

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie)

**Funktionelle und phänotypische Analyse organständiger,
residueller T-Zellkompartimente vor und nach *in-vivo*
Depletion graft-versus-host mediiender T-Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Jakob Michael Kressin

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. D. Schneidawind

Tag der Disputation: 07.12.2021

Widmung

Für Mama, Papa und Simon

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Hämatopoetische Stammzelltransplantation</i>	1
1.2	<i>Akute Graft-versus-Host Disease</i>	2
1.3	<i>Pathophysiologie der GvHD</i>	3
1.4	<i>T-Zellen und T-Zell-Untergruppen innerhalb der GvHD</i>	4
1.5	<i>Der T-Zellrezeptor</i>	6
1.6	<i>Vergleich zwischen der GvHD und einer pathogen-spezifischen Immunantwort.....</i>	9
1.7	<i>Alloreaktive T-Zellen</i>	9
1.8	<i>Zielantigene der alloreaktiven T-Zellen</i>	10
1.9	<i>T-Zell-Effektormechanismen</i>	12
1.10	<i>Die Bedeutung von Effektor-Memory-T-Zellen.....</i>	12
1.11	<i>Aktuelle Ansätze zur Prävention der GvHD</i>	13
1.12	<i>Verfahren zur T-Zell-Depletion – Geschichte der Transplantatgenerierung..</i>	13
1.13	<i>CD45RA-Depletion</i>	14
1.14	<i>Bedeutung co-stimulatorischer und co-inhibitorischer Signale für die Pathogenese der GvHD</i>	15
1.15	<i>CD276.....</i>	15
1.16	<i>Arbeitshypothese und Zielsetzung.....</i>	16
2	Material und Methoden	18
2.1	<i>Material</i>	18
2.1.1	<i>Antikörper.....</i>	22
2.1.2	<i>Pufferlösungen</i>	23
2.1.3	<i>PCR-Primer.....</i>	23
2.1.4	<i>Computerprogramme.....</i>	25
2.2	<i>Methoden.....</i>	25
2.2.1	<i>Mausmodell.....</i>	25

2.2.2	Transplantation der humanen CD4 ⁺ -T-Zellen in NSG-Ab ^o DR4-Mäuse ...	25
2.2.3	<i>In-vivo</i> Depletion von CD276 ⁺ -CD4 ⁺ -T-Zellen mittels mAb	27
2.2.4	Histologie	28
2.2.5	Immunologische Methoden.....	28
2.2.6	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.7	Statistische Methoden.....	39
3	Ergebnisse	40
3.1	<i>Infiltration von GvHD-Zielorganen durch humane CD4⁺-T-Zellen in DR4-mismatched- und DR4-matched-Transplantaten.....</i>	41
3.2	<i>Einfluss der CD45RA/CD276-Depletion auf die perivaskuläre Lymphozyten-Infiltration in NSG-DR4-Individuen nach Erhalt von HLA-DR4-matched-Transplantaten.....</i>	45
3.3	<i>Identifikation monoklonaler alloreaktiver T-Zellklone durch Direktsequenzierung von Singlepeaks in der Spectratype-Analyse.....</i>	49
3.4	<i>Identifizierung Keimbahn-kodierter TCRs nach Transplantation von pan-CD4⁺-T-Zell-Transplantaten.....</i>	54
3.5	<i>Nachweis systemischer T-Zellklone im DR4-mismatched- und identischer organspezifischer T-Zellklone im DR4-matched-Transplantat.....</i>	58
3.6	<i>Untersuchung von T-Zell-Master-Transkriptionsfaktoren in GvHD-Zielorganen</i>	60
3.7	<i>In-vitro Analyse des CD276-Antikörpers.....</i>	69
3.7.1	Additiver Effekt von ADCC und CDC durch Einsatz des CD276-Antikörpers 69	
3.7.2	Additiver Effekt von CDC und ADCC bei Apoptoseinduktion	70
3.7.3	Vergleich der Apoptoserate zwischen CD276 ⁻ - und CD276 ⁺ -Zellen.....	72
3.8	<i>In-vivo Depletion von CD276 innerhalb der NSG-Ab^o DR-4-Mäuse.....</i>	73
4	Diskussion	77
4.1	<i>CD276 als hochsensitiver Marker alloreaktiver CD4⁺-T- Lymphozyten</i>	78
4.2	<i>Depletion von CD276⁺-CD4⁺-T-Zellen verringert das Risiko einer GvHD.....</i>	78

4.3	<i>Identische T-Zell-Klone treten systemisch im HLA-DR4-mismatched Transplantat auf, organspezifische T-Zell-Klone im HLA-DR4-matched Transplantat.....</i>	80
4.4	<i>Charakteristika alloreaktiver T-Zellrezeptoren</i>	81
4.5	<i>Public-T-Zellrezeptoren.....</i>	83
4.6	<i>Analyse verschiedener Transkriptionsfaktoren im Kontext der GvHD.....</i>	85
4.7	<i>Die Depletion von CD45RA/CD276-T-Zellen erhöht die Expression von GATA3 und SOCS3 im Transplantat und senkt die Induktion und Rekrutierung von T_H17-Zellen in GvHD Zielorganen</i>	87
4.8	<i>Anti-CD276-Antikörper vermittelt CDC und ADCC sowie Apoptose hochselektiv in CD276⁺-CD4⁺-T-Lymphozyten (alloreaktive Population)</i>	88
4.9	<i>Die in-vivo Depletion von CD276⁺-Zellen verbessert die GvHD in NSG-DR4-Mäusen, die Memory-CD4⁺-T-Zell-Transplantate von HLA-DR4-mismatched Spendern erhielten.....</i>	89
4.10	<i>Bewertung des Studiendesigns</i>	89
4.11	<i>Zusammenfassung</i>	91
5	Literaturverzeichnis	93
6	Abkürzungsverzeichnis	106
7	Erklärung zum Eigenanteil	109
8	Veröffentlichungen.....	110
9	Danksagung.....	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologie der GvHD	3
Abbildung 2: Differenzierung von T-Helferzell-Subtypen	5
Abbildung 3: Spectratype-Ergebnisse der CDR3-Region von V β 1-V β 24 einer gesunden Maus	8
Abbildung 4: In-vivo CD276 ⁺ -Depletion	27
Abbildung 5: Darstellung der Infiltration von GvHD-Zielorganen durch humane CD4 ⁺ -T-Zellen in DR4-mismatched-Transplantaten.	42
Abbildung 6: Infiltration von GvHD-Zielorganen durch humane CD4 ⁺ -T-Zellen: Repräsentative Durchflusszytometrie-Plots zeigen CD4 ⁺ -T-Zellinfiltrate innerhalb des DR4-mismatched-Settings.....	43
Abbildung 7: Infiltration von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse mit CD4 ⁺ -T-Lymphozyten im FACS.	43
Abbildung 8: Infiltration ausgewählter Mausorgane mit CD45-tragenden humanen Zellen innerhalb des DR4-mismatched-Settings nach real time PCR.	44
Abbildung 9: Infiltration der Mausorgane mit CD45 tragenden humanen Zellen innerhalb des matched-Settings nach real time PCR.....	44
Abbildung 10: (Immun-)histologischer Nachweis perivaskulärer Lymphozyteninfiltration im DR4-matched-Setting.	46
Abbildung 11: (Immun-)histologischer Nachweis perivaskulärer Lymphozyteninfiltration im matched-Setting.....	47
Abbildung 12: (Immun-)histologischer Nachweis perivaskulärer Lymphozyteninfiltration im matched-Setting.....	48
Abbildung 13: Beispiel eines monoklonalen Chromatogramms der α -Kette eines alloreaktiven T-Zellrezeptors.	50
Abbildung 14: Beispiel eines polyklonalen Chromatogramms der α -Kette eines alloreaktiven T-Zellrezeptors.	50
Abbildung 15: Analyse des Transkriptionsfaktors SOCS3 in GvHD-Zielorganen im HLA-DR4 ⁻ -Transplantat.	61
Abbildung 16: Analyse des Transkriptionsfaktors STAT1 in GvHD-Zielorganen im HLA-DR4 ⁻ -Transplantat.	62
Abbildung 17: HLA-DR4 ⁺ -Transplantat – SOCS3 Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4 ⁺ -Transplantatempfängern.	63

Abbildung 18: HLA-DR4 ⁺ -Transplantat – STAT1 Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4 ⁺ -Transplantatempfängern.	63
Abbildung 19: HLA-DR4 ⁺ -Transplantat – GATA3 Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4 ⁺ -Transplantatempfängern.	64
Abbildung 20: HLA-DR4 ⁺ -Transplantat – FOXP3 Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4 ⁺ -Transplantatempfängern.	65
Abbildung 21: HLA-DR4 ⁺ -Transplantat – EOMES Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4 ⁺ -Transplantatempfängern.	66
Abbildung 22: HLA-DR4 ⁺ -Transplantat – RORC Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4 ⁺ -Transplantatempfängern.	67
Abbildung 23: HLA-DR4 ⁺ -Transplantat – T-bet Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4 ⁺ -Transplantatempfängern.	67
Abbildung 24: HLA-DR4 ⁺ -Transplantat – Darstellung der Ration aus GATA3/RORC innerhalb Leber, Lunge, Colon und Haut.	68
Abbildung 25: Additiver Effekt von ADCC und CDC durch Einsatz des CD276-Antikörpers	70
Abbildung 26: Additiver Effekt von CDC und ADCC bei Apoptoseinduktion.	71
Abbildung 27: Die Häufigkeit von Annexin V ⁺ apoptotischen Zellen innerhalb CD4 ⁺ -T-Zellen nach 24h Inkubation mit NK-Zellen, Serum und Ab für CD276 +/- CD4 ⁺ -T-Lymphozyten. (n=3).....	72
Abbildung 28: Histologische Untersuchung der GvHD-Zielorgane für infiltrierende CD3 ⁺ -T-Zellen innerhalb der Kontrolle (linke Bildreihe) und der <i>in-vivo</i> Depletion von CD276 (rechte Bildreihe) innerhalb NSG-Ab ^o DR-4-Mäusen.	74
Abbildung 29: Histologische Untersuchung der GvHD-Zielorgane für infiltrierende CD3 ⁺ -T-Zellen innerhalb der Kontrolle (linke Bildreihe) und der <i>in-vivo</i> Depletion von CD276 (rechte Bildreihe) innerhalb NSG-Ab ^o DR-4-Mäusen.	75
Abbildung 30: In-vivo Depletion von CD276 verbesserte die GvHD und sorgte für einen symptomfreien Phänotyp.....	76
Abbildung 31: Regulatorische Effekte von GATA3 auf die T _H 17-Zelldifferenzierung. ...	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien	18
Tabelle 2: Geräte	19
Tabelle 3: Laborzubehör	20
Tabelle 4: Immunologische Kits	21
Tabelle 5: Molekularbiologische Kits und Enzyme.....	21
Tabelle 6: Primärantikörper.....	22
Tabelle 7: Sekundärantikörper.....	22
Tabelle 8: Antikörper für die Isotypenkontrolle.....	22
Tabelle 9: PCR-Primer.....	24
Tabelle 10: Übersicht über die analysierten Individuen mit den zugehörigen Transplantaten und den jeweiligen untersuchten Organen.	26
Tabelle 11: Versuchsansätze für den ADCC/CDC Assay	33
Tabelle 12: real time PCR-Bedingungen der unterschiedlichen Primer.....	36
Tabelle 13: Ansatz für den MasterMix jeder durchgeführten real time PCR.....	37
Tabelle 14: PCR-Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen.....	38
Tabelle 15: Maus 1 (Gesamtheit aller CD4 ⁺ -T-Zellen) – HLA-DR4 ⁻ -Transplantat	52
Tabelle 16: Maus 2 (Gesamtheit aller CD4 ⁺ -T-Zellen) – HLA-DR4 ⁻ -Transplantat	52
Tabelle 17: Maus 3 (Gesamtheit aller CD4 ⁺ -T-Zellen) – HLA-DR4 ⁻ -Transplantat	53
Tabelle 18: Maus 4 Rezipient eines CD45RA-depletierten – HLA-DR4 ⁻ -Transplantats	55
Tabelle 19: Maus 5 CD45RA-/CD276-depletiert – HLA-DR4 ⁻ -Transplantat.....	55
Tabelle 20: Maus 6 CD45RA-depletiert – HLA-DR4 ⁺ -Transplantat	57
Tabelle 21: Maus 7 CD45RA-/CD276-depletiert – HLA-DR4 ⁺ -Transplantat	57
Tabelle 22: Alloreaktive T-Zell-Pools enthalten Public-TCRs in allen Kohorten	59

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSCT) ist eine potentiell kurative Therapieoption für maligne hämatologische Erkrankungen sowie für vererbte oder erworbene Blutkrankheiten wie die Sichelzell-Anämie oder die aplastische Anämie [2-4]. Vor einer allo-HSCT erhalten Patienten in den meisten Fällen zunächst eine Chemotherapie, die häufig mit einer Radiotherapie kombiniert wird, sowie T-Zell-depletierende Antikörper. Dies dient dazu, den Empfänger weitestgehend durch T-Zell-Minimierung zu immunsupprimieren und dadurch die Stammzelltransplantat-Abstoßung zu vermeiden, aber auch die Anzahl der malignen Zellen bei Tumorerkrankungen zu reduzieren [2]. Es können drei verschiedene Quellen für Stammzellen zur allo-HSCT genutzt werden: Knochenmark, mittels Granulozyten-colony-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisiertes peripheres Blut (PBSCs) und Nabelschnurblut (NSB). Ein „human-leukocyte-antigen“ (HLA) identer Zwilling gilt als idealer Spender zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion [5]. Wenn solch ein Spender nicht zu finden ist, kommen folgende Alternativen in Frage: Freiwillige unverwandte Spender, NSB und HLA-identische oder haploidentisch verwandte Spender [6, 7]. Unverwandte Spender, die ein identisches (matched) HLA aufweisen, erzielten ein ähnliches Ergebnis wie Transplantate HLA-identischer Zwillinge [8]. HLA-mismatched-allo-HSCT und haploidentische allo-HSCT blieben lange mit einer hohen Mortalität assoziiert [9-12]. Dank neuer Konditionierungs- und Depletionstechniken rückt die haploidentische allo-HSCT vermehrt in den Fokus und wird so zur Methode der Wahl [13]. Das Risiko einer schweren GvHD, das durch intensive Konditionierung minimiert werden soll, muss immer in Balance stehen zu dem Risiko eines wahrscheinlicher werdenden Rezidivs oder dem Risiko an endogenen oder neuerworbenen Infektionen zu versterben [14-18].

Knochenmarkzellen und G-CSF-mobilisierte PBSCs enthalten reife CD4⁺- und CD8⁺- $\alpha\beta$ -T-Zellen. Reife $\alpha\beta$ -T-Zellen, die in der Fremdspende enthalten sind, bauen T-Zell-Immunität wieder auf und eradizieren maligne Zellen im Empfänger.

Dieser Anti-Tumor-Effekt ist auch bekannt als Graft-versus-Leukaemia (GVL)-Effekt [19]. Das volle Potential einer HSCT kann nur dann erlangt werden, wenn ein Gleichgewicht aus ausreichender Immunität, einem Anti-Tumor-Effekt und keiner GvHD erreicht wird [20].

1.2 Akute Graft-versus-Host Disease

Nach wie vor stellt die GvHD eine lebensbedrohende Komplikation nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation dar. Diese entsteht, wenn immunkompetente T-Zellen des Spenders (im „Graft“ enthalten) die Organe und Gewebe des Empfängers („Host“) als fremd erkennen und angreifen [21]. Klinisch unterscheidet man die akute von der chronischen GvHD [2]. Diese Arbeit konzentriert sich auf die akute GvHD, die u.a. zu Schäden an Haut, Leber, Lunge und Gastrointestinaltrakt führen kann [22]. Chronische GvHD führt zu diffusen Manifestationen und kann in Form von Autoimmunsyndromen wie eosinophiler Fascitis, Sklerodermie-ähnlicher Symptomatik und vielen anderen Varianten auftreten [23]. Definitionsgemäß und basierend auf epidemiologischen Studien tritt die akute GvHD innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auf, die chronische hingegen nach dem 100. Tag post transplantationem. Jedoch kann auch die akute GvHD, insbesondere nach Einsatz immunsuppressiver Medikamente, nach 100 Tagen auftreten, weshalb die Klassifizierung anhand pathologischer Kriterien größere Genauigkeit verspricht [24].

Die Schwere der Erkrankung kann über das Ausmaß der Lymphozyten-Infiltration der drei hauptsächlichen Zielorgane eingeschätzt werden: Die Haut (am häufigsten und auch am frühesten betroffen), der Gastrointestinaltrakt (am zweithäufigsten betroffen) und die Leber [22, 25].

Grad 1 der akuten GvHD wird als mild eingestuft, Grad 2 als moderat, Grad 3 als schwer und Grad 4 als sehr schwer. Betrachtet man alle Patienten, die einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen werden, so zeigt sich bei 30-50% eine akute Form der GvHD (Grad1-4) und bei 14% eine schwere Form der akuten GvHD (Grad 3-4) [26]. Zu den Risikofaktoren einer akuten GvHD gehören der Grad von HLA-Inkompatibilität, der Empfang eines Transplantats von einem unverwandten Spender, ein weiblicher Spender für einen männlichen Empfänger

oder die Nutzung von mobilisierten peripheren Blutzellen des Stammzell-Spenders [26].

1.3 Pathophysiologie der GvHD

Nach Ferrara et al. [27] lässt sich die Entwicklung der akuten GvHD in drei Phasen einteilen: Zunächst erfolgt in Phase I die Aktivierung der APCs. Anschließend ist die Phase II durch T-Zell-Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Migration gekennzeichnet. Phase III wird durch die eigentliche Gewebszerstörung charakterisiert.

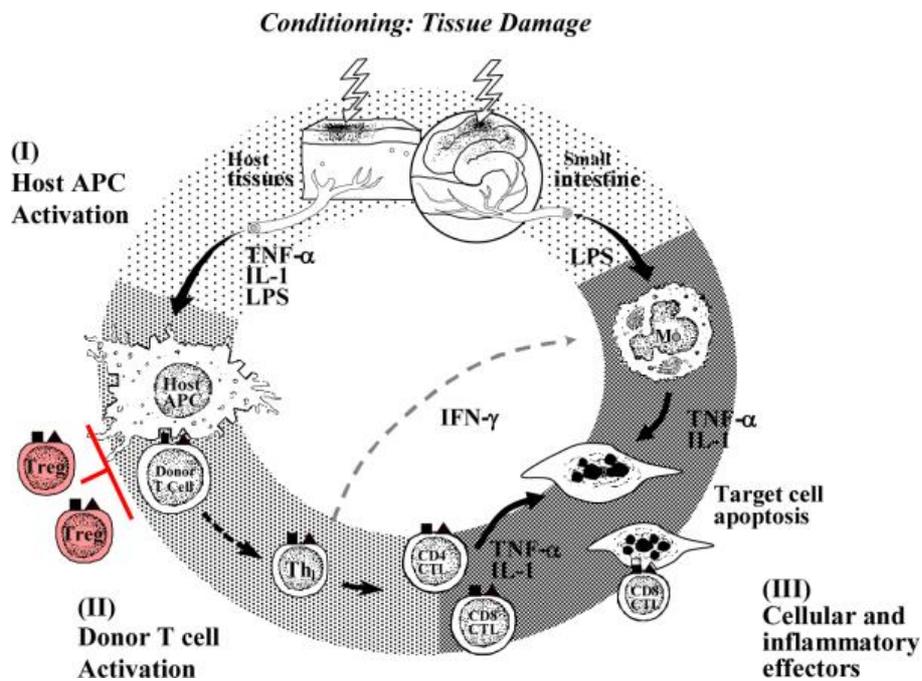


Abbildung 1: Pathophysiologie der GvHD

Das Konditionierungsregime sorgt in Phase I für die Freisetzung von Zytokinen. Anschließend erfolgt die Aktivierung von Empfänger-APCs. In Phase II werden Spender-T-Zellen durch Empfänger-APCs aktiviert. Phase III bezeichnet die durch zelluläre und inflammatorische Mechanismen ausgelöste Gewebszerstörung. License number: 4899340557819

Einleitung

In Phase I sorgt das Konditionierungsregime mit dem Einsatz von Bestrahlung, Chemotherapie und Antikörpergabe für die Freisetzung von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6. Erhöhte Level dieser Zytokine sorgen für die Aktivierung von APCs des Empfängers. In Phase II aktivieren Empfänger APCs reife Spender-T-Zellen, worauf die Proliferation und Differenzierung von aktivierten T-Zellen zusammen mit zytotoxischen T-Lymphozyten, NK-Zellen, $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 erfolgen. $\text{TNF}\alpha$ kann Gewebszerstörung durch die Induktion von Apoptose und Nekrose bsp. in der Haut und im GI-Trakt mediiern, die entweder über TNF-Rezeptoren oder den Fas-Signalweg abläuft [27].

1.4 T-Zellen und T-Zell-Untergruppen innerhalb der GvHD

T-Lymphozyten bilden folgende Untergruppen: CD8^+ , hauptsächlich zytotoxische T-Zellen, und CD4^+ -T-Helferzellen; beide spielen als Auslöser der GvHD eine wichtige Rolle [20]. Während CD4^+ -T-Zellen meistens die Initiation der GvHD verursachen, treiben CD8^+ -T-Zellen die gewebsschädigende efferente Phase der Erkrankung. CD4^+ -T-Zellen können aber auch alleine die GvHD mediiern [28, 29]. Nachdem naive CD4^+ -T-Lymphozyten den Selektionsprozess des Thymus durchlaufen haben, können sie antigenabhängig und -unabhängig in verschiedene T-Helferzell-Subklassen differenzieren (T_H -Zellen). Die Differenzierung erfolgt wesentlich durch Zytokin-Stimuli und die Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren (s. Kapitel 4.6).

Einleitung

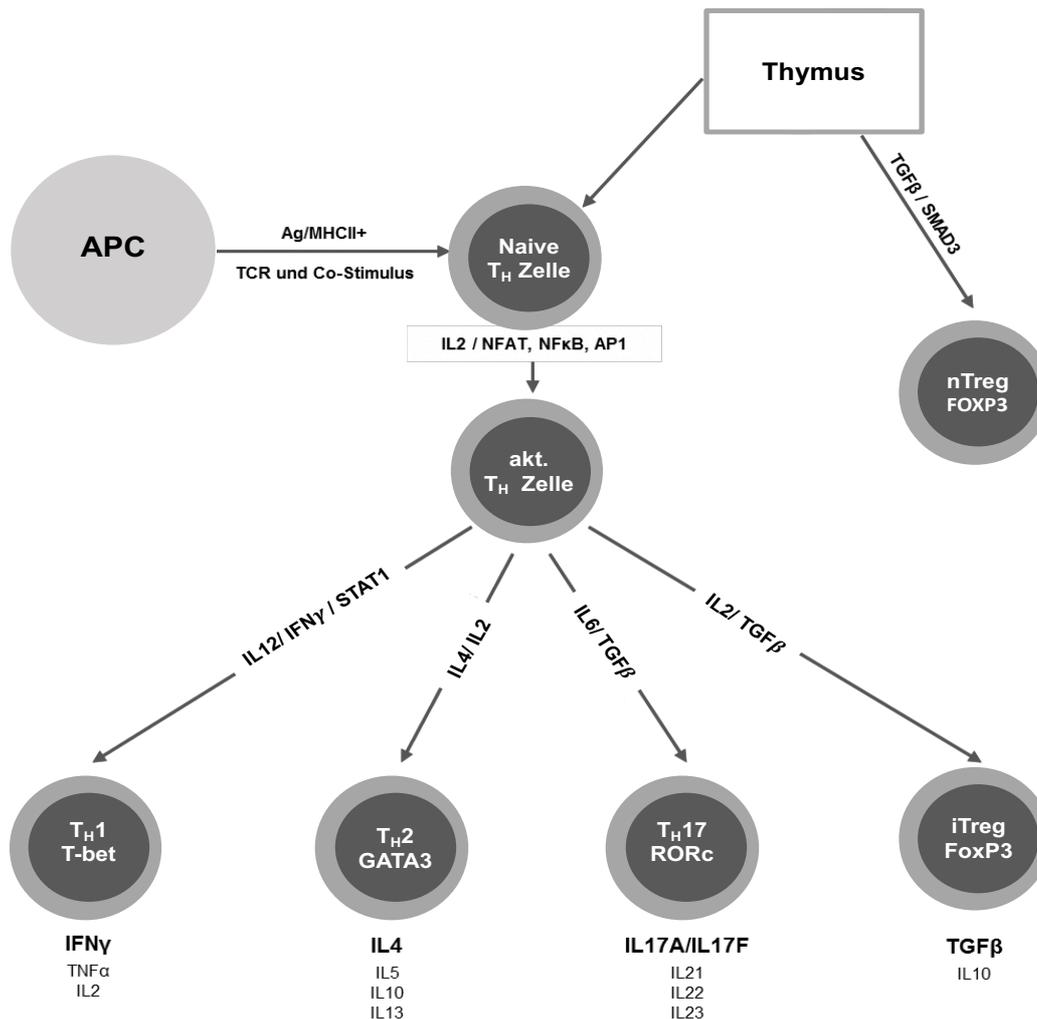


Abbildung 2: Differenzierung von T-Helferzell-Subtypen

Die Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu Effektor-T-Zellen (T_H1, T_H2, T_H17 und iTreg) in der Peripherie wird durch die Aktivierung des TCR-Signalweges durch die Erkennung eines Antigens induziert. Die Entwicklung der nTregs erfolgt stattdessen im Thymus. Für jeden T-Helferzell-Subtyp ist ein Mastertranskriptionsfaktor charakteristisch sowie die Produktion von spezifischen Zytokinen. Außerdem wird die Differenzierung durch spezifische Zytokine reguliert. Abbildung modifiziert nach [30].

Zunächst erkennen naive CD4⁺-Spender-T-Zellen Fremdantigene über APCs [31]. Anschließend differenzieren sie in T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen. Ist IL-12 präsent, differenzieren CD4⁺-T-Zellen in IFN_γ-produzierende T_H1-Zellen. Unter

IL-4 differenzieren sie in IL-4-, IL-5- und IL-13-produzierende T_H2-Zellen. T_H17-Zellen produzieren IL-17A, IL-17 F und IL-22 [32].

Ohne IFN γ differenzieren CD4⁺-T-Zellen vermehrt in T_H2- und T_H17-Zellen und verursachen im Mausmodell Gewebsschäden in Lunge und Haut [33, 34]. CD4⁺-Spender-T-Zellen können reziprok in T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen differenzieren und organspezifisch die GvHD auslösen [31]. Eine weitere Untergruppe der T-Zellen sind regulatorische T-Zellen (Tregs). Sie sind spezialisiert auf die Unterdrückung überschießender und die Beendigung inadäquater Immunantworten und dienen damit der Aufrechterhaltung der homöostatischen Immuntoleranz [35]. Die Rolle von T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen während der akuten GvHD wird kontrovers diskutiert. Man geht derzeit davon aus, dass die akute GvHD überwiegend von T_H1-Zellen vermittelt wird und die chronische von T_H2-Zellen [36]. So zeigten Mäuse mit IL-4-defizienten T-Zellen eine mildere Verlaufsform der akuten GvHD [37]. Überraschenderweise induzierten IFN γ -defiziente T-Zellen bei Mäusen eine schwerere Erkrankung [38].

1.5 Der T-Zellrezeptor

T-Zellen kommt die zentrale Rolle bei der Entstehung der GvHD zu [26]. T-Zellen erkennen entweder fremde Antigene, die von einem MHC-Molekül präsentiert werden oder sie erkennen das MHC-Molekül selbst, wenn es nicht vom gleichen Individuum wie die T-Zelle stammt. Der TCR ist ein Heterodimer, das aus 2 Ketten besteht. Bei $\alpha\beta$ -T-Zellen handelt es sich um eine α - und eine β -Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind [39, 40]. Beide Ketten werden über somatische Rekombination von DNA-Abschnitten gebildet und formen damit ein immens diverses Repertoire an nicht Keimbahn-kodierten TCR-Sequenzen. Man geht davon aus, dass die Anzahl der verschiedenen funktionellen $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptoren etwa 10^{15} bis 10^{20} beträgt [41, 42].

Wie entsteht diese Rezeptordiversität?

Sowohl α - als auch β -Kette formen die hypervariable CDR3-Region, mit der der TCR sein Antigen erkennt und bindet. Über sie erfolgt die Erkennung des MHC-präsentierten Peptids. Die Antigen-spezifität wird dabei etwas mehr von der V- α -Kette bestimmt als von der β -Kette [43]. Es gibt jede CDR3-Region nur einmal, so dass sie charakteristisch für eine bestimmte T-Zelle ist [42]; dennoch besitzt sie bestimmte konservierte Aminosäuresequenzen. Hierzu gehören bei der α -Kette die Sequenz CA-XXXX-FGXGT, wobei die Aminosäuresequenz CA (Cystein/Alanin) vom V-Segment und die Sequenz FGXGT (Phenylalanin/Glycin/X/Glycin/Threonin) vom jeweiligen J-Segment zusammengesetzt wird [44-46]. Dieses Motiv steht am Ende der CDR3-Region. Keimbahn-kodiert sind die CDR1- und CDR2-Regionen – sie binden an Strukturelemente von MHC-Molekülen [47, 48]. Besitzen die CDR3-Regionen zweier unterschiedlicher TCRs ähnliche Strukturen, d.h. können sie potentiell das gleiche Epitop binden, spricht man von Motiven.

Der Locus der α -Kette des T-Zellrezeptors findet sich auf Chromosom 14 (14q11.2) und ist aus 47 TRAV-, 57 TRAJ-Regionen und einer TRAC-Region zusammengesetzt. Der Locus der β -Kette des T-Zellrezeptors liegt auf Chromosom 7 (7q35) und ist aus 54 TRBV-, 2 TRBD-, 13 TRBJ- und 2 TRBC aufgebaut [49]. Eine zufällige Kombination von Abschnitten dieser Gene sorgt nur für 5-10% der potentiellen Diversität innerhalb des T-Zellrezeptors [50, 51]. Dabei liegen bei der Neukombination von DNA-Segmenten keine Sollbruchstellen vor, sondern Bereiche, in denen ein Doppelstrangbruch möglich ist. Eine Exonukleotid-Transferase füllt vor der Neuverbindung der Bruchstellen variabel und zufällig beliebig viele N-Nukleotide ein, was eine immense Diversität schafft, da diese Insertionen zwischen V- und D-Segment sowie D- und J-Segment stattfinden. Die Paarung von einer α - mit einer β -Kette bedingt einen weiteren Zuwachs an Diversität.

Verteilungsmuster und Repertoire der TCR-Familien

Das Repertoire der TCR-Familien im Gesunden zeigt sich als Gauß'sche Normalverteilung. Das Verteilungsmuster im Gesunden ist außerdem polyklonal. Es weist eine große Dynamik auf und ist äußerst anpassungsfähig gegenüber äußeren (Viren oder andere Pathogene) und inneren (Alter oder Polymorphismen in T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren) Einflüssen [52]. Um Erkenntnisse über das TCR-Repertoire auf molekularer Ebene zu gewinnen, eignet sich die Methode des Spectratyping [53]. Sowohl die Anzahl exprimierter V β -Familien als auch die Anzahl, Intensität und Anordnung der Banden innerhalb einer Familie lassen Rückschlüsse auf die Komplexität und Anordnung des TCR-Repertoires zu [54-56].

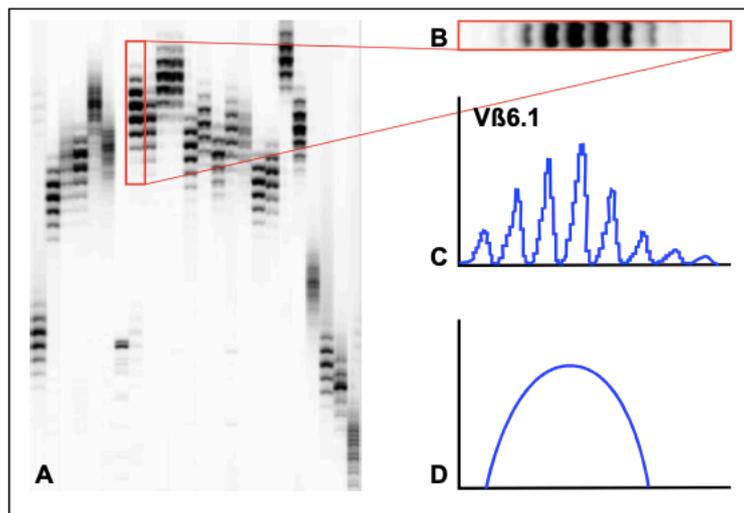


Abbildung 3: Spectratype-Ergebnisse der CDR3-Region von V β 1-V β 24 einer gesunden Maus

A: Dargestellt werden die V β -Familien V β 1-V β 24, die eine Bandenzahl von 6-8 pro V β -Familie innerhalb der Milz aufweisen. B: In der Mitte zeigen sich die Banden mit der stärksten Intensität, rechts und links davon treten Banden schwächerer Intensitäten auf, mit ab- bzw. zunehmenden Fragmentlängen. C: Darstellung der Abbildung B in der Saggitalebene. D: Ableitung der Bandenintensitäten als Gauss'sche Normalverteilung innerhalb einer V β -Familie [57]. (Quelle der Abbildung ist die Habilitationsschrift von K. Schilbach-Stückle)

1.6 Vergleich zwischen der GvHD und einer pathogen-spezifischen Immunantwort

Die GvHD unterscheidet sich von einer klassischen Pathogen-spezifischen Immunantwort in vielen Aspekten. Es entsteht keine Pathogen-induzierte Gewebs-Inflammation, die Inflammation rührt vielmehr von Konditionierungsregimen wie Chemotherapie, Bestrahlung und Antikörpergabe her [58, 59].

Bei der GvHD werden T-Zellen direkt in den Empfänger transplantiert - im Gegensatz zu schon vorhandenen T-Zellen bei einer normalen Infektion. Die Spender-T-Zellen richten sich gegen kein Pathogen. Stattdessen präsentiert jede APC körpereigene Antigene wie während der Homöostase. Deshalb ist auch keine spezifische Untergruppe von APCs an der GvHD beteiligt [2, 27]. Auch die Reifung und Migration von APCs zu sekundär lymphatischen Organen sind nicht mit einem Zielpathogen assoziiert. Außerdem kann das körpereigene Antigen bei einer GvHD nicht durch Effektorzellen eliminiert werden, da es „unendlich“ vorkommt – eine GvHD ähnelt daher einer chronischen viralen Infektion. Zielantigene sind ubiquitär exprimiert.

Während der GvHD kommt es zum Einsatz einer Vielzahl von Mechanismen des adaptiven Immunsystems. Dies erklärt, warum Schweregrad, Organverteilung, aber auch die Histopathologie sehr variieren und warum die Manipulation von fast allen Immunmodulatoren, z.B. von Zytokinen und co-stimulatorischen Molekülen, den Phänotyp der Erkrankung in Mausmodellen ändern kann [23].

1.7 Alloreaktive T-Zellen

Auch im Gesunden spielt Kreuzreaktivität von T-Zellen eine bedeutende Rolle [60]. Sie sorgt u.a. für eine gesicherte Immunantwort gegenüber jeglichen präsentierbaren Fremdanitigenen. Post transplantationem sind alloreaktive T-Zellen verantwortlich für das Auftreten der GvHD. Entscheidend ist ein Gleichgewicht zwischen einer ausreichenden Immunität, dem Verhindern des Rezidivs der malignen Erkrankung und dem Auftreten der GvHD.

T-Zellen im Gesunden können von Peptiden aktiviert werden, die unverwandt zu den Peptiden sind, für die die T-Zelle ursprünglich die Selektion des Thymus durchlaufen hat [61]. Für den Pathomechanismus der GvHD erfolgt die T-Zell-Prägung bereits häufig im Spender-Organismus. Die anschließend transplantierten T-Zellen binden im Empfänger an Fremdantigene und mediieren die GvHD [62].

Wie können selektiv alloreaktive Effektor-T-Zellen depletiert und dennoch eine ausreichende Immunität sichergestellt werden? Hierzu wurden in den letzten Jahren verschiedene Techniken entwickelt. Diese folgen der Annahme, dass naive T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, das größte Risiko für Alloreaktivität darstellen. Diese weisen die größte Diversität im TCR-Repertoire auf [63].

1.8 Zielantigene der alloreaktiven T-Zellen

Die Antigenerkennung alloreaktiver T-Zellen unterscheidet sich in Abhängigkeit davon, ob das präsentierende MHC-Molekül von Spender und Empfänger, matched oder mismatched ist [64-66]. MHC-I-Moleküle (A, B und C) sind auf verschiedenem Niveau von allen Zellen exprimiert, während MHC-II-Moleküle (DR, DQ und DP) hauptsächlich von APCs, inklusive B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten sowie z.B. von aktivierten CD4⁺-T-Zellen exprimiert werden [67].

Wenn die MHC-Moleküle von Spender und Empfänger identisch sind, kann die Spender-T-Zelle nur MHC-gebundene Peptide erkennen, die das Produkt polymorpher Gene des Empfängers darstellen, aber nicht im Spender vorkommen. Diese Antigene werden als „Minor Histocompatibility Antigens“ (miHAs) bezeichnet. Somit sind miHAs Peptide zellulärer Proteine, die von MHC-I präsentiert werden [68]. Da jedes Gewebe eine bestimmte Aufgabe zu erfüllen hat, unterscheiden sich die miHAs, die z.B. eine Muskelzelle herstellt, von denen, die z.B. Blutzellen machen. Minor-Antigene weisen deshalb in den meisten Fällen eine Gewebsrestriktion auf [69]. Dies hat Einfluss auf die Infiltration der jeweiligen Organe mit alloreaktiven T-Zellen und resultiert, wie von unserer Arbeitsgruppe

gezeigt, in organständigen Repertoires [70]. Die Quellen [71-74] zeigen einige der bereits identifizierten miHAs.

Auch in MHC-mismatched Transplantationen ist die Erkennung von miHAs möglich – nämlich, wenn diese von den übereinstimmenden MHC-Molekülen präsentiert werden. Dies ist besonders relevant für CD4⁺-T-Zellen-vermittelte Erkrankungen [23].

Die GvHD-induzierenden T-Zell-Antworten können sowohl gegen Empfänger-MHCs als auch Empfänger-miHAs abzielen, die von autologen oder mit dem Spender übereinstimmenden MHC-Molekülen präsentiert werden.

Bestimmen einzelne miHAs die GvHD?

Obwohl MHC-matched Spender und Empfänger verschiedenste polymorphe Loci haben, die potentiell miHAs generieren könnten, kommt manchen miHAs eine besondere Rolle zu. Minor-Antigene haben ein unterschiedliches Potential, eine (letale) GvHD auszulösen – sie zeigen eine interindividuelle Organexpression. Es gibt miHAs, die allein eine GvHD auslösen können. Zu ihnen gehört das auf die Hämatopoese restringierte Minorantigen HA-1. Andere können im Verbund eine GvHD triggern. Bedenkt man ihre große Vielfalt und betrachtet die hohe Inzidenz einer GvHD trotz MHC-Match wird klar, dass die Transplantatabstoßung heute in den meisten Fällen aufgrund von miHA-Mismatches erfolgt [75-77].

Auch wurden ausschließlich MHC-I zugehörige miHAs beschrieben, die eigentlich an CD8⁺-T-Zellen binden sollten, jedoch CD4⁺-T-Zell-abhängig sind [23]. Das Vorhandensein bestimmter miHAs kann für die Schwere der GvHD prognostisch sein [78-81], z.B. bei den Genen für SNPs [82], insbesondere für die Gene NOD2/CARD15 [83].

1.9 T-Zell-Effektormechanismen

Zur Induktion der GvHD ist nicht immer eine direkte Bindung der T-Zellen an das Zielorgan-Antigen nötig. Sowohl in HLA-mismatched- als auch in -matched Transplantationen können CD4⁺-T-Zellen allein durch die Ausschüttung von Zytokinen (wie z.B. TNF α , IL-1 und IL-6), d.h. ohne direkte Zell-Interaktion, die Entwicklung einer GvHD bestimmen [84]. In HLA-mismatched Transplantationen ist die Häufigkeit von alloreaktiven T-Zellen besonders hoch, weil hier MHC-Moleküle erkannt werden, die ubiquitär vorkommen [85]. Auch können CD4⁺-T-Zellen über die Aktivierung von Gewebsmakrophagen (via Zytokine wie TNF α , IL-2 und IFN γ) Gewebsschäden auslösen. Die Unabhängigkeit der HLA-mismatched GvHD von direkten Zielgewebkontakten zeigt sich auch darin, dass sie unabhängig von CD95L und/oder Perforin sein kann [86]. Stattdessen spielen TNF und oder TNF-related Apoptosis inducing Ligand (TRAIL) eine Rolle. Die möglicherweise essentielle Rolle von TNF für die GvHD zeigt der therapeutische Effekt einer TNF-Blockade [87].

Zusammenfassend besitzen T-Zellen eine Vielzahl von Effektormechanismen, die eine GvHD auslösen können. So beeinflusst der Eingriff in einzelne Signalwege zwar den Verlauf der GvHD, ihre Entstehung kann jedoch nicht komplett verhindert werden [88].

1.10 Die Bedeutung von Effektor-Memory-T-Zellen

Die Einteilung von T-Zellen nach bereits erworbenem Antigenkontakt (Gedächtnis-T-Zellen, Memory-T-Zellen) oder Naivität (nicht aktivierte T-Zellen) spielt im Kontext der GvHD eine große Rolle. Werden ausschließlich Effektor-Memory-T-Zellen transplantiert, kann die Immunsystem-Wiederherstellung verbessert und das Risiko einer GvHD deutlich vermindert werden [89-91]. Humane Memory-T-Zellen besitzen ein fokussierteres und, weil antigenerfahren, weniger alloreaktives TCR-Repertoire im Vergleich zu naiven T-Zellen [92]. Auch eine reduzierte klonale Expansion von Effektor-Memory-T-Zellen kann die Entwicklung eines Vollbildes der GvHD verhindern [93]. Effektor-Memory-T-Zellen weisen eine reduzierte Expression von CD62L oder CCR7 auf, weshalb sie nicht zwangsläufig zu Lymphknoten und Peyer-Plaques wandern. Transplantierte entwickeln auch

ohne Lymphknoten und Peyer-Plaques eine GvHD – dies zeigt, dass Spender-T-Zell-Prägung in der Milz und nicht in Lymphknoten wichtig ist für die Entwicklung einer GvHD [94].

1.11 Aktuelle Ansätze zur Prävention der GvHD

Seit 1980 ist die Standardprophylaxe für Patient*innen nach allo-HSCT die Kombination von Folat-Antagonisten wie Methotrexat (MTX) mit Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin-Alpha und Tacrolimus [95]. Die Kombination aus MTX und Tacrolimus ist mit einem um 40% verringerten Risiko der Entstehung einer schweren GvHD assoziiert, jedoch mit einer ähnlichen Inzidenz und vergleichbaren Mortalität einer GvHD [96]. Mycophenolat Mofetil (MMF) zeigt auch synergistische Effekte mit Calcineurin-Inhibitoren zur Prävention der GvHD [97]. Die Gabe von hochdosiertem Cyclophosphamid kurz nach Transplantation kann speziell proliferierende alloreaktive T-Zellen erreichen. So konnte nach Gabe von hochdosiertem Cyclophosphamid eine niedrige Inzidenz von Grad 3-4 aGvHD gezeigt werden [98].

1.12 Verfahren zur T-Zell-Depletion – Geschichte der Transplantatgenerierung

Mit zunehmendem Verständnis über zentrale Mechanismen der GvHD wurden unterschiedliche Depletions-Techniken entwickelt, um ein Gleichgewicht zwischen GVL-Effekt, einer ausreichenden Immunität und dem Auftreten der GvHD zu erreichen. Trotz der Standard-Kombination von Calcineurin-Inhibitoren mit MTX oder MMF post transplantationem tritt die aGvHD in ungefähr 40-60% der Fälle auf [99]. Die *ex-vivo* pan-T-Zell-Depletion war ein erster Versuch, HLA-mismatched Transplantationen erfolgreich durchzuführen [100]. Auch wenn sich zunächst ein sehr niedriges Risiko für das Auftreten einer GvHD zeigte [15, 101], erwies sich dieses Verfahren als ungünstig in Bezug auf die Wiederherstellung des Immunsystems und den GVL-Effekt [14]. Das Therapieergebnis der pan-T-Zell-Depletion wurde durch den Einsatz einer hohen Dosis ($>12 \times 10^6/\text{kg}$) von CD34⁺- Stammzellen von G-CSF-mobilisierten PBSCs verbessert [102]. Auch die kombinierte Depletion von T- und B-Zellen zeigte eine verspätete

Immunrekonstitution und vermehrt Infektionen [103, 104]. Basierend auf der Beobachtung, dass die aGvHD u.a. durch CD8⁺-T-Lymphozyten ausgelöst wird, konnte zunächst gezeigt werden, dass die Inzidenz der aGvHD durch CD8-Depletion niedrig gehalten werden konnte, was jedoch nicht in einer Phase II Studie bestätigt werden konnte [105, 106]. Eine Weiterentwicklung der T-Zell-Depletionsansätze bei gleichzeitigem Erhalt von NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen im Spender stellte die Strategie der $\alpha\beta$ -T-Zell-Depletion dar [107], sodass keine nachfolgende medikamentöse Prophylaxe des Empfängers benötigt wurde [108]. Neben der *ex-vivo* T-Zell-Depletion wurden auch *in-vivo* Depletionstechniken entwickelt. Hierunter fallen das Anti-Thymozyten Globulin (ATG) [109] oder Alemtuzumab, was durch die Bindung von CD52 gegen reife T- und B-Lymphozyten gerichtet ist [110].

1.13 CD45RA-Depletion

GvHD-auslösende T-Zellen befinden sich hauptsächlich im naiven T-Zell-Kompartiment (CD45RA⁺-Zellen) - verschiedene Arbeitsgruppen haben den Effekt der Depletion von CD45RA⁺-Zellen untersucht [111-113]. Beispielsweise wurde beobachtet, dass hierdurch die Alloreaktivität des Spenders gegenüber dem Empfänger signifikant reduziert werden kann. *In-vitro* wurde sogar ein verstärktes antitumorales und antivirales Verhalten der transplantierten Zellen nachgewiesen [113]. Verschiedene Arbeitsgruppen haben anschließend herausgestellt, dass CD45RA-depletierte Transplantationen möglich sind [111, 114-117], jedoch mit weiterhin auftretender GvHD [111].

Bislang existiert keine Strategie, wie mit den verbliebenen alloreaktiven T-Zellen nach CD45RA-Depletion umzugehen sei oder aus welcher Entität sie sich rekrutieren. Bekannt ist allerdings, dass Memory-T-Zellen niedrigschwelliger und damit rascher aktivierbar sind als naive T-Zellen. Sie können auch ohne TCR-Crosslink Effektorfunktion medieren, wenn sie über Zytokine wie in der Inflammation stimuliert werden.

1.14 Bedeutung co-stimulatorischer und co-inhibitorischer Signale für die Pathogenese der GvHD

Aktuelle Forschung zeigt, dass co-stimulatorischen und co-inhibitorischen Molekülen eine herausragende Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf der durch T-Zellen medierte GvHD zukommt. So wurde beispielsweise versucht, über die Blockade von CD40-CD40L und CD80-/CD86-CD28/CTLA-4 alloantigen-spezifische T-Zell-Anergie und -Toleranz zu erreichen [18, 118]. Der sog. Induzierbare-T-Zell-Co-Stimulator (ICOS), der auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Induktion von aGvHD und cGvHD [119, 120]. CD26 ist assoziiert mit T-Zellrezeptor-assoziierten Signaltransduktionswegen. CD26⁺-T-Zellen akkumulieren in GvHD-Zielorganen [121]. Darüber hinaus wurde die Zelloberflächenexpression von 4-1BB (CD137) als nützlich zur Identifikation von alloreaktiven T-Zellen beschrieben [122]. Das Protein LAG3 (Lymphocyte-activation Gene 3) bindet an MHC-II und inhibiert die primäre Aktivierung von T-Zellen. Dies verhindert das Entstehen der murinen GvHD [123]. Das T-Zell-Immunoglobulin und sog. Mucin-containing Protein 3 (TIM3) reguliert T_H1-Antworten negativ. Die Serumkonzentration von TIM3 korreliert positiv mit der Schwere von aGvHD [124].

Im Vorfeld meiner Arbeit untersuchte unsere Arbeitsgruppe verschiedene dieser co-stimulatorischen und co-inhibitorischen Signale sowie Aktivierungs-, Proliferations- und Phänotypmarker als potentielle charakterisierende Marker alloreaktiver Memory-T-Zellen im Versuchsaufbau einer haploidentischen HSCT und identifizierte CD276 als hochspezifischen Marker für alloreaktive CD4⁺-T-Zellen [1].

1.15 CD276

CD276 gehört zur B7-Familie (B7-H3), dessen Rezeptor(en) unbekannt und dessen Funktion(en) in der Immunregulation bislang noch nicht geklärt sind. Eine große Gruppe von Immunzellen exprimiert CD276, darunter aktivierte T-Zellen, NK-Zellen, DCs, Makrophagen und nicht-hämatopoetische Zellen, z.B. epitheliale Zellen und die Mehrheit an soliden Tumoren [125, 126]. Sowohl die

immun-co-stimulatorische als auch -co-inhibitorische Rolle von CD276 auf APCs wurde intensiv untersucht [127]. Die Bedeutung von CD276 auf T-Zellen ist jedoch bislang unklar. Zwar wurde die Beeinflussung der GvHD durch CD276 auf Spender-Zellen beschrieben, jedoch wurde gezeigt, dass CD276 als ein negatives co-stimulatorisches Molekül im Kontext der GvHD agiert: Spender-T-Zellen von CD276^{-/-}-Mäusen verstärkten die GvHD in einem mismatched-Versuchsaufbau [128]. Vorversuche der AG-Schilbach identifizierten CD276 als einen hochspezifischen Marker für aktivierte, alloreaktive CD4⁺-T-Zellen, denjenigen T-Zellen, die die GvHD initiieren und treiben [1]. Der zu den publizierten Ergebnissen beobachtete gegenteilige Effekt von CD276 bedarf Erklärung. Bedeutsam ist jedoch, dass in einem Mausmodell, in dem generell kein CD276 exprimiert wird, die Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen gestört ist. Hingegen wird in der vorliegenden Studie CD276 ausschließlich auf T-Zellen nachgewiesen und, so angegeben, auch depletiert, wodurch die Funktion aller anderen CD276-tragenden Zellen unangetastet bleibt.

1.16 Arbeitshypothese und Zielsetzung

Die Graft-versus-Host Disease (GvHD) ist eine der Hauptursachen von Therapieversagen in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation [129-132]. Ursächlich für akute Abstoßungsreaktionen sind die im Transplantat enthaltenen Lymphozyten – insbesondere CD4⁺-T_H1-Zellen. Trotz neuer Therapieansätze wie der Entfernung naiver (CD45RA⁺) T-Zellen aus dem Transplantat, tritt die GvHD (wenngleich milder) trotzdem weiterhin auf [111-113]. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass das Oberflächenmolekül CD276 (B7-H3) ein hochspezifischer Marker für alloreaktive CD4⁺-T-Zellen ist und von den T-Zellen, die die GvHD initiieren und treiben, exprimiert wird [1].

Durch die Analyse von haploidentischen CD45RA-depletierten mixed-Lymphocytes-Cultures (MLCs) konnten wir bereits zeigen, dass die CD45RA-Depletion zwar die Alloreaktivität von CD8⁺-T-Lymphozyten zufriedenstellend reduziert,

Einleitung

jedoch Fremdantworten innerhalb des CD4-Kompartiments nicht ausreichend minimiert. Um die Alloreaktivität von CD4⁺-T-Lymphozyten zu minimieren, soll daher CD276 als hochspezifischer Marker für alloreaktive CD4⁺-T-Lymphozyten, nach Co-Kultur von Spender- und Empfängerzellen depletiert und untersucht werden, ob durch diese Strategie die Abstoßungsreaktion verhindert werden kann.

Dazu wurden als ein sehr sensibles humanes allo-GvHD-Modell NSG-Ab^o DR4-Mäuse herangezogen. Diese Mäuse waren Rezipient von drei verschiedenen T-Zelltransplantaten: a) der Gesamtheit aller CD4⁺-T-Zellen, b) CD45RA-depletierter- und c) CD45RA/CD276-depletierter CD4⁺-T-Zellen. Die Frage, der ich mit dieser Doktorarbeit auf den Grund gehen werde, lautet:

Kann die Depletion von CD276⁺-T-Zellen aus dem Transplantat die GvHD verhindern?

Für den ersten Teil meiner Arbeit fand die Methode des „Graft Engineerings“ Anwendung - also die Depletion von CD45RA bzw. CD276 durch die Gabe der Antikörper „*in-vitro*“ - vor Transplantation in die Maus. In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Antikörper gegen CD276 „*in-vivo*“ verabreicht.

Das Ziel dieser Arbeit ist eine funktionelle und phänotypische Analyse organständiger Kompartimente der CD4⁺-T-Lymphozyten vor und nach der Depletion Graft-versus-Host-mediierender T-Zellen im humanen allo-GvHD-Modell.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Biocoll Lösung	Biochrom AG, Berlin, D
Desoxyribonukleotidtriphosphate	Roche, Mannheim, D
DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, D
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, D
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, D
Heparin	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Hi-Di™ Formamid	LifeTechnologies, Darmstadt, D
Interleukin-2	Immunotools GmbH, Friesoythe, D
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, D
Lyse Puffer	Universitätsapotheke, Tübingen, D
Penicillin/Streptavidin	Biochrom AG, Berlin, D
PBS (mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	GIBCO, Eggenstein, D
PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	PAA, Farnborough, UK
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, D
RNAase-, DNAase-freies Wasser	Invitrogen, Groningen, NL
TGF Beta	Immunotools GmbH, Friesoythe, D
Trypan blue solution (0,4%)	Sigma, Taufkirchen, D
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%)	Biochrom AG, Berlin, D

Material und Methoden

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank: B6060	Heraerus, Hanau, D
FACS: BD FACSCalibur, BD LSR II	Becton Dickison, Heidelberg, D
Gefrierschränke:	
Froster Labex 95, QSD 3500 (-20°C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, D
Model 91 (-80°C)	ThermoQuest, Egelsbach, D
Gen-Sequenzierer: 3130 xl Genetic Analyze	Life Technologies, Darmstadt, D
FKU 1800	Liebherr, Kirchdorf an der Iller, D
Lightcycler: CFX96 Real-time System, C1000TM Thermal	Cycler Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Magnete: MiniMACSTM Separator	Mitenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Mikroskope: IX50, CX40	Olympus, Shinjuku, Japan
PCR Thermocycler: Gene AMP PCR System 9700	Thermofischer Scientific, Waltham, USA
Pipetten: P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Villers-le Bel, F
Vortexgerät: REAX top	Heidolph, Nürnberg, D
Waage: BP 121 S	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad: WB 14	Memmert Schwalbach, D
Zentrifugen: Mikro 22 R, Rotixa 50 RS, Rotanta 46 RSC	Hettich, Tuttlingen, D

Material und Methoden

Tabelle 3: Laborzubehör

Gerät	Hersteller
Verschiedene Glaswaren	Schott Duran, Schott Mainz, D
Kryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
Pasteur Röhrchen	Fortuna, Barking, UK
PCR Reaktionsgefäße	Thermo-Strips, PEQLAB, Erlangen D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, D, Greiner, Frickenhausen, D Biozym, Oldendorf, D
Stabpipetten	Greiner, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße 15ml, 20ml	Greiner, Frickenhausen, D
Spritzen	Braun, Melsungen, D
Sterilfilter Ministart	Satorius, Göttingen, D
Zellsieb	BD Falcon, Heidelberg, D
Zellkulturflaschen	BD Falcon, Heidelberg, D
Zellkulturplatten	BD Falcon, Heidelberg, D

Material und Methoden

Tabelle 4: Immunologische Kits

Immunologische Kits	
Kit zur Isolierung von FITC-markierten Zellen	Anti-FITC-Microbeads Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Kit zur Isolierung von PE-markierten Zellen	Anti-PE-Microbeads Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Kit zur Isolierung von CD4 ⁺ -T-Zellen	Dynabeads CD4 Positive Isolation Kit Invitrogen, Groningen, NL
Kit zur Expansion von humanen T-Zellen	Dynabeads human T-cell activator CD3/CD28 Invitrogen, Groningen, NL
Kit zur Isolierung von NK-Zellen	Dynabeads Untouched Human NK Cells Kit Invitrogen, Groningen, NL

Tabelle 5: Molekularbiologische Kits und Enzyme

Molekularbiologische Kits	
Kit zur Isolation von RNA	RNeasy® Mini Plus Kit Qiagen, Hilden, D
Kit zur cDNA-Synthese	Super Script® III First-Strand Synthesis SuperMix Invitrogen, Groningen, NL
Enzyme	
Taq-Polymerase (inkl. 10x Puffer, 50mM MgCl ₂)	Invitrogen, Groningen, NL
iQTM SYBR® Green Supermix iTaq™ DNA Polymerase SYBRTM Green I	Roche, Mannheim, D
BigDye Terminator v3.1 Master Mix	Life Technologies, Darmstadt, D

2.1.1 Antikörper

Tabelle 6: Primärantikörper

Humanes Antigen	Klon	Fluorochrom	Firma
CD3 (Maus IgG ₁ , Kappa)	UCHT1	FITC	BD-Biosciences
CD28 (Maus IgG ₁ , Kappa)	CD28.2	BUV737	BD Biosciences
CD25 (Maus IgG ₁ , Kappa)	M-A251	BUV395	BD Biosciences
CD276 (Maus IgG ₁ , Kappa)	7-517	BV421	BD Biosciences
CD45RA (Maus IgG ₁ ,Kappa)	5H9	PE-Cy7	BD Biosciences
CD45 (Maus IgG ₁ , Kappa)	HI30	APC	BD Biosciences
CD8 (Maus IgG ₁ , Kappa)	HIT8alpha	APC-H7	BD Biosciences
CD3 (Maus IgG2a, Kappa)	HIT3alpha	Alexa700	BioLegend
CD8 (Maus IgG1,Kappa)	HIT8alpha	PercP	BioLegend
CD4 (Maus IgG1, Kappa)	SK3	PercP	BioLegend
CD4 (human IgG1)	REA623	Vioblue	Miltenyi Biotech

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Humanes Antigen	Fluorochrom	Firma
IgG1	FITC, PE, APC	Becton-Dickinson
IgG2a	PerCP	Becton-Dickinson

Tabelle 8: Antikörper für die Isotypenkontrolle

Humanes Antigen	Fluorochrom	Firma
Ziege anti-Maus	FITC	Becton-Dickinson
Ratte anti-Maus	PE	Becton-Dickinson

2.1.2 Pufferlösungen

FACS-Puffer

Für die Durchflusszytometrie wurde ein PBS-Puffer ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mit zusätzlichem 2% FCS und 2mM EDTA genutzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

MACS-Puffer

Die magnetaktivierte Zellsortierung erfolgte mit einem Puffer aus PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mit 10% BSA und 2 mM steril-filtrierte EDTA. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.1.3 PCR-Primer

Anhand von Publikationen wurden die Primer ausgewählt, die Verifizierung ihrer Sequenz erfolgte mittels der NCBI-Datenbank. Ihre Synthese erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland). Sie wurden als Lyophilisat geliefert, in DEPC-Wasser gelöst, in Konzentrationen von 20 pmol/ μl aliquotiert und bei -20° C gelagert.

Tabelle 9: PCR-Primer

Primer	Sequenz
GAPDH (sense)	5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'
GAPDH (anti-sense)	5'-GGCAACAATATCCACTTTACCAGACT-3'
h-STAT1-rev	5'-TTCCACCCCTTTCCATCAGTC-3'
h-STAT1-for	5'-TACTGACCTGCCACCTTGTG-3'
h-SOCS3-for	5'-AGCAGCGATGGAATTACCTGGAAC-3'
h-SOCS3-rev	5'-TCCAGCCCAATACCTGACACAGAA-3'
CD45-for	5'-TGCACAAACAATGAGGTGCAT-3'
CD45-rev	5'-CCACTGGAGAACACCACACA-3'
T-bet-for	5'-GCCTACCAGAATGCCGAGATTA-3'
T-bet-rev	5'-ACTCAAAGTTCTCCCGGAATCC-3'
RORC-for	5'-CAGTGAGAGCCCAGAAGGAC-3'
RORC-rev	5'-TCTTGGCCTTCATTGTACCC-3'
Foxp3-for	5'-GAGAAGCTGAGTGCCATGCA-3'
Foxp3-rev	5'-GGAGCCCTTGTCGGATGAT-3'
Gata3-for	5'-GCGGGCTTCTATCACAAAATGA-3'
Gata3-rev	5'-GCCTTCGCTTGGGCTTAAT-3'
Eomes-for	5'-GGCAAAGCGGACAATAACAT-3'
Eomes-rev	5'-AGCCTCGGTTGGTATTTGTG-3'

2.1.4 Computerprogramme

Genutzt wurden zur Textverarbeitung Microsoft® Word® 2010 (Fa. Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim), zur Grafikbearbeitung GraphPadPrism (Fa. GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) oder Microsoft® Powerpoint® 2010, zur Diagrammerstellung Microsoft® Excel® 2007 oder GraphPadPrism (Fa. GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Die Messung der FACS-Analysen wurde mit Hilfe von CellQuest™ (Becton-Dickinson, Heidelberg, D) durchgeführt. Zur Datenauswertung wurden entweder dasselbe Programm oder FACSDiva™ Software (Becton-Dickinson, Heidelberg, D) genutzt.

2.2 Methoden

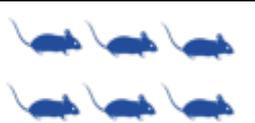
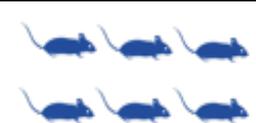
2.2.1 Mausmodell

Die immundefizienten NSG-Ab° DR4-Mäuse (NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}H2-Ab1^{tm1Gru}Tg(HLA-DRB1)31Dmz/SzJ) stammen vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Alle Mäuse waren weiblich und zum Zeitpunkt des Einsatzes zwischen 12 und 24 Wochen alt. Sie wurden in Einzelkäfigen unter speziellen keimfreien Bedingungen gehalten. Die Versorgung der Tiere und die anschließende Organexplantation erfolgte durch Hisayoshi Hashimoto und Karin Schilbach. Alle Tierversuche wurden auf Grundlage folgender Ethikvota durchgeführt: K01/17, K05/18 und K04/19G.

2.2.2 Transplantation der humanen CD4⁺-T-Zellen in NSG-Ab° DR4-Mäuse

NSG-Ab° DR4-Mäuse erhielten von drei Spendern eine Einzelinjektion (4×10^6 Zellen/Maus) in die Schwanzvene nach folgendem Aufbau:

Tabelle 10: Übersicht über die analysierten Individuen mit den zugehörigen Transplantaten und den jeweiligen untersuchten Organen.

Transplantat	Analysierte Individuen		Untersuchte Organe
	HLA-DR4+	HLA-DR4-	
Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen			Leber Lunge Colon Haut
CD45RA⁺-depletiert			Leber Lunge Colon Haut
CD45RA⁺/CD276⁺-depletiert			Leber Lunge Colon Haut

Die Depletionen von CD45RA bzw. CD276 erfolgten vor der Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer. Alle Tiere erhielten die gleiche Zellzahl. Die Individuen wurden täglich auf fünf Parameter der klinischen GvHD kontrolliert (Körperhaltung, Aktivität, Eigenschaften des Fells, Hautläsionen und Gewichtsverlust) und auf einer Skala von 0-2 bewertet. Der Score der klinischen GvHD wurde nach Summation dieser Parameter wie beschrieben berechnet [133]. Die Mäuse wurden getötet, wenn sie einen Einzelwert von 1,5 oder einen klinischen Score von 4 oder aber den Endpunkt von 100 Tagen erreicht hatten. Das Engraftment, also das Anwachsen des Transplantats, wurde definiert als >5% humane Zellen in den gesamten PBMCs. Wurde das Engraftment nach Tag 35 nicht erreicht, wurden die Mäuse von der Studie ausgeschlossen. Die CD4⁺-T-Zellen, die transplantiert wurden (99.7-100% Reinheit, restliche 0,3% waren jeweils nicht CD3⁺-Zellen), wurden in 50-100 µl PBS gelöst.

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen für die Durchführung der Durchflusszytometrie von Leber, Lunge, Colon und Haut (3 x 3 cm²) wurden die jeweiligen Mausorgane mit zwei Skalpellern in kleinste Stücke zerkleinert und für

eine Stunde in RPMI bei 37°C gelöst. Das Gewebe bzw. die Suspension wurde anschließend durch ein Zellsieb (Durchmesser 70 µm) gestrichen. Nun wurde die gewonnene Zellsuspension bei 300 g für 5 min sedimentiert. Noch vorhandene Erythrozyten wurden wie unter 2.2.5.1 beschrieben lysiert und die Durchflusszytometrie wie unter 2.2.5.5 beschrieben durchgeführt.

2.2.3 *In-vivo* Depletion von CD276⁺-CD4⁺-T-Zellen mittels mAb

Wie unter 2.2.5.7 bzw. 2.2.5.9 beschrieben, wurden CD4⁺-T-Lymphozyten isoliert und CD45RA⁺-Zellen depletiert. Die Reinheit der Zellen betrug für CD4⁺-T-Lymphozyten >97% und für CD45RA⁻-CD4⁺-T-Lymphozyten >99%. Die NSG-Ab^o DR4-Mäuse erhielten eine Einzelinjektion in die Schwanzvene mit HLA-DR4-Spender CD45RA-depletierten CD4⁺-T-Zellen (4x10⁶ Zellen/Maus). Autologe NK-Zellen (1x10⁵ Zellen/Maus) wurden wöchentlich zusammen mit dem CD276-depletierenden Antikörper (20 µg) bzw. der Isotypen-Kontrolle (PBS) appliziert. Der für die *in-vivo* CD276-Depletion verwendete Antikörper besitzt die Klonbezeichnung HEK5-1B3 und wurde von HJ Bühring generiert.

In-vivo CD276⁺-Depletion

GvHD-Induktion mittels Einzelinjektion von 4x10⁶ HLA-DR4⁺ Memory-CD4⁺-T-Zellen/Maus

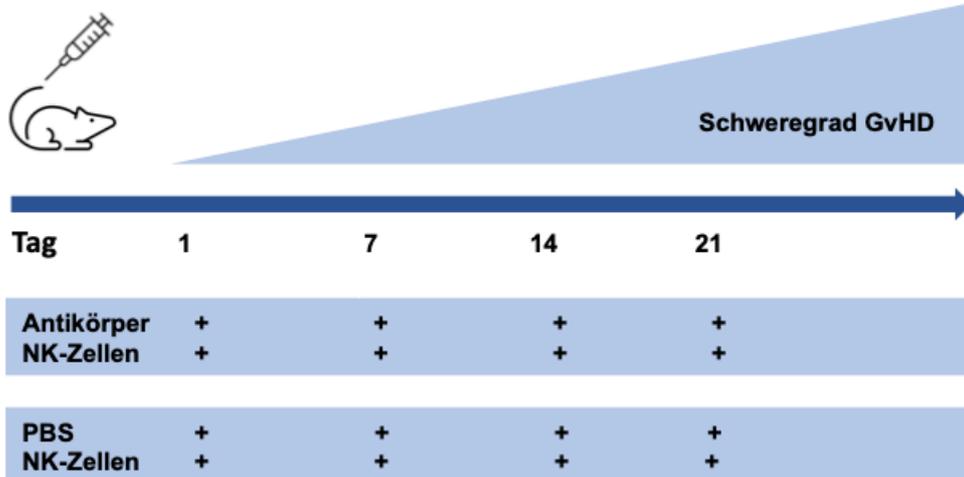


Abbildung 4: *In-vivo* CD276⁺-Depletion

NSG-Ab^o DR4-Mäusen wurden je 4x10⁶ CD4⁺-Memory-T-Zellen HLA-DR4-Spender transplantiert. Autologe NK-Zellen wurden wöchentlich zusammen mit dem CD276-depletierenden Antikörper bzw. PBS zur Kontrolle durch Punktion der Schwanzvene appliziert.

2.2.4 Histologie

Gewebe der NSG-Ab^o DR4-Mäuse wurde in 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. An 5 µm Schnitten erfolgte die Hämatoxylin-Eosin Färbung und der immunhistochemische Nachweis von T-Lymphozyten mittels Maus-humanem CD3. Die Histologie wurde in Zusammenarbeit mit Pathologen der Universität Tübingen durchgeführt.

2.2.5 Immunologische Methoden

2.2.5.1 Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation wird angewendet, um die mononukleären Zellen des Blutes von neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten zu trennen. Entsprechend ihrer Dichte entstehen drei Schichten: Unten finden sich Granulo- und Erythrozyten, darüber ein Ring aus den mononukleären Zellen (Peripher Blood Mononuclear Cells, PBMCs), bedeckt von Blutplasma und Thrombozyten. Alle im Folgenden beschriebenen Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS vermischt und vorsichtig auf die Biocoll-Lösung geschichtet. Danach wurde der Gradient bei 800 g für 15 min ohne Bremse abzentrifugiert. Der durch die Dichtezentrifugation entstandene Lymphozytenring, der die mononukleären Zellen des Blutes enthält, wurde abgenommen und zweimal gewaschen (1. 500 g, 12 min; 2. 350 g 10 min, beides jetzt mit Bremse). Anschließend wurden die verbliebenen Erythrozyten mittels Lysepuffer gelöst (2 min), die nach der Lyse empfindlich gewordenen Zellen wurden bei 250 g für 10 min zentrifugiert. Wasser dringt dank der hypotonen Eigenschaften des Lysepuffers in die Zellen ein. Da Erythrozyten eine nicht-flexible Zellmembran besitzen, platzen nur diese, während die PBMCs zwar quellen, aber nicht platzen. Inhibiert wurde die Lyse durch Zugabe von mindestens dem 5-10fachen Volumen PBS. Die Zellen wurden bei 250 g zentrifugiert. Zwei weitere Zentrifugationsschritte mit PBS bei 250 g dienten dem Auswaschen verbliebenen Lysepuffers. Nach Resuspension in PBS konnte die Zellzahl nach Trypanblaufärbung in der Neubauerzählkammer

bestimmt werden. Die Zellen wurden in RPMI 1640 bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

2.2.5.2 Zellkulturbedingungen

Zellkulturen wurden bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5% in einem Inkubator gelagert.

2.2.5.3 Zellkulturmedien

PBMNCs wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert. Dem RPMI 1640 Medium wurde 10% fetales Kälberserum (FCS) und eine 1% Penicillin/Streptavidin-Lösung (10⁴ U/ml /10⁴ pg/ml) zugesetzt, dem RPMI 1640 Medium darüber hinaus auch 1% Glutamin-Lösung (2mM). Zur Hitzeinaktivierung wurde das FCS 40 min 56°C ausgesetzt und anschließend in Aliquots à 50 ml bei -20°C gelagert. 5ml Aliquots der Antibiotika und des Glutamin wurden bei -20°C gelagert, fertig angesetztes RPMI Medium bei 4°C.

2.2.5.4 Zellkultur von PBMNCs

PBMNCs wurden, wie unter 2.2.5.1 beschrieben, durch Dichtegradientenzentrifugation von gesunden freiwilligen Spendern isoliert. Je 2x10⁵ PBMNCs pro Well wurden auf eine 96-Well-Platte ausgesät. In allen Ansätzen wurde ebenfalls 50 U/ml oder 150 U/ml IL-2 hinzugegeben, um einer aktivierungsinduzierten Apoptose entgegenzuwirken. Nach 4 bzw. 7 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Proliferation und Zytokin-Produktion hin untersucht.

2.2.5.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bestimmt mittels Laserstrahl die Größe und Granularität der passierenden Zellen. Im Forward Scatter des Dot-Plots wird die Größe der Zellen, im Side Scatter die Granularität dargestellt (s. Abb. 6). Durch die zusätzliche Markierung der Zellen mit verschiedenen Antikörpern, die jeweils ein anderes Fluorochrom tragen, können simultan verschiedene Proteine der Zelle angefärbt und über die FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) sortiert werden. Diese Markierung kann sowohl direkt als auch indirekt erfolgen.

Im direkten System wird der gebundene Primärantikörper unmittelbar detektiert. Beim indirekten Verfahren kommt ein Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper zum Einsatz. Der Detektion kann das Biotin/Streptavidin-System dienen oder ein Sekundärantikörper, der die konstante Region des Primärantikörpers erkennt. Die Färbung mittels Primär- bzw. Sekundärantikörper erfolgte nach folgendem Protokoll: Zunächst wurden die zu markierenden Zellen in 1 ml FACS-Puffer für 2 min bei 660 g gewaschen und der Überstand abgeschüttet. Nach Rütteln der pelletierten Zellen erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurde erneut mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und der Überstand verworfen. Vor der Messung am FACS-Gerät wurde kurz mit dem Vortex-Gerät gerüttelt.

2.2.5.6 MACS - Magnetaktivierte Zellseparation

Diese Technik basiert auf der Bindung von magnetischen Microbeads an Antikörper gegen Oberflächenmoleküle. Die Antikörper-gebundene Zellfraktion wird im magnetischen Feld getrennt. Zuvor erfolgt die Inkubation der Zellen mit einem oder mehreren Antikörpern. Beads können entweder direkt an die Antikörper gebunden sein, oder die Antikörper tragen eine nicht magnetische Chromophor- oder Biotingruppe, an die spezifische Microbeads binden können. Zellen können mit Hilfe der beschriebenen direkten oder indirekten Methode gebunden und magnetisch von der restlichen Population getrennt werden. Dies ist die positive Isolation. Auch nicht gewünschte Zellpopulationen können mittels Anti-Biotin-Microbeads markiert und depletiert werden. Man spricht von der Negativ-Isolation. Da die gewünschten Zellen die Säule unberührt passieren, bezeichnet man diese Technik als „untouched Isolation“.

Depletion bedeutet „maximal Abreichern“, d.h. die zu untersuchenden Zellen sollen später zu 100% rein sein und keine Zellbestandteile der zu depletierenden Fraktion enthalten.

2.2.5.7 Positive Isolation mittels Dynabeads von CD4⁺-T-Zellen

Bei dieser Isolationstechnik werden die Zellen direkt positiv isoliert, d.h. der magnetisierte Antikörper bindet direkt an die Zielzelle. Verwendet wurde das „Dynabeads CD4 Positive Isolation Kit“ von Invitrogen. Positive Isolation sorgt für

eine hohe Reinheit. Jedoch müssen die gebundenen Beads nach der Isolation wieder mit dem DETACHaBEAD-Kit entfernt werden. Die isolierten Zellen sind Antikörper-frei und können für weitere Analysen verwendet werden.

Wie im Protokoll beschrieben, werden die Dynabeads zunächst im Verhältnis 1:1 mittels PBS (enthält zusätzlich 0,1% BSA und 2nM EDTA) gewaschen, dann wird der durch die Dichtezentrifugation peripheren Blutes gewonnene Buffy-Coat vorbereitet und die anti-CD4 Dynabeads[®] (4×10^8 Beads/ml in PBS mit 0,1% BSA und 0,02% Natriumsalz) mit PBMNCs zusammengegeben (25 μ l Beads für 1×10^7 PBMNCs/ml). Es erfolgt die Inkubation für 20 min bei 4°C und ständiger Rotation. Dann wird das Tube in den Magnet platziert. Nach magnetisch bedingter Adhäsion der gelabelten Fraktion an die Tubewand wird der Überstand verworfen und die adhärenen Zellen isoliert. Sie entsprechen der Positiv-Fraktion. Im letzten Schritt werden die Dynabeads von den isolierten CD4⁺-T-Zellen mit Hilfe des DETACHaBEAD[®] durch Inkubation für 45 min entfernt. Anschließend erfolgen 2-3 Waschgänge mittels jeweils 500 μ l RPMI 1640/1% FCS. In einem letzten Zentrifugationsschritt werden DETACHaBEAD[®] bei 400 g für 6 min entfernt. Die isolierten Zellen sind frei von Antikörpern und Beads.

2.2.5.8 Dynabeads Human T-Cell-Activator CD3/CD28

Mithilfe dieser Methode lassen sich T-Zellen aktivieren. Somit imitiert dieses Produkt eine *in-vivo* T-Zell-Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen, indem zwei Aktivierungssignale (aCD3 und aCD28) an ein dreidimensionales Bead gebunden sind, welches der Größe einer Antigen-präsentierenden Zelle ähnelt. Nach Benutzung der Beads können die T-Zellen in Kultur zur Proliferation gebracht werden. Zunächst werden Dynabeads[®] Human T-Activator CD3/CD28 (4×10^7 Beads/ml in PBS mit 0,1% humanem Serum-Albumin) gewaschen und dann in einem bestimmten Verhältnis (25 μ l Dynabeads[®] Human T-Activator CD3/CD28 für 1×10^6 T-Zellen) zu den humanen T-Zellen gegeben. Anschließend erfolgt die Inkubation der Zellen.

2.2.5.9 Depletion von CD45RA⁺- und CD276⁺-T-Zellen

Die CD45RA⁺-Fraktion enthält naive T-Zellen. In unserem Mausmodell wurden jedoch nur Memory-T-Zellen transplantiert. Zur Gewinnung der Memory-T-Zellen wurde die indirekte Isolation angewendet. Genutzt wurde das Anti-PE MicroBeads Ultra Pure Kit von Miltenyi Biotec zur MACS Isolation. Zunächst wurden die Zellen mit R-Phycoerythrin (PE) gebundenem Antikörper, in diesem Fall anti-CD45RA-Antikörper angefärbt und für 10 min inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 20 μ l Anti-PE MicroBeads pro 10^7 Zellen gebunden und für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschgang, das Verwerfen des Überstandes und die Resuspendierung in 500 μ l Puffer pro 10^8 -Zellen. Diese Zellen konnten dann in eine MACS-LD-Säule geladen werden und wurden im magnetischen Feld an die Wand dieser Säule gebunden. D.h. die magnetischen Zellen werden zurückgehalten, während die ungebundenen durch die Säule hindurchwandern und durch den Puffer ausgewaschen werden. Die auf die Säule gebundenen Zellen erhält man, indem man die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und mit Puffer die sich jetzt von der Stahlmatrix lösenden Zellen auswäscht. Diese können direkt durchflusszytometrisch untersucht werden. Alle verwendeten Lösungen wurden gekühlt bei 4°C genutzt. Die gleiche Technik wurde für die Depletion der CD276⁺-Fraktion innerhalb der CD4⁺-T-Lymphozyten angewendet. Die Reinheit der CD45- und CD276- Fraktion betrug >99%.

2.2.5.10 ADCC/CDC Assay

Nach Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation wurde mit den isolierten kernhaltigen Zellen weitergearbeitet und CD4⁺-T-Lymphozyten isoliert. Wir konzentrieren uns auf diese Subpopulation, weil sie, wie in der Einleitung beschrieben, den Hauptakteur der Abstoßungsreaktion repräsentiert und Hauptexpressor von CD276 ist. Innerhalb der 7-tägigen Stimulation mit Dynabeads und niedrig dosiertem IL-2 erfolgten regelmäßige Kontrollen der CD276-Zellzahl innerhalb der CD4⁺-Population mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung folgender Antikörper: Live/Dead, CD3-PerCP, CD276-PE, CD4-Vioblue, CD8-APC. Nach erfolgter Stimulation konnten autologe NK-Zellen und vom gleichen Spender stammendes Serum isoliert werden. NK-Zellen wurden streng nach Herstellerprotokoll der Firma Invitrogen mittels „untouched

Material und Methoden

Isolation“ (s. 2.2.5.6) gewonnen. Im Gegensatz zur Isolation der CD4⁺-T-Lymphozyten (s. 2.2.5.7) wurden die NK-Zellen „unberührt“ von den mittels Dynabeads® markierten Zellen durch einen Magneten getrennt.

Die Gewinnung von Serum erfolgte, indem nach der Blutentnahme zunächst bei Raumtemperatur die Gerinnung des gewonnenen Blutes für 15-20 min abgewartet wurde. Anschließend wurde bei 1000 g für 10 min zentrifugiert, sodass der Überstand als Serum isoliert und sofort weiterverwendet werden konnte.

Am selben Tag wurde die 96er „flat bottom“ Muldenplatte vorbereitet. Für den Assay wurden pro Mulde 1x10⁵ CD4⁺-Lymphozyten, 1x10⁴ NK-Zellen, 20 µl Serum und 10 ng/ml anti-CD276-Antikörper verwendet und nach 2 bzw. 3 Tagen ausgewertet. Für die Auswertung wurde mittels FACS und anschließend FlowJo die Anzahl der CD276⁺-CD4⁺-T-Lymphozyten bestimmt und zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen verglichen. Außerdem wurde der Apoptosemarker Annexin V innerhalb der CD276⁺- und CD276⁻-Fraktionen bestimmt und ausgewertet. Hierzu wurden vorher 2 µl Annexin V zusammen mit 1:10 verdünntem Annexin V Puffer 15 min inkubiert, zentrifugiert und nach Zugabe weiteren Puffers im FACS analysiert.

Tabelle 11: Versuchsansätze für den ADCC/CDC Assay

Für die Durchführung wurden acht Mulden vorbereitet, die wie folgt bestückt wurden:

CD4+ Zellen 1*10 ⁵ /well	+	+	+	+	+	+	+	+
NK Zellen 1*10 ⁴ /well	-	-	+	+	-	-	+	+
mAb CD276 10ng/ml	-	+	-	+	-	+	-	+
Komplement	-	-	-	-	+	+	+	+
Il-2 (50 Units/ µl)	+	+	+	+	+	+	+	+

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Gewebe-Homogenisierung

Um RNA aus den Geweben extrahieren zu können, wurden die Mausorgane homogenisiert. Hierzu wurde der DIAX-900[®] genutzt. Die Organe wurden in beta-mercaptohaltigem RNA-Lysepuffer homogenisiert und sofort nach dem Vorgang auf Trockeneis gebracht und anschließend bei -80°C in Cryo Tube[™] Vials bis zur RNA-Extraktion gelagert.

2.2.6.2 RNA-Extraktion und Quantifizierung durch Spektrometrie

Zur RNA-Extraktion wurde das *RNeasy Mini Kit plus* der Firma Qiagen (Hilden, D) streng nach den Angaben im Protokoll des Herstellers genutzt.

Die Zentrifugation der hämatopoetischen Zellen erfolgte für 10 min bei 300 G. Die Resuspension des aufgelockerten Pellets erfolgte in 350 µl β-RLT-Puffer, hergestellt aus RLT-Puffer, dem 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml hinzugefügt wurden. β-Mercaptoethanol streckt die Proteine und inaktiviert dadurch die Nukleasen/RNAsen. Die Zentrifugation des homogenisierten Lysats bei 14.000 rpm für 30 Sekunden in einem über eine selektiv DNA-bindende Säule (einem *gDNA eliminator*) entfernte genomische DNA, anschließend erfolgte zur Präzipitation der RNA ein Durchmischen mit jeweils 350 µl 70% Ethanol. Unter Einsatz der *RNeasy spin* Säule wurde nun 700 µl fassende Lösung für 15 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nun wurde die RNA dreimal gewaschen: Mit 700 µl RW1-Puffer, danach mit 500 µl RPE-Puffer bei 14.000 rpm für 15 Sekunden und zuletzt mit RPE-Puffer für 2 min bei 14.000 rpm. Nach diesen Waschgängen wurde ohne Zugabe eines Puffers für 2 min bei 14.000 rpm zur Entfernung des restlichen Ethanols zentrifugiert. Abschließend wurde nach Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die herausgewaschene RNA auf Eis gelagert. Die Bestimmung der Reinheit (260nm/280nm) und der Konzentration der RNA erfolgte mittels Spectrophotometer (Nano Drop-1000[®]). Vor dem Umschreiben der gewonnenen RNA in cDNA wurde sie bei -80°C eingelagert.

2.2.6.3 cDNA-Synthese

Für die weiteren Untersuchungen wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Nach Zusatz von 2 µl Annealing Buffer und 2 µl Oligo-dTs (50 µM) zu 12 µl der eluierten RNA erfolgte die Inkubation dieser Mischung für 5 min bei 65°C im Thermocycler zur Eliminierung von dsRNA Formationen. Dies verbessert die Bindung der Oligo-dTs an die RNA. Es folgten der Zusatz von 10 µl des First-Strand Reaktionspuffers sowie 2 µl des DNA-Polymerase enthaltenden SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzym-Mixes, Inkubation bei 56°C für eine Stunde und Denaturierung der Doppelstränge bei 85°C für 5 min und Lagerung auf Eis für 2 min. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.6.4 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR werden durch drei sich zyklisch wiederholende Reaktionsschritte innerhalb kurzer Zeit gewünschte DNA-Abschnitte durch den Einsatz einer hitzebeständigen DNA-Polymerase amplifiziert. Doppelsträngige DNA wird durch eine hohe Temperatur (94°C) denaturiert, woraufhin nach einer Absenkung der Temperatur auf eine sequenzadaptierte Annealing Temperatur die Bindung der Oligonukleotid-Primer an Einzelstränge der DNA stattfindet. In der Elongationsphase synthetisiert z.B. eine Taq-Polymerase neue DNA-Doppelstränge mit den Desoxynukleotidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Die neu entstandenen Doppelstränge durchlaufen dann wiederholt weitere Amplifikationszyklen.

2.2.6.5 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in den Maus-Empfängerorganen vor und nach Depletion von CD45RA/CD276 wurde mittels quantitativer real time PCRs analysiert. Dargestellt wird die Reaktionskinetik der Amplifikation der cDNA, die Aufschluss über die Genexpression gibt. Ein mit der DNA interkalierender Fluoreszenz-Farbstoff (SYBR®-Green) zeigt ein verändertes Absorptionsspektrum bei Interkalierung mit doppelsträngiger DNA (spezifisches PCR-Produkt) im Vergleich zur einzelsträngigen DNA (eingesetzte cDNA). Bezogen werden die Ergebnisse auf die Expression von GAPDH als

Material und Methoden

Housekeeping-Gen. Für die qRT-PCR kamen 10 ng cDNA jeweils in Dubletten sowohl für die GAPDH- als auch die Effektormolekül-Expression zum Einsatz.

Die untersuchten Effektormoleküle waren CD45, STAT1, GATA3, SOCS3, ROR γ T, T-bet, EOMES und FOXP3. CD45 wurde als Leukozytenmarker für Infiltrationsversuche der Maus-Zielorgane mit alloreaktiven T-Zellen verwendet. T-bet, FOXP3, ROR γ T und GATA3 stellen T-Zell Master-Transkriptionsfaktoren dar. Hierdurch sollten Erkenntnisse über das Ausmaß der Beteiligung von T_H1, T_H2, Tregs und T_H17-Zellen an der Abstoßungsreaktion gewonnen werden. Des Weiteren wurden die Transkriptionsfaktoren EOMES, STAT1 und SOCS3 untersucht, da sie eine bedeutende Rolle in der T_H17-zellvermittelten Pathologie spielen [134]. SOCS3 inhibiert die Differenzierung von T_H17-Zellen [135] und verhindert die T-Zellproliferation alloreaktiver T-Zellen [136].

Die einzelnen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Der MasterMix für die einzelnen Ansätze ist in Tabelle 13 aufgeführt, die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 9 beschrieben.

Tabelle 12: real time PCR-Bedingungen der unterschiedlichen Primer

Effektormolekül	PCR-Programm
CD45	95°C 5 min 40x (95° C 30 s; 58° C 45 s) + Schmelzkurve
STAT1	95°C 5 min 40x (95° C 30 s; 62° C 45 s) + Schmelzkurve
SOCS3	95°C 5 min 40x (95° C 30 s; 58° C 45 s) + Schmelzkurve
GATA3	95°C 5 min 40x (95° C 30 s; 60° C 45 s) + Schmelzkurve
RORC	95°C 5 min 40x (95° C 30 s; 60° C 45 s) + Schmelzkurve
T-bet	95°C 5 min 40x (95° C 30 s; 60° C 45 s) + Schmelzkurve
EOMES	95°C 5 min 40x (95° C 30 s; 60° C 45 s) + Schmelzkurve
FOXP3	95°C 5 min 40x (95° C 30 s; 60° C 45 s) + Schmelzkurve

Tabelle 13: Ansatz für den MasterMix jeder durchgeführten real time PCR

Stoff	Menge
SYBR Green I	10 µl
Primer forward	20 pmol
Primer reverse	20 pmol
cDNA	5 ng
H ₂ O	Ad 20µl

2.2.6.6 Sanger-Sequenzierung

Der Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte liegt die Didesoxymethode oder Kettenabbruchmethode zu Grunde. Die vier unterschiedlich Fluorochrom-markierten Desoxynukleotidtriphosphate (dCTP, dATP, dGTP und dTTP) werden zur Amplifikation in das entsprechende PCR-Produkt eingebaut. Angeregt durch einen Laser emittieren diese Fluorochrome Licht in einer definierten Wellenlänge. Diese Lichtemission wird vom Sequenzierer detektiert und als Elektropherogramm dargestellt.

Ungelabelte reverse Primer wurden unter den entsprechenden PCR-Bedingungen zusammen mit dem zu sequenzierenden PCR-Produkt eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Mini Elute PCR Purification Kit[®] und die Konzentration wurde wie oben beschrieben mit dem Nano Drop[®] bestimmt. Je nach Länge des Fragments wurden 1,5-3 ng in der Sequenzierungs-PCR mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit[®] verwendet.

Tabelle 14: PCR-Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen

PCR Name	PCR Mastermix		PCR Bedingungen
Denaturierung	Big dye buffer	1x	5 min 98°C; 5 min 4°C
	Primer	1,8 pmol	
	DMSO	5%	
	H ₂ O	add 9,5 µl	
Sequenzierung	BigDye Terminator v3.1 Mix	0,75 µl	98°C 1 min; 25x (98°C 20sek/50°C 10 sek/ 60°C 4 min)

2.2.6.7 Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Zur Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte kam das ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ von ZymoResearch zum Einsatz. Dem Protokoll folgend wurden 240 µl des Sequencing Binding Buffers zu 5-20 µl Sequencing Reaktionsgemisch gegeben. Die Mischung wurde dann in ein Zymo-Spin™ IB Column in einem Sammel-Tube gegeben. Dieses wurde anschließend mit 13.000 rpm /15000-16.000 g) für 30 sek zentrifugiert. Dann wurden 300 µl Sequencing Wash Buffer auf die Säule aufgetragen. Wiederum erfolgte eine Zentrifugation mit 13.000 rpm für 30 sek.

Im letzten Schritt wurden 6-20 µl H₂O direkt auf die Säule gegeben, die anschließend auf ein 1,5 ml Mikrozentrifugations-Tube transferiert und ein letztes Mal mit 13.000 rpm für 15 sek zentrifugiert wurde, um die DNA herauszulösen. Die isolierte DNA wurde auf ein BigDye Terminator 96 Well-Plate gegeben und stand nun für die Analyse durch den Sequenzer zur Verfügung. Das stets im Dunkeln gelagerte BigDye Terminator 96 Well-Plate wurde auf dem 3130xl Genetic Analyser unter Verwendung der Sequence Analysis Software v.5 analysiert. Die gewonnene Basensequenz wurde auf Übereinstimmung mittels

Material und Methoden

IMGT, NCBI und Emboss-Datenbanken überprüft und die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Die entsprechenden Public-TCRs wurden mit Hilfe von Literaturrecherche und der Datenbank des Pierce-Lab identifiziert.

2.2.7 Statistische Methoden

Die Daten wurden mittels Graphpad Prism 7.0 analysiert. Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurde der One-way ANOVA bzw. Tukey's multiple comparison angewendet. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3 Ergebnisse

Die nun folgenden Abschnitte 3.1 - 3.2 zeigen die Ergebnisse des *ex-vivo* Einsatzes (Graft Engineering) des CD276-Antikörpers.

Die Infiltration und der Phänotyp der CD4⁺-T-Lymphozyten in Leber, Lunge, Colon und Haut wurde mittels a) Durchflusszytometrie b) real time PCR durch Expression des Leukozyten-Markers CD45 nachgewiesen. Darüber hinaus erfolgte c) der immunhistochemische Nachweis perivaskulärer Lymphozyteninfiltration in DR4-matched-Transplantaten.

Die Identifikation der Epitop-bindenden Regionen der T-Zellrezeptoren erfolgte durch direkte Sequenzierung von Singlepeaks vorangegangener Spectratype-Analysen (Abschnitte 3.3-3.5).

Mittels real time PCR wurden Gewebeproben therapierter NSG-DR4-Mäuse auf die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren untersucht, die indikativ für T_H1, T_H2, Treg und T_H17 sind (Abschnitt 3.6).

Die *in-vitro* Analyse von MLCs nach Einsatz des anti-CD276-Antikörpers lieferte Ergebnisse zur anti-CD276-Antikörper vermittelten CDC bzw. ADCC mittels Durchflusszytometrie (Abschnitte 3.7-3.9).

Im letzten Teil meiner Arbeit erfolgte der *in-vivo* Einsatz des anti-CD276-Antikörpers und der anschließende immunhistochemische Nachweis perivaskulärer Lymphozyteninfiltration (Abschnitt 3.10).

3.1 Infiltration von GvHD-Zielorganen durch humane CD4⁺-T-Zellen in DR4-mismatched- und DR4-matched-Transplantaten

Die Durchflusszytometrie mit humanen CD4⁺-T-Lymphozyten lieferte sehr eindrückliche Ergebnisse innerhalb der DR4-mismatched-Transplantate (Abb. 5 und 6). Es zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion ($p < 0,05$) der Infiltration von CD4⁺-T-Lymphozyten in allen Geweben. Während sich in Leber und Lunge nach CD45RA/CD276-Depletion eine geringe Infiltration feststellen ließ, waren so gut wie keine T-Zellen in Colon und Haut nachweisbar (Abb 5).

In DR4-matched-Transplantaten erwies sich der Einsatz von CD276 als nicht erfolgreich im Vergleich zur CD45RA-Depletion (Abb 7). Der Unterschied zwischen den DR4-matched- und DR4-mismatched-Transplantaten konnte durch die Ergebnisse der qPCR (wenn auch in abgeschwächter Form) bestätigt werden (Abb. 8 und 9). Betrachtet werden zunächst die Ergebnisse der qPCR innerhalb der mismatched-Transplantate (Abb. 8): Die Expression von CD45 in der Leber war signifikant geringer ($p < 0,05$) beim Vergleich der Gesamtheit der transplantierten Zellen (bulk) und der Depletion von CD276 (s. Abb 8). In der Lunge ließ sich ein Trend der Reduktion nach Einfach- und Doppeldepletion erkennen ($p > 0,05$). Im Colon wiederum war sowohl das Ergebnis nach Einfach- als auch Doppeldepletion im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen signifikant ($p < 0,05$). In der Haut war die Infiltration insgesamt geringer. Jedoch ließ sich auch hier kein Unterschied zwischen Einfach- und Doppeldepletion feststellen.

Die Infiltrationsrate innerhalb des matched-Settings mit dem Leukozytenmarker CD45 zeigte deutlich andere Ergebnisse als im mismatched-Setting (Abb 9). Die Leber zeigte zwar eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) sowohl nach Einfach- als auch nach Doppeldepletion, jedoch lässt sich dies nicht auf Lunge, Colon und Haut übertragen. Hier zeigte sich zwischen den Therapien kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. In der Lunge ließ sich sogar ein gegenteiliger Trend nach Doppeldepletion erkennen. Die Infiltration erschien intensiver, allerdings ohne signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$). Auch im Colon ließ sich dies beobachten. Insgesamt war die Organinfiltration im DR4-matched-Setting geringer verglichen mit dem DR4-mismatched-Setting.

Ergebnisse

Es lässt sich schlussfolgern, dass im DR4-mismatched-Setting, in dem nicht multiple disparate Minor-Antigene, sondern ein Major-Mismatch erkannt wird, durch die CD45RA/CD276-Depletion die T-Zellinfiltration effizient gesenkt werden konnte. Im DR4-matched-Setting, das starke T-Zell-Antworten durch Erkennen massenhaft disparater Minor-Antigene aufweist, konnte die T-Zellinfiltration nicht effizient reduziert werden.

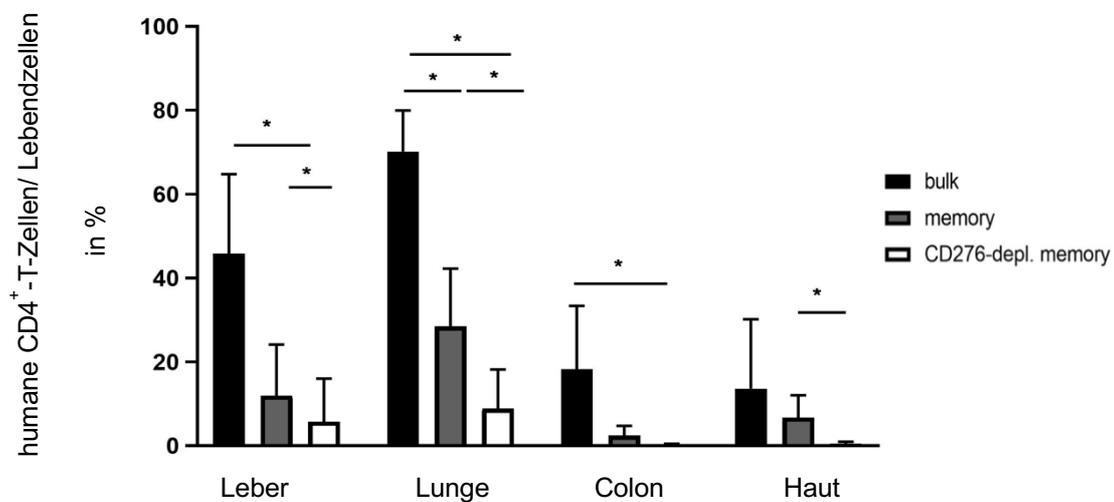


Abbildung 5: Darstellung der Infiltration von GvHD-Zielorganen durch humane CD4⁺-T-Zellen in DR4-mismatched-Transplantaten.

Infiltration von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse mit CD4⁺-T-Lymphozyten im FACS. Resezierte Gewebeprobe wurden in Einzelzellsuspensionen umgewandelt und für das FACS gefärbt. Die Häufigkeit von humanen CD4⁺-T-Zellen wurde als CD4⁺-T-Zellen/Lebendzellen in % errechnet. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen = bulk), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276 depl. CD4⁺-T-Zellen)). Gezeigt ist die Standardabweichung. Abbildung modifiziert nach [1].

Ergebnisse

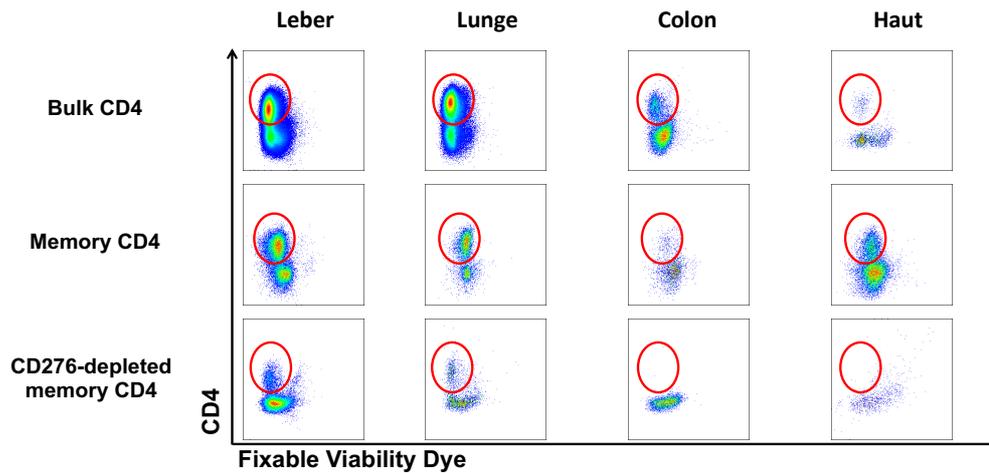


Abbildung 6: Infiltration von GvHD-Zielorganen durch humane $CD4^+$ -T-Zellen: Repräsentative Durchflusszytometrie-Plots zeigen $CD4^+$ -T-Zellinfiltrate innerhalb des DR4-mismatched-Settings.

Die roten Kreise markieren den Bereich der $CD4^+$ -T-Lymphozyten. Reseziertes Mausgewebe wurde in Einzelzellsuspensionen disaggregiert und für die Durchflusszytometrie-Analyse gefärbt. Gated sind $CD4^+$ -T-Lymphozyten. Abbildung modifiziert nach [1].

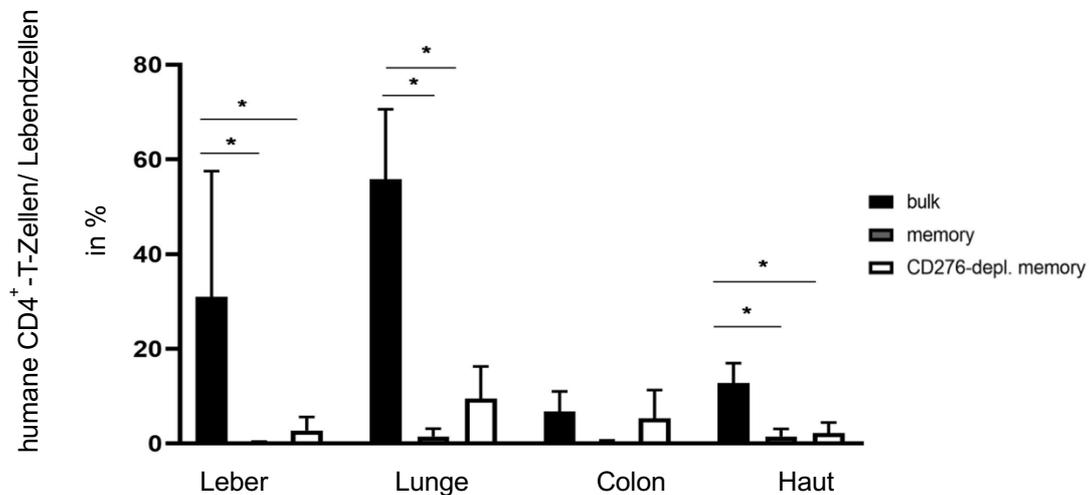


Abbildung 7: Infiltration von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse mit $CD4^+$ -T-Lymphozyten im FACS.

Resezierte Gewebeproben wurden in Einzelzellsuspensionen umgewandelt und für das FACS gefärbt. Die Häufigkeit von humanen $CD4^+$ -T-Zellen wurde als $CD4^+$ -T-Zellen/Lebendzellen errechnet. (n=5 (Gesamtheit $CD4^+$ -T-Zellen = bulk), n=4 (Memory- $CD4^+$ -T-Zellen, CD45RA/CD276 depl. $CD4^+$ -T-Zellen)). Gezeigt ist die Standardabweichung. Abbildung modifiziert nach [1].

Ergebnisse

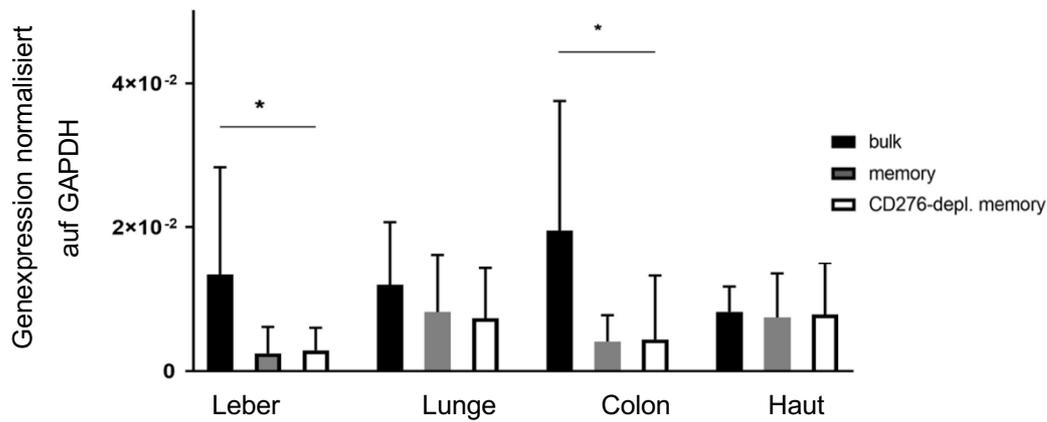


Abbildung 8: Infiltration ausgewählter Mausorgane mit CD45-tragenden humanen Zellen innerhalb des DR4-mismatched-Settings nach real time PCR.

Die Expression von humanem CD45 wurde für Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse mittels qPCR bestimmt. Sie korreliert direkt mit dem Grad der Infiltration humaner hämatopoetischer Zellen. Die Abbildung zeigt die Expression von CD45 normalisiert auf humane GAPDH. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen = bulk), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276 depl. CD4⁺-T-Zellen))

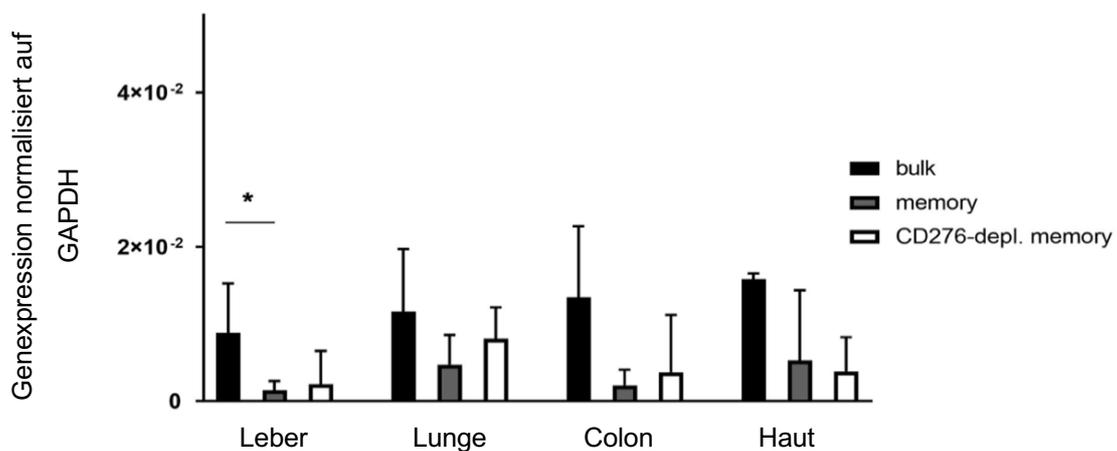


Abbildung 9: Infiltration der Mausorgane mit CD45 tragenden humanen Zellen innerhalb des matched-Settings nach real time PCR.

Die Expression von hCD45 in Leber, Lunge, Colon und Haut von transplantierten DR4-Mäusen wurde mittels qPCR bestimmt. Die Expression von CD45 ist normalisiert auf GAPDH. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen = bulk), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276 depl. CD4⁺-T-Zellen))

3.2 Einfluss der CD45RA/CD276-Depletion auf die perivaskuläre Lymphozyten-Infiltration in NSG-DR4-Individuen nach Erhalt von HLA-DR4-matched-Transplantaten

Mittels Durchflusszytometrie und qPCR (Abb. 7 und 9) konnte im DR4-matched-Setting kein signifikanter Unterschied der Doppeldepletion mit CD276 in Bezug auf die CD45RA-Depletion gezeigt werden. Es erfolgte nun der immunhistochemische Nachweis perivaskulärer Lymphozyteninfiltration in den unterschiedlichen Mausgeweben innerhalb des DR4-matched-Settings (Abb. 10-12). Interessanterweise bestätigten sich die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und qPCR (Abb 7 und 9) zunächst nicht. Es ließen sich bei einigen NSG-DR4-Organen nach Erhalt von DR4-matched-Transplantaten keine perivaskulären Infiltrate nach Einsatz des CD276-depletierenden Antikörpers nachweisen im Vergleich zu deutlichen Lymphozytenansammlungen nach Gesamt-CD4⁺-Lymphozyten-Transplantation (Abb. 10 und 11). In einigen Individuen zeigten sich jedoch deutliche Infiltrate nach Depletion von CD45RA/CD276 (Abb. 12): Vergleichend dargestellt sind Organe von Mäusen, die CD45RA-depletierte Transplantate erhielten und Organe von Tieren, die CD45RA/CD276-depletierte Transplantate erhielten. Es zeigte sich kein Unterschied im perivaskulären lymphozytären Infiltrationsgrad.

Ergebnisse

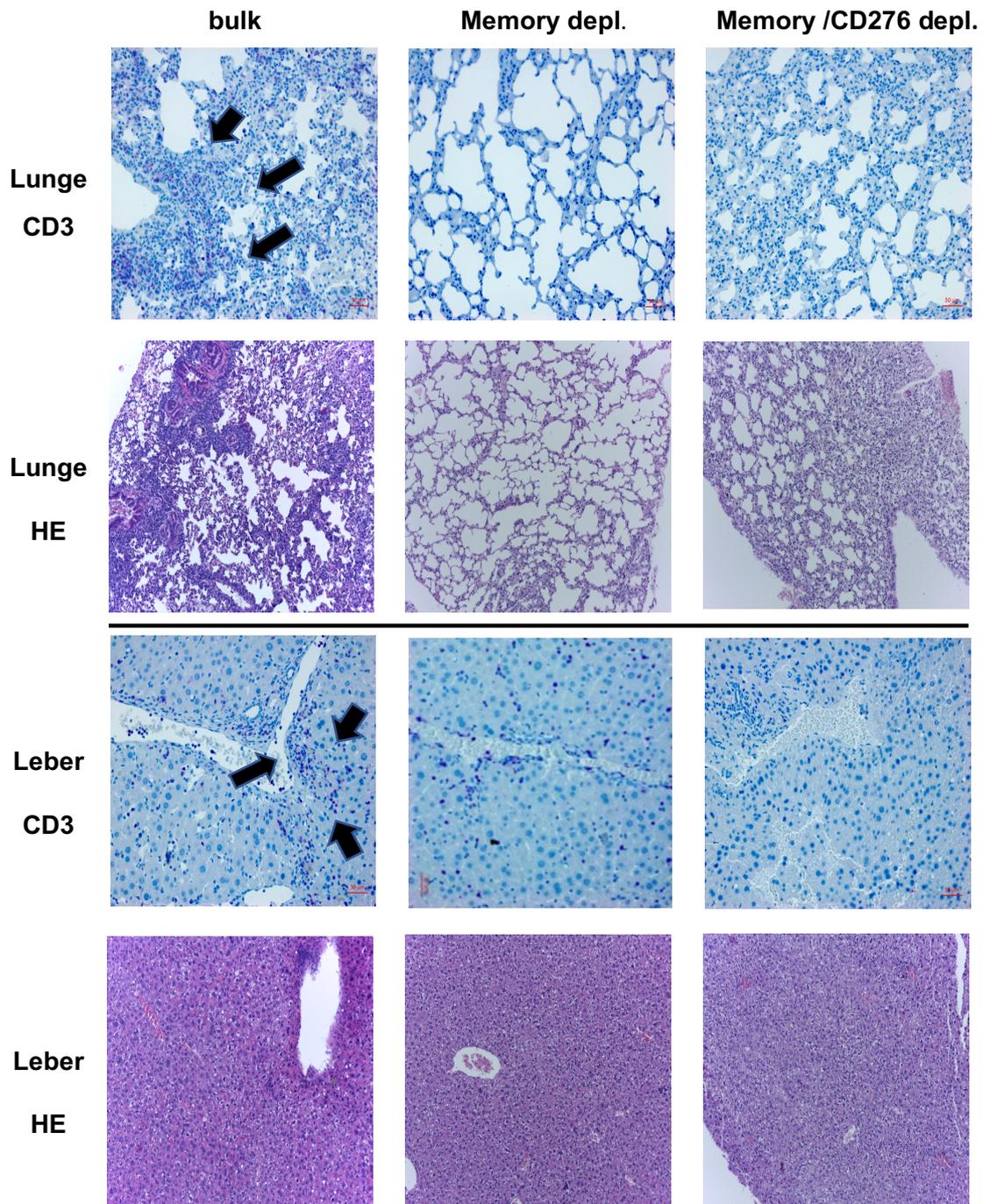


Abbildung 10: (Immun-)histologischer Nachweis perivaskulärer Lymphozyteninfiltration im DR4-matched-Setting.

Gewebe von NSG-Ab^o DR4-Mäusen wurde in 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet für die anschließende Herstellung von Schnitten und die Färbung mit Hämatoxylin/Eosin (HE) und den immunhistochemischen Nachweis von humanem CD3. Die Pfeile verdeutlichen die Lokalisation von humanen lymphozytären Infiltraten. Vergrößerung aller Aufnahmen 100fach. Abbildung modifiziert nach [1].

Ergebnisse

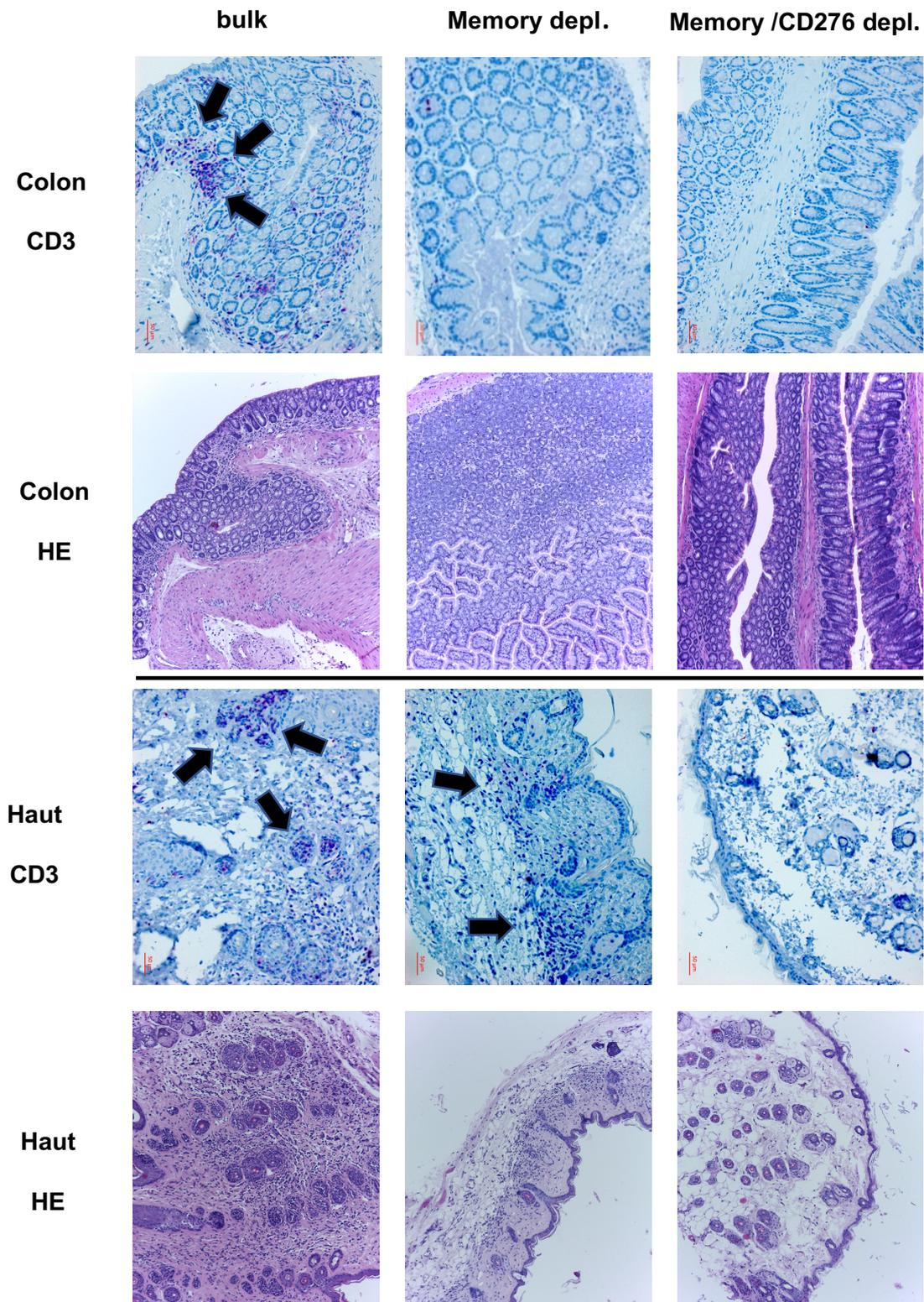


Abbildung 11: (Immun-)histologischer Nachweis perivaskulärer Lymphozyteninfiltration im matched-Setting.

Gewebe von NSG-Ab^o DR4-Mäusen wurde in 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet für die anschließende Herstellung von Schnitten und die Färbung mit Hämatoxylin/Eosin (HE) und den immunhistochemischen Nachweis von CD3. Die Pfeile verdeutlichen die Lokalisation von humanen Infiltraten. Vergrößerung aller Aufnahmen 100fach. Abbildung modifiziert nach [1]

Ergebnisse

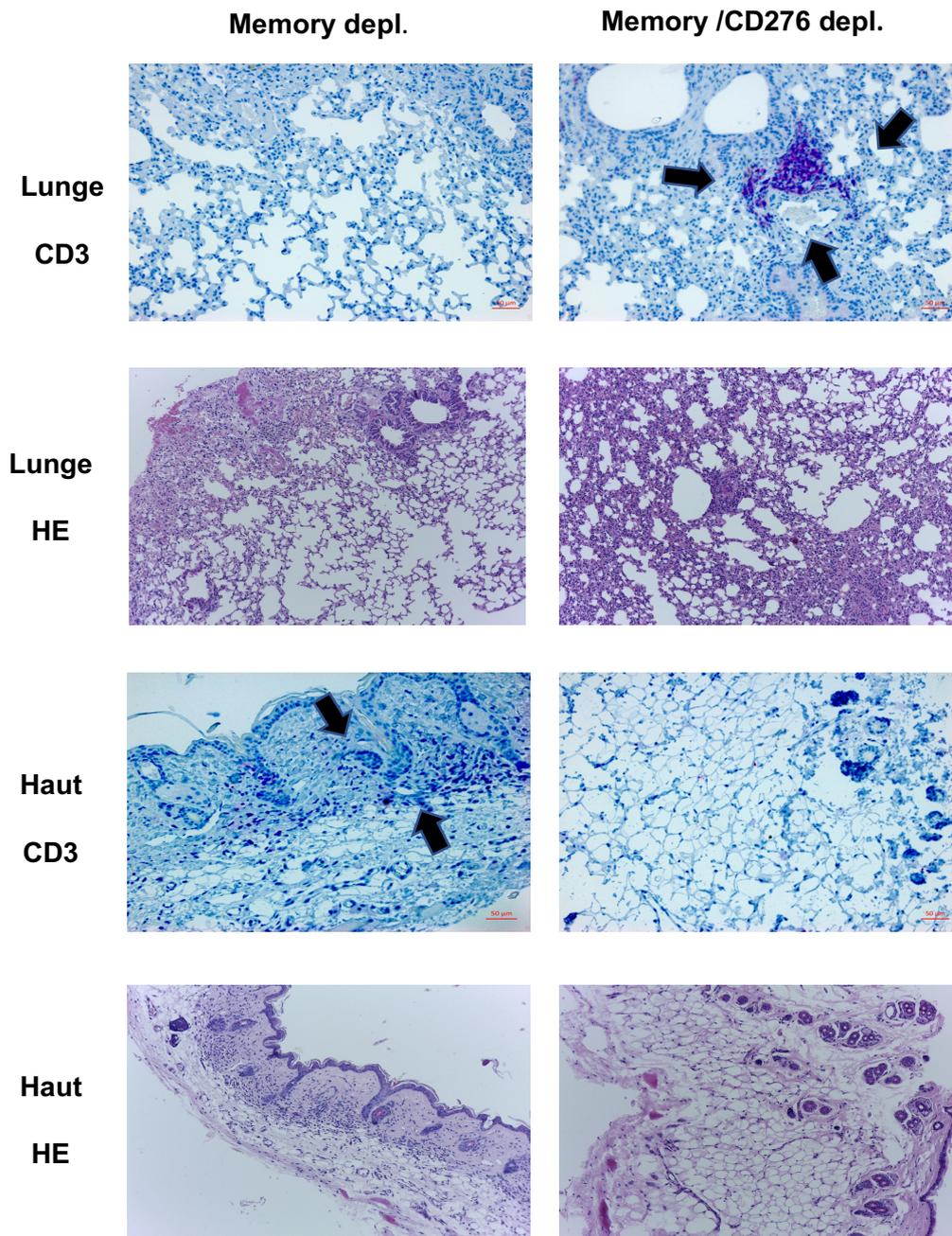


Abbildung 12: (Immun-)histologischer Nachweis perivaskulärer Lymphozyteninfiltration im matched-Setting.

Gewebe von NSG-Ab^o DR4-Mäusen wurde in 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet für die anschließende Herstellung von Schnitten und Färbung mit Hämatoxylin/Eosin (HE) und den immunhistochemischen Nachweis von CD3. Pfeile verdeutlichen die Lokalisation von humanen Infiltraten. Vergrößerung aller Aufnahmen 100fach.

3.3 Identifikation monoklonaler alloreaktiver T-Zellklone durch

Direktsequenzierung von Singlepeaks in der Spectratype-Analyse

Zur Charakterisierung der α -Ketten der TCRs wurde die CDR3-Region des TCR sequenziert. Diese ist bei autoimmunen Prozessen hauptverantwortlich für die hochspezifische Bindung des kognaten Antigens [137]. Nach Spectratype, Detektion der Transkripte nach Längenpolymorphismus und Identifikation von Singlepeaks in bestimmten $V\alpha$ -Subfamilien wurde nach Sangersequenzierung derselben eine Basensequenz identifiziert, die, wie unter 2.2.6.7 beschrieben, in eine Aminosäuresequenz übersetzt wurde.

Die CDR3-Region jedes TCR wird definiert nach Candeias et al. (1991) [138] und ist einzigartig (unique). Sie erstreckt sich vom Cysteinrest am 3'-Ende der V-Region (CA bzw. CAV) über die hochindividuellen N-Nukleotide bis zum Anfang der J-Region. Das Ende der V-Region und der kennzeichnende Beginn der J-Region wurden mit Hilfe der IMGT-Datenbank durch Abgleich mit den identifizierten TRAV- und TRAJ-Regionen identifiziert.

Nachfolgend sind die Sequenzierungsergebnisse der Gewebeproben von 7 untersuchten Mäusen gezeigt. Nicht jeder Singlepeak lieferte auch tatsächlich monoklonale Sequenzierungsergebnisse. Auch nach Depletion von CD45RA/CD276⁺-Zellen ließ sich noch eine Reihe alloreaktiver T-Zellklone nachweisen.

Die folgenden zwei Abbildungen zeigen jeweils ein Beispiel für ein monoklonales und ein poliklonales Chromatogramm. Zu sehen ist ein beispielhafter Sequenzierdatensatz, dem eine monoklonale Sequenz mit sehr wenig Grundrauschen zugrunde liegt (Abb. 13). Bei dem zweiten Beispiel hingegen ist die Abgrenzung nicht mehr möglich – es konnte keine eindeutige Basensequenz bestimmt werden (Abb. 14), da mehrere Sequenzen im Produkt amplifiziert waren.

Ergebnisse

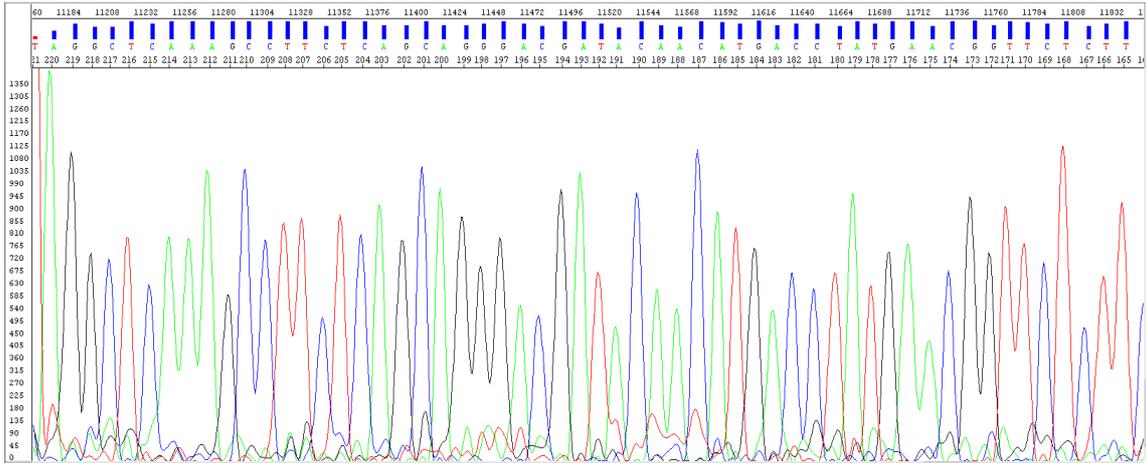


Abbildung 13: Beispiel eines monoklonalen Chromatogramms der α -Kette eines alloreaktiven T-Zellrezeptors.

Den nachfolgenden Ergebnissen liegt jeweils ein in der Aussagekraft vergleichbares Chromatogramm zu Grunde.

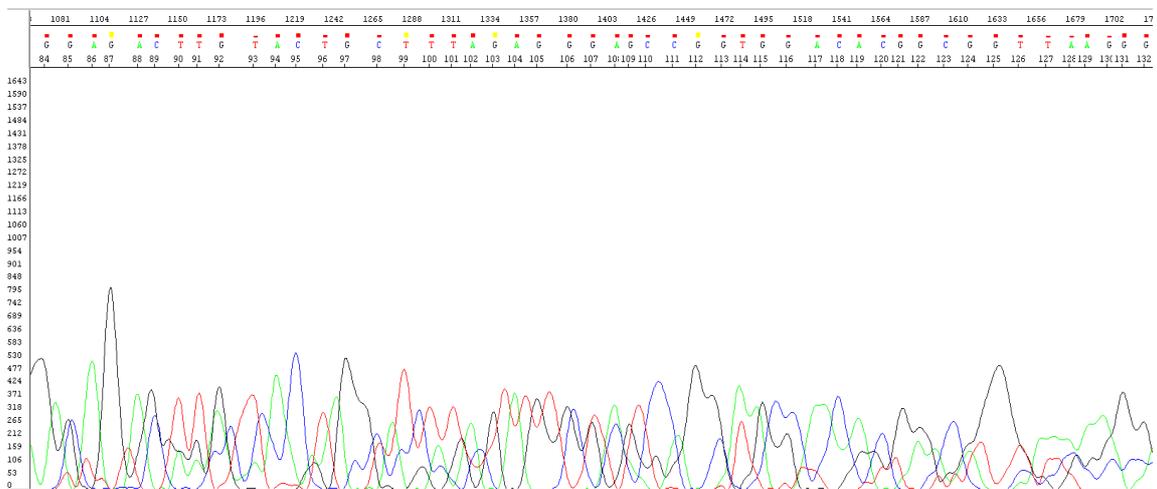


Abbildung 14: Beispiel eines polyklonalen Chromatogramms der α -Kette eines alloreaktiven T-Zellrezeptors.

Die Basensequenz setzte sich hier aus vielen überlagerten Sequenzen zusammen.

Ergebnisdarstellung und Struktur

Insgesamt wurden Leber, Lunge, Colon und Haut von sieben Rezipienten sequenziert:

Aus dem HLA-matched-Setting eine Maus (CD45RA depl. (n=1) sowie eine Maus, die ein CD45RA/CD276-depletierendes (n=1) Transplantat erhalten hatte - die Transplantat-Spender waren DR4⁺.

Die anderen 5 Mäuse waren Rezipienten HLA-DR4-mismatched Spendertransplantate, davon 3 Tiere, die die Gesamtheit aller CD4⁺-T-Lymphozyten erhalten hatte (n=3), ein Tier, das CD45RA-depletiert wurde (n=1) sowie ein Tier, das CD45RA/CD276-depletiert wurde (n=1).

Die Ergebnisdarstellung in Tabelle 15-22 wurde so gewählt, dass die aus den Sequenzierungsdaten abgeleiteten Aminosäuresequenzen der entsprechenden CDR3-Regionen für jede Maus in einer Tabelle gezeigt werden. Zunächst sind die Daten für das HLA-DR4-mismatched-Setting gezeigt, anschließend die für das matched-Setting. Gezeigt werden die Daten für die Gesamtheit der CD4⁺-T-Zellen (Kontrolle), dann die einfach-depletierten und schließlich die doppelt-depletierten Mäuse. Gegebenenfalls identifizierte Public-TCRs sind in der rechten Spalte aufgeführt, ebenso ihre Reaktivität gegenüber Virus-Epitopen.

Ergebnisse

Tabelle 15: Maus 1 (Gesamtheit aller CD4⁺-T-Zellen) – HLA-DR4⁻-Transplantat

CDR3-Region der TCRs, über die der TCR sein Epitop bindet. Gezeigt sind die Daten für die α -Kette des TCR. Links sind die zugehörigen Organe aufgeführt, dann TRAV und TRAJ Region. Ganz rechts ist gezeigt, ob es sich bei den TCRs um Public -TCRs handelte und wenn ja, gegen welches Virus-Epitop sich die T-Zelle richtete. Tabellen 15-21 modifiziert nach [1]. Mit gleicher Farbe sind in dieser Tabelle identische TRAV-, TRAJ-Regionen bzw. Aminosäuresequenzen markiert.

Organ	TRAV	TRAJ	CDR3			Typ	Reaktivität
			V α	N	J α		
Leber	14	56	CA	MRAP	GANSKLTFGKG		
Leber	26	39	CAL	VGAIIRILTLAWTSKKT	FGKG		
Lunge	22	49	CA	GPGYSG	YFGYG		
Lunge	26	39	CIV	RVG	NNAGNMLTFGGG	public	Influenza A
Lunge	23	9	CAAS	TRLRRDQIVALHQQ	FGAG		
Colon	22	49	CAV	AA	NTGNQ FYFGTG	public	CMV
Haut	26	52	CA	RKSHR	FGKG		
Haut	22	49	CAV	AGYSGYGIS	FGTG		
Haut	14	56	CA	SESAP	GANSKLTFGKG		
Haut	3	32	CAV	RGVNGE	KLIFGGG		

Tabelle 16: Maus 2 (Gesamtheit aller CD4⁺-T-Zellen) – HLA-DR4⁻ -Transplantat

CDR3-Region der TCRs, über die der TCR sein Epitop bindet. Gezeigt sind die CDR3-Regionen gewonnen aus Direktsequenzierungen von V α -Spectratypes für diverse Organe von Maus 2. Mit gleicher Farbe sind in dieser Tabelle identische TRAV-, TRAJ-Regionen bzw. Aminosäuresequenzen markiert.

Organ	TRAV	TRAJ	CDR3			Typ	Reaktivität
			V α	N	J α		
Leber	8-4	5	CAV	RDWTWSMV	GLG		
Leber	3	5	CAV	RDGN	TGRRALTFGSG	public	CMV
Leber	41	49	CAV	GDVSES	GNQ FYFGTG		
Leber	27	19		nicht auswertbar			
Lunge	27	31	CA	DAESRSK	GIG		
Lunge	1-2	57		nicht auswertbar			
Lunge	41	49	CA	GAGSKTHER	GYG		
Lunge	3	5	CAV	RDGN	TGRRALTFGSG		
Lunge	8-4	32	CAV	SDWTWGMV	GLG		
Colon	8-4	18		nicht auswertbar			
Colon	35	1	CA	SLLAH	GLG		
Colon	1-2	51	CA	SVLCPVR	EKLIFGTG		

Ergebnisse

Tabelle 17: Maus 3 (Gesamtheit aller CD4⁺-T-Zellen) – HLA-DR4⁻ -Transplantat

CDR3-Region der TCRs, über die der TCR sein Epitop bindet. Gezeigt sind die CDR3-Regionen gewonnen aus Direktsequenzierungen von V α -Spectratypes für diverse Organe von Maus 3. Mit gleicher Farbe sind in dieser Tabelle identische TRAV-, TRAJ-Regionen bzw. Aminosäuresequenzen markiert.

Organ	TRAV	TRAJ	CDR3			Typ	Reaktivität
			V α	N	J α		
Leber	26	31	CI	GRCDNA	ARLMFGDG	public	Influenza A
Leber	2	30	CAV	DRDDNPSFLWKRDT	FGYG		
Leber	39	13	CAV	TN	GGYQKVTFGIG	public	CMV
Leber	26	47	CI	LRDN	FGFG		
Leber	25	36	CA	germline	QTGANNLFFGTG	public	CMV
Lunge	22	40	CAL	S	TSGTYKYIFGTG		
Lunge	26	31	CI	GIDRFT	FGVG		
Lunge	25	36	CAG	TGAHT	LFFGTG		
Lunge	26	56	CIV	germline	TFGIG		
Lunge	3	5	CAV	RDSYTD	RALTFGSG		
Lunge	39	14	CIS	RTPRQGQ	FGSG		
Colon	26	3	CAS	germline	KIIFGSG		
Haut	25	9	PAS	FSLQKKRGG	FGAG		
Haut	38	52	CA	LSG	FGAG		
Haut	2	36	CA	EGGKTT	FGKG		
Haut	26	2	CIA	E	FGIG		
Haut	3	15	CAV	RLT	NQAGTALIFGKG	public	CMV

Charakterisierung der identifizierten CDR3-Regionen

Auffällig an diesen Ergebnissen war das häufige Vorkommen bestimmter TRAV- und TRAJ-Regionen wie TRAV 22 und 26 (Tab. 15). Außerdem fielen kurze CDR3-Regionen auf (u.a. in Colon) und eine von Aminosäuren mit hydrophober Ladung dominierte CDR3-Region. Jede CDR3-Region begann mit einem charakteristischen Motiv wie z.B. CA, CAV oder CAL und endete mit einer palindromischen Sequenz wie z.B. GKG, GLG, GAG, GYG usw. - auch hier waren die sich häufig wiederholenden TRAV- und TRAJ-Segmente auffällig. In drei Fällen konnte aufgrund polyklonaler Sequenzierungsergebnisse keine CDR3-Region identifiziert werden (Tab. 16).

3.4 Identifizierung Keimbahn-kodierter TCRs nach Transplantation von pan-CD4⁺-T-Zell-Transplantaten

Bei folgenden TCRs konnten keine N-Nukleotide zwischen V- und J-Region in der CDR3-Region identifiziert werden: TRAV 25/ TRAJ 36 in der Leber, TRAV 26/ TRAJ 56 in der Lunge und TRAV 26/ TRAJ 3 im Colon (Tab. 17). Diese Keimbahn-kodierten CDR3-Regionen (germline encoded) gelten als besonders reaktiv, da weniger Aminosäuren an der CDR3-Liganden Bindung beteiligt sind, wird die Bindung ausschließlich über CDR1 und CDR2 bewerkstelligt und ist daher einflußreicher und begünstigt eine hohe Promiskuität [139].

Identifizierung identischer CDR3-Regionen in unterschiedlichen Geweben nach Transplantation von Gesamt CD4⁺-T-Zelltransplantaten

Es konnten identische V- und J-Regionen in unterschiedlichen Organen identifiziert werden: TRAV 14/ TRAJ 56 in Leber und Haut, außerdem TRAV 26/ TRAJ 39 in Leber und Lunge (Tab. 14). In Lunge und Haut fanden sich zwei Sequenzen, die beide das V- und J-Segment TRAV 22/ TRAJ 49 rekombiniert hatten (Tab. 15). Die Sequenzen entstammten jedoch nicht einem gemeinsamen Vorläufer, da eine der Sequenzen zusätzliche N Nukleotide 5' aufwies und die andere Sequenz 3' eine andere Palindromsequenz zeigte. Wenn idente CDR3-Regionen aus unterschiedlichen Kombinationen hervorgehen spricht man von einer konvergenten CDR3-Formation. Beide TCRs erkennen das gleiche Epitop, dies spricht auch für die Immunogenität des erkannten Epitops. Interessanterweise konnten wir bei Maus 3 zwei TCRs identifizieren, die die gleichen V- und J-Segmente rearrangiert hatten, jedoch ihre Sequenzen nicht homolog oder identisch waren (Tab. 17). Dieser Befund ist insofern interessant, dass die Rekombination kein zufälliges Ereignis ist, sondern dass Faktoren des Mikromilieu für die Rekombinationswahrscheinlichkeit der V-Regionen entscheidend sind [47]. Auch die Kombination TRAV 41/ TRAJ 49 sowie TRAV 8-4 bzw. TRAV 27 oder TRAV1-2 wurden in diesem Transplantationssetting häufig identifiziert (Tab. 17). Möglicherweise zeigen diese V-Segmente Bindungspräferenzen für dieses MHC. Es konnten insgesamt sieben sog. Public-T-Zellrezeptoren identifiziert werden, auf deren Charakteristika in einem eigenen Kapitel eingegangen werden soll.

Ergebnisse

Tabelle 18: Maus 4 Rezipient eines CD45RA-depletierten – HLA-DR4⁻ -Transplantats

CDR3-Region der TCRs, über die der TCR sein Epitop bindet. Gezeigt sind die CDR3-Regionen gewonnen aus Direktsequenzierungen von V α -Spectratypes für diverse Organe von Maus 4. Mit gleicher Farbe sind in dieser Tabelle identische TRAV-, TRAJ-Regionen bzw. Aminosäuresequenzen markiert.

Organ	TRAV	TRAJ	CDR3			Typ	Reaktivität
			V α	N	J α		
Leber	2	37	CAV	EAG	NTGKLIFGQG		
Leber	10	6	CAV	IELGI	SGGSYIPTFGRG		
Lunge	23	44	CA	PGTNSAGGG	LTFGTG		
Lunge	26	53	CI	LRDPDR	GGSNYKLTFGKG		
Lunge	2	37	CAV	EAG	NTGKLIFGQG		
Lunge	29	52	CA	AGSG	AGGTSYGKLTFGQG	public	Insulin
Lunge	19	36		nicht auswertbar			
Colon	8-3	18	CA	GTR	FGQG		
Colon	29	52	CA	ST	AGGTSYGKLTFGQG		
Colon	13-1	20	CA	ASVG	SNDYKLSFGAG	public	CMV
Haut	29	18	CAV	QFKI	FGQG		
Haut	2	37	CAV	EAG	NTGKLIFGQG		
Haut	19	18		nicht auswertbar			
Haut	13	36		nicht auswertbar			

Tabelle 19: Maus 5 CD45RA-/CD276-depletiert – HLA-DR4⁻ -Transplantat

CDR3-Region der TCRs, über die der TCR sein Epitop bindet. Gezeigt sind die CDR3-Regionen gewonnen aus Direktsequenzierungen von V α -Spectratypes für diverse Organe von Maus 5. Mit gleicher Farbe sind in dieser Tabelle identische TRAV-, TRAJ-Regionen bzw. Aminosäuresequenzen markiert.

Organ	TRAV	TRAJ	CDR3			Typ	Reaktivität
			V α	N	J α		
Leber	10	33		nicht auswertbar			
Leber	12	25	CAV	RGEYTPCDCTR	FGRG		
Leber	20	37	CAV	WRGTTQA	KLIFGQG		
Leber	1	32	CAV	SGRR	GATNKLIFGTG	public	CMV
Lunge	25	54	CAS	L	IQGAQKLVFGQG		
Lunge	26-1	23	CI	VRS	NQGGKLIFGQG		
Lunge	9-2	6	CI	DLNDT	GGSYIPTFGRG		
Lunge	8-4	44		nicht auswertbar			
Colon	25	53	CA	GARNTD	TFGKG		
Colon	26-1	42	CI	VCPLEATVISP	FGKG		
Colon	9-2	14		nicht auswertbar			
Haut	12-3	30		nicht auswertbar			
Haut	25	34	CA	GARNTVKLIF	KLIFGTG		
Haut	38	43	CAV	LIGAL	MRFGAG		
Haut	9-2	6	CA	LSET	GGSYIPTFGRG	public	CMV
Haut	8-4	33	CAV	SDRII	YQLIWGAG	public	CMV

Charakterisierung der identifizierten CDR3-Regionen

Insgesamt sieben Singlepeaks konnten in direkten Sequenzierungen nicht aufgelöst werden; diese Sequenzen sind eindeutig als polyklonal überlagerte Sequenzen gekennzeichnet (Tab. 18 und 19). Besonders kurze CDR3-Regionen (nur 2-5 Nukleotide) fanden sich in Colon und Haut mit folgenden rekombinierten Gensegmenten: TRAV 8-3, TRAJ 18, TRAV 29 und TRAV 2 (Tab. 18). Die Aminosäureladungen beider CDR3-Regionen zeigten übereinstimmend große Hydrophobizität. Auffällig waren die häufige Verwendung einzelner TRAV-Segmente wie TRAV 25, aber auch die der Regionen wie TRAV 8-4 kamen häufiger vor (Tab. 19).

Identifizierung identischer CDR3-Regionen in unterschiedlichen Geweben

In Leber, Lunge und Haut von Maus 4 (Tab. 18) konnten drei identische CDR3-Regionen identifiziert werden, bestehend aus rearrangierten TRAV 2 und TRAJ 37 Segmenten. Diese identischen CDR3-Sequenzen lauteten CAVEAGNTGKLIFGQG. Interessant waren die wenigen eingefügten N-Nukleotide. Weiterhin bemerkenswert waren die identischen TRAV- und TRAJ-Regionen 29 und 52 in Lunge und Colon (Tab. 18). Hierbei ist insbesondere der Public-TCR gegen den Insulin-Rezeptor hervorzuheben. Außerdem konnte ein Public-TCR gegen CMV identifiziert werden. Die sequenzierten Organe von Maus 5 (Tab. 19) wiesen drei TCRs als „public“ auf. Sie alle waren gegen CMV gerichtet. Besonders hervorzuheben ist die CDR3-Region aus der Lunge mit der Rekombination des TRAV 25-Segmentes mit TRAJ 54 – sie enthielt nur ein einziges N-Nukleotid. In Lunge und Haut konnten zwei TCRs mit gleichen rekombinierten Elementen identifiziert werden, deren CDR3-Regionen jedoch nicht identisch und nicht public waren (Tab. 19).

Die Tabellen 20 und 21 zeigen die sequenzierten CDR3-Regionen aus dem HLA-DR4-matched-Setting. Auch hier konnten drei Public-TCRs identifiziert werden (n=3). Auffällig waren weiterhin die Hydrophobizität und Kürze der CDR3-Region einiger alloreaktiver T-Zellen.

Ergebnisse

Tabelle 20: Maus 6 CD45RA-depletiert – HLA-DR4⁺-Transplantat

CDR3-Regionen gewonnen aus Direktsequenzierungen von V α -Spectratypes für diverse Organe von Maus 6. Grün unterlegt ist ein identischer organspezifischer T-Zellklon, der im Lungengewebe von Maus 6 und Maus 7 nachgewiesen werden konnte. Beide waren Rezipienten desselben Transplantats vom selben Spender.

Organ	TRAV	TRAJ	CDR3			Typ	Reaktivität
			V α	N	J α		
Lunge	1-2	1		nicht auswertbar			
Lunge	19	2	CAL	SGDNQGG	KLTFGLG		
Lunge	9-2	12	CI	RGLSVCVMGSKG	LIFGSG		
Lunge	2	18	CAV	GSGSAQ	GSG		
Lunge	25	53		CRVGIVGG	FGEG		
Haut	3	8	CAV	RDMG	TGFQKLVFGTG		
Haut	1-2	9		nicht auswertbar			
Haut	25	40	CA	AI	TSGTYKYIFGTG	public	Influenza A
Haut	2	20	CAL	FIAAHP	FGAG		
Haut	24	20	CAF	LCPLLWDDYK	FGAG		
Haut	4	35		nicht auswertbar			
Haut	5	29	CA	EGH	SGNTPLVFGKG		

Tabelle 21: Maus 7 CD45RA-/CD276-depletiert – HLA-DR4⁺-Transplantat

CDR3-Region der TCRs, über die der TCR sein Epitop bindet. Gezeigt sind die CDR3-Regionen gewonnen aus Direktsequenzierungen von V α -Spectratypes für diverse Organe von Maus 7. Grün unterlegt ist ein identischer organspezifischer T-Zellklon, der im Lungengewebe von Maus 6 und Maus 7 nachgewiesen werden konnte.

Organ	TRAV	TRAJ	CDR3			Typ	Reaktivität
			V α	N	J α		
Leber	8-4	20	CA	SPLRCRTRVDHE	FGAG		
Leber	5	7	CAV	CDKLII	FGEG		
Lunge	30	14	CA	FSLEY	FGGG		
Lunge	9-2	12	CI	RGLSVCVMGSKG	LIFGSG		
Colon	23	11	CA	TKRFSSAPQL	FGKG		
Haut	24	3	CA	P	YSSASKIIFGKG	public	EBV
Haut	26	42	CIV	CHTR	GSQGNLIFGKG		
Haut	26	53	CAV	VHSSISQGSTVQDQ	GTG		
Haut	8-3	6	CAV	GAR	GSYIPTFGRG	public	CMV
Haut	8-4	15	CAV	RAF	NQAGTALIFGKG		

3.5 Nachweis systemischer T-Zellklone im DR4-mismatched- und identischer organspezifischer T-Zellklone im DR4-matched-Transplantat

Es konnten innerhalb des DR4-mismatched-Transplantats vier idente CDR3-Sequenzen in unterschiedlichen Organen im gleichen Transplantatempfänger identifiziert werden. Im Gegensatz dazu und hochinteressanterweise konnten innerhalb des DR4-**matched**-Transplantats identische T-Zellklone im gleichen Organ, jedoch in unterschiedlichen Mäusen gefunden werden (Tab. 20 und 21). Deren CDR3-Region lautete: CIRGLSVCVMGSKGLIFGSG mit dem TRAV Segment 9-2 und dem TRAJ Segment 12. Dies bedeutet, dass es eine organspezifische Verteilung und Expansion von T-Zellen innerhalb des matched-Settings gibt, die alloreaktiv und unmittelbar an der Abstoßungsreaktion beteiligt sind. Hier kommt die in Abschnitt 1.10 in der Einleitung beschriebene Bedeutung der Minor-Antigene zum Tragen.

Ergebnisse

Tabelle 22: Alloreaktive T-Zell-Pools enthalten Public-TCRs in allen Kohorten

Gezeigt sind die Daten der identifizierten Public-TCRs mit der jeweiligen CDR3-Region, über die der TCR sein Epitop bindet. Auf der rechten Seite sind die Verweise auf die Quellen der Public-TCRs zu finden.

Gesamtheit aller CD4⁺-T-Lymphozyten

TRAV	TRAJ	V α	CDR3 N	J α	Typ	Reaktivität	MHC	PMID
26	31	CI	GRCDNA	ARLMFGDG	Typ IV	Influenza A	HLA-A*02	28423320
39	13	CAV	TN	GGYQKVTFGIG	Typ II	CMV	HLA-A*02	28423320
25	36	CA	germline	QTGANNLFFGTG	Typ II	CMV	HLA-A*02	284233
3	15	CAV	RLT	N QAGTALIFGKG	Typ II	CMV	HLA-A*02	28423320
26	39	CIV	RVG	NNAGNMLTFGGG	Typ III	Influenza A	HLA-A*02	28423320
22	49	CAV	AANTGYQ	FYF	Typ IV	CMV	HLA-A*02	28636592

CD45RA depl.

TRAV	TRAJ	V α	CDR3 N	J α	Typ	Reaktivität	MHC	PMID
25	40	CA	AI	TSGTYKYIFGTG	Typ IV	Influenza A	HLA-A*02	28423320
29	52	CA	AGSG	AGGTSYGKLTFGQG	Typ IV	Insulin	HLA-DRB1*04	26437244
13-1	20	CA	ASVG	SNDYKLSFGAG	Typ III	CMV	HLA-A*02	28423320

CD45RA depl./CD276 depl.

TRAV	TRAJ	V α	CDR3 N	J α	Typ	Reaktivität	MHC	PMID
24	3	CA	P	YSSASKIIFGKG	Typ II	EBV	HLA-A*02	10925283
8-3	6	CAV	GAR	GSYIPTFGRG	Typ III	CMV	HLA-A*02	28423320
1	32	CAV	SGRR	GATNKLIIFGTG	Typ II	CMV	H-2Db	28636592
9-2	6	CA	LSET	GGSYIPTFGRG	Typ II	CMV	HLA-A*02	28423320
8-4	33	CAV	SDRII	YQLIWGAG	Typ IV	CMV	HLA-A*02	28423320

Hervorzuheben ist, dass **alle** in Tab. 22 aufgeführten Public-TCRs (mit einer Ausnahme) **nur für CD8⁺-T-Zellen beschrieben wurden. Dies ist insofern interessant, da in unserem Mausmodell nur CD4⁺-T-Lymphozyten transplantiert und damit an der GvHD beteiligt waren.** In der rechten Spalte der Tabellen sind die Verweise auf die Quellen der Public-TCRs zu finden. Nicht alle identifizierten TCRs entsprachen dem höchsten Grad (Grad 4) an Gleichheit eines Public-TCRs (Tab. 22). Die Regeln zur Identifikation der Public-TCRs werden in der Diskussion erläutert.

3.6 Untersuchung von T-Zell-Master-Transkriptionsfaktoren in GvHD-Zielorganen

Mittels qPCR wurde die Expression der T-Zell-Master-Transkriptionsfaktoren Tbet, FOXP3, ROR γ T und GATA3 gezeigt. Hierdurch sollten Erkenntnisse über das Ausmaß der Beteiligung von T_H1, T_H2, Tregs und T_H17-Zellen an der Abstoßungsreaktion gewonnen werden. Des Weiteren wurden die Transkriptionsfaktoren EOMES, STAT1 und SOCS3 untersucht. So wurde berichtet, dass ein Anstieg von GATA3 im Zusammenhang mit einer verminderten Expression von RORC sowie von STAT1 mit einer verminderten T_H17-zellvermittelten Pathologie einhergeht [134], sowie dass SOCS3 die Differenzierung von T_H17-Zellen inhibiert [135] und die T-Zellproliferation alloreaktiver T-Zellen verhindert [136].

Im Folgenden sind zunächst die Expression von SOCS3 und STAT1 für das HLA-DR4 mismatched-Setting dargestellt – normalisiert auf GAPDH.

Nachdem das Mausgewebe homogenisiert und die RNA extrahiert worden ist, konnte mit reverser Transkriptase cDNA geschrieben werden. Die qPCR wurde wie in 2.2.6.6 beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich innerhalb der Leber ein leichter Trend einer angestiegenen SOCS3-Expression nach Einfach- bzw. Doppel-Depletion (Abb. 15). In der Lunge schien sich nahezu nichts zu verändern. In Colon und Haut jedoch zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$) von SOCS3 sowohl nach Einfach- als auch nach Doppel-Depletion. Die Expression von STAT1 war bezogen auf alle Mausgewebe sehr

Ergebnisse

gering (10^{-4}) und es ließ sich weder vor noch nach Therapie ($p > 0,05$) ein Unterschied feststellen (Abb 16). STAT1 scheint zumindest in diesem Modell für die Entstehung der GvHD keine relevante Rolle zu spielen.

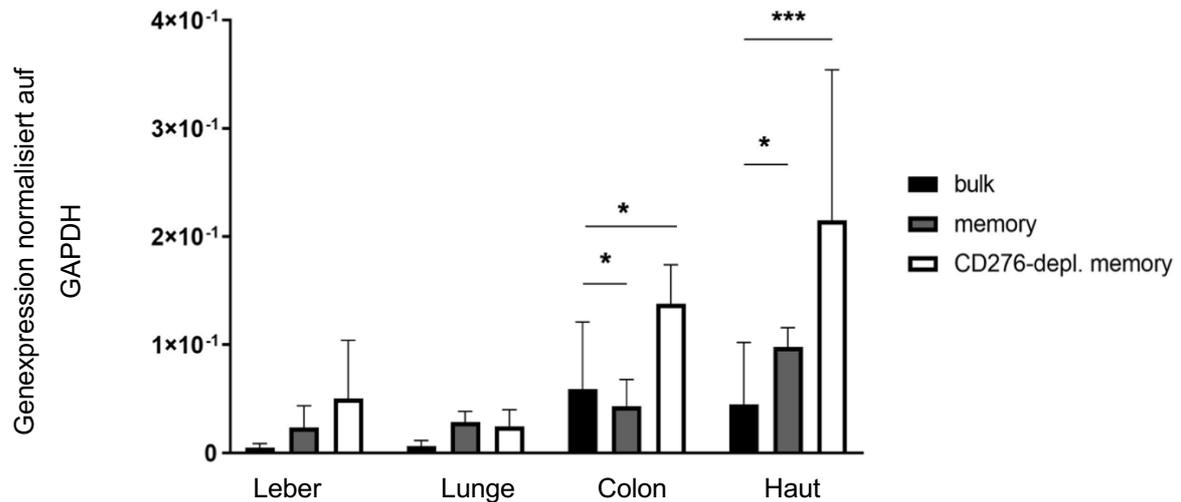


Abbildung 15: Analyse des Transkriptionsfaktors SOCS3 in GvHD-Zielorganen im HLA-DR4⁻-Transplantat.

Die Genexpression von SOCS3 innerhalb von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse wurde mittels qPCR bestimmt. Die Genexpression von SOCS3 wurde normalisiert auf GAPDH dargestellt. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276-depl. CD4⁺-T-Zellen)). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Ergebnisse

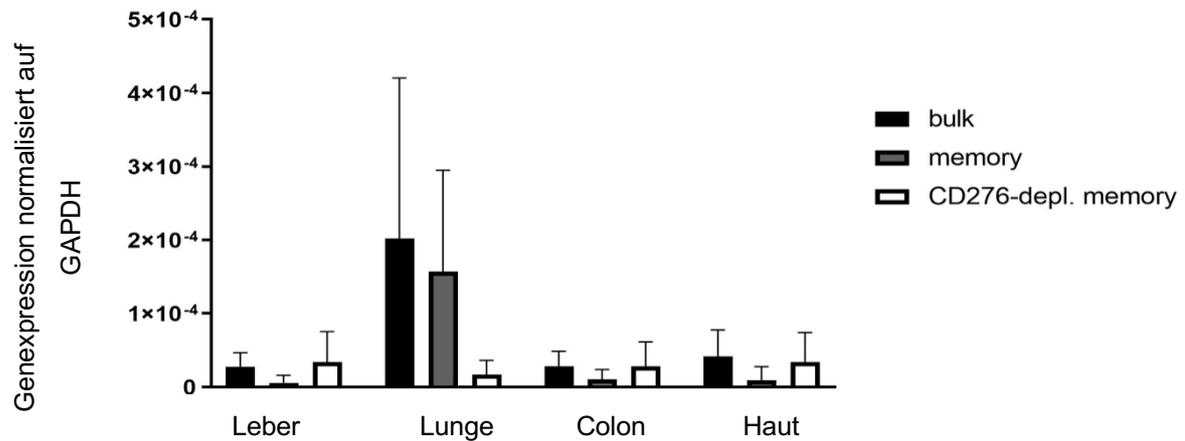


Abbildung 16: Analyse des Transkriptionsfaktors STAT1 in GvHD-Zielorganen im HLA-DR4⁻-Transplantat.

Die Genexpression von STAT1 innerhalb von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse wurde mittels qPCR bestimmt. Die Genexpression von STAT1 wurde normalisiert auf GAPDH dargestellt. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276-depl. CD4⁺-T-Zellen)). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Die folgenden Abbildungen 17 und 18 zeigen die Genexpression von SOCS3 und STAT1 innerhalb des DR4-matched-Settings normalisiert auf GAPDH.

In der Leber konnte innerhalb des DR4-matched-Settings ein signifikanter Anstieg von SOCS3 nach CD45RA/CD276-Depletion beobachtet werden (p<0,05). In der Lunge und Haut konnte kein Unterschied zwischen den Kohorten gesehen werden in Bezug auf die Expression von SOCS3. Im Colon war ein signifikanter Anstieg von SOCS3 im Vergleich zur CD45RA-Depletion feststellbar (p<0,05). Insgesamt war die Expression von SOCS3 im Vergleich zum HLA-DR4-mismatched-Setting geringer (Abb. 17). STAT 1 wurde ähnlich wie im HLA-DR4-mismatched-Setting bezogen auf alle Kohorten und zwischen den Behandlungen nicht nennenswert exprimiert (Abb. 18). Auch innerhalb des matched-Settings spielte STAT1 als Transkriptionsfaktor keine nennenswerte Rolle für die Entstehung der GvHD.

Ergebnisse

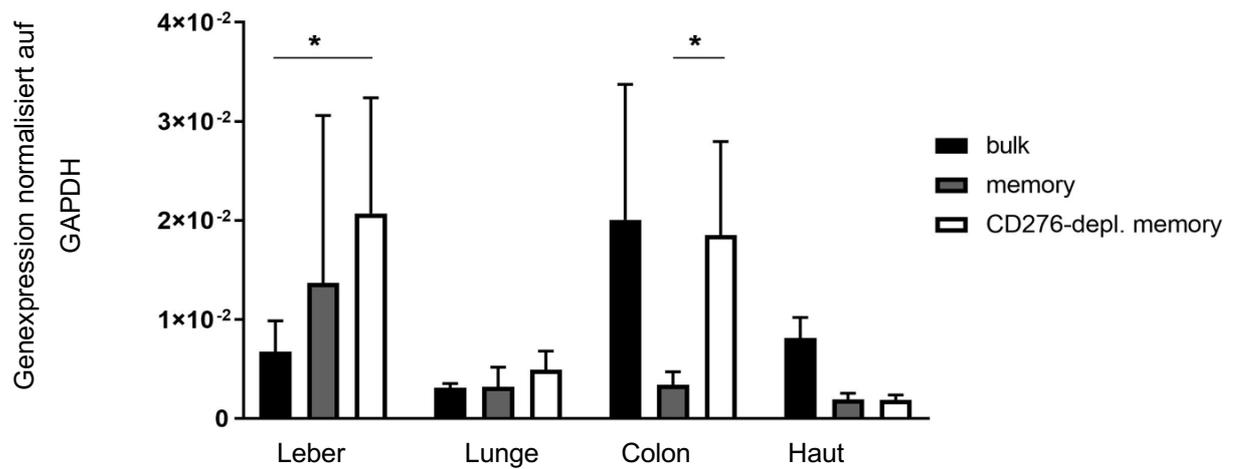


Abbildung 17: HLA-DR4⁺-Transplantat – SOCS3 Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4⁺-Transplantatempfängern.

Die Genexpression von SOCS3 innerhalb von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse wurde mittels qPCR bestimmt. Die Genexpression von SOCS3 wurde normalisiert auf GAPDH dargestellt. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276-depl. CD4⁺-T-Zellen)). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

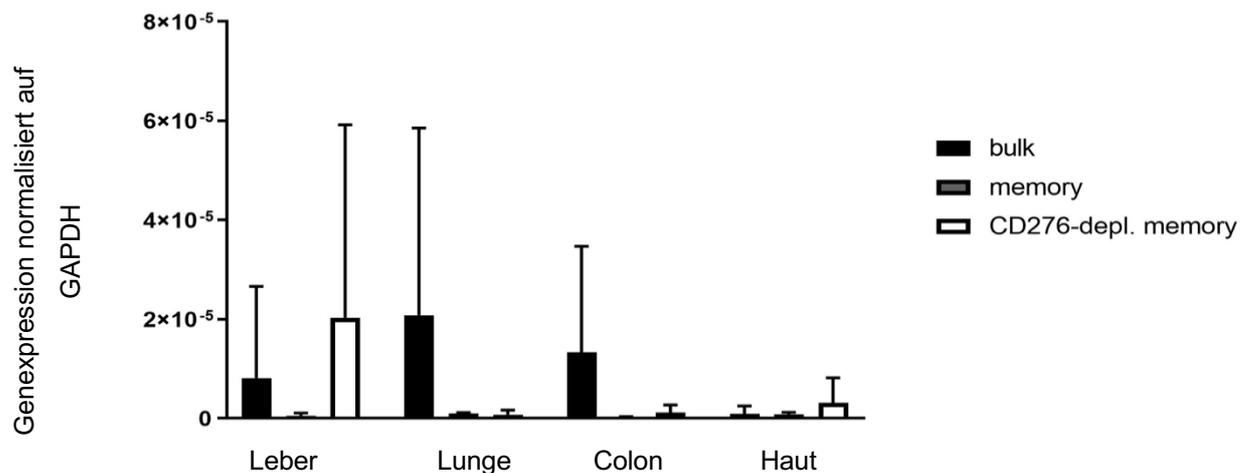


Abbildung 18: HLA-DR4⁺-Transplantat – STAT1 Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4⁺-Transplantatempfängern.

Die Genexpression von STAT1 innerhalb von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse wurde mittels qPCR bestimmt. Die Genexpression von STAT1 wurde normalisiert auf GAPDH dargestellt. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276-depl. CD4⁺-T-Zellen)). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Ergebnisse

GATA 3 zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Kohorten (Abb. 19). In der Leber ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. In der Lunge und im Darm jedoch konnte ein signifikanter Anstieg sowohl nach Einzel- ($p < 0,05$) als auch nach CD45RA/CD276-Depletion ($p < 0,001$) festgestellt werden. Auch in der Haut war ein signifikanter Anstieg zu sehen ($p < 0,05$), jedoch nicht nach CD45RA/CD276-Depletion. FOXP3 wurde in allen Kohorten sehr niedrig exprimiert und es konnte in Leber und Lunge kein Unterschied zwischen den Behandlungen festgestellt werden. Im Colon wurde eine signifikante Reduktion verzeichnet ($p < 0,05$) und in der Haut ein signifikanter Anstieg nach Doppeldepletion ($p < 0,05$). Aufgrund der verschwindend geringen Expression spielte FOXP3 in unserem Mausmodell keine bedeutende Rolle (Abb. 20).

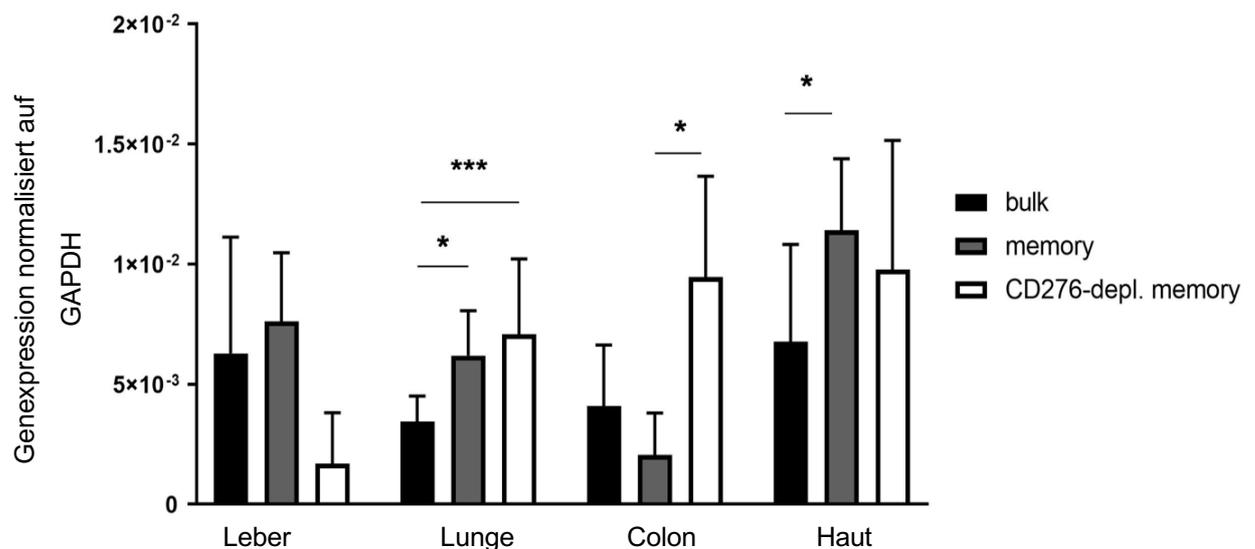


Abbildung 19: HLA-DR4⁺-Transplantat – GATA3 Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4⁺-Transplantatempfängern.

Die Genexpression von GATA3 innerhalb von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse wurde mittels qPCR bestimmt. Die Genexpression von GATA3 wurde normalisiert auf GAPDH dargestellt. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276-depl. CD4⁺-T-Zellen)). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Ergebnisse

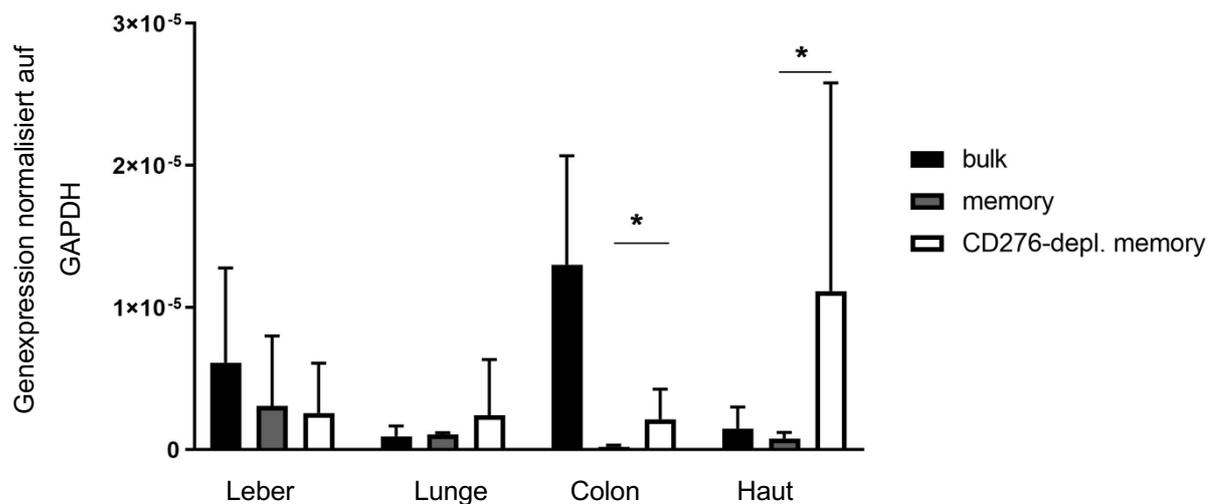


Abbildung 20: HLA-DR4⁺-Transplantat – FOXP3 Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4⁺-Transplantatempfängern.

Die Genexpression von FOXP3 innerhalb von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse wurde mittels qPCR bestimmt. Die Genexpression von FOXP3 wurde normalisiert auf GAPDH dargestellt. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276-depl. CD4⁺-T-Zellen)). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Die Expression des Transkriptionsfaktors EOMES war insgesamt sehr gering in Bezug auf GAPDH. In Colon und Haut ließen sich keine signifikanten Unterschiede der CD45RA/CD276-Depletion in Bezug auf die CD45RA-Depletion feststellen. In der Leber jedoch resultierte die Depletion von CD45RA/CD276 im Vergleich zur Einfachdepletion und den unbehandelten Mäusen in einem signifikanten Unterschied von EOMES (p<0,05) (Abb. 21). Es konnte nur eine sehr geringe Expression von RORC festgestellt und auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten beobachtet werden. Jedoch war sehr auffällig, dass nach Depletion von CD45RA/CD276 fast keine RORC-Expression mehr nachweisbar war. Dieses Ergebnis ließ sich auf die Leber, Colon und Lunge, jedoch nicht auf die Haut beziehen (Abb. 22). Um das Verhältnis des signifikanten Anstieges von GATA3 zu einem Abfall von RORC darzustellen, wurde die Ratio in Abbildung 24 gebildet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf T-bet zwischen den Kohorten festgestellt werden (Abb. 23).

Ergebnisse

Die Expression war innerhalb der Leber insgesamt etwas höher. Das Expressionsmuster von T-bet gab keinen Hinweis auf die Beteiligung von T_H1 -Zellen in unserem Mausmodell.

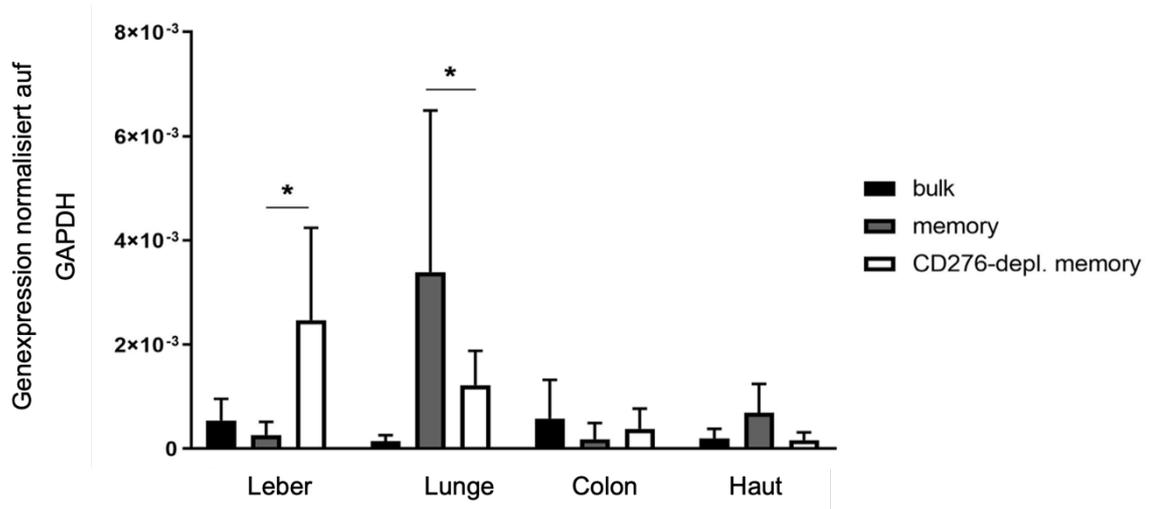


Abbildung 21: HLA-DR4⁺-Transplantat – EOMES Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4⁺-Transplantatempfängern.

Die Genexpression von EOMES innerhalb von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse wurde mittels qPCR bestimmt. Die Genexpression von EOMES wurde normalisiert auf GAPDH dargestellt. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit $CD4^+$ -T-Zellen), n=4 (Memory- $CD4^+$ -T-Zellen, CD45RA/CD276-depl. $CD4^+$ -T-Zellen)). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Ergebnisse

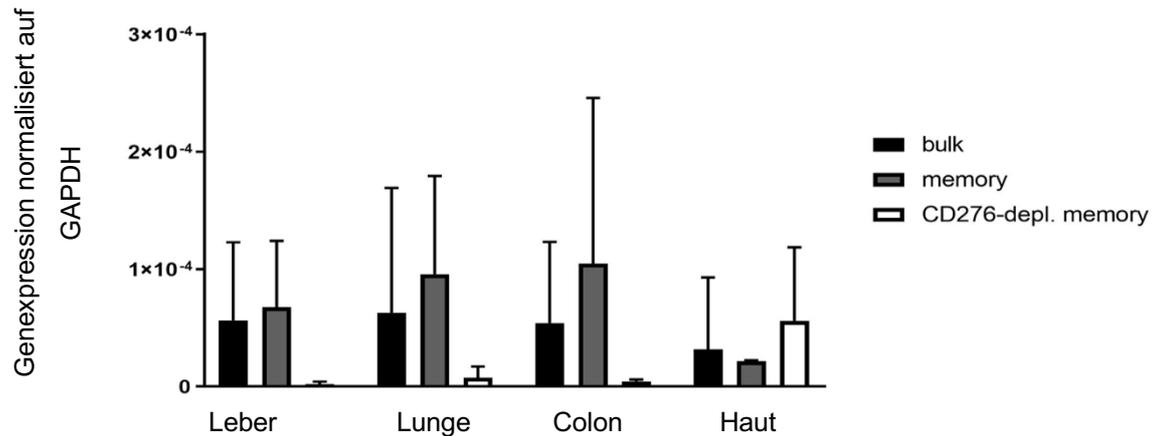


Abbildung 22: HLA-DR4⁺-Transplantat – RORC Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4⁺-Transplantatempfängern.

Die Genexpression von RORC innerhalb von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse wurde mittels qPCR bestimmt. Die Genexpression von RORC wurde normalisiert auf GAPDH dargestellt. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276-depl. CD4⁺-T-Zellen)). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

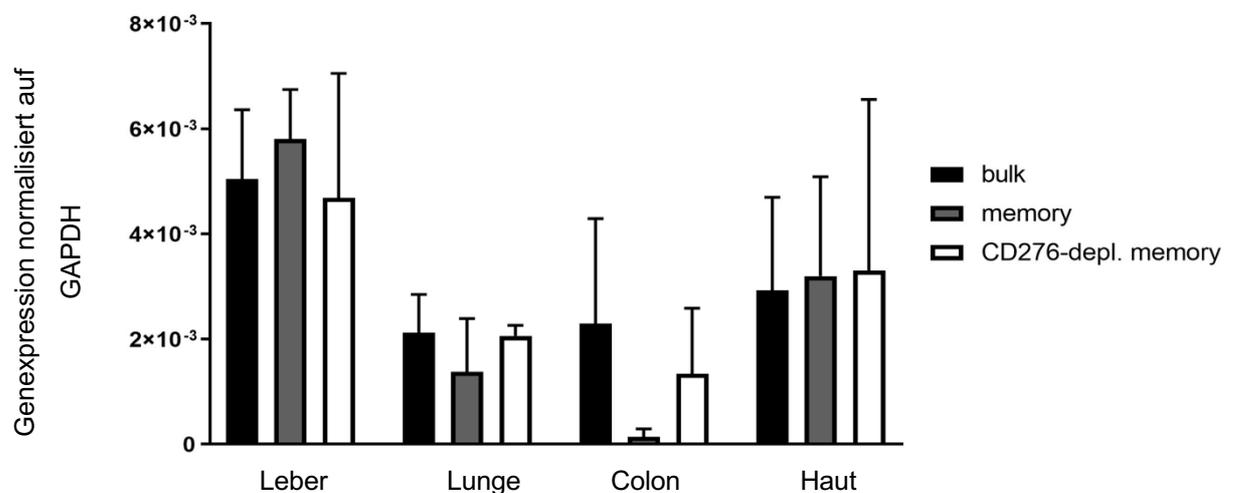


Abbildung 23: HLA-DR4⁺-Transplantat – T-bet Expression in Leber, Lunge, Colon und Haut von DR4⁺-Transplantatempfängern.

Die Genexpression von T-bet innerhalb von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse wurde mittels qPCR bestimmt. Die Genexpression von T-bet wurde normalisiert auf GAPDH dargestellt. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276-depl. CD4⁺-T-Zellen)). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Ergebnisse

CD4⁺-T_H17-Zellen initiieren die GvHD. GATA3 ist als Inhibitor von T_H17-zellvermittelter Pathologie bekannt [134]. Gezeigt ist die Ratio aus GATA3/RORC in den Organen von Tieren der unterschiedlichen Therapiegruppen. Ein hochsignifikanter Anstieg von GATA3 zusammen mit einem ausbleibenden Anstieg oder sogar Abfall von RORC in Lunge und Colon spricht dafür, dass T_H17-Zellen nach Depletion von CD45RA/CD276 keine bedeutende Rolle mehr spielen [134]. In Leber und Haut ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Jedoch erwies sich der Anstieg der Ratio von GATA3/RORC nach CD45RA/CD276-Depletion im Vergleich zur CD45RA-Depletion und der Gesamtheit der transplantierten CD4⁺-T-Lymphozyten in Lunge und Colon als hochsignifikant ($p < 0,001$). D.h. die Ratio steigt an, wenn GATA3 ansteigt oder RORC abfällt oder beides der Fall ist.

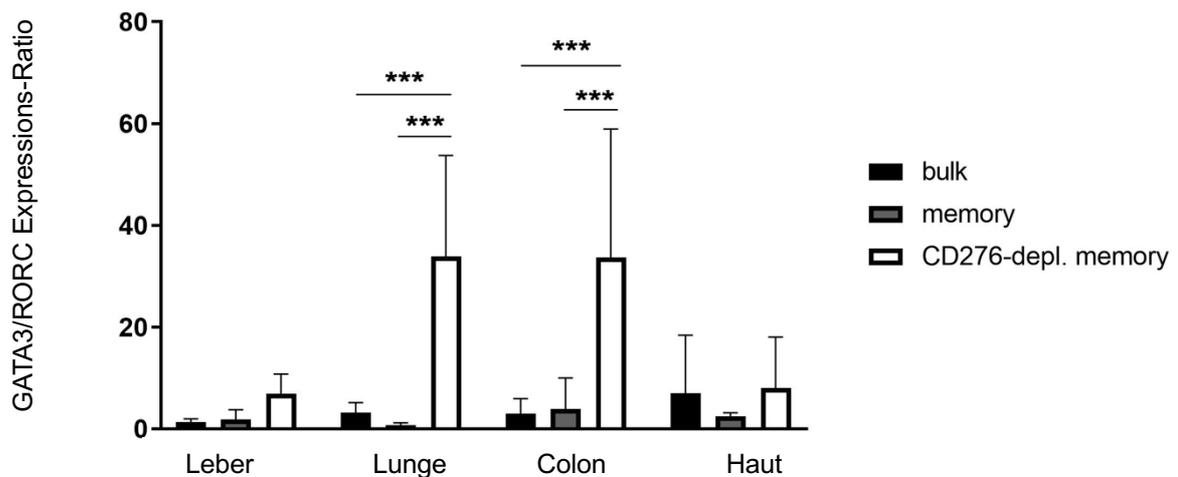


Abbildung 24: HLA-DR4⁺-Transplantat – Darstellung der Ration aus GATA3/RORC innerhalb Leber, Lunge, Colon und Haut.

Es wurde die Ratio aus GATA3/RORC berechnet. Die Genexpression von GATA3 und RORC innerhalb von Leber, Lunge, Colon und Haut der DR4-Mäuse wurde mittels qPCR bestimmt. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=5 (Gesamtheit CD4⁺-T-Zellen), n=4 (Memory-CD4⁺-T-Zellen, CD45RA/CD276-depl. CD4⁺-T-Zellen)). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.7 *In-vitro* Analyse des CD276-Antikörpers

Der Antikörper, der zur *in-vivo* Depletion von CD276 eingesetzt wurde, wurde von Hans-Georg Bühring in Tübingen generiert. Für die nachfolgenden *in-vivo* Versuche ist es sehr wichtig, die genaue Funktion des CD276-Antikörpers zu verstehen. Wie genau löst er Apoptose innerhalb der Zielzelle aus? In unserem *in-vitro* Modell mussten für eine funktionierende ADCC, im Hinblick auf eine *in-vivo* Depletion, autologe NK-Zellen und Komplementfaktoren hinzugegeben werden. Nach Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation (Abschnitt 2.2.5.1) wurde mit den isolierten kernhaltigen Zellen weitergearbeitet. Es wurden autologe NK-Zellen nach dem gleichen Prinzip wie CD4⁺-T-Lymphozyten (s. unter 2.2.5.6) isoliert.

3.7.1 Additiver Effekt von ADCC und CDC durch Einsatz des CD276-Antikörpers

Es wurde die Anzahl der CD276⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-T-Zellen in der haploidentischen MLC bestimmt. Insgesamt wurden 8 Kulturansätze von drei verschiedenen Spendern jeweils nach folgendem Schema analysiert:

CD4+ Zellen 1*10 ⁵ /well	+	+	+	+	+	+	+	+
NK Zellen 1*10 ⁴ /well	-	-	+	+	-	-	+	+
mAb CD276 10ng/ml	-	+	-	+	-	+	-	+
Komplement	-	-	-	-	+	+	+	+
Il-2 (50 Units/ µl)	+	+	+	+	+	+	+	+

Die Negativkontrolle des Ansatzes (Abb. 25, linker Balken) zeigte die höchste Frequenz von CD276⁺-Zellen mit ca. 11 %. Die alleinige Gabe des CD276-Antikörpers bewirkte nur eine leichte Reduktion um 2% auf ca. 9 % (CD276⁺/CD4⁺). Größer war die Reduktion bei alleiniger Gabe von Serum, das Komplementfaktoren enthielt. Serum und Antikörper zeigten eine 40%ige Reduktion, was auf eine ausgeprägte CDC-Reaktion schließen ließ. Die

Ergebnisse

zusätzliche Gabe von NK-Zellen erzielte ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$), was für einen additiven Effekt von Serum und NK-Zellen sprach.

Insgesamt zeigte der CD276-Antikörper eine Mischform aus ADCC und CDC bzw. einer CDC-verstärkten ADCC.

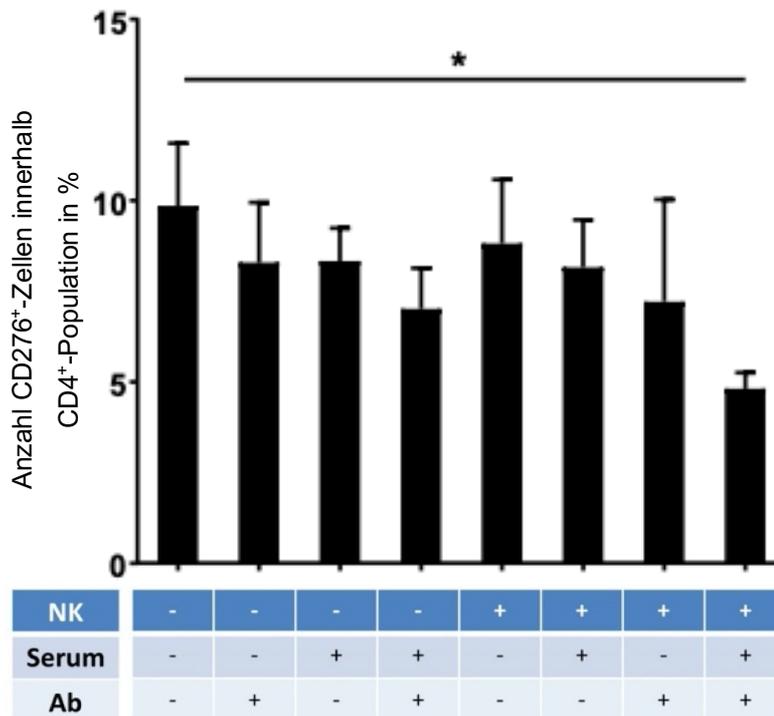


Abbildung 25: Additiver Effekt von ADCC und CDC durch Einsatz des CD276-Antikörpers

Dargestellt ist die Häufigkeit der CD276⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Population in % (n=3). Die Reinheit der CD4⁺-T-Lymphozyten innerhalb der CD3⁺-Population nach Isolation betrug 99,7 %. Die Ordinate zeigt die Anzahl der CD276⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Zellen in %. Gezeigt ist die Standardabweichung. Abbildung modifiziert nach [1].

3.7.2 Additiver Effekt von CDC und ADCC bei Apoptoseinduktion

Betrachtet wurde der Apoptosemarker Annexin V ausschließlich innerhalb der CD276⁺-Zellfraktion (Abb 26). Es wurde der Messwert vom Kontrollwert subtrahiert, sodass relative Werte dargestellt sind. Zu sehen ist, dass die alleinige Gabe des CD276-Antikörpers keinen signifikanten Anstieg des Apoptosemarkers Annexin V in Bezug auf die Negativkontrolle bewirkte, während Serum und

Ergebnisse

Antikörper zusammen einen deutlich erhöhten Apoptoseeffekt erzielen. Ähnlich verhielt es sich mit der gleichzeitigen Gabe von Antikörper und NK-Zellen. Eine Kombination aus Antikörper, NK-Zellen und Komplementfaktoren sowie NK-Zellen und Antikörper bewirkte ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$). Insgesamt deckten sich diese Ergebnisse mit den Erkenntnissen des ersten Versuchsteils (s. 3.7.1). Es waren CDC und ADCC vorhanden und es ließ sich ein additiver Effekt einer CDC-verstärkten ADCC beobachten.

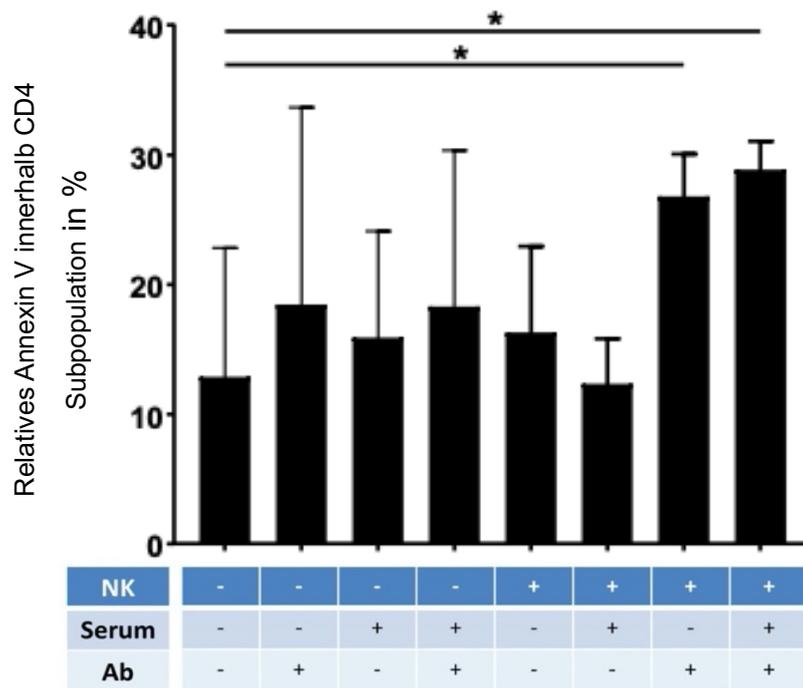


Abbildung 26: Additiver Effekt von CDC und ADCC bei Apoptoseinduktion.

Die Häufigkeit von Annexin V⁺ apoptotischen Zellen innerhalb der CD4⁺-T-Zellpopulation nach 24h Inkubation mit +/- NK, +/- Serum und +/- Ab. Gezeigt ist die Standardabweichung. (n=3). Abbildung modifiziert nach (1).

3.7.3 Vergleich der Apoptoserate zwischen CD276⁻- und CD276⁺-Zellen

Wie spezifisch kann der CD276-Antikörper Apoptose induzieren? Betrachtet werden die CD276⁺-Fraktion im Vergleich mit der CD276⁻-Fraktion innerhalb derjenigen Zellen, bei denen NK-Zellen, Serum und CD276-Antikörper hinzugegeben wurden. Man sah einen hochsignifikanten Anstieg der Annexin V positiven Zellen ($p < 0,0001$). Der Median lag bei ca. 42% der CD276⁺-Fraktion im Vergleich zu 0% in der CD276⁻-Fraktion. Zusammenfassend konnte man feststellen, dass für eine effektive Funktion des Antikörpers sowohl NK-Zellen als auch Komplementfaktoren nötig waren und dass ausschließlich CD276⁺-T-Zellen eliminiert wurden, d.h. der Antikörper ist hochspezifisch.

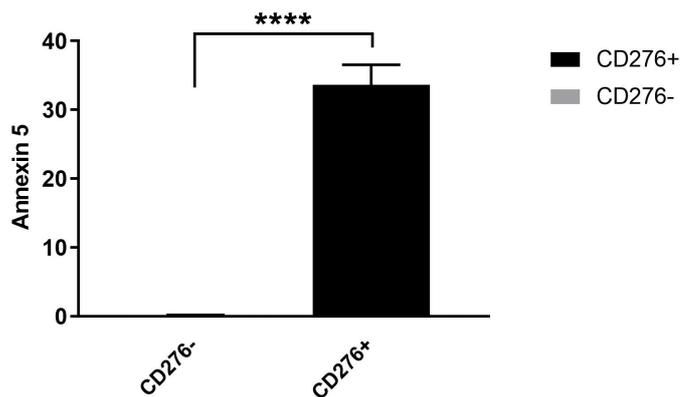


Abbildung 27: Die Häufigkeit von Annexin V⁺ apoptotischen Zellen innerhalb CD4⁺-T-Zellen nach 24h Inkubation mit NK-Zellen, Serum und Ab für CD276 +/- CD4⁺-T-Lymphozyten. (n=3)

3.8 *In-vivo* Depletion von CD276 innerhalb der NSG-Ab^o DR-4-Mäuse

Nachdem die oben angeführten *in-vitro* Daten des CD276-Antikörpers eine spezifische NK-zellabhängige Zielzellen-Lyse nahelegten, wurden NSG-DR4-Mäusen CD45RA-depletierte T-Zellen transplantiert und anschließend der CD276-Antikörper intravenös verabreicht. Dies erfolgte mit dem Ziel, jene alloreaktiven T-Zellen *in-vivo* zu depletieren, die durch eine MLC im Sinne von „Graft Engineering“ nicht erreicht werden konnten bzw. *in-vivo* durch das Zytokinmilieu und die Antigenerkennung aktiviert und alloreaktiv wurden. Wie die Histologie der Zielorgane zeigte, wurde die Infiltration in allen Organen nach Einsatz des CD276-Antikörpers auf ein absolutes Minimum reduziert. Auch das deutlich verbesserte Gesamtüberleben und die klinische Evaluation der NSG-DR4-Mäuse legten eine erfolgreiche Depletion von alloreaktiven T-Zellen *in-vivo* nahe. Damit zeigte sich, dass die *in-vivo* Depletion von CD276 eine vielversprechende Option zur Prophylaxe einer GvHD in der haploidentischen-HSCT ist.

Ergebnisse

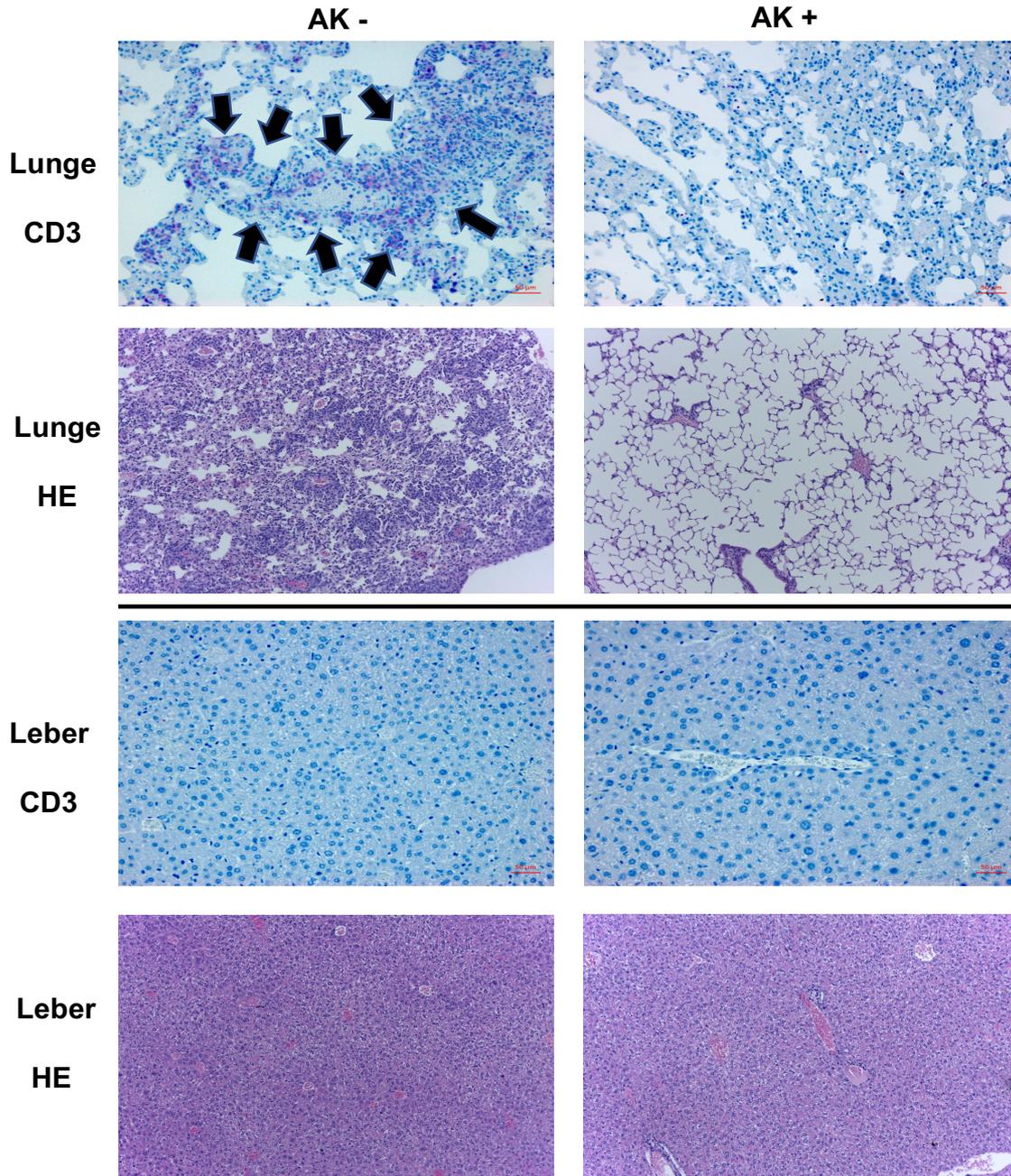


Abbildung 28: Histologische Untersuchung der GvHD-Zielorgane für infiltrierende CD3⁺-T-Zellen innerhalb der Kontrolle (linke Bildreihe) und der *in-vivo* Depletion von CD276 (rechte Bildreihe) innerhalb NSG-Ab^o DR-4-Mäusen.

Das Gewebe von Lunge und Leber der Mäuse wurde in 10% gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet für die HE-Färbung und den immunhistochemischen Nachweis von CD3. Pfeile verdeutlichen die Lokalisation von humanen Infiltraten. Vergrößerung aller Aufnahmen 100fach. Abbildung modifiziert nach [1].

Ergebnisse

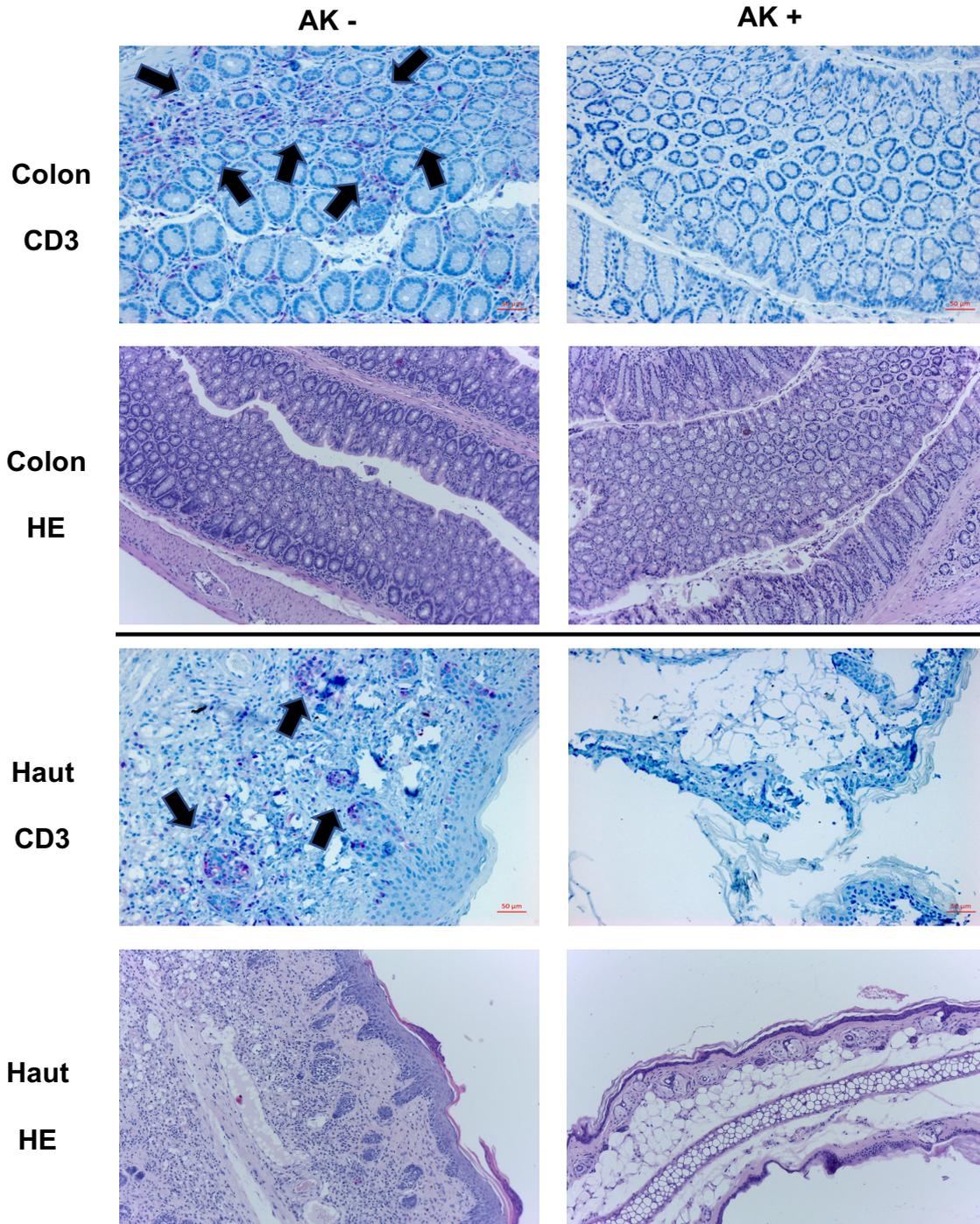


Abbildung 29: Histologische Untersuchung der GvHD-Zielorgane für infiltrierende CD3⁺-T-Zellen innerhalb der Kontrolle (linke Bildreihe) und der *in-vivo* Depletion von CD276 (rechte Bildreihe) innerhalb NSG-Ab^o DR-4-Mäusen.

Das Gewebe von Colon und Haut der Mäuse wurde in 10% gepuffertem Formalin und in Paraffin eingebettet für die HE-Färbung und den immunhistochemischen Nachweis von CD3. Pfeile verdeutlichen die Lokalisation von humanen Infiltraten. Vergrößerung aller Aufnahmen 100fach. Abbildung modifiziert nach [1].

Ergebnisse

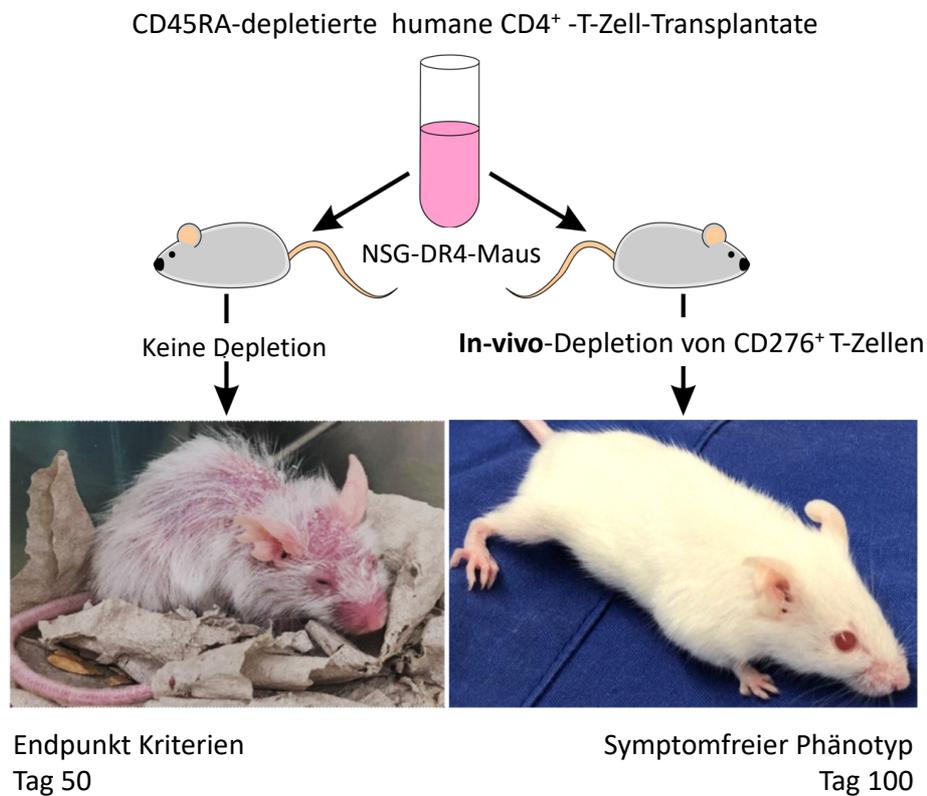


Abbildung 30: In-vivo Depletion von CD276 verbesserte die GvHD und sorgte für einen symptomfreien Phänotyp.

Beide Tiere erhielten das gleiche Transplantat vom gleichen Spender, die linke Maus erhielt NK-Zellen, jedoch keine Depletion der CD276⁺ T-Zellen, die Maus rechts erhielt wöchentlich NK-Zellen sowie einen Antikörper, der CD276⁺-T-Zellen depletiert. Graphische Darstellung modifiziert nach [1].

Die Behandlungsgruppe zeigte zum Endpunkt der Studie an Tag 100 einen vollkommen unauffälligen Phänotyp, während die Tiere der unbehandelten Kontroll-Kohorte spätestens an Tag 50 Endpunktkriterien erreichten. Das signifikant bessere Überleben korrelierte mit der Aussage der histologischen Analyse.

4 Diskussion

Die GvHD ist eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation [129-132]. In der Vergangenheit konnte zwar eine deutliche Verbesserung im Gesamtüberleben nach Transplantation erreicht werden, jedoch ist die Inzidenz von akuter GvHD nahezu unverändert geblieben. Neue Therapiestrategien sind zwingend erforderlich [140].

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern wichtige Erkenntnisse zur einer potentiellen, zukünftigen Prophylaxe und Therapie der GvHD nach allogener Stammzelltransplantation.

Die Basis bildet die Identifikation von CD276 als spezifischer Marker alloreaktiver CD4⁺-T-Zellen. Der Einsatz eines Antikörpers gegen CD276 in Kombination mit der Depletion von naiven T-Zellen aus dem Transplantat führte zu einer signifikanten Reduktion der Gewebsinfiltration alloreaktiver T-Lymphozyten in den Zielorganen der GvHD und zu einer signifikanten Besserung der klinischen Symptomatik im Vergleich zur Gruppe derer, die unmanipulierte Gesamt-CD4⁺-T-Zellen als Transplantate erhielten. Diese Arbeit beinhaltet die phänotypische und funktionelle Charakterisierung der noch im Transplantat verbliebenen alloreaktiven T-Zellen innerhalb der CD4⁺-T-Lymphozytenpopulation vor und nach CD45RA- bzw. CD45RA/CD276-Depletion. Alloreaktive T-Zellen wurden *in-vivo* in Rezipienten des HLA-DR4⁻-Settings, aber auch innerhalb des HLA-DR4⁺-Maus-Settings depletiert. Zunächst konnte mittels „Graft Engineering“, also dem Einsatz des Antikörpers vor Transplantation nach Spender/Rezipienten MLC, eine signifikante Reduktion der GvHD innerhalb des HLA-DR4⁻-Settings erreicht werden. Die aus Gründen der Praktikabilität durchgeführte *in-vivo* Depletion von CD276⁺-Zellen erwies sich eindrucksvoll als erfolgreicher Ansatz für ein zukünftiges Prophylaxe- und Therapiekonzept. Der *in-vivo* Depletion ging eine funktionelle Analyse des anti-CD276-Antikörpers voraus.

4.1 CD276 als hochsensitiver Marker alloreaktiver CD4⁺-T- Lymphozyten

Haploidentische-HSCT mit anschließender Depletion von CD45RA⁺-T-Zellen, also naiven T-Zellen, garantiert eine deutliche Verbesserung zur Prävention der GvHD [113]. Nicht genau geklärt sind die Natur und das Verhalten von verbliebenen alloreaktiven CD4⁺-T-Zellen nach CD45RA-Depletion, die bereits Antigenkontakt hatten. In Voruntersuchungen hat die AG Schilbach verschiedene co-stimulatorische und co-inhibitorische Moleküle, die von alloreaktiven T-Zellen nach haploidentischer HSCT exprimiert wurden, *in-vitro* auf die Korrelation mit IFN γ untersucht und CD276 als einen hochspezifischen Marker für alloreaktive CD4⁺-T-Lymphozyten, insbesondere T_H1-Zellen nach Depletion von CD45RA⁺-Zellen, identifiziert [1].

Außerdem konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass die CD45RA/CD276-Depletion die Fremdanwort auf Empfänger-Zellen signifikant reduziert und gleichzeitig die Immunantwort gegen Fremdantigene und bekannte virale Antigene aufrechterhält oder sogar noch verstärkt. D.h. man kann davon ausgehen, dass die Depletion von CD276⁺-T-Zellen die Effizienz gegenüber infektiösen Ereignissen und den anti-Tumor-Effekt im Transplantat/Rezipienten aufrechterhält [1].

4.2 Depletion von CD276⁺-CD4⁺-T-Zellen verringert das Risiko einer GvHD

Die Grundlage dieser Arbeit ist ein hochsensitives humanes allo-GvHD Mausmodell [133], in welchem humane T-Zellen gegen humane HLA-Klasse-II Moleküle aktiviert werden und die Maus kein eigenes MHC mehr exprimiert, hingegen humane HLA-Klasse-II Moleküle. In diesem kann *in-vivo* mittels eines HLA-DR4-Transplantats eindrucksvoll gezeigt werden, dass CD45RA/CD276-depletierte CD4⁺-Transplantate das Auftreten von klinischen Symptomen und die Schwere der Erkrankung, verglichen mit alleiniger CD45RA-Depletion, signifikant senken konnte. Es konnte in dieser Arbeit veranschaulicht werden, dass die

CD45RA/CD276-Depletion innerhalb des HLA-DR4⁻-Settings die Infiltration von Haut und Colon mit alloreaktiven CD4⁺-T-Zellen eindrucksvoll reduziert und es nur zu minimalen Infiltraten mit verminderter alloreaktiver Aktivität in Lunge und Leber kam.

Interessanterweise zeigte sich bei HLA-DR4⁺-Transplantaten nur eine geringe bis keine Verbesserung der klinischen GvHD trotz zusätzlicher CD276-Depletion, verglichen mit alleiniger CD45RA-Depletion. Diese selektive Depletion sorgte für eine bessere Kontrolle der GvHD im HLA-DR4⁻-Transplantat, jedoch nicht im HLA-DR4⁺-Setting. Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits gezeigt [113], jedoch existieren auch gegenteilige Befunde [115]. Diese Diskrepanz kann durch Unterschiede im Ausmaß des HLA-Mismatch erklärt werden. Während der ersten Untersuchung ein komplettes HLA-Mismatch zugrunde liegt [113], wurde in der zweiten Arbeit nur über ein einzelnes HLA-Mismatch transplantiert [115].

In Voruntersuchungen wurde eine stärkere Alloreaktivität innerhalb der CD45RA-depletierten CD4⁺-T-Lymphozyten verglichen mit CD8⁺-T-Lymphozyten beobachtet. Dieses Phänomen könnte mit den variableren Peptid-Bindungen an MHC-II-Moleküle erklärt werden, was in einer größeren Alloreaktivität innerhalb der CD4⁺-T-Zell-Untergruppe resultiert [141]. Dies ist ein wichtiger Grund, warum wir ausschließlich CD4⁺-T-Zellen transplantiert haben.

B7-H3 (CD276) gehört zur Gruppe der B7-Moleküle, deren Funktion in der Immunregulation noch nicht ausreichend definiert worden ist [125]. Eine große Bandbreite von Immunzellen exprimiert CD276, so z.B. aktivierte T-Zellen, NK-Zellen, DCs und Makrophagen, aber auch nicht-hämatopoetische Zellen wie Epithelzellen und eine große Bandbreite an Krebszellen [127, 142-144]. Die Rolle von CD276 auf APCs und in der Immunregulation wurde intensiv untersucht und als immunstabilisierend sowie -inhibierend beschrieben [125, 145, 146]. Die Bedeutung der Expression von CD276 auf T-Zellen wurde bislang nicht ausreichend untersucht. Es gab lediglich eine Untersuchung von CD276 exprimierenden T-Zellen, die überdies zu gegenteiligen Befunden kam wie sie hier erhoben werden konnten [128]. Diese Untersuchungen wurden in einem CD276-knockout Modell gemacht, welches die Entwicklung, die Prägung und das

Überleben der T-Zellen in einen komplett anderen Kontext stellt als dies in unserem Modell der Fall war. Hier beschleunigten CD276-Spender-T-Zellen die GvHD in einem Mismatch-Modell, woraus geschlossen wurde, dass CD276 als negativer Co-Stimulator im Kontext der GvHD agiert. Eine Erklärung für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass in einem CD276^{-/-}-Modell die Funktionalität von T-Zellen grundsätzlich moduliert wird, da die Interaktion zwischen T-Zellen und APCs oder anderen Lymphozyten-Untergruppen, die CD276 exprimieren, gestört ist. In den eigenen Untersuchungen wurde die Rolle von CD276 ausschließlich auf T-Zellen betrachtet und exklusiv auf CD4⁺-T-Zellen induziert und diese depletiert. Dies kann erklären, warum sich unsere Ergebnisse so grundsätzlich vom oben angeführten Bericht unterscheiden.

4.3 Identische T-Zell-Klone treten systemisch im HLA-DR4-mismatched Transplantat auf, organspezifische T-Zell-Klone im HLA-DR4-matched Transplantat

Im zweiten Schritt meiner Arbeit ging es nun um eine funktionelle und phänotypische Charakterisierung alloreaktiver CD4⁺-Memory-T-Zellen in Transplantaten vor und nach Depletion von CD276. Zur Identifikation von T-Zellrezeptorbinderegionen, die die Breite an alloreaktiven T-Zellpools anzeigt, wurden Direktsequenzierungen der α -Kette von Spectratype-Singlepeaks durchgeführt.

Die CDR3-Region bindet das Epitop direkt. Die Komplexität eines TCR-Repertoires (Anzahl unterschiedlicher CDR3-Regionen) kann dabei als direktes Maß für die Infiltration der Gewebe gelten. Die Homologie von Sequenzen der CDR3-Region kann Aufschluss über Klone geben, die evtl. gleiche Epitope erkennen. Während Major-Antigene in allen Geweben einer transgenen DR4⁺-NSG-Maus vorkommen, weisen Minor-Antigene meist eine Geweberestriktion auf und werden daher höchstwahrscheinlich organspezifische Repertoires der T-Zellrezeptoren induzieren [70].

Wie in der Einleitung beschrieben, werden in Patient*innen innerhalb des matched-Settings vor allem Minor-Antigene von alloreaktiven T-Zellen erkannt [77, 147] - bedingt durch das optimierte HLA-Match von Spender und Empfänger. Obwohl manche miHAs ubiquitär exprimiert werden, weisen viele miHAs gewebs- und organspezifische Eigenschaften auf [70]. Die gewebs- und organspezifische Expression von miHAs induziert die Bildung organspezifischer alloreaktiver T-Zellklone [2, 70]. Mit der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass es zur systemischen Infiltration von alloreaktiven T-Zellen im HLA-DR4-Setting kam, während organspezifische T-Zellrepertoires im HLA-DR4+-Setting (matched) vorherrschen. Warum war also die Depletion von CD276 nach MLC via Graft Engineering im mismatched-Setting erfolgreicher als im matched-Setting? Organspezifische miHAs werden nicht von PBMCs exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor der Transplantation der CD45RA/CD276-depletierten T-Zellen eine MLC mit PBMCs durchgeführt. Die Depletion von CD276 nach einer MLC mit PBMCs kann keine alloreaktiven T-Zellen gegen organspezifische Antigene eliminieren. Dies erklärt, warum Graft Engineering mittels Depletion von CD276⁺-T-Zellen nach einer MLC die Schwere der GvHD dramatisch innerhalb des Major-mismatched-Settings reduzieren konnte, jedoch nicht im HLA-matched-Setting. Deshalb ist die Depletion von CD276⁺-Spender-Zellen mittels Graft Engineering besonders passend für die HLA-mismatched HSCT. Die Depletion organspezifischer alloreaktiver T-Zellen wurde *in-vivo* durchgeführt.

4.4 Charakteristika alloreaktiver T-Zellrezeptoren

Durch die Direktsequenzierung von Spectratype-Singlepeaks konnten einige sehr interessante Charakteristika alloreaktiver T-Zellrezeptoren aufgezeigt werden (vgl. Tab. 15-22). Die Spezifität der Erkennung von MHC-Molekülen durch T-Lymphozyten wird durch die CDR1- und CDR2-Region der V-Region der α - und β -Kette des T-Zellrezeptors bestimmt [43]. Die Antigenpezifität wird dabei etwas mehr von der V- α -Kette als von der β -Kette bestimmt [43]. Die CDR3-Region weist einen hohen Grad an Diversität auf und ist für die Antigenbindung

Diskussion

verantwortlich [148]. Im Thymus wird das Repertoire an T-Zellrezeptoren, das produziert wird, durch positive und negative Selektion so geformt, dass autoreaktive T-Zellen ausgesondert werden – ebenso wie T-Zellen, die eigentlich nicht binden und erkennen können. Die positive Selektion sortiert dabei Thymozyten aus, die gar nicht oder zu schwach an pMHC im Thymus binden. [149-151]. Die negative Selektion eliminiert Thymozyten mit einem T-Zellrezeptor, der an pMHC zu stark bindet [152, 153]. Trotz dieser Selektion haben bestimmte CD4⁺-T-Zellen ungewöhnliche Bindungsspezifitäten. Vor allem CD4⁺-T-Zellen neigen dazu, mit verschiedenen anderen MHC-II-Allelen zu interagieren [154, 155] und können sogar mit MHC-I-Liganden kreuzreagieren [156]. Die CDR1- und CDR2-Region der α -Kette ist hauptsächlich für die Bindung an das MHC-Molekül verantwortlich, während die CDR3-Region die Spezifität der Bindung an das eigentliche Zielantigen bestimmt [139]. Bei T-Zellrezeptoren mit sehr kurzer oder fehlender CDR3-Region (diese TCRs bezeichnet man als „Keimbahn-kodiert“, „germline encoded“) zeigt sich demnach die größte Promiskuität. Durch die Gensequenzierungen im Rahmen dieser Arbeit konnten einige Keimbahn-kodierte T-Zellrezeptoren nachgewiesen werden, die als besonders alloreaktiv gelten. Alloreaktive Keimbahn-kodierte CDR3-Regionen konnten ausschließlich im T-Zellrezeptor-CDR3-Repertoire **nicht depletierter**, also der Gesamtheit der CD4⁺-, Transplantate dargestellt werden. Daraus geht klar hervor, dass die CD45RA-Depletion diesen Typ alloreaktiver T-Zellen eliminiert.

Auch andere bemerkenswerte Eigenschaften alloreaktiver T-Zellrezeptoren konnten aufgezeigt werden. So spielen aromatische Aminosäuren (Y, F und W) eine bedeutende Rolle für die hydrophobe Natur kreuzreaktiver T-Zellrezeptoren [139] — d.h. je kreuzreaktiver T-Zellen agieren, desto hydrophober ist die Zusammensetzung der CDR3-Region. Auch diese Besonderheit zeigten die hier vorgestellten Sequenzierungsergebnisse (Abb.15-20).

4.5 Public-T-Zellrezeptoren

Bei der riesigen Anzahl verschiedener T-Zellrezeptoren ist das Vorkommen identischer CDR3-Regionen bei zwei unterschiedlichen Individuen theoretisch nahezu ausgeschlossen. Nichtsdestotrotz tritt dies auf – dies sind sog. Public-T-Zellrezeptoren [157]. Gerade im Kontext einer Immunantwort auf ein spezifisches Antigen sind diese CDR3-Regionen beteiligt [158-160]. Beispiele für Erkrankungen vermittelt durch Public-T-Zellrezeptoren sind: Hepatitis B [161] und C[162], HIV [163, 164], EBV [165], CMV [166, 167], verschiedene Krebserkrankungen [168, 169], Autoimmunerkrankungen [170-172] und Alloreaktivität z.B. im Kontext der GvHD [173, 174]. Ein Public-T-Zellrezeptor wird nach Grad der Übereinstimmung mit anderen T-Zellrezeptoren gegen das gleiche Epitop in unterschiedliche Grade der Übereinstimmung eingeteilt und kann auch schon allein durch die Übereinstimmung von TRAV- und TRAJ- Segmenten unabhängig von der CDR3-Region entstehen. Um dies übersichtlich darzustellen, existiert eine Klassifikation von „Public-T-Zellrezeptoren“ [42, 175]:

- Zeigen CDR3-Region und TRAJ-Segment wenig bis keine Übereinstimmung, besitzen jedoch das gleiche TRAV-Segment, spricht man von Typ 1.
- Stimmt die Sequenz der CDR3-Region überein, während TRAV- und TRAJ-Segment verschieden sind, spricht man von Typ 2.
- Stimmen TRAV- und TRAJ-Segmente überein, jedoch die CDR3-Region nur teilweise, handelt es sich um Typ 3.
- Bestmögliche Übereinstimmung der TRAV- und TRAJ-Segmente und der CDR3-Region bestimmen Typ 4.

Die unter Kapitel 3.3 aufgeführten Sequenzierungsergebnisse zeigen ein breites, diverses Repertoire an TCR-CDR3-Regionen. Bemerkenswert ist die große Anzahl an Public-T-Zellrezeptoren, die identifiziert wurde. Angesichts der Tatsache, dass nur CD45RA-depletierte, also nur Memory-T-Zellen, transplantiert wurden, ist von einer Virus-spezifischen Anreicherung der T-Zellpopulation auszugehen. Dass Public-T-Zellrezeptoren jedoch in besonderem Maße Alloreaktivität besitzen, ist augenscheinlich und so noch nicht beschrieben. Die

Diskussion

Tatsache, dass wir identische T-Zellklone wie z.B. den Klon TRAV9-2, TRAJ12, CDR3: CIRGLSVCVMGSKGLIFGSG in Individuen identifizieren konnten, die CD45RA-depletierte +/- CD276-depletierte Transplantate erhielten, zeigt, dass nicht alle alloreaktiven T-Zellklone durch eine CD276-Depletion mit vorgeschalteter MLC beim Graft Engineering erreicht werden können. Außerdem zeigt dieses Beispiel, dass Memory-T-Zellen transplantiert wurden: Denn Memory-T-Zellen sind nicht „einzigartig“, sondern in diversen Untergruppen lokalisiert und außerdem klonal expandiert. D.h. sie sind mehrfach vorhanden und können daher auch in unterschiedlichen Rezipienten präsent sein. Die Tatsache, dass eine MLC-Alloreaktivität durch Graft Engineering nicht eliminiert werden kann, war ein weiteres Argument für die anschließend durchgeführte *in-vivo* Depletion. Der Nachweis virusspezifischer Public-T-Zellrezeptoren in CD45RA/CD276-depletierten Transplantatempfängern zeigt aber auch, dass weiterhin eine Immunantwort des Empfängers gegen Virusantigene besteht.

Sehr interessant ist auch, dass die in Abb. 20 dargestellten Public-T-Zellrezeptoren für CD8⁺-T-Lymphozyten beschrieben wurden, die MHC-I restringiert sind. Da in den NSG-DR4 Individuen nur MHC-II existiert, werden die Minor-Antigene auf MHC-II erkannt und präsentiert. Dies unterstreicht die niedrige Bindungsspezifität der identifizierten Rezeptoren und die daraus resultierende große Alloreaktivität. CD4⁺-T-Zellen sind unter bestimmten Umständen in der Lage, an über MHC-I präsentierte Peptide zu binden oder eine GvHD über lösliche organspezifische Peptide zu medieren [23, 74, 78]. So gibt es eine Reihe von Berichten über identifizierte MHC-I-restringierte CD4⁺-T-Lymphozyten [176-178]. MHC-I-restringierte CD4⁺-T-Zellen spielen eine Rolle sowohl bei der Major- als auch Minor-Antigenerkennung im Kontext einer allogenen HSCT [179]. Außerdem wurden ausschließlich MHC-I-zugehörige miHAs beschrieben, die eigentlich an CD8⁺-T-Zellen binden sollten, jedoch CD4⁺-T-Zell restringiert sind [23].

4.6 Analyse verschiedener Transkriptionsfaktoren im Kontext der GvHD

Während die Sequenzierungsergebnisse eine molekularbiologische phänotypische Analyse des T-Zellrepertoires darstellten, ermöglichte die Bestimmung spezieller Transkriptionsfaktoren eine komparative funktionelle Analyse alloreaktiver T-Zellen.

Wie in der Einleitung beschrieben, sind T_H1-Zellen die Hauptverursacher von akuter GvHD und ein hohes Level an T_H1-verwandten Zytokinen wie INF γ konnte bereits in allen Zielorganen der akuten GvHD gefunden werden [2]. Komparative Analysen von Transkriptionsfaktoren der CD276⁺-T-Zellen im Vergleich zu CD276⁻-T-Zellen zeigten in Voruntersuchungen eine signifikant höhere Expression von T-bet- und IFN γ -mRNA in CD276⁺-T-Zellen, woraus sich schließen lässt, dass die Schwere der klinischen GvHD-Symptomatik positiv mit T_H1-Zellen korreliert. Im Gegensatz dazu ist die Bedeutung von T_H17-Zellen im Kontext der GvHD bislang äußerst umstritten [180-182]. Die Entwicklung von T_H17-Zellen wurde als unabhängig von T_H1- und T_H2-spezifischen Transkriptionsfaktoren (u.a. T-bet und GATA3) beschrieben und daher die T_H17-Linie als unabhängig von der T_H1- und T_H2-Linie angesehen [183, 184]. Charakteristisch für T_H17-Zellen ist der Transkriptionsfaktor RORC [185], STAT3 spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von T_H17-Zellen [140].

Es wurde gezeigt, dass die Deletion von RORC in CD4⁺- und CD8⁺-Spender-T-Zellen zu einem milderen Verlauf der akuten GvHD führte und mit einer verminderten Gewebspathologie in Colon, Leber und Lunge einherging [186]. IL-6 aktiviert den für die T_H17-Zelldifferenzierung wichtigen Transkriptionsfaktor STAT3, unterdrückt aber auch einen weiteren Transkriptionsfaktor, nämlich FOXP3 (forkhead box protein 3). Dieser ist charakteristisch für Tregs [187], sodass letztlich IL-6 über die Unterdrückung von FOXP3 die Entwicklung der Tregs verhindert [188]. Tregs repräsentieren eine Untergruppe von CD4⁺-T-Zellen, die wichtig für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz sind [189]. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass die Infusion hochdosierter Tregs die GvHD im Mausmodell verhindern bzw. vermindern konnte [190]. Für die eigenen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass auch Tregs

Diskussion

transplantiert worden sind. Jedoch können Tregs nicht allein anhand von FOXP3 zweifelsfrei identifiziert werden, denn auch aktivierte T_H-Zellen exprimieren FOXP3, allerdings nur transient. Weiterhin ist der Transkriptionsfaktor T-bet entscheidend für die Entwicklung von T_H1-Zellen. Er gilt als „lineage“ Transkriptionsfaktor, stellt aber auch ein Drehkreuz für die Differenzierung von pathogenen und nicht pathogenen T_H17-Zellen dar [191]. Eine Schlüsselrolle für die Immunantwort nimmt auch der Transkriptionsfaktor SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3) ein – er arbeitet als negativer Regulator von Zytokinen, die den JAK-STAT3 Signalweg aktivieren [136]. Die Abwesenheit von SOCS3 erhöht die Sekretion von TGFβ und IL-10. SOCS3 inhibiert die Differenzierung von T_H17-Zellen [135] und verhindert die Proliferation alloreaktiver T-Zellen [136].

Als ein Master-Regulator der T_H2-T-Zell-Differenzierung gilt GATA3 (zink-finger transcription factor), indem GATA3 die Expression von Zytokinen der T_H2-Zellreihe verstärkt und die T_H1-Entwicklung unterdrückt [134]. GATA3 wurde überdies als negativer Regulator der T_H17-Zelldifferenzierung beschrieben [134]. Berichtet wurde ein Anstieg von GATA3 auch im Zusammenhang mit einer verminderten Expression von RORC sowie von STAT1 – dies ging mit einer verminderten T_H17-zellvermittelnden Pathophysiologie einher [134].

EOMES ist ein Transkriptionsfaktor der t-box Familie (verwandt mit T-bet), der für Effektor-CD8⁺-T-Zellen, aber auch für NK-Zell-Differenzierung eine Rolle spielt. EOMES sorgt für die Sekretion von INFγ und unterdrückt die T_H17-Zelldifferenzierung [192-195].

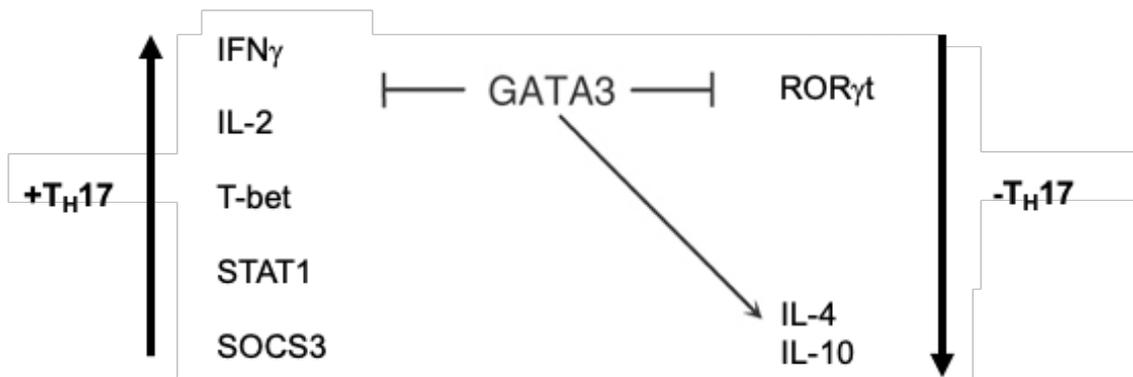


Abbildung 31: Regulatorische Effekte von GATA3 auf die TH17-Zelldifferenzierung.

GATA3 limitiert die IFN γ - und IL-2-Produktion und verhindert die Expression von T-bet, STAT1 und dem TH17-Repressor-Protein SOCS3. Auf der anderen Seite schränkt GATA3 die TH17-Zelldifferenzierung ein, indem es die Expression wichtiger Differenzierungsfaktoren mindert, darunter ROR γ t. Außerdem wird die TH17-zellvermittelte Pathologie durch verstärkte Produktion von IL-4 und IL-10 gemindert [134]. License number: 4899341143918

4.7 Die Depletion von CD45RA/CD276-T-Zellen erhöht die Expression von GATA3 und SOCS3 im Transplantat und senkt die Induktion und Rekrutierung von TH17-Zellen in GvHD-Zielorganen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zu den zuvor beschriebenen Transkriptionsfaktoren lassen sich folgendermaßen einordnen: Wie in den Abbildungen 22 und 23 dargelegt, konnten in keinem der untersuchten Organe, weder im matched- noch im mismatched-Setting, signifikante Unterschiede der Expression von RORC oder T-bet nachgewiesen werden. GATA3 hingegen wurde in Leber und Colon innerhalb des matched-Settings signifikant hochreguliert. Die Expression von FOXP3 war generell niedrig und konnte durch die qPCR in den meisten Proben nicht detektiert werden. SOCS3 war im HLA-DR4⁺-Setting in den Organen Leber und Colon nach CD45RA/CD276-Depletion hochreguliert. Anhand dieses Expressionsprofils in den Zielorganen der GvHD, d.h. hochreguliertes GATA3 sowie SOCS3 verbunden mit sehr niedrigem RORC, kann man davon ausgehen, dass pathogene TH17-Zellen in diesem Modell keine bedeutende Rolle spielen. Keine Konstellation der gemessenen Transkriptionsfaktoren legt eine Beteiligung pathogener TH17-Zellen nahe. Dafür spricht auch, dass SOCS3 in Spenderzellen als negativer Regulator der GvHD-Pathophysiologie agiert [136].

Unterstützt wird diese auf der molekularen Analyse basierende Schlussfolgerung durch unsere klinischen Befunde: Die Mäuse im HLA-DR4⁻-Setting zeigten nach Doppeldepletion keine bis geringe Anzeichen einer GvHD (vgl. Abb. 4 und 30).

4.8 Anti-CD276-Antikörper vermittelt CDC und ADCC sowie Apoptose hochselektiv in CD276⁺-CD4⁺-T-Lymphozyten (alloreaktive Population)

Dem CD276-Antikörper stehen verschiedene Möglichkeiten der zytotoxischen Wirkung auf die Zielzelle zur Verfügung. Die direkte Induktion von Apoptose, die sog. ADCC, oder eine komplementabhängige Lyse (CDC) [196].

Bei der ADCC wird eine antikörperbeladene Zielzelle vor allem von NK-Zellen, aber auch anderen Effektorzellen zerstört, die Fc-Rezeptor-positiv sind ($\gamma\delta$ T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen). Die ADCC verbindet das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem [196]. Fc γ -Rezeptoren wie CD16 oder CD32 (lokalisiert auf humanen NK-Zellen) erkennen die Fc-Domäne von Immunglobulinen. Es kommt anschließend zur Ausschüttung von IFN γ und zytotoxischen Proteinen durch die Effektorzelle. Perforine sind dabei beispielsweise in der Lage über die Bildung einer Pore die Zielzellmembran zu durchdringen. Granzyme können dann in die Zelle gelangen und am Zielort Apoptose auslösen. Die Aktivierung des Komplementsystems spielt bei der CDC eine bedeutende Rolle. Verbunden sind beide Prozesse auf Proteinebene [196, 197].

Die *in-vitro* Daten konnten eine CDC- verstärkte ADCC des CD276-Antikörpers zeigen. Diese Ergebnisse deckten sich mit den *in-vivo* Depletionsexperimenten, die unter Gabe von NK-Zellen und CD276-Antikörper erfolgten.

4.9 Die *in-vivo* Depletion von CD276⁺-Zellen verbessert die GvHD in NSG-DR4-Mäusen, die Memory-CD4⁺-T-Zell-Transplantate von HLA-DR4-mismatched Spendern erhielten

Nachdem *in-vitro* Daten des CD276-Antikörpers eine NK-Zell-abhängige Zielzellen-Lyse nahelegten, wurden NSG-DR4-Mäusen CD45RA-depletierte T-Zellen transplantiert und anschließend der CD276-Antikörper intravenös verabreicht. Dies erfolgte mit dem Ziel, genau jene alloreaktiven T-Zellen zu depletieren, die durch eine MLC im Sinne von „Graft Engineering“ nicht erreicht werden konnten bzw. die *in-vivo* durch das Zytokinmilieu und die Antigenerkennung aktiviert und alloreaktiv wurden. Wie die Histologie der Zielorgane zeigte, wurde die Infiltration in allen Organen nach Einsatz des CD276-Antikörpers auf ein absolutes Minimum reduziert. Auch das deutlich verbesserte Gesamtüberleben und die klinische Evaluation der NSG-DR4-Mäuse legten eine erfolgreiche Depletion von alloreaktiven T-Zellen nahe. Damit zeigte sich, dass die *in-vivo* Depletion von CD276 eine vielversprechende Option zur Prophylaxe einer GvHD in der haploidentischen HSCT ist.

4.10 Bewertung des Studiendesigns

NSG-DR4-Mäuse sind immunodefizient, d.h. sie besitzen keine eigenen T- oder B-Zellen, keine funktionellen NK-Zellen und weisen eine reduzierte Anzahl von dysfunktionalen myeloiden und DCs auf. Sie haben außerdem Defekte im Komplementsystem. Sie eignen sich daher als Rezipienten für Xenotransplantate. Die transgene Expression der NSG-Maus von DR4 erlaubt es jetzt nicht, eine Xeno-GvHD zu untersuchen, sondern eine humane GvHD zu zeigen. Dies erlaubt die Interaktion von humanen CD4⁺-T-Zellen mit autologen oder allogenen MHC-II-Molekülen. Sie wurde erstmals für DR4-negative CD4⁺-Transplantationen eingesetzt, was der Reaktion eines Major-HLA-Mismatches entspricht [198]. Wir haben sie erstmals im HLA-matched-Setting mit DR4⁺-Spendern transplantiert und damit die Rolle der Minor-Antigene beleuchtet, die in dieser Maus alle murin sind, also zu 100% mismatched im Vergleich zum Spender der T-Zellen. Interessanterweise war die Gruppe, die das Major-

Diskussion

Mismatch aufwies, also Transplantate DR4⁻- Spender erhielt, deutlich weniger von GvHD Symptomen betroffen als die der DR4⁺-Transplantatempfänger. Da die GvHD eines Patienten aus Major- und Minor-Mismatches resultiert, kann hier nur modellhaft auf die jeweils eine oder andere Komponente eingegangen werden. Trotzdem erlaubt sich doch die Überlegung, dass im haploidenten Setting nicht zwingend das Überleben schlechter sein muss als im HLA-matched-Setting. Während bei nicht verwandten Spendern potentiell 100 % der Minor-Antigene disparat sind und optimal präsentiert werden, sind im haploidenten Setting maximal 50% der Minor-Antigene disparat und werden nicht erkannt aufgrund fehlender Restriktion der T-Zellen für 50% der HLA-Liganden.

In jedem Fall eignet sich dieses Mausmodell hervorragend zur Evaluation neuer therapeutischer Strategien zur Prophylaxe und Therapie der GvHD [199-201].

4.11 Zusammenfassung

Die Graft-versus-Host Disease (GvHD) ist eine der Hauptursachen von Therapieversagen in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation [129-132]. Ursächlich für die Abstoßungsreaktionen sind die im Transplantat enthaltenen Lymphozyten – insbesondere CD4⁺-T_H1-Zellen. Trotz neuer Therapieansätze wie der Entfernung naiver (CD45RA⁺) T-Zellen aus dem Transplantat, tritt die GvHD (wenngleich milder) weiterhin mit gleicher Frequenz auf [111-113]. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass das Oberflächenmolekül CD276 (B7-H3) als spezifischer Marker für alloreaktive CD4⁺-T-Zellen angesehen werden kann, denjenigen T-Zellen, die die GvHD initiieren und treiben [1]. Durch Co-Kultur von Spender- und Empfängerzellen und anschließender Depletion der CD276⁺-Fraktion konnten wir Transplantate herstellen, die keine Abstoßungsreaktion mehr hervorrufen. Hierzu wurden die Gesamtheit der CD4⁺-T-Lymphozyten CD45RA-depletiert und nach MLC mit Empfängergewebe CD276-depletiert. Diese CD4⁺-T-Lymphozytenpopulation wurde in NSG-Ab^oDR4-Mäuse transplantiert, die transgen für humanes DR4 sind. Diese Transplantate wurden sowohl von HLA-DR4-negativen als auch von HLA-DR4-positiven Spendern generiert. Durch die Depletion von CD45RA/CD276⁺-T-Zellen konnte die Infiltration von GvHD-Zielorganen im DR4-mismatched Setting hochsignifikant reduziert werden. Immunhistochemische Untersuchungen belegen eine signifikante Reduktion der perivaskulären Infiltration. Die Analyse der „lineage“ Transkriptionsfaktoren Eomes, Tbet, GATA3, FOXP3 und RORC - indikativ für T_H1-, T_H2-, Treg- und T_H17-Zellen – zeigte, dass T_H17-Zellen nach Doppeldepletion praktisch nicht mehr vorhanden sind.

Die Identifikation der Epitop-bindenden Regionen (CDR3-Region) der T-Zellrezeptoren durch direkte Sequenzierung von Singlepeaks aus der Spectratype-Analyse erlaubte eine phänotypische Charakterisierung alloreaktiver T-Zellrepertoires anhand ihrer CDR3-Regionen. Wir konnten innerhalb der sequenzierten alloreaktiven T-Zellrezeptoren eine große Anzahl Public-T-Zellrezeptoren zeigen sowie ein breites Repertoire an privaten virusspezifischen CDR3-Regionen. Identische systemische T-Zellklone traten im DR4-mismatched Setting auf, identische

Diskussion

organspezifische T-Zellklone konnten im DR4-matched Setting identifiziert werden. Keimbahn-kodierte T-Zellrezeptoren gelten als besonders alloreaktiv und wurden nach CD45RA/CD276-Depletion nicht mehr nachgewiesen.

In-vitro Analysen mit dem CD276-Antikörper zeigten eine Komplement-verstärkte ADCC, die den Antikörper für eine *in-vivo* Depletion alloreaktiver T-Zellen in Empfängern unmanipulierter Memory-T-Zelltransplantate geeignet machten.

Die CD276 *in-vivo* Depletion Behandlungsgruppe zeigte zum Endpunkt der Studie an Tag 100 einen vollkommen unauffälligen Phänotyp, während die Tiere der unbehandelten Kontrollkohorte bereits spätestens an Tag 50 Endpunktkriterien erreichten. Das signifikant bessere Überleben korrelierte mit den Befunden der histologischen Analyse.

Es ist nun möglich, die GvHD mittels Graft Engineering ohne pharmakologische Hilfe zu kontrollieren. Diese Graft Engineering Strategie macht die haploidentische HSCT zu einer sicheren therapeutischen Option für maligne, aber auch nicht hämatologische Erkrankungen.

5 Literaturverzeichnis

1. Hashimoto, H., et al., *Removal of CD276+ cells from haploidentical memory T-cell grafts significantly lowers the risk of GVHD*. Bone Marrow Transplantation, 2021.
2. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-1561.
3. Takenaka, K., [*Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloproliferative neoplasms*]. Rinsho Ketsueki, 2019. **60**(9): p. 1148-1156.
4. Passweg, J.R., et al., *Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually*. Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(6): p. 786-792.
5. Szydlo, R., et al., *Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings*. J Clin Oncol, 1997. **15**(5): p. 1767-1777.
6. Penack, O., et al., *Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation*. Lancet Haematol, 2020. **7**(2): p. e157-e167.
7. Zuckerman, T. and J.M. Rowe, *Alternative donor transplantation in acute myeloid leukemia: which source and when?* Curr Opin Hematol, 2007. **14**(2): p. 152-161.
8. Balduzzi, A., et al., *Transplantation in Children and Adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia from a Matched Donor versus an HLA-Identical Sibling: Is the Outcome Comparable? Results from the International BFM ALL SCT 2007 Study*. Biol Blood Marrow Transplant, 2019. **25**(11): p. 2197-2210.
9. Ballen, K.K., et al., *Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant*. Blood, 2012. **119**(9): p. 1972-1980.
10. Apperley, J., et al., *Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Global Overview Comparing Asia, the European Union, and the United States*. Biol Blood Marrow Transplant, 2016. **22**(1): p. 23-26.
11. Anasetti, C., et al., *Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma*. N Engl J Med, 1989. **320**(4): p. 197-204.
12. Anasetti, C., et al., *Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma*. Hum Immunol, 1990. **29**(2): p. 79-91.
13. Ciurea, S.O., et al., *The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Consensus Guidelines for the Detection and Treatment of Donor-specific Anti-HLA Antibodies (DSA) in Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2018. **53**(5): p. 521-534.

Literaturverzeichnis

14. Aversa, F., et al., *Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype*. N Engl J Med, 1998. **339**(17): p. 1186-1193.
15. Aversa, F., et al., *Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3447-3454.
16. Mehta, J., et al., *Bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched family donors for acute leukemia: single-center experience of 201 patients*. Bone Marrow Transplant, 2004. **33**(4): p. 389-396.
17. Lang, P., et al., *Long-term outcome after haploidentical stem cell transplantation in children*. Blood Cells Mol Dis, 2004. **33**(3): p. 281-287.
18. Guinan, E.C., et al., *Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts*. N Engl J Med, 1999. **340**(22): p. 1704-1714.
19. Bleakley, M. and S.R. Riddell, *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 371-380.
20. Korngold, R. and J. Sprent, *Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow*. J Exp Med, 1978. **148**(6): p. 1687-1698.
21. Murray, J., J. Stringer, and D. Hutt, *Graft-Versus-Host Disease (GvHD)*, in *The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses: Under the Auspices of EBMT*, M. Kenyon and A. Babic, Editors. 2018, Springer Copyright 2018, EBMT and the Author(s). Cham (CH). p. 221-251.
22. Glucksberg, H., et al., *Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors*. Transplantation, 1974. **18**(4): p. 295-304.
23. Shlomchik, W.D., *Graft-versus-host disease*. Nature reviews. Immunology, 2007. **7**(5): p. 340-352.
24. Flowers, M.E. and P.J. Martin, *How we treat chronic graft-versus-host disease*. Blood, 2015. **125**(4): p. 606-615.
25. Harris, A.C., et al., *International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium*. Biol Blood Marrow Transplant, 2016. **22**(1): p. 4-10.
26. Zeiser, R. and B.R. Blazar, *Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy*. N Engl J Med, 2017. **377**(22): p. 2167-2179.
27. Ferrara, J.L. and P. Reddy, *Pathophysiology of graft-versus-host disease*. Semin Hematol, 2006. **43**(1): p. 3-10.
28. Gallardo, D., et al., *Low-dose donor CD8+ cells in the CD4-depleted graft prevent allogeneic marrow graft rejection and severe graft-versus-host disease for chronic myeloid leukemia patients in first chronic phase*. Bone Marrow Transplant, 1997. **20**(11): p. 945-952.
29. Champlin, R., et al., *Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 1990. **76**(2): p. 418-423.
30. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-787.

Literaturverzeichnis

31. Yi, T., et al., *Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease*. *Blood*, 2009. **114**(14): p. 3101-3112.
32. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 821-852.
33. Bruggen, M.C., et al., *Diverse T-cell responses characterize the different manifestations of cutaneous graft-versus-host disease*. *Blood*, 2014. **123**(2): p. 290-299.
34. Markey, K.A., K.P. MacDonald, and G.R. Hill, *The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice*. *Blood*, 2014. **124**(3): p. 354-362.
35. Zhao, H., X. Liao, and Y. Kang, *Tregs: Where We Are and What Comes Next?* *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 1578.
36. De Wit, D., et al., *Preferential activation of Th2 cells in chronic graft-versus-host reaction*. *J Immunol*, 1993. **150**(2): p. 361-366.
37. Murphy, W.J., et al., *Differential effects of the absence of interferon-gamma and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(9): p. 1742-1748.
38. Yang, Y.G., et al., *Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(12): p. 2126-2135.
39. Glusman, G., et al., *Comparative genomics of the human and mouse T cell receptor loci*. *Immunity*, 2001. **15**(3): p. 337-349.
40. Allison, J.P., B.W. McIntyre, and D. Bloch, *Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody*. *J Immunol*, 1982. **129**(5): p. 2293-2300.
41. Nikolich-Zugich, J., M.K. Slifka, and I. Messaoudi, *The many important facets of T-cell repertoire diversity*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(2): p. 123-132.
42. Miles, J.J., D.C. Douek, and D.A. Price, *Bias in the alphabeta T-cell repertoire: implications for disease pathogenesis and vaccination*. *Immunol Cell Biol*, 2011. **89**(3): p. 375-387.
43. Dietrich, P.Y., et al., *Prevalent role of TCR alpha-chain in the selection of the preimmune repertoire specific for a human tumor-associated self-antigen*. *J Immunol*, 2003. **170**(10): p. 5103-5109.
44. Lefranc, M.P., et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*. *Dev Comp Immunol*, 2003. **27**(1): p. 55-77.
45. Lefranc, M.P., *IMGT unique numbering for the variable (V), constant (C), and groove (G) domains of IG, TR, MH, IgSF, and MhSF*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2011. **2011**(6): p. 633-642.
46. Kaas, Q., F. Ehrenmann, and M.P. Lefranc, *IG, TR and IgSF, MHC and MhcSF: what do we learn from the IMGT Colliers de Perles?* *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2007. **6**(4): p. 253-264.
47. Davis, M.M. and P.J. Bjorkman, *T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition*. *Nature*, 1988. **334**(6181): p. 395-402.
48. Chothia, C., D.R. Boswell, and A.M. Lesk, *The outline structure of the T-cell alpha beta receptor*. *Embo j*, 1988. **7**(12): p. 3745-3755.

Literaturverzeichnis

49. Clambey, E.T., et al., *Molecules in medicine mini review: the alphabeta T cell receptor*. J Mol Med (Berl), 2014. **92**(7): p. 735-741.
50. Miles, J.J., et al., *Genetic and structural basis for selection of a ubiquitous T cell receptor deployed in Epstein-Barr virus infection*. PLoS Pathog, 2010. **6**(11): p. 1001-1049.
51. Cabaniols, J.P., et al., *Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase*. J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1385-1390.
52. LaRocque, R. and M.A. Robinson, *Diversity in the human T cell receptor beta chain*. Hum Immunol, 1996. **48**(1-2): p. 3-11.
53. Gorski, J., et al., *Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status*. J Immunol, 1994. **152**(10): p. 5109-5119.
54. Cochet, M., et al., *Molecular detection and in vivo analysis of the specific T cell response to a protein antigen*. Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2639-2647.
55. Naumov, Y.N., E.N. Naumova, and J. Gorski, *CD4+ and CD8+ circulating alpha/beta T-cell repertoires are equally complex and are characterized by different levels of steady-state TCR expression*. Hum Immunol, 1996. **48**(1-2): p. 52-62.
56. Maślanka, K., et al., *Molecular analysis of T cell repertoires. Spectratypes generated by multiplex polymerase chain reaction and evaluated by radioactivity or fluorescence*. Hum Immunol, 1995. **44**(1): p. 28-34.
57. Schilbach-Stückle, K., *Die Physiologie des angeborenen und erworbenen Immunsystems als konzeptionelles Prinzip in der Entwicklung adjuvanter Therapien zur Behandlung maligner, transplantationsbedingter und autoimmuner Erkrankungen*. 2008.
58. Hill, G.R., et al., *Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines*. Blood, 1997. **90**(8): p. 3204-3213.
59. Chakraverty, R., et al., *An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(8): p. 2021-2031.
60. Mason, D., *A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor*. Immunol Today, 1998. **19**(9): p. 395-404.
61. Ignatowicz, L., J. Kappler, and P. Marrack, *The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand*. Cell, 1996. **84**(4): p. 521-529.
62. Sewell, A.K., *Why must T cells be cross-reactive?* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(9): p. 669-677.
63. Chen, B.J., et al., *Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse*. Blood, 2007. **109**(7): p. 3115-3123.
64. Aosai, F., et al., *Different types of allospecific CTL clones identified by their ability to recognize peptide loading-defective target cells*. European journal of immunology, 1991. **21**(11): p. 2767-2774.
65. Man, S., R.D. Salter, and V.H. Engelhard, *Role of endogenous peptide in human alloreactive cytotoxic T cell responses*. International immunology, 1992. **4**(3): p. 367-375.

Literaturverzeichnis

66. Crumpacker, D.B., et al., *Role of endogenous peptides in murine allogenic cytotoxic T cell responses assessed using transfectants of the antigen-processing mutant 174xCEM.T2*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 1992. **148**(10): p. 3004-3011.
67. Santos, N., et al., *UGT2B17 minor histocompatibility mismatch and clinical outcome after HLA-identical sibling donor stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(1): p. 79-82.
68. Wallny, H.J. and H.G. Rammensee, *Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide*. Nature, 1990. **343**(6255): p. 275-278.
69. de Bueger, M., et al., *Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 1992. **149**(5): p. 1788-1794.
70. Schilbach, K., et al., *Organ-specific T cell receptor repertoire in target organs of murine graft-versus-host after transplantation across minor histocompatibility antigen barriers*. Transplantation, 2004. **78**(1): p. 31-40.
71. den Haan, J.M., et al., *Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen*. Science (New York, N.Y.), 1995. **268**(5216): p. 1476-1480.
72. Brickner, A.G., et al., *The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing*. The Journal of experimental medicine, 2001. **193**(2): p. 195-206.
73. Mutis, T., et al., *Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease*. Nature medicine, 1999. **5**(7): p. 839-842.
74. Feldhahn, M., et al., *miHA-Match: computational detection of tissue-specific minor histocompatibility antigens*. J Immunol Methods, 2012. **386**(1-2): p. 94-100.
75. Schilbach, K., et al., *Cytotoxic minor histocompatibility antigen HA-1-specific CD8+ effector memory T cells: artificial APCs pave the way for clinical application by potent primary in vitro induction*. Blood, 2005. **106**(1): p. 144-149.
76. Korngold, R., et al., *Inter-strain graft-vs.-host disease T-cell responses to immunodominant minor histocompatibility antigens*. Biol Blood Marrow Transplant, 1997. **3**(2): p. 57-64.
77. Blazar, B.R., et al., *Lack of GVHD across classical, single minor histocompatibility (miH) locus barriers in mice*. Transplantation, 1996. **61**(4): p. 619-624.
78. Goulmy, E., et al., *Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 281-285.

Literaturverzeichnis

79. Maruya, E., et al., *Evidence that CD31, CD49b, and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants*. Blood, 1998. **92**(6): p. 2169-2176.
80. Tseng, L.H., et al., *Correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation*. Blood, 1999. **94**(8): p. 2911-2914.
81. Randolph, S.S., et al., *Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants*. Blood, 2004. **103**(1): p. 347-352.
82. Lazarus, R., et al., *Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease*. Immunol Rev, 2002. **190**: p. 9-25.
83. Holler, E., et al., *Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination*. Blood, 2006. **107**(10): p. 4189-4193.
84. Teshima, T., et al., *Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium*. Nat Med, 2002. **8**(6): p. 575-581.
85. Matte-Martone, C., et al., *CD8+ but not CD4+ T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across only minor H antigens, whereas both CD4+ and CD8+ T cells require direct leukemic contact to mediate GVL*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3884-3892.
86. Marks, L., et al., *Donor T cells lacking Fas ligand and perforin retain the capacity to induce severe GvHD in minor histocompatibility antigen mismatched bone-marrow transplantation recipients*. Transplantation, 2004. **77**(6): p. 804-812.
87. Hill, G.R., et al., *The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 656-663.
88. Anderson, B.E., et al., *Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2227-2234.
89. Anderson, B.E., et al., *Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease*. J Clin Invest, 2003. **112**(1): p. 101-108.
90. Chen, B.J., et al., *Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1534-1541.
91. Min, B., et al., *Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(11): p. 3874-3879.
92. Arstila, T.P., et al., *A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity*. Science, 1999. **286**(5441): p. 958-961.
93. Beilhack, A., et al., *In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1113-1122.

Literaturverzeichnis

94. Anderson, B.E., W.D. Shlomchik, and M.J. Shlomchik, *The Influence of Migration, Alloreactive Repertoire and Memory Subset on the Differential Ability of Naive and Memory T Cells To Induce GVHD*. *Blood*, 2005. **106**(11): p. 577-577.
95. Storb, R., J.H. Antin, and C. Cutler, *Should methotrexate plus calcineurin inhibitors be considered standard of care for prophylaxis of acute graft-versus-host disease?* *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010. **16**(1 Suppl): p. 118-127.
96. Ram, R., et al., *Prophylaxis regimens for GVHD: systematic review and meta-analysis*. *Bone Marrow Transplant*, 2009. **43**(8): p. 643-653.
97. Yu, C., et al., *Synergism between mycophenolate mofetil and cyclosporine in preventing graft-versus-host disease among lethally irradiated dogs given DLA-nonidentical unrelated marrow grafts*. *Blood*, 1998. **91**(7): p. 2581-2587.
98. Luznik, L., et al., *HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008. **14**(6): p. 641-650.
99. *Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(22): p. 5074-5087.
100. Servais, S., et al., *Impact of Pre-Transplant Anti-T Cell Globulin (ATG) on Immune Recovery after Myeloablative Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0130026.
101. Antoine, C., et al., *Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99*. *Lancet*, 2003. **361**(9357): p. 553-560.
102. Klingebiel, T., et al., *Results and factors influencing outcome after fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with very high-risk acute lymphoblastic leukemia: impact of center size: an analysis on behalf of the Acute Leukemia and Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant group*. *Blood*, 2010. **115**(17): p. 3437-3446.
103. Soiffer, R.J., et al., *Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies*. *Blood*, 2011. **117**(25): p. 6963-6970.
104. Bethge, W.A., et al., *Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update*. *Blood Cells Mol Dis*, 2008. **40**(1): p. 13-19.
105. Willems, E., et al., *Non-myeloablative transplantation with CD8-depleted or unmanipulated peripheral blood stem cells: a phase II randomized trial*. *Leukemia*, 2009. **23**(3): p. 608-610.
106. Ho, V.T., et al., *Partial CD8+ T-cell depletion of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation is insufficient to prevent graft-versus-host disease*. *Bone Marrow Transplant*, 2004. **34**(11): p. 987-994.

107. Airoidi, I., et al., *$\gamma\delta$ T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR- $\alpha\beta$ +/ $CD19$ + lymphocytes.* Blood, 2015. **125**(15): p. 2349-2358.
108. Bertaina, A., et al., *HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta$ + T and B cells in children with nonmalignant disorders.* Blood, 2014. **124**(5): p. 822-826.
109. Bacigalupo, A., et al., *Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO).* Blood, 2001. **98**(10): p. 2942-2947.
110. Chakraverty, R., et al., *Impact of in vivo alemtuzumab dose before reduced intensity conditioning and HLA-identical sibling stem cell transplantation: pharmacokinetics, GVHD, and immune reconstitution.* Blood, 2010. **116**(16): p. 3080-3088.
111. Bleakley, M., et al., *Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts.* J Clin Invest, 2015. **125**(7): p. 2677-2689.
112. Müller, N., et al., *Generation of alloreactivity-reduced donor lymphocyte products retaining memory function by fully automatic depletion of CD45RA-positive cells.* Cytotherapy, 2018. **20**(4): p. 532-542.
113. Teschner, D., et al., *Depletion of naive T cells using clinical grade magnetic CD45RA beads: a new approach for GVHD prophylaxis.* Bone Marrow Transplant, 2014. **49**(1): p. 138-144.
114. Touzot, F., et al., *CD45RA depletion in HLA-mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for primary combined immunodeficiency: A preliminary study.* J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(5): p. 1303-1309
115. Distler, E., et al., *Alloreactive and leukemia-reactive T cells are preferentially derived from naive precursors in healthy donors: implications for immunotherapy with memory T cells.* Haematologica, 2011. **96**(7): p. 1024-1032.
116. Triplett, B.M., et al., *Rapid memory T-cell reconstitution recapitulating CD45RA-depleted haploidentical transplant graft content in patients with hematologic malignancies.* Bone Marrow Transplant, 2015. **50**(7): p. 968-977.
117. Cherel, M., et al., *Naive subset develops the most important alloreactive response among human CD4+ T lymphocytes in human leukocyte antigen-identical related setting.* Eur J Haematol, 2014. **92**(6): p. 491-496.
118. Li, X.L., et al., *Promises and obstacles for the blockade of CD40-CD40L interactions in allotransplantation.* Transplantation, 2008. **86**(1): p. 10-15.
119. Sato, M., et al., *Inducible costimulator (ICOS) up-regulation on activated T cells in chronic graft-versus-host disease after dog leukocyte antigen-nonidentical hematopoietic cell transplantation: a potential therapeutic target.* Transplantation, 2013. **96**(1): p. 34-41.
120. Taylor, P.A., et al., *Targeting of inducible costimulator (ICOS) expressed on alloreactive T cells down-regulates graft-versus-host disease (GVHD) and*

- facilitates engraftment of allogeneic bone marrow (BM)*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3372-3380.
121. Hatano, R., et al., *CD26-mediated co-stimulation in human CD8(+) T cells provokes effector function via pro-inflammatory cytokine production*. Immunology, 2013. **138**(2): p. 165-172.
 122. Litjens, N.H., et al., *Activation-induced CD137 is a fast assay for identification and multi-parameter flow cytometric analysis of alloreactive T cells*. Clin Exp Immunol, 2013. **174**(1): p. 179-191.
 123. Cho, H. and Y.H. Chung, *Construction, and in vitro and in vivo analyses of tetravalent immunoadhesins*. J Microbiol Biotechnol, 2012. **22**(8): p. 1066-1076.
 124. Hansen, J.A., et al., *A novel soluble form of Tim-3 associated with severe graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(9): p. 1323-1330.
 125. Picarda, E., K.C. Ohaegbulam, and X. Zang, *Molecular Pathways: Targeting B7-H3 (CD276) for Human Cancer Immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(14): p. 3425-3431.
 126. Seaman, S., et al., *Eradication of Tumors through Simultaneous Ablation of CD276/B7-H3-Positive Tumor Cells and Tumor Vasculature*. Cancer Cell, 2017. **31**(4): p. 501-515.e8.
 127. Castellanos, J.R., et al., *B7-H3 role in the immune landscape of cancer*. Am J Clin Exp Immunol, 2017. **6**(4): p. 66-75.
 128. Veenstra, R.G., et al., *B7-H3 expression in donor T cells and host cells negatively regulates acute graft-versus-host disease lethality*. Blood, 2015. **125**(21): p. 3335-3346.
 129. Gooley, T.A., et al., *Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation*. N Engl J Med, 2010. **363**(22): p. 2091-2101.
 130. Taskinen, M., S. Ryhänen, and K. Vettenranta, *Graft-versus-host disease in stem cell transplantation*. Duodecim, 2017. **133**(3): p. 251-258.
 131. Hamilton, B.K., *Current approaches to prevent and treat GVHD after allogeneic stem cell transplantation*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2018. **2018**(1): p. 228-235.
 132. Moreno, D.F. and J. Cid, *Graft-versus-host disease*. Med Clin (Barc), 2019. **152**(1): p. 22-28.
 133. Riesner, K., et al., *A preclinical acute GVHD mouse model based on chemotherapy conditioning and MHC-matched transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(3): p. 410-417.
 134. van Hamburg, J.P., et al., *Enforced expression of GATA3 allows differentiation of IL-17-producing cells, but constrains Th17-mediated pathology*. Eur J Immunol, 2008. **38**(9): p. 2573-2586.
 135. Chen, Z., et al., *Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8137-8142.
 136. Hill, G.R., et al., *SOCS3 regulates graft-versus-host disease*. Blood, 2010. **116**(2): p. 287-296.
 137. D'Orsogna, L.J., et al., *TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition*. Immunogenetics, 2012. **64**(2): p. 77-85.

Literaturverzeichnis

138. Candéias, S., et al., *The V beta 17+ T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4+ versus CD8+ cells.* J Exp Med, 1991. **174**(5): p. 989-1000.
139. Dai, S., et al., *Crossreactive T Cells spotlight the germline rules for alphabeta T cell-receptor interactions with MHC molecules.* Immunity, 2008. **28**(3): p. 324-334.
140. Malard, F., et al., *Translational opportunities for targeting the Th17 axis in acute graft-vs.-host disease.* Mucosal Immunol, 2016. **9**(2): p. 299-308.
141. Joshi, S.K., P.R. Suresh, and V.S. Chauhan, *Flexibility in MHC and TCR recognition: degenerate specificity at the T cell level in the recognition of promiscuous Th epitopes exhibiting no primary sequence homology.* J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6693-6703.
142. Son, Y., S.M. Kwon, and J.Y. Cho, *CD276 (B7-H3) Maintains Proliferation and Regulates Differentiation in Angiogenic Function in Late Endothelial Progenitor Cells.* Stem Cells, 2019. **37**(3): p. 382-394.
143. Wang, Z., et al., *Genetic and clinical characterization of B7-H3 (CD276) expression and epigenetic regulation in diffuse brain glioma.* Cancer Sci, 2018. **109**(9): p. 2697-2705.
144. Li, G., et al., *B7-H3 in tumors: friend or foe for tumor immunity?* Cancer Chemother Pharmacol, 2018. **81**(2): p. 245-253.
145. Takashima, Y., et al., *CD276 and the gene signature composed of GATA3 and LGALS3 enable prognosis prediction of glioblastoma multiforme.* PLoS One, 2019. **14**(5): p. e0216825.
146. Deng, J., et al., *Expression and Clinical Significance of Immune Checkpoint Regulator B7-H3 (CD276) in Human Meningioma.* World Neurosurg, 2020. **135**: p. e12-e18.
147. Dierselhuis, M. and E. Goulmy, *The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation.* Curr Opin Organ Transplant, 2009. **14**(4): p. 419-425.
148. Davis, M.M. and Y. Chien, *Issues concerning the nature of antigen recognition by alpha beta and gamma delta T-cell receptors.* Immunol Today, 1995. **16**(7): p. 316-318.
149. Hogquist, K.A., et al., *Pillars article: T cell receptor antagonist peptides induce positive selection.* Cell. 1994. 76: 17-27. J Immunol, 2012. **188**(5): p. 2046-2056.
150. Sebzda, E., et al., *Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide.* Science, 1994. **263**(5153): p. 1615-1618.
151. Sprent, J., et al., *T cell selection in the thymus.* Immunol Rev, 1988. **101**: p. 173-190.
152. Bluthmann, H., et al., *T-cell-specific deletion of T-cell receptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta-genes.* Nature, 1988. **334**(6178): p. 156-159.
153. Kappler, J.W., N. Roehm, and P. Marrack, *T cell tolerance by clonal elimination in the thymus.* Cell, 1987. **49**(2): p. 273-280.
154. Fung-Leung, W.P., et al., *Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice.* Science, 1996. **271**(5253): p. 1278-1281.

Literaturverzeichnis

155. Martin, W.D., et al., *H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection*. Cell, 1996. **84**(4): p. 543-550.
156. Huseby, E.S., et al., *How the T cell repertoire becomes peptide and MHC specific*. Cell, 2005. **122**(2): p. 247-260.
157. Venturi, V., et al., *The molecular basis for public T-cell responses?* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 231-238.
158. Moss, P.A., et al., *Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 8987-8990.
159. Argaet, V.P., et al., *Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus*. J Exp Med, 1994. **180**(6): p. 2335-2340.
160. Cibotti, R., et al., *Public and private V beta T cell receptor repertoires against hen egg white lysozyme (HEL) in nontransgenic versus HEL transgenic mice*. J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 861-872.
161. Sing, G.K., et al., *A molecular comparison of T lymphocyte populations infiltrating the liver and circulating in the blood of patients with chronic hepatitis B: evidence for antigen-driven selection of a public complementarity-determining region 3 (CDR3) motif*. Hepatology, 2001. **33**(5): p. 1288-1298.
162. Umemura, T., et al., *Analysis of T cell repertoire in the liver of patients with chronic hepatitis C*. Clin Exp Immunol, 2000. **121**(1): p. 120-126.
163. Gillespie, G.M., et al., *Strong TCR conservation and altered T cell cross-reactivity characterize a B*57-restricted immune response in HIV-1 infection*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3893-3902.
164. Yu, X.G., et al., *Mutually exclusive T-cell receptor induction and differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 mutational escape associated with a two-amino-acid difference between HLA class I subtypes*. J Virol, 2007. **81**(4): p. 1619-1631.
165. Venturi, V., et al., *TCR beta-chain sharing in human CD8+ T cell responses to cytomegalovirus and EBV*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7853-7862.
166. Khan, N., et al., *Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype*. J Infect Dis, 2002. **185**(8): p. 1025-1034.
167. Wynn, K.K., et al., *Impact of clonal competition for peptide-MHC complexes on the CD8+ T-cell repertoire selection in a persistent viral infection*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4283-4292.
168. Cole, D.K., et al., *Modification of MHC anchor residues generates heteroclitic peptides that alter TCR binding and T cell recognition*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2600-2610.
169. Le Gal, F.A., et al., *Distinct structural TCR repertoires in naturally occurring versus vaccine-induced CD8+ T-cell responses to the tumor-specific antigen NY-ESO-1*. J Immunother, 2005. **28**(3): p. 252-257.

Literaturverzeichnis

170. Wucherpfennig, K.W., et al., *Shared human T cell receptor V beta usage to immunodominant regions of myelin basic protein*. Science, 1990. **248**(4958): p. 1016-1019.
171. Oksenberg, J.R., et al., *Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis*. Nature, 1993. **362**(6415): p. 68-70.
172. Hong, J., et al., *A common TCR V-D-J sequence in V beta 13.1 T cells recognizing an immunodominant peptide of myelin basic protein in multiple sclerosis*. J Immunol, 1999. **163**(6): p. 3530-3538.
173. Hirokawa, M., et al., *Distinct TCRAV and TCRBV repertoire and CDR3 sequence of T lymphocytes clonally expanded in blood and GVHD lesions after human allogeneic bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2002. **30**(12): p. 915-923.
174. O'Keefe C, L., et al., *Molecular TCR diagnostics can be used to identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Exp Hematol, 2004. **32**(10): p. 1010-10122.
175. Turner, S.J., et al., *Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 883-894.
176. Flomenberg, N., et al., *HLA class I specific T lymphocyte clones with dual alloreactive functions*. Immunogenetics, 1984. **19**(1): p. 39-51.
177. Moore, R.L. and B.S. Fox, *CD4+ class I-restricted T cells specific for HIV gp160 315-329*. Cell Immunol, 1994. **154**(1): p. 43-53.
178. Yang, Y. and J.M. Wilson, *Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo*. J Immunol, 1995. **155**(5): p. 2564-2570.
179. Boyle, L.H., J.C. Goodall, and J.S. Gaston, *Major histocompatibility complex class I-restricted alloreactive CD4+ T cells*. Immunology, 2004. **112**(1): p. 54-63.
180. Dander, E., et al., *Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation*. Transplantation, 2009. **88**(11): p. 1261-1272.
181. Broady, R., et al., *Cutaneous GVHD is associated with the expansion of tissue-localized Th1 and not Th17 cells*. Blood, 2010. **116**(25): p. 5748-5751.
182. Ratajczak, P., et al., *Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease*. Blood, 2010. **116**(7): p. 1165-1171.
183. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-1132.
184. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-1141.
185. Ivanov, II, et al., *The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-1133.
186. Fulton, L.M., et al., *Attenuation of acute graft-versus-host disease in the absence of the transcription factor RORgammat*. J Immunol, 2012. **189**(4): p. 1765-1772.

Literaturverzeichnis

187. Pereira, L.M.S., et al., *Regulatory T Cell and Forkhead Box Protein 3 as Modulators of Immune Homeostasis*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 605.
188. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-238.
189. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 531-564.
190. Cohen, J.L., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 401-406.
191. Kallies, A. and K.L. Good-Jacobson, *Transcription Factor T-bet Orchestrates Lineage Development and Function in the Immune System*. Trends Immunol, 2017. **38**(4): p. 287-297.
192. Dejean, A.S., E. Joulia, and T. Walzer, *The role of Eomes in human CD4 T cell differentiation: A question of context*. Eur J Immunol, 2019. **49**(1): p. 38-41.
193. Li, J., et al., *High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Anti-tumor CD8(+) T Cells*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2981.
194. Mazzoni, A., et al., *Eomes controls the development of Th17-derived (non-classic) Th1 cells during chronic inflammation*. Eur J Immunol, 2019. **49**(1): p. 79-95.
195. Gruarin, P., et al., *Eomesodermin controls a unique differentiation program in human IL-10 and IFN- γ coproducing regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2019. **49**(1): p. 96-111.
196. Boross, P. and J.H. Leusen, *Mechanisms of action of CD20 antibodies*. Am J Cancer Res, 2012. **2**(6): p. 676-690.
197. Rogers, L.M., S. Veeramani, and G.J. Weiner, *Complement in monoclonal antibody therapy of cancer*. Immunol Res, 2014. **59**(1-3): p. 203-210.
198. Covassin, L., et al., *Human peripheral blood CD4 T cell-engrafted non-obese diabetic-scid IL2rgamma(null) H2-Ab1 (tm1Gru) Tg (human leucocyte antigen D-related 4) mice: a mouse model of human allogeneic graft-versus-host disease*. Clin Exp Immunol, 2011. **166**(2): p. 269-280.
199. Bohana-Kashtan, O., et al., *Selective reduction of graft-versus-host disease-mediating human T cells by ex vivo treatment with soluble Fas ligand*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 696-705.
200. Golovina, T.N., et al., *CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2855-2868.
201. Wilson, J., et al., *Antibody to the dendritic cell surface activation antigen CD83 prevents acute graft-versus-host disease*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 387-398.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
aGvHD	Akute Graft-versus-Host Disease
AK	Antikörper
allo-HSCT	Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
APCs	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
CCR7	Chemokine Receptor Type 7
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Komplement abhängige Zytotoxizität
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR-Region	Complementary determining Region
CMV	Cytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
CTP	Cytidintriphosphat
DC	Dendritische Zelle
depl.	depletiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EOMES	Eomesodermin

Abkürzungsverzeichnis

FACS	Fluorescence activated Cell Sorting
Fc	Fragment crystallisable
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA3	GATA Binding Protein 3
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GTP	Guanosintriphosphat
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GVL	Graft-versus-Leukämie Effekt
HE	Hämatoxilin-Eosin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
ICOS	Inducible Co-Stimulator
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LAG-3	Lymphocyte-Activation Gene 3
mAb	Monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic activated Cell Sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
miHA	Minor-Antigen
min	Minuten
MLC	Mixed Lymphocyte Cultures

Abkürzungsverzeichnis

MMF	Mycophenolat-Mofetil
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MTX	Methotrexat
NK	Natürliche Killerzelle
NSG	NOD Scid Gamma Mouse
PBMC	Peripher Blood Mononuclear Cell
PBSC	Peripher Blood Stem Cell
RNA	Ribonukleinsäure
RORC	RAR-related Orphan Receptor
SCT	Stem Cell Transplantation
sek	Sekunden
SNP	Small nuklear Particle
SOCS3	Supressor of Cytokine Signaling 3
STAT-1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
T-bet	T-Box Transcription Factor
TCR	T-Zellrezeptor
TH-Zelle	T-Helferzelle
TIM-3	T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain-containing Protein 3
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	Tumor-Nekrose-Faktor related Apoptosis-inducing Ligand
TRAJ	J-Region der α -Kette eines T-Zellrezeptors
TRAV	V-Region der α -Kette eines T-Zellrezeptors
Treg	Regulatorische T-Zelle
TTP	Thymidintriphosphat

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Universitätsklinikum für Kinder- und Jugendmedizin unter Betreuung von Karin Schilbach und Hisayoshi Hashimoto durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Karin Schilbach in Zusammenarbeit mit Hisayoshi Hashimoto.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Karin Schilbach und Hisayoshi Hashimoto von mir eigenständig durchgeführt. Die Versorgung der Mäuse, die Präparation sowie Explantation der Organe erfolgten durch Karin Schilbach und Hisayoshi Hashimoto. Die Durchführung der Histopathologie erfolgte in Kooperation mit dem pathologischen Institut der Universität Tübingen.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Hisayoshi Hashimoto.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Veröffentlichungen

Aus der Promotion ging folgende Originalarbeit als Veröffentlichung hervor:

Removal of CD276⁺ cells from haploidentical memory T-cell grafts significantly lowers the risk of GvHD

Hisayoshi Hashimoto, Patrick Kasteleiner, Jakob Kressin, Friederike Müller, Hans-Jörg Bühring, Rupert Handgretinger, Karin Schilbach

Received: 8 October 2020 / Revised: 27 March 2021 / Accepted: 12 April 2021

Bone Marrow Transplantation <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01307-9>

Die Arbeit wurde präsentiert im 01/2020 als Poster auf dem Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät Tübingen und mit dem **Posterpreis 2020 der medizinischen Fakultät Tübingen** ausgezeichnet.

9 Danksagung

Sehr gerne möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben. Ich danke Herrn Prof. Handgretinger für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Kinderklinik in seiner Abteilung anzufertigen.

Besonders herzlich danken möchte ich Frau Prof. Karin Schilbach für die Bereitstellung des Themas und die fachliche und menschliche Kompetenz, mit der sie mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützte. Ihre Vorschläge zur Bewältigung unterschiedlichster Herausforderungen, ihre hervorragende Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft und ihr Wissen haben diese Zeit im Labor spannend und motivierend gemacht. Ich gleichem Maße danke ich Dr. Hisayoshi Hashimoto, der mir mit seiner stets geduldigen und liebenswürdigen Art bei jedem Problem zur Seite stand und mich mit seiner großen fachlichen Kompetenz unterstützte.

Ein großer Dank gilt auch dem IZKF-Promotionskolleg, das mich während der Promotion mit einem Stipendium finanziell unterstützte.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich bei allen meinen Vorhaben in unglaublicher Art und Weise unterstützen.

