



**Induktion von GvHD-artigen Gewebeschäden  
an humanen artifizialen Hautmodellen**

**Induction of GvHD-like tissue damage  
in human artificial skin models**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences, Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Infektion und Immunität

vorgelegt von

Julia Wallstabe

aus Blankenburg (Harz)

Würzburg 2017

**Eingereicht am:**

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzender:** Prof. Dr. med. Manfred Gessler

**1. Betreuer:** Prof. Dr. med. Stephan Mielke

**2. Betreuer:** Prof. Dr. rer. biol. hum. Heike Walles

**3. Betreuer:** Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

**Tag des Promotionskolloquiums:**

**Doktorurkunde ausgehändigt am:**

# Inhalt

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Summary .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 <i>Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation</i> .....	5
1.2 <i>Graft-versus-Host Disease (GvHD)</i> .....	6
1.2.1 Entstehung der GvHD .....	6
1.2.2 Zielorgane der GvHD .....	9
1.2.3 Behandlung der GvHD.....	12
1.3 <i>Testsysteme für GvHD</i> .....	15
1.3.1 Tiermodelle .....	15
1.3.2 <i>In-vitro</i> -Testsysteme.....	17
1.3.3 Skin-Explant Assay .....	19
1.4 <i>Tissue Engineering</i> .....	21
1.5 <i>Zielsetzung</i> .....	24
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1 <i>Material</i> .....	25
2.1.1 Biologisches Material .....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	25
2.1.3 Lösungen, Puffer, Medien .....	26
2.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Kits.....	28
2.1.5 Antikörper.....	28
2.2 <i>Methoden</i> .....	30
2.2.1 Zellkulturführung .....	30
2.2.2 Isolation primärer humaner Zellen .....	30
2.2.3 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen primärer humaner Zellen .....	32
2.2.4 IFN- $\gamma$ -Stimulation primärer humaner Zellen.....	34
2.2.5 CFSE-Markierung von PBMCs.....	34
2.2.6 Vorstimulation von PBMCs .....	34
2.2.7 MLR .....	35
2.2.7.1 Versuchsvorbereitung .....	35
2.2.7.2 Proliferationsassay (CFSE-Verdünnung) .....	36
2.2.7.3 Proliferationsassay ( $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporation).....	36
2.2.8 Herstellung humaner artifizierter Hautmodelle .....	37
2.2.8.1 Hautmodelle auf Basis einer Kollagen-Matrix.....	37
2.2.8.2 Vaskularisierte Hautmodelle auf Basis der BioVaSc-Matrix .....	39
2.2.9 Induktion von Gewebeschäden in humanen artifizierten Hautmodellen .....	42
2.2.9.1 Gewebeschäden in Kollagen-Hautmodellen.....	42
2.2.9.2 Gewebeschäden in vaskularisierten Hautmodellen .....	43
2.2.10 Histologische Analysen.....	44
2.2.11 Zytokinmessung .....	45
2.2.12 Durchflusszytometrie.....	45
2.2.13 Statistische Analysen .....	46

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1	<i>Immunmodulatorische Eigenschaften von primären humanen Hautzellen.....</i>	47
3.1.1	Oberflächenexpression immunmodulatorischer Moleküle auf primären humanen Hautzellen.....	47
3.1.2	Einfluss von primären humanen Hautzellen auf die Proliferation von allogenen PBMCs	49
3.2	<i>Inflammatorische Gewebeschäden in humanen artifiziellen Hautmodellen.....</i>	54
3.2.1	Inflammatorische Gewebeschäden durch vorstimulierte PBMCs in Kollagen- Hautmodellen .....	54
3.2.2	Inflammatorische Gewebeschäden durch vorstimulierte PBMCs in vaskularisierten Hautmodellen .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>iii</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>iv</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>V</b>
	<b>Beiträge zur vorgelegten Arbeit .....</b>	<b>vi</b>
	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>vii</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>viii</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>ix</b>

## Zusammenfassung

Graft-versus-Host Disease (GvHD) stellt einen häufigen, den Gesamterfolg einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation limitierenden Faktor dar. Bei dieser Komplikation attackieren vor allem alloreaktive T-Lymphozyten des Stammzellspenders gesunde Körperzellen des Patienten. Infolgedessen kommt es zu Gewebeschäden in den Zielorganen Haut, Leber und Darm. Die Behandlung der GvHD erfordert eine effektive Immunsuppression, was wiederum Graft-versus-Tumor-Effekte kompromittiert und den Rückfall der malignen Grunderkrankung bedingen kann. Viele Patienten sprechen aus bisher ungeklärten Gründen nicht auf die klassische immunsuppressive Therapie mit Steroiden oder second-line Therapien an. Neue zelluläre Therapien zur Behandlung der refraktären GvHD sind auf dem Vormarsch, bedürfen aber einer weiterführenden klinischen Testung, auch um die exakten Wirkungsmechanismen zu verstehen. Idealerweise könnten neue Testsysteme das GvHD-Potential von allogenen Stammzellpräparaten oder aber das immunsuppressive Potential von neuen GvHD-Therapien vorhersagen, bevor diese in klinischen Studien eingesetzt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein erstes, in multiplen Replikaten einsetzbares, humanes organotypisches Gewebemodell zur Simulation einer GvHD-Reaktion am Beispiel der Haut zu etablieren.

Zu diesem Zweck wurden artifizielle humane Hautmodelle unter statischen (Kollagen-Hautmodelle) und dynamischen Kulturbedingungen (vaskularisierte Hautmodelle) generiert. Die Injektion unstimulierter PBMCs (*engl.* peripheral blood mononuclear cells) führte zu keinen histomorphologischen Veränderungen in den Kollagen-Hautmodellen. Im Gegensatz dazu hatte die Injektion vorstimulierter allogener PBMCs eine Zerstörung der epidermalen Strukturen der Kollagen-Hautmodelle zur Folge, welche vergleichbar waren mit Gewebeschäden bei einer akuten GvHD der Haut. Dieselben Schädigungen der Epidermis wurden durch die Injektion von Mediumüberständen vorstimulierter PBMCs in die Kollagen-Hautmodelle erreicht. Im Kulturmedium der Kollagen-Hautmodelle wurden hohe Konzentrationen von Interleukin 2 und 17, Interferon gamma sowie Tumornekrosefaktor alpha gemessen, wodurch auf die Beteiligung von Zytokinen an der inflammatorischen Reaktion geschlossen werden konnte. Auch im komplexeren vaskularisierten Hautmodell

verursachte die Injektion vorstimulierter PBMCs histomorphologische Veränderungen entsprechend einer akuten Haut-GvHD sowie einen zeitabhängigen Anstieg proinflammatorischer Zytokine.

Zusammenfassend zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass die Induktion einer starken Inflammations- und Immunreaktion in artifiziellen humanen Hautmodellen, welche histomorphologisch eine GvHD imitiert, möglich ist. Dieses Modell könnte als Grundlage für die Entwicklung eines klinisch relevanten Testsystems zur Bestimmung des GvHD-Restpotentials oder zur Festlegung der immunsuppressiven Kapazität innovativer Zellpräparate dienen. Somit könnten humane artifizielle GvHD-Modelle in klinischen Studien eingesetzt werden und die Erfahrungen aus Tiermodellen ergänzen sowie erste *in vitro* Ergebnisse im humanen System liefern, welche dann mit dem tatsächlichen klinischen Resultat verglichen werden könnten.

## Summary

Graft-versus-Host Disease (GvHD) remains the most important limiting factor for the success of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. This major complication is caused by alloreactive donor T-lymphocytes that attack healthy tissues of the recipient leading to severe tissue damage within the target organs skin, liver and gut. Treatment of GvHD requires effective immunosuppression, which in turn impairs Graft-versus-Tumor activity and enhances the risk for relapse of the malignant disease. However, for still unknown reasons many patients do not respond to standard immunosuppressive therapy with steroids or to second-line therapies. Development of novel cellular therapies that gain more and more clinical relevance due to their high anti-tumor potency lead to a strong demand for advanced test platforms to further investigate their underlying functional mechanisms and exclude off-tumor effects against healthy tissues. Ideally, new test systems could be used for the prediction of the GvHD potential of allogeneic stem cell products or for prediction of an immunosuppressive potential of novel GvHD therapies before entering clinical studies. The aim of this study was to establish a GvHD test system based on human organotypic skin models allowing the simulation of GvHD reactions in the skin in multiple replicates.

To this end, artificial human skin models were generated under static (collagen skin model) and dynamic culture conditions (vascularized skin model). Injection of unstimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) did not cause histomorphological changes in collagen skin models. In contrast, injection of prestimulated PBMCs resulted in disruption of the epidermis of collagen skin models mimicking acute skin GvHD. The same disruption of the epidermal layer was observed using cell culture supernatants of prestimulated PBMCs, suggesting the involvement of proinflammatory cytokines. Indeed, measurement of cytokine levels in culture supernatants revealed an increase of interleukin 2 and 17, interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. In addition, injection of prestimulated PBMCs into more complex vascularized skin models also caused disruption of the epidermal layer and an increase of proinflammatory cytokine levels in a time dependent manner.

Taken together, these findings demonstrate that it is possible to induce a strong immune reaction and inflammatory tissue damage in artificial human skin models mimicking histomorphological patterns of acute skin GvHD. Therefore, this model could contribute to the development of a clinically relevant GvHD test platform for prediction of the GvHD potential or immunosuppressive capacity of innovative cell products. Thus, artificial human GvHD models may be employed in clinical studies in order to gain first *in vitro* results in a human system and to extend information from animal models, which can then be compared to the actual clinical outcome.



# 1 Einleitung

## 1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation bleibt für viele Patienten, welche an Leukämien und Lymphomen erkrankt sind, oftmals die einzige Möglichkeit auf langfristige Erkrankungskontrolle und Heilung (Copelan, 2006). Für die Behandlung dieser Erkrankungen müssen die malignen Zellen des Patienten zunächst durch verschiedene Konditionierungs-Verfahren mit einer Kombination aus Chemotherapie, Bestrahlung und Immuntherapie zerstört werden. Dabei erfolgt auch die Depletion der immunkompetenten Zellen (Deeg *et al.*, 1982). Durch den Ersatz der patienteneigenen Stammzellen durch hämatopoetische Stammzellen eines Spenders kann sich ein allogenes Immunsystem im Empfänger ausbilden. Zu diesem Zweck werden die Stammzellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut eines gesunden Spenders isoliert (Appelbaum, 2001; Holtick *et al.*, 2014). Da das allogene Stammzelltransplantat zusätzlich auch immunkompetente Zellen des Spenders wie alloreaktive T-Lymphozyten enthält, ist ein möglichst genauer Abgleich der Gewebemerkmale zwischen Spender und Patient nötig. Die Gewebemerkmale jedes Menschen werden über hochpolymorphe Gengruppen festgelegt, den Hauptgewebeverträglichkeitskomplexen Typ I und II (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) oder beim Menschen auch humane Leukozyten-Antigene (HLA, Typ A/B/C und DR/DQ/DP) genannt. Je geringer die Abweichungen der MHC-Merkmale zwischen Patient und Spender ausfallen, desto kleiner ist das Risiko einer Abstoßungsreaktion (Klein *et al.*, 2000). Inzwischen ist jedoch bekannt, dass nicht ausschließlich der MHC-Abgleich über mögliche Komplikationen der allogenen Stammzelltransplantation entscheidet, sondern auch geringfügige Unterschiede in den Minor-Histokompatibilitätsantigenen (mHag, engl. *minor histocompatibility antigen*), z. B. von Y-chromosomalen Antigenen (H-Y) (Falkenburg *et al.*, 2002). Der Erfolg der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation hinsichtlich der Malignomtherapie ist maßgeblich abhängig von der Bekämpfung der verbliebenen malignen Zellen im Patienten durch T-Lymphozyten vom Spender (Horowitz *et al.*, 1990). Dieser Graft-versus-Tumor-Effekt (GvT) wird bereits seit 1956 diskutiert und erforscht (Barnes *et al.*, 1956). Allerdings können reaktive Spender-T-Lymphozyten ebenfalls gesundes Gewebe des Patienten angreifen und zu schweren Komplikationen, der Graft-versus-Host Disease (GvHD), führen.

## 1.2 Graft-versus-Host Disease (GvHD)

### 1.2.1 Entstehung der GvHD

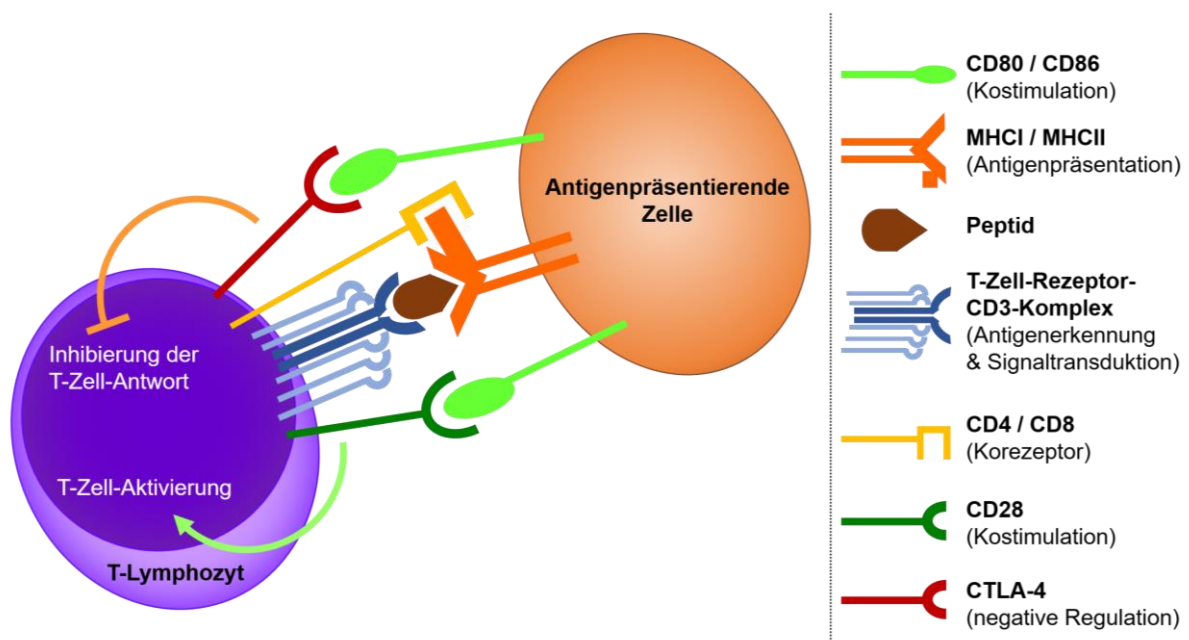
Das Auftreten einer GvHD nach allogener Stammzelltransplantation gilt als eine der wesentlichsten Limitationen für den Erfolg der Behandlung (Ferrara *et al.*, 1991). Die im Transplantat enthaltenen immunkompetenten Zellen des Spenders zerstören körpereigene Zellen des Patienten, sowohl maligne Tumorzellen im Rahmen des GvT-Effekts als auch gesunde Körperzellen. GvHD wird demnach als inflammatorische Reaktion gegen gesundes Körpergewebe des Patienten durch die übertragenen Spenderzellen definiert. Daraus können massive Gewebeschäden bis hin zum Ausfall der Organe resultieren. Diese schwerwiegenden Komplikationen betreffen trotz HLA-passender Spender ca. 40 bis 50 % der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation und führt bei besonders ausgeprägten Formen sogar zum Tod (Ferrara *et al.*, 2009; Scarisbrick *et al.*, 2015). Bereits im Jahr 1966 postulierte Billingham, dass für die Entstehung einer GvHD drei Bedingungen erfüllt sein müssen (Billingham, 1966):

- Mit dem Transplantat müssen immunkompetente Zellen des Spenders auf den Patienten übertragen werden. Teile dieser immunkompetenten Zellen sind aber auch eine Voraussetzung für den Erfolg der allogenen Stammzelltransplantation im Sinne eines GvT-Effektes. Der Einsatz selektiver Depletionsverfahren der alloreaktiven Spender-Zellen könnte es hier ermöglichen, unerwünschte GvH-Effekte von gewünschten GvT-Effekten zu trennen oder zumindest den Schweregrad einer resultierenden GvHD zu verringern ohne den GvT-Effekt gänzlich zu kompromittieren (Solomon *et al.*, 2005; Amrolia *et al.*, 2006; Mielke *et al.*, 2008). Diese Verfahren sind hochkomplex und Gegenstand der aktuellen klinisch-translationalen Forschung (Mielke *et al.*, 2005).
- Die körpereigenen Antigene, welche von den Zellen des Patienten präsentiert werden, müssen sich von denen des Spenders unterscheiden. In der Situation von HLA-passenden Patienten-Spender-Paaren wird an dieser Stelle wieder die Bedeutung der mHags deutlich. Die Spender-Zellen erkennen die Körperzellen des Patienten als „fremd“ und reagieren dementsprechend mit einer starken Immunreaktion darauf (Vogt *et al.*, 2002).

- Das residuale autologe Immunsystem des Patienten selbst ist aufgrund der vorausgegangenen Konditionierung und der zusätzlichen Immunsuppression nicht in der Lage, diese allogene Immunreaktion zu inhibieren. Therapeutisch muss dann die Immunsuppression verstärkt werden, was wiederum den GvT-Effekt in seiner Wirksamkeit reduziert und Infektionen mit opportunistischen Erregern den Weg bereitet.

Die Reaktivität der Spender-T-Lymphozyten beruht darauf, dass für die Aktivierung von T-Lymphozyten zwei Signale notwendig sind (siehe Abbildung 1). Zum einen wird die Stimulation über den T-Zell-Rezeptor vorausgesetzt. Die Erkennung eines fremden Antigens, welches über die MHCs präsentiert wird, führt zur Initiierung der Signaltransduktion (Signal 1). Zum anderen wird ein zweites Signal benötigt, das über Bindung von kostimulatorischen Rezeptoren der CD28-Rezeptor-Familie (CD, engl. *cluster of differentiation*) an CD80 oder CD86 generiert wird. Die Moleküle CD80 und CD86 werden von aktivierten professionellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert (Chen *et al.*, 2013).

Es wird davon ausgegangen, dass insbesondere die im Gewebe des Patienten verbliebenen dendritischen Zellen aktiviert und als antigenpräsentierende Zellen eine allogene Reaktivität der Spender-Lymphozyten auslösen (Chakraverty *et al.*, 2007).



**Abbildung 1: Aktivierung von T-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen**

T-Lymphozyten benötigen zur Aktivierung zwei Signale. Die Erkennung einer Antigen-Struktur auf der Peptidoberfläche erfolgt über den T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex. Intrazelluläre bzw. extrazelluläre Peptide werden über die MHC I-Moleküle an zytotoxische T-Lymphozyten bzw. über die MHC II-Moleküle an T-Helfer-Lymphozyten präsentiert. Für den jeweiligen Zelltyp befinden sich Korezeptoren auf der Oberfläche der T-Lymphozyten: CD4 für T-Helfer-Lymphozyten bzw. CD8 für zytotoxische T-Lymphozyten. Das Signal über den T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex reicht jedoch nicht aus, um die T-Lymphozyten in einen aktivierten Zustand zu versetzen. Ein zweites Signal weiterer beteiligter Rezeptoren wird benötigt. Die Rezeptoren der CD28-Familie binden an ihre Liganden auf den antigenpräsentierenden Zellen (CD80 und CD86). Dadurch erfolgt eine Kostimulation, die letztlich zur Aktivierung der vollständigen Signaltransduktion und Differenzierung der naiven T-Lymphozyten zu Effektorzellen führen. CD4-positive T-Helfer-Lymphozyten sind vorwiegend verantwortlich für Zytokinproduktion und T-Helfer-induzierte Effektormechanismen, während CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten die direkte Zerstörung infizierter oder entarteter Körperzellen vermitteln. Durch die Aktivierung von professionellen antigenpräsentierenden Zellen werden die für die Kostimulation benötigten Moleküle CD80/CD86 hochreguliert. Um Schäden im gesunden Gewebe aufgrund einer zu starken Immunantwort zu vermeiden, greifen Mechanismen zur negativen Regulation ein, z. B. bindet auch der Rezeptor CTLA-4 (CD152) auf T-Lymphozyten kompetitiv an CD80/CD86, was eine Inhibierung der T-Zell-Antwort zur Folge hat. Auch durch das Fehlen der Kostimulation wird die Aktivierung der T-Lymphozyten gehemmt und die Lymphozyten verfallen in Anergie. Dies kann zu Toleranz führen. Orientiert an (Appelbaum, 2001), schriftliche Genehmigung vorliegend.

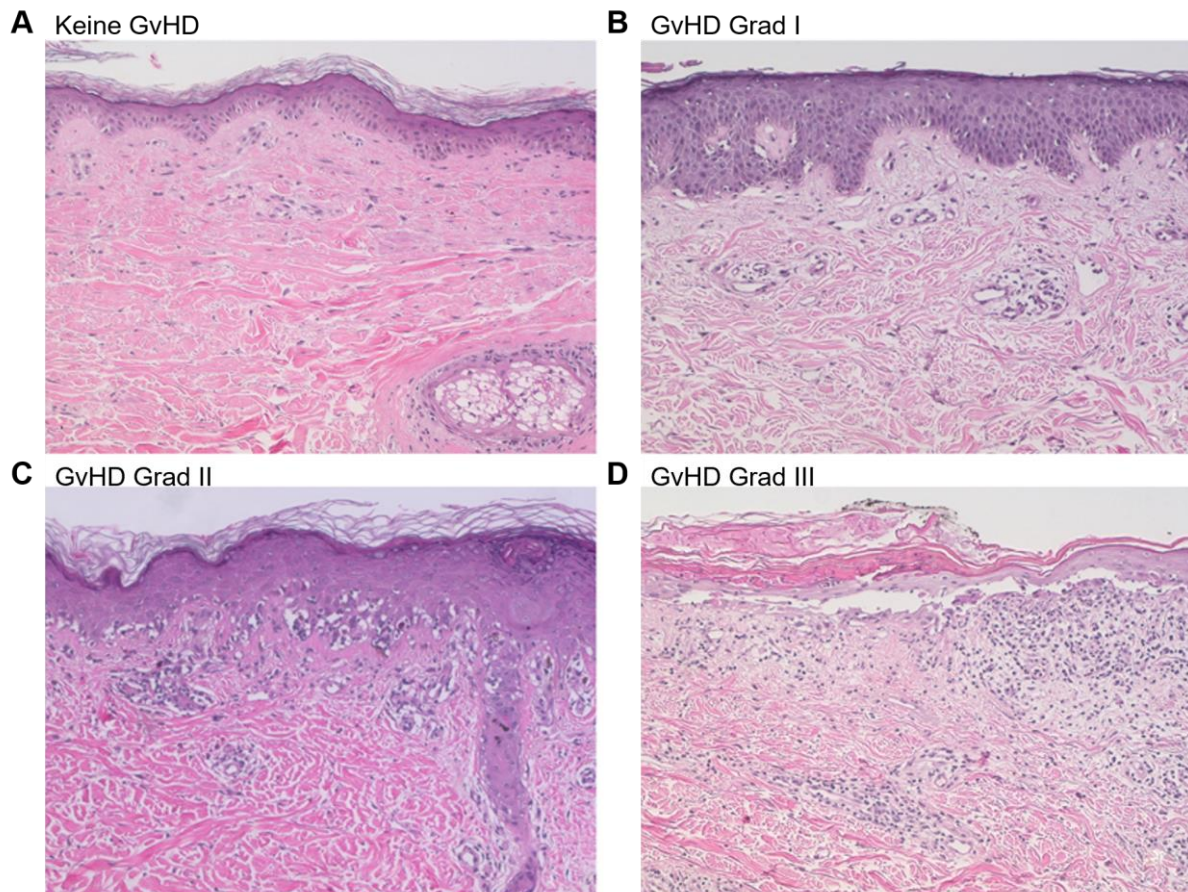
### 1.2.2 Zielorgane der GvHD

In der akuten Form der GvHD, welche regelmäßig aber nicht ausschließlich in den ersten drei Monaten bzw. 100 Tagen nach allogener Stammzelltransplantation auftritt, kommt es zum direkten Angriff auf vorzugsweise epitheliale Zellen der Haut, der Leber und des Magen-Darm-Traktes. Die Patienten leiden beispielsweise unter Ausschlägen, Ikterus, Übelkeit und Diarrhoe (Ferrara *et al.*, 2009). Die chronische Form der GvHD wird regelmäßig später im Verlauf nach Transplantation beobachtet und kann jedes Organ betreffen. Davon sind die Haut und Schleimhäute, aber auch Bindegewebe betroffen. Die Erkrankung erinnert an den Formenkreis autoimmuner und rheumatischer Erkrankungen. Fibrotische Veränderungen und Gewebeschwund (Atrophie) in den Zielorganen können letztlich die Organfunktionen schwer kompromittieren (Sullivan *et al.*, 1992).

Bei 80 % der Patienten tritt eine akute GvHD in der Haut auf. Damit ist die Haut das am häufigsten von akuter GvHD betroffene Organ (Martin *et al.*, 1990). Die histopathologischen Merkmale reichen von Vakuolenbildung in den basalen Schichten der Epidermis, bis hin zum Verlust der Verbindung zwischen Epidermis und Dermis. Lymphozyten-Infiltrate in der Epidermis treten häufig in der Nähe von abgestorbenen Keratinozyten auf, sogenannte „Satelliten-Nekrosen“ (Sundram, 2014). Klinisch richtet sich die klassische Einteilung ganz wesentlich nach dem Anteil der betroffenen Haut (Stadieneinteilung des Gesamtschweregrades der akuten GvHD nach Glucksberg) (Rowlings *et al.*, 1997). Histopathologisch wird die Schwere einer GvHD in der Haut in die Grade I bis IV eingeteilt (siehe Abbildung 2).

Sowohl CD4-positive als auch CD8-positive T-Lymphozyten-Populationen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Pathogenese der GvHD. Im Hinblick auf die Aktivierung von CD4-T-Helfer-Lymphozyten ist die Beteiligung von professionellen antigenpräsentierenden Zellen besonders wichtig (Schwarer *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass grundsätzlich nur professionelle antigenpräsentierende Zellen MHC II-Moleküle exprimieren, welche essentiell für die Stimulation der T-Helfer-Lymphozyten sind. Diese reagieren wiederum mit erhöhter Zytokin-Ausschüttung.

Hingegen werden CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten über MHC I-Moleküle aktiviert, welche auf allen kernhaltigen Körperzellen vorhanden sind. Die Folge der Stimulation von zytotoxischen T-Lymphozyten ist die direkte Lyse der betroffenen Körperzellen z. B. zur Elimination virusinfizierter Zellen (Braun *et al.*, 1996).



**Abbildung 2: GvHD der Haut**

Dargestellt sind repräsentative Hautbiopsien von Patienten mit oder ohne GvHD. **(A)** Die Haut weist keine GvHD-Merkmale auf. Eine mehrschichtige Epidermis mit mehreren erkennbaren Differenzierungsschichten und ausreichender Verhornung haftet vollständig an der Dermis an. **(B)** Bei einer GvHD mit Schweregrad I beginnen sich erste Vakuolen um die Zellkerne der Keratinozyten zu bilden. **(C)** Nekrotische Keratinozyten treten bei einer GvHD Grad II auf teilweise mit Lymphozyteninfiltraten. **(D)** Die Haut bei einer GvHD Grad III zeigt massive Infiltrationen mit Lymphozyten sowie die Ablösung der epidermalen Schichten von der Dermis. Färbung mit Hämatoxylin/Eosin (HE). Modifiziert nach (Wu *et al.*, 2010), schriftliche Genehmigung vorliegend.

Die initiiierende Phase der GvHD wird auf professionelle antigenpräsentierende Zellen des Patienten (insbesondere dendritische Zellen) zurückgeführt, die im Zuge ihrer Aktivierung in die Lymphknoten wandern. Dort induzieren sie wiederum die Stimulation der Spender-Lymphozyten, welche anschließend in die Zielorgane wie Haut oder Leber migrieren (engl. *homing*) und Gewebeschäden auslösen (Warnock *et al.*, 1998; Sackstein, 2006).

Kontrovers wird diskutiert, ob auch Körperzellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs in der Lage sind, Eigenschaften von antigenpräsentierenden Zellen anzunehmen (Teshima *et al.*, 2002). In Mausversuchen konnte nachgewiesen werden, dass antigenpräsentierende Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs ausreichen, um eine akute GvHD auszulösen (Koyama *et al.*, 2011; Toubai *et al.*, 2012). So wurde eine durch proinflammatorische Bedingungen induzierte Expression von HLA-DR auf epidermalen Keratinozyten (Lampert, 1984), dermalen Fibroblasten (Maurer *et al.*, 1987) und mikrovaskulären Endothelzellen (Muczynski *et al.*, 2001) gezeigt.

Ein proinflammatorisches Milieu wird bereits im Zuge der Vorbereitung einer allogenen Stammzelltransplantation ausgelöst. Die Konditionierung des Patienten zur Entfernung der körpereigenen malignen und immunkompetenten Zellen kann so schon im Vorfeld zu Gewebeschäden führen (Ramadan *et al.*, 2015). Im Zusammenspiel mit freigesetzten Zytokinen kann es zur Aktivierung von Hautzellen kommen, welche später als antigenpräsentierende Zellen für die Spender-Lymphozyten fungieren könnten. Die Zytokinausschüttung spielt bei der Entstehung oder dem Verlauf einer GvHD eine wichtige Rolle. Zytokinprofile im Blut von GvHD-Patienten zeigten den Anstieg der Interleukine (IL) IL-6, IL-8, IL-12 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) im Verlauf der Erkrankung (Holler *et al.*, 1990; Yabe *et al.*, 1999; Schots *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde eine Korrelation der Zytokinspiegel von IL-2, IL-17 sowie Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) und akuter GvHD in Mausmodellen aufgezeigt (Ju *et al.*, 2014; Schmid *et al.*, 2017).

Dem Gefäß-Endothel als Eintrittszone für reaktive Lymphozyten in die Gewebe der Zielorgane wird ebenfalls eine große Bedeutung bei der Entstehung von GvHD zugeschrieben (Carreras *et al.*, 2011). Die Schädigung der endothelialen Schichten wurde bei Patienten mit GvHD beobachtet. Dadurch wird der Eintritt der Lymphozyten aus der Blutbahn in die Zielorgane, wie z. B. die Haut, mit entsprechenden proinflammatorischen Bedingungen erleichtert (Dumler *et al.*, 1989; Schmid *et al.*, 2014).

### 1.2.3 Behandlung der GvHD

Um die Entwicklung einer akuten GvHD möglichst zu vermeiden oder zumindest zu verlangsamen, wird eine prophylaktische Immunsuppression der Patienten im Anschluss an die allogene Stammzelltransplantation eingeleitet. Somit soll die primäre Stimulation und Expansion von potentiellen GvHD-induzierenden Spender-Lymphozyten verhindert werden, bis die proinflammatorische Phase unmittelbar nach der Konditionierung verstrichen ist. Üblicherweise wird die Immunsuppression durch unspezifische Chemotherapeutika, wie Methotrexat (ein Folsäure-Antagonist), oder Kortikosteroide (synthetische Analoga der Steroidhormone) erzielt. Weitere Medikamente stehen u. a. mit Ciclosporin A (Calcineurin-Inhibitor) und Tacrolimus (FK506, Calcineurin-Inhibitor) zur Verfügung (Filipovich *et al.*, 2005; Finke *et al.*, 2009; Wolff *et al.*, 2009). Letztere hindern die Lymphozyten an ihrer Proliferation, während Methotrexat und Steroide das Potential besitzen, bereits proliferierende Lymphozyten zu depletieren, was je nach klinischer Situation erwünscht oder unerwünscht sein kann.

Trotz einer prophylaktischen Immunsuppression kann das Auftreten einer akuten GvHD nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation in ca. der Hälfte der Fälle nicht verhindert werden (Gooley *et al.*, 2010). Die Therapie einer GvHD richtet sich nach Schweregrad und dem Zeitpunkt ihres Auftretens nach Transplantation. Ferner muss der Status der malignen Grunderkrankung berücksichtigt werden, welcher sich beispielsweise im Remissionsstand und dem Risikoprofil widerspiegelt. Somit werden milde Formen von akuter Haut-GvHD vorzugsweise topisch mit Steroidcremen und nicht primär systemisch behandelt. Ferner wird die prophylaktische Immunsuppression fortgesetzt, zum Teil in Verbindung mit einer Dosiserhöhung der Immunsuppressiva. Das Ansprechen auf die Erstlinientherapie mit Kortikosteroiden ist grundsätzlich mit einer verbesserten Prognose assoziiert. Man spricht auch von einer steroidsensiblen GvHD. Allerdings sprechen die Patienten in 30 bis 40 % der Fälle aus bisher noch unbekanntem Gründen nicht auf die Therapie mit Steroiden an (Martin *et al.*, 2012). In der Situation einer steroidrefraktären GvHD werden weitere Therapieoptionen hinzugezogen.



Dazu können der Einsatz von Antikörpern, neuen Substanzen wie Januskinase-Inhibitoren und mTOR-Inhibitoren sowie zelluläre Therapien zählen. Beispiele sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Der Schwerpunkt der neuen Therapieansätze verschiebt sich immer mehr von der klassischen Immunsuppression hin zu immunregulatorischen Strategien. Zwar unterdrückt die unspezifische Suppression des Immunsystems einerseits die Stimulation alloreaktiver Lymphozyten, andererseits wird aber auch die Immunrekonstitution beeinträchtigt. Überdies kommt es zur Abschwächung des GvT-Effektes. Folglich steigt das Risiko für Virus- und Pilzinfektionen sowie Rezidive der malignen Erkrankung.

**Tabelle 1:** Ansätze für Zweitlinientherapien zur Behandlung der GvHD  
Zusammengefasst aus (Blazar *et al.*, 2012)

Therapieansatz	Beispiele	Wirkungsweise	Referenz
Antikörper	Antithymozytenglobulin (ATG)	T-Zell-Depletion	(Eiermann <i>et al.</i> , 1999)
	Infliximab	TNF- $\alpha$ -Inhibitor	(Alousi <i>et al.</i> , 2009)
	Rituximab	CD20-spezifischer Antikörper	(Kharfan-Dabaja <i>et al.</i> , 2011)
	Denileukin	CD25-spezifischer Antikörper	(Alousi <i>et al.</i> , 2009)
Small Molecules	Rapamycin	mTOR-Inhibitoren	(Cutler <i>et al.</i> , 2010;
	Sirolimus	(engl. <i>mechanistic target of rapamycin</i> )	Mielke <i>et al.</i> , 2014)
	Everolimus		
	Ruxolitinib	Tyrosinkinase-Inhibitoren	(Jabbour <i>et al.</i> , 2007;
	Imatinib		Olivieri <i>et al.</i> , 2009;
	Nilotinib		Zeiser <i>et al.</i> , 2015)
	Vorinostat	HDAC-Inhibitor (Histon-Deacetylasen)	(Reddy <i>et al.</i> , 2004)
	Maraviroc	Chemokinrezeptor CCR5-Inhibitor	(Moy <i>et al.</i> , 2017)
Zytokine	Low-dose IL-2	Expansion natürlicher Killerzellen und regulatorischer T-Lymphozyten	(Liu <i>et al.</i> , 2008)
Zelluläre Therapien	Infusion pluripotenter mesenchymaler Stromazellen	unbekannt, vermutlich lösliche Mediatoren	(Le Blanc <i>et al.</i> , 2008)
	Infusion regulatorischer T-Lymphozyten	Suppression CD8-positiver Effektorzellen	(Brunstein <i>et al.</i> , 2011)

Inwieweit zelluläre Therapien selektiv GvHD- aber nicht GvT-Effekte beeinflussen können, bleibt vorerst unklar. Für die Wiederherstellung der Immunregulation wurde u. a. der Einfluss von regulatorischen T-Lymphozyten auf den Verlauf der GvHD untersucht. Die Suppression alloreaktiver Spender-T-Lymphozyten durch regulatorische T-Lymphozyten konnte bereits in Mausmodellen beobachtet werden (Edinger *et al.*, 2003). Bei Patienten mit steroidrefraktärer GvHD zeigte die Behandlung mit pluripotenten mesenchymalen Stromazellen vielversprechende Ergebnisse. In einigen Studien konnte das Überleben der Patienten durch Infusion pluripotenter mesenchymaler Stromazellen verlängert werden (Le Blanc *et al.*, 2008). Der genaue Wirkmechanismus dieser immunmodulatorischen Zellen ist bislang ungeklärt, könnte aber auf einer grundlegenden Veränderung des Immunmilieus beruhen.

## 1.3 Testsysteme für GvHD

### 1.3.1 Tiermodelle

Die Forschung in Tiermodellen bietet vielseitige Anwendungsmöglichkeiten für die Erforschung immunologischer Mechanismen. Auch bedeutsame Grundlagen für das Verständnis der pathologischen Abläufe in der GvHD wurden in Tiermodellen aufgedeckt (Schroeder *et al.*, 2011).

Tierversuche waren es, die letztlich zur Aufklärung über die Existenz und Bedeutung von MHCs für Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen beigetragen haben (Snell, 1948; Billingham *et al.*, 1953). Außerdem konnte in Tierversuchen nachgewiesen werden, dass Knochenmarkzellen eines Spenders in der Lage sind, das Immunsystem des Empfängers nach letaler Bestrahlung wieder aufzubauen. Damit wurde der Weg für die Durchführung von Knochenmarktransplantationen bereitet (Lorenz *et al.*, 1951; Trentin, 1956). Zudem basieren die Fortschritte für allogene Transplantationen auf Untersuchungen zur Gewebetypisierung in Hunden (Epstein *et al.*, 1968). Für mechanistische Fragestellungen bestehen mittlerweile gute Mausmodelle. Eine Vielzahl von klinischen Konzepten im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation wurde in der Tat anhand von Mausmodellen erarbeitet. Dazu zählen grundlegende Experimente, auf denen das Wissen über den Mechanismus der GvT-Aktivität sowie dem Nutzen von Spender-Lymphozyten-Infusionen beruht (Hulsdunker *et al.*, 2015).

Im Allgemeinen stimmt man darin überein, dass Tierversuche eine wichtige Grundlage für die Erforschung der pathologischen Zusammenhänge im Verlauf einer GvHD bilden. Insbesondere Mausmodelle bieten viele Vorteile für die Untersuchung spezifischer Problemstellungen unter kontrollierbaren Bedingungen (siehe Tabelle 2). Jedoch ist das Bewusstsein darüber gewachsen, dass Tierversuche von humanen Systemen abweichen und eine bedenkenlose Übertragbarkeit nicht immer gegeben ist (Perel *et al.*, 2007; Hunig, 2012). Bei der Untersuchung des Einflusses von IL-11 auf GvHD wurde beispielsweise in Mäusen eine reduzierte GvHD-induzierte Mortalität nachgewiesen, wobei das Verabreichen des Zytokins von den Mäusen gut toleriert wurde.

Im Gegensatz dazu wurden bei einer klinischen Phase I/II-Studie massive Nebenwirkungen bei den Patienten einhergehend mit einer hohen Sterberate festgestellt (Teshima *et al.*, 1999; Antin *et al.*, 2002). Humanisierte Mausmodelle, welche humane hämatopoetische Stammzellen einschließen, um ein humanes Immunsystem zu simulieren, bieten realitätsnähere Voraussetzungen bei der Erforschung immunologischer Aspekte. Aber auch in diesen Modellen müssen die Einschränkungen bezüglich der Vergleichbarkeit zum Menschen beachtet werden. Letztendlich ist das Auftreten einer GvHD für den einzelnen Patienten durch derartige Tierversuche auch unter humanisierten Bedingungen schwer vorhersehbar, da die Modelle sehr artifiziell und schlecht individualisierbar sind (Chong *et al.*, 2013; Hulsdunker *et al.*, 2015).

**Tabelle 2:** Vor- und Nachteile von Mausmodellen zur Erforschung von GvHD  
Zusammengefasst aus (Markey *et al.*, 2014)

<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
Umwelteinflüsse streng kontrollierbar	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen kritisch
Kontrolle über Abweichungen zwischen MHC- und mHag-Merkmalen	hohe Variabilität in humanen Merkmalen (Genetik, Alter, Gesundheitszustand, Therapie-Schemata etc.) nicht reflektiert
verschiedene Versuchsbedingungen parallel untersuchbar und vergleichbar	wesentliche Abweichungen im Stoffwechsel und anatomischen Aufbau zwischen Maus und Mensch
spezifische genetische Veränderungen von potentiell bedeutsamen Molekülen	Strategie für Myeloablation im Mausmodell meist ausschließlich durch Einsatz von Ganzkörper-Bestrahlung
etablierte Methoden zum Imaging sowie definierte Methoden zur Auswertung der Immunreaktion verfügbar	große Unterschiede in Pharmakokinetik- und Toxizitätsbestimmungen zwischen Maus und Mensch
Erzeugung relevanter Krankheitsmodelle möglich	mögliche Überbewertung der Ergebnisse aufgrund nicht adäquater Anpassung der Modelle an krankheitsrelevante Fragestellungen

### 1.3.2 *In-vitro*-Testsysteme

*In-vitro*-Testsysteme erlauben die Untersuchung humaner Zellen, was als ein Vorteil gegenüber dem Mausmodell angesehen werden kann. Auf der anderen Seite können diese Systeme niemals die Komplexität eines lebenden Organismus wiedergeben und bleiben somit in ihrer Validität für den Menschen deutlich reduziert.

Die gemischte Lymphozyten-Reaktion (MLR, engl. *mixed lymphocyte reaction*) stellt eine sehr alte Methode zur Vorhersage von GvHD Reaktionen dar. Diese Methode hatte insbesondere eine Bedeutung in einer Zeit, in der noch keine hochauflösende HLA-Typisierung bestand. Mit der sich stetig verbessernden Typisierung sind diese Methoden in den Hintergrund geraten.

In der sogenannten „one-way“ MLR kann die T-Zell-Antwort auf „fremde“ MHC-Moleküle bestimmt werden. Auf diese Weise kann im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation die Reaktion von Spender-Lymphozyten auf Lymphozyten des Patienten getestet werden. Dafür wird die Proliferation der Patienten-Lymphozyten zunächst durch Bestrahlung oder Mitomycin C-Behandlung gehemmt. Die proliferations-inhibierten Patienten-Lymphozyten dienen als Stimulator-Zellen. Für die MLR werden dann die Lymphozyten des Spenders mit den Patienten-Lymphozyten gemischt und über 4 bis 7 Tage kokultiviert. Anschließend wird die Immunreaktion anhand der Proliferation der Spender-Lymphozyten analysiert. Die Proliferationsrate kann über verschiedene Methoden bestimmt werden (Muul *et al.*, 2008). Eine indirekte Erfassung der DNA-Synthese und Proliferation der Zellen kann über radioaktive ( $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporation) oder kolorimetrische Methoden (Tetrazolium-Reduktion) in standardisierten Messungen erfasst werden. Durch die Färbung der Zellen mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) können sich teilende Zellen durchflusszytometrisch identifiziert werden. Diese Methode bietet zudem die Möglichkeit, die Zellpopulationen über zusätzliche Fluoreszenzmarkierungen weitergehend zu differenzieren und zu charakterisieren (Asquith *et al.*, 2006).

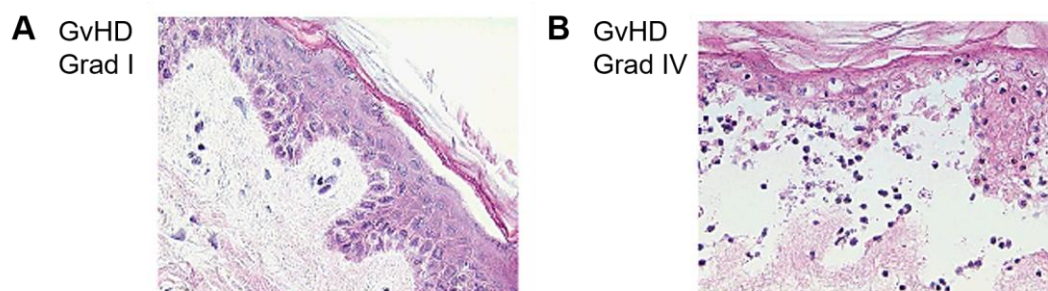
Als Weiterführung der MLR können Limiting Dilution Assays betrachtet werden. Damit wird der Anteil einer bestimmten Zellpopulation an der entstandenen Immunreaktion ermittelt. Durch den Einsatz verschiedener Zellkonzentrationen können über statistische Verfahren (lineare Regression) die Frequenzen der Zellen, welche Effektorfunktionen ausüben (z. B. T-Helfer-Lymphozyten, zytotoxische T-Lymphozyten), berechnet und somit ergänzende Informationen erlangt werden (Frisan *et al.*, 2001).

Der Vorteil dieser *in-vitro*-Testsysteme liegt in der einfachen und schnellen Handhabung. Abhängig vom Ausgangsmaterial und vom Ausmaß der Detektionsvarianten sind diese Methoden in der Regel kostengünstiger als Tierversuche. Außerdem kann durch die Verwendung z. B. von Humanserum eine Untersuchung ausschließlich mit humanen Komponenten durchgeführt werden. Ein großer Nachteil dieser Testsysteme ist, dass sie die regulatorischen Interaktionen zwischen den Zellpopulationen nicht messen können. Auch bilden sie physiologische Bedingungen nur unzureichend ab. Die klinische Erfahrung zeigt, dass diese Systeme für eine zuverlässige Vorhersage zum Auftreten einer GvHD nicht ausreichend sind. Funktionelle Analysen zur alloreaktiven Kapazität verschiedener T-Lymphozyten-Populationen sind nur sehr eingeschränkt möglich.

### 1.3.3 Skin-Explant Assay

Eine klinisch relevante Alternative zu den bisher beschriebenen Testsystemen stellt der Skin-Explant Assay dar. Diese Methode wird seit den achtziger Jahren angewendet, um Auftreten und Schweregrad einer akuten GvHD bei Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation vorherzusagen (Vogelsang *et al.*, 1985). Zu diesem Zweck werden herkömmliche Stanzbiopsien aus der Haut (4 mm) von Transplantations-Patienten entnommen, von Bindegewebe befreit und in sechs bis zehn gleichgroßen Teilen eingesetzt. Zusätzlich werden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell, PBMCs) aus dem Blut des Patienten und eines möglichen Spenders isoliert. Die Spender-Lymphozyten werden in einer MLR mit den Patienten-Lymphozyten sensibilisiert. Anschließend werden die PBMCs zusammen mit den Stanzbiopsien inkubiert. Nach drei Tagen erfolgen die mikroskopische Begutachtung der Hautbiopsien und die Einordnung in das Schweregrad-System nach histopathologischen Merkmalen (siehe Abbildung 3). Hautbiopsien, die ausschließlich mit Medium inkubiert wurden, werden als Negativkontrollen verwendet, um Effekte durch Handhabung der Proben und Dauer der Inkubation auf die Histologie der Gewebeproben zu bestimmen. Das histologische Bild wird definitionsgemäß als GvHD Grad I bewertet. Erst eine akute GvHD Grad II oder höher wird als aussagekräftiges Ergebnis erfasst (Dickinson *et al.*, 1988; Sviland *et al.*, 1999).

Der Skin-Explant Assay ist wohl das beste *in-vitro*-Testsystem, was jemals zur Vorhersage von akuter Haut-GvHD entwickelt wurde. Der Test zeichnet sich durch eine gute Sensitivität, Reliabilität und Spezifität aus. Der Schweregrad der GvHD im Skin-Explant Assay korrelierte bei 45 von 56 Patienten (80 %) mit den klinischen Daten (Dickinson *et al.*, 1994). In einer pädiatrischen Patientengruppe konnte sogar eine Korrelation von 91 % festgestellt werden (Hromadnikova *et al.*, 2001).



**C** Einteilung des Schweregrades von GvHD in der Haut

Schweregrad	Merkmale
Grad 0	normale Haut
Grad I	Vakuolenbildung vorwiegend basaler Keratinozyten
Grad II	erweiterte Vakuolenbildung Differenzierungsstörungen vorwiegend in den basalen Schichten der Epidermis
Grad III	Spaltenbildung unterhalb der Epidermis
Grad IV	vollständige Ablösung der epidermalen Schichten von der Dermis

**Abbildung 3: Bewertung des Schweregrades von GvHD im Skin-Explant Assay**

Der Schweregrad einer GvHD in Stanzbiopsien von Patienten wird anhand von HE-Färbungen beurteilt. **(A)** Ein repräsentatives Beispiel einer Negativkontrolle zeigt nur geringfügige Veränderungen der Haut des Grades I. **(B)** Zytotoxische T-Lymphozyten spezifisch für das mHAG H-Y riefen morphologische Veränderungen der Haut in den Stanzbiopsien hervor (repräsentatives Beispiel). **(C)** Die Beurteilung des GvHD-Schweregrades erfolgt nach der Einteilung von Lerner (Lerner *et al.*, 1974). Modifiziert nach (Dickinson *et al.*, 2002), schriftliche Genehmigung vorliegend.

Die starke Aussagekraft dieses Testsystems wird vermutlich durch die Verwendung von humanen Zellen und Geweben erreicht. Neben den Lymphozyten des Patienten und des Spenders bietet die Verfügbarkeit der Patienten-Hautproben einen großen Vorteil. Insofern kann der Skin-Explant Assay nicht nur zur routinemäßigen GvHD-Vorhersage bei HLA-passenden Patienten-Spender-Paaren, sondern auch zur Erforschung der Pathophysiologie der GvHD genutzt werden. So wurde mit diesem Modell die Bedeutung von CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten bei der Entstehung von Gewebeschäden in der Haut bestätigt (Dickinson *et al.*, 2002). Auch die Beteiligung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , bei der Entstehung der GvHD wurde gezeigt (Dickinson *et al.*, 1991). Der limitierende Faktor des Skin-Explant Assays ist die geringe Anzahl an Stanzbiopsien, die von einem Patienten entnommen werden können, und die damit den Umfang an möglichen Testungen beschränken.



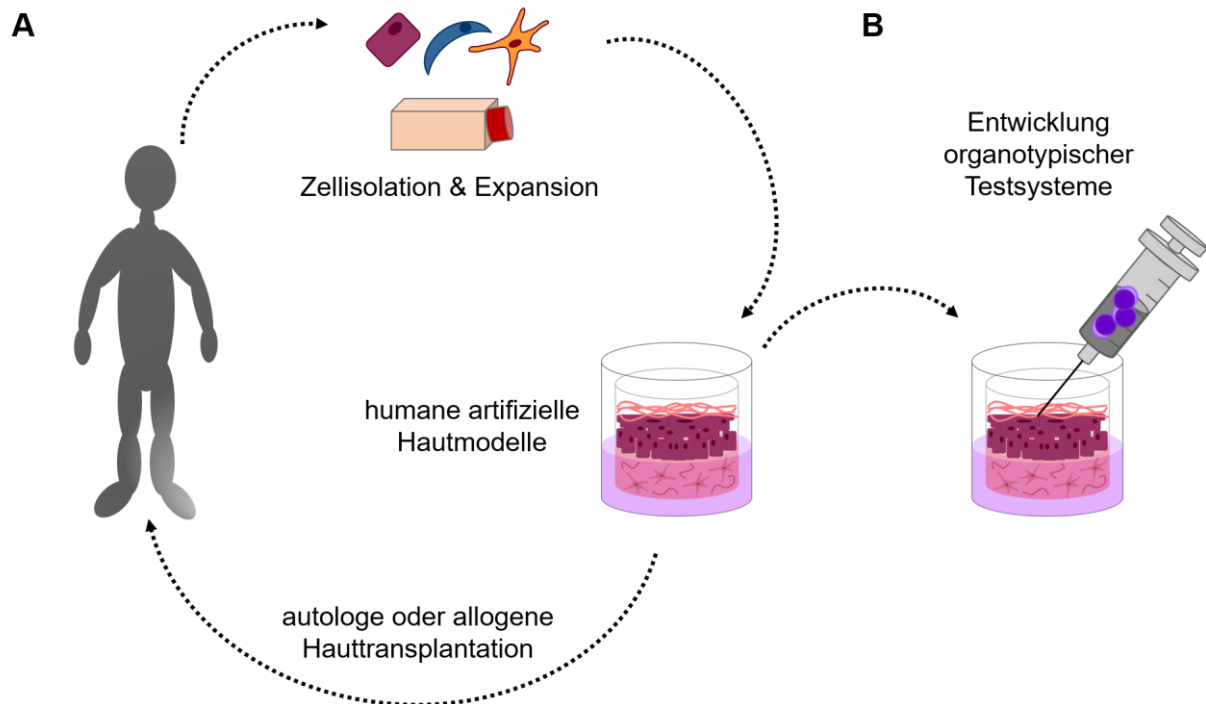
## 1.4 Tissue Engineering

Derzeit wird die Entwicklung neuer Haut-Testsysteme im Bereich des Tissue Engineering vorangetrieben. Bei dieser Herangehensweise werden dreidimensionale Strukturen zur Kultivierung von Zellen gebildet, damit die Zellen unter physiologischeren Bedingungen und Netzwerken wachsen können. Somit kann ein großer Nachteil der unphysiologischen zweidimensionalen Kultur mit Monolayern überwunden werden (Sun *et al.*, 2006; Pampaloni *et al.*, 2007).

Die Methoden im Tissue Engineering folgen in aller Regel demselben Prinzip (siehe Abbildung 4A). Zunächst werden primäre Zellen aus humanen Geweben isoliert. Verschiedene Zellarten können anschließend *in vitro* selektiert, kultiviert und expandiert werden. Die Expansion dieser primären Zellen stellt eine wichtige Grundlage für den erfolgreichen Aufbau von artifiziellen organotypischen Gewebemodellen dar. Zu diesem Zweck werden die primären Zellen auf ein Trägermaterial (Matrix) aufgebracht oder darin integriert (Gilbert *et al.*, 2006). Die darauffolgende Kultivierungsdauer ist abhängig vom Gewebemodell und den verwendeten Zellarten. Während der Kultivierung können sich die Zellen innerhalb oder auf der Matrix dreidimensional ausbreiten. Auf diese Weise können die Zellen *in vitro* unter Bedingungen kultiviert werden, die denen *in vivo* nahekommen und damit physiologischer sind als konventionelle Kulturbedingungen. Das entstandene organotypische Gewebemodell kann schließlich einem Menschen als autologes oder allogenes Transplantat wieder zugeführt werden (Langer *et al.*, 1993). Eine weitere Anwendung besteht darin, anhand dieser Gewebemodelle neue Testsysteme zu entwickeln (siehe Abbildung 4B) (Moll *et al.*, 2013; Fecher *et al.*, 2016).

Dieser Ansatz konnte bereits insbesondere für den Aufbau humaner artifizieller Hautmodelle ausgebaut werden. Wie bereits beschrieben werden dazu primäre Zellen aus der Epidermis (Keratinozyten) und Dermis (Fibroblasten) von humanen Hautbiopsien isoliert und expandiert. Als Matrix können verschiedene Materialien dienen, z. B. synthetische Verbundstoffe, Kollagen- und Hydrogele (Chaudhari *et al.*, 2016). Mithilfe dieser Materialien kann eine dreidimensionale Zellkultivierung unter statischen Bedingungen gewährleistet werden. Inzwischen wurden auch Matrizes entwickelt, welche Strukturen ähnlich zu Blutgefäßen aufweisen.

Diese vaskularisierten Hautmodelle ermöglichen zum einen das Einbringen von Zellen oder Substanzen über ein Gefäßsystem. Zum anderen können diese Gewebemodelle auch unter dynamischen Bedingungen in einem Bioreaktorsystem kultiviert werden. Dadurch wird eine zusätzliche Annäherung an physiologische Wachstumsbedingungen der Hautzellen erreicht (Martin *et al.*, 2004; Groeber *et al.*, 2013; Groeber *et al.*, 2016).



#### Abbildung 4: Methodisches Prinzip von Tissue Engineering

Dargestellt ist das Prinzip am Beispiel humaner künstlicher Hautmodelle. **(A)** Hautgewebe eines Spenders oder Patienten wird entnommen. Daraus werden primäre humane Zellen isoliert. Durch eine *in vitro* Kultivierung können die isolierten Zellen vermehrt werden (Expansion). Eine geeignete Trägersubstanz dient als Matrix für die Herstellung humaner künstlicher Hautmodelle. **(C)** Diese Hautmodelle können anschließend zum einen als autologe oder allogene Hauttransplantation einem Patienten zurückgeführt werden. **(B)** Zum anderen können die Hautmodelle zur Etablierung neuer Testsysteme genutzt werden. Orientiert an (Groeber *et al.*, 2011), schriftliche Genehmigung vorliegend.

Artifizielle humane Hautmodelle finden eine breite Anwendung in verschiedensten wissenschaftlichen und klinischen Gebieten. Die Versorgung von Brandopfern mit autologen Hauttransplantaten stellt dabei einen großen Schwerpunkt der klinischen Forschung dar. Artifizielle humane Hautmodelle erlangen zudem eine immer größere Bedeutung als klinisch relevantes Modell für die Untersuchung verschiedenster Erkrankungen der Haut. So werden inflammatorische Zustände in Psoriasis erforscht und Tumormodelle etabliert, z. B. als Melanom-Modelle (Groeber *et al.*, 2011).

Hautmodelle werden außerdem zur Untersuchung von Wundheilungsprozessen und Infektionsvorgängen herangezogen (Jannasch *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2015). Der Schwerpunkt der Forschung an artifiziellen humanen Hautmodellen liegt derzeit auf pharmakologischen Studien von Medikamenten, Kosmetika und anderen potentiell toxischen Substanzen. Aufgrund der reproduzierbaren Vorhersage, ob eine chemische Substanz hautirritierend oder sogar toxische und ätzende Effekte auf die Haut zeigt, stellen Hautmodelle inzwischen ein wichtiges Testsystem zur Überprüfung der Sicherheit dieser Substanzen dar (Weindl *et al.*, 2011). Die Testung anhand von Hautmodellen wurde bereits in die Richtlinien der Organisation für wissenschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD, engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) aufgenommen. Infolgedessen konnte die Anzahl von Tierversuchen, u. a. zur Testung von Kosmetika, massiv eingeschränkt werden (OECD, 2010).

## 1.5 Zielsetzung

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation stellt die bis dato erfolgreichste, jemals etablierte zelluläre Therapieform zur Behandlung von Patienten mit Hochrisikoleukämien und –lymphomen dar. Die Manifestation einer akuten GvHD ist dabei eine hochrelevante Nebenwirkung dieses Therapieverfahrens, die je nach Schweregrad mit einer gesteigerten Morbidität einhergehen kann. Die Haut ist das am häufigsten betroffene Zielorgan der akuten GvHD. Bis dato erlaubt nur der Skin-Explant Assay eine gute Vorhersage für das Auftreten einer relevanten Haut-GvHD. Dieses Verfahren erlaubt nur eine sehr begrenzte Anzahl an Testungen, was mechanistische Untersuchungen in der Regel nicht mehr oder nur in sehr geringem Umfang zulässt.

Somit war das Ziel dieser Arbeit, auf der Basis humaner Hautzellen ein artifizielles Testsystem zu etablieren, welches die GvHD der Haut histomorphologisch simuliert und zahlenmäßig nicht limitiert ist. Anders als beim Skin-Explant Assay wäre ein solches Testsystem auch für klinische Studien attraktiv, da eine unbegrenzte Möglichkeit an Testungen eine bessere Vorhersage der GvHD beim Patienten erlaubt. In Hinblick auf zahlreiche neue Therapieformen zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen könnten diese GvHD-Modelle erstmals auch komplexere mechanistische Studien im humanen System *in vitro* erlauben und somit ergänzende Informationen zu Tiermodellen liefern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Biologisches Material

Humane Keratinozyten, Fibroblasten und mikrovaskuläre Endothelzellen wurden aus juvenilen Präputien isoliert. Die Spender waren nicht älter als 10 Jahre. Zuvor wurde die schriftliche Einverständniserklärung der Erziehungsberechtigten der Spender eingeholt. Die Verwendung und Aufarbeitung der Gewebeproben wurde durch die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Würzburg genehmigt (Aktenzeichen 182/10 und 2/12).

Zur Gewinnung von PBMCs wurden Blutproben von freiwilligen Spendern herangezogen. Dafür wurde ein Abfallprodukt von leukozytenreduzierten Thrombozytenspenden verwendet. Dieses Leukozytenreduktionssystem (LRS) enthält zahlreiche PBMCs und wurde anonymisiert vom Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt (Bock *et al.*, 2002; Dietz *et al.*, 2006). Die Verwendung und Aufarbeitung der Proben wurde durch die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Würzburg genehmigt (Aktenzeichen 182/10).

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

**Tabelle 3:** Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cryovials®	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kulturflaschen Cellstar® 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kulturflaschen Cellstar® 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kulturflaschen Cellstar® 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Insulinspritze 0,3 x 12 mm Kanüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Mikrotiterplatte Nunclon™ Surface 96 Well, round-bottom	Nunc™ by Thermo Fisher Scientific™, Roskilde, Denmark
Microtubes 1,2 ml	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Multischalen Nunclon™ Surface 6 Well	Nunc™ by Thermo Fisher Scientific™, Roskilde, Denmark
Multischalen Nunclon™ Surface 12 Well	Nunc™ by Thermo Fisher Scientific™, Roskilde, Denmark
Multischalen Nunclon™ Surface 24 Well	Nunc™ by Thermo Fisher Scientific™, Roskilde, Denmark
Pasteurpipetten Kunststoff 3,5 ml	Sarstedt AG & Co.KG, Nürnberg, Deutschland
Serologische Pipetten 5/10/20 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Syringe BD Luer-Lok™ Tip 2/5/10 ml	BD Biosciences (Becton Dickinson), San José, CA, USA
Transwell-Inserts Nunc™ Polycarbonat-Membraneinsätze (Oberfläche 0,47 cm <sup>2</sup> )	Nunc™ by Thermo Fisher Scientific™, Roskilde, Denmark
Zellsieb EASYstrainer™ 100 µm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

**Tabelle 4:** Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank INCO 2 246, 108	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACSCalibur™	Becton Dickinson, San José, CA, USA
Flüssigstickstofflagertank CryoPlus 1	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA
Harvester Mach 2 SemiAutomatic	TomTec Imaging Systems GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Kühlschrank CN 3033 Comfort	Liebherr Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Magnetrührer Model L-71	Labinco BV, Breda, Niederlande
Mikroskop Biorevo Keyence BZ-9000	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Mikrozentrifuge 1-14	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Mikrozentrifuge Fresco 17	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA
Scintillation Counter Wallac 1450 Microbeta Trilux	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
Sicherheitswerkbank BDK-SK 1800	BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERASAFE HS 12	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA
Ultratiefkühlschrank MDF-U7386S -80°C	Sanyo, Osaka, Japan
Wärmebad WNB 22	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Zellanalysator Vi-Cell™ XR	Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA
Zentrifuge Multifuge® 1S	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA
Zentrifuge 3-16PK	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland

### 2.1.3 Lösungen, Puffer, Medien

**Tabelle 5:** In der Zellkultur verwendete Lösungen, Puffer und Medien

Beschreibung	Hersteller
ACK Lysing Buffer	Bio Whittaker®, LONZA, Walkersville, MD, USA
Biocoll Separating Solution: 1,077 g/ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
CellGro® GMP DC Medium	CellGenix GmbH, Freiburg, Deutschland
DMEM (1x) (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit GlutaMAX™, 4,5 g/l D-Glucose	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
EpiLife®	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
FBS (fetales bovines Serum)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Gelneutralisationlösung: DMEM 2x (93 %), 3 M HEPES (3 %), FBS (3 %), Chondroitin-Sulfat-Lösung (1 %)	zur Verfügung gestellt vom Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universitätsklinikum Würzburg, Eigenherstellung
Gentamicin: 10 mg/ml	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
HKGS (100x) (Human Keratinocyte Growth Supplement)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
PBS (1x) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ohne MgCl <sub>2</sub> , ohne CaCl <sub>2</sub>	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
PBS+Mg/Ca (1x) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) mit MgCl <sub>2</sub> , mit CaCl <sub>2</sub>	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
PenStrep: 10,000 U/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RPMI (1x) (Roswell Park Memorial Institute 1640) mit GlutaMAX™, HEPES	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA: 0,05 % Trypsin, 1x EDTA	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
VascuLife® Basal Medium	LifeLine Cell Technology, Frederick, MD, USA
VascuLife® LifeFactors® EnGs	LifeLine Cell Technology, Frederick, MD, USA
Versene: PBS/EDTA (1:5000)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Um ein optimales Wachstum aller Zellen zu gewährleisten, wurden für jede Zellart ein angepasstes Kultur- bzw. Einfriermedium verwendet (siehe Tabelle 6). Zum Auftauen der Zellen wurde jeweils das entsprechende Kulturmedium eingesetzt.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Medien für die Kultivierung und Konservierung der verwendeten Zellarten

Zellart	Zusammensetzung Kulturmedium	Zusammensetzung Einfriermedium
<b>Keratinocyten</b>	EpiLife® + 1 % HKGS + 1 % PenStrep	EpiLife® + 5 % HKGS + 1 % PenStrep + 10 % DMSO (siehe Tabelle 8)
<b>Fibroblasten</b>	DMEM + 10 % FBS + 1 % PenStrep	DMEM + 10 % FBS + 1 % PenStrep + 10 % DMSO
<b>Endothelzellen</b>	VascuLife® Basal Medium + VascuLife® LifeFactors® EnGs + 1 % PenStrep	VascuLife® Basal Medium + VascuLife® LifeFactors® EnGs + 1 % PenStrep + 10 % FBS + 10 % DMSO
<b>PBMCs</b>	RPMI + 10 % FBS + 1 % PenStrep	RPMI + 40 % FBS + 1 % PenStrep + 10 % DMSO

Während der Kultivierung der artifiziellen Hautmodelle konnten verschiedene Prozesse der Zelldifferenzierung innerhalb der Epidermis durch unterschiedliche Medienzusammensetzungen gesteuert werden. Entsprechend sind in Tabelle 7 die Medien für jede Kultivierungsphase aufgelistet.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der Medien für die Kultivierung von humanen artifiziellen Hautmodellen

Medium	Zusammensetzung	Phase der Kultivierung
<b>E1</b>	EpiLife® + 1 % HKGS + 1 % PenStrep	Kulturmedium für Keratinocyten in Zellkulturflaschen
<b>E2</b>	EpiLife® + 1 % HKGS + 1 % PenStrep + 1,44 mM CaCl <sub>2</sub>	Submers-Kultivierung (Hautmodelle vollständig mit Medium bedeckt)
<b>E3</b>	EpiLife® + 1 % HKGS + 1 % PenStrep + 1,44 mM CaCl <sub>2</sub> + 50 µg/ml Vitamin C	Grenzflächenkultivierung (Mediumspiegel unterhalb der Epidermis der Hautmodelle, Epidermis-Oberfläche frei von Medium)

## 2.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Kits

**Tabelle 8:** Chemikalien, Reagenzien und kommerziell erhältliche Kits

Beschreibung	Hersteller
Aqua dest. AmpuWa® Spüllösung	Fresenius KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dispase II: 0,5 U/mg	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
FACS Clean™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fibronektin	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung 4 % Roti®-Histofix: säurefrei (pH 7), phosphatgepuffert	Carl-Roth® GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
IFN-γ: recombinant, human	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Kollagen: Rattenschwanzkollagen Typ I in 0,1 % Essigsäure	zur Verfügung gestellt vom Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universitätsklinikum Würzburg, Eigenherstellung
Kollagenase: Typ A von Clostridium histolyticum	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Milliplex® Human Cytokine MAGNETIC Kit HCYTOMAG-60K-04	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
<sup>3</sup> H-Thymidin: 1 mCi (37 MBq)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland
Vi-Cell Reagent Quad Pak (Trypan Blue, Cleaning Agent, Buffer Solution, Disinfectant)	Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA
Vitamin C (Ascorbinsäure)	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland

## 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 9:** Antikörper für histologische Analysen

Antikörper	Klon	Katalognummer	Verdünnung	Hersteller
Mouse Anti-Human CD3	F7.2.38	M7254	1:20	Dako, Glostrup, Dänemark
Mouse Anti-Human CD4	4B12	IS649	gebrauchsfertig	Dako, Glostrup, Dänemark
Mouse Anti-Human CD8	C8/144B	M7103	1:100	Dako, Glostrup, Dänemark



**Tabelle 10:** Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Fluoro- chrom</b>	<b>Katalog- nummer</b>	<b>Volumen (*)</b>	<b>Hersteller</b>
Mouse Anti-Human <b>CD3</b>	SK7	IgG1κ	PerCP	344813	11,7 µl	Biologend Inc., San Diego, CA, USA
Mouse Anti-Human <b>CD25</b>	BC96	IgG1κ	APC	302610	10 µl	Biologend Inc., San Diego, CA, USA
Mouse Anti-Human <b>CD80</b>	2D10	IgG1κ	APC	130-097-204	11,7 µl	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse Anti-Human <b>CD86</b>	2331	IgG1κ	APC	555660	16,7 µl	BD Biosciences, San José, CA, USA
Mouse Anti-Human <b>HLA-ABC</b>	G46-2.6	IgG1κ	PE	555553	16,7 µl	BD Biosciences, San José, CA, USA
Mouse Anti-Human <b>HLA-DR</b>	G46-6	IgG2ακ	PE	555812	16,7 µl	Biologend Inc., San Diego, CA, USA
Mouse <b>IgG1κ</b>	MOPC-21		PE	555749		BD Biosciences, San José, CA, USA
Mouse <b>IgG1κ</b>	MOPC-21		APC	555751		BD Biosciences, San José, CA, USA

(\*) Angegeben ist das Antikörper-Volumen, welches zur Färbung von max.  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Färbevolumen von insgesamt 100 µl verwendet wurde.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturführung

Die Kultivierung der primären humanen Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup> bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit im entsprechenden Kulturmedium im Brutschrank. Zellzahlen wurden mithilfe des Vi-Cell™ XR bzw. mikroskopisch mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurde stets die Zellvitalität mittels Trypanblau-Färbung überprüft. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Kryokonservierung wurden alle Zellen im jeweiligen Einfriermedium aufgenommen (siehe Tabelle 6), schrittweise abgekühlt und bei -180 °C im flüssigen Stickstoff gelagert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten Medien und Puffer vorgewärmt auf 37 °C und steril benutzt.

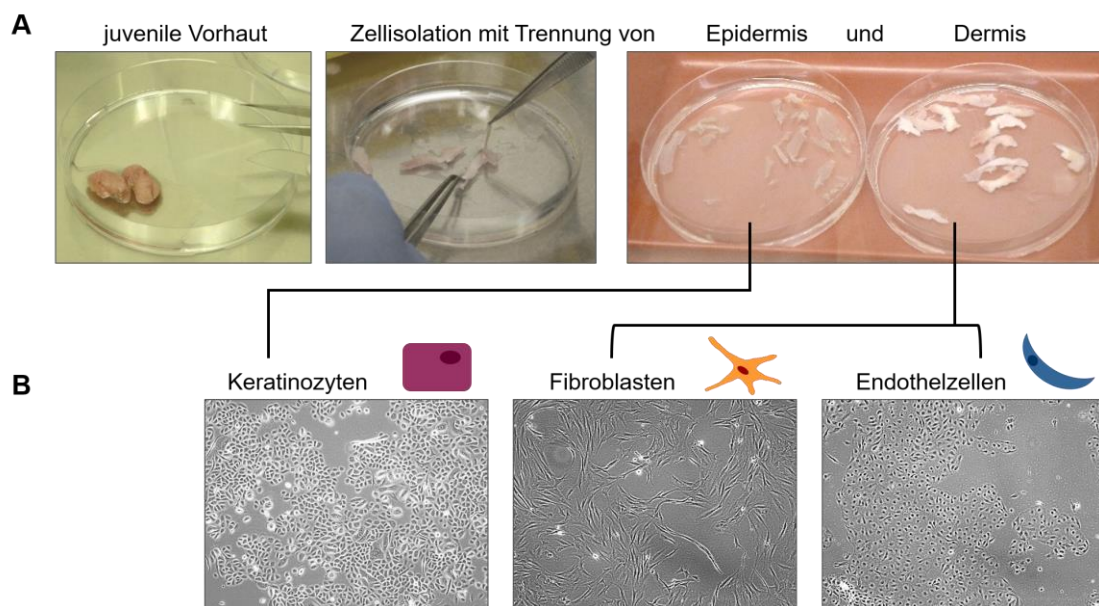
### 2.2.2 Isolation primärer humaner Zellen

Für die Isolation primärer Hautzellen wurden juvenile Präputien am Tag der Operation aufgearbeitet. Die Aufarbeitung erfolgte auf Grundlage bereits publizierter Protokolle (Pudlas *et al.*, 2011; Groeber *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2015) und ist zusammenfassend in Abbildung 5 dargestellt. Zunächst wurden die Präputien mehrfach in PBS+Mg/Ca gespült und von Fett- und Geweberesten befreit. Nach nochmaligem Spülen wurden die Biopsate zerkleinert, in PBS überführt und in Dispase-Lösung (2 U/ml) bei 4 °C inkubiert. Nach 16 bis 18 h erfolgte die Trennung der dermalen und epidermalen Teile der Biopsate. Die Dermis wurde zur Gewinnung von Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen, die Epidermis zur Gewinnung von Keratinozyten verwendet. Alle Kulturmedien sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Zur Isolation mikrovaskulärer Endothelzellen wurden die Dermisstücke mit Versene gespült und für 40 min mit 0,05 % Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FBS abgestoppt. Die Dermisstücke wurden in Endothelzell-Kulturmedium ausgestrichen und die auf diese Weise gewonnene Zellsuspension auf ein Zellsieb gegeben. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 300 x g wurde das Zellpellet in Endothelzell-Kulturmedium aufgenommen und im Brutschrank kultiviert.

Anschließend wurden die verbliebenen dermalen Teile des Biopsates zur Isolation von Fibroblasten verwendet. Dazu wurden sie mithilfe eines Skalpell stark zerkleinert und für 45 min mit Kollagenase (500 U/ml) bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (300 x g, 5 min) wurde das Pellet in 2 ml Kulturmedium aufgenommen und im Brutschrank kultiviert. Eine erste Zugabe von frischem Medium erfolgte frühestens nach 2 Tagen, ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte nach frühestens 4 Tagen. In dieser Zeit sollten die Zellkulturflaschen möglichst unberührt bleiben, um ein ungestörtes Auswachsen der Fibroblasten aus den Geweberesten zu gewährleisten.

Keratinocyten wurden aus dem epidermalen Teil der Biopsate isoliert, indem die zerkleinerten Stücke der Epidermis nicht länger als 5 min mit 0,05 % Trypsin/EDTA im Wärmebad bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert wurden. Die Reaktion wurde mit FBS abgestoppt. Nach Vereinzeln der Zellen durch starkes Resuspendieren wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb filtriert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 300 x g wurde das Zellpellet in Keratinocyten-Kulturmedium (E1, siehe Tabelle 7) aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und mit einer Zellkonzentration von maximal  $2,3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> im Brutschrank kultiviert. Der erste Mediumwechsel wurde bereits nach 4 h vorgenommen.



**Abbildung 5: Isolation primärer humaner Hautzellen aus Präputien**

**(A)** Keratinozyten, Fibroblasten und mikrovaskuläre Endothelzellen wurden aus juvenilen Präputien isoliert. Nach Entfernung der Fett- und Bindegewebsreste sowie der Behandlung mit Dispase konnte die Epidermis von der Dermis getrennt werden. **(B)** Aus der Epidermis konnten humane Keratinozyten gewonnen werden. Fibroblasten und Endothelzellen wurden aus der Dermis isoliert.

Für die Isolation von PBMCs wurde die angereicherte Leukozytenfraktion aus den LRS-Kammern mit PBS verdünnt, auf eine Trennlösung gegeben (Biocoll Separating Solution, Dichte 1,007 g/ml) und 30 min bei 1000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandene leukozytenreiche Interphase wurde vorsichtig abgenommen und zwei weiteren Waschschrritten mit PBS unterzogen (300 x g und 200 x g für jeweils 10 min). Anschließend wurden die Zellen im entsprechendem Medium bzw. Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

### **2.2.3 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen primärer humaner Zellen**

Das Medium der isolierten Keratinozyten wurde stets nach 2 bis 3 Tagen durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden eingefroren, wenn eine Konfluenz von 80 bis 90 % erreicht worden war und nicht mehr als 8 Tage vergangen waren. Dazu wurden die Keratinozyten 10 min mit Versene im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde das gleiche Volumen 0,05 % Trypsin/EDTA zugefügt, das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert und die Reaktion mit FBS abgestoppt. Nach der Zentrifugation (300 x g, 5 min) wurden die Keratinozyten in gekühltem Einfriermedium aufgenommen und maximal  $3 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren. Das Einfrieren der Keratinozyten erfolgte ohne FBS-Zugabe.

Ein vollständiger Mediumwechsel bei den Fibroblasten wurde frühestens 4 Tage nach Isolation vollzogen. Dafür wurden die Gewebereste mit PBS abgespült und frisches Medium zugegeben. Jeder weitere Mediumwechsel erfolgte stets nach 2 bis 3 Tagen durch einmaliges Spülen der adhärennten Zellen mit PBS und anschließender Mediumzugabe. Die Fibroblasten wuchsen in dichten Kolonien in naher Umgebung der Gewebereste. Um eine gleichmäßige Zellverteilung und höhere Zellzahl zu erhalten, wurden die Zellen abgelöst und auf neue Zellkulturflaschen verteilt (Split-Verhältnis 1:6). Dafür wurden die Fibroblasten mit PBS gespült und mit 0,05 % Trypsin/EDTA inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert und die Reaktion mit FBS abgestoppt. Nach der Zentrifugation (300 x g, 5 min) wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und eingesät. Spätestens 14 Tage nach Isolation sollten die Fibroblasten eine Konfluenz von 80 bis 90 % erreicht haben. Zum Einfrieren wurden die Zellen abgelöst, in gekühltem Einfriermedium aufgenommen und maximal  $2 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren.

Das Medium der isolierten Endothelzellen wurde ebenfalls stets nach 2 bis 3 Tagen gewechselt. Dafür wurden die Zellen zunächst 3 bis 5 min mit Versene inkubiert, um ein Überwachsen durch Fibroblasten zu verhindern. Anschließend wurde mit PBS gespült und frisches Kulturmedium zugegeben. Wenn eine Konfluenz von 80 bis 90 % erreicht worden war, wurden die Endothelzellen abgelöst und auf mehrere neue Zellkulturflaschen verteilt (Split-Verhältnis 1:9). Dabei wurden die Zellen mit Versene für 3 bis 5 min inkubiert. Danach wurde das Versene durch 0,05 % Trypsin/EDTA ersetzt und das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Die Reaktion wurde mit FBS abgestoppt. Nach der Zentrifugation (300 x g, 5 min) wurden die Endothelzellen in Kulturmedium aufgenommen und eingesät. Nach max. 7 Tagen sollten die Endothelzellen wieder eine Konfluenz von 80 bis 90 % erreicht haben. Zum Einfrieren wurden die Zellen abgelöst, in gekühltem Einfriermedium aufgenommen und maximal  $3 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren.

Das Auftauen der humanen Hautzellen erfolgte für alle drei Zellarten identisch. Die Kryoröhrchen wurden im Wärmebad aufgetaut und die Zellen in vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt in Zellkulturflaschen ausgesät und das Medium am darauffolgenden Tag gewechselt oder es folgte zunächst ein Zentrifugationsschritt (300 x g, 5 min) und ein Mediumwechsel erst nach 2 bis 3 Tagen. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $0,5-1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und das Medium alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

PBMCs wurden entweder direkt nach der Isolation für Experimente verwendet oder mit einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^7$  Zellen pro Kryoröhrchen im gekühlten Einfriermedium eingefroren. Frühestens ein Tag vor Verwendung im Experiment wurden die Zellen im Wärmebad aufgetaut. Danach wurden die Zellen zentrifugiert und in Kulturmedium oder PBS aufgenommen.

#### 2.2.4 IFN- $\gamma$ -Stimulation primärer humaner Zellen

Keratinocyten, Fibroblasten und Endothelzellen desselben Spenders wurden aufgetaut, kultiviert und bei einer Konfluenz von 60 bis 70 % stimuliert. Für die Stimulation wurden 20 ng/ml IFN- $\gamma$  in das Kulturmedium zugegeben. Als Vergleich wurden jeweils unstimulierte Kontrollen mitgeführt, in deren Kulturmedium nur das entsprechende Volumen Aqua dest. zugegeben wurde. Die Zellen wurden 48 h im Brutschrank inkubiert, bevor sie für die Experimente eingesetzt wurden.

#### 2.2.5 CFSE-Markierung von PBMCs

Zur Vorbereitung wurden die PBMCs zweimal mit PBS gewaschen und danach auf eine Zellkonzentration von max.  $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml in PBS eingestellt. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 2,5 bzw. 5  $\mu$ M CFSE für 8 min im Dunkeln bei 37 °C. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem das gleiche Volumen FBS zum Färbevolumen zugefügt und vermischt wurde. Nach zweiminütiger Inkubation wurde das doppelte Volumen RPMI-Medium mit 10 % FBS (in Bezug zum ursprünglichen Färbevolumen) dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und in CellGro® GMP DC Medium aufgenommen. Während des gesamten Vorganges und für spätere Arbeiten mit den markierten Zellen galt es, die Zellen möglichst wenig Licht auszusetzen, um die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes nicht zu verringern.

#### 2.2.6 Vorstimulation von PBMCs

Zur Erzeugung einer unspezifischen T-Zell-Antwort wurden CFSE-markierte oder nicht markierte PBMCs mit PMA/Ionomycin vorstimuliert. Die Stimulation erfolgte im Kulturmedium unter Zugabe von PMA/Ionomycin. Für die MLR wurden die PBMCs ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) für 2 h mit 50 ng/ml PMA und 2  $\mu$ g/ml Ionomycin im Brutschrank inkubiert. Für die Verwendung an den Hautmodellen wurden die PBMCs über Nacht stimuliert: Entweder mit 25 ng/ml PMA und 1  $\mu$ g/ml Ionomycin für die Kollagen-Hautmodelle ( $2 \times 10^6$  PBMCs/ml) oder mit 50 ng/ml PMA und 0,8  $\mu$ g/ml Ionomycin für die vaskularisierten Hautmodelle ( $1 \times 10^7$  PBMCs/ml). Es wurden stets unstimulierte Kontrollen mitgeführt. Zum Einsatz in den Experimenten wurden die PBMCs zweimal mit CellGro® GMP DC Medium gewaschen und auf die erwünschte Zellkonzentration eingestellt.

## 2.2.7 MLR

Bei einer klassischen „one-way“ MLR werden Lymphozyten unterschiedlicher Spender miteinander vermischt, wobei nur die Zellen eines Spenders („Responder“-Zellen) reagieren und proliferieren können. Die Proliferation der anderen Zellen, welche als „Stimulator“-Zellen dienen, wird gehemmt (z. B. durch Bestrahlung).

### 2.2.7.1 Versuchsvorbereitung

In Anlehnung daran wurden hier primäre humane Hautzellen als Stimulator-Zellen eingesetzt. Pro Ansatz wurden Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen jeweils desselben Spenders verwendet. Die Experimente wurden für mindestens drei Spender durchgeführt. Dabei wurden die Hautzellen, wie in Abschnitt 2.2.4 erläutert, für 48 h mit 20 ng/ml IFN- $\gamma$  behandelt und für die MLR mit einer Gesamtdosis von 30 Gy bestrahlt. Als Responder dienten PBMCs, welche mit 5  $\mu$ M CFSE markiert worden waren (siehe Abschnitt 2.2.5). Ein Teil der PBMCs wurde mit 50 ng/ml PMA und 2  $\mu$ g/ml Ionomycin über 2 h vorstimuliert, wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben. Die Responder-PBMCs wurden in drei verschiedenen Konditionen eingesetzt: unstimuliert, vorstimuliert mit PMA/Ionomycin oder stimuliert mit 3<sup>rd</sup>Party-Zellen (3rdP). Bei 3rdP handelte es sich um einen Mix aus allogenen PBMCs von fünf unterschiedlichen Spendern, welche mit einer Gesamtdosis von 30 Gy bestrahlt wurden. Unstimulierte PBMCs spiegelten dabei ruhende PBMCs wider. Durch PMA/Ionomycin-Behandlung wurde eine unspezifische Stimulation der PBMCs erreicht. Die 3rdP sollte eine antigenspezifische alloreaktive Immunantwort auslösen.

Der Einfluss der IFN- $\gamma$ -behandelten und bestrahlten Hautzellen auf die Proliferation der Responder-PBMCs wurde unter allen drei Bedingungen getestet. Eine Übersicht zur Zusammensetzung der einzelnen Reaktionen ist in Tabelle 11 zusammengefasst. Alle Responder- und Stimulator-Zellen wurden gewaschen und in CellGro<sup>®</sup> GMP DC Medium aufgenommen. Für die Reaktion wurde eine 96-Well round-bottom Mikrotiterplatte verwendet. Pro Well wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Responder- und Stimulator-Zellen eingesetzt. Jede Reaktion wurde in Triplikaten in einem Endvolumen von 200  $\mu$ l pro Well eingesät. Die MLR wurde anschließend 5 bis 9 Tage lang im Brutschrank inkubiert.

**Tabelle 11:** Responder- und Stimulator-Zellen in der MLR

Responder-PBMCs	Kontrolle	Stimulator-Zellen
unstimuliert (ruhend)	unstimulierte PBMCs + autologe, bestrahlte PBMCs	Keratinocyten ± IFN- $\gamma$ Fibroblasten ± IFN- $\gamma$ Endothelzellen ± IFN- $\gamma$
vorstimuliert mit PMA/Ionomycin (unspezifische Stimulation)	PMA/Ionomycin vorstimulierte PBMCs <i>alone</i>	Keratinocyten ± IFN- $\gamma$ Fibroblasten ± IFN- $\gamma$ Endothelzellen ± IFN- $\gamma$
stimuliert mit 3rdP (antigenspezifische Stimulation)	unstimulierte PBMCs + 3rdP	Keratinocyten ± IFN- $\gamma$ Fibroblasten ± IFN- $\gamma$ Endothelzellen ± IFN- $\gamma$

### 2.2.7.2 Proliferationsassay (CFSE-Verdünnung)

Die Proliferationsrate der Responder-PBMCs wurde mithilfe zweier unterschiedlicher Methoden analysiert. Zum einen wurde die Verdünnung der CFSE-Fluoreszenzintensität der sich teilenden PBMCs durchflusszytometrisch bestimmt. Bei jeder Zellteilung wird der Fluoreszenzfarbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Damit nimmt die Fluoreszenzintensität mit jeder Zellteilung ab. Bei einer hohen Teilungsrate können die verschiedenen Zellgenerationen im Durchflusszytometer identifiziert und der Anteil der proliferierenden Zellen ermittelt werden (Hilchey *et al.*, 2007). Die Fluoreszenzintensität der Responder-PBMCs wurde nach fünf, sieben und neun Tagen der MLR gemessen. Dafür wurden Wells derselben Bedingung vereint und die Responder-PBMCs bezüglich der Oberflächenmarker CD3, CD25 sowie der CFSE-Verdünnung durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abschnitt 2.2.12).

### 2.2.7.3 Proliferationsassay ( $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporation)

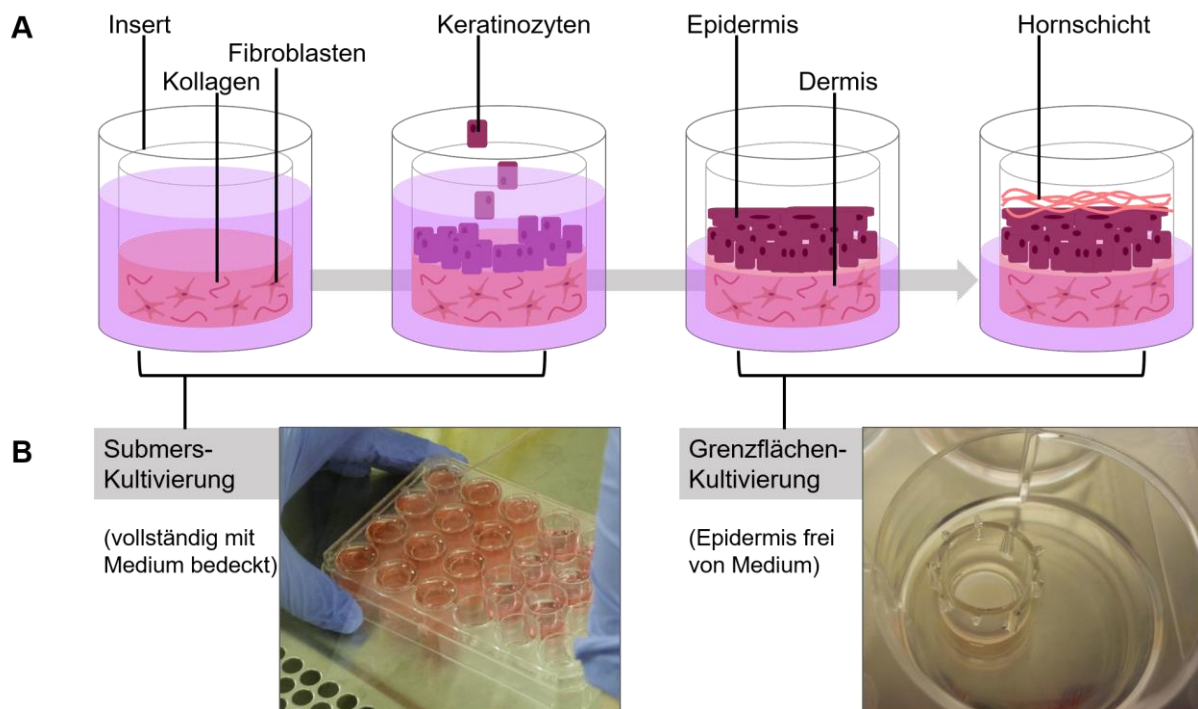
Die Proliferationsrate wurde zum anderen über den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin ( $^3\text{H}$ -Thymidin) in die DNA sich teilender Zellen analysiert. Dafür wurde 18 h vor der Analyse 1  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin pro Well zugegeben und im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Cell Harvester geerntet und die  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporation im Beta-Scintillation Counter bestimmt. Die Ergebnisse wurden als counts per minute (cpm) erfasst.



## 2.2.8 Herstellung humaner artifizierender Hautmodelle

### 2.2.8.1 Hautmodelle auf Basis einer Kollagen-Matrix

Für eine dreidimensionale Kultur benötigten die isolierten humanen Zellen eine vorgegebene Struktur, in der sie sich ausbreiten und adäquate Vernetzungen aufbauen konnten. Hierfür wurde Rattenschwanz-Kollagen Typ I (4 mg/ml) verwendet, welches als physiologischer Bestandteil der Extrazellulärmatrix geeignete Eigenschaften für das Wachstum der Fibroblasten in der Dermis bietet. Die Hautmodelle wurden in Transwell-Inserts mit einer Polycarbonat-Membran im 24-Well-Platten Format erstellt. Die Herstellung und Optimierung der Kollagen-Hautmodelle basieren auf bereits veröffentlichten Arbeiten (Rossi *et al.*, 2015; Lange *et al.*, 2016). Die unterschiedlichen Phasen der Herstellung und Kultivierung der Kollagen-Hautmodelle ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6: Herstellung humaner artifizierender Hautmodelle auf Basis einer Kollagen-Matrix**

**(A)** Die Kollagen-Hautmodelle wurden in Transwell-Inserts mit einer Polycarbonat-Membran im 24-Well-Platten Format erstellt. Ein Gemisch von humanen Fibroblasten und einer Kollagenlösung bildete den dermalen Teil des Hautmodells. Die Epidermis wurde anschließend aus humanen Keratinozyten aufgebaut. Während der nachfolgenden Kultivierung fand die epidermale Differenzierung bis hin zur Ausbildung der Hornschicht statt. **(B)** Zunächst erfolgte die Kultivierung der Kollagen-Hautmodelle submers, d. h. die Modelle waren vollständig mit Medium bedeckt. Für die Initiierung der epidermalen Differenzierung war es u. a. notwendig, die Epidermis an der Luft zu kultivieren. Dafür wurde der Mediumspiegel soweit gesenkt, dass die Epidermis frei von Medium kultiviert wurde und die Hautmodelle nur noch über die Membran des Inserts mit Medium versorgt wurden (Grenzflächenkultivierung).

Als erstes wurde die dermale Komponente hergestellt, indem  $1 \times 10^5$  Fibroblasten/ml in einer Gelneutralisationslösung aufgenommen und mit dem Kollagen (Verhältnis 2:3) möglichst luftblasenfrei vermischt wurden. Pro Insert wurden 500  $\mu$ l dieser Suspension möglichst schnell und ebenfalls luftblasenfrei zugegeben und anschließend im Brutschrank inkubiert. Bei 37 °C und aufgrund der pH-Wert-Verschiebung der sauren Kollagenlösung durch die basische Gelneutralisationslösung kommt es zu einer starken Quervernetzung der Kollagenfasern. Es entsteht eine gelartige Struktur im Insert. Nach 20 min wurde Fibroblasten-Kulturmedium zugegeben, sodass die Gele submers, d. h. vollständig von Medium bedeckt, kultiviert werden konnten.

24 h später wurde das Medium abgesaugt. Jedes Gel wurde mit 25  $\mu$ l Fibronectin (50  $\mu$ g/ml) bedeckt und 30 min im Brutschrank inkubiert. Keratinozyten desselben Spenders wurden in E2-Medium (siehe Tabelle 7) aufgenommen. Daraus wurden  $5 \times 10^5$  Keratinozyten/cm<sup>2</sup> in 300  $\mu$ l E2-Medium pro Gel aufgetragen und 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Gele wiederum mit E2-Medium submers gesetzt und im Brutschrank inkubiert. Nach weiteren 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Insert von 24-Well-Platten in 6-Well-Platten überführt. Mit einem sterilen Spatel wurde vorsichtig die Epidermis vom Insert-Rand abgelöst. Anschließend wurde E3-Medium in jedes Well gegeben. Der Mediumspiegel sollte dabei unterhalb der Epidermis liegen, sodass die Epidermis-Oberfläche an der Luft kultiviert wurde und die Nährstoffaufnahme nur von unten über die Membran des Inserts erfolgte (Grenzflächenkultivierung). Die Hautmodelle wurden nun ca. 14 Tage an der Grenzfläche unter statischen Bedingungen kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte regelmäßig alle 2 bis 3 Tage mit E3-Medium. Die Kultivierung an der Grenzfläche war Voraussetzung für die physiologische Differenzierung der Epidermis und letztendlich die Ausbildung der Hornschicht.

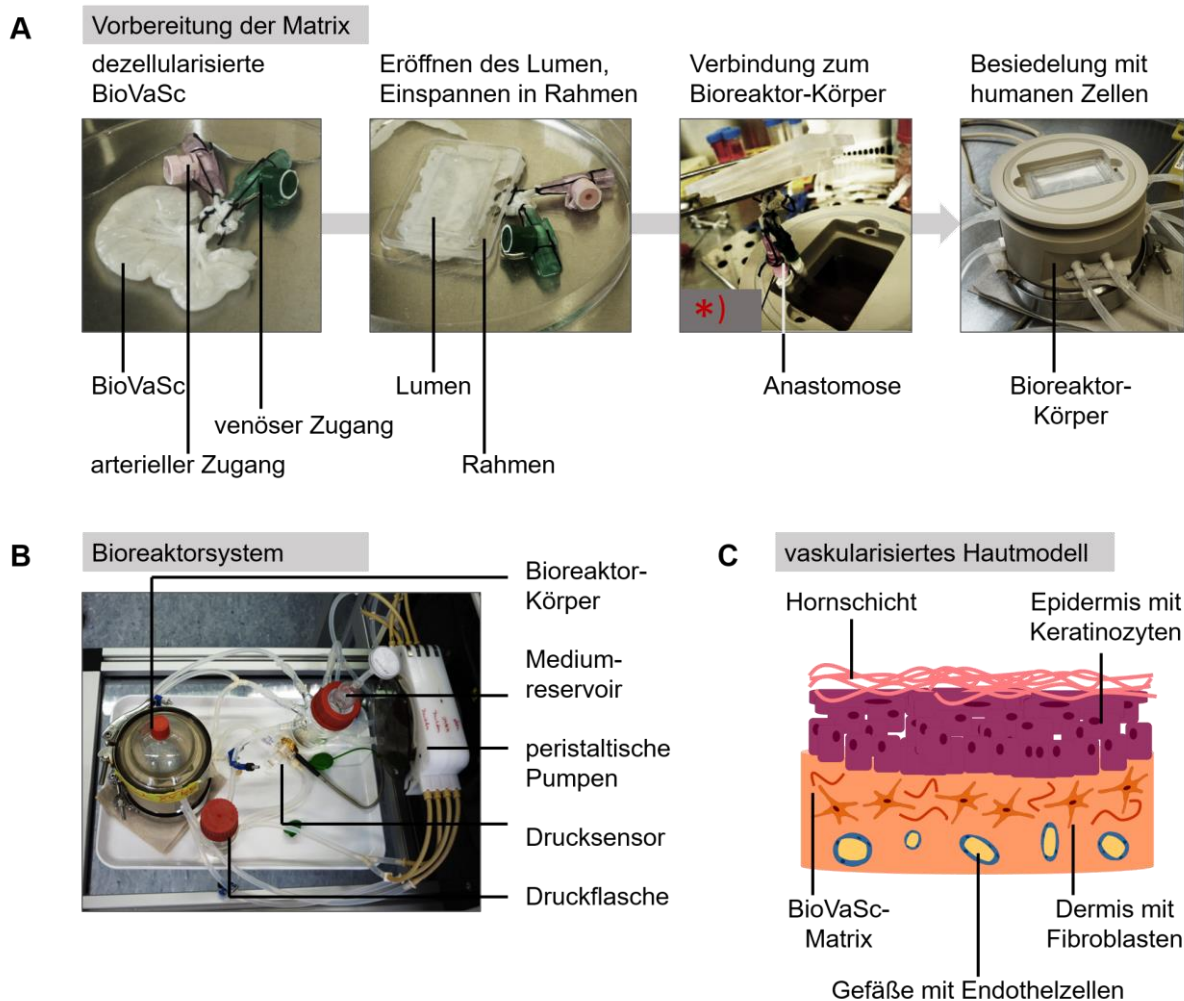
### 2.2.8.2 Vaskularisierte Hautmodelle auf Basis der BioVaSc-Matrix

Im Vergleich zu Hautmodellen auf Kollagen-Basis bot die BioVaSc-Matrix (biological vascularized scaffold) die Möglichkeit der Kultivierung unter dynamischen Bedingungen in einem Bioreaktor-System. Dabei handelte es sich um ein dezellularisiertes, vaskularisiertes Stück porcinen Dünndarms, wobei die Gefäßstrukturen mit einem arteriellen und venösen Zugang erhalten blieben (Mertsching *et al.*, 2009; Groeber *et al.*, 2013). Durch den Einsatz von Pumpen konnten im Gefäßsystem der Matrix physiologische Druckbedingungen geschaffen werden (Groeber *et al.*, 2016). Grundlage für diese Technologie bildete ein Bioreaktor-Körper, der über ein Schlauchsystem mit Medium-Reservoirs verbunden wurde. Die BioVaSc-Matrix sowie das Bioreaktor- und Inkubationssystem wurden uns vom Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde die BioVaSc für die Neubesiedelung mit humanen Zellen vorbereitet. Dafür wurde das Darmrohr der Matrix aufgeschnitten und das Lumen geöffnet. Nun wurde die Matrix in einen desinfizierten Polycarbonat-Rahmen eingespannt (siehe Abbildung 7A). Dabei war darauf zu achten, dass das Darmlumen die Oberfläche im Rahmen bildete und alle Gefäße mit eingeschlossen wurden. Dies konnte überprüft werden, indem Endothelzell-Kulturmedium in den arteriellen Zugang der BioVaSc eingespritzt und der Austritt des Mediums über das Lumen und den venösen Zugang beobachtet wurde. Nach mehrfachem Spülen des Gefäßsystems wurde die Matrix in einer Petrischale über Nacht mit Endothelzell-Kulturmedium im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Matrix wiederum dreimal mit Endothelzell-Kulturmedium gespült.

Für die Neubesiedelung wurden primäre humane Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (isoliert von einem Spender) verwendet. Zuerst wurden Endothelzellen abgelöst und in Endothelzell-Kulturmedium mit einer Konzentration von  $10 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen. Davon wurden  $7 \times 10^6$  Zellen in den arteriellen Zugang der BioVaSc eingebracht und  $3 \times 10^6$  Zellen in den venösen Zugang, gefolgt von einer dreistündigen Inkubation in Endothelzell-Kulturmedium im Brutschrank. Im nächsten Schritt wurde die Matrix mit dem Bioreaktor-System verknüpft. Die sterilen Bestandteile des Bioreaktors wurden zuvor zusammengesetzt und das System mit Endothelzell-Kulturmedium befüllt (ca. 250 ml Mediumvolumen).

Die Anastomose der BioVaSc erfolgte über die Verbindung des arteriellen und venösen Zugangs an das Schlauchsystem des Bioreaktors unter sterilen Bedingungen. Der Polycarbonat-Rahmen wurde befestigt, sodass das Lumen der BioVaSc als Oberfläche für die Besiedelung mit Hautzellen dienen konnte. Fibroblasten wurden abgelöst und in Endothelzell-Kulturmedium mit aufgenommen. Auf die Oberfläche der BioVaSc wurden  $0,89 \times 10^6$  Zellen aufgetragen und der gesamte Bioreaktor im Inkubatorsystem bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit für 2 h inkubiert.



**Abbildung 7: Herstellung humaner artifizierender Hautmodelle auf Basis der BioVaSc-Matrix**

(A) Als Matrix für das vaskularisierte Hautmodell diente ein Stück porcinen Dünndarms. Vor der Neubesiedelung mit primären humanen Hautzellen wurde die Matrix in einen Polycarbonat-Rahmen eingespannt, sodass das Lumen der Matrix als Oberfläche für das Hautmodell genutzt werden konnte. Über die erhaltenen arteriellen und venösen Zugänge konnte das Gefäßsystem der BioVaSc mit dem Bioreaktor-Körper verbunden werden. (B) Dies ermöglichte das Anschließen an einen Mediumkreislauf und die Kultivierung unter physiologischen Druckbedingungen. (C) Das vaskularisierte Hautmodell konnte in den Submers- und Grenzflächenphasen kultiviert werden, sodass der Aufbau einer mehrschichtigen Epidermis mit entsprechenden Differenzierungsstadien bis hin zur Hornschicht gewährleistet wurde. \*) Modifiziert nach (Groeber *et al.*, 2013), schriftliche Genehmigung vorliegend.

Anschließend wurden die Pumpschläuche angelegt und die peristaltischen Pumpen gestartet (siehe Abbildung 7B). Der Kreislauf, der für die Versorgung der Matrix auf der Oberfläche verantwortlich war, wurde dabei noch nicht angeschlossen, damit die Fibroblasten noch besser anhaften konnten. Das Schlauchsystem, insbesondere aber die Schläuche des arteriellen Zugangs mit Drucksensor, sollte unbedingt frei von Luftblasen sein. Es war außerdem wichtig, dass zunächst nur mit geringem Druck von 10 mmHg gearbeitet wurde. In regelmäßigen Abständen wurde nun der Druck erhöht auf 100 mmHg mit  $\pm 20$  mmHg Amplitude. Währenddessen konnte auch der Kreislauf für die Versorgung der Matrix-Oberfläche geöffnet werden, sodass die Matrix submers kultiviert werden konnte.

Nach 5 Tagen erfolgte ein vollständiger Medienwechsel des Bioreaktors zu E2-Medium. Die Oberfläche der BioVaSc wurde für 1 h mit 560  $\mu$ l Fibronectin (50  $\mu$ g/ml) bedeckt. In der Zwischenzeit wurden Keratinozyten in E2-Medium aufgenommen und  $4 \times 10^6$  Zellen auf die Matrix aufgebracht. Nach dreistündiger Inkubation wurden die Pumpen wieder gestartet und die Matrix submers kultiviert.

Für die Grenzflächen-Kultivierung wurde nach 3 Tagen ein vollständiger Medienwechsel zu E3-Medium vorgenommen. Bei der anschließenden Kultivierung wurde der Medienstand im Reaktorgefäße so eingestellt, dass die Oberfläche der Matrix nicht mit Medium bedeckt wurde und die Epidermis an der Luft lag. Die Versorgung der Matrix erfolgte somit nur durch den unteren Bereich des Reaktorgefäßes und über die Gefäßstrukturen (siehe Abbildung 7C). Das Hautmodell wurde nun weitere 11 bis 14 Tage an der Grenzfläche kultiviert, wobei das Medium ca. alle 6 Tage gewechselt wurde.

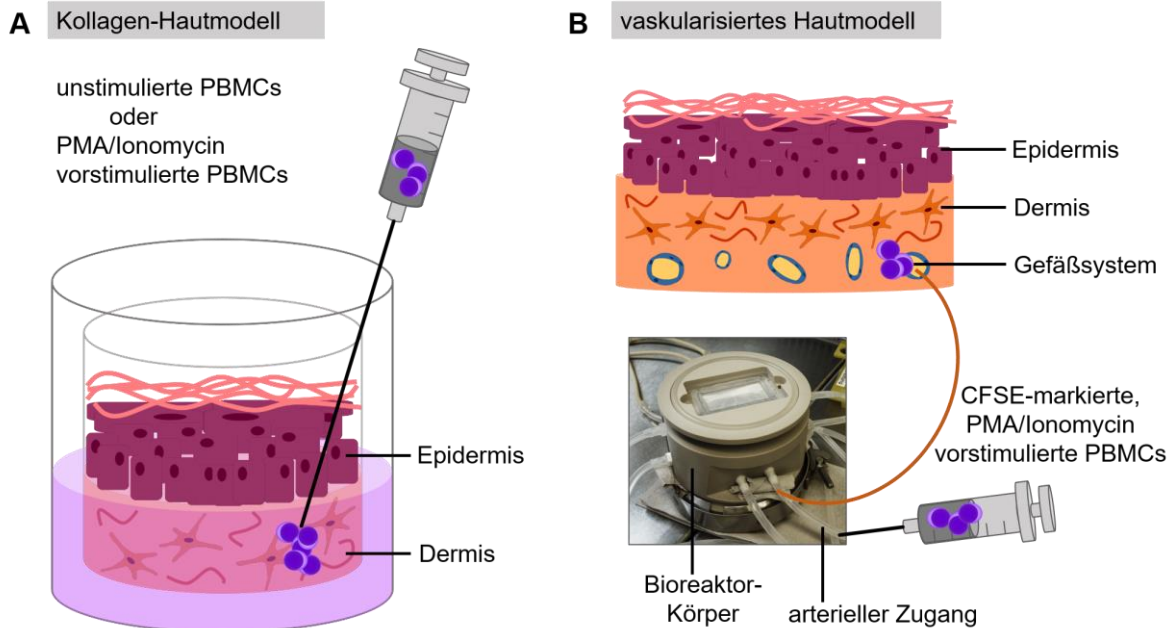
## 2.2.9 Induktion von Gewebeschäden in humanen artifiziellen Hautmodellen

### 2.2.9.1 Gewebeschäden in Kollagen-Hautmodellen

Um eine Reaktion im Gewebe der Hautmodelle hervorzurufen, sollten allogene PBMCs in die dermale Komponente der Modelle eingebracht werden. Die PBMCs wurden entweder über Nacht vorstimuliert mit 25 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin (siehe Abschnitt 2.2.6) oder verblieben unstimuliert. Danach wurden die PBMCs zweimal gewaschen, wobei zuvor Mediumüberstände jeweils der unstimulierten und vorstimulierten PBMCs abgenommen wurden. Die PBMCs wurden in CellGro® GMP DC Medium mit einer Konzentration von  $4 \times 10^7$  Zellen/ml aufgenommen.

Anschließend wurde das Medium der Kollagen-Hautmodelle abgesaugt, die sich über 13 Tage in der Grenzflächenkultur befanden. Die PBMCs wurden nun mithilfe einer Insulinspritze in die Dermis der Hautmodelle eingespritzt (siehe Abbildung 8A). Pro Hautmodell wurden 25 µl an zwei Stellen mit einer Gesamtzahl von  $2 \times 10^6$  PBMCs eingebracht. Es war zu beachten, dass bei diesem Schritt die Epidermis durch die mechanische Belastung nicht abgerissen wurde. Zur Überprüfung, inwieweit diese Maßnahmen Einfluss nehmen würden auf die Morphologie der Hautmodelle, wurden Kontrollen mitgeführt, in denen ausschließlich CellGro® GMP DC Medium eingespritzt wurde (Mediumkontrolle). Pro Bedingung wurden 3 Hautmodelle behandelt: Mediumkontrolle, Einspritzen von unstimulierten PBMCs oder Einspritzen von vorstimulierten PBMCs. Zuletzt wurde CellGro® GMP DC Medium als Kulturmedium in die Wells gegeben, wobei wiederum die Kultivierung an der Grenzfläche stattfand. Zusätzlich wurden zwei weitere Bedingungen getestet. Dafür wurden jeweils die Mediumüberstände der unstimulierten bzw. vorstimulierten PBMCs verwendet, welche vor der Einbringung in die Hautmodelle gesammelt worden waren (siehe oben). Diese Mediumüberstände wurden ebenfalls in die Dermis der Hautmodelle eingespritzt (2x 25 µl pro Modell) und als Kulturmedium für diese entsprechenden Hautmodelle in der Grenzflächenkultivierung eingesetzt.

Zur Auswertung wurden nach 48 h Inkubation im Brutschrank Mediumüberstände der Hautmodelle für die Zytokinbestimmung abgenommen und bei -80 °C gelagert (siehe Abschnitt 2.2.11) sowie die histologische Aufarbeitung der Hautmodelle vorgenommen (siehe Abschnitt 2.2.10).



**Abbildung 8: Induktion von Gewebeschäden in humanen artifiziellen Hautmodellen**

**(A)** Nach vollständiger Ausreifung der Kollagen-Hautmodelle wurden unstimulierte oder mit PMA/Ionomycin vorstimulierte PBMCs in die Dermis eingespritzt und die Hautmodelle über 48 h weiterkultiviert. Anschließend erfolgte eine histologische Aufarbeitung zur Bewertung des Gewebeschadens. Als Kontrolle dienten Hautmodelle, bei denen lediglich Medium appliziert wurde. **(B)** Um in den vaskularisierten Hautmodellen Gewebeschäden hervorzurufen, wurden CFSE-markierte und mit PMA/Ionomycin vorstimulierte PBMCs in das Kreislaufsystem des Bioreaktors appliziert. Die Hautmodelle wurden über 48, 72 oder 96 h weiterkultiviert und anschließend histologisch beurteilt. Ein zweiter Bioreaktor, in den ausschließlich Medium appliziert wurde, diente jeweils als Kontrolle.

### 2.2.9.2 Gewebeschäden in vaskularisierten Hautmodellen

Aufgrund der Komplexität des vaskularisierten Hautmodells konnten hier nur zwei parallel laufende Bioreaktoren getestet werden. Allogene PBMCs wurden direkt nach der Isolation verwendet. Nach der Markierung mit  $2,5 \mu\text{M}$  CFSE wurden alle PBMCs über Nacht vorstimuliert mit  $50 \text{ ng/ml}$  PMA sowie  $0,8 \mu\text{g/ml}$  Ionomycin (siehe Abschnitt 2.2.5 und 2.2.6). Nur ein kleiner Anteil verblieb für spätere durchflusszytometrische Analysen unstimuliert. Vor der Einbringung in das Hautmodell wurden die PBMCs zweimal gewaschen und alle Zellen in  $1 \text{ ml}$  CellGro<sup>®</sup> GMP DC Medium aufgenommen.

Die vaskularisierten Hautmodelle, die sich nun 11 bis 14 Tage in der Grenzflächenkultur befanden, wurden einem vollständigen Mediumwechsel zu CellGro<sup>®</sup> GMP DC Medium unterzogen. In einen Bioreaktor wurden jeweils  $1,5$  bis  $2 \times 10^8$  PBMCs in  $500 \mu\text{l}$  in den arteriellen Zugang der BioVaSc-Matrix injiziert sowie in die

Druckflasche gegeben (siehe Abbildung 8B). Ein Magnetrührer gewährleistete die gleichmäßige Durchmischung des Mediums mit den zugegebenen PBMCs und damit eine ausreichende Zirkulation der PBMCs. Als Kontrolle wurden in einem zweiten Bioreaktor je 500 µl CellGro® GMP DC Medium in den arteriellen Zugang injiziert sowie in die Druckflasche gegeben (Mediumkontrolle). Anschließend wurden die Pumpen für beide Bioreaktoren wieder gestartet und die Hautmodelle in der Grenzflächenkultivierung gehalten.

Direkt bei Zugabe der vorstimulierten PBMCs bzw. des Mediums (Zeitpunkt 0 h) wurden 4x 200 µl Mediumüberstand aus den Mediumreservoirs der Bioreaktoren entnommen und für die Zytokinmessung bei -80 °C gelagert (siehe Abschnitt 2.2.11). Weitere Mediumüberstände wurden nach 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h entnommen und bei -80 °C gelagert (die letzten beiden Zeitpunkte falls durchgeführt). Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Bei allen vaskularisierten Hautmodellen wurde derselbe Hautzell-Spender verwendet, aber pro Versuch wurden PBMCs eines anderen Spenders eingesetzt. Nach der Zugabe der PBMCs wurden die Bioreaktoren über 48 h, 72 h oder 96 h kultiviert und dann abgestoppt. Für den 72 h-Versuch musste der Kontrollreaktor zu einem anderen Zeitpunkt nachgeholt werden. Zum Abstoppen wurde die Matrix aus dem Rahmen gelöst und histologisch aufgearbeitet (siehe Abschnitt 2.2.10). In der Zirkulation verbliebene PBMCs wurden bezüglich der Oberflächenmarker CD3, CD25 sowie der CFSE-Verdünnung durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abschnitt 2.2.12).

### **2.2.10 Histologische Analysen**

Die Kollagen-Hautmodelle wurden für ca. 2 h in Roti®-Histofix fixiert und anschließend in Einbettkassetten überführt. Die Fixierung der vaskularisierten Hautmodelle erfolgte über Nacht. Alle Hautmodelle wurden im Einbettautomaten in Paraffin überführt und anschließend in einem Paraffin-Block eingegossen. Danach konnten histologische Schnitte von 4 µm Dicke hergestellt werden. Die getrockneten Schnitte wurden im Labor der Dermatohistopathologie und Immunhistochemie des Universitätsklinikums Würzburg gefärbt. Als Übersichtsfärbung wurden HE-Färbungen vorgenommen.



Außerdem wurden immunhistochemische Färbungen für die Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 durchgeführt (siehe Tabelle 9). Mikroskopische Aufnahmen wurden in 100- und 400facher Vergrößerung mit Biorevo Keyence BZ-9000 angefertigt.

### **2.2.11 Zytokinmessung**

Die Zytokinspiegel in Kulturmediumüberständen wurden mittels LUMINEX®-Technologie ermittelt. Es wurden die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17 und TNF- $\alpha$  bestimmt. Dafür wurde das Milliplex Human Cytokine MAGNETIC Kit HCYTOMAG-60K-04 verwendet. Für die Herstellung der Standardreihe wurde das CellGro® GMP DC Medium eingesetzt. Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben und wurde in der Forschungsabteilung für Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt.

### **2.2.12 Durchflusszytometrie**

Die Expression von Oberflächenmolekülen auf primären humanen Hautzellen sowie PBMCs wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dafür wurden die Zellen mit PBS + 0,1 % FBS gewaschen (Zentrifugation 500 x g, 5 min) und mit folgenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern im Dunkeln gefärbt (15 min, 4 °C): CD3 PerCP, CD25 APC, CD80 APC, CD86 APC, HLA-ABC PE und HLA-DR PE (siehe Tabelle 10). Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS + 0,1 % FBS (Zentrifugation 500 x g, 5 min) und die Aufnahme der Zellen in PBS.

Die gefärbten Zellen wurden mit einem BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer analysiert und zunächst bezüglich ihrer Vitalität anhand der Größe (FSC, engl. *forward scatter*) und Granularität (SSC, engl. *side scatter*) bewertet. PBMCs wurden außerdem erst hinsichtlich des T-Zell-Markers CD3 untersucht, bevor die Analyse der CFSE-Verdünnung und des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD25 folgte (Gating auf CD3-positive Populationen). Die Daten wurden mit der Software FlowJo® v10 (Tree Star, Ashland, OR, USA) ausgewertet.

### **2.2.13 Statistische Analysen**

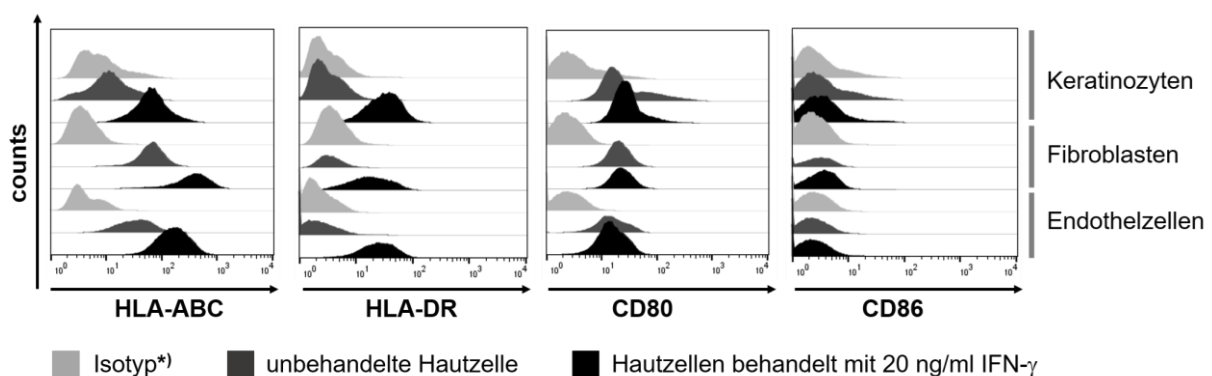
Für die Darstellung und die statistische Auswertung der Daten wurde die Software GraphPad Prism v5.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Die Daten wurden je nach Größe der Stichprobe mit dem D'Agostino & Pearson omnibus normality Test, dem Kolomogrov-Smirnov Test oder dem Shapiro-Wilk normality Test auf Normalverteilung überprüft. Nicht normal verteilte Daten wurden mit nichtparametrischen Testfahren analysiert (Mann-Whitney *U* Test). Ein *p*-Wert < 0,05 wurde für einen statistisch signifikanten Unterschied angenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunmodulatorische Eigenschaften von primären humanen Hautzellen

##### 3.1.1 Oberflächenexpression immunmodulatorischer Moleküle auf primären humanen Hautzellen

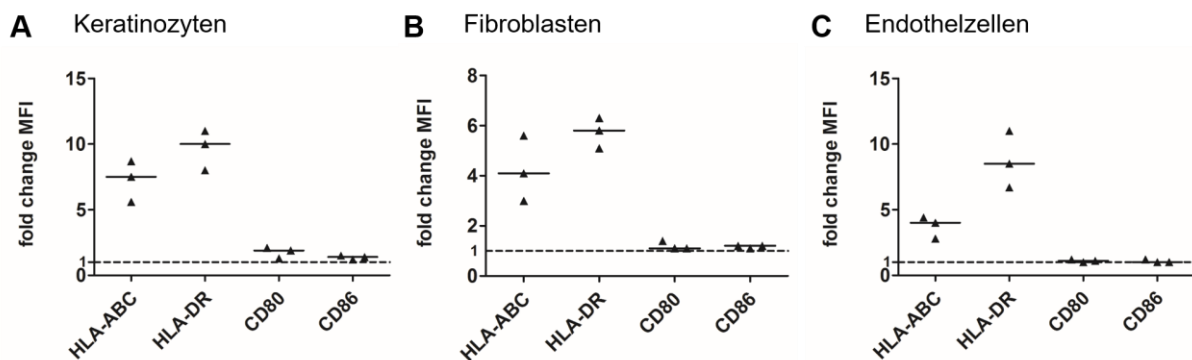
Zuerst sollte die Fähigkeit von primären humanen Hautzellen, eine Immunantwort zu induzieren, untersucht werden. Im menschlichen Immunsystem sind in der Regel professionelle antigenpräsentierende Zellen hämatopoetischen Ursprungs für die Stimulation von T-Lymphozyten verantwortlich. Im Rahmen einer inflammatorischen Situation während einer GvHD wird die Beteiligung nicht-hämatopoetischer antigenpräsentierender Zellen diskutiert (van Dijk *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2009; Koyama *et al.*, 2011). Deshalb wurden primäre humane Hautzellen auf eine für die T-Zell-Aktivierung notwendige Expression relevanter Oberflächenmoleküle untersucht. Auf humanen Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen konnte eine basale Expression von HLA-ABC und CD80 nachgewiesen werden. Die Moleküle HLA-DR und CD86 wurden nicht exprimiert. Durch Behandlung mit dem proinflammatorischen Zytokin IFN- $\gamma$  konnte die Expression von HLA-DR auf allen Zellarten induziert werden (siehe Abbildung 9). Außerdem konnte die Expression von HLA-ABC auf Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen durch IFN- $\gamma$  erhöht werden. Die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 wurde durch die Behandlung mit IFN- $\gamma$  jedoch nicht verändert.



**Abbildung 9: Expression immunrelevanter Moleküle auf der Oberfläche von primären humanen Hautzellen**

Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen wurden über 48 h mit 20 ng/ml IFN- $\gamma$  behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Histogramme zeigen repräsentative Beispiele der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenexpression von HLA-ABC, HLA-DR, CD80 und CD86. Diese Daten wurden von Herrn Lukas Freund im Rahmen seiner Masterarbeit erhoben. \*) Falls keine Isotyp-Kontrolle verfügbar war, wurden ungefärbte Zellen als Kontrolle verwendet.

Die Auswertung der relativen Veränderung der Oberflächenexpression (fold change) bestätigte die qualitative Analyse der durchflusszytometrischen Daten (siehe Abbildung 10A-C). Die Expression von HLA-ABC auf Keratinozyten wurde durch IFN- $\gamma$  um das Sechsfache gesteigert. Die durch IFN- $\gamma$  induzierte stärkste Expression wurde für HLA-DR auf Keratinozyten und Endothelzellen mit einer bis zu zehnfachen Erhöhung der MFI (engl. *mean fluorescent intensity*) nachgewiesen.



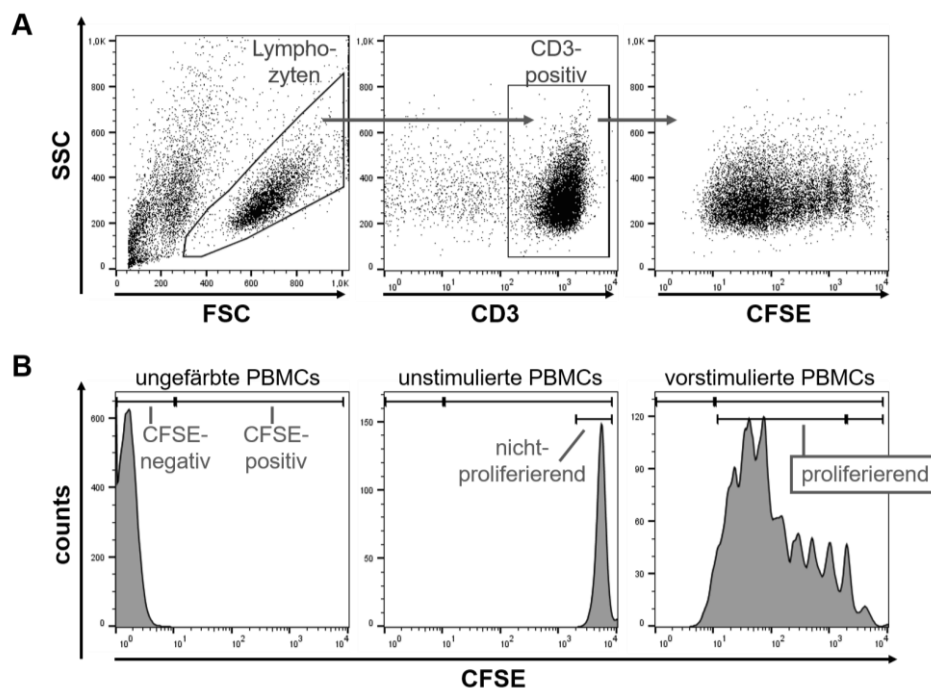
**Abbildung 10: Veränderung der Oberflächenexpression immunrelevanter Moleküle auf primären humanen Hautzellen**

Relative Veränderung (fold change MFI) der Oberflächenexpression von HLA-ABC, HLA-DR, CD80 und CD86 auf **(A)** Keratinozyten, **(B)** Fibroblasten und **(C)** Endothelzellen. Für die Berechnung der relativen Veränderung wurde die Expression nach Behandlung mit 20 ng/ml IFN- $\gamma$  über 48 h auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Werte für die relative Veränderung für unterschiedliche Hautspender ( $n=3$ ) sowie der Median der drei Experimente (waagerechte Linie). Die horizontale gestrichelte Linie markiert den Wert fold change MFI = 1, d. h. es liegt keine Veränderung der Expression vor. Diese Daten wurden von Herrn Lukas Freund im Rahmen seiner Masterarbeit erhoben.

Diese Daten zeigen, dass primäre humane Hautzellen einerseits in der Lage waren, die für die Antigenpräsentation notwendigen Moleküle HLA-ABC und HLA-DR unter inflammatorischen Bedingungen zu exprimieren. Andererseits verfügten Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen über eine nur basale bzw. fehlende Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 bzw. CD86, welche nicht durch IFN- $\gamma$  beeinflusst werden konnte.

### 3.1.2 Einfluss von primären humanen Hautzellen auf die Proliferation von allogenen PBMCs

Ein immunstimulierendes Potential der primären humanen Hautzellen wurde nun in funktionalen Proliferationsassays untersucht. Dafür wurden Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen in einer MLR als Stimulatoren eingesetzt. Da eine IFN- $\gamma$ -vermittelte Überexpression von HLA-ABC und HLA-DR auf primären humanen Hautzellen beobachtet wurde, wurden die Hautzellen ebenfalls mit oder ohne IFN- $\gamma$ -Behandlung eingesetzt. Die proliferationsinduzierende Fähigkeit der Hautzellen wurde an allogenen PBMCs mit zufälligen HLA-Mismatches durch CFSE-Markierung und  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporation bestimmt. Die Bestimmung der Proliferationsrate anhand der CFSE-Markierung bot die Möglichkeit, proliferierende und nicht-proliferierende Populationen zu unterscheiden (siehe Abbildung 11). Zudem konnten CD3-positive T-Lymphozyten in der Analyse differenziert betrachtet werden.



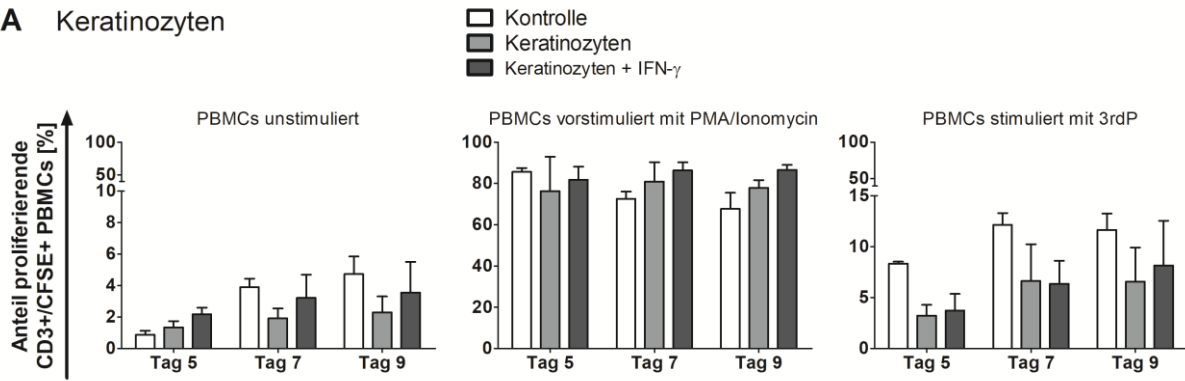
**Abbildung 11: Auswertungsstrategie zur Bestimmung der Proliferationsrate im Proliferationsassay mit CFSE-Verdünnung**

Repräsentative Beispiele zeigen die Proliferationsmuster von PBMCs in der durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung der Proliferationsrate. **(A)** Zuerst wurde die Lymphozyten-Population unter Berücksichtigung der Zellgröße (FSC) und -granularität (SSC) eingegrenzt (links). In dieser Population wurden CD3-positive Zellen bestimmt (Mitte). CD3-positive PBMCs wurden anschließend bezüglich der CFSE-Verdünnung untersucht (rechts). **(B)** Anhand einer ungefärbten Kontrolle konnten CFSE-negative Populationen ausgeschlossen werden (links). Die CFSE-positive Fraktion konnte außerdem anhand von unstimulierten (Mitte) und mit PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs (rechts) unterteilt werden in: nicht-proliferierende Zellen ohne Zellteilung und proliferierende Zellen, die sich mindestens einmal geteilt haben. Für die Auswertung der Proliferationsrate wurde der prozentuale Anteil der CD3-positiven, CFSE-positiven, proliferierenden PBMCs herangezogen.

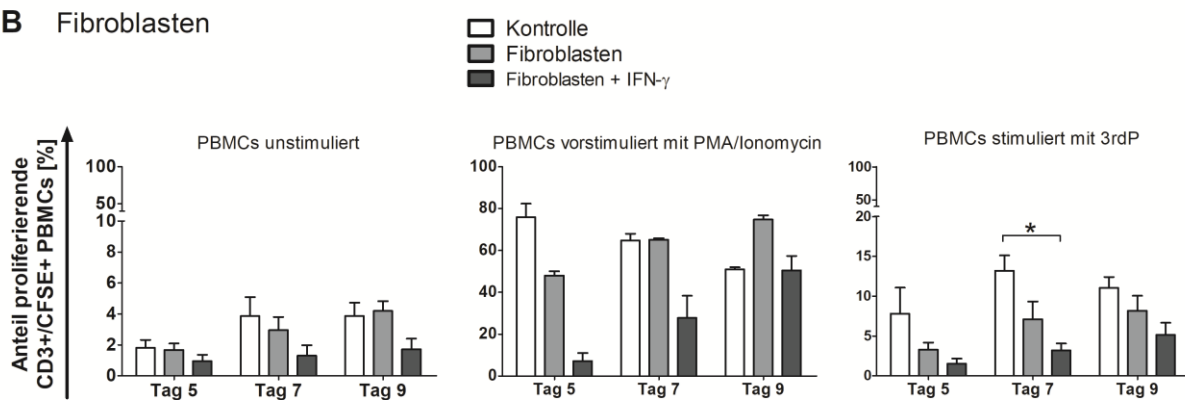
Für die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurden die CD3-positiven sowie CFSE-positiven, proliferierenden Populationen nach 5, 7 und 9 Tagen berücksichtigt. Zur Unterscheidung verschiedener Aktivierungswege wurden die allogenen PBMCs unstimuliert, mit PMA/Ionomycin vorstimuliert (unspezifische Stimulation) oder mit 3rdP stimuliert (antigenspezifische Stimulation) eingesetzt. Keratinozyten beeinflussten nicht die Proliferation der PBMCs in der MLR, und zwar unabhängig vom Aktivierungszustand der PBMCs (siehe Abbildung 12A). Einzig für 3rdP-stimulierte PBMCs waren Tendenzen einer Suppression der PBMC-Proliferation erkennbar. Dieser Unterschied war nicht signifikant zur Kontrolle und auch nicht mit IFN- $\gamma$ -vorbehandelten Keratinozyten zu steigern. Ein ähnliches Ergebnis zeichnete sich bei den Fibroblasten ab. Es konnte kein Einfluss der allogenen Fibroblasten auf die Proliferation unstimulierter und mit PMA/Ionomycin vorstimulierter PBMCs mit einem statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden (siehe Abbildung 12B). Dagegen war für 3rdP-stimulierte PBMCs eine Suppression der Proliferation durch Fibroblasten nachzuweisen, die durch eine IFN- $\gamma$ -behandelte Fibroblasten noch verstärkt wurde. Der Unterschied zur Kontrolle war an Tag 7 signifikant ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney  $U$  Test). Im Gegensatz zu Keratinozyten und Fibroblasten verstärkten Endothelzellen die Proliferation von PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs (siehe Abbildung 12C). Der Unterschied zur Kontrolle war nach 7 und 9 Tagen in Kultur signifikant ( $p < 0,01$ , Mann-Whitney  $U$  Test). Eine signifikante Steigerung der Proliferation war auch für 3rdP-stimulierte PBMCs an Tag 5 nachzuweisen ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney  $U$  Test). Mit IFN- $\gamma$ -vorbehandelte Endothelzellen führten zu keiner zusätzlichen Steigerung der PBMC-Proliferation. Auf die Proliferation unstimulierter PBMCs hatten Endothelzellen und mit IFN- $\gamma$ -vorbehandelte Endothelzellen keinen Einfluss.

Keratinozyten und Fibroblasten, nicht aber Endothelzellen, zeigten eine Suppression der PBMC-Proliferation im CFSE-Proliferationsassay. Im Gegensatz zu diesen beiden Zelltypen führten Endothelzellen zu einer leichten, aber signifikanten Steigerung der Proliferation allogener PBMCs. Die Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  beeinflusste nicht wesentlich die immunmodulatorischen Eigenschaften der drei Zellarten.

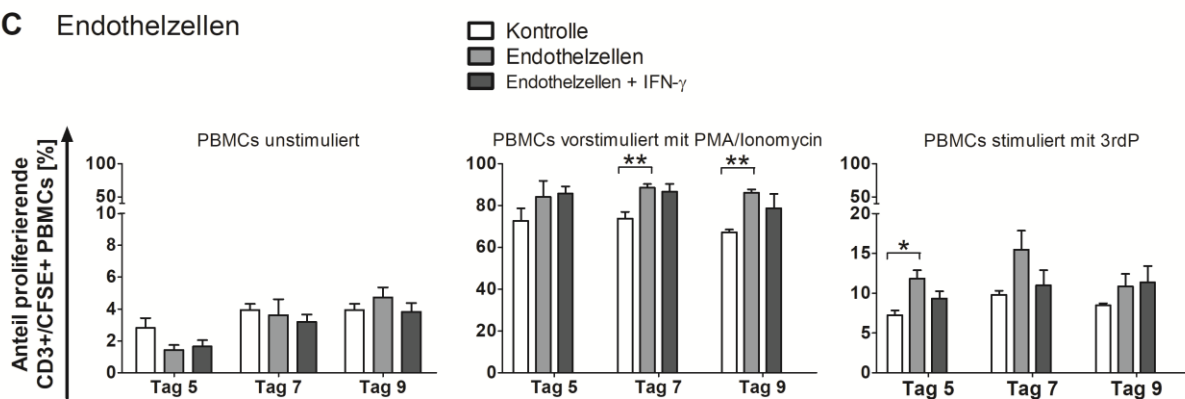
## A Keratinozyten



## B Fibroblasten



## C Endothelzellen



## Abbildung 12: Einfluss von primären humanen Hautzellen auf die Proliferation von PBMCs (CFSE-Verdünnung)

Die Proliferationsrate von PBMCs wurde nach 5, 7 und 9 Tagen in einer MLR anhand der CFSE-Verdünnung ermittelt. Für die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde der prozentuale Anteil der CD3-positiven, CFSE-positiven, proliferierenden PBMCs herangezogen. **(A-C)** Die PBMCs als Responder-Zellen in der MLR wurden unstimuliert (links), vorstimuliert mit PMA/Ionomycin (Mitte) oder stimuliert mit 3rdP (rechts) verwendet. Als Stimulator-Zellen wurden unbehandelte oder IFN- $\gamma$ -behandelte (20 ng/ml über 48 h) Hautzellen eingesetzt: **(A)** Keratinozyten, **(B)** Fibroblasten und **(C)** Endothelzellen (siehe Tabelle 11). Dargestellt sind Mittelwerte + SEM ( $n=3$ ). Diese Daten wurden von Herrn Lukas Freund im Rahmen seiner Masterarbeit erhoben. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney  $U$  Test

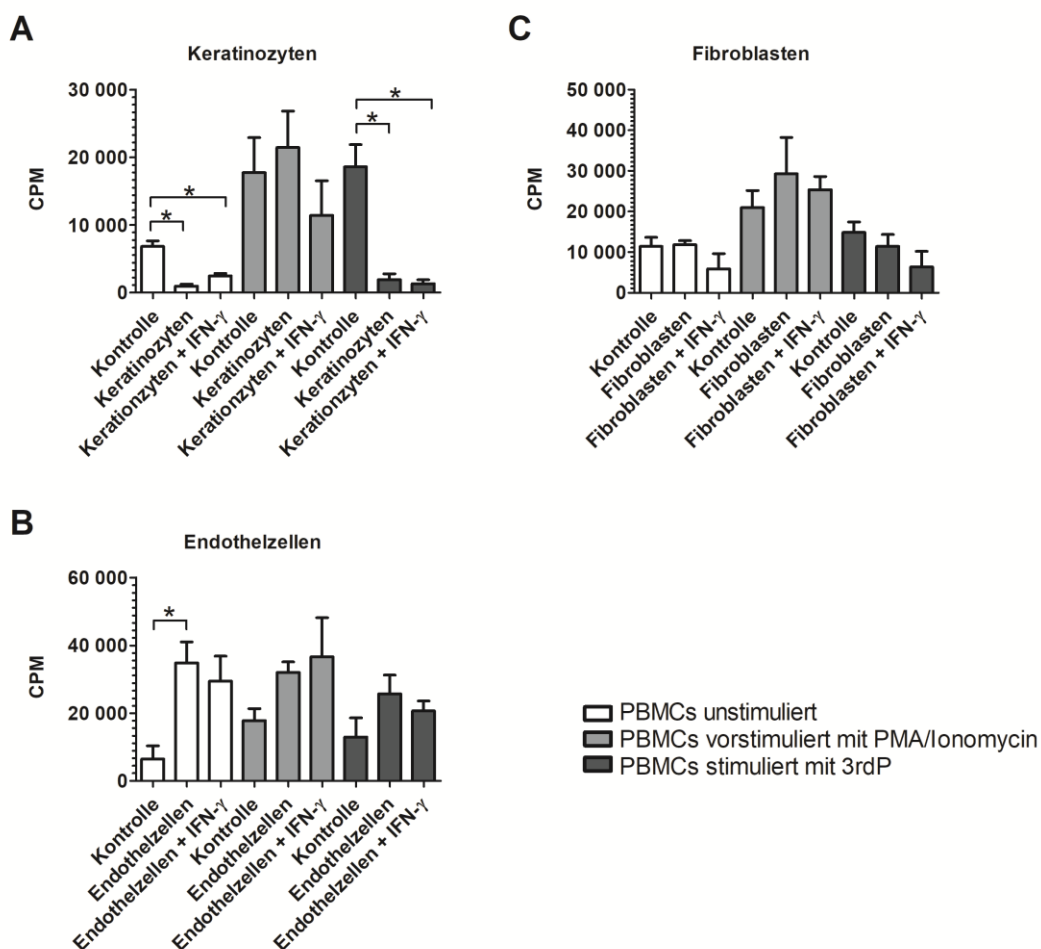
Zur Überprüfung der Daten aus dem CFSE-Assay wurde die Proliferationsrate der PBMCs in einem  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporationsassay nach 7 Tagen in der MLR unter den gleichen Bedingungen gemessen. Die Ergebnisse des  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporationsassays sind in Abbildung 13 dargestellt.

Auch mit diesem Assay waren die suppressiven Eigenschaften von Keratinozyten sowohl auf die Proliferation von unstimulierten PBMCs als auch von 3rdP-stimulierten PBMCs nachzuweisen und zwar unabhängig davon, ob die Keratinozyten mit  $\text{IFN-}\gamma$  vorbehandelt waren oder nicht ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney  $U$  Test; siehe Abbildung 13A). Für Fibroblasten war erneut kein Einfluss auf die Proliferation der PBMCs nachweisbar (siehe Abbildung 13B). Die sich im CFSE-Proliferationsassay angedeutete proliferationssteigernde Eigenschaft der Endothelzellen konnte tendenziell bestätigt werden (siehe Abbildung 13C). Für unstimulierte PBMCs war der Unterschied in der Proliferation zwischen Endothelzellen und Kontrolle signifikant ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney  $U$  Test). Dies gilt nur für unbehandelte Endothelzellen. Auch mit dem  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporationsassay konnte durch Vorbehandlung der drei Hautzellarten mit  $\text{IFN-}\gamma$  kein zusätzlicher Effekt auf ihre Fähigkeit, die PBMC-Proliferation zu induzieren bzw. supprimieren, erzielt werden.

Zusammenfassend konnten immunmodulatorische Eigenschaften bei primären humanen Hautzellen nachgewiesen werden, wobei Keratinozyten und Fibroblasten einen suppressiven Effekt und Endothelzellen einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation von PBMC *in vitro* zeigten. Dabei unterscheiden sich die drei Hautzelltypen nicht wesentlich in der  $\text{IFN-}\gamma$ -induzierten Expression von HLA-DR bzw. der Hochregulierung von HLA-ABC. Damit erfüllen sie wichtige Voraussetzungen für die Aktivierung von T-Lymphozyten. Im Gegensatz zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen wiesen die Hautzellen nur eine basale Expression von CD80 bzw. eine fehlende Expression von CD86 auf, was auf eine eingeschränkte Fähigkeit zur Kostimulation schließen lässt.



Die Proliferationsassays verdeutlichten, dass eine substanzielle Proliferation der PBMCs in Kokultur mit den Hautzellen nur durch die Vorstimulation mit PMA/Ionomycin erreicht werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass ein proliferationsinduzierender Einfluss auf PBMCs durch Endothelzellen möglich wäre. Im Zusammenspiel mit Keratinozyten bzw. Fibroblasten ist jedoch die Vorstimulation der PBMCs mit PMA/Ionomycin erforderlich, um eine ausreichend starke und anhaltende Proliferation der PBMCs zu bewirken.



**Abbildung 13: Einfluss von primären humanen Hautzellen auf die Proliferation von PBMCs ( $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporationsassay)**

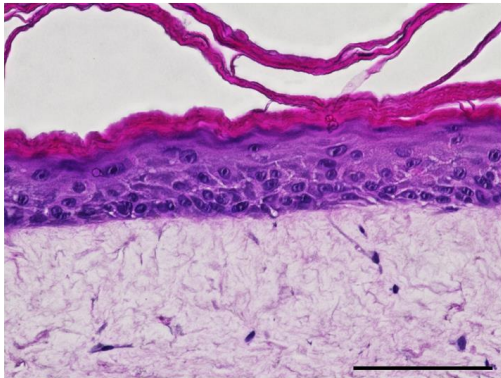
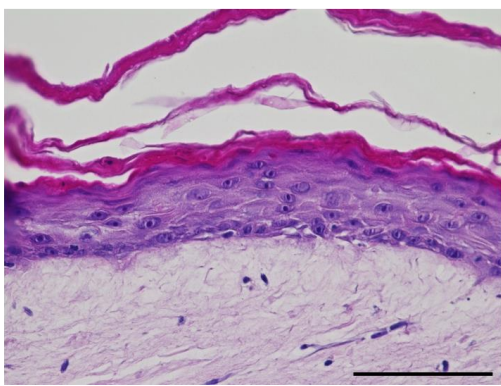
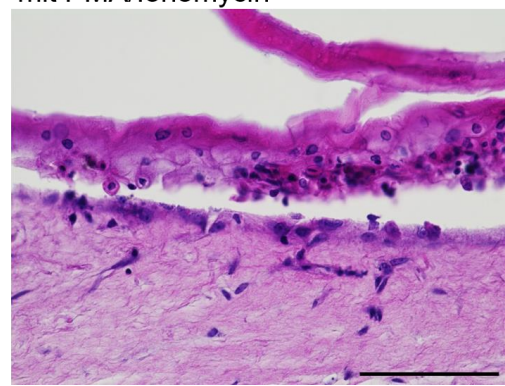
Die Proliferationsrate von PBMCs wurde nach sieben Tagen in einer MLR anhand der  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporation ermittelt. Die PBMCs als Responder-Zellen wurden unstimuliert, vorstimuliert mit PMA/Ionomycin oder stimuliert mit 3rdP verwendet. Als Stimulator-Zellen wurden unbehandelte oder IFN- $\gamma$ -behandelte (20 ng/ml über 48 h) Hautzellen eingesetzt: **(A)** Keratinozyten, **(B)** Fibroblasten und **(C)** Endothelzellen (siehe Tabelle 11). Dargestellt sind Mittelwerte + SEM ( $n=3$ ). Diese Daten wurden von Herrn Lukas Freund im Rahmen seiner Masterarbeit erhoben. \* =  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney  $U$  Test

### **3.2 Inflammatorische Gewebeschäden in humanen artifiziellen Hautmodellen**

#### **3.2.1 Inflammatorische Gewebeschäden durch vorstimulierte PBMCs in Kollagen-Hautmodellen**

Das Zusammenspiel von primären humanen Hautzellen und allogenen PBMCs sollte als nächstes in organotypischen dreidimensionalen Strukturen untersucht werden. Dafür wurden die PBMCs in die Dermis von Kollagen-Hautmodellen eingespritzt. Die PBMCs wurden unstimuliert oder mit PMA/Ionomycin vorstimuliert eingesetzt. Zum Aufbau der Kollagen-Hautmodelle wurden jeweils Keratinozyten und Fibroblasten eines Spenders verwendet. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Kollagen-Hautmodelle für alle untersuchten Bedingungen von demselben Spender hergestellt und das Experiment für zwei weitere Spender wiederholt.

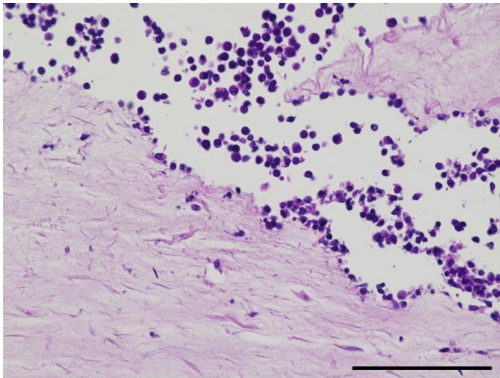
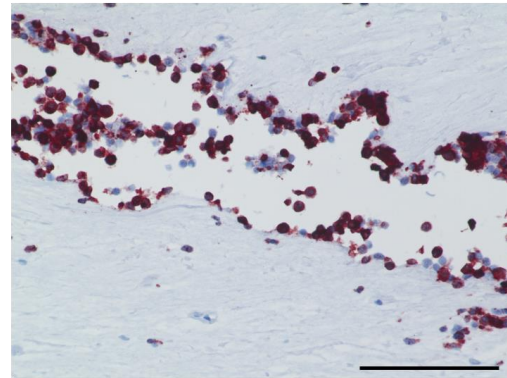
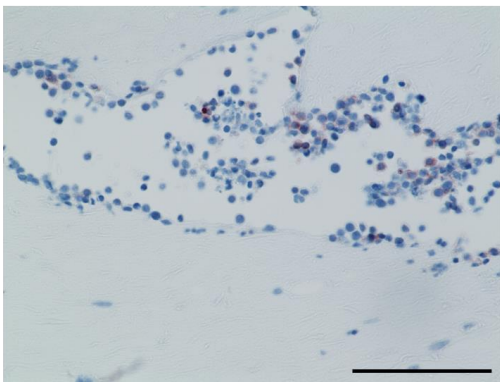
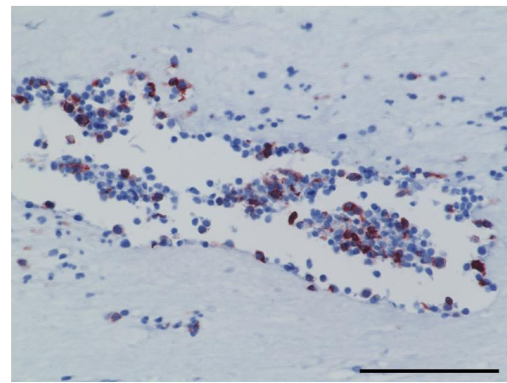
Die histologische Analyse der Kollagen-Hautmodelle ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Kollagen-Hautmodelle, in die lediglich Zellkulturmedium appliziert wurde (Mediumkontrolle), zeigten eine mehrschichtige Epidermis mit den verschiedenen Differenzierungsstadien der Keratinozyten bis hin zur Hornschicht sowie eine intakte Verbindung zwischen Dermis und Epidermis (siehe Abbildung 14A). Eine mechanische Belastung durch das Einspritzen von Medium in die Dermis führte zu keiner Änderung der morphologischen Strukturen in den Kollagen-Hautmodellen und war damit als Kontrolle für die nachfolgenden Zellinjektionen geeignet. Die Injektion unstimulierter PBMCs führte zu keiner Morphologie-Veränderung der Kollagen-Hautmodelle (siehe Abbildung 14B). Im Gegensatz dazu hatte die Injektion von PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs die Zerstörung der epidermalen Strukturen zur Folge (siehe Abbildung 14C). Eine Organisation der Differenzierungsstadien in den epidermalen Schichten war nicht mehr erkennbar. Außerdem wurde häufig eine vollständige Ablösung der Epidermis von der Dermis beobachtet. Infiltrate der eingespritzten PBMCs wurden innerhalb der Dermis, zum Teil auch in den epidermalen Schichten, als Hinweis auf eine Migration nachgewiesen. Diese Merkmale entsprechen mit großer Übereinstimmung den pathologischen Mustern in Hautbiopsien von GvHD-Patienten. Dies konnte in Zusammenarbeit mit dem Leiter der Abteilung für Dermatohistopathologie und Immunhistochemie des Universitätsklinikums Würzburg, Herrn Dr. med. Hermann Kneitz, bestätigt werden.

**A** Mediumkontrolle**B** PBMCs unstimuliert**C** PBMCs vorstimuliert mit PMA/Ionomycin**Abbildung 14: Histologische Analyse von Gewebeschäden durch PBMCs in Kollagen-Hautmodellen**

Repräsentative HE-Färbungen von Kollagen-Hautmodellen. **(A)** Medium, **(B)** unstimulierte PBMCs oder **(C)** mit PMA/Ionomycin vorstimulierte PBMCs wurden in die Dermis der Kollagen-Hautmodelle injiziert und diese für weitere 48 h inkubiert.  $n=3$ ; Maßstab: 100  $\mu\text{m}$

Zur Analyse der beschriebenen PBMC-Infiltrate wurden beispielhaft Kollagen-Hautmodelle mit Infiltraten von PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs immunhistochemisch gefärbt und CD3-, CD4- und CD8-positive Populationen identifiziert (siehe Abbildung 15A-D). Der Anteil der CD4-positiven Zellen fiel geringer aus als der Anteil von CD8-positiven Zellen. Es konnte demzufolge davon ausgegangen werden, dass sich sowohl CD4-positive T-Helfer-Lymphozyten als auch CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten in diesen Infiltraten befanden.

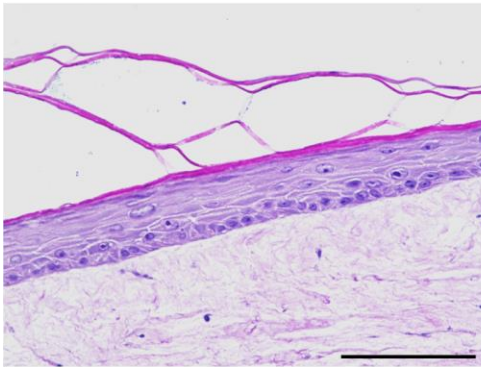
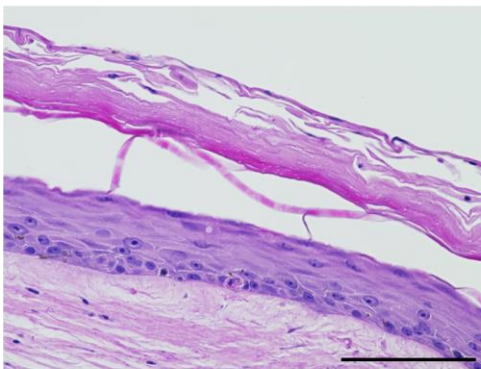
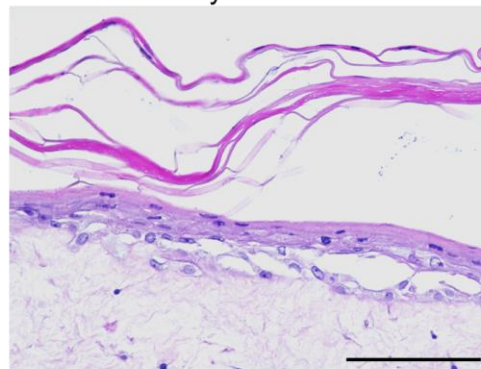
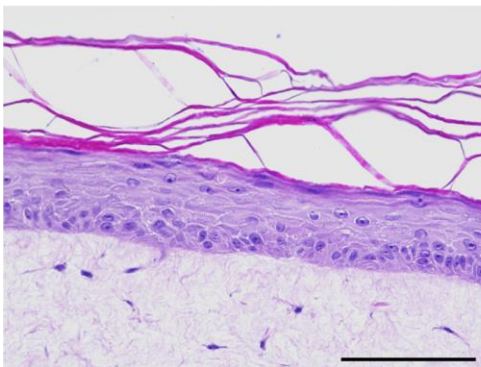
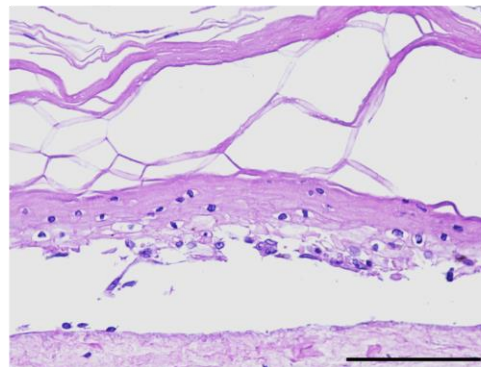
Unter dem Aspekt, dass im Vorfeld und während einer GvHD stark inflammatorische Prozesse auftreten, sollte die Beteiligung von Zytokinen an der Entstehung der Gewebeschäden in den Kollagen-Hautmodellen überprüft werden.

**A** HE**B** CD3**C** CD4**D** CD8

**Abbildung 15: Immunhistochemische Analyse der PBMC-Infiltrate in Kollagen-Hautmodellen mit Gewebeschäden**

Repräsentative histologische Färbungen eines Kollagen-Hautmodells. PMA/Ionomycin vorstimulierte PBMCs wurden in die Dermis der Kollagen-Hautmodelle injiziert und diese für weitere 48 h inkubiert. **(A)** Übersicht über das PBMC-Infiltrat in der Dermis durch HE-Färbung, **(B)** CD3-positive Zellen, **(C)** CD4-positive Zellen **(D)** CD8-positive Zellen. **(B-D)** Positivität wird durch rote Färbung angezeigt. Maßstab: 100 µm

Die Injektion von PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs führte zu einer starken Zerstörung der Epidermis, während unstimulierte PBMCs keine Veränderung der Morphologie auslösten (siehe Abbildung 16A-C). Um einen Hinweis für eine Beteiligung von Zytokinen an den Gewebeschäden zu erhalten, wurden Mediumüberstände von PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs in die Kollagen-Hautmodelle injiziert. Dabei wurden vergleichbare morphologische Veränderungen wie durch die Injektion vorstimulierter PBMCs gefunden. Dies weist daraufhin, dass die von den vorstimulierten PBMCs produzierten Zytokine an der Zerstörung der epidermalen Schichten beteiligt sind (siehe Abbildung 16D-E).

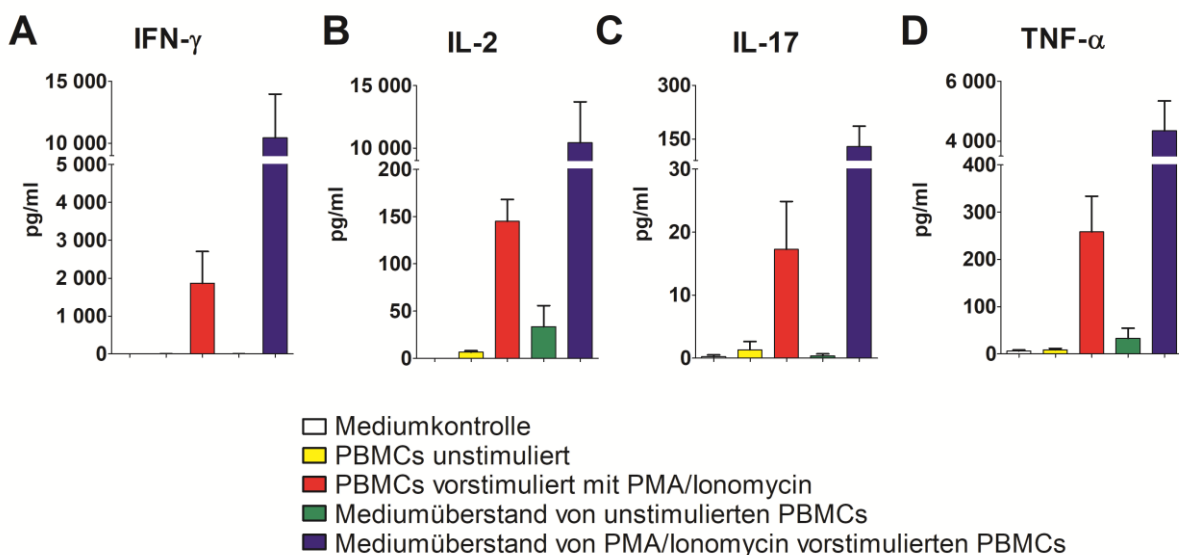
**A** Mediumkontrolle**B** PBMCs unstimuliert**C** PBMCs vorstimuliert mit PMA/Ionomycin**D** Mediumüberstand von unstimulierten PBMCs**E** Mediumüberstand von PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs

**Abbildung 16: Histologische Analyse von Gewebeschäden in Kollagen-Hautmodellen durch PBMCs und Mediumüberstände**

Repräsentative HE-Färbungen von Kollagen-Hautmodellen. **(A)** Medium, **(B)** unstimulierte PBMCs oder **(C)** mit PMA/Ionomycin vorstimulierte PBMCs wurden in die Dermis der Kollagen-Hautmodelle injiziert und für weitere 48 h inkubiert. Als zusätzliche Bedingungen wurden **(D)** Mediumüberstände von unstimulierten PBMCs oder **(E)** Mediumüberstände von PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs verwendet.  $n=3$ ; Maßstab: 100  $\mu\text{m}$

Um sicherzustellen, dass mit den untersuchten Bedingungen tatsächlich proinflammatorische Verhältnisse im Kulturmilieu der Kollagen-Hautmodelle induziert wurden, wurde eine Zytokinbestimmung im Kulturmedium vorgenommen.

Die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17 und TNF- $\alpha$  konnten in hoher Konzentration im Kulturmedium von Kollagen-Hautmodellen mit PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs nachgewiesen werden. Auch in Kollagen-Hautmodellen, welche mit den Mediumüberständen der vorstimulierten PBMCs behandelt worden waren, wurden diese proinflammatorischen Zytokine detektiert (siehe Abbildung 17A-D). Dagegen konnten diese Zytokine nicht oder in nur sehr geringem Maße bei den Mediumkontrollen und bei den Kollagen-Hautmodellen behandelt mit unstimulierten PBMCs bzw. behandelt mit Mediumüberständen von unstimulierten PBMCs nachgewiesen werden.



**Abbildung 17: Zytokinspiegel im Kulturmedium von Kollagen-Hautmodellen**

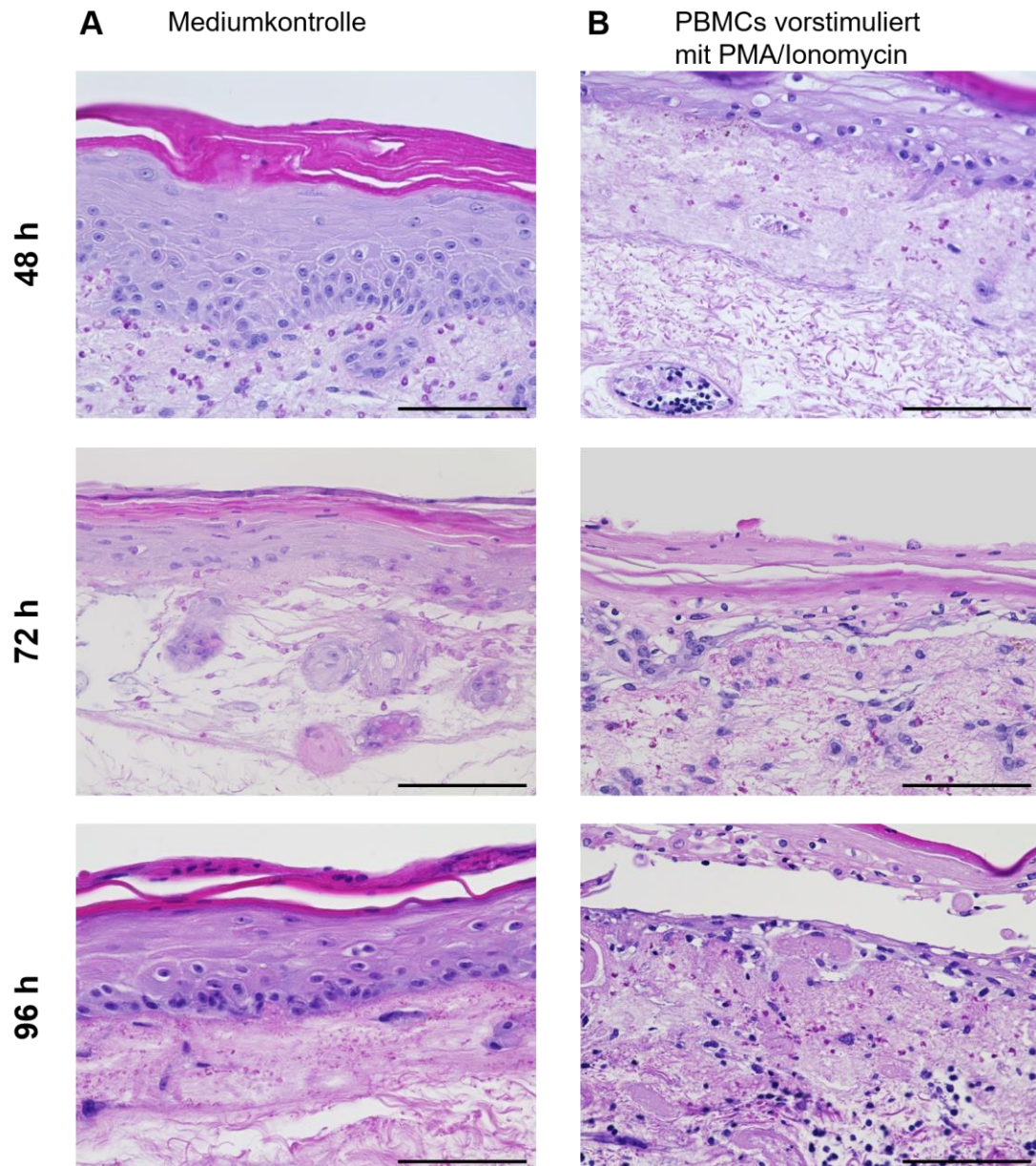
Medium (weiß), unstimulierte PBMCs (gelb) oder mit PMA/Ionomycin vorstimulierte PBMCs (rot) wurden in die Dermis der Kollagen-Hautmodelle injiziert und über 48 h inkubiert. Außerdem wurden Mediumüberstände von unstimulierten PBMCs (grün) oder Mediumüberstände von PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs (blau) verwendet. Die Konzentration der Zytokine **(A)** IFN- $\gamma$ , **(B)** IL-2, **(C)** IL-17 und **(D)** TNF- $\alpha$  wurden im Kulturmedium der Kollagen-Hautmodelle mittels LUMINEX®-Technologie detektiert. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM ( $n=3$ ).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Induktion inflammatorischer Gewebeschäden in den artifiziellen Kollagen-Hautmodellen möglich war. Dabei war die Vorstimulation der PBMCs erforderlich, um die Gewebeschäden hervorzurufen. Die von den vorstimulierten PBMCs sezernierten proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17 und TNF- $\alpha$  waren maßgeblich an den Gewebeschäden beteiligt.

### **3.2.2 Inflammatorische Gewebeschäden durch vorstimulierte PBMCs in vaskularisierten Hautmodellen**

Als nächster Schritt sollte die etablierte Methodik auf ein komplexeres Modell übertragen werden. Die Gefäßstrukturen im vaskularisierten Hautmodell auf Basis der BioVaSc-Matrix boten die Möglichkeit einer realitätsnäheren Kultivierung unter physiologischen Fluss- und Druckbedingungen. Aufgrund der hohen Komplexität wurde sich im vaskularisierten Hautmodell darauf beschränkt, PMA/Ionomycin vorstimulierte, CFSE-markierte PBMCs in die Zirkulation des Bioreaktorsystems zu injizieren. Als Kontrolle wurde ausschließlich Medium in einen zweiten, parallel laufenden Bioreaktor eingebracht. Es wurden drei Versuche durchgeführt, die nach 48, 72 oder 96 h nach PBMC-Zugabe beendet wurden.

Die vaskularisierten Hautmodelle wurden anschließend bezüglich ihrer morphologischen Merkmale beurteilt. In der Mediumkontrolle konnte eine mehrschichtige Epidermis mit den verschiedenen Differenzierungsstadien beobachtet werden (siehe Abbildung 18A). Die Anhaftung von Epidermis und Dermis war in allen vaskularisierten Hautmodellen sehr gut ausgeprägt. Nach Einbringung der vorstimulierten PBMCs konnten bereits nach 48 h starke Veränderungen der epidermalen Organisation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18B). Die Epidermis wies vakuolisierte Keratinozyten sowie eine geringere Schichtdicke im Vergleich zur Mediumkontrolle desselben Versuchszeitraums auf. Zunächst konnten PBMC-Infiltrate nur innerhalb der Gefäße lokalisiert werden. Nach 72 h mit vorstimulierten zirkulierenden PBMCs traten Reife- und Schichtungsstörungen innerhalb der Epidermis sowie erste Einrisse zwischen Epidermis und Dermis auf. Die vollständige Ablösung der Epidermis von der Dermis konnte nach 96 h festgestellt werden. Die vorstimulierten PBMCs infiltrierten die BioVaSc-Matrix bis hin zur Epidermis sehr stark. Die gravierenden Schädigungen der Epidermis konnten einer akuten GvHD mit schwerstem Krankheitsverlauf im Endstadium Grad IV zugeordnet werden.

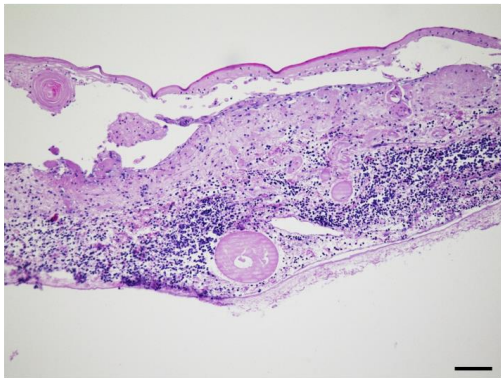
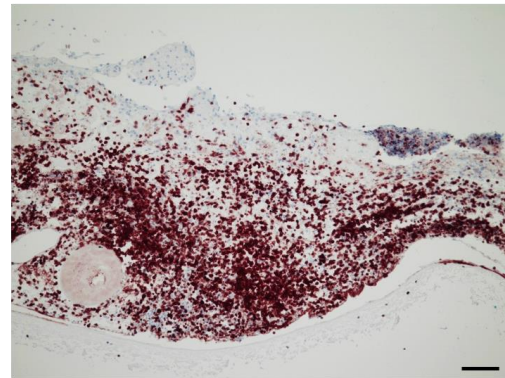
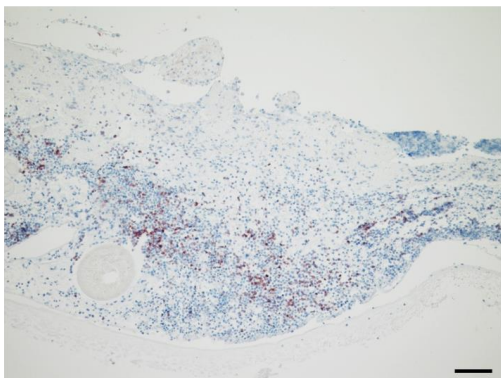
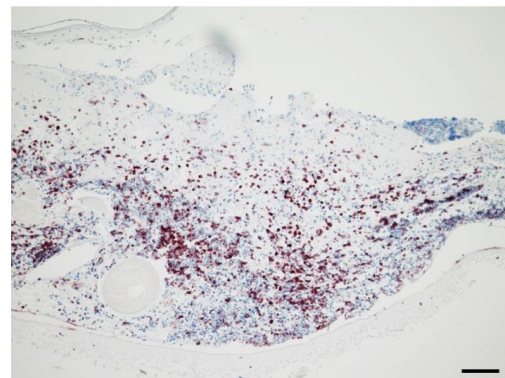


**Abbildung 18: Histologische Analyse von Gewebeschäden durch PBMCs in vaskularisierten Hautmodellen**

Repräsentative HE-Färbungen von vaskularisierten Hautmodellen kultiviert im Bioreaktorsystem. **(A)** Medium oder **(B)** mit PMA/Ionomycin vorstimulierte, CFSE-markierte PBMCs wurden in die Zirkulation des Bioreaktorsystems injiziert. Die Bioreaktoren wurden anschließend nach 48 h, 72 h oder 96 h abgestoppt. Die vaskularisierten Hautmodelle wurden mit Zellen desselben Hautzellspenders aufgebaut. Zur Induktion von Gewebeschäden wurden jedoch drei verschiedene PBMC-Spender verwendet. Maßstab: 100  $\mu$ m



Um die massiven kleinzelligen Infiltrate in den vaskularisierten Hautmodellen nach 96-stündiger Inkubation näher zu charakterisieren, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt (siehe Abbildung 19A-D). Hierbei konnte ein großer Anteil an CD3-positiven T-Lymphozyten in den Infiltraten beobachtet werden. Innerhalb dieser Infiltrate konnten sowohl CD4-positive T-Helfer-Lymphozyten als auch CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten identifiziert werden. Wie bereits bei den Kollagen-Hautmodellen beobachtet, lag dabei der Anteil der CD8-positiven Zellen höher als der Anteil der CD4-positiven Zellen.

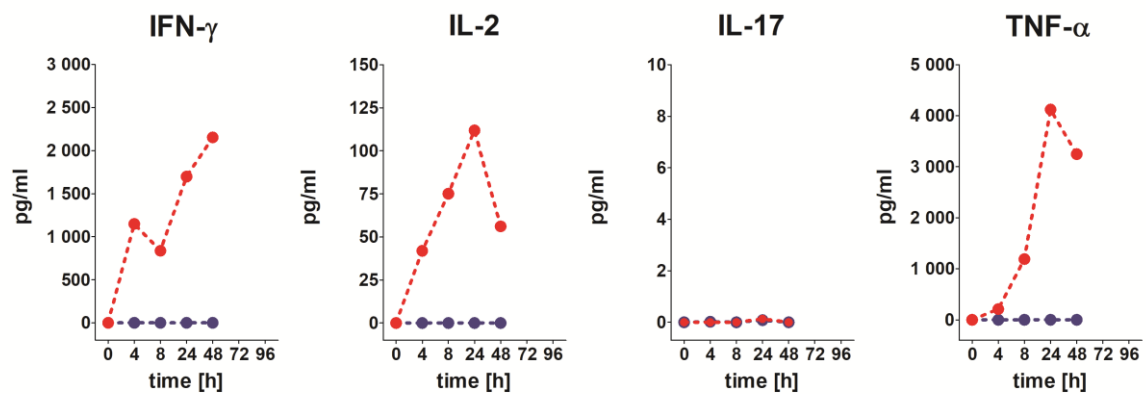
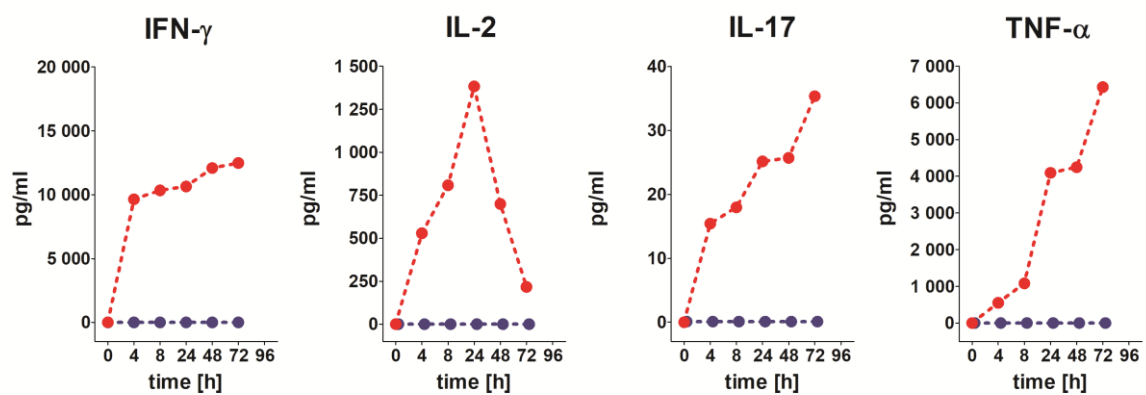
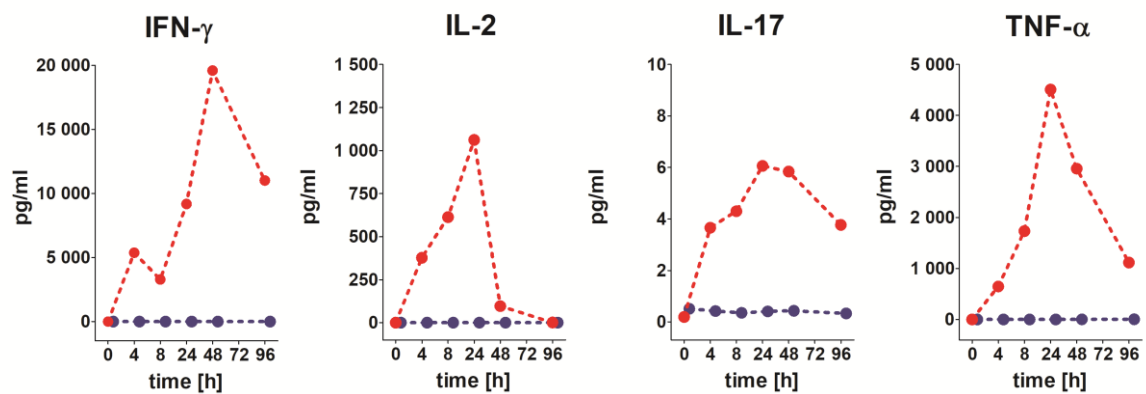
**A** HE**B** CD3**C** CD4**D** CD8

**Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse der PBMC-Infiltrate in vaskularisierten Hautmodellen mit Gewebeschäden**

Repräsentative histologische Färbungen eines vaskularisierten Hautmodells kultiviert im Bioreaktorsystem. PMA/Ionomycin vorstimulierte, CFSE-markierte PBMCs wurden in die Zirkulation des Bioreaktorsystems injiziert. Der Bioreaktor wurde nach weiteren 96 h Inkubation abgestoppt. **(A)** Übersicht über das PBMC-Infiltrat in der Dermis durch HE-Färbung, **(B)** CD3-positive Zellen, **(C)** CD4-positive Zellen **(D)** CD8-positive Zellen. **(B-D)** Positivität wird durch rote Färbung angezeigt. Maßstab: 100 µm

Eine Beteiligung von Zytokinen an den Gewebeschäden, insbesondere in der Epidermis, konnte bereits für die Kollagen-Hautmodelle nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17). Die Bioreaktortechnologie zur Kultivierung der vaskularisierten Hautmodelle bot die Möglichkeit, die Zytokinbestimmung um einen zeitlichen Verlauf zu erweitern. Die Messung der Zytokine im zellfreien Überstand des Kulturmediums ergab einen Anstieg von IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17 und TNF- $\alpha$  ausschließlich für die Bioreaktoren, welche mit PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs behandelt worden waren. Die zeitlichen Verläufe für alle Versuche (Beendigung nach 48, 72 oder 96 h) sind in Abbildung 20A-C dargestellt.

Ein zeitabhängiger Anstieg für IFN- $\gamma$  konnte in allen drei Experimenten festgestellt werden, wobei die maximale Konzentration jeweils bei ca. 48 h Stunden erreicht wurde. Die IL-2-Konzentration stieg ebenfalls bei allen Versuchen bis zu einem Maximum bei 24 h an. Auch für IL-17 konnte ein Anstieg der Konzentration bis zu 72 h nach PBMC-Zugabe beobachtet werden, wobei im 48 h-Versuch kein IL-17 detektiert wurde. Für TNF- $\alpha$  konnte ein Konzentrationsmaximum bei 24 h bestimmt werden, wobei die TNF- $\alpha$ -Konzentration im 48 h-Versuch auch danach noch weiter anstieg. In den Kontrollreaktoren, welche ausschließlich mit Medium behandelt worden waren, konnten keine der angegebenen Zytokine detektiert werden. Daraus kann gefolgert werden, dass die in die Zirkulation des Bioreaktors eingebrachten PBMCs (CFSE-markiert und vorstimuliert) in der Lage waren, weiterhin Zytokine zu produzieren, welche nachweislich eine wichtige Rolle im klinischen Verlauf einer GvHD spielen.

**A** Bioreaktoren abgestoppt nach 48 h**B** Bioreaktoren abgestoppt nach 72 h**C** Bioreaktoren abgestoppt nach 96 h

- Bioreaktor nur mit Medium (Mediumkontrolle)
- Bioreaktor mit PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs

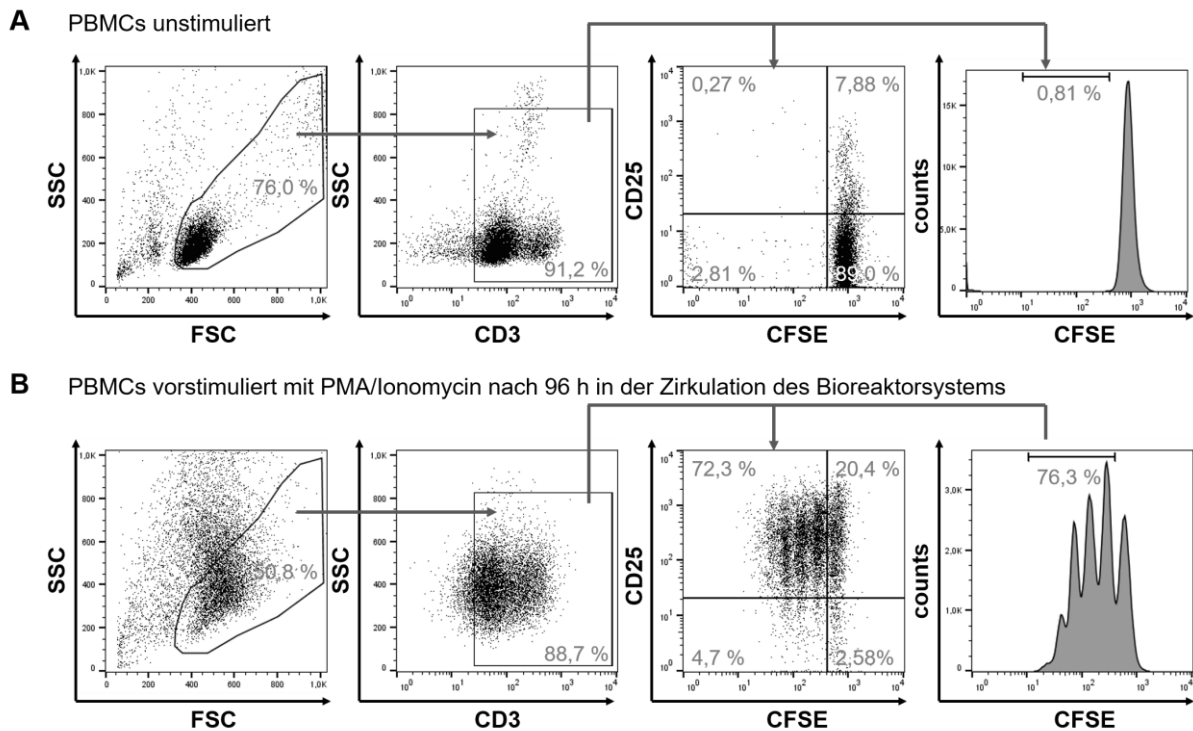
**Abbildung 20: Zeitabhängiger Verlauf der Zytokinspiegel im Kulturmedium von vaskularisierten Hautmodellen**

In die Zirkulation des Bioreaktorsystems wurden Medium (blau) oder mit PMA/Ionomycin vorstimulierte, CFSE-markierte PBMCs (rot) injiziert. Anschließend wurden Überstände des zirkulierenden Kulturmediums nach 0 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h (falls vorhanden) und 96 h (falls vorhanden) abgenommen. Die Bioreaktoren wurden abgestoppt nach **(A)** 48 h, **(B)** 72 h oder **(C)** 96 h. Die Konzentration der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17 und TNF- $\alpha$  wurden mittels LUMINEX®-Technologie detektiert und ist im zeitabhängigen Verlauf dargestellt.

Die Bioreaktor-Technologie ermöglichte es zudem, die eingebrachten CFSE-markierten PBMCs aus der Zirkulation zurückzugewinnen und deren Proliferationsverhalten durchflusszytometrisch zu untersuchen. Ein repräsentatives Beispiel ist für die rückgewonnenen Zellen nach 96 h in der Zirkulation des Bioreaktors in Abbildung 21 aufgezeigt. Für die Auswertung wurden zunächst CD3-positive Populationen definiert und bezüglich der CFSE-Verdünnung und Oberflächenexpression von CD25 charakterisiert.

PBMCs, welche außerhalb des Bioreaktors ohne vorangegangene Stimulation kultiviert worden waren, wiesen keine unterscheidbaren Populationen mit abnehmender CFSE-Konzentration auf. Diese unstimulierten PBMCs zeigten weder Zeichen für Proliferation (0,81 % proliferierende Zellen) noch für eine Aktivierung, da der Aktivierungsmarker CD25 auf den Zellen nur in sehr geringem Maße detektiert wurde (8,15 % CD25-positive Zellen, siehe Abbildung 21A). Im Gegensatz dazu konnten stark proliferierende Zellen bei den PBMCs identifiziert werden, welche über 96 h im Schlauchsystem des Bioreaktors zirkulierten (88,7 % proliferierende Zellen). Diese zirkulierenden Zellen zeigten außerdem einen stark aktivierten Zustand, da CD25 auch nach 96 h auf der Zelloberfläche detektiert werden konnte (92,7 % CD25-positive Zellen, siehe Abbildung 21B).

Die Versuche zur Induktion eines Gewebeschadens im dynamisch kultivierten Bioreaktorsystem konnten die Ergebnisse der Kollagen-Hautmodelle bestätigen. In diesem komplexeren vaskularisierten Modell ist es möglich, CFSE-markierte und mit PMA/Ionomycin vorstimulierte PBMCs einzubringen. Dadurch konnte eine zeitabhängige Zerstörung der epidermalen Strukturen im vaskularisierten Hautmodell erreicht werden, welche morphologisch mit histopathologischen Merkmalen einer akuten GvHD vergleichbar waren. Darüber hinaus besaßen die eingebrachten PBMCs weiterhin die Fähigkeit, GvHD-relevante Zytokine zu produzieren, zu proliferieren und dabei ihren Aktivierungszustand zu erhalten.



**Abbildung 21: Proliferationsmuster und Aktivierungszustand vorstimulierter PBMCs im Bioreaktorsystem**

PMA/Ionomycin vorstimulierte, CFSE-markierte PBMCs wurden in die Zirkulation des Bioreaktorsystems injiziert. Der Bioreaktor wurde nach weiteren 96 h abgestoppt und die in der Zirkulation verbliebenen Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Unstimulierte PBMCs wurden ebenfalls über 96 h in einer Zellkulturflasche zur Kontrolle mitgeführt. Repräsentative Beispiele zeigen die Gatingstrategie zur Auswertung der durchflusszytometrische Daten von **(A)** unstimulierten Kontroll-PBMCs sowie **(B)** von PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs aus der Bioreaktorzirkulation. Zuerst wurde die Lymphozyten-Population unter Berücksichtigung der Zellgröße (FSC) und -granularität (SSC) eingegrenzt. In dieser Population wurden CD3-positive Zellen bestimmt. CD3-positive PBMCs wurden anschließend bezüglich des Aktivierungsmarkers CD25 sowie der CFSE-Verdünnung untersucht. Die Histogramme zeigen zusätzlich das Proliferationsmuster der Zellen angegeben durch die CFSE-Verdünnung.

## 4 Diskussion

Schwerwiegende Komplikationen nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation treten häufig in Form einer akuten oder chronischen GvHD auf. Der Angriff von Spender-Immunzellen gegen die Haut und andere Organe des Empfängers kann durchaus lebensbedrohliche Folgen haben. Dabei vermitteln die im Transplantat enthaltenen allogenen T-Lymphozyten das Auftreten von GvHD. Bis heute kann nicht eindeutig vorhergesagt werden, ob ein Patient eine GvHD entwickeln wird oder nicht. Der Grund liegt in der multifaktoriellen Genese der GvHD. Grundsätzlich erscheint jedoch eine Abgrenzbarkeit von GvHD und GvT möglich (Michalek *et al.*, 2003). Somit kann die gezielte Verabreichung spezifischer Populationen von Lymphozyten die Wahrscheinlichkeit einer GvT-Aktivität zugunsten einer GvHD erhöhen (Wagner *et al.*, 2005). Die Suche nach Wegen, das GvHD-Risiko zu minimieren, ohne den GvT-Effekt zu beeinträchtigen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Die Entwicklung neuer Methoden zur Selektion und Manipulation von Lymphozyten setzt optimierte *in-vitro*-Testsysteme voraus, um GvHD-Risiken besser abschätzen zu können. Alternativ verbleibt nur die Testung im Rahmen einer klinischen Studie, wodurch Patienten in frühen Studienphasen Risiken, aber auch potentiellern Nutzen ausgesetzt werden.

In einem ersten Schritt wurde untersucht, inwieweit die zellulären Einzelkomponenten der Haut als antigenpräsentierende Zellen zur Entstehung einer GvHD beitragen könnten. Dafür wurden primäre humane Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen isoliert und hinsichtlich ihrer immunogenen Eigenschaften analysiert. Alle Zellarten waren in der Lage, HLA-DR nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin IFN- $\gamma$  zu exprimieren bzw. HLA-ABC hochzuregulieren. Die Expression von HLA-DR und anderen MHC Klasse II-Molekülen galt lange als Eigenschaft ausschließlich von professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Inzwischen ist bekannt, dass auch Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs HLA-DR exprimieren können. Dies ist Voraussetzung für die Aktivierung von T-Helfer-Lymphozyten, welche in der GvHD-Entstehung eine große Rolle spielen. Die Hochregulation von HLA-ABC begünstigt die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten, welche für massive Gewebeschäden in den Zielorganen der GvHD verantwortlich sein können.

Die Expression der für eine T-Zell-Aktivierung unbedingt notwendigen kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 konnte nicht auf den untersuchten Hautzellen induziert bzw. erhöht werden. Ohne das kostimulatorische Signal wird keine T-Zell-Aktivierung hervorgerufen. In anderen Studien wurde sogar das Fehlen beider kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf humanen Keratinozyten und Fibroblasten gezeigt (Nonn *et al.*, 2008). Dies gilt auch für die Expression von CD80 auf Endothelzellen, wohingegen abweichende Berichte über die CD86-Expression auf Endothelzellen bestehen (Denton *et al.*, 1999; Lozanoska-Ochser *et al.*, 2008). In diesen Studien wurden Endothelzellen aus anderen Geweben als der Haut untersucht (Endothelzellen aus der Nabelschnur bzw. aus dem Pankreas), wodurch solche Diskrepanzen eventuell zu erklären sind.

In der MLR konnten die primären humanen Hautzellen keine Proliferation allogener PBMCs auslösen (siehe 3.1.2). Keratinozyten zeigten sogar einen supprimierenden Effekt auf die Proliferation allogener PBMCs. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von Dominguez-Castillo und Kollegen, in welcher die Kokultivierung mit adhärennten humanen Keratinozyten keine gesteigerte Proliferation von T-Lymphozyten bewirkte (Dominguez-Castillo *et al.*, 2008). Auch Fibroblasten zeigten in der vorliegenden Arbeit einen tendenziell supprimierenden Effekt auf die Proliferation der PBMCs. Damit einhergehend wird dermalen Fibroblasten eine immunsuppressive Funktion vergleichbar zu pluripotenten mesenchymalen Stromazellen zugeschrieben (Haniffa *et al.*, 2007). Ebenfalls wurde gezeigt, dass die adhäsive Interaktion zwischen Lymphozyten und Fibroblasten zu einer erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen, jedoch nicht zu einer T-Zell-Aktivierung durch Fibroblasten führt (Murakami *et al.*, 1997). Ausschließlich Endothelzellen waren in der Lage, die Proliferation von unstimulierten PBMCs (<sup>3</sup>H-Thymidin Inkorporation) oder von mit PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs (CFSE-Verdünnung) zu steigern. Ein proliferationsinduzierender Einfluss von humanen Endothelzellen wurde u. a. durch Samsonov und Kollegen bestätigt (Samsonov *et al.*, 2012). IFN- $\gamma$ -vorbehandelte Endothelzellen konnten hier die Proliferation von T-Helfer-Zellen steigern, während weder epitheliale Zellen noch Fibroblasten eine Proliferationssteigerung induzierten.

Die Vorbehandlung der primären humanen Hautzellen mit IFN- $\gamma$  zeigte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf ihre immunmodulatorische Kapazität bei allogenen PBMCs. Eine Vorbehandlung der Hautzellen ausschließlich mit IFN- $\gamma$  spiegelt aber nicht die komplexe immunologische Reaktion z. B. im Zuge einer GvHD wider. Eine Vorbehandlung mit zusätzlichen Zytokinen, die im Zusammenhang mit der GvHD-Pathogenese eine Rolle spielen könnten (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17), wäre möglicherweise ein vielversprechender Ansatz für weiterführende Versuche.

Es wird weiterhin diskutiert, ob Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs als antigenpräsentierende Zellen wesentlich zur Pathogenese der GvHD beitragen. In Mausmodellen wurde einerseits gezeigt, dass die Präsentation von allogenen Antigenen durch epitheliales Gewebe des Empfängers keine Voraussetzung für die Entstehung einer GvHD ist (Teshima *et al.*, 2002). Andererseits konnte in Mausmodellen nachgewiesen werden, dass professionelle antigenpräsentierende Zellen nicht zwingend notwendig sind, um eine GvHD zu induzieren. Auch antigenpräsentierende Zellen nicht-hämapoetischen Ursprungs sind in der Lage, akute GvHD in Mäusen auszulösen (Koyama *et al.*, 2011). In diesem Fall wird diese Eigenschaft insbesondere Zellen mit mesenchymalen und epithelialen Merkmalen zugeordnet. Folglich könnten auch Hautzellen als antigenpräsentierende Zellen im Rahmen einer GvHD fungieren. Grundlage für diese Vermutung bildet auch die charakteristische Ausprägung akuter GvHD, welche in der Regel auf die typischen Zielorgane Haut, Leber und Darm beschränkt ist. Dabei liegt eine Beteiligung der entsprechenden gewebespezifischen Zellen an der Aktivierung der allogenen Spender-Lymphozyten nahe. Das Fehlen kostimulatorischer Signale auf humanen Keratinozyten könnte in diesem Zusammenhang durch die Zugabe von CD28-spezifischen Antikörpern überwunden werden. Unter diesen Bedingungen war es in *in-vitro*-Tests möglich, eine höhere Korrelation zu patientenbezogenen GvHD-Daten unter Verwendung von Keratinozyten als Stimulatoren zu erreichen als mit hämatopoetischen Zellen (van Dijk *et al.*, 2000). Diese Erkenntnisse konnten bereits genutzt werden, um selektive Depletionsverfahren mit dem Ziel der Vorbeugung von GvHD im Rahmen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation vorzubereiten. Beruhend auf der Zugabe von CD28-spezifischen Antikörpern zum Zwecke der Kostimulation konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die selektive Depletion von T-Lymphozyten mit alloreaktivem Potential gegen Hautzellen die



gesamtheitliche Alloreaktivität des Transplantats vermindern konnte. Trotzdem blieben der GvT-Effekt sowie anti-virale Wirkungen im Wesentlichen erhalten (van Dijk *et al.*, 1999; Nonn *et al.*, 2008). Die Separation von GvHD- und GvT-Aktivitäten stellt ein übergeordnetes Ziel der GvHD-Therapie dar.

Im nächsten Schritt wurden artifizielle humane Hautmodelle etabliert. Diese Hautmodelle sollten mit allogenen Lymphozyten konfrontiert werden, um zu untersuchen, ob die histomorphologischen Resultate eine akute GvHD simulieren können. In der vorliegenden Arbeit wurden Kollagen-basierte Hautmodelle unter statischen Kultivierungsbedingungen sowie vaskularisierte Hautmodelle unter dynamischen Bedingungen eingesetzt. Als zelluläre Bestandteile der Kollagen-Hautmodelle dienten primäre humane Keratinozyten zur Bildung der epidermalen Schichten sowie Fibroblasten zum Aufbau der Dermis. Die Generierung im 24-Well-Platten-Format ermöglichte die Testung unterschiedlicher Versuchsbedingungen. Entscheidend für die Generierung der Kollagen-Hautmodelle war die Kultivierung an der Medium-Luft-Grenzfläche, die letztlich zur Ausprägung der epidermalen Differenzierung einschließlich Verhornung führte. Um morphologische Veränderungen in den vollständig ausgebildeten Hautmodellen hervorzurufen, wurden nun allogene PBMCs in den dermalen Teil injiziert. Wie bereits die Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften der Hautzellen zeigte, konnte eine ausreichende Proliferation allogener PBMCs im Zusammenspiel mit Hautzellen nur durch eine Vorstimulation der PBMCs mit PMA/Ionomycin erreicht werden. Dieser unspezifische Stimulus induziert zum einen über die Aktivierung der Proteinkinase C, zum anderen über Freisetzung intrazellulärer Calcium-Speicher eine starke Zellproliferation und Zytokinproduktion (Beeler *et al.*, 1979; Strulovici *et al.*, 1989). Die Injektion unstimulierter PBMCs führte zu keinen morphologischen Veränderungen der Kollagen-Hautmodelle. Ausschließlich PMA/Ionomycin vorstimulierte PBMCs verursachten eine starke Zerstörung der epidermalen Strukturen in den Kollagen-Hautmodellen sowie die vollständige Ablösung der Epidermis von der Dermis. Diese Merkmale zeigen große Ähnlichkeiten zu Hautbiopsien von Patienten mit einer GvHD des Schweregrades IV. Eindeutig scheint eine entzündliche Reaktion vorzuliegen, welche für die Zerstörung insbesondere der epidermalen Schichten verantwortlich ist.

PBMC-Infiltrate mit T-Helfer-Lymphozyten und zytotoxischen T-Lymphozyten wurden in der Dermis der Kollagen-Hautmodelle identifiziert. Infiltration mit alloreaktiven Immunzellen in der Haut stellt ebenfalls ein Kriterium bei der GvHD-Einstufung von Patienten dar. Mediumüberstände von PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs lösten dieselben histopathologischen Veränderungen in den Hautmodellen aus wie sie durch die Injektion vorstimulierter PBMCs beobachtet wurden. Somit wird die Schädigung des Gewebes durch die von PBMCs produzierten Zytokine induziert. Ein direkter Kontakt zwischen PBMCs und Hautzellen scheint damit nicht notwendig zu sein. Die Bestimmung der Zytokinspiegel im Kulturmedium der Kollagen-Hautmodelle bestätigte eine erhöhte Konzentration der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17 und TNF- $\alpha$  wie sie auch bei PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs zu finden waren. Der Anstieg dieser Zytokine ist auch im Verlauf einer GvHD beschrieben (Holler *et al.*, 1990; Yabe *et al.*, 1999; Ju *et al.*, 2014).

Wie im Kollagen-Hautmodell ließen sich mit PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs auch im vaskularisierten Hautmodell Veränderungen auslösen, welche mit einer akuten GvHD vergleichbar sind. Diese vaskularisierten Hautmodelle bieten eine weitaus höhere Komplexität durch die Bereitstellung eines Gefäßsystems sowie eine dynamische Kultivierung unter physiologischen Druckbedingungen, wodurch die Annäherung an eine *in-vivo*-Situation erreicht wird. Damit einhergehend steigt aber auch der experimentelle, materielle und zeitliche Aufwand, sodass hierfür nur eine geringe Anzahl an Versuchsbedingungen getestet werden konnte. Da unstimulierte PBMCs in den Kollagen-Hautmodellen keinen Einfluss auf die Morphologie der Epidermis ausübten, wurden für die Versuche im vaskularisierten Hautmodell nur PMA/Ionomycin vorstimulierte PBMCs im Vergleich zu einer Mediumkontrolle verwendet. Die Zugabe von vorstimulierten PBMCs hatte auch im vaskularisierten Hautmodell eine starke Zerstörung der Epidermis zur Folge. Diese Zerstörung nahm zeitabhängig zu und war vergleichbar mit Hautbiopsien von GvHD-Patienten. So zeigten die vaskularisierten Hautmodelle nach 48 h mit PBMCs Veränderungen des Schweregrades II bis hin zu vollständiger Zerstörung und Ablösung der Epidermis entsprechend einer Grad IV-GvHD nach 96 h. Eine Zeitabhängigkeit konnte auch für die Zytokinspiegel bestätigt werden. Die Konzentration der GvHD-relevanten Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17 und TNF- $\alpha$  stieg im Verlauf an, meist verbunden mit einem maximalen Wert nach 24 bis 48 h.

Diese Reproduzierbarkeit stellt ein wichtiges Kriterium für die Entwicklung eines Testsystems dar. Des Weiteren konnten massive Infiltrate sowohl von CD4-positiven T-Helfer-Lymphozyten als auch CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten innerhalb der Matrix identifiziert werden. Die Zirkulation der PBMCs sowie die Einwanderung über das Gefäßsystem in die dermalen und sogar epidermalen Bereiche der Haut simuliert mit großer Ähnlichkeit die physiologische Situation im Patienten. Es wird davon ausgegangen, dass stimulierte alloreaktive T-Lymphozyten *in vivo* im Rahmen einer GvHD ebenfalls den Weg über aktiviertes Endothel in den Gefäßen zu den Zielorganen finden (Cooke *et al.*, 2008). Somit bieten die vaskularisierten Hautmodelle optimale Möglichkeiten, um die Migrationen alloreaktiver Zellen zu untersuchen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass vorstimulierte PBMCs massive inflammatorische Schäden in artifiziellen humanen Hautmodellen hervorrufen konnten, sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Kultivierungsbedingungen. Diese Entzündungsreaktion zeichnete sich durch Zerstörung und Ablösung der Epidermis, Einwanderung von Immunzellen sowie Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen aus. Es besteht dabei eine maßgebliche Ähnlichkeit zu Merkmalen von Immunreaktionen in der Haut von GvHD-Patienten.

Die histopathologischen Veränderungen in den Kollagen- und vaskularisierten Hautmodellen sind auch vergleichbar mit den Ergebnissen der Skin-Explant Assays der Gruppe um Anne Dickinson. Charakteristische Merkmale der akuten GvHD, wie epitheliale Apoptose, Ablösung der Epidermis von der Dermis und stark erhöhte Zytokinkonzentrationen, stimmen weitestgehend überein. Die Bedeutung der Zytokine wurde auch im Skin-Explant Assay bestätigt, da auch hier beobachtet wurde, dass PBMC-Infiltrate in den Hautbiopsien nicht zwingend notwendig für die histopathologischen Veränderungen in der Haut sind (Wang *et al.*, 2006). Die klinische Relevanz konnte u. a. bewiesen werden, indem die Vorhersage dieses Assays genutzt wurde, um das Ausmaß der GvHD-Prophylaxe von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation individuell anzupassen. So wurden in einer englischen Studie Patienten mit einem niedrigen GvHD-Risiko aus dem Skin-Explant Assay ausschließlich mit Ciclosporin A behandelt. Dagegen wurde für Patienten, bei denen ein höheres GvHD-Risiko vorhergesagt wurde, eine erweiterte GvHD-Prophylaxe in Kombination mit Methotrexat eingeführt (Dickinson *et al.*, 1999).

Die aufgrund der Materialmenge bedingten Limitationen des Skin-Explant-Assays könnten durch ein GvHD-relevantes Hautmodell überwunden werden. Der Vorteil der in dieser Arbeit vorgestellten Hautmodelle liegt in der Verwendung von primären humanen Zellen, welche dennoch expandiert und kryokonserviert gelagert werden können. Dadurch können Hautmodelle jederzeit in größerer Anzahl und wiederholbar bereitgestellt werden. Dabei würde eine automatisierte Technologie zur Zellisolierung und Generierung der Hautmodelle die Reproduzierbarkeit und Effizienz verbessern. Entsprechende Bestrebungen werden von Forschungsinstituten und Firmen verfolgt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse in der vorgelegten Arbeit ist zu beachten, dass mit PMA/Ionomycin vorstimulierten PBMCs gearbeitet wurde. Diese Art der Stimulation ist antigenunspezifisch, und reflektiert demgemäß nicht die tatsächliche Situation während einer GvHD, bei der beispielsweise die Lymphknoten als sekundäre lymphatische Organe aber auch professionelle antigenpräsentierende Zellen in den Endorganen eine entscheidende Rolle spielen. In den Lymphknoten sollte die eigentliche Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten stattfinden. Dort treffen die T-Lymphozyten in engstem Raum auf aktivierte professionelle antigenpräsentierende Zellen, wie z. B. dendritische Zellen (Itano *et al.*, 2003). Dendritische Zellen sind nach ihrer Aktivierung in der Lage, durch die erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle auf ihrer Oberfläche, auch das zweite Signal zur Stimulation von T-Lymphozyten zu liefern. Im Rahmen einer GvHD wird davon ausgegangen, dass dendritische Zellen durch die der Stammzelltransplantation vorausgegangenen Konditionierung und damit einhergehenden Inflammation aktiviert werden (Ramadan *et al.*, 2015). Während dieser ersten Phase der GvHD-Entstehung wird vermutet, dass auch Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs zur Antigenpräsentation (wie z. B. Hautzellen) angeregt werden könnten. Die in der vorgelegten Arbeit verwendete Vorstimulation der PBMCs mit PMA/Ionomycin sollte diese erste Phase der GvHD-Entstehung und auch die zweite Phase der T-Zell-Aktivierung in den Lymphknoten imitieren und ersetzen. Die entstandenen Gewebeschäden in den artifiziellen humanen Hautmodellen entsprechen einer starken Entzündungsreaktion und könnten der dritten Phase der GvHD-Pathogenese zugeordnet werden (Ferrara *et al.*, 1991). In dieser Effektorphase tritt massiver Zelluntergang durch Apoptose aufgrund von proinflammatorischen Zytokinen und aktivierten Effektorzellen auf (Langley *et al.*, 1996).

Im Skin-Explant Assay wird das Fehlen der Lymphknoten überwunden, indem im Vorfeld der Inkubation mit den Hautbiopsien eine MLR durchgeführt wird. Dafür stehen PBMCs des Spenders und Patienten zur Verfügung. Auf diese Weise können die T-Lymphozyten des Spenders bereits durch Patienten-Zellen aktiviert werden, bevor sie anschließend zu den Hautbiopsien des Patienten gegeben werden. Für die im Rahmen der vorgelegten Arbeit bearbeiteten Hautproben von juvenilen Präputien konnte dieses Verfahren nicht umgesetzt werden, da die entsprechenden Blutproben der Hautspender nicht bereitgestellt werden konnten. Deshalb wird derzeit als Weiterführung des Projektes die Isolation humaner Hautzellen aus adulten Hautstanzen initiiert und optimiert. Dadurch wäre die Verfügbarkeit von Blutproben adulter Hautspender realisierbar und würde zudem den Vorteil bieten, dass auch weibliche Hautproben getestet werden könnten. Folglich könnte der experimentelle Ansatz mit einer vorgeschalteten MLR identisch zum Skin-Explant Assay aufgebaut werden. Dies würde zusätzlich die Möglichkeit eröffnen, auf einfache Weise mHags zu untersuchen, da z. B. das mHag H-Y ausschließlich von männlichen Zellen exprimiert wird und somit grundsätzlich einen Angriffspunkt für weibliche Immunzellen darstellt (Li *et al.*, 2015).

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten artifiziellen Hautmodelle sollten auch hinsichtlich der bei einer GvHD vorherrschenden immunologischen Situation angepasst werden. Um eine realitätsnähere Stimulation der Immunzellen zu erreichen, werden trotz der potentiellen immunogenen Eigenschaften der Hautzellen professionelle antigenpräsentierende Zellen längerfristig für die Bearbeitung spezifischer Fragestellungen unentbehrlich sein. Das Einbringen von dendritischen Zellen in die Hautmodelle konnte bereits beschrieben werden (Chau *et al.*, 2013). In dieser Studie wurden dendritische Zellen (differenziert aus CD14-positiven Monozyten aus dem Blut) in einer Zwischenschicht zwischen Dermis und Epidermis in ein Hautmodell eingeführt. Mithilfe dieser Methode konnte u. a. eine hohe Expression von CD86 und HLA-DR auf den dendritischen Zellen im dreidimensionalen Zellverbund als Voraussetzung für die Induktion einer Immunreaktion erreicht werden.

Zusätzlich zu den Optimierungsschritten in Bezug auf die Aktivierungsart der Immunzellen sollten aussagekräftige Kontrollreaktionen etabliert werden. Zum einen würde eine MLR zwischen autologen Zellen unspezifische Reaktionen ausschließen und gegebenenfalls die alloreaktive Natur der Gewebeschäden beweisen. Um die Funktionsfähigkeit des entwickelten GvHD-Modells zu demonstrieren, müssten ferner Substanzen in Form von in der Klinik angewendeten Immunsuppressiva getestet werden, welche die Gewebeschäden in den Hautmodellen unterbinden bzw. vermindern sollten. Nicht zuletzt besteht für die Entwicklung eines relevanten GvHD-Testsystems Bedarf an validen Methoden zur Datengenerierung. In der vorgelegten Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Auswertung histologischer Merkmale der Hautmodelle beruhend auf Kriterien, welche einen Vergleich zu GvHD-Hautbiopsien ermöglichen würden (Lange *et al.*, 2016). Weiterhin boten die immunhistologischen Färbungen spezifischer Oberflächenmarker sowie Zytokinprofile detailliertere Aussagen über die in den Hautmodellen ausgelöste inflammatorische Reaktion. Die CFSE-Markierung der PBMCs kann Informationen zum einen über das Proliferationsverhalten der Zellen, zum anderen über die Lokalisation der Zellen in der Matrix der Hautmodelle liefern. Dennoch gilt es, verbesserte Methoden zu etablieren, welche u. a. eine wie in Mausmodellen verwendete Verfolgung von Zellen (engl. *trafficking*) gewährleisten können (Beilhack *et al.*, 2005). Die Anwendung von Impedanzspektroskopie findet bereits Einsatz bei der Untersuchung von Substanzen an Hautmodellen und könnte auch auf ein GvHD-Testsystem übertragen werden (Groeber *et al.*, 2015). Der Ausbau solcher nicht-invasiver Testmethoden bringt Vorteile, da Zeitverläufe anstelle von Endpunktbestimmungen erweiterte Aussagen zulassen.

Unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren (Materialkosten und begrenzter Zeitrahmen) ist es empfehlenswert, die angeführten Optimierungsschritte zunächst weitestgehend anhand der Kollagen-Hautmodelle vorzunehmen. Dieses Modell bietet ausreichende Möglichkeiten zur parallelen Testung verschiedener Kulturbedingungen. Darauf basierende Daten können eindeutige Hinweise auf die ablaufende Immunreaktion geben. Hingegen geht die höhere Komplexität der vaskularisierten Hautmodelle mit gesteigertem zeitlichen und technischen Aufwand einher. Dieses Modell könnte deshalb für die Validierung von Ergebnissen unter realitätsnäheren und physiologischeren Bedingungen herangezogen werden.

Außerdem werden auch im Feld der Bioreaktortechnik Optimierungsversuche für eine effektivere Handhabung des Systems vorangetrieben, wobei in naher Zukunft mit Fortschritten hinsichtlich eines vereinfachten Aufbaus, eines reduzierten Zeitaufwandes und einer flexibler Anpassung an mehrere Fragestellungen gerechnet werden kann.

In der vorgelegten Arbeit wurden artifizielle humane Hautmodelle vorgestellt, in denen durch Zugabe vorstimulierter PBMCs eine inflammatorische Reaktion vergleichbar zu akuter GvHD in der Haut bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation simuliert werden konnte. Die Entwicklung eines GvHD-relevanten Testsystems ist damit noch nicht abgeschlossen. Unter Berücksichtigung der genannten Limitationen könnten die beschriebenen Optimierungsansätze dazu beitragen, ein GvHD-Testsystem für translationale Fragestellungen zu realisieren. Ein Testsystem für GvHD auf der Basis von artifiziellen humanen Hautmodellen könnte zahlreiche Möglichkeiten eröffnen, grundlegende immunologische Abläufe bei der Entstehung einer GvHD abzubilden. Viele Mechanismen zur Pathogenese der GvHD sowie der Wirkungsweise therapeutischer Ansätze sind noch nicht ausreichend geklärt.

Gegenstand aktueller Untersuchungen ist außerdem die Zellisolation aus adulten Hautstanzen sowie die Generierung von Hautmodellen aus diesen Zellen. Hautmodelle aus adulten Zellen könnten die Situation im Patienten besser widerspiegeln als jene aus juvenilen Zellen aus Präputien. Zudem könnten auf diese Weise Stanzbiopsien von relevanten Hautpartien zum Aufbau der Hautmodelle getestet werden. Die Ausweitung der Zellquellen auf Hautstanzen könnte dabei die Grundlage für neuartige Screening-Methoden bilden, um einen optimalen Spender zur allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation individuell für einen Patienten zu finden. Durch ein im Vorfeld der allogenen Stammzelltransplantation stattfindendes Spender-Screening könnte das GvHD-Risiko vermindert und damit die Lebensqualität sowie die Langzeitprognose für die Patienten stark verbessert werden. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise Untersuchungen von mHag-spezifischen Immunantworten möglich, welche vermutlich verantwortlich für die alloreaktive Aktivierung von Spender-Lymphozyten bei HLA-passender Stammzelltransplantation sind.

Zudem bieten die Hautmodelle eine gute Grundlage, um den Einfluss verschiedener Substanzen auf eine GvHD-Reaktion zu testen. Beispielsweise befassen sich klinische Studien mit dem möglichen protektiven Einfluss des Wachstumsfaktors KGF (engl. *keratinocyte growth factor*) auf akute GvHD der Haut. In Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass der Schweregrad von GvHD im Darm durch KGF verringert wurde (Krijanovski *et al.*, 1999). Diese Beobachtung konnte jedoch in klinischen Studien bisher nicht bestätigt werden (Jagasia *et al.*, 2012). Die Aufklärung über die genauen mechanistischen Funktionen von KGF könnte helfen, die Ergebnisse aus vorklinischen Studien besser auf den Menschen übertragen zu können. Auch die exakte Wirkungsweise von Medikamenten, welche bereits im klinischen Alltag eingesetzt werden, sowie neuer Substanzklassen könnte mithilfe eines zuverlässigen Testsystems analysiert werden.

Die Anwendung eines GvHD-Testsystems in humanen Hautmodellen könnte eine wichtige Rolle einnehmen, um die Sicherheit zellulärer Therapieansätze zur Behandlung maligner Erkrankungen einzuschätzen. Als vielsprechender Ansatz wird die Entwicklung von T-Lymphozyten mit genetisch modifizierten Rezeptoren (CAR, engl. *chimeric antigen receptor*) angesehen. CAR-T-Zellen sind in der Lage, eine spezifische Anti-Tumor-Aktivität auszuüben mit einem gleichzeitig geringen Risiko für das Auftreten einer GvHD (Anwer *et al.*, 2017). Dagegen berichteten u. a. Jacoby und Kollegen, dass CD19-spezifische CAR-T-Zellen akute letale GvHD in Mausmodellen auslösten (Jacoby *et al.*, 2016). Außerdem stellen eine therapiebedingte massive Zytokinfreisetzung (engl. *cytokine storm*) sowie die Suche nach geeigneten Zielstrukturen momentan noch Limitationen der CAR-T-Zell-Therapie bei Patienten dar (Jensen *et al.*, 2014; Maude *et al.*, 2014). Ein humanes GvHD-Testsystem könnte helfen, die noch immer unzureichende Übertragbarkeit von *in-vitro*-Testsystemen auf klinische Studien zumindest zu verringern.

Analysen in einem klinisch relevanten GvHD-Testsystem würden es überdies erlauben, Biomarker für die Diagnose und zur Einschätzung des Therapieerfolges zu definieren. Als prognostischer Biomarker im Plasma von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation konnte u. a. Elafin identifiziert werden. Elafin-Konzentrationen korrelierten mit dem Auftreten von GvHD in der Haut und mit erhöhtem Sterbe-Risiko (Paczesny *et al.*, 2010).



Die Validierung von Biomarkern aus klinischen Beobachtungen kann dazu beitragen, dass eine einsetzende GvHD so früh wie möglich erkannt wird. Infolgedessen kann der pathogenen Immunreaktion schneller therapeutisch entgegengewirkt und somit eine verbesserte Prognose erreicht werden (Levine *et al.*, 2012; Hartwell *et al.*, 2017).

Der Fortschritt der Technologien im Bereich des Tissue Engineering ermöglicht ferner die Ausweitung eines GvHD-Testsystems auf andere Organmodelle. Die Grundlagen für organotypische Modelle der Leber und des Darms sind bereits gelegt und werden weiter ausgebaut (Bhatia *et al.*, 2014; Schweinlin *et al.*, 2016). Damit könnte ein großes Spektrum der inflammatorischen Reaktionen direkt in Modellen für die von einer GvHD betroffenen Zielorgane untersucht und im Zusammenhang verglichen werden. Daraus resultierende Erkenntnisse hätten bedeutenden Einfluss auf das letztendliche Ziel, verbesserte Therapiemöglichkeiten für Patienten mit GvHD zu etablieren.

## Literaturverzeichnis

Alousi AM, Weisdorf DJ, Logan BR, Bolanos-Meade J, Carter S, Difronzo N, *et al.* (2009). Etanercept, mycophenolate, denileukin, or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease: a randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. *Blood* 114: 511-517.

Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H, Adams S, Durett A, Gee A, *et al.* (2006). Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 108: 1797-1808.

Antin JH, Lee SJ, Neuberg D, Alyea E, Soiffer RJ, Sonis S, *et al.* (2002). A phase I/II double-blind, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-11 for mucositis and acute GVHD prevention in allogeneic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* 29: 373-377.

Anwer F, Shaukat AA, Zahid U, Husnain M, McBride A, Persky D, *et al.* (2017). Donor origin CAR T cells: graft versus malignancy effect without GVHD, a systematic review. *Immunotherapy* 9: 123-130.

Appelbaum FR (2001). Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 411: 385-389.

Asquith B, Debacq C, Florins A, Gillet N, Sanchez-Alcaraz T, Mosley A, *et al.* (2006). Quantifying lymphocyte kinetics in vivo using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE). *Proceedings. Biological sciences* 273: 1165-1171.

Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE (1956). Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *British medical journal* 2: 626-627.

Beeler TJ, Jona I, Martonosi A (1979). The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. *The Journal of biological chemistry* 254: 6229-6231.

Beilhack A, Schulz S, Baker J, Beilhack GF, Wieland CB, Herman EI, *et al.* (2005). In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood* 106: 1113-1122.

Bhatia SN, Underhill GH, Zaret KS, Fox IJ (2014). Cell and tissue engineering for liver disease. *Science translational medicine* 6: 245sr242.

Billingham RE (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey lectures* 62: 21-78.

Billingham RE, Brent L, Medawar PB (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172: 603-606.

Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M (2012). Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature reviews. Immunology* 12: 443-458.

Bock M, Rahrig S, Kunz D, Lutze G, Heim MU (2002). Platelet concentrates derived from buffy coat and apheresis: biochemical and functional differences. *Transfusion medicine* 12: 317-324.

Braun MY, Lowin B, French L, Acha-Orbea H, Tschopp J (1996). Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *The Journal of experimental medicine* 183: 657-661.

Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, *et al.* (2011). Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 117: 1061-1070.

Carreras E, Diaz-Ricart M (2011). The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT. *Bone marrow transplantation* 46: 1495-1502.

Chakraverty R, Sykes M (2007). The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood* 110: 9-17.

Chau DY, Johnson C, MacNeil S, Haycock JW, Ghaemmaghami AM (2013). The development of a 3D immunocompetent model of human skin. *Biofabrication* 5: 035011.

Chaudhari AA, Vig K, Baganizi DR, Sahu R, Dixit S, Dennis V, *et al.* (2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *International journal of molecular sciences* 17.

Chen L, Flies DB (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology* 13: 227-242.

Chong AS, Alegre ML, Miller ML, Fairchild RL (2013). Lessons and limits of mouse models. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3: a015495.

Cooke KR, Jannin A, Ho V (2008). The contribution of endothelial activation and injury to end-organ toxicity following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 14: 23-32.

Copelan EA (2006). Hematopoietic stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine* 354: 1813-1826.

Cutler C, Antin JH (2010). Sirolimus immunosuppression for graft-versus-host disease prophylaxis and therapy: an update. *Current opinion in hematology* 17: 500-504.

Deeg HJ, Storb R, Shulman HM, Weiden PL, Graham TC, Thomas ED (1982). Engraftment of DLA-nonidentical unrelated canine marrow after high-dose fractionated total body irradiation. *Transplantation* 33: 443-446.

Denton MD, Geehan CS, Alexander SI, Sayegh MH, Briscoe DM (1999). Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4(+) T cell alloactivation. *The Journal of experimental medicine* 190: 555-566.

Dickinson A, Hromadnikova I, Sviland L, Jackson G, Taylor P, Vavrinec J, *et al.* (1999). Use of a skin explant model for predicting GVHD in HLA-matched bone marrow transplants - effect of GVHD prophylaxis. *Bone marrow transplantation* 24: 857-863.

Dickinson AM, Sviland L, Dunn J, Carey P, Proctor SJ (1991). Demonstration of direct involvement of cytokines in graft-versus-host reactions using an in vitro human skin explant model. *Bone marrow transplantation* 7: 209-216.

Dickinson AM, Sviland L, Carey P, Reid MM, Hamilton PJ, Pearson AJ, *et al.* (1988). Skin explant culture as a model for cutaneous graft-versus-host disease in humans. *Bone marrow transplantation* 3: 323-329.

Dickinson AM, Sviland L, Hamilton PJ, Usher P, Taylor P, Jackson G, *et al.* (1994). Cytokine involvement in predicting clinical graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Bone marrow transplantation* 13: 65-70.

Dickinson AM, Wang XN, Sviland L, Vyth-Dreese FA, Jackson GH, Schumacher TN, *et al.* (2002). In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Nature medicine* 8: 410-414.

Dietz AB, Bulur PA, Emery RL, Winters JL, Epps DE, Zubair AC, *et al.* (2006). A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *Transfusion* 46: 2083-2089.

Dominguez-Castillo RI, Sanchez-Guzman E, Castro-Munozledo F, Santos-Argumedo L, Kuri-Harcuch W (2008). Epidermal keratinocytes do not activate peripheral T-cells: interleukin-10 as a possible regulator. *Immunology* 125: 370-376.

Dumler JS, Beschoner WE, Farmer ER, Di Gennaro KA, Saral R, Santos GW (1989). Endothelial-cell injury in cutaneous acute graft-versus-host disease. *The American journal of pathology* 135: 1097-1103.

Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, *et al.* (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nature medicine* 9: 1144-1150.

Eiermann TH, Lambrecht P, Zander AR (1999). Monitoring anti-thymocyte globulin (ATG) in bone marrow recipients. *Bone marrow transplantation* 23: 779-781.

Epstein RB, Storb R, Ragde H, Thomas ED (1968). Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. *Transplantation* 6: 45-58.

Falkenburg JH, Marijt WA, Heemskerk MH, Willemze R (2002). Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions. *Current opinion in hematology* 9: 497-502.

Fecher D, Hofmann E, Buck A, Bundschuh R, Nietzer S, Dandekar G, *et al.* (2016). Human Organotypic Lung Tumor Models: Suitable For Preclinical 18F-FDG PET-Imaging. *PloS one* 11: e0160282.

Ferrara JL, Deeg HJ (1991). Graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine* 324: 667-674.

Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009). Graft-versus-host disease. *Lancet* 373: 1550-1561.

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, *et al.* (2005). National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 11: 945-956.

Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, *et al.* (2009). Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* 10: 855-864.

Frisan T, Levitsky V, Masucci M (2001). Limiting dilution assay. *Methods in molecular biology* 174: 213-216.

Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27: 3675-3683.

Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, *et al.* (2010). Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *The New England journal of medicine* 363: 2091-2101.

Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K (2011). Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. *Advanced drug delivery reviews* 63: 352-366.

Groeber F, Kahlig A, Loff S, Walles H, Hansmann J (2013). A bioreactor system for interfacial culture and physiological perfusion of vascularized tissue equivalents. *Biotechnology journal* 8: 308-316.

Groeber F, Engelhardt L, Egger S, Werthmann H, Monaghan M, Walles H, *et al.* (2015). Impedance spectroscopy for the non-destructive evaluation of in vitro epidermal models. *Pharmaceutical research* 32: 1845-1854.

Groeber F, Engelhardt L, Lange J, Kurdyn S, Schmid FF, Rucker C, *et al.* (2016). A first vascularized skin equivalent for as an alternative to animal experimentation. *Altex* 33: 415-422.

Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, *et al.* (2007). Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *Journal of immunology* 179: 1595-1604.

Hartwell MJ, Ozbek U, Holler E, Renteria AS, Major-Monfried H, Reddy P, *et al.* (2017). An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival. *JCI insight* 2: e89798.

Hilchey SP, Bernstein SH (2007). Use of CFSE to monitor ex vivo regulatory T-cell suppression of CD4+ and CD8+ T-cell proliferation within unseparated mononuclear cells from malignant and non-malignant human lymph node biopsies. *Immunological investigations* 36: 629-648.

Holler E, Kolb HJ, Moller A, Kempeni J, Liesenfeld S, Pechumer H, *et al.* (1990). Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 75: 1011-1016.

Holtick U, Albrecht M, Chemnitz JM, Theurich S, Skoetz N, Scheid C, *et al.* (2014). Bone marrow versus peripheral blood allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for haematological malignancies in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*: CD010189.

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, *et al.* (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75: 555-562.

Hromadnikova I, Sedlacek P, Stary J, Cermakova M, Vavrinec J, Stechova K, *et al.* (2001). An in vitro skin explant assay as a predictive assay for graft-versus-host disease in a cohort of pediatric transplants. *Pediatric transplantation* 5: 258-265.

Hulsdunker J, Zeiser R (2015). Insights into the pathogenesis of GvHD: what mice can teach us about man. *Tissue antigens* 85: 2-9.

Hunig T (2012). The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. *Nature reviews. Immunology* 12: 317-318.

Itano AA, Jenkins MK (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature immunology* 4: 733-739.

Jabbour E, Cortes J, Kantarjian H, Giralt S, Andersson BS, Giles F, *et al.* (2007). Novel tyrosine kinase inhibitor therapy before allogeneic stem cell transplantation in patients with chronic myeloid leukemia: no evidence for increased transplant-related toxicity. *Cancer* 110: 340-344.

Jacoby E, Yang Y, Qin H, Chien CD, Kochenderfer JN, Fry TJ (2016). Murine allogeneic CD19 CAR T cells harbor potent antileukemic activity but have the potential to mediate lethal GVHD. *Blood* 127: 1361-1370.

Jagasia MH, Abonour R, Long GD, Bolwell BJ, Laport GG, Shore TB, *et al.* (2012). Palifermin for the reduction of acute GVHD: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Bone marrow transplantation* 47: 1350-1355.

Jannasch M, Groeber F, Brattig NW, Unger C, Walles H, Hansmann J (2015). Development and application of three-dimensional skin equivalents for the investigation of percutaneous worm invasion. *Experimental parasitology* 150: 22-30.

Jensen MC, Riddell SR (2014). Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells. *Immunological reviews* 257: 127-144.

Ju JM, Lee H, Oh K, Lee DS, Choi EY (2014). Kinetics of IFN-gamma and IL-17 Production by CD4 and CD8 T Cells during Acute Graft-versus-Host Disease. *Immune network* 14: 89-99.

Kharfan-Dabaja MA, Cutler CS (2011). Rituximab for prevention and treatment of graft-versus-host disease. *International journal of hematology* 93: 578-585.

Kim BS, Miyagawa F, Cho YH, Bennett CL, Clausen BE, Katz SI (2009). Keratinocytes function as accessory cells for presentation of endogenous antigen expressed in the epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 129: 2805-2817.

Klein J, Sato A (2000). The HLA system. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 343: 782-786.

Koyama M, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Wilson YA, Don AL, et al. (2011). Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nature medicine* 18: 135-142.

Krijanovski OI, Hill GR, Cooke KR, Teshima T, Crawford JM, Brinson YS, et al. (1999). Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease. *Blood* 94: 825-831.

Lampert IA (1984). Expression of HLA-DR (Ia like) antigen on epidermal keratinocytes in human dermatoses. *Clinical and experimental immunology* 57: 93-100.

Lange J, Weil F, Riegler C, Groeber F, Rebhan S, Kurdyn S, et al. (2016). Interactions of donor sources and media influence the histo-morphological quality of full-thickness skin models. *Biotechnology journal* 11: 1352-1361.

Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science* 260: 920-926.

Langley RG, Walsh N, Nevill T, Thomas L, Rowden G (1996). Apoptosis is the mode of keratinocyte death in cutaneous graft-versus-host disease. *Journal of the American Academy of Dermatology* 35: 187-190.



Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, *et al.* (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371: 1579-1586.

Lerner KG, Kao GF, Storb R, Buckner CD, Clift RA, Thomas ED (1974). Histopathology of graft-vs.-host reaction (GvHR) in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation proceedings* 6: 367-371.

Levine JE, Logan BR, Wu J, Alousi AM, Bolanos-Meade J, Ferrara JL, *et al.* (2012). Acute graft-versus-host disease biomarkers measured during therapy can predict treatment outcomes: a Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network study. *Blood* 119: 3854-3860.

Li J, Heinrichs J, Haarberg K, Semple K, Veerapathran A, Liu C, *et al.* (2015). HY-Specific Induced Regulatory T Cells Display High Specificity and Efficacy in the Prevention of Acute Graft-versus-Host Disease. *Journal of immunology* 195: 717-725.

Liu KY, Chen YH, Liu DH, Xu LP, Huang XJ (2008). A pilot study of low-dose recombinant interleukin-2 for acute lymphoblastic malignancy after unmanipulated allogeneic blood and marrow transplantation. *Bone marrow transplantation* 42: 535-539.

Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *Journal of the National Cancer Institute* 12: 197-201.

Lozanoska-Ochser B, Klein NJ, Huang GC, Alvarez RA, Peakman M (2008). Expression of CD86 on human islet endothelial cells facilitates T cell adhesion and migration. *Journal of immunology* 181: 6109-6116.

Markey KA, MacDonald KP, Hill GR (2014). The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. *Blood* 124: 354-362.

Martin I, Wendt D, Heberer M (2004). The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in biotechnology* 22: 80-86.

Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, *et al.* (1990). A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 76: 1464-1472.

Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, *et al.* (2012). First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation.

*Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 18: 1150-1163.

Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, *et al.* (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England journal of medicine* 371: 1507-1517.

Maurer DH, Hanke JH, Mickelson E, Rich RR, Pollack MS (1987). Differential presentation of HLA-DR, DQ, and DP restriction elements by interferon-gamma-treated dermal fibroblasts. *Journal of immunology* 139: 715-723.

Mertsching H, Schanz J, Steger V, Schandar M, Schenk M, Hansmann J, *et al.* (2009). Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue. *Transplantation* 88: 203-210.

Michalek J, Collins RH, Durrani HP, Vaclavkova P, Ruff LE, Douek DC, *et al.* (2003). Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1180-1184.

Mielke S, Solomon SR, Barrett AJ (2005). Selective depletion strategies in allogeneic stem cell transplantation. *Cytotherapy* 7: 109-115.

Mielke S, Lutz M, Schmidhuber J, Kapp M, Ditz D, Ammer J, *et al.* (2014). Salvage therapy with everolimus reduces the severity of treatment-refractory chronic GVHD without impairing disease control: a dual center retrospective analysis. *Bone marrow transplantation* 49: 1412-1418.

Mielke S, Nunes R, Rezvani K, Fellowes VS, Venne A, Solomon SR, *et al.* (2008). A clinical-scale selective allodepletion approach for the treatment of HLA-mismatched and matched donor-recipient pairs using expanded T lymphocytes as antigen-presenting cells and a TH9402-based photodepletion technique. *Blood* 111: 4392-4402.

Moll C, Reboredo J, Schwarz T, Appelt A, Schurlein S, Walles H, *et al.* (2013). Tissue engineering of a human 3D in vitro tumor test system. *Journal of visualized experiments : JoVE*.

Moy RH, Huffman AP, Richman LP, Crisalli L, Wang XK, Hoxie JA, *et al.* (2017). Clinical and immunologic impact of CCR5 blockade in graft-versus-host disease prophylaxis. *Blood* 129: 906-916.

Muczynski KA, Cotner T, Anderson SK (2001). Unusual expression of human lymphocyte antigen class II in normal renal microvascular endothelium. *Kidney international* 59: 488-497.

Murakami S, Okada H (1997). Lymphocyte-fibroblast interactions. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 8: 40-50.

Muul LM, Silvin C, James SP, Candotti F (2008). Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. *Current protocols in immunology* Chapter 7: Unit 7 10 11-17 10 24.

Nonn M, Herr W, Khan S, Todorova M, Link I, Thies J, *et al.* (2008). Selective depletion of alloreactive T lymphocytes using patient-derived nonhematopoietic stimulator cells in allograft engineering. *Transplantation* 86: 1427-1435.

OECD (2010). Organisation for Economic Co operation and Development. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Section 4. In: *Publishing Number 439*.

Olivieri A, Locatelli F, Zecca M, Sanna A, Cimminiello M, Raimondi R, *et al.* (2009). Imatinib for refractory chronic graft-versus-host disease with fibrotic features. *Blood* 114: 709-718.

Paczesny S, Braun TM, Levine JE, Hogan J, Crawford J, Coffing B, *et al.* (2010). Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. *Science translational medicine* 2: 13ra12.

Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8: 839-845.

Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, *et al.* (2007). Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *Bmj* 334: 197.

Pudlas M, Koch S, Bolwien C, Thude S, Jenne N, Hirth T, *et al.* (2011). Raman spectroscopy: a noninvasive analysis tool for the discrimination of human skin cells. *Tissue engineering. Part C, Methods* 17: 1027-1040.

Ramadan A, Paczesny S (2015). Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem-cell transplantation. *Frontiers in immunology* 6: 14.

Reddy P, Maeda Y, Hotary K, Liu C, Reznikov LL, Dinarello CA, *et al.* (2004). Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3921-3926.

Rossi A, Appelt-Menzel A, Kurdyn S, Walles H, Groeber F (2015). Generation of a three-dimensional full thickness skin equivalent and automated wounding. *Journal of visualized experiments : JoVE*.

Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, *et al.* (1997). IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *British journal of haematology* 97: 855-864.

Sackstein R (2006). A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 12: 2-8.

Samsonov D, Geehan C, Woda CB, Briscoe DM (2012). Differential activation of human T cells to allogeneic endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts in vitro. *Transplantation research* 1: 4.

Scarisbrick JJ, Dignan FL, Tulpule S, Gupta ED, Kolade S, Shaw B, *et al.* (2015). A multicentre UK study of GVHD following DLI: rates of GVHD are high but mortality from GVHD is infrequent. *Bone marrow transplantation* 50: 62-67.

Schmid PM, Bouazzaoui A, Schmid K, Birner C, Schach C, Maier LS, *et al.* (2017). Acute renal graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Cell transplantation*.

Schmid PM, Bouazzaoui A, Doser K, Schmid K, Hoffmann P, Schroeder JA, *et al.* (2014). Endothelial dysfunction and altered mechanical and structural properties of resistance arteries in a murine model of graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 20: 1493-1500.

Schots R, Kaufman L, Van Riet I, Ben Othman T, De Waele M, Van Camp B, *et al.* (2003). Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia* 17: 1150-1156.

Schroeder MA, DiPersio JF (2011). Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Disease models & mechanisms* 4: 318-333.

Schwarer AP, Jiang YZ, Deacock S, Brookes PA, Barrett AJ, Goldman JM, *et al.* (1994). Comparison of helper and cytotoxic antirecipient T cell frequencies in unrelated bone marrow transplantation. *Transplantation* 58: 1198-1203.

Schweinlin M, Wilhelm S, Schwedhelm I, Hansmann J, Rietscher R, Jurowich C, *et al.* (2016). Development of an Advanced Primary Human In Vitro Model of the Small Intestine. *Tissue engineering. Part C, Methods* 22: 873-883.

Snell GD (1948). Methods for the study of histocompatibility genes. *Journal of genetics* 49: 87-108.

Solomon SR, Mielke S, Savani BN, Montero A, Wisch L, Childs R, *et al.* (2005). Selective depletion of alloreactive donor lymphocytes: a novel method to reduce the severity of graft-versus-host disease in older patients undergoing matched sibling donor stem cell transplantation. *Blood* 106: 1123-1129.

Strulovici B, Daniel-Issakani S, Oto E, Nestor J, Jr., Chan H, Tsou AP (1989). Activation of distinct protein kinase C isozymes by phorbol esters: correlation with induction of interleukin 1 beta gene expression. *Biochemistry* 28: 3569-3576.

Sullivan KM, Mori M, Sanders J, Siadak M, Witherspoon RP, Anasetti C, *et al.* (1992). Late complications of allogeneic and autologous marrow transplantation. *Bone marrow transplantation* 10 Suppl 1: 127-134.

Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S (2006). Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *Journal of biotechnology* 122: 372-381.

Sundram U (2014). A review of important skin disorders occurring in the posttransplantation patient. *Advances in anatomic pathology* 21: 321-329.

Sviland L, Dickinson AM (1999). A human skin explant model for predicting graft-versus-host disease following bone marrow transplantation. *Journal of clinical pathology* 52: 910-913.

Teshima T, Hill GR, Pan L, Brinson YS, van den Brink MR, Cooke KR, *et al.* (1999). IL-11 separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *The Journal of clinical investigation* 104: 317-325.

Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagrin S, Liu C, Cooke KR, *et al.* (2002). Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nature medicine* 8: 575-581.

Toubai T, Tawara I, Sun Y, Liu C, Nieves E, Evers R, *et al.* (2012). Induction of acute GVHD by sex-mismatched H-Y antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic-derived antigen-presenting cells. *Blood* 119: 3844-3853.

Trentin JJ (1956). Mortality and skin transplantability in x-irradiated mice receiving isologous, homologous or heterologous bone marrow. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 92: 688-693.

van Dijk AM, Kessler FL, Stadhouders-Keet SA, Verdonck LF, de Gast GC, Otten HG (1999). Selective depletion of major and minor histocompatibility antigen reactive T cells: towards prevention of acute graft-versus-host disease. *British journal of haematology* 107: 169-175.

van Dijk AM, Kessler FL, Verdonck LF, Stadhouders-Keet SA, van Lier RA, de Gast GC, *et al.* (2000). Primary human keratinocytes as targets in predicting acute graft-versus-host disease following HLA-identical bone marrow transplantation. *British journal of haematology* 111: 791-796.

Vogelsang GB, Hess AD, Berkman AW, Tutschka PJ, Farmer ER, Converse PJ, *et al.* (1985). An in vitro predictive test for graft versus host disease in patients with genotypic HLA-identical bone marrow transplants. *The New England journal of medicine* 313: 645-650.

Vogt MH, van den Muijsenberg JW, Goulmy E, Spierings E, Kluck P, Kester MG, *et al.* (2002). The DBY gene codes for an HLA-DQ5-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in graft-versus-host disease. *Blood* 99: 3027-3032.

Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA, Unrelated Donor Marrow Transplantation T (2005). Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet* 366: 733-741.

Wang XN, Collin M, Sviland L, Marshall S, Jackson G, Schulz U, *et al.* (2006). Skin explant model of human graft-versus-host disease: prediction of clinical outcome and correlation with biological risk factors. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 12: 152-159.

Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH (1998). Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 187: 205-216.

Weindl G, Castello F, Schafer-Korting M (2011). Evaluation of anti-inflammatory and atrophogenic effects of glucocorticoids on reconstructed human skin. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 39: 173-187.

Wolff D, Steiner B, Hildebrandt G, Edinger M, Holler E (2009). Pharmaceutical and cellular strategies in prophylaxis and treatment of graft-versus-host disease. *Current pharmaceutical design* 15: 1974-1997.

Wu JM, Thoburn CJ, Wisell J, Farmer ER, Hess AD (2010). CD20, AIF-1, and TGF-beta in graft-versus-host disease: a study of mRNA expression in histologically matched skin biopsies. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23: 720-728.

Yabe M, Yabe H, Hattori K, Shimizu T, Matsumoto M, Morimoto T, *et al.* (1999). Role of interleukin-12 in the development of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplant patients. *Bone marrow transplantation* 24: 29-34.

Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, Verbeek M, Maas-Bauer K, Metzelder SK, *et al.* (2015). Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey. *Leukemia* 29: 2062-2068.

**Abkürzungsverzeichnis**

3rdP	3 <sup>rd</sup> Party-Zellen
APC	Allophycocyanin
ATG	Antithymozytenglobulin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAR	engl. <i>chimeric antigen receptor</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
d. h.	das heißt
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
engl.	englisch
FACS	engl. <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Fetales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i> )
HDAC	Histon-Deacetylasen
HE	Hämatoxylin/Eosin
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HKGS	Human Keratinocyte Growth Supplement
H-Y	Y-chromosomale Antigene
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvT	Graft-versus-Tumor
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
KGF	engl. <i>keratinocyte growth factor</i>
LRS	Leukozytenreduktionssystem
Mg	Magnesium
mHag	Minor-Histokompatibilitätsantigen (engl. <i>minor histocompatibility antigen</i> )
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )



MLR	gemischte Lymphozyten-Reaktion (engl. <i>mixed lymphocyte reaction</i> )
mTOR	engl. <i>mechanistic target of rapamycin</i>
OECD	Organisation für wissenschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (engl. <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> )
PBMC	mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )
PBS	engl. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
PerCP	engl. <i>peridinin chlorophyll protein</i>
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

**Einheiten:**

%	Anteil [1/100]
°C	Grad Celsius (Temperatur)
Ci	Curie (Radioaktivität)
cpm	engl. <i>counts per minute</i>
Gy	Gray (Energiedosis ionisierender Strahlung) [J/kg]
MFI	engl. <i>mean fluorescent intensity</i>
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (statischer Druck)
$\mu$ M, mM, M	Konzentration [Stoffmenge mol/l]
$\mu$ m, mm, cm	Länge
ng, $\mu$ g, g	Masse
$\mu$ l, ml, l	Volumen
min, h	Minute(n), Stunde(n) (Zeit)
U	Enzymaktivität [Unit, $\mu$ mol/min]
x g	Zentrifugalkraft [Vielfaches der Erdanziehung g]

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aktivierung von T-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen	8
Abbildung 2:	GvHD der Haut.....	10
Abbildung 3:	Bewertung des Schweregrades von GvHD im Skin-Explant Assay.	20
Abbildung 4:	Methodisches Prinzip von Tissue Engineering.....	22
Abbildung 5:	Isolation primärer humaner Hautzellen aus Präputien.....	31
Abbildung 6:	Herstellung humaner artifizieller Hautmodelle auf Basis einer Kollagen-Matrix .....	37
Abbildung 7:	Herstellung humaner artifizieller Hautmodelle auf Basis der BioVaSc-Matrix .....	40
Abbildung 8:	Induktion von Gewebeschäden in humanen artifiziellen Hautmodellen .....	43
Abbildung 9:	Expression immunrelevanter Moleküle auf der Oberfläche von primären humanen Hautzellen .....	47
Abbildung 10:	Veränderung der Oberflächenexpression immunrelevanter Moleküle auf primären humanen Hautzellen .....	48
Abbildung 11:	Auswertungsstrategie zur Bestimmung der Proliferationsrate im Proliferationsassay mit CFSE-Verdünnung .....	49
Abbildung 12:	Einfluss von primären humanen Hautzellen auf die Proliferation von PBMCs (CFSE-Verdünnung) .....	51
Abbildung 13:	Einfluss von primären humanen Hautzellen auf die Proliferation von PBMCs ( <sup>3</sup> H-Thymidin Inkorporationsassay) .....	53
Abbildung 14:	Histologische Analyse von Gewebeschäden durch PBMCs in Kollagen-Hautmodellen .....	55
Abbildung 15:	Immunhistochemische Analyse der PBMC-Infiltrate in Kollagen-Hautmodellen mit Gewebeschäden.....	56
Abbildung 16:	Histologische Analyse von Gewebeschäden in Kollagen-Hautmodellen durch PBMCs und Mediumüberstände.....	57
Abbildung 17:	Zytokinspiegel im Kulturmedium von Kollagen-Hautmodellen.....	58
Abbildung 18:	Histologische Analyse von Gewebeschäden durch PBMCs in vaskularisierten Hautmodellen .....	60
Abbildung 19:	Immunhistochemische Analyse der PBMC-Infiltrate in vaskularisierten Hautmodellen mit Gewebeschäden.....	61
Abbildung 20:	Zeitabhängiger Verlauf der Zytokinspiegel im Kulturmedium von vaskularisierten Hautmodellen .....	63
Abbildung 21:	Proliferationsmuster und Aktivierungszustand vorstimulierter PBMCs im Bioreaktorsystem.....	65

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Ansätze für Zweitlinientherapien zur Behandlung der GvHD .....	13
Tabelle 2:	Vor- und Nachteile von Mausmodellen zur Erforschung von GvHD	16
Tabelle 3:	Verbrauchsmaterialien .....	25
Tabelle 4:	Geräte .....	26
Tabelle 5:	In der Zellkultur verwendete Lösungen, Puffer und Medien .....	26
Tabelle 6:	Zusammensetzung der Medien für die Kultivierung und Konservierung der verwendeten Zellarten.....	27
Tabelle 7:	Zusammensetzung der Medien für die Kultivierung von humanen artifiziellen Hautmodellen .....	27
Tabelle 8:	Chemikalien, Reagenzien und kommerziell erhältliche Kits .....	28
Tabelle 9:	Antikörper für histologische Analysen .....	28
Tabelle 10:	Antikörper für durchflusszytometrische Analysen.....	29
Tabelle 11:	Responder- und Stimulator-Zellen in der MLR .....	36

## **Erklärung**

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Induktion von GvHD-artigen Gewebeschäden an humanen artifiziellen Hautmodellen“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

### **Affidavit**

I hereby confirm that my thesis entitled „Induction of GvHD-like tissue damage in human artificial skin models” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, den 28.08.2017

---

Julia Wallstabe

## **Beiträge zur vorgelegten Arbeit**

Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit verschiedenen Personen und Abteilungen bearbeitet. Die Graduate School of Life Sciences der Universität Würzburg stellte im Rahmen des Programms zur Familienunterstützung die Finanzierung eines Hilfswissenschaftlers Herrn Lukas Freund zur Verfügung. Herr Freund übernahm unter meiner Anleitung und Betreuung experimentelle Arbeiten während meiner Schwangerschaft und des Mutterschutzes. Die Experimente wurden von Herrn Freund im Rahmen seiner Masterarbeit im Jahr 2016 durchgeführt. Teile der vorgelegten Arbeit enthalten Daten, welche von Herrn Freund im Rahmen seiner Masterarbeit erhoben worden sind. Dazu zählen die Versuche zur Oberflächenexpression immunmodulatorischer Moleküle auf primären humanen Hautzellen und deren Einfluss auf die Proliferation allogener PBMCs (siehe Abschnitt 3.1). Die Auswertung der Daten erfolgte unter meiner Anleitung. Für die vorliegende Arbeit wurden die Darstellungen der Daten von mir erstellt. Alle Daten, welche von Herrn Freund im Rahmen seiner Masterarbeit erhoben wurden, sind entsprechend gekennzeichnet.

Die Versuche im vaskularisierten Hautmodell im Bioreaktor wurden am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin unter Leitung von Prof. rer. bio. hum. Heike Walles durchgeführt. Dabei wurden uns die entsprechenden Technologien sowie fachliche Beratung bereitgestellt.

Histologische Färbungen wurden vom Labor der Dermatohistopathologie und Immunhistochemie des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt. Die Zytokinmessungen wurden von Frau Mariola Dragan der Forschungsabteilung für Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt.

Würzburg, den 28.08.2017

---

Julia Wallstabe

## Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

Groeber F, Engelhardt L, **Lange J**, Kurdyn S, Schmid FF, Rucker C, Mielke S, Walles H, Hansmann J

*A first vascularized skin equivalent for as an alternative to animal experimentation.*

ALTEX 2016; 33: 415-422

**Lange J\***, Weil F\*, Riegler C, Groeber F, Rebhan S, Kurdyn S, Alb M, Kneitz H, Gelbrich G, Walles H\*, Mielke S\*

*Interactions of donor sources and media influence the histo-morphological quality of full-thickness skin models.*

Biotechnol J. 2016; 11(10): 1352-1361

\*authors contributed equally to this work

### Konferenzbeiträge – Posterpräsentationen

**Lange J**, Weil F, Kurdyn S, Rebhan S, Groeber F, Walles H, Mielke S

*Optimized culture conditions for the generation of human full-thickness skin models.*

EUREKA 2014, International Symposium organized by the Students of the Graduate School of Life Sciences, Würzburg

**Lange J**, Weil F, Riegler C, Groeber F, Rebhan S, Kurdyn S, Gelbrich G, Walles H, Mielke S

*Donor sources and culture media influence the histo-morphological quality of full-thickness skin models in an interactive fashion.*

World Conference on Regenerative Medicine 2015, Leipzig



## Danksagung

*Mein großer Dank gilt ...*

... Prof. Dr. med. *Stephan Mielke*. Als mein Doktorvater hast du mir dieses wahnsinnig spannende Projekt zur Verfügung gestellt und mit hohem Anspruch und viel Enthusiasmus zum Gelingen dieser Arbeiten beigetragen. Für deine Ratschläge, deine kritischen Diskussionen und deinen Ansporn möchte ich dir danken!

... Prof. Dr. rer. biol. hum. *Heike Walles* und Prof. Dr. rer. nat. *Christoph Otto* als Mitglieder meines Thesis Committees. Vielen Dank für die Betreuung während meiner Promotion.

... der *Graduate School of Life Sciences* mit all ihren motivierten Mitarbeitern, die immer tatkräftig dabei halfen, die bürokratischen Hürden zu überwinden. Ich bedanke mich für die Finanzierung eines Hilfwissenschaftlers, welcher eine große Unterstützung bei der Bearbeitung des Projektes während meiner Schwangerschaft war.

... der *Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung* für die Finanzierung von Teilprojekten meiner Promotion.

... der *AG Mielke mit Silke, Miriam, Lukas, Lydia, Claudia, Mathias, Freddy & Steffi*. Ich danke euch von Herzen für eure Unterstützung und Freundschaft! An dieser Stelle möchte ich Silke hervorheben. Mit dir war kein Problem zu groß, kein Weg zu weit, keine Bitte zu viel. Deine selbstverständliche Hilfsbereitschaft, mit der du mich unterstützt hast, hat mir unglaublich viel Rückhalt gegeben. Danke, liebe Silke! Und Lukas möchte ich für seine tatkräftige Unterstützung und sein Verständnis in der Zeit seiner Masterarbeit danken!

... dem Team des *Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin* für die Hilfsbereitschaft und die Beantwortung vieler Fragen. Ganz besonders bedanke ich mich bei *Florian, Szymon, Freia, Christa, Sabine und den Ingenieuren!*

... Dr. med. *Hermann Kneitz* für die Beratung hinsichtlich der histopathologischen Beurteilung unserer Hautmodelle. Seinem Team der Dermatohistopathologie und Immunhistochemie danke ich vielmals für die Durchführung der histologischen Färbungen und die unkomplizierte und zuverlässige Zusammenarbeit!



... Prof. Dr. *Ana-Maria Waaga-Gasser* aus der Experimentellen Chirurgie und ihrer Mitarbeiterin *Mariola Dragan* für die Durchführung der Zytokinmessungen. Auch an dieser Stelle möchte ich mich für die unkomplizierte und zuverlässige Zusammenarbeit herzlich bedanken!

... dem *Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie* für die Bereitstellung der Zapfen.

... der *AG Löffler* stellvertretend für die angenehme Arbeitsatmosphäre im schönen Haus C11!

... *Mirjam* und *Miriam* für alle hilfreichen Korrekturen.

... meinem Mentor Dr. rer. nat. *Michael Wolf* für seine offene, herzliche Art und der Hilfestellungen zur Bewältigung jeglicher Probleme.

... nicht zuletzt *allen tapferen Spendern* der Hautproben sowie den Eltern für ihr Einverständnis. Besonders möchte ich auch den *Ärzten und Teams* danken für die Bereitstellung der Proben: Dr. med. Roland Bonfig & Moritz Böckenhoff (Urologie Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt), Dr. med. Gerhard Cermann & Dr. med. Ralf Karras (Urologische Praxis Meiningen), Dr. med. Michael Gruner (Urologische Praxis Bad Kissingen), Dr. med. Wolfgang Kieser (Urologische Praxis MainUrologie Kitzingen/Ochsenfurt), Prof. Dr. med. Jens Rassweiler & Dr. med. Koray Genisoglu (Urologie SLK-Kliniken Heilbronn) und Dr. med. Alexandra Weltzien (Kinderchirurgie Klinikum Frankfurt Höchst).

... der Organisation „*wellcome*“ in Würzburg für die Unterstützung bei der Betreuung unserer Tochter. Ein paar freie Momente haben wesentlich zum Voranschreiten der Dissertation beigetragen. Vielen Dank dafür!

.... *meinen lieben Freunden*, ganz nah und ganz fern, für eure offenen Ohren, euer Verständnis und eure Freundschaft.

... *meinen Eltern* für die stetige grenzenlose und bedingungslose Unterstützung. Mit einer unglaublichen Selbstverständlichkeit habe ich jede denkbare Hilfe von euch erhalten! Von Herzen vielen Dank für das Vertrauen in mich!

... meiner kleinen Familie – ihr seid die größten! *Lars & Ella*, ihr seid wundervoll!