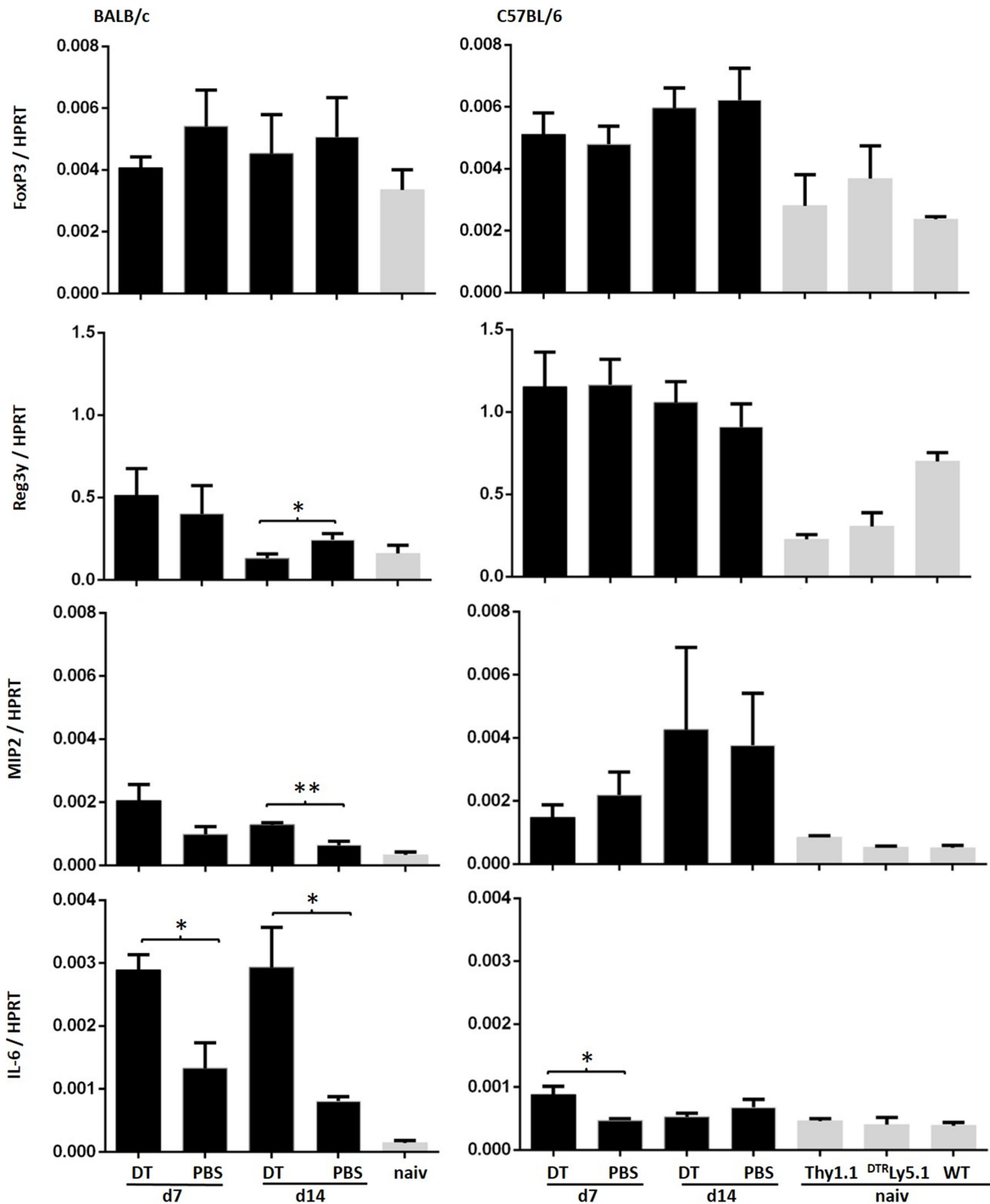


Abb. 3.29: Expression von FoxP3, Reg3 $\gamma$  und immunmodulierenden Zytokinen (MIP2, IL-6) im Dünndarm von Empfängertieren an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe. An den Tagen 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe wurde die Expression der gezeigten Faktoren mittels quantitativer RT-PCR in Darmhomogenisaten bestimmt. Dargestellt ist die relative Expression in Bezug zum konstitutiv exprimierten 'housekeeping' Gen HPRT. Dünndarmhomogenisate nicht-transplantierte Tiere (naiv) wurden zum Vergleich analysiert. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$  (ungepaarter, unabhängiger Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n(\text{BALB/c}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{C57BL/6}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{naiv}) = 3$  Einzeltiere/Kohorte.

Die Quantität der FoxP3-mRNA im Gewebe stellt ein indirektes Maß für die Frequenz regulatorischer T-Zellen dar. Zwischen BALB/c-DT- und BALB/c-PBS-Mäusen ergaben sich hinsichtlich der FoxP3-Expression an Tag 7 und Tag 14 keine signifikanten Unterschiede – bei jeweils angedeutetem Vorteil für BALB/c-PBS-Mäuse. Als Zeichen einer Inflammation zeigten BALB/c-DT-Mäuse jedoch eine gegenüber BALB/c-PBS-Mäusen signifikant erhöhte Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 an Tag 7 und 14 sowie des Chemokins MIP2 an Tag 14 (vgl. Abb. 3.29). Darüber hinaus ließ sich bei BALB/c-DT-Mäusen eine gegenüber BALB/c-PBS-Mäusen signifikant erniedrigte Expression von Reg3 $\gamma$  im Dünndarm detektieren, die als indirektes Anzeichen eines Verlusts von intestinalen Paneth-Zellen als Charakteristikum einer akuten GvHD (vgl. 4.) gewertet werden kann.

Es zeichnete sich zudem eine vermehrte Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN $\gamma$  im Dünndarm allogene transplantierte BALB/c-Mäusen nach Ausschaltung der DTR-Treg ab, die aber kein Signifikanzniveau gegenüber der BALB/c-Kontrollgruppe erreichte (vgl. Abb. 3.30).

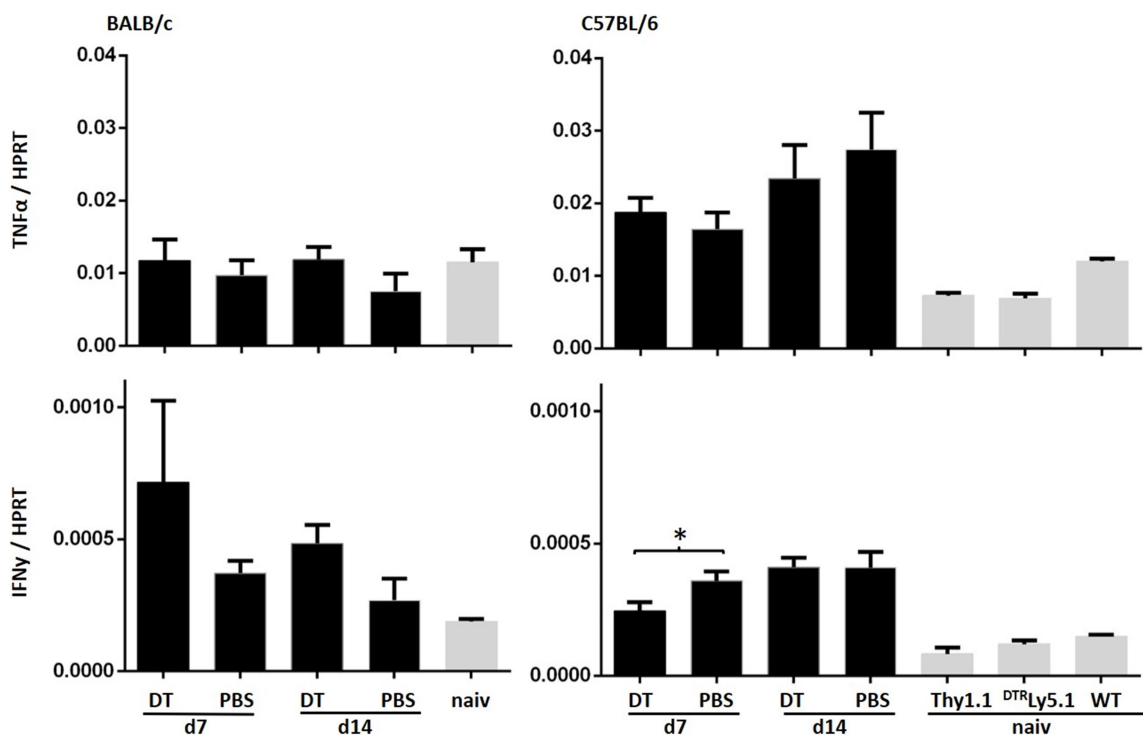


Abb. 3.30: Expression von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  im Dünndarm von Empfängertieren an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe. An den Tagen 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe wurde die Expression der gezeigten Faktoren mittels quantitativer RT-PCR in Darmhomogenisaten bestimmt. Dargestellt ist die relative Expression in Bezug zum konstitutiv exprimierten 'housekeeping' Gen HPRT. Dünndarmhomogenisate nicht-transplantierte Tiere (naiv) wurden zum Vergleich analysiert. \*, p<0,05, \*\*, p<0,01 (ungepaarter, unabhängiger Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von n(BALB/c) = 5 Einzeltiere/Kohorte, n(C57BL/6) = 5 Einzeltiere/Kohorte, n(naiv) = 3 Einzeltiere/Kohorte.

Bei C57BL/6-Mäusen bestand an Tag 7 nach DT-Gabe einerseits eine signifikant erhöhte Expression des proinflammatorischen IL-6 (vgl. Abb. 3.29), gleichzeitig eine signifikant erniedrigte Expression des proinflammatorischen IFN $\gamma$  im Vergleich zu C57BL/6-PBS-Mäusen (vgl. Abb. 3.30). Die genannten Unterschiede nivellierten sich bis Tag 14, sodass beide C57BL/6-Kohorten zu diesem Zeitpunkt ein vergleichbares Zytokinexpressionsmuster im Dünndarm aufzeigten. Ein vermehrtes Maß an Inflammation im Dünndarm von C57BL/6-Mäusen infolge der Eliminierung reif transplantiertter Spender-Treg konnte somit auf molekularbiologischer Ebene nicht nachgewiesen werden.

Die quantitativen Untersuchungen anderer Zytokine (CCL2, IL-10, IL-17, IL-22) zeigten weder bei BALB/c- noch bei C57BL/6-Mäusen signifikante Unterschiede.

#### 3.4.4. Expression von FoxP3 und immunmodulierenden Zytokinen im Dickdarm

Der Dickdarm ist statistisch häufiger und schwerer vom Krankheitsgeschehen einer akuten GvHD betroffen als der Dünndarm.<sup>96</sup> Dem Vergleich der Abbildungen 3.30 und 3.31 ist zu entnehmen, dass in den Dickdärmen der allogenen transplantierten Versuchstiere sowohl TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  als auch FoxP3 stärker exprimiert werden als im Dünndarm. Entsprechend stehen sich Inflammation und Gegenregulation in diesem Organ deutlicher gegenüber.

Analog zu den Befunden im Dünndarm zeigte sich im Dickdarm von BALB/c-DT-Mäusen und BALB/c-PBS-Mäusen eine vergleichbare Expression von FoxP3, wodurch ein genereller Mangel an regulatorischen T-Zellen während des Beobachtungszeitraums ausgeschlossen werden kann. Vereinbar mit dem histologischen Befund einer vermehrten Inflammation, ließen sich im Dickdarm von BALB/c-DT-Mäusen an Tag 14 allerdings gegenüber BALB/c-PBS-Mäusen signifikant erhöhte Expressionen der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  nachweisen (vgl. Abb. 3.31). Im Gegensatz dazu gab es zwischen den C57BL/6-Kohorten im Dickdarm keine relevanten Unterschiede in der Expression von FoxP3, TNF $\alpha$ , oder IFN $\gamma$ .

Hinsichtlich der weiteren, quantifizierten Zytokine (CCL2, MIP2, IL-6, IL-10, IL-17, IL-22) ergaben sich weder zwischen den BALB/c- noch zwischen den C57BL/6-Kohorten relevante Unterschiede.

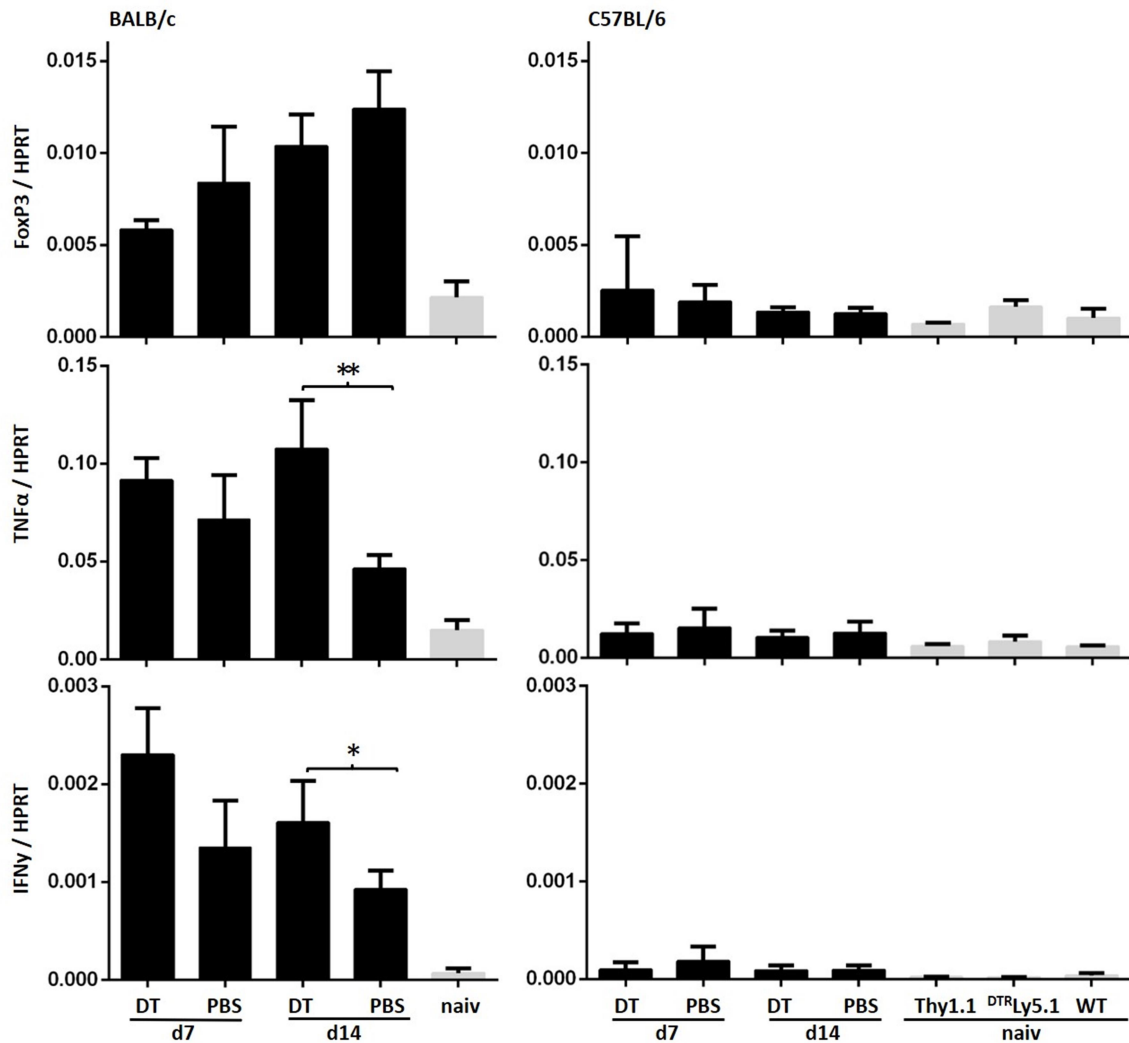


Abb. 3.31: Expression von FoxP3 und immunmodulierenden Zytokinen (TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ ) im Dickdarm von Empfängertieren an Tag 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe. An den Tagen 7 und 14 nach DT-/PBS-Gabe wurde die Expression der gezeigten Faktoren mittels quantitativer RT-PCR in Darmhomogenisaten bestimmt. Dargestellt ist die relative Expression in Bezug zum konstitutiv exprimierten 'housekeeping' Gen HPRT. Dünndarmhomogenisate nicht-transplantierte Tiere (naiv) wurden zum Vergleich analysiert. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$  (ungepaarter, unabhängiger Student's t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n(\text{BALB/c}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{C57BL/6}) = 5$  Einzeltiere/Kohorte,  $n(\text{naiv}) = 3$  Einzeltiere/Kohorte.

Anhand der Histologie von Dün- und Dickdarm sowie der Expressionsanalyse von FoxP3 und verschiedenen Zytokinen zeigte sich, dass die selektive Ausschaltung transplatatstämmiger Treg nach allogener HSZT zu vermehrter inflammatorischer Aktivität führte, wohingegen der Verlust der genannten Treg-Population nach syngener HSZT nur mit einer leichten, nicht signifikant erhöhten inflammatorischen Aktivität im Darmgewebe einherging, die auf einer transienten Imbalance zwischen regulatorischen und konventionellen T-Zellen beruhen könnte.

## 4 Diskussion

Die allogene Stammzelltransplantation (HSZT) ist ein Therapieverfahren zur Behandlung verschiedener maligner und nicht-maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems. Trotz erheblicher Verbesserung von Verfügbarkeit, Anwendbarkeit und Sicherheit des Verfahrens im Verlauf der vergangenen Jahrzehnte bleibt die allogene HSZT aufgrund potenziell schwerwiegender Komplikationen lebensbedrohlichen Erkrankungssituationen vorbehalten.<sup>97</sup> Neben Krankheitsrückfällen und Transplantatversagen stellt die Graft-versus-host-Erkrankung (GvHD) eine Hauptkomplikation des Therapieverfahrens dar. Bei der GvHD handelt es sich um eine posttherapeutische, immunologische Dysregulation in Empfängern, die durch transplantatstämmige, alloreaktive, konventionelle T-Zellen vermittelt wird und eine Zerstörung von empfängereigenem Körpergewebe – insbesondere Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt – zur Folge hat.<sup>98</sup> Aktuelle Strategien zur Prävention und Therapie der GvHD beruhen im Wesentlichen auf einer langfristigen, medikamentösen Induktion einer generalisierten Immunsuppression. Nachteile der Methode sind insbesondere das Risiko opportunistischer Infektionen, das ungünstige Nebenwirkungsprofil verschiedener Immunsuppressiva, sowie die teils unzureichende therapeutische Wirksamkeit der gängigen Therapieregimes bei höhergradiger GvHD.<sup>98</sup> Neuere Therapieansätze streben nach einer möglichst selektiven Hemmung des Immunsystems zur Prophylaxe bzw. Therapie der GvHD, wodurch einerseits die Effektivität der GvHD-spezifischen Therapie gesteigert und andererseits das Ausmaß therapieassoziierter Nebenwirkungen verringert werden sollen.<sup>99</sup> Ein erfolgsversprechender Ansatz hierfür ist die Verwendung regulatorischer T-Zellen (Treg) als „natürliche Immunsuppressoren“.<sup>100</sup> Ausgangspunkt der Bemühungen um Treg als Immunregulatoren war die Feststellung, dass eine kongenitale Dysfunktion dieser Zellen infolge einer Mutation im liniendefinierenden FoxP3-Gen zu letaler Autoimmunität führt.<sup>39,42,47</sup> Von dem Defekt betroffene, sogenannte ‚scurfy‘-Mäuse präsentieren ein lymphoproliferatives Syndrom mit entzündlichen Veränderungen an Augen, Ohren und Extremitäten, sowie Hepatosplenomegalie, Lymphknotenschwellungen und diffusen, lymphozytären Organinfiltrationen.<sup>101</sup> Effektoren des Krankheitsbilds sind konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die bei fehlender Suppression durch Treg autoimmuninflammatorische Schäden verursachen.<sup>102</sup> Seit der Entdeckung der immunsuppressiven Eigenschaften von Treg wurden Physiologie und therapeutisches Potenzial der Zellen in zahlreichen Studien untersucht. Anhand muriner HSZT-Modelle zeigte sich einerseits, dass die Verabreichung Treg-depletierter, MHC-inkompatibler Transplantate von Knochenmark und Splenozyten

bzw. Knochenmark und splenischen T-Zellen zu schwerster GvHD in Rezipienten führt<sup>103</sup>, andererseits, dass der adoptive Transfer donorstämmiger Treg im Rahmen MHC-inkompatibler HSZT das Auftreten letaler GvHD in Rezipienten verhindert, ohne etwaige Graft-versus-Leukämie-Effekte zu vermindern.<sup>80,82,104</sup> Seit wenigen Jahren werden Treg auch innerhalb von Studien im Rahmen humaner allogener HSZT zur Prophylaxe oder Therapie der GvHD verwendet. Die bislang erzielten Ergebnisse sind ermutigend. Im Rahmen klinischer Studien wurden u.a. Patienten mit AML-, ALL- oder NHL-Hochrisikoerkrankungen mittels haploidenter HSZT therapiert, wobei zusätzlich zum Stammzelltransplantat Spender-Tconv und Spender-Treg gegeben, postinterventionell jedoch keinerlei Immunsuppressiva verabreicht wurden. Die Inzidenzen von Krankheitsrückfällen und GvHD präsentierten sich hierbei als deutlich geringer im Vergleich zu konventionell therapierten Patientenkollektiven.<sup>79,105</sup> Bislang veröffentlichte Einzelfallberichte legen auch eine Wirksamkeit von Treg als Therapeutikum bei bereits bestehender GvHD im Menschen nahe.<sup>106</sup> Diese vielversprechende Einsatzmöglichkeit ist Gegenstand aktueller Studien, an denen auch das Universitätsklinikum Regensburg federführend beteiligt ist.<sup>107</sup>

Hinsichtlich der prophylaktischen und therapeutischen Verwendung von Treg stellt sich die Frage, welche Subpopulationen – d.h. donor- oder rezipientenstämmige Treg – nach allogener HSZT zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase beitragen können. Hoffmann et al. konnten in einer Grundlagenarbeit zur therapeutischen Nutzbarkeit von Treg am murinen Modell zeigen, dass Rezipienten MHC-inkompatibler Stammzelltransplantate durch den adoptiven Transfer donorstämmiger Treg vor dem Auftreten letaler GvHD geschützt werden, nicht jedoch durch den Transfer empfängerstämmiger Treg.<sup>82</sup> Gleichzeitig ist seit Entdeckung und Analyse der ‚scurfy‘-Maus bekannt, dass ein Mangel an regulatorischen T-Zellen per se – unabhängig vom Vorliegen eines allogenen Stimulus – zu immunologischer Dysregulation führen kann. Dies konnte durch Entwicklung neuer Mauslinien mit selektiv eliminierbaren Treg durch die Arbeitsgruppen von A. Rudensky und T. Sparwasser experimentell verifiziert werden.<sup>84,85</sup> Bei FoxP3<sup>DTR</sup>-Mäusen (Rudensky) und DEREK-Mäusen (Sparwasser) wurden mit Hilfe unterschiedlicher Techniken Fusionsgene in das Genom eingebracht, die unter Kontrolle des FoxP3-Promotors jeweils für das *green fluorescence protein* (gfp) sowie den Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) kodieren. Da Mäuse per se kein DTR exprimieren, führt die Injektion von Diphtherie-Toxin (DT) so in beiden Mausmodellen zur selektiven Depletion der Treg, die durchflusszytometrisch über die Expression von gfp verfolgt werden können. Das FoxP3-Expressionsmuster der „knock in“-Mäuse bleibt unverändert. Während in DEREK-Mäusen allerdings 5-10% der regulatorischen T-Zellen eine DT-Insensitivität und gfp-

Negativität aufweisen – und somit nicht vollständig eliminiert werden können –, exprimieren in FoxP3<sup>DTR</sup>-Mäusen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, sämtliche regulatorische T-Zellen sowohl gfp als auch den DT-Rezeptor.<sup>84,108</sup>

Nach einer allogenen HSZT existieren im Empfänger verschiedene Treg-Populationen unterschiedlicher Herkunft und Entwicklungsgeschichte: zum einen die im Spender gereiften und mit dem Transplantat in den Empfänger transferierten Treg, zum anderen die residuellen Treg des Empfängers und schließlich die aus transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen im Empfänger neu ausdifferenzierten Treg. Während kotransplantierte Spender-Treg alloantigen-spezifisch aktiviert werden und dadurch suppressive Aktivität gewinnen, sollten die beiden letztgenannten Treg-Subpopulationen aufgrund ihres Reifungsprozesses im Empfänger keine gegen ihn gerichteten Klone enthalten und damit Toleranz gegen den Empfänger aufweisen.

Von unserer Arbeitsgruppe wurden verschiedene Untersuchungen zur Bedeutung donorstämmiger Treg für die Immunhomöostase nach allogener HSZT durchgeführt. Im allogenen Setting zeigte sich anhand eines C57BL/6\_FoxP3<sup>DTR</sup>→BALB/c HSZT-Modells, dass eine komplette Depletion donorstämmiger Treg in Empfängertieren mittels DT-Applikation zu letaler GvHD führt (unveröffentlichte Ergebnisse). Später konnte von unserer Arbeitsgruppe die besondere Rolle donorstämmiger Treg in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase nach allogener HSZT experimentell weiter verdeutlicht werden: durch HSZT eines künstlich zusammengesetzten Knochenmarktransplantats mit selektiv eliminierbaren Spender-Treg (C57BL/6\_Ly5.1(TZD-KM)+C57BL/6\_FoxP3<sup>DTR</sup> KM-T-Zellen) in MHC-inkompatible BALB/c-Empfänger – analog dem Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit – wurde nachgewiesen, dass auch die isolierte Depletion kotransplantierte Treg ohne Manipulation empfangereigener oder im Empfänger gereifter Treg zu letaler GvHD führt (unveröffentlichte Ergebnisse). Dass eine komplette Treg-Depletion auch ohne Vorliegen von Allostimuli zu schwerer Autoimmunität mit letalem Verlauf führen kann, war aus Experimenten mit nicht-transplantierten FoxP3<sup>DTR</sup>-Mäusen bekannt: so entwickeln FoxP3<sup>DTR</sup>-Mäuse nach DT-Applikation ein zu Treg-defizienten ‚scurfy‘-Mäusen vergleichbares Krankheitsbild mit Entzündungen von Augen, Ohren, Haut und Schwanz sowie Hepatosplenomegalie, Anämie und Lymphknotenschwellungen.<sup>84</sup> Diese früheren Ergebnisse führten zur Fragestellung der Arbeit: ist die im allogenen HSZT-Modell nach gezielter Elimination der Spender-Treg beobachtete systemische Erkrankung tatsächlich Folge einer Spender-Tconv-abhängigen Immundysregulation oder führt jeder (transiente)

Treg-Mangel unweigerlich zu einer systemischen, (auto-)inflammatorischen Reaktion mit Krankheitsfolge?

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden allogene und autologe HSZT am murinen Modell vorgenommen und hierbei ein künstlich zusammengesetztes Transplantat eingesetzt, in dem nur reif transplantierte Spender-Treg den DT-Rezeptor tragen und jene Zellen gleichzeitig über kongene Marker sowohl von Empfänger-Treg als auch von im Empfänger gereiften Spender-Treg unterschieden werden können. Dies ermöglichte nicht nur die gezielte Eliminierung der mit dem Stammzelltransplantat kotransplantierten Treg und ihrer Nachkommen durch Verabreichung von DT, sondern erlaubte auch ihre durchflusszytometrische Detektion. Im Nachgang der interventionellen Treg-Depletion wurden die allogenen und syngen transplantierten Versuchstiere klinisch, durchflusszytometrisch, histologisch und molekularbiologisch hinsichtlich des Auftretens einer systemischen Inflammationserkrankung untersucht.

Die DT-Injektionen führten im allo- und syngenem Mausmodell vorübergehend zu einer vollständigen Depletion der transplantatstammigen Treg (DTR-Treg), sodass die Zellen in den durchflusszytometrischen Analysen von Knochenmark, Milz und peripherem Blut an den Tagen 7 und 14 nach Intervention nicht mehr nachweisbar waren. Überraschenderweise zeigten Chimerismusanalysen des peripheren Bluts ein Wiederauftreten von DTR-Treg ca. 20 bis 40 Tage nach deren Eliminierung, wenn auch nur in sehr geringem Ausmaß. Auf diesen Befund wird weiter unten im Detail eingegangen.

Klinisch präsentierten die Versuchstiere von allogenen und syngenem HSZT-Modell unterschiedliche Verläufe nach selektiver Depletion der DTR-Treg. Die syngen transplantierten C57BL/6-Mäuse blieben nach der Intervention körperlich unauffällig. Insbesondere traten keine Anzeichen einer systemischen, inflammatorischen Erkrankung auf, wie sie bei kongenital Treg-defizienten ‚scurfy‘-Mäusen<sup>101</sup> oder künstlich vollständig Treg-depletierten FoxP3<sup>DTR</sup>-Mäusen<sup>85</sup> beobachtet werden. Demgegenüber entwickelten die allogenen transplantierten BALB/c-Mäuse infolge der DTR-Treg-Eliminierung typische Anzeichen einer akuten GvHD und boten schuppiges Fell, schorfige Haut, Durchfälle und Gewichtsverlust. Die Symptomlast war in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten jedoch moderat ausgeprägt und nicht von letalem Ausmaß und bildete sich im Verlauf – parallel zum Wiederauftreten der DTR-Treg – wieder zurück.



Der geringer ausgeprägte Krankheitsverlauf des allogenen HSZT-Modells im Rahmen der Arbeit stand im Kontrast zu Befunden aus dem etablierten C57BL/6→BALB/c GvHD-Mausmodell<sup>109</sup> und Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe zur selektiven Ausschaltung von donorstämmigen Treg nach allogener HSZT. In dem „klassischen“ C57BL/6→BALB/c GvHD-Mausmodell<sup>109</sup> erfolgt die Induktion der GvHD durch Inokulation von Spender-Splenozyten oder -T-Zellen an Tag 0, wodurch eine exzessive Expansion alloreaktiver Spender-T-Zellen auf dem Boden vorhandener Konditionierungsschäden bewirkt wird, die in den Empfängertieren zu einer fulminanten und letalen GvHD führt. Zu einer solchen, schweren GvHD mit letalem Krankheitsverlauf war es in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe auch in HSZT-Modellen mit vollständiger oder selektiver Depletion der reif transplantierten, donorstämmigen Treg im Empfänger gekommen (unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Ursache der vergleichsweise milden Krankheitsverläufe nach selektiver DTR-Treg-Depletion infolge der allogenen HSZT im Rahmen dieser Arbeit – insbesondere im Vergleich zu früheren Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe – blieb unklar, wobei hierfür mehrere Erklärungsmöglichkeiten bestehen. Einerseits könnten unterschiedlich gewählte Mausstamm-Kombinationen für die divergenten klinischen Verläufe verantwortlich zeichnen – in der vorliegenden Arbeit entstammt das eliminierbare Spender-T-Zell-Kompartiment FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Mäusen, in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe FoxP3<sup>DTR</sup>-Mäusen. Möglicherweise führen die konventionellen T-Zellen aus FoxP3<sup>DTR</sup>\_Ly5.1-Spendertieren im allogenen Empfängertier nach Verlust der donorstämmigen Treg aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrunds zu weniger aggressiver GvHD im Vergleich zu entsprechenden Zellen aus FoxP3<sup>DTR</sup>-Spendertieren. Andererseits könnte die Ursache der moderaten GvHD-Symptomatik in der Menge der transplantierten Spender-T-Zellen zu sehen sein. Den Rezipienten im Rahmen dieser Arbeit wurden an Tag 0 jeweils  $75 \times 10^3$  T-Zellen transplantiert, entsprechend einem T-Zell-Gehalt des Transplantats von 3%. In späteren, identisch aufgebauten Kontrollversuchen der eigenen Arbeitsgruppe wurden auch Transplantate mit 5% und 10% T-Zell-Gehalt verwendet, in denen nach Eliminierung der DTR-Treg stärkere und teilweise letal endende GvHD unter den allogenen Empfängertieren auftrat. In den erwähnten, früheren Versuchen der Arbeitsgruppe mit Verwendung eines Spender-T-Zell-Kompartiments aus FoxP3<sup>DTR</sup>-Mäusen war jedoch bereits ein T-Zell-Gehalt des Transplantats von 3% zur Induktion letaler GvHD-Verläufe ausreichend. Eine weitere Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete, moderate und vorübergehende GvHD in allogenen Empfängertieren könnte die bereits erwähnte Wiederkehr der eliminierten DTR-Treg im Verlauf sein.

Die eliminierten DTR-Treg waren in den durchflusszytometrischen Analysen von Knochenmark, Milz und peripherem Blut an Tag 7 und Tag 14 nach erster DT-Gabe nicht nachweisbar, traten aber 20 bis 40 Tage nach deren Eliminierung in Chimerismusanalysen des peripheren Bluts erneut auf. Deren relativer Anteil erwies sich mit maximal 0,5% aller peripheren T-Zellen bzw. maximal 5% aller peripheren Treg im Verlauf als gering und als vergleichbar zum Vorkommen von peripheren DTR-Treg in entsprechenden PBS-Kontrolltieren. Für das Wiederauftreten von DTR-Treg nach DT-Gabe bestehen zwei Möglichkeiten: einerseits könnte es sich um residuelle, reif transplantierte DTR-Treg handeln, die von der dreimaligen DT-Applikation nicht erfasst wurden und erneut expandierten, oder um unreif transplantierte, im Empfänger ausgereifte DTR-Treg, die zum Zeitpunkt der DT-Applikationen noch kein FoxP3 und damit auch keine DT-Rezeptoren exprimierten. In ersterem Falle würde es sich bei den wiederauftretenden DTR-Treg um im Spender gereifte, alloreaktive Treg handeln, in letzterem Falle um im Empfänger ausgereifte, autoreaktive Treg. Interessanterweise trat die klinische Zustandsverbesserung der GvHD nach DTR-Treg-Depletion in zeitlichem Zusammenhang mit der Treg-Regeneration auf, sodass ein von diesen Zellen ausgehender protektiver Effekt nahelag. Dieser spräche dafür, dass es sich bei den regenerierenden DTR-Treg um transplantatstämmige, reife DTR-Treg handelte, die von den DT-Applikationen unvollständig erfasst wurden.

Eine experimentelle Überprüfung des Sachverhalts wäre durch eine Wiederholung der DT-Injektionen nach Wiederauftreten der DTR-Treg mit Frage nach erneuter Zustandsverschlechterung der Mäuse möglich. Darüber hinaus könnte die Anzahl der – im Versuchsaufbau dreimaligen – DT-Injektionen erhöht werden, um möglicherweise noch langfristige und vollständigere Treg-Depletionen zu erzielen. Die Erstpublikation über das FoxP3<sup>DTR</sup>-Mausmodell empfiehlt DT-Injektionen zu je 0,5µg an sieben aufeinanderfolgenden Tagen, um eine optimale Treg-Depletion zu erzielen.<sup>84</sup> Inwieweit jedoch vom interventionell verabreichten Diphtherie-Toxin auch eine unspezifische Toxizität ausgehen kann, wird kontrovers diskutiert. Einerseits stellten Christiaansen et al. bei Experimenten mit DREG- und C57BL/6-WT-Mäusen fest, dass aus ungeklärter Ursache sowohl virusinfizierte DREG- als auch virusinfizierte C57BL/6-Wildtyp-Mäuse nach Applikation von DT letale Krankheitsverläufe entwickelten, während virusinfizierte, PBS-behandelte Kontrolltiere deutlich harmlosere Krankheitsverläufe boten.<sup>110</sup> Andererseits zeigten Versuche unserer Arbeitsgruppe mit DT-Injektionen in Ly5.1 versus Ly5.1\_FoxP3<sup>DTR</sup>→BALB.B HSZT-Modellen dass erstere in klinischen und durchflusszytometrischen Analysen keinerlei Reaktion auf das verabreichte DT zeigten.

In der vorliegenden Arbeit führte die – transiente – Depletion der DTR-Treg in den allogenen transplantierten BALB/c-Mäusen zu einer Dysregulation der T-Zell-Nische: im Knochenmark vermochten verbliebene, empfängerstämmige bzw. empfängergereifte Treg die entstandene Lücke im Treg-Kompartiment nicht zu kompensieren, sodass dort und im peripheren Blut ein signifikanter Mangel an Treg entstand; in der Milz war der Effekt dagegen nur angedeutet zu beobachten. Gleichzeitig fand eine signifikante Expansion von CD4<sup>+</sup> Tconv im Knochenmark der allogenen transplantierten Rezipienten statt. Eine exzessive Expansion von CD4<sup>+</sup> Tconv ist ein bekannter Pathomechanismus in der Entstehung muriner und humaner GvHD und typisch für das verwendete, MHC-inkompatible C57BL/6 → BALB/c-Mausmodell.<sup>111</sup> Ganz überwiegend expandierte im vorliegenden Experiment interessanterweise die Population der CD4<sup>+</sup> BM-Tconv, d.h. derjenigen donorstämmigen CD4<sup>+</sup> Tconv, die aus den transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen im Empfänger ausreiften. Für deren überschießende Aktivität im allogenen HSZT-Modell nach Eliminierung der DTR-Treg bestehen zwei denkbare Ursachen. Die Zellen könnten trotz Reifung im Thymus reaktiv gegenüber Empfänger-Antigenen sein und bei fehlender Treg-Suppression expandieren. Zwar sollten sie nach thymischer Reifung eigentlich tolerant gegen den Empfänger sein, allerdings könnte der Prozess der TCR- und MHC-abhängigen, thymischen Selektion<sup>112</sup> durch eine MHC-Barriere zwischen C57BL/6-stämmigen Tconv und BALB/c-Thymusgewebe gestört sein. Andererseits könnten die unreif transplantierten BM-Tconv im Falle einer erfolgreichen, thymischen Reifung im Empfänger bei fehlender Treg-Suppression autoreaktiv sein.

Prinzipiell können lymphoproliferative Syndrome auch außerhalb des allogenen HSZT-Settings in nicht-transplantierten Tieren im Rahmen eines Treg-Mangels auftreten, wie Kim et al. anhand des etablierten FoxP3<sup>DTR</sup>-Mausmodells zeigten: die vollständige Treg-Eliminierung in adulten FoxP3<sup>DTR</sup>-Mäusen mittels repetitiven DT-Injektionen induzierte eine Expansion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Tconv, die zu systemischer Inflammation und fulminanten, letalen Krankheitsverläufen führte.<sup>84</sup> Bei dem im Rahmen der Arbeit verwendeten syngenem Transplantationsmodell blieb die Eliminierung der – je nach betrachtetem Kompartiment 10-50% aller vorhandenen Treg umfassenden – DTR-Treg-Subpopulation ohne weitreichende Konsequenzen für die T-Zell-Homöostase oder den Allgemeinzustand der Tiere: kurzfristige Disparitäten im medullären, splenischen und peripheren Treg-Kompartiment wurden durch eine homöostatische Proliferation verbleibender Treg-Populationen ausgeglichen; klinisch blieben die Mäuse unauffällig. Hinweise auf ein lymphoproliferatives Syndrom oder speziell auf eine CD4<sup>+</sup> Tconv-Expansion analog zum allogenen HSZT-Modell ergaben sich nicht. Die Beobachtungen im syngenem Mausmodell deckten sich mit Befunden von Lahl et al.<sup>85</sup> sowie

Mayer et al.<sup>108</sup> nach Treg-Eliminierungsexperimenten mit DEREK-Mäusen. Aufgrund der 10% DT-insensitiven Treg in DEREK-Mäusen führt eine DT-Behandlung (jeweils 1µg/d DT über 5d) in den Tieren zu einer entsprechend inkompletten Treg-Ablation mit Rekonstitution der Treg-Nische innerhalb von zwei Wochen. In adulten DEREK-Mäusen zieht die Intervention keine autoimmunologischen Phänomene nach sich.<sup>85</sup> Verschiedene Sublinien des von Suffner et al. etablierten Mausmodells FoxP3.LuciDTR verdeutlichen ebenfalls, dass eine relevante immunologische Dysregulation in nicht-transplantierten Tieren erst bei einem nahezu totalen Treg-Mangel zu erwarten ist.<sup>113</sup> Im FoxP3.LuciDTR-Mausmodell exprimieren Treg neben DT-Rezeptoren und gfp auch das Enzym Luciferase, das ein Tracking der Zellen im lebenden Tier via Biolumineszenz imaging (*in vivo* BLI)<sup>114</sup> ermöglicht. Verschiedene Sublinien dieses Mausmodells erlauben eine unterschiedlich ausgeprägte Treg-Depletion. So können mittels DT-Gabe (jeweils 0,15ng/g/d über 2d) in FoxP3.LuciDTR-3-Mäusen je nach betrachtetem Kompartiment bis zu 75% aller Treg eliminiert werden, in FoxP3.LuciDTR-4-Mäusen bis zu 90% aller Treg und in FoxP3.LuciDTR-5-Mäusen mehr als 95% aller Treg.<sup>113</sup> Während die Treg-Elimination in FoxP3.LuciDTR-3-Mäusen klinisch und immunologisch ohne jegliche Folgen bleibt und zu einer Rekonstitution des peripheren Treg-Kompartiments innerhalb von zwei Wochen führt, präsentieren FoxP3.LuciDTR-4-Mäuse infolge der Intervention Splenomegalie und Lymphknotenschwellungen und FoxP3.LuciDTR-5-Mäuse versterben an einem nicht näher spezifizierten „wasting-syndrom“. Die Studie über die verschiedenen FoxP3.LuciDTR-Modelle verdeutlicht, dass die periphere Immuntoleranz mitunter von der Quantität des Treg-Kompartiments abhängig ist. Die Tatsache, dass die inkomplette Treg-Elimination bei dem im Rahmen der Arbeit verwendeten syngenen HSZT-Modell klinisch ebenso folgenlos blieb wie Treg-Eliminationen bei adulten DEREK- oder FoxP3.LuciDTR-3-Mäusen, legt somit nahe, dass die klinische Symptomatik des hier verwendeten allogenen HSZT-Modells nicht alleine Folge eines relativen Treg-Mangels sein kann.

Wenngleich insbesondere kotransplantierten Donor-Treg eine essenzielle Bedeutung in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase nach HSZT zukommt, stellte sich im Rahmen der Arbeit dennoch die Frage, inwieweit empfängerstämmige Treg Einfluss auf die Immunhomöostase der transplantierten und DTR-Treg-depletierten Versuchstiere besaßen. Syn- und allogenes HSZT-Modell unterschieden sich im Rahmen der durchgeführten Versuche in den Anteilen verbleibender Empfänger-T-Zellen nach Konditionierung und Transplantation: während in syngen transplantierten C57BL/6-Mäusen empfängerstämmige („Host“-stämmige) T-Zellen initial noch die größte T-Zell-Fraktion darstellten und im Verlauf

zugunsten BM-stämmiger Zellen abnahmen, besaßen allogene transplantierte BALB/c-Mäuse nach Konditionierung und Transplantation nahezu keine empfängerstämmigen T-Zellen bzw. Treg mehr. Nach Elimination der DTR-Treg ging in den syngen transplantierten C57BL/6-Mäusen die anfängliche, homöostatische Proliferation in der Treg-Nische interessanterweise überwiegend von empfängerstämmigen Treg aus, bevor auch BM-stämmige Spender-Treg proliferierten. Insofern waren empfängerstämmige Treg im syngen Modell zumindest an der Kompensation der in der Treg-Nische entstandenen Lücke beteiligt. Dass empfängerstämmige Treg nach allogener Transplantation keine ausreichend protektive Wirkung besitzen, zeigte eine frühere Studie aus der Arbeitsgruppe<sup>82</sup>: dort wurde anhand des auch hier verwendeten, allogenen HSZT-Modells (C57BL/6→BALB/c) nachgewiesen, dass eine Co-Transplantation donorstämmiger Treg eine Protektion vor GvHD vermittelt, während der Transfer gleicher Zellmengen rezipientenstämmiger Treg lediglich eine nicht signifikante Verlängerung der Überlebensdauer in Empfängertieren bewirkt. Die Ursache der marginalen Verlängerung der Überlebensdauer durch den Transfer rezipientenstämmiger Treg könnte in den u.a. zellkontakt-unabhängigen Wirkmechanismen von Treg (vgl. 1.4) mit unspezifischer Hemmung systemischer, inflammatorischer Prozesse gelegen haben. Gemäß der Natur allogener Stammzelltransplantationen mit – therapeutisch gewünschter – Spender-versus-Empfänger-Aktivität ist das Fehlen empfängerstämmiger T-Zellen zwar ein zu erwartender Effekt, im Rahmen des vorliegenden Versuchs stellte das Fehlen empfängerstämmiger Treg im allogenen HSZT-Modell jedoch eine gewisse Limitation in der Vergleichbarkeit zwischen allogenen und syngenen HSZT-Modell dar, nachdem nicht auszuschließen ist, dass letzteres von der längeren Persistenz empfängerstämmiger Treg profitierte. Ein quantitativer Effekt der Abwesenheit empfängerstämmiger Treg im verwendeten, allogenen HSZT-Modell war, dass die eliminierbare DTR-Treg-Population dort, relativ betrachtet, einen größeren Anteil an der Treg-Gesamtpopulation einnahm als im syngenen HSZT-Modell, sodass nach DTR-Treg-Eliminierung eine entsprechend größere Lücke im Treg-Kompartiment auftrat.

Interessant gestaltete sich die Betrachtung der B-Zell-Kompartimente der Empfängertiere nach Depletion kotransplantierte Spender-Treg. Anhaltende B-Zell-Defizienz ist eine mögliche Komplikation humaner und muriner GvHD.<sup>26,115</sup> Aus murinen Experimenten der Arbeitsgruppe (K. Doser, Dissertation 2011) über die Rekonstitution der B-Zell-Nische nach allogener Stammzelltransplantation ist bekannt, dass das Auftreten von GvHD zu B-Zell-Ausreifungsstörungen bereits auf Ebene der B-Vorläuferzellen führen kann.<sup>27</sup> So konnte gezeigt werden, dass aus Knochenmark-Zellkulturen GvHD-kranker Tiere keine B-Zellen hervorgehen. Zudem wurde in *in vivo*-Studien demonstriert, dass eine zu unterschiedlichen

Zeitpunkten induzierte GvHD jeweils zum Verlust des B-Zell-Kompartiments in Rezipienten führt und die Replantation von Knochenmark GvHD-kranker Tiere eine verzögerte B-Zell-Rekonstitution in Empfängern der nächsten Generation auslöst. Tatsächlich trat auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Depletion donorstämmiger Treg in allogenen transplantierten Mäusen das Phänomen einer B-Zell-Reifungsstörung auf. Im peripheren, splenischen und insbesondere medullären Kompartiment zeigte sich jeweils ein relativer Mangel an B-Zellen. Im Knochenmark wurde eine Akkumulation früher B-Zell-Reifungsstadien beobachtet, sodass die Störung der Lymphopoese offenbar auch hier bereits auf Ebene der B-Vorläuferzellen bestand. Die pathologischen Veränderungen der B-Zell-Nische ergänzten das Bild auftretender Alloimmunität im allogenen HSZT-Modell nach Intervention. Die Beobachtung, dass das postinterventionell veränderte B-Zell-Kompartiment im allogenen HSZT-Modell parallel zum Wiederauftreten der zuvor eliminierten DTR-Treg regenerierte, unterstützt die These, dass es sich bei diesen DTR-Treg – wie oben diskutiert – um residuelle, reif transplantierte, donorstämmige Treg handelte und legt wiederum einen von diesen Zellen vermittelten, protektiven Effekt nahe.

Aus ‚scurfy‘-Mäusen sowie Treg-depletierten FoxP3<sup>DTR</sup>- und FoxP3.LuciDTR-Mäusen ist bekannt, dass Veränderungen des B-Zell-Kompartiments auch im Rahmen von Autoimmunität auftreten können. Dies präsentiert sich bei den genannten Mausmodellen allerdings weniger in einem B-Zell-Mangel als vielmehr in einer pathologisch gesteigerten B-Zell-Aktivität. Von Blair et al. wurde beschrieben, dass bei ‚scurfy‘-Mäusen im Rahmen des lymphoproliferativen Syndroms mitunter eine Vermehrung und Aktivierung von B-Zellen auftritt.<sup>102</sup> Aschermann et al. zeigten im Umkehrschluss, dass B-Zell-defiziente ‚scurfy‘-Mäuse im Vergleich zu herkömmlichen ‚scurfy‘-Mäusen deutlich abgemilderte Krankheitssymptome darbieten.<sup>116</sup> Kim et al. beobachteten eine Proliferation von B-Zellen nach Treg-Ablation in FoxP3<sup>DTR</sup>-Mäusen<sup>84</sup>, Suffner et al. eine systemische Expansion von B-Zellen nach inkompletter Treg-Ablation in Foxp3.LuciDTR-Mäusen.<sup>113</sup> Mögliche Pathomechanismen der B-Zell-Überaktivität infolge des relativen oder absoluten Treg-Mangels in den genannten Mausmodellen wurden in den jeweiligen Publikationen nicht diskutiert; Hintergrund könnte u.a. jedoch eine gesteigerte Interaktion zwischen B-Zellen als antigenpräsentierenden Zellen und reaktiven T-Zellen bei fehlender Treg-Suppression sein. Interessanterweise trat im Gegensatz zu den genannten, autoimmun dysregulierten Mausmodellen beim im Rahmen der Arbeit verwendeten, syngenem HSZT-Modell nach Depletion der DTR-Treg eine – wenn auch nur transiente – Verzögerung der B-Zell-Rekonstitution auf. Dies äußerte sich in einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant

erniedrigten B-Zell-Frequenz im Knochenmark sowie einer nicht-signifikant erniedrigten B-Zell-Frequenz in der Milz an Tag 7 nach Intervention. In beiden Kompartimenten normalisierten sich die B-Zell-Frequenzen bis Tag 14. Die Analyse der B-Zell-Reifungsstadien an Tag 7 sprach dabei nicht für eine Akkumulation von Vorstufen bzw. das Vorliegen eines Reifungsstopps, wie er beim allogenen HSZT-Modell beobachtet wurde.

Für das Phänomen der verzögerten B-Zell-Reifung im syngenen HSZT-Modell sind verschiedene Ursachen denkbar. Zum einen könnte der transiente Treg-Mangel im syngenen HSZT-Modell einen kurzzeitigen, autoimmunen Angriff auf die Stammzell-Nische ermöglicht haben. Aus murinen *in vivo*-Imaging-Studien von Fujisaki et al. ist bekannt, dass Treg in proprietären Stammzell-Nischen kumulieren, um die Stammzellen vor Angriffen durch das Immunsystem zu schützen.<sup>117</sup> Dieser Mechanismus könnte durch die Eliminierung der DTR-Treg – die nach Kompartiment 10-50% aller Treg umfassten – gestört worden sein, sodass über eine Beeinträchtigung der Stammzellen kurzfristig ein quantitativer B-Zell-Mangel mit unveränderter, relativer Verteilung der B-Vorläuferzellen entstand, der nach homöostatischer Proliferation und Rebalancierung des Treg-Kompartiments wieder verschwand. Zum anderen ist es möglich, dass Unterschiede in den Konfigurationen der Oberflächenantigene CD45 und CD90 zwischen Spendern und Empfängern des syngenen HSZT-Modells alloreaktives Potenzial bargen. Xu et al. beschrieben ein Auftreten geringer Alloreaktivität bei Transplantation zwischen CD45.1<sup>+</sup> Donoren und CD45.2<sup>+</sup> Rezipienten: obwohl sie nicht mit den Folgen von Alloreaktivität bei MHC-Differenz vergleichbar sei, bestehe bei Vorliegen einer CD45-Differenz die Möglichkeit einer schwachen, T-Zell-vermittelten Immunreaktion, die mit verzögertem Transplantatanwachsen einhergehen könne.<sup>118</sup> McKenna et al. zeigten darüber hinaus, dass CD90.1- und CD90.2-Antigene bei Transplantation in CD90-differente Mausmodelle immunogenes Potenzial besitzen.<sup>119</sup> Für die verwendeten HSZT-Modelle wurden bewusst Spender- und Empfängertiere mit unterschiedlichen CD45- und CD90-Konfigurationen gewählt, um die T-Zellen über diese kongenen Marker nach ihrer Herkunft differenzieren zu können. Es besteht damit die Möglichkeit, dass aus diesen Differenzen ein alloreaktives Potenzial entstand, das im syngenen HSZT-Modell nach Ausschaltung kotransplantierte Spender-Treg evident wurde und analog der aGvHD zu einer verzögerten B-Zell-Hämatopoese führte. Gleichzeitig lässt sich nicht ausschließen, dass sich die verschiedenen C57BL/6-Mausmodelle über die CD45-/CD90-Antigene hinaus in weiteren Teilen ihres Antigenrepertoires (Minorantigene) unterscheiden und so eine geringe Alloreaktivität bedingt wurde.

Zusätzlich zu den pathologischen Veränderungen in der T- und B-Zell-Nische präsentierten allogenen transplantierte BALB/c-Mäuse nach Eliminierung der reif kotransplantierten Donor-Treg eine im Verlauf signifikant vermehrte Proliferation von Granulozyten im Knochenmark und nicht-signifikante Proliferation von Granulozyten in der Milz. Granulozyten sind primär nicht an der Induktion einer GvHD beteiligt, tragen als Bestandteil des unspezifischen Immunsystems aber zur Aufrechterhaltung der entzündlichen Kaskade nach Beginn der GvHD bei.<sup>120</sup> Eine signifikante Granulozytenvermehrung bei beginnender GvHD wurde für das etablierte und hier verwendete C57BL/6→BALB/c GvHD-Mausmodell beschrieben.<sup>27</sup> Im Gegensatz zum allogenen HSZT-Modell – und im Gegensatz zu ‚scurfy‘-Mäusen und Treg-depletierten FoxP3<sup>DTR</sup>-Mäusen<sup>84</sup> – zeigte das syngene HSZT-Modell im Rahmen der Arbeit keine Auffälligkeiten im medullären oder splenischen Granulozytenkompartiment nach Eliminierung der DTR-Treg.

Außer dem klinischen Zustand der Versuchstiere sowie den zellulären Veränderungen in peripherem Blut, Knochenmark und Milz wurden die Versuchstiere auch auf entzündliche Veränderungen in Dünn- und Dickdarm untersucht, nachdem der Gastrointestinaltrakt ein bekanntes Zielorgan allo- und autoreaktiver Immunprozesse darstellt.<sup>20</sup> Die Untersuchungen umfassten einerseits die histologische Begutachtung des Darmepithels hinsichtlich GvH-typischer Veränderungen, andererseits die Analyse des intestinalen Zytokinmileus, um eine mögliche Verschiebung hin zu einer proinflammatorischen Umgebung erfassen zu können.

Allogenen transplantierte BALB/c-Mäuse entwickelten nach Eliminierung der kotransplantierten Spender-Treg histologische Kriterien gastrointestinaler GvHD: die hier beobachteten Kryptenapoptosen, Epithelnekrosen und Infiltrationen durch Granulozyten und Lymphozyten zählen sowohl bei humaner<sup>121</sup> als auch muriner<sup>86</sup> GvHD des Gastrointestinaltrakts zu typischen, histopathologischen Veränderungen und bedingten in der Kohorte der allogenen transplantierten Mäuse einen postinterventionell pathologisch erhöhten Kaplan-Score. Klinisches Korrelat waren intermittierend auftretende Durchfälle. Unterstrichen wurden die histologischen Gewebsveränderungen durch die Entstehung eines proinflammatorischen Zytokinmileus. In der Pathogenese intestinaler GvHD spielen unter anderem die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  tragende Rollen: nach Chemo- oder Radiotherapie im Rahmen der Konditionierung kann eine Gewebeschädigung des Darms mit Translokation intestinaler Lipopolysaccharide und reaktiver Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch das Darmepithel auftreten, die ihrerseits zu einer Aktivierung von konventionellen Spender-T-Zellen führen. Letztere sezernieren im Rahmen ihrer Alloreaktivität u.a. IFN- $\gamma$  und



stimulieren damit wiederum Monozyten und Makrophagen, die zu einer weiteren Zunahme der Inflammation führen, ihrerseits proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  ausschütten und damit den inflammatorischen Kreislauf nähren.<sup>19</sup> Die Depletion der kotransplantierten Treg führte in allogenen transplantierten BALB/c-Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung der TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Expression im Dickdarm. Im Dünndarm der Kohorte präsentierten sich insbesondere die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und MIP-2 als signifikant erhöht. Ähnlich wie TNF- $\alpha$  ist auch IL-6 ein Produkt reaktiver Spender-T-Zellen und kann zur Schädigung intestinaler Stammzellen beitragen.<sup>94</sup> MIP-2 ist ein von verschiedenen, potenziellen GvHD-Zielorganen – z.B. Darm und Leber – exprimiertes Chemokin und wurde experimentell als mögliches Target einer GvHD-Prophylaxe ausgemacht: in einem murinen B-ALL-Modell führte die Blockade von MIP-2 nach allogener KMT zu einem unverminderten GvL-Effekt bei reduzierter GvHD-Prävalenz und -Intensität.<sup>122</sup> Die außer den genannten Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 und MIP-2 erfassten Zytokine CCL2, IL-10, IL-17 und IL-22 unterschieden sich jeweils nicht signifikant zwischen Interventions- und Kontrollgruppe des allogenen HSZT-Modells. Während CCL2 und IL-17 als proinflammatorische Zytokine an der Aktivierung und Migration reaktiver T-Zellen beteiligt sind<sup>29,123</sup>, stellen IL-10 und IL-22 antiinflammatorische Zytokine dar: IL-10 wird von B-Zellen und regulatorischen T-Zellen produziert und hemmt u.a. die Bildung proinflammatorischer Zytokine, IL-22 regt Darmepithelzellen und Paneth-Zellen zur Differenzierung und Regeneration an.<sup>94</sup> Die Verschiebung des intestinalen Zytokinmilieus in allogenen transplantierten BALB/c-Mäusen nach Depletion kotransplantierte Spender-Treg hin zu einer proinflammatorischen Umgebung wurde begleitet vom Vorliegen eines signifikant verminderten Spiegels von Reg3 $\gamma$  im Dünndarm. Murines Reg3 $\gamma$  und das strukturhomologe, humane Reg3 $\alpha$  sind antibakterielle Peptide, die von intestinalen Paneth-Zellen und, in geringerem Umfang, von weiteren Enterozyten produziert werden.<sup>124</sup> Paneth-Zellen sezernieren abseits von Reg3 insbesondere Defensine als antimikrobielle Peptide und Wachstumsfaktoren für intestinale Stammzellen. Beim Auftreten einer aGvHD weist die Darmschleimhaut von Menschen und Mäusen einen auffälligen Mangel an Paneth-Zellen auf, der als schlechtes prognostisches Kriterium intestinaler GvHD gilt.<sup>124</sup> Während der Verlust von Paneth-Zellen in Mensch und Maus paradoxerweise mit einem erhöhten Serumspiegel an Reg3-Proteinen einhergehen kann – a.e. als Ausdruck einer kompensatorischen Reg3-Produktion durch Nicht-Paneth-Zellen bei fortschreitender, GvHD-abhängiger Zerstörung der Paneth-Zellen<sup>125</sup> – ist der Mangel an Reg3 $\gamma$  in den Darmhomogenisaten der an GvHD erkrankten BALB/c-Mäuse die Folge des Verlusts an Paneth-Zellen.<sup>124,126,127</sup>

Experimentell bestehen Hinweise dafür, dass Paneth-Zellen und indirekt auch intestinale Stammzellen von intakten, darmständigen Treg protegiert werden.<sup>128</sup> Die Integrität jener Treg kann sowohl durch alloreaktive als auch durch autoreaktive Prozesse gestört werden. Aus humanen Darmbiopsien bei Vorliegen intestinaler aGvHD ist bekannt, dass die alloreaktive Inflammation zu einer Verringerung darmständiger Treg und damit auch des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 führen kann.<sup>129</sup> Unabhängig vom Vorliegen eines Allostimulus wurde im murinen Setting bei Experimenten mit CTLA-4- bzw. FoxP3-defizienten Mäusen gezeigt, dass sowohl eine CTLA-4-Defizienz bei regelrechter FoxP3-Expression als auch eine FoxP3-Defizienz bei regelrechter CTLA-4-Expression zu einem ‚scurfy‘-ähnlichen Krankheitsbild führt, einhergehend mit Kolitis und Durchfällen.<sup>130</sup> Obwohl in den vorliegenden Versuchen weder das syngene noch das allogene HSZT-Modell einen signifikanten Abfall der FoxP3-Expression bzw. Treg-Zellen im Darm nach Eliminierung der DTR-Treg zeigte, entwickelte das allogene HSZT-Modell krankhafte Darmveränderungen und einen Mangel an Paneth-Zellen. Dies verdeutlicht erneut, dass die Immunhomöostase wesentlich von der Qualität der vorhandenen Treg abhängt und nicht vordergründig von deren Quantität. In syngen transplantierten Mäusen wurden nach DTR-Treg-Eliminierung auch darüber hinaus keine zum allogenen HSZT-Modell vergleichbaren, inflammatorischen Veränderungen im Darmgewebe oder dem intestinalen Zytokinmilieu festgestellt. In den angeführten Publikationen über Treg-defiziente ‚scurfy‘-Mäuse bzw. Treg-depletierte FoxP3<sup>DTR</sup>-, DEREK- und FoxP3.LuciDTR-Mäuse wurden die Auswirkungen der autoimmunen, systemischen Erkrankungen auf den Darm nicht untersucht.

Zusammenfassend wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die selektive Eliminierung der mit dem Transplantat kotransplantierten DTR-Treg im allogenen HSZT-Modell zu einem GvHD-ähnlichen Krankheitsbild mit typischen Veränderungen des Allgemeinzustands, des blutbildenden Systems und des Gastrointestinaltrakts führte, im syngen HSZT-Modell dagegen nur zu gering ausgeprägten und vorübergehenden Veränderungen in diesen Bereichen. Entsprechend sind die Ursache und Ausprägung der Pathologien im allogenen HSZT-Modell nach DTR-Treg-Eliminierung nicht als Folge des auftretenden, relativen Treg-Mangels, sondern als Folge einer Tconv-induzierten Immunreaktion zu sehen. Diese Daten belegen, dass kotransplantierte Spender-Treg für die Toleranzinduktion und –aufrechterhaltung nach allogener HSZT von entscheidender Bedeutung sind und alloreaktive Spender-Tconv-Zellen langfristig aktiv supprimieren.

## 5 Zusammenfassung

Die allogene Stammzelltransplantation (HSZT) stellt ein etabliertes Therapieverfahren zur Behandlung maligner und nicht-maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems dar. Trotz großer Fortschritte bleibt die verfahrensbezogene Morbidität und Mortalität hoch. Neben Krankheitsrückfällen und Infektionserkrankungen stellt die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) eine wesentliche Komplikation dar. Mediatoren der GvHD sind insbesondere alloreaktive, konventionelle T-Zellen (Tconv). Die medikamentöse Immunsuppression als gängiges Behandlungskonzept geht häufig mit unerwünschten Nebenwirkungen einher und zeigt mitunter mangelnde Wirksamkeit. Zelluläre Behandlungsverfahren auf Basis regulatorischer T-Zellen (Treg) stellen einen neuen Ansatz zur Prophylaxe und Therapie der GvHD dar. Die Anforderungen an Treg zur Ausübung ihres suppressiven Potenzials im Rahmen der HSZT und die Interaktionen zwischen Treg und Tconv unter physiologischen und pathologischen Bedingungen waren und sind Gegenstand zahlreicher Studien.

Treg-Mangelzustände führen sowohl in nicht-transplantierten als auch in transplantierten Mäusen zu immunologischer Dysregulation. Untersuchungen von kongenital Treg-defizienten Mäusen und künstlich vollständig Treg-depletierten Mäusen zeigten, dass ein vollständiger Treg-Mangel jeweils in schwersten, letal endenden Systemerkrankungen resultiert. Aus Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe war darüber hinaus bekannt, dass nach allogener HSZT sowohl eine vollständige Treg-Depletion als auch eine selektive Depletion nur der reif transplantierten, donorstämmigen Treg zu letaler GvHD im Empfängertier führt.

Aufbauend auf diese Vorkenntnisse sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die nach allogener HSZT und Eliminierung der transplantatstämmigen Treg auftretende Inflammationserkrankung tatsächlich Folge einer Spender-Tconv-induzierten Alloreaktion ist oder bloße Folge eines relativen Treg-Mangels.

Dazu wurden allogene und syngene HSZT im murinen Modell vorgenommen und überprüft, ob die selektive Depletion kotransplantiertter Spender-Treg nach Transplantatanwachsen GvHD in einem allogenen HSZT-Modell induziert und sich diese von potentieller Autoreaktivität nach Treg-Depletion im syngenen HSZT-Modell unterscheidet. Die Untersuchungen umfassten die klinische Langzeitbeobachtung der Versuchstiere,

durchflusszytometrische Analysen von peripherem Blut, Knochenmark und Milz sowie histologische und molekularbiologische Untersuchungen von Dün- und Dickdarm.

Während im allogenen HSZT-Modell nach selektiver Depletion kotransplantierte Spender-Treg (ohne Manipulation empfangerstämmiger oder im Empfänger neu aus Stammzellen regenerierter Treg) ein GvHD-typisches Krankheitsbild beobachtet wurde, führte die selektive Depletion kotransplantierte Treg nach syngener HSZT nicht zu relevanten Krankheitssymptomen oder Immundysregulationsphänomenen. Der Vergleich beider HSZT-Modelle beweist, dass kotransplantierte Spender-Treg-Zellen für die Toleranzinduktion und –aufrechterhaltung nach allogener Knochenmarktransplantation von zentraler Bedeutung sind, indem sie alloreaktive, konventionelle Spender-T-Zellen aktiv und langfristig supprimieren. Die fehlende Pathologie bei Depletion von Spender-Treg nach syngener HSZT unterstreicht, dass es sich hierbei um Alloreaktionen und nicht um Autoimmunphänomene infolge einer Treg-Defizienz handelt. Diese Beobachtungen sind von grundlegender wissenschaftlicher Bedeutung und für die Entwicklung neuer GvHD-Prophylaxe und –Therapiekonzepte klinisch hochgradig relevant.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Jansen J. The first successful allogeneic bone-marrow transplant: Georges Mathe. *Transfus Med Rev* 2005;19:246–8.
2. Little M-T, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 2002;2:231–8.
3. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res* 1965;25:1525–31.
4. Hilgendorf I, Greinix H, Halter JP, Lawitschka A, Bertz H, Wolff D. Long-term follow-up after allogeneic stem cell transplantation. *Dtsch Arztebl Int* 2015;112:51–8.
5. Pasquini MC, Zhu X. Current uses and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides, 2015 2015.
6. Passweg JR, Baldomero H, Peters C, et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2014;49:744–50.
7. Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2011;29:2230–9.
8. Brissot E, Rialland F, Cahu X, et al. Improvement of overall survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children and adolescents: a three-decade experience of a single institution. *Bone Marrow Transplant* 2016;51:267–72.
9. Welsch U, Deller T. *Lehrbuch Histologie*, Unter Mitarbeit von Thomas Deller. 3rd ed. s.l.: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher, 2011.
10. Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008;42 Suppl 2:S71-6.
11. Bornhäuser M, Kobbe G, Mielke S, et al. Leitlinie Spenderauswahl, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie 2016.
12. Kröger N, Burchert A, Niederwieser D, Wulf G. Leitlinie Konditionierung, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie 2016.
13. Bornhäuser M, Kienast J, Trenschele R, et al. Reduced-intensity conditioning versus standard conditioning before allogeneic haemopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia in first complete remission, A prospective, open-label randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2012;13:1035–44.

14. Bader P, Bornhäuser M, Grigoleit Götz-Ulrich, Kröger N. Leitlinie Monitoring, Chimerismusanalysen und Bestimmung der minimalen Resterkrankung, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie 2016.
15. Fu Y, Schroeder T, Zabelina T, et al. Postallogeic monitoring with molecular markers detected by pretransplant next-generation or Sanger sequencing predicts clinical relapse in patients with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol* 2014;92:189–94.
16. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006;354:1813–26.
17. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012;12:443–58.
18. Holtan SG, Pasquini M, Weisdorf DJ. Acute graft-versus-host disease: a bench-to bedside update. *Blood* 2014;124:363–73.
19. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95:2754–9.
20. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet* 2009;373:1550–61.
21. MacDonald KPA, Hill GR, Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood* 2017;129:13–21.
22. Min C-K. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease: the unveiling of an enigma. *Korean J Hematol* 2011;46:80–7.
23. Wolff D, Bertz H, Greinix H, Lawitschka A, Halter J, Holler E. The treatment of chronic graft-versus-host disease: consensus recommendations of experts from Germany, Austria, and Switzerland. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108:732–40.
24. Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG. Alloreactive Memory T Cells Are Responsible for the Persistence of Graft-versus-Host Disease. *J Immunol* 2005;174:3051–8.
25. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 2003;112:1688–96.
26. Shono Y, Ueha S, Wang Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease, Early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2010;115:5401–11.

27. Doser K. Untersuchungen zur B-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation. unv.diss.; Universität Regensburg 2011.
28. Glauzy S, Soret J, Fournier I, et al. Impact of acute and chronic graft-versus-host disease on human B-cell generation and replication. *Blood* 2014;124:2459–62.
29. Zeiser R, Wolff D, Scheid C, et al. Leitlinie akute Graft-versus-Host Erkrankung, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie 2015.
30. Cutler CS, Koreth J, Ritz J. Mechanistic approaches for prevention and treatment of chronic GVHD. *Blood* 2016.
31. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, et al. Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:387–94.
32. Jagasia M, Greinix H, Robin M, et al. Extracorporeal photopheresis versus anticytokine therapy as a second-line treatment for steroid-refractory acute GVHD: a multicenter comparative analysis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1129–33.
33. Klinke R, Pape H-C, Silbernagl S. *Physiologie*. 5th ed. Stuttgart: Thieme, 2005.
34. Bucher C, Koch L, Vogtenhuber C, et al. IL-21 blockade reduces graft-versus-host disease mortality by supporting inducible T regulatory cell generation. *Blood* 2009;114:5375–84.
35. Das R, Komorowski R, Hessner MJ, et al. Blockade of interleukin-23 signaling results in targeted protection of the colon and allows for separation of graft-versus-host and graft-versus-leukemia responses. *Blood* 2010;115:5249–58.
36. Cetkovic-Cvrlje M, Roers BA, Waurzyniak B, Liu XP, Uckun FM. Targeting Janus kinase 3 to attenuate the severity of acute graft-versus-host disease across the major histocompatibility barrier in mice. *Blood* 2001;98:1607–13.
37. Koning C de, Nierkens S, Boelens JJ. Strategies before, during, and after hematopoietic cell transplantation to improve T-cell immune-reconstitution. *Blood* 2016;128:2607-15.
38. Edinger M, Hoffmann P. Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Curr Opin Immunol* 2011;23:679–84.
39. Powell BR, Buist NR, Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr* 1982;100:731–7.
40. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996;184:387–96.

41. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–1.
42. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68–73.
43. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151–64.
44. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–6.
45. Khattri R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337–42.
46. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 2003. 299: 1057-1061. *J Immunol* 2017;198:981–5.
47. Ramsdell F, Ziegler SF. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nat Rev Immunol* 2014;14:343–9.
48. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005;6:1142–51.
49. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006;108:1571–9.
50. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287–96.
51. Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, Laufer TM. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 2001;194:427–38.
52. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 2009;70:326–36.
53. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor Effector Function of CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Is Antigen Nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183–90.



54. La Rosa M de, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004;34:2480–8.
55. Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol* 2004;34:366–76.
56. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004;21:589–601.
57. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012;30:531–64.
58. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 2009;10:48–57.
59. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30:636–45.
60. Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM. CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells. *J Immunol* 2004;172:2778–84.
61. Liang B, Workman C, Lee J, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 2008;180:5916–26.
62. Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 2008;28:402–13.
63. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345–52.
64. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 2005;201:723–35.
65. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 2013;14:307–8.
66. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol* 2009;39:1088–97.

67. Leveque L, Deknuydt F, Bioley G, et al. Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4<sup>+</sup> regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells. *J Immunother* 2009;32:101–8.
68. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 2013;38:414–23.
69. Maldonado RA, Andrian UH v. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* 2010;108:111–65.
70. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2010;11:21–7.
71. Matthews K, Lim Z, Afzali B, et al. Imbalance of effector and regulatory CD4 T cells is associated with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation using a reduced intensity conditioning regimen and alemtuzumab. *Haematologica* 2009;94:956–66.
72. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209–26.
73. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701–11.
74. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203:1693–700.
75. Schneidawind D, Pierini A, Negrin RS. Regulatory T cells and natural killer T cells for modulation of GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2013;122:3116–21.
76. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, et al. Only the CD45RA<sup>+</sup> subpopulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 2006;108:4260–7.
77. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1455–65.
78. Nguyen VH, Zeiser R, Dasilva DL, et al. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 2007;109:2649–56.
79. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood* 2014;124:638–44.

80. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144–50.
81. Del Papa B, Ruggeri L, Urbani E, et al. Clinical-Grade-Expanded Regulatory T Cells Prevent Graft-versus-Host Disease While Allowing a Powerful T Cell-Dependent Graft-versus-Leukemia Effect in Murine Models. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23:1847–51.
82. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4 + CD25 + Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Exp Med* 2002;196:389–99.
83. Pierini A, Colonna L, Alvarez M, et al. Donor Requirements for Regulatory T Cell Suppression of Murine Graft-versus-Host Disease. *J Immunol* 2015;195:347–55.
84. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007;8:191–7.
85. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 2007;204:57–63.
86. Kaplan DH, Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Shlomchik MJ, Shlomchik WD. Target Antigens Determine Graft-versus-Host Disease Phenotype. *J Immunol* 2004;173:5467–75.
87. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 1996;88:3230–9.
88. Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 1991;173:1213–25.
89. Ludenberg I. Regulation der B-Zell-Differenzierung anhand posttranslationaler Modifikationen von Ebf1 und Untersuchungen zur Redundanz von Ebf-Proteinen. unv.diss.; Universität München 2011.
90. Power UF, Huss T, Michaud V, Plotnicky-Gilquin H, Bonnefoy JY, Nguyen TN. Differential histopathology and chemokine gene expression in lung tissues following respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV- or BBG2Na-immunized mice. *J Virol* 2001;75:12421–30.
91. Matsushita T, Tedder TF. Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. *Methods Mol Biol* 2011;677:99–111.

92. Jupelli M, Guentzel MN, Meier PA, Zhong G, Murthy AK, Arulanandam BP. Endogenous IFN-gamma production is induced and required for protective immunity against pulmonary chlamydial infection in neonatal mice. *J Immunol* 2008;180:4148–55.
93. Huppert J, Closhen D, Croxford A, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* 2010;24:1023–34.
94. Teshima T, Reddy P, Zeiser R. Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22:11–6.
95. Geoffrey R. Hill, James L.M. Ferrara. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95(9):2754-9.
96. Ma C, Maluf HM, Liu T-C. Acute graft-versus-host disease is more prevalent and severe in the lower than the upper gastrointestinal tract. *Hum Pathol* 2015;46:1480–7.
97. Majhail NS, Farnia SH, Carpenter PA, et al. Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation, Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:1863–9.
98. Ghimire S, Weber D, Mavin E, Wang XN, Dickinson AM, Holler E. Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. *Front Immunol* 2017;8:79.
99. Villa NY, Rahman MM, McFadden G, Cogle CR. Therapeutics for Graft-versus-Host Disease: From Conventional Therapies to Novel Virotherapeutic Strategies. *Viruses* 2016;8:85.
100. Ramlal R, Hildebrandt GC. Advances in the Use of Regulatory T-Cells for the Prevention and Therapy of Graft-vs.-Host Disease. *Biomedicines* 2017;5.
101. Godfrey VL, Wilkinson JE, Russell LB. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol* 1991;138:1379–87.
102. Blair PJ, Bultman SJ, Haas JC, Rouse BT, Wilkinson JE, Godfrey VL. CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J Immunol* 1994;153:3764–74.
103. Taylor PA. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99:3493–9.
104. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T Cells, New therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002;196:401–6.

105. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Immunoselection and clinical use of T regulatory cells in HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011;24:459–66.
106. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol* 2009;133:22–6.
107. EudraCT: Treg002 2012-002685-12, Treg003 2016-003947-12.
108. Mayer CT, Ghorbani P, Kuhl AA, et al. Few Foxp3(+) regulatory T cells are sufficient to protect adult mice from lethal autoimmunity. *Eur J Immunol* 2014;44:2990–3002.
109. van Leeuwen L, Guiffre A, Atkinson K, Rainer SP, Sewell WA. A two-phase pathogenesis of graft-versus-host disease in mice. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:151–8.
110. Christiaansen AF, Boggiatto PM, Varga SM. Limitations of Foxp3(+) Treg depletion following viral infection in DREG mice. *J Immunol Methods* 2014;406:58–65.
111. Reddy P, Ferrara JLM. Mouse models of graft-versus-host disease. In: *StemBook*. Cambridge (MA), 2008.
112. Alpdogan O, van den Brink MRM. Immune tolerance and transplantation. *Semin Oncol* 2012;39:629–42.
113. Suffner J, Hochweller K, Kuhnle M-C, et al. Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3+ regulatory T cells in Foxp3.LuciDTR mice. *J Immunol* 2010;184:1810–20.
114. Edinger M, Cao Y-a, Hornig YS, et al. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer* 2002;38:2128–36.
115. Corre E, Carmagnat M, Busson M, et al. Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation, B-cell deficiency is associated with late infections. *Haematologica* 2010;95:1025–9.
116. Aschermann S, Lehmann CHK, Mihai S, Schett G, Dudziak D, Nimmerjahn F. B cells are critical for autoimmune pathology in Scurfy mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:19042–7.
117. Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, et al. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* 2011;474:216–9.
118. Xu H, Exner BG, Chilton PM, Schanie C, Ildstad ST. CD45 congenic bone marrow transplantation: evidence for T cell-mediated immunity. *Stem Cells* 2004;22:1039–48.

- 119.** McKenna KC, Vicetti Miguel RD, Beatty KM, Bilonick RA. A caveat for T cell transfer studies: generation of cytotoxic anti-Thy1.2 antibodies in Thy1.1 congenic mice given Thy1.2+ tumors or T cells. *J Leukoc Biol* 2011;89:291–300.
- 120.** Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, et al. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med* 2014;20:648–54.
- 121.** Vinod B Shidham, Chung-Che Chang, Ganesh Shidham, Farrukh Ghazala<sup>1</sup>, Paul F Lindholm, Bal Kampalath, Varghese George, Richard Komorowski. Colon biopsies for evaluation of acute graft-versus-host disease (A-GVHD) in allogeneic bone marrow transplant patients. *BMC Gastroenterology* 2003;3:5.
- 122.** Cho K-A, Woo S-Y, Park YS, Park MH, Ryu K-H. Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)/CXCR2 blockade attenuates acute graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;426:558–64.
- 123.** Shachar I, Karin N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *J Leukoc Biol* 2013;93:51–61.
- 124.** Peled JU, Hanash AM, Jenq RR. Role of the intestinal mucosa in acute gastrointestinal GVHD. *Blood* 2016;128:2395–402.
- 125.** Zhao D, Kim Y-H, Jeong S, et al. Survival signal REG3 $\alpha$  prevents crypt apoptosis to control acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2018;128:4970–9.
- 126.** Eriguchi Y, Nakamura K, Hashimoto D, et al. Decreased secretion of Paneth cell  $\alpha$ -defensins in graft-versus-host disease. *Transpl Infect Dis* 2015;17:702–6.
- 127.** Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, et al. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of  $\alpha$ -defensins. *Blood* 2012;120:223–31.
- 128.** Riegel C, Boeld TJ, Doser K, Huber E, Hoffmann P, Edinger M. Efficient treatment of murine acute GvHD by in vitro expanded donor regulatory T cells. *Leukemia* 2020;34:895–908.
- 129.** Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, et al. Mucosal FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006;107:1717–23.
- 130.** Chikuma S, Bluestone JA. Expression of CTLA-4 and FOXP3 in cis protects from lethal lymphoproliferative disease. *Eur J Immunol* 2007;37:1285–9.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| °C              | Grad Celsius  |
| 8-MOP           | 8-Methoxypsoralen   |
| Abb.            | Abbildung   |
| ACK             | Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat                          |
| aGvHD           | akute Graft-versus-host Disease                                 |
| APC             | Antigen-presenting cell   |
| APC             | Allophycocyanin   |
| APC-Cy7         | Allophycocyanin-Cy7   |
| BM              | Bone marrow   |
| CCL2            | CC-Chemokine ligand 2   |
| CD              | Cluster of differentiation                                      |
| c-kit           | Stammzellfaktor-Rezeptor  |
| cGvHD           | chronische Graft-versus-host Disease                            |
| CLP             | Common lymphoid progenitor (lymphoide Progenitorzelle)          |
| CO <sub>2</sub> | Carbon dioxide (Kohlenstoffdioxid)                              |
| CTLA-4          | Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4                                |
| CXCL2           | Chemokine (C-X-C motif) ligand 2                                |
| CXCR2           | Chemokine (C-X-C motif) receptor 2                              |
| d               | Tag   |
| DAPI            | 4,6-Diamidino-2-phenylindol                                     |
| DC              | Dendritic cell  |
| DEPC            | Diethylpyrocarbonat   |
| DEREG           | Depletion of regulatory T cell (Mausstamm)                      |
| DN              | Double negative (doppelt-negativ)                               |
| DNA             | Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)                 |
| DT              | Diphtherie-Toxin  |
| DTR             | Diphtherie-Toxin-Rezeptor                                       |
| EDTA            | Ethylendiamin-tetraacetat                                       |
| et al.          | Et alii/alia  |
| FACS            | Fluorescence activated cell sorting                             |
| FCS             | Foetal calf serum (Fötales Kälberserum)                         |
| FISH            | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung                              |
| FITC            | Fluorescein Isothiocyanat                                       |
| FoxP3           | Forkhead box P3 (Transkriptionsfaktor)                          |
| FSC             | Forward scatter   |
| GFP             | Green fluorescent protein                                       |
| GITR            | Glucocorticoid induced tumor necrosis factor                    |
| GvHD            | Graft-versus-host disease                                       |
| GvH             | Graft-versus-host   |
| h               | Stunde  |
| HLA             | Human leucocyte antigen   |
| HPRT            | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase                          |
| HSC             | Hematopoetic stem cell (Hämatopoetische Stammzelle)             |
| HSZT            | Hämatopoetische Stammzelltransplantation                        |
| ICOS            | Inducible T-cell Co-Stimulator                                  |
| IFN             | Interferon  |
| Ig              | Immunglobulin   |
| IL              | Interleukin   |
| IPEX (Syndrom)  | Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked |

|               |   |
|---------------|---|
| iTreg         | Induzierte regulatorische T-Zelle                                   |
| KM            | Knochenmark   |
| LAG3          | Lymphocyte activation gene 3  |
| Lin           | Lineage   |
| LSK           | Lin <sup>-</sup> /Sca1 <sup>+</sup> /Kit <sup>+</sup>               |
| m             | Milli (10 <sup>-3</sup> )   |
| MACS          | Magnetic activated cell sorting (Magnetische Zellseparation)        |
| MHC           | Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex) |
| min           | Minute  |
| MIP-2         | macrophage inflammatory protein 2                                   |
| ml            | Milliliter  |
| M-MLV         | Moloney Murine Leukemia Virus                                       |
| MNC           | Mononuclear cells   |
| MOPS          | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure                                  |
| MPP           | Multipotent progenitors (multipotente Vorläuferzellen)              |
| MRD           | Minimal residual disease  |
| mRNA          | messenger RNA   |
| MTX           | Methotrexat   |
| N             | number (Anzahl)   |
| n             | Nano (10 <sup>-9</sup> )  |
| NK-Zelle      | Natural killer cell (natürliche Killer-Zelle)                       |
| NKT-Zelle     | Natural killer T cell   |
| NOD           | Non-obese diabetic (Mausmodell)                                     |
| nTreg         | Natürliche regulatorische T-Zelle                                   |
| OD            | Optical density   |
| PB            | Pacific Blue  |
| PBS           | Phosphate buffered saline   |
| PCR           | Polymerase chain reaction   |
| PE            | Phycoerythrin   |
| PE-Cy7        | Phycoerythrin-Cy7   |
| PerCP         | Peridinin Chlorophyll-a Protein                                     |
| R             | Rezeptor  |
| Reg3 $\gamma$ | Regenerating islet-derived protein 3 gamma                          |
| RNA           | Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)                                 |
| rpm           | revolutions per minute  |
| RT            | Raumtemperatur  |
| RT            | Reverse Transkriptase   |
| Sca1          | Stem cells antigen-1  |
| SEM           | Standard error of the mean  |
| SSC           | Side scatter  |
| Tconv         | Conventional T cell (konventionelle T-Zelle)                        |
| TCR           | T cell receptor (T-Zell-Rezeptor)                                   |
| TGF           | Transforming growth factor  |
| Thy1          | Thymocyte differentiation antigen 1                                 |
| Th-Zelle      | T-Helferzelle   |
| TIGIT         | T cell immunoglobulin ITIM domain                                   |
| TNF           | Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)                          |
| Treg          | Regulatorische T-Zelle  |
| Tx            | Transplantation   |
| TZD           | T-Zell-depletiert   |
| UV-A          | Ultraviolett-A  |



WT  
 $\mu$

Wildtyp  
Mikro ( $10^{-6}$ )

## 8 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich bei der Erarbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Edinger und Frau PD Dr. Petra Hoffmann, die die Arbeit ermöglicht und im Entstehungsprozess mit viel Hingabe begleitet haben. Der wissenschaftliche Eigenanspruch, das herausragende Sachverständnis und die hohen technischen Standards der Arbeitsgruppe haben mein Wissenschaftsverständnis nachhaltig geprägt. Die mannigfaltige Unterstützung durch die Arbeitsgruppenmitglieder Kristina, Christin, Jacqueline, Claudia, Ute, Rüdiger und, ganz besonders, Evi war einmalig.

Allerherzlichst bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, ohne deren Zuspruch und Unterstützung die Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

## 9 Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

|                     |                                  |
|---------------------|----------------------------------|
| Name                | Nikolai Benkowitsch              |
| Geburtsdatum        | 18.10.1991                       |
| Geburtsort          | Ulm                              |
| Staatsangehörigkeit | deutsch                          |
| Konfession          | evangelisch                      |
| Familienstand       | verheiratet, zwei Kinder         |
| Eltern              | Dr. Roland und Sonja Benkowitsch |

### **Schulbildung**

|                   |  |
|-------------------|--|
| 09/1997 – 08/2001 | Grundschule, Bad Abbach                  |
| 09/2001 - 07/2010 | Goethe-Gymnasium, Regensburg             |
| 07/2010           | Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife |

### **Hochschulausbildung**

|                   |   |
|-------------------|---|
| 10/2010 – 05/2017 | Studium der Medizin an der Universität Regensburg |
| 09/2012           | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung           |
| 04/2016           | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung          |
| 05/2017           | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung          |
| 05/2017           | Approbation als Arzt                              |

### **Famulaturen**

|         |   |
|---------|---|
| 03/2013 | Klinik für Gastroenterologie und interventionelle Endoskopie,<br>Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg |
| 09/2013 | Praxis für Neurologie, Dr. Benkowitsch, Weiden  |
| 03/2014 | Praxis für Allgemeinmedizin Dres. Pickl, Seubert, Kiefmann,<br>Mehring, Bad Abbach                          |
| 09/2015 | Klinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Regensburg  |

### **Praktisches Jahr**

|                   |  |
|-------------------|--|
| 05/2016 - 09/2016 | Klinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Regensburg |
| 09/2016 - 12/2016 | Klinik für Chirurgie, Krankenhaus St. Josef, Regensburg      |

12/2016 – 04/2017

Kliniken für Innere Medizin, Krankenhaus Barmherzige Brüder,  
Regensburg

### **Stipendien**

10/2010 – 05/2017

Stipendiat des Max Weber-Programms Bayern

02/2011 – 05/2017

Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

### **Berufstätigkeit**

seit 07/2017

Assistenzarzt, Klinik für Onkologie und Hämatologie,  
Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg