

Inaugural-Dissertation



Migrationsfördernde Faktoren im intestinalen T-Zell-Homing während der akuten Graft-versus-Host Erkrankung

Migration-promoting factors in the intestinal T-cell homing during acute
graft-versus-host disease

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

vorgelegt von

Lukas Scheller

aus Riedenberg

Würzburg, September 2021





**Migrationsfördernde Faktoren im intestinalen T-Zell-Homing
während der akuten Graft-versus-Host Erkrankung**

Migration-promoting factors in the intestinal T-cell homing during
acute graft-versus-host disease

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

vorgelegt von

Lukas Scheller

aus Riedenberg

Würzburg, September 2021

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Nicolas Schlegel

1. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack

2. Betreuer: Prof. Dr. Hermann Einsele

3. Betreuer: PD Dr. Niklas Beyersdorf

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

I. Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Migration-promoting factors in the intestinal T-cell homing during acute graft-versus-host disease” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and 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.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Migrationsfördernde Faktoren im intestinalen T-Zell-Homing während der akuten Graft-versus-Host Erkrankung“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig 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.

Ort, Datum

Unterschrift

II. Danksagung

Die Realisierung dieses Projektes wäre ohne die Hilfe einiger Personen nicht möglich gewesen, weshalb ich an dieser Stelle ein paar Dankesworte ausrichten möchte.

Vielen Dank Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in Ihrem Labor anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für das Anvertrauen dieses großartigen Projektes, Ihre intensive Förderung und Ihre stetige wissenschaftliche Inspiration. Ihr herausragendes und umfassendes Mentoring hat es mir ermöglicht, mich während der gesamten Zeit wissenschaftlich wie auch persönlich bestmöglich zu entwickeln und hat mich in meinem Werdegang tief geprägt.

Vielen Dank an Prof. Dr. Hermann Einsele und PD Dr. Niklas Beyersdorf für die Bereiterklärung als Teil meines Promotionskomitees zu fungieren. Ihr wissenschaftlicher Input und konstruktive Kritik haben mir neue Sichtweisen auf das Projekt ermöglicht und wesentlich zu dessen Entwicklung und Fertigstellung beigetragen.

Herzlichsten Dank an Dr. Katja Jarick für die Möglichkeit Teil eines großartigen Projektes zu sein. Danke für die hervorragende Einführung und Lehre des wissenschaftlichen Arbeitens, welches den Grundstein für meine wissenschaftliche Entwicklung legte. Danke für die umfassende Betreuung, die fruchtbaren Diskussionen und Anregungen, ohne die dieses Projekt nicht hätte realisiert werden können.

Lieben Dank an die gesamte Arbeitsgruppe Beilhack, insbesondere auch an Duc-Dung Le, Carolin Graf, Estibaliz Arellano, Maria Ranecky, Haroon Shaikh, Musga Qureischi, Sina Thusek, Tim Steinfatt, Julia Hartweg und Dr. Zeinab Mokhtari für die großartige Aufnahme in die Gruppe, den intensiven und ergiebigen wissenschaftlichen Austausch sowie die Hilfe und Unterstützung.

Zuletzt auch herzlichen Dank an meine Familie, meine Eltern Stefan und Susanne, sowie meine Geschwister Marc und Cecilia, welche mich in meinem Werdegang jederzeit unterstützt haben.

III. Inhaltsverzeichnis

I. Affidavit	III
II. Danksagung	IV
III. Inhaltsverzeichnis	V
IV. Abbildungsverzeichnis	VIII
V. Abkürzungsverzeichnis	X
VI. Zusammenfassung	XII
VII. Summary	XIV
1. Einleitung	1
1.1. Graft-versus-Host Erkrankung	2
1.1.1. Pathogenese der akuten GvHD	3
1.2. Mechanismen der Zellmigration	5
1.2.1. Intrazelluläre Signalwege der Zellmotilität und Migration	7
1.2.2. T-Zell Motilität und Suchstrategien	10
1.3. Chemokine, Signalproteine der Zellmigration	11
1.4. T-Zellmigration während der akuten GvHD	12
2. Fragestellung	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Materialienliste	16
3.2. Puffer, Medium und Narkosemittel	22
3.3. Methoden	23
3.3.1. MHC-inkompatibles Mausmodell	23
3.3.2. Zellisolierung aus Mausorganen	23
3.3.2.1. Isolierung von Splenozyten	23
3.3.2.2. Isolierung von Knochenmarkzellen	24
3.3.3. T-Zell Anreicherung und T-Zell Depletion	24
3.3.4. Allogene Stammzelltransplantation	25
3.3.5. Bewertung des Grades der GvHD	27
3.3.6. Biolumineszenzbildgebung	27
3.3.7. Herstellung histologischer Präparate	28
3.3.8. Histologische Schnell-Färbeprotokolle	28
3.3.8.1. Toluidinblau-Färbung	28
3.3.8.2. Kresylviolett-Färbung	29
3.3.9. Laser-Mikrodissektion	29
3.3.10. Proteinexpressionanalyse	30

3.3.10.1. Protein-Isolierung und -Verdau in Lösung	31
3.3.10.2. Nanoskalierte Flüssig-Chromatographie Tandem-Massenspektrometrie	31
3.3.10.3. Datenauswertung Massenspektrometrie	32
3.3.11. Transkriptomanalyse	32
3.3.11.1. RNA Isolierung	33
3.3.11.2. Erstellung der Sequenzierungsbibliothek	33
3.3.11.3. RNA Sequenzierung	34
3.3.12. Durchflusszytometrie	35
3.3.13. Immunfluoreszenzfärbung	38
3.3.13.1. Auswertung der Immunfluoreszenz Bilder	39
3.3.14. Migrationsanalysen	40
3.3.14.1. <i>In vitro</i> T-Zell Stimulation	40
3.3.14.2. Transwell-Migrationsassay	41
3.3.14.3. Gewinnung <i>in vivo</i> stimulierter T-Zellen	41
3.3.14.4. Migrationsanalyse in der Lebendzellmikroskopie	42
3.3.15. Photokonversion und <i>in vivo</i> 2-Photononen Mikroskopie	43
4. Ergebnisse	44
4.1. Allogene SZT im MHC-inkompatiblem Mausmodell	44
4.2. Zeitpunkt der T-Zellinfiltration in den Darm nach allogener SZT	48
4.3. Intestinale T-Zellverteilung während der frühen aGvHD	49
4.4. Migrationsverhalten aktivierter T-Zellen an der Grenze zwischen Peyerschem Plaque und <i>Lamina Propria</i>	50
4.5. Laser-Mikrodissektion zur Gewinnung von RNA und Proteinproben aus intestinalen murinen Kryoschnitten	52
4.6. Ergebnisse der RNA Sequenzierung	53
4.6.1. Vergleich der Transkriptionsprofile der KM+T Gruppe und KM Kontrollgruppe	54
4.6.1.1. Oberflächenmarker und Zelltypen der intestinalen aGvHD	56
4.6.1.2. Chemokine der intestinalen aGvHD	61
4.6.2. Vergleich der Transkriptionsprofile zwischen <i>Lamina Propria</i> Bereichen nah und fern der PP während der aGvHD	63
4.6.2.1. Oberflächen- und Zellmarker nahe der Peyerschen Plaques	63
4.6.2.2. Aktivierungsmarker und migrationsfördernde Faktoren nahe der Peyerschen Plaques	66
4.7. Ergebnisse der Massenspektroskopie	69

4.8. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen	71
4.9. Ergebnisse der durchflusszytometrischen T-Zellanalyse während der frühen aGVHD	78
4.10. Ergebnisse der Migrationsanalysen	81
4.10.1. Ergebnisse der in-vitro Transwell-Migrationsversuche	81
4.10.2. Ergebnisse der Live-Mikroskopie Migrationsanalyse	81
5. Diskussion	83
5.1. Dynamik der aGvHD im MHC-inkompatiblem SZT Mausmodell	83
5.2. IFN- γ -induzierbare Chemokine und MIP sind entscheidende Faktoren des intestinalen T-Zell-Homings während der aGvHD	86
5.3. Die T-Zellinfiltration des Darmes beginnt bereits ab Tag 2,5 nach allogener SZT	88
5.4. T-Zellen formen einen Gradienten um den PP in der frühen aGvHD	88
5.5. Aktivierte T-Zellen migrieren direkt aus den PP in die angrenzende <i>Lamina Propria</i>	89
5.6. Aktivierte T-Zellen nahe der PP haben einen hoch-motilen Phänotyp	91
5.7. T-Zellen nahe der PP zeigen eine vermehrte Expression von CCR5, CCR9 und Integrin $\alpha 4\beta 7$	95
5.8. Die während der frühen aGvHD ausgeglichene CD4/CD8 T-Zellratio nahe der PP geht rasch in eine CD8 Dominanz über	97
5.9. Die <i>Lamina Propria</i> infiltrierenden T-Zellen exprimieren die kostimulatorischen Marker CD27 und CD2	98
5.10. CXCL11 und CCL4 fördern die Migration von Spender T-Zellen	100
6. Konklusion	101
7. Literaturverzeichnis	102
8. Lebenslauf	118
9. Publikationen	120

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phasen der akuten Graft-versus-Host Erkrankung.....	4
Abbildung 2: Unterschiedliche Modi der Migration.....	7
Abbildung 3: Intrazelluläre Signalwege der Zellmotilität.....	8
Abbildung 4: Mechanismen der endothelialen Transmigration.....	14
Abbildung 5: Transplantationsschema und experimentelle Gruppen.....	26
Abbildung 6: Laser Mikrodissektion.....	30
Abbildung 7: Erstellung der Sequenzierungsbibliothek und Ablauf der Illumina RNA Sequenzierung-durch-Synthese.....	35
Abbildung 8: Versuchsschema zur durchflusszytometrischen Analyse von Spender T- Zellen aus unterschiedlichen Organen und Darmabschnitten.....	37
Abbildung 9: Konfokalmikroskopische Aufnahme.....	38
Abbildung 10: Darstellung einer beispielhaften Immunfluoreszenz Auswertung für CD2.....	40
Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines μ -Slide Chemotaxis-Kammersystems.....	42
Abbildung 12: Aufreinigungsanalyse der transplantierten Zellen und Biolumineszenz- Signale der experimentellen Gruppen.....	45
Abbildung 13: Gewichtskurven und klinischer GvHD Score.....	46
Abbildung 14: Histopathologischer GvHD Score.....	47
Abbildung 15: Kinetik der T-Zell Infiltration in die intestinale Lamina Propria.....	49
Abbildung 16: Intestinaler T-Zellgradient der frühen GvHD.....	50
Abbildung 17: Aktivierte T-Zellen migrieren direkt aus den PP in die angrenzende Lamina Propria.....	51
Abbildung 18: Darstellung der Hauptkomponentenanalyse und Korrelations Heatmaps der RNAseq Daten.....	53
Abbildung 19: Heatmap RNAseq KM+T vs. KM Kontrolle vs. Ut Kontrolle.....	54
Abbildung 20: Vergleich der RNAseq-Transkriptionsprofile der KM+T vs. KM Kontrollgruppe in einem Vulkanplot.....	55
Abbildung 21: Oberflächenmarker und Zelltypen der intestinalen aGvHD.....	60
Abbildung 22: Chemokine der intestinalen akuten GvHD.....	62
Abbildung 23: Vergleich der RNAseq-Transkriptionsprofile der KM+T NtPP vs. FtPP Lamina Propria Areale in einem Vulkanplot.....	63
Abbildung 24: Oberflächen- und Zellmarker mit vermehrter Expression nahe der PP während der intestinalen aGvHD.....	66

Abbildung 25: Aktivierungs-/Signaltransduktionsmoleküle und migrationsfördernde Faktoren der intestinalen aGvHD nahe der PP.	68
Abbildung 26: Darstellung der Massenspektrometrie Ergebnisse als Box-plot Ausreißer...	70
Abbildung 27: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen der Chemokine CXCL9, CCL4 und CCL25.	72
Abbildung 28: Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD90.1, CD4 und CD8 β	74
Abbildung 29: Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD2 und CD27.	75
Abbildung 30: Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen für Coro1 α und Parvin- γ	77
Abbildung 31: Durchflusszytometrische Analyse der Spender T-Zellen an Tag 3,5 nach allogener SZT.....	79
Abbildung 32: Chemokin und Integrin Expression der Spender T-Zellen an Tag 3,5 nach allogener SZT.....	80
Abbildung 33: CXCL11 und CCL25 Transwell-Migrationsversuch.	81
Abbildung 34: in vivo Migrationsanalysen.	82

V. Abkürzungsverzeichnis

aGvHD	akute Graft-versus-Host Erkrankung (engl. <i>acute graft-versus-host disease</i>)
allogene SZT	allogene Stammzelltransplantation
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl. <i>Antigen-presenting cell</i>)
B6	C57BL/6 Mausstamm
BLI	Biolumineszenzbildgebung (engl. <i>Bioluminescence imaging</i>)
BM/KM	<i>Bone marrow</i> /Knochenmark
BSA	Bovines Serumalbumin
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFZ	Durchflusszytometrie
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FC	<i>Fold Change</i>
FCS	fetales Kälberserum (engl. <i>Fetal calf serum</i>)
FDR	Falsch-Entdeckungs-Rate (engl. <i>False-Discovery-Rate</i>)
FMO	Fluoreszenz minus eins (engl. <i>Fluorescence minus one</i>)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>Forward scatter</i>)
FtPP	Laser-mikrodissezierter <i>Lamina Propria</i> Abschnitt mit >1500 µm Distanz zu dem nächstgelegenen Peyerschen Plaque (engl. <i>Far to Peyer's patch</i>)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HLA	Histokompatibilitätsantigene (engl. <i>Huma-Leukocyte-Antigen</i>)

IFF/IFM	Immunfluoreszenzfärbung/Immunfluoreszenzmikroskopie
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand (engl. <i>interquartile range</i>)
Kat.#	Katalognummer
KM Kontr.	Nur mit Knochenmarkzellen transplantierte Kontrollmäuse
KM+T	Mit Knochenmarkzellen und T-Zellen transplantierte Mäuse
LMD	Laser-Mikrodissektion, LMD1/2 Transplantationsreihen für Laser-Mikrodissektionsexperimente Nummer 1/2
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>Major histocompatibility complex</i>)
NRS	Normales Rattenserum
n.s.	nicht signifikant (p – Wert bzw. adj. p – Wert $>0,05$)
NtPP	Unmittelbar an den Peyerschen Plaque angrenzender und $<500 \mu\text{m}$ entfernter, Laser-mikrodissezierter Bereich der intestinalen <i>Lamina Propria</i> (engl. <i>Next to Peyer's patch</i>)
OE	Organentnahme
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Proteine
PP	Peyerscher Plaque
RIN	RNA Integritäts Nummer
RNAseq	RNA Sequenzierung
SMART	Wechselmechanismus am 5'-Ende der RNA Vorlage (engl. <i>Switching Mechanism At 5'-End of RNA Template</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>Side Scatter</i>)
Ut Kontr.	Untransplantierte Kontrollmäuse
WT	Wildtyp

VI. Zusammenfassung

Die akute Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD), insbesondere die Darm GvHD, stellt weiterhin eine der Hauptursachen für Mortalität und Morbidität nach allogener SZT dar. Aktivierte, alloreaktive Spender T-Zellen infiltrieren dabei über die Blutbahn die intestinale *Lamina Propria*. Erst kürzlich konnten wir zeigen, dass neben der vaskulären Migration ein Teil der Spender T-Zellen auch direkt aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* migrieren. Um Faktoren, die diese direkte Migration fördern, zu untersuchen und die direkt migrierenden T-Zellen genauer zu charakterisieren, verwendeten wir ein MHC-inkompatibles Mausmodell zur Induktion einer akuten GvHD.

Durch RNA Sequenzierung und Massenspektrometrie lasermikrodissezierter Darmschleimhautproben konnte eine starke Expression der Chemokine CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4 und CCL5 während der akuten intestinalen GvHD aufgezeigt werden. Neben CCL4 und CXCL11 wiesen verschiedene Faktoren der T-Zellaktivierung, wie CD3 ζ , LAT, Lck und ZAP70, sowie Faktoren der zytoskeletalen Reorganisation, wie Dock2, Coro1 α und Parvin- γ , eine vermehrte Expression insbesondere nahe der PP auf. Die Expression der migrationsfördernden Faktoren Coro1 α und Parvin- γ in Spender T-Zellen nahe der PP konnte anschließend mittels histologischen Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden. Durchflusszytometrische Analysen konnten weiterhin eine vermehrte Expression von CCR5, CCR9 und Integrin $\alpha 4\beta 7$ auf den vornehmlich Tbet⁺ Spender T-Zellen nahe der PP nachweisen. Funktionelle *in vitro* Migrationsversuche zeigten abschließend, dass *in vivo* aktivierte Spender T-Zellen eine gerichtete Migration in Richtung auf CXCL11 und zu späterem Zeitpunkt auch auf CCL4 vollziehen können.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit die Bedeutung zahlreicher Chemokine für das sequenzielle T-Zell-Homing während der akuten intestinalen GvHD. Neben der insbesondere durch Faktoren der zytoskeletalen Reorganisation vermittelten amoeboiden Migration kann auch eine mesenchymale Fortbewegung über Faktoren wie CCR5, CCR9 und Integrin $\alpha 4\beta 7$ die direkte Migration der T-Zellen fördern. Den direkt migrierenden vornehmlich T_H1 polarisierten Zellen folgen weitere, CD27 und Integrin $\alpha L\beta 2$ exprimierende, zytotoxische T-Zellen aus der Blutbahn. Die direkt migrierenden Zellen könnten als Initiator und Potentiator der intestinalen T-

Zell Infiltration wirken und müssen für zukünftige therapeutische Strategien nicht nur der Darm GvHD, sondern der intestinalen Inflammation im Allgemeinen mitberücksichtigt werden.

VII. Summary

Acute graft-versus-host disease (GvHD), especially intestinal GvHD, remains one of the main causes of mortality and morbidity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In this process activated alloreactive donor T cells infiltrate the intestinal *lamina propria* via the bloodstream. Our group could recently show that besides the vascular migration route some donor T cells migrate directly from the Peyer's patches into the adjacent *lamina propria*. To investigate factors that could promote such a direct migration, and to characterize these direct migrating T cells we applied a major mismatch mouse model to induce acute GvHD.

Using RNA sequencing and mass spectrometry of lasermicrodissected *lamina propria* samples, we detected a strong upregulation of the chemokines CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4 and CCL5 during acute intestinal GvHD. Alongside CCL4 and XCL1, several factors of T cell activation, such as CD3 ζ , LAT, Lck und ZAP70, as well as factors of cytoskeletal reorganization, such as Dock2, Coro1 α und Parvin- γ , showed higher expression near the Peyer's patches. Subsequently, we validated the expression of Coro1 α and Parvin- γ on donor T cells near the Peyer's patches with histological immunofluorescence stainings. Flow cytometry analysis further revealed high expression of CCR5, CCR9 and Intgerin α 4 β 7 on the predominantly Tbet⁺ donor T cells near the Peyer's patches. Conclusively, *in vitro* migration assays showed that *in vivo* activated donor T cells can directly migrate towards CXCL11 and subsequently also towards CCL4.

The present study shows the relevance of several chemokines for the sequential T-cell homing during acute intestinal GvHD. Besides the amoeboid migration mode, which is particularly driven by cytoskeletal reorganization, a mesenchymal movement using factors, such as CCR5, CCR9 and Integrin α 4 β 7, can promote the direct migration of donor T cells. The directly migrating cells, which are predominantly of a T_H1 phenotype, are followed by cytotoxic T cells, expressing CD27 and Integrin α L β 2 (LFA-1), from the systemic circulation. Thus, these directly migrating cells may act like an initiator and potentiator for the intestinal T cell infiltration and must be considered for new therapeutic strategies not only of GvHD but of intestinal inflammation in general.

1. Einleitung

Alle 15 Minuten erhält in Deutschland ein Mensch die Diagnose Blutkrebs (DKMS 2021). Hierunter werden nicht nur Leukämien mit über 13.000 Neuerkrankungen im Jahr 2016 zusammengefasst, sondern auch das Hodgkin Lymphom (2.490 Neuerkrankungen 2016), die Gruppe der Non-Hodgkin Lymphome (über 18.000 Neuerkrankungen) sowie das Multiple Myelom (über 6.500 Neuerkrankungen) (RKI 2021). Viele dieser Erkrankungen haben eine schlechte Prognose mit durchschnittlichen 5-Jahres Überlebensraten von teilweise weniger als 60 % und einer hohen Rezidiv-Wahrscheinlichkeit nach initial erfolgreicher Therapie. Für viele dieser Patienten ist eine allogene SZT die einzige Möglichkeit zur kurativen Behandlung ihrer Erkrankung.

Dabei werden nach Konditionierung durch Bestrahlung, Chemo- oder Antikörpertherapie, Stammzellen eines möglichst HLA-identischen Spenders transfundiert. Die transplantierten Stammzellen rekonstituieren hierbei das hämatopoetische System und richten sich dabei gegen die verbliebenen Tumorzellen, welches den erwünschten Graft-versus-Leukämie (GvL) Effekt darstellt. Allerdings werden durch die alloreaktiven T-Zellen teilweise auch körpereigene Organe und Gewebe als fremd erkannt und zerstört, was als Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) bezeichnet wird und eine der Hauptursachen für Nicht-Rezidiv-assoziierte Mortalität nach allogener SZT darstellt. Häufig finden diese beiden Reaktionen in gleichem Maße statt, sodass Patienten mit GvHD aufgrund des GvL Effekts gleichzeitig auch seltener Rezidive erleiden. Leider konnte bis heute noch keine erfolgreiche Separation dieser Effekte erzielt werden, weswegen die nötige Balance zwischen einerseits guter Immuntoleranz und wenig GvHD sowie andererseits aber guter GvL und niedriger Rezidiv-Wahrscheinlichkeit entscheidend ist.

Risikofaktoren, die mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer GvHD nach allogener SZT assoziiert sind, sind unter anderem eine HLA- und Geschlechterungleichheit zwischen Spender und Empfänger, ein hohes Alter des Empfängers, eine hohe Intensität des Konditionierungsregimes, sowie die Gewinnungsart/-ort der allogenen Stammzellen (Nabelschnurblut- und Knochenmarktransplantate haben ein niedrigeres Risiko als periphere Blutstammzelltransplantate). Aufgrund der HLA Komplexität und Variabilität in der Bevölkerung findet jedoch jeder zehnte Patient keinen ausreichend passenden Spender (DKMS 2021). Zudem sind viele der an Blutkrebs erkrankten Patienten zu alt und zu morbid, um die mit einer Stammzelltransplantation verbundenen Nebenwirkungen und Komplikationen

zu überleben. Aufgrund dessen ist es von enormer Bedeutung die Mechanismen der ablaufenden GvHD zu verstehen, um diese selektiv zu inhibieren, gleichzeitig aber den positiven GvL Effekt zu erhalten. Hierdurch könnte diese erfolgversprechende Therapie in Zukunft auch für eine Vielzahl von Patienten zugänglich gemacht werden, welche aktuell keine Chance auf eine Heilung ihrer Erkrankung haben.

1.1. Graft-versus-Host Erkrankung

Die Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) kann in eine akute Reaktion, welche weniger als 100 Tage nach allogener SZT auftritt, und eine chronische Reaktion, welche frühestens 100 Tage nach der Transplantation in Erscheinung tritt, unterschieden werden. Ungefähr 30-60% aller allogenen transplantierten Patienten entwickeln eine akute Graft-versus-Host Erkrankung (Zeiser and Blazar 2017), wobei bis zu 14 % einen schweren oder sehr schweren Verlauf erleiden (Grad 3-4) (Gooley, Chien et al. 2010). Die GvHD ist nicht nur eine der Hauptursachen für Nicht-Rezidiv-assoziierte Mortalität, welche ungefähr 20-26 % nach allogener SZT beträgt, sondern auch maßgeblich für die therapiebedingte Morbidität verantwortlich (Giebel, Labopin et al. 2009, Gooley, Chien et al. 2010). Dabei beschränkt sich die akute Graft-versus-Host Erkrankung meist auf die Hauptmanifestationsorte Haut, Darm und Leber.

Die früheste Manifestation einer akuten GvHD der Haut ist häufig ein makulopapulöses Exanthem oder eine Erythrodermie beginnend im Nacken, Dekolleté, sowie den Handinnenflächen und Fußsohlen. Dieser teilweise sonnenbrandähnliche Ausschlag kann sich rasch auf das ganze Integument ausbreiten und zu einer bullösen Ablösung der Haut führen. Obwohl die Haut das am häufigsten betroffene Organ ist und auch die frühesten Hinweiszeichen auf eine akute GvHD liefert, ist insbesondere die Entzündung des Darms mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert (Harris, Young et al. 2016).

Bei der gastrointestinalen GvHD sind insbesondere wässrige bis hin zu blutigen Durchfällen, krampfartige Bauchschmerzen (Tenesmen), sowie Übelkeit und Erbrechen klinisch führend. Histopathologisch zeigen sich Kryptennekrosen und mukosale Defekte bis hin zum vollständigen Verlust des intestinalen Epithels. Die Patienten sind dadurch, neben schweren Diarrhöen mit teilweise Flüssigkeitsverlusten von über 10 Liter pro Tag, auch der Gefahr einer Translokation intestinaler Bakterien und einer daraus resultierenden Sepsis ausgesetzt. Blutverluste können zusätzlich zu schweren Hämoglobinabfällen mit akutem und dauerhaften Transfusionsbedarf führen. Langfristig resultiert

Einleitung

aus der Zerstörung der normalen Darmarchitektur eine Malabsorption von Nährstoffen mit Mangelzuständen und ausgeprägtem Gewichtsverlust bis hin zum Tod der Patienten.

Eine GvHD der Leber kann sich klinisch durch einen Ikterus sowie laborchemisch steigende Cholestasewerte und Transaminasen bis hin zum Leberversagen manifestieren. Aufgrund der weitreichenden Folgen einer GvHD werden Patienten nach allogener SZT prophylaktisch mit Immunsuppressiva wie Calcineurininhibitoren behandelt. Kommt es dennoch zur Entwicklung einer GvHD dienen in erster Linie Glucocorticoide als Mittel, um die überschießende Immunreaktion zu mindern. Im Verlauf entwickeln jedoch die Hälfte der Patienten eine Steroid-Refraktärität, wodurch die Mortalitätsraten auf über 70% steigen (Hill, Alousi et al. 2018).

1.1.1. Pathogenese der akuten GvHD

Die akute GvHD lässt sich pathogenetisch in eine Induktionsphase, eine Aktivierungsphase und eine Effektorphase einteilen (Ferrara, Levine et al. 2009) (Abbildung 1). Die gewebezerstörenden Effekte der Chemotherapie oder Bestrahlung im Rahmen des Konditionierungsregimes bewirken in der ersten Phase eine vermehrte Produktion inflammatorischer Cytokine wie $\text{TNF}\alpha$, Interleukin-1 und Interleukin-6 durch empfängereigene Zellen (Hill, Crawford et al. 1997). Darüber hinaus kommt es zu einer massiven Freisetzung von Chemokinen und einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen (Shen, French et al. 1994, Mapara, Leng et al. 2006). Die Zerstörung der Integrität des Gastrointestinaltraktes durch die Konditionierung bewirkt durch die Translokation von Bakterien und Lipopolysacchariden (LPS) dabei eine weitere Verstärkung des inflammatorischen Milieus (Hill, Crawford et al. 1997). All diese Effekte führen zu einer starken Aktivierung empfangereigener antigenpräsentierender Zellen (APC), welche eine der Initiatoren der nachfolgenden Immunantwort darstellen (Matzinger 2002).

In der zweiten Phase kommt es durch Präsentation von Empfänger-Antigenen auf Antigen-präsentierenden Zellen zu einer starken Aktivierung von Spender T-Zellen. Nach der Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen migrieren diese zu den die jeweiligen Gewebe drainierenden sekundär lymphatischen Organen wie den peripheren bzw. mesenterischen Lymphknoten oder den PP. Hier findet die Interaktion mit den Spender T-Zellen statt, welche nach der Transplantation rasch aus der Blutbahn mithilfe spezifischer Adhäsionsmoleküle in die sekundär-lymphatischen Organe (SLO) einwandern.

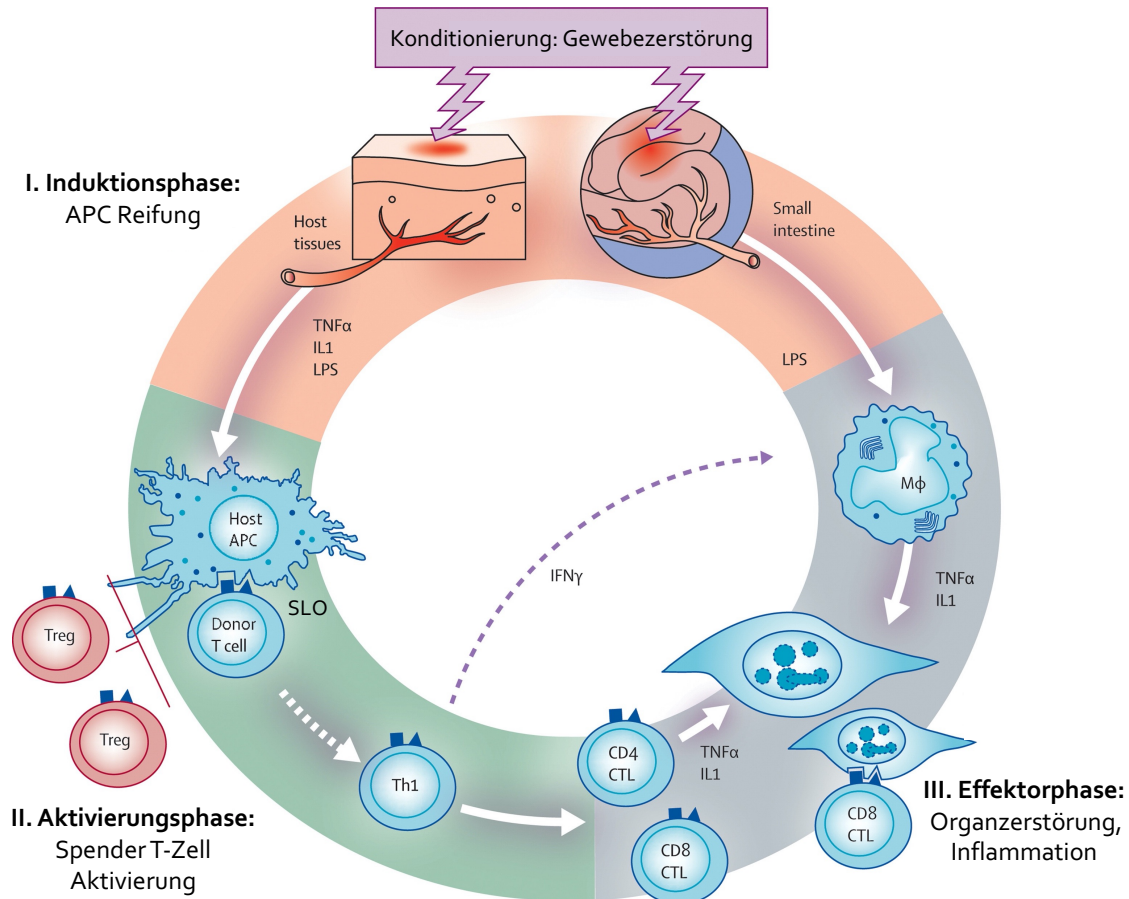


Abbildung 1: Phasen der akuten Graft-versus-Host Erkrankung. (I) Induktionsphase. Durch die gewebeerstörende Wirkung des Konditionierungsregimes und das dadurch entstehende inflammatorische Milieu kommt es zu einer Reifung von empfängereigenen antigenpräsentierenden Zellen (Host APC). (II) Aktivierungsphase. Die APC interagieren in den sekundär-lymphatischen Organen (SLO) mit Spender T-Zellen (Donor T cell), was zur Aktivierung und Proliferation der T-Zellen führt. (III) Effektorphase. Die aktivierten Spender T-Zellen wandern zu ihren Zielstrukturen und vermitteln die Zerstörung von Empfängerorganen. Abbildung modifiziert aus Ferrara JLM, *et al.*, 2008. „Graft-versus-host disease“, freundlicherweise zur Verfügung gestellt unter der Lizenz-Nummer 4974870193703.

Die Interaktion der beiden Zelltypen führt zu einer Aktivierung und Proliferation der alloreaktiven Spender T-Zellen. Die in der Induktionsphase freigesetzten Zytokine verstärken die Aktivierung weiterhin, wohingegen beispielsweise regulatorische T-Zellen eine inhibierende Wirkung vermitteln (Abbildung 1). Die Aktivierung der Immunzellen führt zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen und Zytokin-Rezeptoren. Durch den während der akuten GvHD vorherrschenden T_H1 T-Zellphänotyp werden dabei insbesondere IFN- γ , TNF α und Interleukin-2 freigesetzt (Krenger and Ferrara 1996). IFN- γ induziert eine vermehrte Expression von Chemokinen, Chemokinrezeptoren, MHC-Proteinen und Adhäsionsmolekülen (Wysocki, Panoskaltis-Mortari et al. 2005). Darüber hinaus bewirkt IFN- γ auch eine Sensibilisierung von Makrophagen für die Stimulation durch LPS, wurde jedoch durch die beschleunigte Apoptose aktivierter T-Zellen auch im Zusammenhang mit GvHD unterdrückenden Effekten beschrieben (Brok, Heidt et al. 1993).

Einleitung

Die letzte Phase der akuten GvHD ist gekennzeichnet durch eine zytokin- sowie immunzellvermittelte Organzerstörung. Zu den zellulären Effektoren dieser Phase zählen insbesondere zytotoxische T-Zellen und NK Zellen, welche überwiegend durch FAS/FASL Interaktionen oder den Granzym/Perforin Signalweg zu einer Zerstörung der Zielzellen führen (Kägi, Vignaux et al. 1994). Unter den humoralen Effektoren sind während der akuten GvHD vor allem die von stimulierten Monozyten und Makrophagen freigesetzten Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und Interleukin-1 von großer Bedeutung. Die im Rahmen der Induktionsphase ablaufende massive Freisetzung und Translokation von bakteriellen Bestandteilen, wie Lipopolysacchariden, bewirkt dabei über Toll-Like Rezeptoren (TLR) die Aktivierung der Makrophagen und Monozyten. Dies stellt einen wichtigen Initiator und Mediator des ablaufenden Zytokinsturms dar (Cooke, Olkiewicz et al. 2002). Die freigesetzten Zytokine bewirken hierbei nicht nur eine rein direkte Zell- und Gewebeerstörung, sondern fördern durch die Induktion inflammatorischer Chemokine auch die Rekrutierung von Effektorzellen zu den Effektororganen, wodurch die Inflammation und Gewebeerstörung weiter aggraviert wird.

1.2. Mechanismen der Zellmigration

Unter Zellmigration (latein. *migrare*, ‚wandern‘) versteht man im Allgemeinen die Wanderung, also die aktive Ortsveränderung, von Zellen. Abgrenzend hiervon steht der Begriff Homing (deutsch ‚Rückkehr‘) ursprünglich für die Rückkehr immunkompetenter Lymphozyten in die primär und sekundär lymphatischen Organe. Häufig, so auch in dieser Arbeit, wird auch das Einwandern von Lymphozyten über die Blutbahn in ihre Zielorgane als Homing bezeichnet und die dabei beteiligten Rezeptoren entsprechend als Homingrezeptoren. Zur genaueren Beschreibung der eigentlichen Zellmigration dienen die Begriffe Chemokinese, Chemotaxis, Haptokinese und Haptotaxis (Friedl and Weigelin 2008). Unter Chemokinese versteht man die ungerichtete Migration von Zellen auf gelöste chemische Stimuli. Dagegen beschreibt die Chemotaxis die gerichtete Migration von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten. Haptokinese und Haptotaxis beschreiben die ungerichtete bzw. gerichtete Migration von Zellen entlang eines strukturgebundenen Signalstoffes bzw. dessen Gradienten.

Einleitung

Die verschiedenen Modi beziehungsweise Mechanismen der Zellmigration können unterschieden werden in mesenchymale, lopopodiale und amoeboid Migration (Yamada and Sixt 2019)(Abbildung 2). Bei der mesenchymalen Migration kommt es durch Aktinpolymerisation am führenden Zellpol zur Ausbildung einer Plasmaaustülpung, dem sogenannten Lamellipodium. Über die Integrin-vermittelte Ausbildung von Fokalkontakten am vorderen Zellpol kommt es zu einer Adhärenz der Zelle an die umgebende extrazelluläre Matrix. Anschließend führt die Auflösung der Fokalkontakte und Aktin-vermittelte Kontraktion am hinteren Zellpol zur Protrusion der Zelle.

Die amoeboid Migration dagegen ist gekennzeichnet durch wenig adhäsive Interaktionen und eine ausgeprägte zelluläre Verformbarkeit. Neben der Aktin-vermittelten Zellprotrusion spielt für die amoeboid Migration vor allem die Ausbildung von Plasmamembran Aussackungen eine bedeutende Rolle. Dabei kommt es aufgrund von hydrostatischen Kräften durch intrazelluläre Aktinkontraktionen, sowie eine stellenweise Lockerung der Plasmamembran-Aktinkortex Interaktion zu Membranaussackungen. Aufgrund ihres bläschenartigen Charakters werden diese Aussackungen im englischsprachigen als *Blebs* und der Vorgang selbst als *Blebbing* bezeichnet.

Die lobopoidale Migration kann als Mischform der mesenchymalen und amoeboiden Migration gesehen werden. Durch Aktin-vermittelten intrazellulären Druck kommt es zur Ausbildung Bleb-ähnlicher Membranprotrusionen, sogenannter Lobopodien (Yamada and Sixt 2019). Die Zelle bildet an diesen Protrusionen fokale Adhäsionen und bewegt sich durch die Ausübung von Zugkräften auf die umgebende Extrazellulärmatrix und einem daraus resultierenden Nachziehen der Zelle fort (Yamada and Sixt 2019).

Die mesenchymale, amoeboid und lobopoid Migration dürfen jedoch nicht als vollständig voneinander abgegrenzte Modi gesehen werden. So bedienen sich diese teilweise gemeinsamer intrazellulärer Mechanismen und Signalketten, wie beispielsweise die Aktin-vermittelte zytoskelettale Reorganisation und zelluläre Verformung. Die mesenchymale Migration ist dabei gekennzeichnet durch eine geradlinige Migration entlang der EZM Fasern, wobei sich die Zelle auch unter Mithilfe von Proteolyse ihren Weg bahnt (Abbildung 2, A). Bei der wenig adhäsiven amoeboiden Migration dagegen schiebt sich die Zelle durch ihre Plasmamembran Aussackungen (*Blebs*) entlang des Weges des geringsten Widerstandes durch die EZM (Abbildung 2, B). Abhängig von den jeweiligen äußeren Umständen können die Zellen auch zwischen den unterschiedlichen Migrationsmodi wechseln.

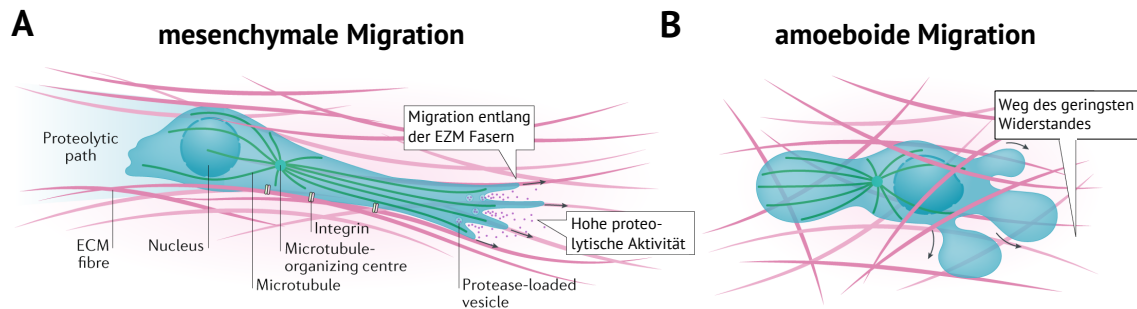


Abbildung 2: Unterschiedliche Modi der Migration. Die mesenchymale Migration (A) ist gekennzeichnet durch die Migration der Zelle entlang der EZM über Integrin-vermittelte Adhäsionen, sowie eine hohe proteolytische Aktivität am führenden Zellpol. Die amoeboiden Migration (B) zeigt ein geringes Maß an adhäsiven Interaktionen mit der EZM. Die Zelle schiebt sich entlang des geringsten Widerstandes durch die Lücken der EZM. Bild modifiziert von Yamada, K. M. and M. Sixt (2019). "Mechanisms of 3D cell migration", freundlicherweise zur Verfügung gestellt unter der Lizenz-Nummer 4983120665757.

1.2.1. Intrazelluläre Signalwege der Zellmotilität und Migration

Die Bindung eines Chemokins an seinen entsprechenden Rezeptor führt zur Aktivierung und Konformationsänderung der membrandurchspannenden Domänen des Rezeptors, sodass dieser als GTP Austauschfaktor und somit Aktivator des nachgeschalteten heterotrimeren G-Proteins fungiert. Durch den Austausch von GDP durch GTP an der Alpha Untereinheit des G Proteins zerfällt das heterotrimere Protein in seine aktiven Untereinheiten $G_{\alpha i}$ und $G_{\beta\gamma}$, welche die weitere Signaltransduktion übertragen (Abbildung 3). Über die Aktivierung weiterer Kinasen wie die Tyrosin Kinase Src, die Janus Kinase-Signaltransduktor und Aktivator der Transkription (JAK-STAT) sowie die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) werden die weiteren zellulären Effekte vermittelt (Kehrl 2006).

Durch die Kinasen Src und PI3K werden unter anderem der GTP-Austauschfaktor Dock2 (*Dedicator of Cytokines 2*) aktiviert, welcher wiederum durch das Austauschen von GDP mit GTP die GTPasen Rac1 und Rac2 aus der Familie der Rho GTPasen aktiviert. Diese bewirken zusammen mit den Proteinen Vav, WASP, Cdc42, Arp2/3, sowie Coro1 α die zytoskelettale Reorganisation, welche entscheidend für die zielgerichtete Migration der Zelle ist (Mellado, Rodríguez-Frade et al. 2001, Thelen and Stein 2008).

Durch die Janus Kinase sowie den Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg kommt es zur Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Transkriptionsfaktoren, welche nicht nur langfristige Effekte auf die chemotaktische Zellantwort und Migration, sondern auch auf die Proliferation und das Überleben der Zelle haben. Darüber hinaus wird auch die Änderung der Integrin Affinität, sowie die Bildung und Aufhebung fokaler Adhäsionen mit der EZM vom Chemokinrezeptor-Signaling

Einleitung

moduliert. So wird durch die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit unter anderem die Phospholipase C aktiviert, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) aufspaltet. DAG wiederum aktiviert die Proteinkinase C, welche Paxillin als wichtiges Adaptor- und Regulatorprotein fokaler Adhäsionen aktiviert.

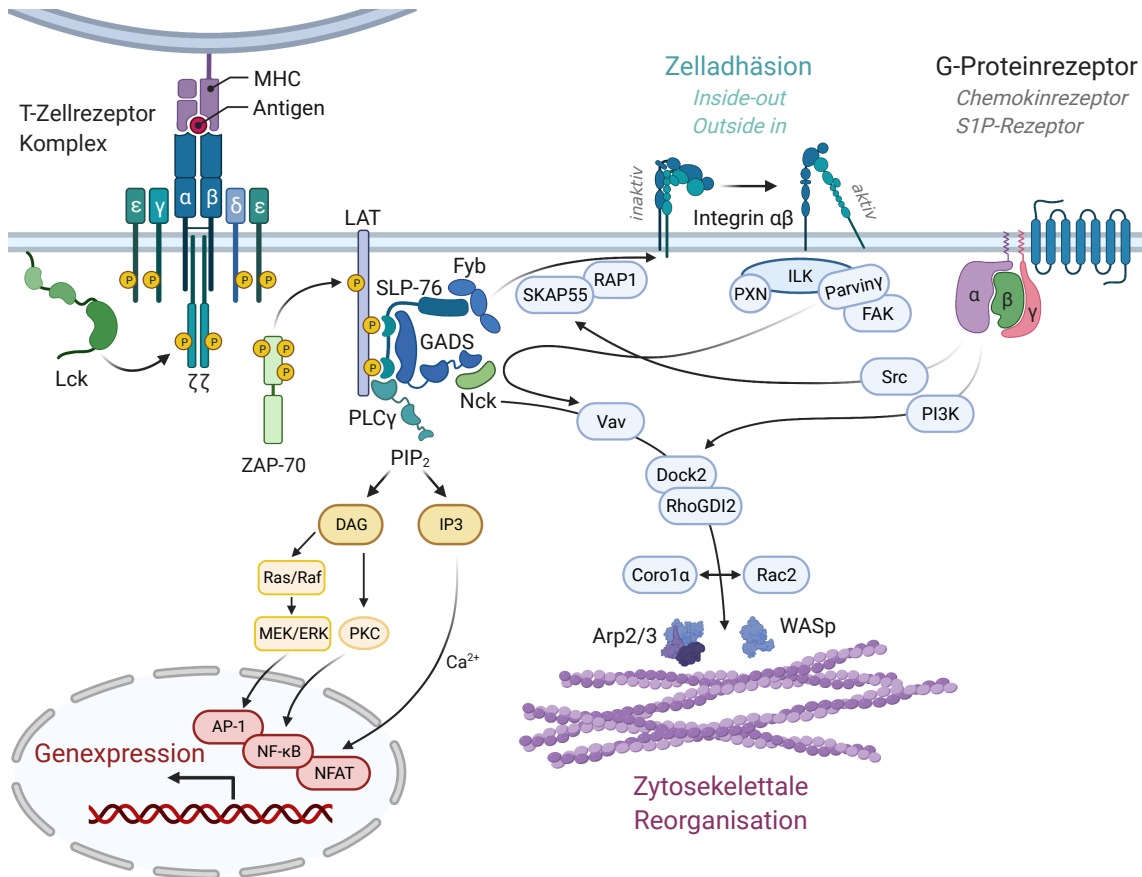


Abbildung 3: Intrazelluläre Signalwege der Zellmotilität. Der T-Zell-Rezeptor-Komplex vermittelt über verschiedene Signalmoleküle intrazelluläre Effekte wie die Regulation der Genexpression, Integrin-vermittelte Zelladhäsion und zytoskelettale Reorganisation. G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie Chemokinrezeptoren können durch teilweise gleiche intrazelluläre Mechanismen die Zelladhäsion und das Zytoskelett und somit die Motilität regulieren. Über das Integrin Outside-In-Signaling können die Integrine auch selbst Einfluss auf das Zytoskelett nehmen. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Zu den intrazellulären Signalwegen mit Einfluss auf die Zelladhäsion und Migration zählt jedoch nicht nur die vom Chemokinrezeptor ausgehende Signaltransduktion. So haben auch der T-Zellrezeptor (TCR) und der γ -Parvin-Integrin-gekoppelte-Kinase (ILK) Signaltransduktionskomplex Einfluss auf die zytoskelettale Reorganisation und Zellmotilität (Wu and Dedhar 2001, Pribila and Shimizu 2003, Yoshimi, Yamaji et al. 2006).

Nach Bindung eines passenden Antigen-MHC Komplexes an den TCR und seinen Korezeptor (CD4/CD8) phosphorylieren die Tyrosinkinase Lck (*lymphocyte specific protein tyrosin kinase*) und Fyn intrazellulär sogenannte Immunoglobulin-Tyrosin-Aktivierungsmotive (ITAMs) der an den

Einleitung

Rezeptorkomplex angelagerten CD3 Adapterproteine (Brownlie and Zamoyska 2013). An die phosphorylierten Tyrosinreste bindet die Proteinkinase ZAP-70 (*Zeta chain associated protein kinase 70*), welches von Lck phosphoryliert und somit aktiviert wird. Die aktivierte Proteinkinase ZAP-70 wiederum kann nun LAT (*Linker for activation of T cells*) phosphorylieren, welches ein entscheidendes Bindeglied der T-Zellrezeptor Signaltransduktion darstellt. Über die Adapterproteine SLP-76 (LCP2; *Lymphocyte cytosolic protein 2*) und Fyb (ADAP; Adhäsions- und Degranulations-förderndes Adapterproteine) werden weitere Proteine wie SKAP1 (Src Kinase-assoziiertes Phosphoprotein 1) aktiviert, welches eine Aktivierung der Integrine und verstärkte Zelladhäsion vermittelt (Brownlie and Zamoyska 2013). Über Vav, Dock2, Rac, WASP, WAVE2, Arp2/3 wird wie bei der Chemokinrezeptor-Signaltransduktion die zytoskelettale Reorganisation der Zelle gesteuert (Kumari, Curado et al. 2014), welche entscheidend für die Motilität der Zelle und die stabile Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen Antigen-präsentierender Zelle und T-Zelle ist (Billadeau, Nolz et al. 2007). Die durch den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg, sowie durch die Phospholipase und Proteinkinase C-Signalwege aktivierten Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NF- κ B bewirken durch Veränderung der Genexpression die längerfristigen Effekte der T-Zellaktivierung (Gaud, Lesourne et al. 2018).

Die Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett mit den assoziierten intrazellulären Signalproteinen und der extrazellulären Matrix (EZM) ist ein wichtiger Bestandteil der Zellmotilität und Migration (Wu and Dedhar 2001). Ein essenzieller Mediator dieser Verknüpfung ist der γ -Parvin-Integrin-gekoppelte-Kinase (ILK) Signaltransduktionskomplex. Parvin- γ spielt dabei besonders für die Zell-Substrat-Interaktion eine bedeutende Rolle, indem es wichtige Signale der Integrine von extrazellulär ins Zellinnere und insbesondere an das zytoplasmatische Aktin übermittelt (Yoshimi, Yamaji et al. 2006). Zusammen mit der Integrin-gekoppelten-Kinase (ILK) zeigt es dabei eine polarisierte Verteilung innerhalb der Zelle und ist zusammen mit Aktin insbesondere am führenden Zellpol lokalisiert (Yoshimi, Yamaji et al. 2006). Der Parvin- γ -Integrin-gekoppelte-Kinase (ILK) Komplex ist über die Vermittlung von Signalen der Integrine an das Zytoskelett für die Polarität der Zelle und somit für die Initiation der Zellmigration von entscheidender Bedeutung. Im Einklang hiermit konnten Liu, Sinha et al. (2005) zeigen, dass T-Zellen mit defizienter ILK eine verminderte Chemotaxis gegenüber Chemokinen aufweisen.

1.2.2. T-Zell Motilität und Suchstrategien

Während einer Immunantwort muss eine T-Zelle mehrfach in unterschiedlichen Situationen und Geweben ihr passendes Antigen oder Zielstruktur finden. Etwa eine aus hunderttausenden von T-Zellen ist spezifisch für ein bestimmtes Antigen, entsprechend schnell muss diese Suche erfolgen, um eine schnelle und rechtzeitige Immunantwort zu gewährleisten (Blattman, Antia et al. 2002). Die T-Zellmotilität ist dabei ein wesentlicher Faktor, um die Suche der T-Zelle nach ihrer passenden Zielstruktur effizient zu ermöglichen.

Auf Ebene der Verhaltensbiologie lassen sich dabei unterschiedliche Bewegungsmuster unterscheiden. Eine mit wenigen Vorinformationen ausgestattete explorative Bewegung, eine bereits durch erhaltene Informationen mehr zielgerichtete bzw. navigierte Bewegung, sowie eine Bewegung als Reaktion auf lokale Gegebenheiten (Nathan, Getz et al. 2008, Krummel, Bartumeus et al. 2016). Naive T-Zellen, welche noch keine Informationen im Rahmen Ihrer Aktivierung erhalten haben, zeigen ein exploratives Bewegungsmuster. Durch Zufallsbewegung (engl. *random walk*, Braunsche Bewegung) suchen diese die antigenpräsentierenden Zellen nach ihrem passenden Antigen ab (Miller, Wei et al. 2002). Das retikuläre Netz der Lymphknoten und SLO dient dabei im Rahmen der Immunantwort als Leitstruktur der T-Zellbewegung im Sinne der ungerichteten Haptokinese.

Nach Bindung an ihr passendes Antigen und Aktivierung werden auf den T-Zellen verschiedene Chemokinrezeptoren hochreguliert, welche eine navigierte bzw. gerichtete Migration der Zelle (Chemotaxis) ermöglichen (Krummel, Bartumeus et al. 2016). Hierdurch werden bspw. CD8 T-Zellen zum Ort der CD4-APC Interaktion geleitet, um eine effiziente und vollständige Aktivierung dieser zu ermöglichen (Castellino, Huang et al. 2006). Vergleichbar hierzu erfolgt auch die Migration der aktivierten T-Zelle am Zielort der Immunantwort zielgerichtet und wird vor allem durch Chemokine navigiert (Chemotaxis).

Die Bewegung aktivierter T-Zellen zeigt abhängig von äußeren Einflüssen Züge einer Braunschen Zufallsbewegung oder einer Lévy Bewegung (engl. *Lévy walk*) (Harris, Banigan et al. 2012). Die Lévy Bewegung ist gekennzeichnet durch lange gerichtete Migrationswege mit definierter Geschwindigkeit verbunden mit kurzen ungerichteten Wegen mit häufigen Richtungswechseln. Maßgeblich entscheidend für die Direktionalität der Bewegung sind die äußeren Stimuli wie das Vorhandensein von Chemokingradienten (Chemotaxis), sowie die vorliegende Gewebestruktur der extrazellulären Matrix (Haptotaxis) (Overstreet, Gaylo et al. 2013).

1.3. Chemokine, Signalproteine der Zellmigration

Chemokine spielen eine bedeutende Rolle bei der Koordination der T-Zellmigration zu ihren Zielorten während der Immunantwort. Im Allgemeinen versteht man unter Chemokinen eine Gruppe von Proteinen deren Hauptfunktion die Chemoattraktion von Leukozyten ist. Abhängig von der Position und Anzahl NH₂-terminaler Cystein-Reste unterscheidet man zwischen C (XCL1/2), CC (CCL1-28), CXC (CXCL1-16) und CX₃C (CX₃CL1) Chemokinen. Chemokine werden durch Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche erkannt, welche ebenfalls unterteilt werden können in C (XCR1), CC (CCR1-10), CXC (CXCR1-6) und CX₃C (CX₃CR1) Rezeptoren. Dabei werden verschiedene Chemokine teilweise durch denselben Rezeptor erkannt. Chemokinrezeptoren bestehen aus sieben Transmembranschleifen an welche intrazellulär heterotrimere G-Proteine angelagert sind, weswegen Chemokinrezeptoren auch zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gezählt werden. Die Bindung von Chemokinen an ihre entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten führt zur Aktivierung G-Protein-gekoppelter Signalwege (s. Abschnitt 1.2.1).

Auch funktionell lassen sich die Chemokine unterteilen in homeostatische, inflammatorische und doppel funktionelle Chemokine (Moser, Wolf et al. 2004). Homeostatische Chemokine wie CCL19, CCL21 (Rezeptor: CCR7), CXCL12 (Rezeptor: CXCR4) und CXCL13 (Rezeptor: CXCR5) sind insbesondere für die Migration von Immunzellen zu den SLO, die Fortbewegung der Zellen innerhalb dieser (Förster, Schubel et al. 1999, Gunn, Kyuwa et al. 1999), sowie die strukturelle Organisation der lymphatischen Organe verantwortlich (Ansel, Ngo et al. 2000, Plotkin, Prockop et al. 2003). CXCL13 beispielweise fördert durch die Bindung an CXCR5 die Retention von B Zellen in den PP, wohingegen die Bindung von CXCL12 an CXCR4 den Austritt der B Zellen fördert (Schmidt, Bannard et al. 2013). Die Interaktion zwischen CCL19/21 und CCR7 spielt eine bedeutende Rolle für das Homing von naiven T-Zellen in SLO (s. Abschnitt 1.4), sowie die Migration der T-Zellen innerhalb dieser (Okada and Cyster 2007).

Die inflammatorischen Chemokine sind essenziell für die Migration von Immunzellen zum Ort der Entzündung im Rahmen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Zu dieser Gruppe können unter anderem die Chemokine CCL3-5/7/8/11/13-15/24-28, CXCL2/3/5-11, sowie CX₃CL1 und XCL1/2 gezählt werden (Qin, Rottman et al. 1998). Sie können durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellen wie Gewebszellen, Endothelzellen,

Fibroblasten, antigenpräsentierende Zellen, NK-Zellen oder auch T-Zellen produziert werden. Die vermehrte Produktion dieser Chemokine wird durch inflammatorische Stimuli, wie $\text{TNF}\alpha$, Typ I und II Interferone, sowie Pathogen-assoziierte molekulare Produkte (PAMPs) welche über Zytokin- und Toll-like Rezeptoren der verschiedenen Zellen detektiert werden, bewirkt (Moser, Wolf et al. 2004).

Zu den Chemokinen mit einer doppelten Funktion, sowohl während der Inflammation als auch der Lymphopoese, zählen unter anderem CXCL9-11 sowie CCL1/17/20/22/25 (Romagnani, Annunziato et al. 2001). Manche dieser Chemokine sind auch für die Migration von Effektor Memory T-Zellen zu spezifischen Zielorganen wie dem Darm (CCL25) oder der Haut (CCL17/22) verantwortlich (Campbell, Haraldsen et al. 1999, Papadakis, Prehn et al. 2000, Wsocki, Panoskaltsis-Mortari et al. 2005).

1.4. T-Zellmigration während der akuten GvHD

Wichtiger Bestandteil der ablaufenden Immunreaktionen während der akuten GvHD ist die Migration der T-Zellen zu ihrem Aktivierungsort, den sekundär lymphatischen Organen (SLO), sowie von diesen zu den jeweiligen GvHD Zielorganen (Koboziev, Karlsson et al. 2010). Diese hauptsächlich durch Chemokine koordinierte Zellbewegung führt interessanterweise zu einem fast ausschließlichen Einwandern von Immunzellen in den Darm, die Haut sowie die Leber. Nach der Transplantation gelangen die Spender T-Zellen rasch aus der Blutbahn in die SLO. Hierbei spielt initial die Interaktion zwischen Selektinen (v.a. L-Selektin) auf der T-Zelloberfläche mit Adhäsionsmolekülen, wie MAdCAM-1 und PNAd, des Endothels eine bedeutsame Rolle (Abbildung 4). Diese Interaktion bewirkt ein erstes Anheften der T-Zellen an das Endothel der hochendothelialen Venolen (HEV) in den SLO (Miyasaka and Tanaka 2004). Hierdurch rollen die T-Zellen entlang des Endothels und kommen so in Kontakt mit auf der Oberfläche der HEV exponierten Chemokinen wie CCL19 und CCL21. Diese binden an CCR7, ihren entsprechenden Rezeptor auf der T-Zelloberfläche, was über G-Protein gekoppelte Signalwege zur Aktivierung weiterer Adhäsionsmoleküle, insbesondere von Integrin $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha L\beta 2$, auf der T-Zelloberfläche führt. Die Interaktion der Integrine mit MAdCAM-1 und ICAM-1/2 auf der Endotheloberfläche führt schlussendlich zu einer festen Adhäsion der T-Zellen an das Endothel. Dies ermöglicht die anschließende Transmigration der T-Zellen durch das Endothel und somit die Einwanderung der Zellen in die T-Zellzone der SLO.

Einleitung

Nach der Aktivierung gelangen die T-Zellen über die efferenten lymphatischen Gefäße der SLO zurück in die Blutbahn. Hierfür spielt insbesondere der Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor 1 (S1PR1) vermittelte Lymphknoten-Austritt eine wichtige Rolle (Cyster and Schwab 2012). Die austrittsfördernden Effekte von S1PR1 stehen den retinierenden Effekten von CCR7 und CCL19/21 gegenüber. S1PR1 auf der T-Zelloberfläche detektiert dabei S1P, welches in hohen Konzentrationen in Lymphe und Blut vorkommt, und bewirkt so eine Migration der Zellen zu den die T-Zellzone säumenden lymphatischen Gefäßen. Während die T-Zellen in der Blutbahn sind, wird durch die Bindung von S1P S1PR1 kontinuierlich internalisiert und dadurch desensibilisiert. Nach dem CCR7-vermittelten Eintritt der T-Zellen in den Lymphknoten und der fehlenden Exposition zu S1P, wird S1PR1 erst wieder allmählich an der T-Zelloberfläche rekonstituiert (Tomura, Yoshida et al. 2008). Die Erkennung eines passenden Antigens durch die T-Zelle und der im Rahmen der frühen T-Zellaktivierung vermehrt exprimierte Oberflächenmarker CD69 verzögern dabei die Rekonstitution von S1PR1. Hierdurch wird eine ausreichend lange Persistenz der T-Zellen in den Lymphknoten gewährleistet, welche entscheidend für die Aktivierung und Proliferation dieser ist (Tomura, Yoshida et al. 2008). Durch Hochregulierung von S1PR1 während der Proliferation der aktivierten T-Zellen bei gleichzeitiger Herunterregulierung von CCR7, werden die Retentionssignale überwunden und eine Auswanderung der T-Zelle aus den SLO ermöglicht (Pham, Okada et al. 2008).

Zurück in der Blutbahn wandern die aktivierten T-Zellen abhängig von ihrem durch die Aktivierung geprägtem Profil an Oberflächenmarkern zu den jeweiligen Effektororganen. Beispielsweise führt die durch dendritische Zellen produzierte Retinsäure während der Aktivierung in den Darm-assoziierten SLO wie PP und mLN zu einer verstärkten Induktion von CCR9 und Integrin $\alpha 4\beta 7$ auf der T-Zelloberfläche. Hierdurch wird eine zielgerichtete Einwanderung der T-Zellen in den Darm ermöglicht, wo die dendritischen Zellen initial ihr Antigen detektierten (Iwata, Hirakiyama et al. 2004). Das Anheften und Rollen der T-Zellen entlang des intestinalen Endothels wird durch die Bindung von PSGL-1 und VLA-4 auf Seiten der T-Zelle an E/P-Selektin und MAdCAM-1 auf Seiten des Endothels vermittelt (Abbildung 4, C). Hierdurch können die T-Zellen über ihre Rezeptoren die auf dem Endothel präsentierten Chemokine detektieren. Ein für das intestinale T-Zell-Homing bekanntes Paar ist das Chemokin CCL25 und der zugehörige Rezeptor CCR9 auf der T-Zelloberfläche. Die Bindung des Chemokins an seinen Rezeptor führt über G-protein gekoppelte Signalwege zur Konformationsänderung und Aktivierung weiterer Adhäsionsmoleküle wie Integrin $\alpha 4\beta 7$ und LFA-1 auf den T-Zellen.

Einleitung

Die Interaktion der aktivierten Integrine mit MAdCAM-1 sowie ICAM-1/2 auf der Endotheloberfläche bewirkt das feste Anheften der T-Zellen und ermöglicht somit die Transmigration und Einwanderung dieser in die intestinale *Lamina Propria*.

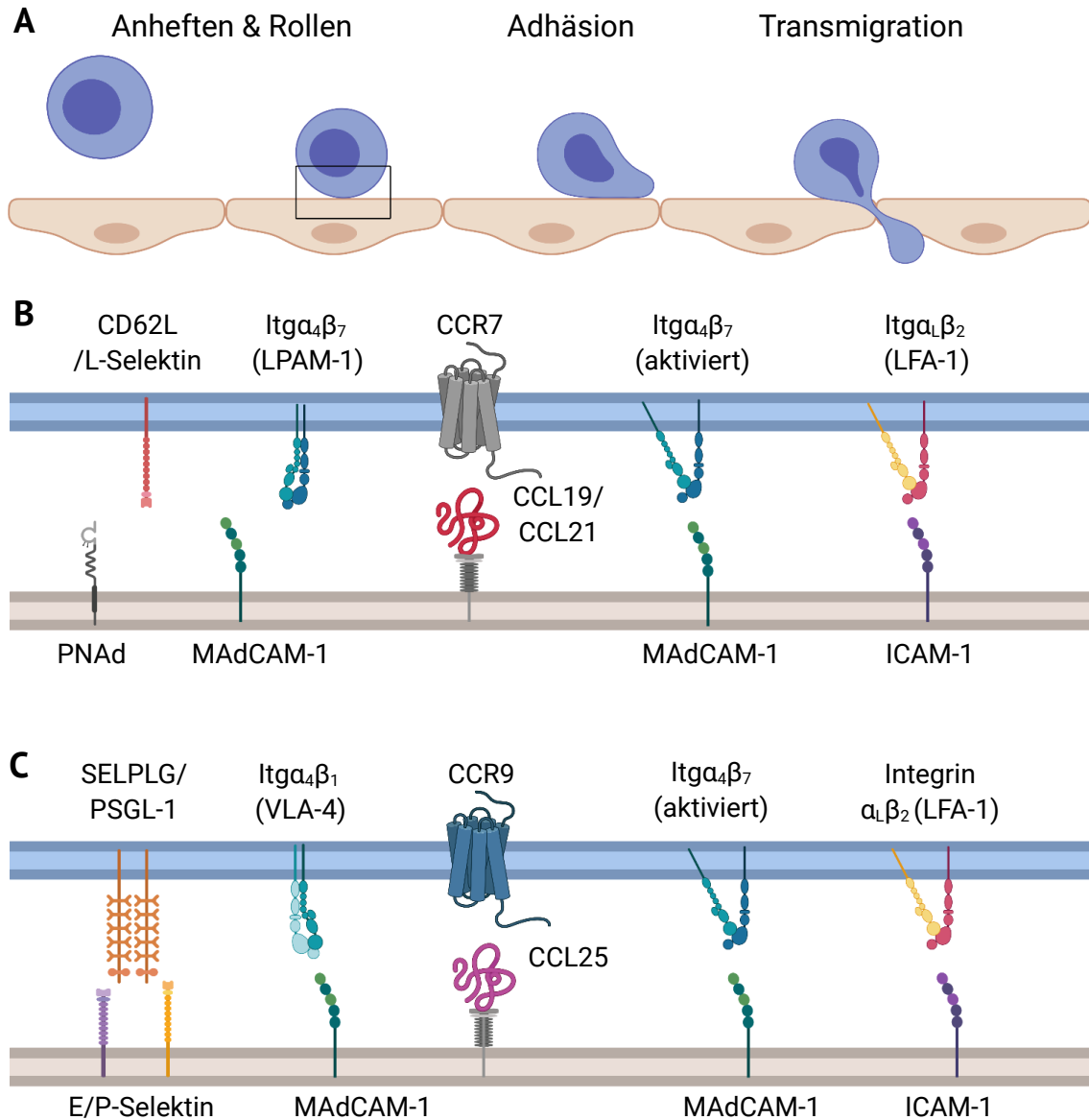


Abbildung 4: Mechanismen der endothelialen Transmigration (A) in sekundär lymphatische Organe (SLO) (B) und in die intestinale *Lamina Propria* (LP) (C). (A) Schritte der endothelialen Transmigration. (B) Die Interaktion zwischen CD62L auf naiven T-Zellen sowie MAdCAM-1/PNAAd auf Seiten des Endothels führt zu einem Anheften und Rollen der Zellen entlang der HEV der SLO. Durch Bindung von CCL19/21 an CCR7 auf der T-Zelloberfläche kommt es zur Konfigurationsänderung und Aktivierung weiterer Adhäsionsmoleküle, wie Integrin $\alpha_4\beta_7$ und LFA-1. Die feste Adhäsion der T-Zellen ermöglicht die Transmigration dieser durch das Endothel. (C) Aktivierte T-Zellen binden über PSGL-1/VLA-4 an Selektine des intestinalen Endothels. Die Interaktion zwischen Chemokinen der intestinalen *Lamina Propria* und ihren passenden Rezeptoren auf der T-Zelloberfläche führt wiederum zur Aktivierung weiterer Adhäsionsmoleküle. Die hierdurch vermittelte feste Adhäsion zwischen Integrinen und ICAM-1/MAdCAM-1 ermöglicht die Transmigration und Einwanderung der T-Zellen in die LP. Modifiziert aus Koboziev, I., F. Karlsson and M. B. Grisham (2010) "Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation", freundlicherweise zur Verfügung gestellt unter der Lizenz-Nummer 4974870854501. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

2. Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es Faktoren zu identifizieren, die für das Homing der T-Zellen aus den sekundär lymphatischen Organen in den Darm während der akuten Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) von Bedeutung sind. Besonders Rezeptor-Ligandeninteraktionen, welche eine direkte Migration von T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* fördern können, sollen hierbei aufgezeigt werden. Weiterhin ist es von großem Interesse diese direkt auswandernden T-Zellen, welche als Initiatoren der intestinalen GvHD fungieren könnten, genauer zu charakterisieren. Diese Arbeit befasst sich somit mit folgenden Fragestellungen:

- ⇒ Welche Chemokine sind generell für das Homing der T-Zellen aus den SLO in die *Lamina Propria* während der akuten GvHD von Bedeutung?
- ⇒ Welche Faktoren können eine direkte Migration der aktivierten T-Zellen aus den PP in die benachbarte *Lamina Propria* fördern?
- ⇒ Wodurch können diese direkt auswandernden T-Zellen charakterisiert werden?
- ⇒ Welche therapeutischen Optionen ergeben sich hieraus zur Behandlung der akuten GvHD?

Ein genaueres Verständnis der Migration der alloreaktiven Spender T-Zellen in den Darm als einen der Hauptwirkorte der GvHD ist von grundlegender Bedeutung, um die sichere Anwendbarkeit der allogenen SZT als effektive Therapie zu verbessern und das medizinische Indikationsspektrum hierfür zu erweitern. Die Identifizierung von direkt aus den PP in die *Lamina Propria* auswandernden T-Zellen, welche nicht nur als Initiatoren der intestinalen GvHD fungieren könnten, sondern auch ein bedeutender Faktor in der Pathogenese anderer entzündlicher Darmerkrankungen spielen könnten, bietet neue therapeutische Möglichkeiten diese häufigen und komplexen Erkrankungen in ihrer Entstehung zu verhindern. Somit soll diese Arbeit helfen, die ablaufenden Mechanismen der GvHD besser zu verstehen, um die Nebenwirkungen der allogenen SZT zu minimieren und somit diese vielversprechende Therapie einem größeren Anteil an Patienten zugänglich zu machen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialienliste

In den nachfolgenden Tabellen sind alle für die Arbeit verwendeten Materialien und Mauslinien aufgelistet. Angegeben ist jeweils die Produktbezeichnung inklusive, sofern verfügbar, die Bestellnummer. Die Firmenangaben sind um den Ort Ihres Hauptsitzes bzw. des jeweiligen Verteilers vor Ort ergänzt.

Tabelle 1: Antikörper für die Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie

Antikörper	Klon/Kat.#	Farbe	Titer	Firma	Zweck
CD3	17A2	BV711	1:200	Biolegend ¹	DFZ
CD4	GK1.5	APC-Cy7	1:400	Biolegend ¹	DFZ
CD4	RM4-5	PerCP/Cy5.5	1:1600	Biolegend ¹	DFZ
CD8	53-6.7	PE-Cy7	1:3200	Biolegend ¹	DFZ
CD8	53-6.7	FITC	1:800	Biolegend ¹	DFZ
CD90.1	OX-7	A647	1:1600	Biolegend ¹	DFZ
CD90.1	OX-7	A488	1:800	Thermofisher ²	DFZ
CD27	LG.7F9	PE	1:800	Thermofisher ²	DFZ
4-1BB	17B5	PE-Cy7	1:200	Invitrogen ²	DFZ
CD69	H1.2F3	Pacific Blue	1:800	Biolegend ¹	DFZ
CD44	IM7	PerCP-Cy5.5	1:200	Biolegend ¹	DFZ
CD103	2E7	Pacific Blue	1:100	Biolegend ¹	DFZ
Itg α 4 β 7	DATK32	PE	1:800	Biolegend ¹	DFZ
Itg α L	M17/4	PerCP-Cy5.5	1:200	Biolegend ¹	DFZ
T-bet	eBio4B10	PE	1:100	Thermofisher ²	DFZ
Roryt	AFKJS-9	APC	1:100	Thermofisher ²	DFZ
CCR5	C34-3448	PE	1:200	Biolegend ¹	DFZ
CCR9	CW-1.2	PE-Cy7	1:100	Thermofisher ²	DFZ
CCR9	CW-1.2	A647	1:400	Biolegend ¹	DFZ
CCR9	LS-A961	Pur	1:200	LSBio ³	IFM
CCL21	AF457	Pur	1:100	R&D Systems ⁴	IFM
CCL25	CYT-74478	Pur	1:100	Dianova ⁵	IFM
CXCL9	AF-492-NA	Pur	1:100	R&D Systems ⁴	IFM
CCL4	AF-451-NA	Pur	1:100	R&D Systems ⁴	IFM

Material und Methoden

XCR1	ZET	APC	1:50	Biolegend ¹	IFM
XCR1	ZET	Biotin	1:100	Biolegend ¹	IFM
CD90.1	HIS51	Biotin	1:100	eBioscience ²	IFM
CD4	RM4-5	APC	1:50	Biolegend ¹	IFM
CD8b	YTS156.7.7	A647	1:50	Biolegend ¹	IFM
CD2	RM2-5	Pur	1:100	Santa Cruz ⁶	IFM
CD27	#012	Pur	1:66	Sino Biological ⁷	IFM
Coro1a	PA1-10022	Pur	1:500	Thermofisher ²	IFM
Dock2	bs-12431R	Pur	1:100	Biozol ⁸	IFM
ParvG	13284-1-AP	Pur	1:50	Proteintech ⁹	IFM

Tabelle 2: Zweitantikörper und Seren für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Konjugat	Titer	Bestell-Nr.	Firma
Streptavidin	A488	1:400	S32354	Thermo Fisher Scientific ²
Streptavidin	A546	1:400	S11225	Thermo Fisher Scientific ²
Donkey anti Rat IgG	Cy3	1:400	712-165-150	Dianova ⁵
Donkey anti Goat IgG	Cy3	1:400	705-165-003	Dianova ⁵
Goat anti Rabbit IgG	Cy3	1:400	111-165-003	Dianova ⁵
Goat anti Armenian Hamster	Cy3	1:400	127-165-169	Dianova ⁵
Donkey Serum	-	-	017-000-121	Jackson Laboratory ¹⁰
Goat Serum	-	-	005-000-121	Jackson Laboratory ¹⁰

Tabelle 3: Rekombinante Proteine

Rekombinantes Protein	Produktionsstamm	Konzentration	Firma
Humanes IL-2	Insektenzellen	50 IE/ml	Biolegend ¹
Maus CXCL11	E. coli	400 ng/ml	Biolegend ¹
Maus CCL4	E. coli	1000 ng/ml	Biolegend ¹
Maus CCL25	E. coli	100 ng/ml	Biolegend ¹

¹ Amsterdam, Niederlande; ² Waltham, USA; ³ Seattle, USA; ⁴ Minneapolis, USA; ⁵ Hamburg, Deutschland; ⁶ Dallas, USA; ⁷ Peking, China; ⁸ Eching b. München, Deutschland; ⁹ St. Leon-Rot, Deutschland; ¹⁰ Bar Harbor, USA

Tabelle 4: Materialien, Geräte und Mäuse

Material	Katalog #	Firma
Transplantation & allgemeine Materialien		
DPBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	P04-36500	Pan Biotech, Aidenbach
Neubauer Zählkammer	ZK03	Hartenstein, Würzburg
Dynabeads Untouched Mouse T cells Kit	11413D	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Dynabeads FlowComp Mouse CD4 & CD8 Kit	11461D/ 11462D	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Transcription Factor staining kit	00-5523-00	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Zellsieb, 70µm EASYstrainer™	542070	Greiner Bio-one, Frickenhausen
15 & 50ml Falcons	188261/227261	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Tissue-Tek® Cryomold® Kryoeinbettformen		Sakura Finetek, Staufen im Breisgau
Tissue-Tek® O.C.T™ Einbettungsmedium	4583	Sakura Finetek, Staufen im Breisgau
5 ml Spritze BD Discardit™ II	309050	Becton Dickinson, Heidelberg
D-Luciferin		Biosynth AG, Staad, Schweiz
RPMI Medium 1640	21875-034	Gibco®, Carlsbad, USA
Penicillin, Streptomycin (PenStrep)	15140-122	Gibco®, Carlsbad, USA
L-Glutamin	25030081	Gibco®, Carlsbad, USA
Fetales Kälber Serum (FCS)	10270-106	Gibco®, Carlsbad, USA
PEN-Membran Slides (2,0 µm), RNase frei	11505189	Leica, Wetzlar
RNase freie PCR Tubes 0,2 ml		Axygen, Union City, USA
5 ml, 10 ml & 25 ml Pipettenspitzen		Greiner Bio-one, Frickenhausen
10 µl, 100 µl & 1000 µl Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht
1 ml Insulinspritzen (30Gx1/2" (0,3mm × 12mm), Omnican® 100	9151141	Braun, Melsungen
96-Well Platten mit Rundboden	83.3922.500	Sarstedt, Nümbrecht

Material und Methoden

Chemikalien		
Trypanblau	A0668,0010	AppliChem, Darmstadt
Toluidinblau	0300.1	Carl Roth, Karlsruhe
Kresylviolettacetat	7651.2	Carl Roth, Karlsruhe
Massenspektrometrie		
NuPAGE™ LDS Sample Puffer	NP0007	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Endopeptidase		Wako Chemicals, Neuss
C-18 Empore™ SPE Disks		Sigma-Aldrich, Darmstadt
PepMap™ 100 C18-LC-Säulen		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNA Isolierung & Sequenzierung		
RNeasy Micro Kit	74004	Qiagen, Hilden
SUPERase In™ RNase Inhibitor (20 U/ml)	AM2694	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNaseZAP™	R2020-250ml	Sigma-Aldrich, Darmstadt
RNA 6000 Nano/Pico Kit		Agilent, Waldbronn
SMARTer® Stranded total RNAseq Kit – Pico Input mammalian	634411	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Immunfluoreszenzfärbung		
SuperFrost Plus Objektträger	03-0060	R. Langenbrinck, Emmendingen
Super PAP Pen Liquid Blocker	N71310	Science Services, München
Vectashield Eindeckmedium mit DAPI	H-1200	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Entellan®	1079610500	Merck, Darmstadt
Migrationsversuche		
T-Zell Aktivierungs Beads CD3/CD28	11452D	Gibco®, Carlsbad, USA
CD3 Antikörper pur, Klon 145-2C11	553058	Becton Dickinson, Heidelberg
ThinCert™ Transwell-Einsätze, 3 bzw. 8 µm Porengröße	662631/662638	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Transwell®-Insert, 5 µm Porengröße	3421	Corning, Wiesbaden

Material und Methoden

μ -Slide Chemotaxis Collagen IV	80322	Ibidi, Martinsried
Durchflusszytometrie		
LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, 405 nm Exzitation	L34955	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LIVE/DEAD™ Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit, 405 nm Exzitation	L34959	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Typ VIII Kollagenase	C2139	Sigma-Aldrich, Darmstadt
DNase I	D5025	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Geräte		
Röntgen Bestrahlungsgerät	CP-160	Faxitron, Siemens, Erlangen
Zentrifuge Megafuge 40R		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IVIS Spectrum Imaging System		Caliper Life Science, Hopkinton, USA
LSM 780 Konfokalmikroskop		Carl Zeiss, Jena
Axio Imager Z1m Fluoreszenzmikroskop		Carl Zeiss, Jena
Vert.A1 Zellkulturmikroskop		Carl Zeiss, Jena
Heiz und Inkubationseinsatz P-Set 2000		Pecon, Erbach
Leica CM 1950 Kryomikrotom		Leica, Wetzlar
Leica AS LMD		Leica, Wetzlar
Leica LMD 6000B		Leica, Wetzlar
Vacuum Concentrator		Eppendorf, Hamburg
GentleMACS Octo Dissociators		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Orbitrap Fusion Massenspektrometer ausgestattet mit EASY-Spray Ionenquelle und EASY-nLC 1000 Flüssig-Chromatograph		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
2100 Bioanalyser System		Agilent, Waldbronn
FACS Canto II ausgestattet mit 405 nm, 488 nm und 633 nm Lasern und einem Hoch-Durchsatz Probenaufnehmer		Becton Dickinson, Heidelberg

Material und Methoden

Filterset für FACS 488 Laser: 735 LP+780/60, 655LP+760LP, 610LP, 556LP+585/42, 520LP+530/30, 488/10; 405 Laser: 502 LP+510/50, 450/50; 633 Laser: 735LP+780/60, 685LP, 660/20		
Attune Nxt Durchflusszytometer ausgestattet mit 405 nm, 488 nm, 561 nm, 633 nm Laser und einem Autosampler		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Filter Set für 405 nm Laser: Pacific blue: 440/50; 488 Laser: FITC 530/30, PerCP-Cy5.5 695/40; 561 Laser: PE 574/26, PE-Cy7 870/60; 633 Laser: APC 670/14, APC-Cy7 870/60.		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Illumina NextSeq500		Illumina, San Diego, USA
2-Photonenmikroskop DM6000 CFS, Objective HC Fluotar L 25x/1.0 Imm mot Corr, 2 PMTs: Hamamatsu R9624, 2 HyD-RLD 2 detectors, Chameleon Vision II TiSa laser, Beam splitters: RSP 620 + BP440/20 + 675/50, RSP 455, RSP 560 + 525/50 + 585/40, RSP 495+ BP 440/20		Leica, Wetzlar
Programme		
FlowJo Version X		TreeStar, Ashland, USA
GraphPad PRISM 6		GraphPad Software, La Jolla, USA
IMARIS Version 9.1		Bitplane, Zürich, Schweiz
Matlab Version R2016a		Mathworks, Natick, USA
ZEN pro Version 11.0		Carl Zeiss, Jena
Ingenuity® Pathway Analysis (IPA)		Qiagen, Hilden
Living Image Software Version 4.0		Caliper Life Science, Hopkinton, USA
bcl2fastq v2.18.0.12		Illumina, San Diego, USA
LMD V5.0 und V6.3		Leica, Wetzlar
R Version 3.5.2 / R Studio 1.1.463		The R Foundation / R Studio, Boston, USA

Mäuse		
BALB/cAnCrl	Stammkennung 028	Charles River, Sulzfeld
C57BL/6NCrl	Stammkennung 027	Charles River, Sulzfeld
B6;129S-Gt(ROSA)26Sor ^{tm1.1} (CAG-COX8A/Dendra2)Dcc/J	018397	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

3.2. Puffer, Medium und Narkosemittel

10x PBS	80 g NaCl; 14,2 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O; 2 g KCl; 2 g KH ₂ PO ₄ in 1000 ml Aqua destillata, pH = 6,8
Erythrozytenlysepuffer	89,9 g NH ₄ Cl, 10 g KHCO ₃ , 0,37 g EDTA in 1000 ml Aqua destillata
Zellaufreinigungspuffer	0,5 g BSA, 0,375 g EDTA in 500 ml DPBS
Stimulationsmedium	RPMI Medium 1640 ergänzt um Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), L-Glutamin (2mM), 10 % FCS und 0,1 % 2-Mercaptoethanol
Migrationsmedium	RPMI Medium 1640 ergänzt um Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), L-Glutamin (2mM) und 0,1% BSA
Anästhetikum	2 ml Ursotamin [®] (Ketamin; 100 mg/ml), 2 ml Xylavet [®] (Xylazin; 20 mg/ml), 21 ml PBS (Gesamtvolumen 25 ml)
Trypanblau-Lösung	1 g Trypanblau in 100 ml PBS, 1:10 in PBS verdünnt
Toluidinblau-Lösung	0,1 g Toluidinblau in 10 ml DEPC Wasser, steril filtriert, 1:10 in DEPC Wasser verdünnt
Kresylviolett-Lösung	1% Kresylviolettacetat in 50% Ethanol in DEPC Wasser, steril filtriert

3.3. Methoden

3.3.1. MHC-inkompatibles Mausmodell

Um eine akute GvHD zu untersuchen, wurden Inzuchtmausstämme mit ungleichen Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) als Spender- und Empfängertiere eingesetzt. Als Empfängertiere wurden Weibchen des Mausstammes BALB/c (H-2^d, CD90.2) verwendet. Als Knochenmark Spendertiere dienten Weibchen des Stammes C57BL/6 (H-2^b, CD90.2). Die C57BL/6.L2G85.CD90.1 (H-2^b, CD90.1) T-Zell Spendertiere stammten aus eigener Zucht. Alle Mäuse waren geschlechtsgleich und zu Beginn der Versuche acht bis zwölf Wochen alt. Die Tierhaltung erfolgte im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin der Universität Würzburg unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen. Die Mäuse waren einem 14- zu 10-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt, und wurden kontinuierlich mit Nahrung und Wasser versorgt. Alle Tiere wurden während der Versuche täglich gewogen und anhand eines GvHD Bewertungsschemas (Cooke, Kobzik et al., 1996) begutachtet. Die durchgeführten Tierexperimente wurden von der zuständigen Behörde der Regierung Unterfrankens unter der Tierversuchsantrags-Nummer 55.2-2531.01-82/14 genehmigt.

3.3.2. Zellisolierung aus Mausorganen

Die Spendertiere wurden mit Ketamin (80 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (16 mg/kg) gewichtsadaptiert anästhesiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Mausorgane wurden entnommen und wie im Folgenden beschrieben bis hin zu einer Einzelzelllösung prozessiert.

3.3.2.1. Isolierung von Splenozyten

Zur Isolierung der Spender T-Zellen wurden die Milzen der T-Zell Spendertiere entnommen, und umgehend auf ein im Voraus mit 2 ml Erythrozytenlysepuffer befeuchtetes 70 µm Zellsieb gegeben. Die Milzkapsel wurde rechtwinklig zur Organlänge eingeschnitten und mithilfe eines sterilen 5 ml Spritzenstempels durch das Zellsieb gerieben. Das Sieb und der Spritzenstempel wurden mit 8 ml Erythrozytenlysepuffer sorgfältig gespült, und die Suspension zur vollständigen Lyse der Erythrozyten für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation wurde mit 10 ml DPBS abgestoppt und die Zelllösung für 5 min bei 311 g und 4 °C zentrifugiert. Der Großteil des Überstandes wurde verworfen und das Zellpellet in den verbleibenden 3 ml resuspendiert. Die

Zellsuspension wurde ein zweites Mal durch ein 70 µm Zellsieb gegeben und mit 7 ml PBS nachgespült. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer, wurde die Zelllösung zentrifugiert und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

3.3.2.2. Isolierung von Knochenmarkzellen

Von den euthanasierten Knochenmark Spendertieren wurden die Hinterbeine entnommen und Femur und Tibia frei präpariert. Die Markhöhle der Knochen wurde durch einen Schnitt entlang der Epiphysenlinie eröffnet und das Knochenmark mit Hilfe einer PBS gefüllten 5 ml Spritze und einer 26 Gauge Kanüle herausgespült. Die Isolierung der Knochenmarkzellen erfolgte in einer mit 5 ml PBS gefüllten 6-Well Platte. Das ausgespülte Knochenmark wurde gründlich mit einer 1000 µl Pipette resuspendiert und durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert, um Einzelzellsuspension ohne Zelldebris zu erhalten. Im Anschluss wurde die 6-Well Platte und das Zellsieb mit weiteren 5 ml PBS gespült. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zelllösung bei 311 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

3.3.3. T-Zell Anreicherung und T-Zell Depletion

Für die T-Zell-Anreicherung aus Splenozytensuspensionen wurde das Dynabeads Untouched Mouse T Cells Kit verwendet. Die Antikörper (CD11b, CD16, CD32, CD45R, Ter-119) dieses Kits richten sich gegen die in der Zellsuspension enthaltenen B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, natürliche Killerzellen, Dendritische Zellen, Granulozyten und Erythrozyten. Nach der Kopplung der Antikörper-gebundenen Zellen mit den Beads und der Depletion dieser durch den Magneten bleiben somit nur noch die angereicherten unversehrten T-Zellen zurück. Um sicherzustellen, dass es sich bei den in den nachfolgenden Transkriptom- und Proteinexpressionsanalysen detektierten T-Zellen rein um die transferierten Spender T-Zellen aus der Milz handelte, wurde eine Depletion der T-Zellen des Knochenmarks durchgeführt. Hierfür wurden die Dynabeads FlowComp Mouse CD4 und CD8 Kits kombiniert. Die Aufreinigung erfolgte bei den jeweiligen Kits entsprechend den Herstellerangaben.

3.3.4. Allogene Stammzelltransplantation

3-4 Stunden vor der allogenen SZT wurden die 8-12 Wochen alten BALB/c Weibchen mit 8 Gy myeloablativ bestrahlt. Zur Rekonstitution des blutbildenden Systems wurden den bestrahlten Tieren je 5×10^6 aufgereinigte C57BL/6 Wildtyp Knochenmarkszellen intravenös injiziert. Für die Induktion einer akuten GvHD wurden den Tieren zusätzlich jeweils $1,2 \times 10^6$ aufgereinigte Luciferase-exprimierende T-Zellen von C57BL/6.L2G85.CD90.1 Spendermäusen intravenös injiziert (Abbildung 5). Die Injektion der Zellen erfolgte unter Anästhesie jeweils retroorbital und entsprechend der Zugehörigkeit der Tiere zu den jeweiligen Versuchsgruppen (Abbildung 5, B). Zur Infektionsprophylaxe erhielten alle Mäuse während der ersten Versuchswoche orale Antibiose über das Trinkwasser (Baytril 0,05 %, Enrofloxacin).

Zur Überprüfung der Transplantation und der ablaufenden GvHD erfolgte an den Tagen 2, 4 und 6 nach allogener SZT eine Biolumineszenzbildgebung (s. Abschnitt 3.3.6). Die Versuchsgruppen bestanden für jeden der Organentnahme Zeitpunkte aus jeweils 3 Mäusen. Um genügend Probenmaterial für die weiterführenden Analysen zu generieren, wurden insgesamt zwei Transplantationsreihen durchgeführt, welche im Weiteren als LMD1 und LMD2 bezeichnet werden. Zur Unterscheidung der Spender- und Empfängerzellen dienten in den weiterführenden Analysen die unterschiedlichen kongenen Marker CD90.1 auf Spender T-Zellen und CD90.2 auf Empfänger T-Zellen.

Material und Methoden

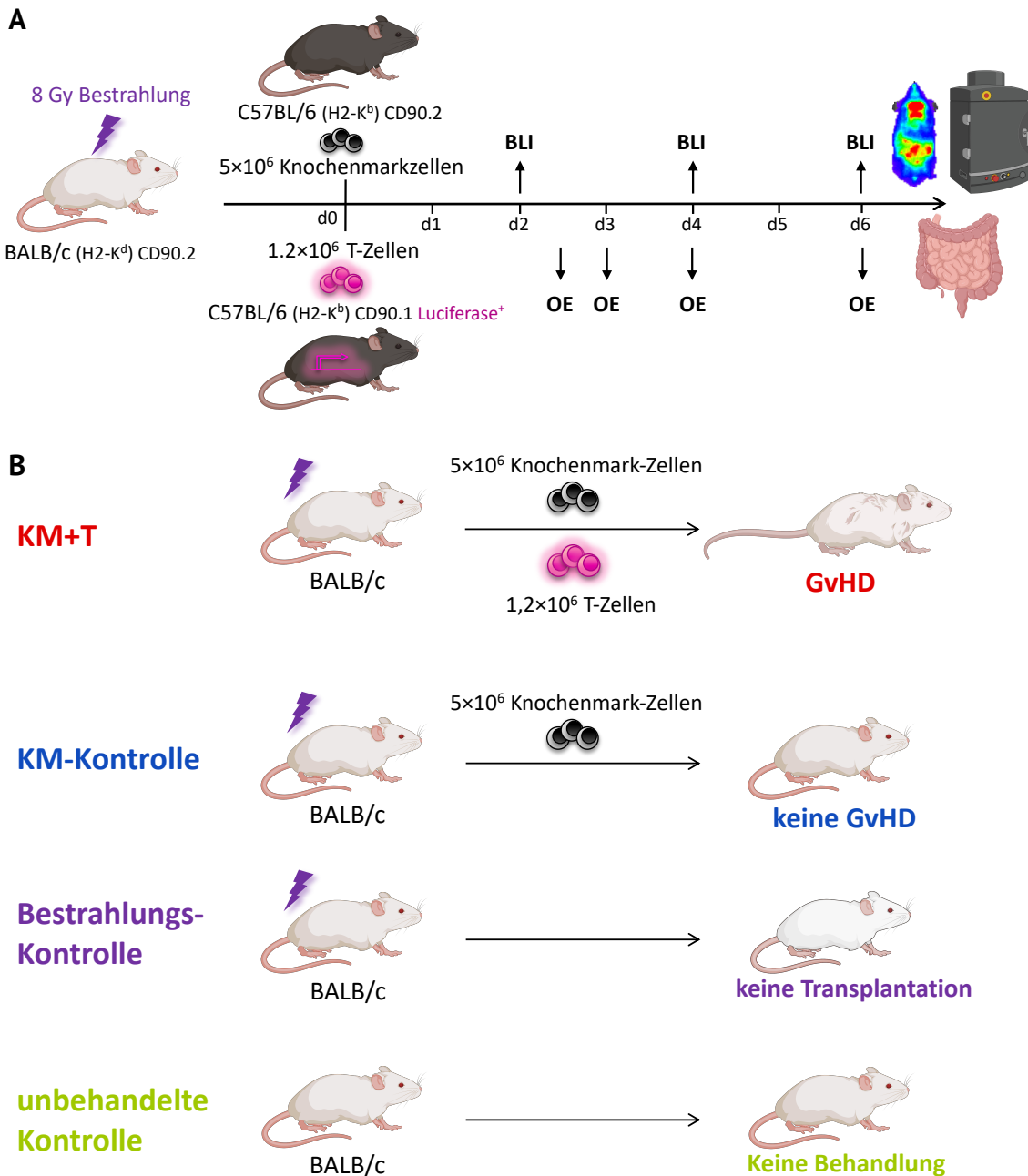


Abbildung 5: Transplantationsschema und experimentelle Gruppen. (A) Myeloablativ behandelte Mäuse wurden entsprechend ihrer Versuchsgruppenzugehörigkeit mit T-Zellen und/oder Knochenmarkszellen transplantiert. An den Tagen 2,4 und 6 nach allogene SZT wurden die Versuchstiere mittels Biolumineszenzbildgebung begutachtet und für weiterführende Analysen deren Organe zu den Zeitpunkten Tag 2,5, 3, 4 und 6 entnommen (OE). (B) Die experimentellen Vergleichsgruppen gliederten sich in Knochenmark und T-Zellen transplantierte Mäuse (KM+T), welche eine ausgeprägte GvHD entwickelten, Mäuse die nur Knochenmark erhielten (KM-Kontrolle) und somit keine GvHD entwickelten, sowie eine Bestrahlungs- und eine unbehandelte Kontrollgruppe. Für jede Transplantationsreihe wurden pro Versuchsgruppe und pro OE-Zeitpunkt je 3 Mäuse mitgeführt (insgesamt $n=6$ pro OE-Zeitpunkt). Abbildung erstellt mit BioRender.com.

3.3.5. Bewertung des Grades der GvHD

Zur Erhebung des klinischen GvHD Grades wurden die Mäuse jeden Tag gewogen und bezüglich definierter Kriterien begutachtet (Cooke, Kobzik et al. 1996). Hierzu zählten neben dem Gewichtsverlust unter anderem die Fellbeschaffenheit, das Verhalten, die Haltung sowie die Hautintegrität der Mäuse. Für jedes Kriterium wurden je nach Ausprägung ein Punktwert zwischen null bis zwei vergeben, sodass sich ein Gesamtwert zwischen null und zehn ergibt. Zur abschließenden Beurteilung des pathologischen GvHD Grades der Versuchstiere wurden an Tag 6 nach allogener SZT Haut-, Leber-, Lungen- sowie Dünn- und Dickdarmproben der nur mit Knochenmark transplantierten Mäuse (KM-Kontrolle) und der GvHD Mäuse (KM+T) durch einen fachkundigen und unabhängigen Pathologen histopathologisch untersucht. Die entnommenen Organproben wurden hierfür in Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung mikroskopisch begutachtet.

3.3.6. Biolumineszenzbildgebung

Die Biolumineszenzbildgebung aller Versuchstiere erfolgte an den Tagen 2, 4 und 6 nach allogener SZT. Bei den verwendeten T-Zell Spendertieren B6.L2G85.CD90.1 handelt es sich um eine transgene Mauslinie, welche Luciferase, ein Gen aus dem Nordamerikanischen Glühwürmchen (*Photinus pyralis*), in allen Zellen exprimiert (Nishimura, Baker et al. 2008). Das in den Spender T-Zellen exprimierte Luciferase Enzym setzt bei der Oxidation von D-Luciferin Licht mit einem Emissionsmaximum von 578 nm bei 25°C, und einer Rotverschiebung hinzu 612 nm bei 37°C, frei, welches mit Hilfe einer CCD-Kamera detektiert werden kann (Zhao, Doyle et al. 2005). Diese Methodik ermöglicht es die Lokalisation der Luciferase-exprimierenden Spender T-Zellen nach allogener SZT *in vivo* zu visualisieren, ohne dabei dem Empfängertier zu schaden. Alle Versuchstiere wurden für die *in vivo* Aufnahmen in 5er Gruppen gewichtsadaptiert mit Ketamin/Xylazin anästhesiert und D-Luciferin durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Die Bildaufnahme erfolgte 10 Minuten nach Verabreichung, um eine gute systemische Verteilung und ausreichende Signalstärke zu gewährleisten. Für die Analyse und Auswertung der Bilddaten wurde die Software Living Image Version 4.0 verwendet.

3.3.7. Herstellung histologischer Präparate

An den Tagen 2,5, 3, 4 und 6 nach allogener SZT wurden pro Versuchsgruppe jeweils drei Mäusen euthanasiert, um Organe für weiterführende Untersuchungen zu entnehmen. Es wurden je vier Dünndarmabschnitte inklusive PP, ein Dickdarmabschnitt und die mesenterischen Lymphknoten einer Maus in einem Einbettschälchen mittels Einbettungsmedium eingebettet und auf Trockeneis schockgefroren. Alle weiteren geeigneten Dünndarmabschnitte einer Maus wurden zu einem zweiten Gewebblock eingebettet. Die Gewebelöcke wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Histologische Schnitte der Gewebelöcke wurden mit Hilfe eines Kryomikrotoms zu Schnittdicken von 5 µm für Immunfluoreszenzfärbungen und 15 µm für die Laser-Mikrodissektion angefertigt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden SuperFrost Plus Objektträger verwendet. Für die Laser-Mikrodissektion wurden spezielle RNase-freie, mit einer PEN-Membran (2 µm Dicke) bezogene Objektträger verwendet. Zur Herstellung RNase-freier histologischer Schnitte wurde das Kryomikrotom zuvor gründlich mit RNase Zap gereinigt. Für die Transkriptomanalyse wurden die RNase-freien Schnitte direkt nach ihrer Anfertigung mit dem Kryomikrotom bei RT für 1 min in 70 % Ethanol fixiert, auf Trockeneis tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Transkriptomanalyse wurden pro Maus beziehungsweise Gewebblock je 6 histologische Schnitte angefertigt. Für die massenspektrometrische Analyse wurden pro Maus je 5 Schnitte angefertigt.

3.3.8. Histologische Schnell-Färbeprotokolle

Für die bessere Differenzierbarkeit einzelner Geweberegionen während der Laser-Mikrodissektion (LMD) wurden die nachfolgend aufgeführten RNA- und Protein-schonenden Schnell-Färbeprotokolle verwendet.

3.3.8.1. Toluidinblau-Färbung

Für die Proteinexpressionsanalyse wurden die bei -20 °C gelagerten Schnitte für 5 min bei RT aufgetaut und für 2,5 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert. Die Schnitte wurden für 30 s mit Toluidinblau-Lösung gefärbt. Anschließend wurden diese drei Mal 1 min in DEPC Wasser und einmal 1 min in 30 % Ethanol gewaschen. Die Schnitte wurden abschließend für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und zügig mittels LMD weiterverarbeitet.

3.3.8.2. Kresylviolett-Färbung

Für die Transkriptomanalyse wurden die bei -80 °C gelagerten RNase-freien Schnitte ohne aufzutauen direkt für 30 s in 70 % Ethanol dehydriert. Um eine bessere RNA-Qualität zu erreichen, wurde ein RNase-Inhibitor (Endkonzentration 1 U/ μ l) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Schnitte wurden für 30 s mit Kresylviolett-Lösung gefärbt und abschließend je einmal in 70 % und in 100 % Ethanol getaucht, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Schnitte wurden für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und zügig mittels LMD weiterverarbeitet.

3.3.9. Laser-Mikrodissektion

Für die Laser-Mikrodissektion (LMD) wurden die zu analysierenden Gewebeschnitte auf spezielle mit einer thermoplastischen Membran bezogene Objektträger aufgezogen. Unter mikroskopischer Darstellung konnten so die gewünschte Gewebebereiche exakt und hochspezifisch selektiert werden und durch einen Ultraviolett-Laser aus dem Gewebe ausgeschnitten werden. Dabei wird die Energie des Lasers von der Membran absorbiert, wodurch diese entlang der Schnittlinie verdampft, und das ausgeschnittene Gewebe der Schwerkraft folgend in ein 0,2 ml RNase-freies PCR Röhrchen fällt (Abbildung 6). Für die LMD wurden freundlicherweise die Geräte der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Albrecht Müller und Prof. Dr. Robert Blum der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

Zur Analyse der Expressions- und Transkriptionsprofile intestinaler *Lamina Propria* unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen wurden Darmschleimhautbereiche (*Lamina Propria* und Epithel) direkt neben den PP (NtPP; <500 μ m entfernt) und weit entfernt der PP (FtPP; >1500 μ m) aus den histologischen Schnitten der unterschiedlich behandelten Mäuse (s. Abschnitt 3.4) mittels Laser-Mikrodissektion ausgeschnitten. Für die RNA Sequenzierung wurden je zwei Mäuse der Transplantationsreihen LMD1 und LMD2 an Tag 4 nach allogener SZT aus den Gruppen KM+T, KM Kontrolle und Ut Kontrolle (n=4 pro Gruppe) verwendet. Pro Maus wurden aus 6 histologischen Schnitten alle Darmschleimhautbereiche neben (NtPP, insgesamt ca. 25-35 Bereiche/Maus; \varnothing 5 mm²/Bereich) und einige Bereiche weit entfernt (FtPP, insgesamt ca. 10-20 Bereiche/Maus; \varnothing 10 mm²/Bereich) der PP mittels LMD ausgeschnitten. Die lasermikrodissezierten Darmschleimhautbereiche einer Maus für nah und weit entfernt der PP wurden zu je einer Probe zusammengefasst.

Material und Methoden

Für die Massenspektrometrie wurden je drei Mäuse der Transplantationsreihe LMD1 an Tag 4 nach allogener SZT aus den Gruppen KM+T und KM-Kontrolle (n=3 pro Gruppe) verwendet. Für die KM-Kontrollgruppen wurden pro Maus 5 histologische Schnitte angefertigt und nur die Darmschleimhaut weit entfernt der PP (FtPP) mittels LMD ausgeschnitten. Die lasermikrodissezierten Darmschleimhautbereiche einer Maus für weit entfernt der PP wurden zu je einer Probe zusammengefasst.

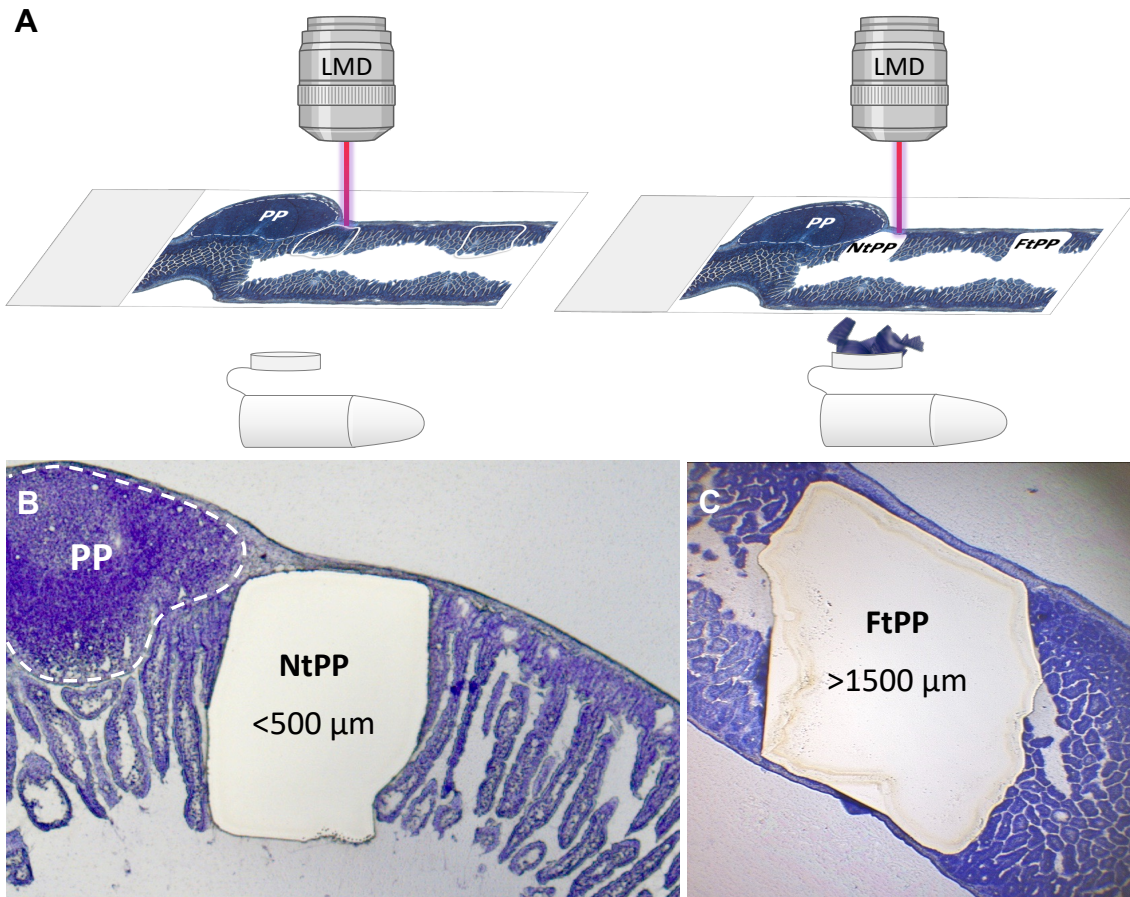


Abbildung 6: Laser Mikrodissektion (A) Schematische Darstellung histologischer Dünndarmschnitte vor und nach der Laser-Mikrodissektion. (B) Histologisches Dünndarmpräparat mit ausgeschnittenem Darmschleimhautbereich direkt neben eines PP (NtPP; $<500\ \mu\text{m}$ Abstand zum PP). (C) histologisches Dünndarmpräparat mit ausgeschnittenem Darmschleimhautbereich weit entfernt eines PP (FtPP; $>1500\ \mu\text{m}$ Abstand zum PP). Kresylviolett gefärbt. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

3.3.10. Proteinexpressionsanalyse

Für die massenspektrometrischen Analysen wurden pro Vergleichsgruppe die lasermikrodissezierten Darmschleimhautproben weit entfernt der PP (FtPP) von je drei Mäusen der Transplantationsreihe LMD1 an Tag 4 nach allogener SZT verwendet. Die Massenspektrometrie wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schlosser der Universität Würzburg durchgeführt.

3.3.10.1. Protein-Isolierung und -Verdau in Lösung

Die lasermikrodissezierten Darmschleimhautproben wurden mit NuPAGE LDS Sample Buffer und Dithiothreitol (50 mM) für 10 min bei 70 °C versetzt. Dithiothreitol spaltet dabei Disulfidbindungen durch Reduktion zu Thiol-Resten, wodurch die Entfaltung der Proteine bewirkt wird. Die reaktiven Thiol-Reste wurden durch Alkylierung mit Iodacetamid (120 mM) für 20 min bei RT und Dunkelheit irreversibel inaktiviert. Die Proteinpräzipitation wurde mit dem vierfachen Volumen an Aceton für 2 h bei -20 °C durchgeführt. Die Pellets wurden anschließend bei -20 °C dreimalig mit Aceton gewaschen. Die präzipitierten Proteine wurden mit 100 µl Harnstoff (8 M) in Ammoniumhydrogenkarbonat (100 mM) gelöst und durch 1 µg Lysyl Endopeptidase für 2 h bei 30 °C verdaut. Die Proben wurden mit weiteren 300 µl Ammoniumhydrogenkarbonat (100 mM) verdünnt und wiederum mit 1 µg Trypsin bei 37 °C über Nacht verdaut. Die Peptide wurden mit Hilfe von selbst hergestellten Filterspitzen entsalzt (Rappsilber, Ishihama et al. 2003). Abschließend wurden die Peptide mit 60 % Acetonitril in 0,1 % Methansäure eluiert, in einem Eppendorf Vakuum Konzentrierer getrocknet und bei -20 °C gelagert. Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die Peptide in 2 % Acetonitril in 0,1 % Methansäure gelöst. Der Proteinverdau in Lösung sowie die nachfolgend beschriebene Massenspektrometrie wurden durch die Arbeitsgruppe Schlosser der Universität Würzburg durchgeführt.

3.3.10.2. Nanoskalierte Flüssig-Chromatographie Tandem-Massenspektrometrie

Bei der nanoskalierten Flüssig-Chromatographie Tandem-Massenspektrometrie (NanoLC-MS/MS) werden durch Chromatographie die Moleküle eines Gemisches aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Die Peptide wurden auf eine Einfangsäule (2 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße) geladen und mittels einer EASY-Spray Säule (50 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße) mit einem 180-minütigen linearen Gradienten von 3-40-%igem Acetonitril und 0,1-%iger Methansäure aufgetrennt. Massenspektrometrie-Aufnahmen wurden mit dem Orbitrap Analysator bei einer Auflösung von 120,000 erfasst. Massenspektrometrie/Massenspektrometrie-Aufnahmen wurden unter Nutzung einer rapid-scan-rate mit dem Ionenfallen Analysator aufgenommen. Die Fragmentierung wurde durch Kollisionen höherer Energie (HCD) mit 35 % normalisierter Kollisionsenergie durchgeführt. Es wurde eine festgelegte

Taktzeit von 3 Sekunden verwendet. Dynamische Exklusion wurde mit einer Wiederholungsanzahl von 1 und einer Exklusionszeit von 60 s erzielt. Einfach geladene Vorläufersubstanzen wurden ausgeschlossen. Die minimale Signalschwelle für die Auswahl der Vorläufersubstanzen betrug 10,000. Automatisierte prädiktive Verstärkungsregelung wurde mit einem Zielwert von 200000 für MS Aufnahmen und 3000 für MS/MS Aufnahmen genutzt. Das System wurde durch die internalisierte Kalibrierungskonfiguration der EASY-IC Ionenquelle kalibriert.

3.3.10.3. Datenauswertung Massenspektrometrie

Die rohen MS Werte wurden mit der Software MaxQuant Version 1.5.3.30 ausgewertet (Cox and Mann 2008). Zum Abgleich der Daten diente die UniProt Mouse Datenbank sowie eine Datenbank der häufigsten Verunreinigungen. Die Suche wurde mit der für Trypsin typischen Spaltung von Peptiden am C-terminalen Ende der Aminosäuren Arginin und Lysin durchgeführt, wobei bis zu 3 nicht passende Spaltungsstellen erlaubt wurden. Die Proteinidentifizierung erfolgte unter Kontrolle der *False Discovery Rate* (FDR) <1% (Benjamini and Hochberg 1995). Zur Proteinquantifizierung wurden die markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierungs-Intensitäten genutzt (Cox, Hein et al. 2014). Proteine mit weniger als zwei eindeutig identifizierten Peptiden wurden ausgeschlossen. Die Daten wurden als Box-plot Ausreißer analysiert. Hierfür wurden die ersten Quartile minus das 1,5- bzw. 3-fache des Interquartilsabstandes (IQR) als unterer Grenzwert und die dritten Quartile plus das 1,5- bzw. 3-fache des IQR als oberer Grenzwert verwendet. Für die weiterführende Analyse wurde die Software IPA[®] genutzt.

3.3.11. Transkriptomanalyse

Zur Analyse der intestinalen Transkriptionsprofile wurden pro experimenteller Vergleichsgruppe die lasermikrodissezierten Darmschleimhautproben nah (NtPP) und weit entfernt (FtPP) der PP von je zwei Mäusen der Transplantationsreihen LMD1 und LMD2 an Tag 4 nach allogener SZT durch RNA Sequenzierung untersucht. Die Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer, die Erstellung der Sequenzierungsbibliothek, sowie die Sequenzierung wurde durch die Core Unit Systemmedizin unter der Leitung von Dr. Sascha Sauer der Universität Würzburg durchgeführt.

3.3.11.1. RNA Isolierung

Die Isolierung der gesamten RNA aus den lasermikrodissezierten Darmschleimhautproben erfolgte mit Hilfe des RNeasy Micro Kit entsprechend der Herstellerangaben. Durch Guanidiniumthiocyanat-enthaltene Puffer werden hierbei die Zellen lysiert und gleichzeitig die RNA-degradierenden RNasen inaktiviert. Durch die Zugabe weiterer Puffer und Präzipitation der RNA durch Ethanol wird eine Bindung der RNA an die Siliciumdioxid Membran der Säule bewirkt. Ebenfalls gebundene DNA-Bestandteile werden durch DNase verdaut. Durch die Zugabe von Waschpuffer und die anschließende Zentrifugierung werden Verunreinigungen und DNA aus der Säule ausgewaschen, wodurch nur die aufgereinigte an die Siliciumdioxid Membran gebundene RNA zurückbleibt. Diese wird abschließend mit RNase-freiem Wasser von der Membran gelöst. Die Qualitätskontrolle erfolgte durch RNA 6000 Pico Chips und ein Agilent 2100 Bioanalyser System.

3.3.11.2. Erstellung der Sequenzierungsbibliothek

Für die Erstellung der Sequenzierungsbibliothek wurde das SMARTer Stranded Total RNAseq-Pico Input Kit v2 entsprechend den Herstellerangaben verwendet (Abbildung 7, A). Die zu sequenzierende mRNA wird hierbei durch Spaltung der rRNA isoliert. Im Unterschied zur Isolierung der mRNA über die Poly-A-Schwänze wird hier auch die unprozessierte also unreife und auch nicht kodierende prä-mRNA mit sequenziert. Die Selektion der mRNA über ihren am 3'-Ende befindlichen Poly-A Schwanz kann zu einer Anhäufung von 3'-RNA Fragmenten führen und somit eine ungleichmäßige Abdeckung des Transkriptoms bewirken. Da dieser 3'-Verzerrungseffekt mit zunehmender RNA Degradierung und dadurch kleineren RNA Fragmenten zunimmt, ist die Poly-A-Selektion von mRNA für Proben mit niedrigen RIN Werten nur bedingt geeignet (Chen, Souaiaia et al. 2014).

Um eine gleichmäßige Abdeckung des gesamten Transkriptoms zu gewährleisten, werden durch das verwendete Kit mit Hilfe von Primern mit zufälliger Basenfolge (*random priming*) alle RNA Fragmente, inklusive der rRNA, in cDNA umgeschrieben. Die cDNA Moleküle werden anschließend mit Illumina Adaptoren verknüpft. Durch diese Identifizierungsschlüssel wird ermöglicht, dass verschiedene Proben gleichzeitig sequenziert werden können und man deren Sequenzierungs-Abschriften (*Reads*) nachträglich wieder den einzelnen Proben zuordnen kann. Abschließend wird die aus ribosomaler und

mitochondrialer RNA entstandene cDNA durch die Hybridisierung mit hierfür konstruierten Markersequenzen (R Probes) markiert und durch das Enzym ZapR gespalten. Zum Schluss werden die übrigbleibenden aus mRNA entstandenen cDNA Library Fragmente, welche sowohl am 3'- als auch 5'-Ende eine Primer Bindestelle besitzen, durch PCR Amplifizierung angereichert.

3.3.11.3. RNA Sequenzierung

Die RNA Sequenzierung wurde an einer Illumina NextSeq500 durchgeführt. Diese nutzt die Sequenzierung-durch-Synthese Methode (Abbildung 7, B-C). Hierbei wird die aus der zu sequenzierenden RNA generierte cDNA über Adapter an einem Glasobjektträger (*Flow Cell*) gebunden. In einem ersten Schritt werden die gebundenen DNA-Stränge zu Ansammlungen aus identischen DNA-Molekülen amplifiziert. Für die anschließende schrittweise Sequenzierung werden fluoreszenzmarkierte modifizierte Nukleotide, deren Fluoreszenzmarker gleichzeitig die weitere Polymerisation verhindern, verwendet. Somit wird sichergestellt, dass jede Runde nur ein Nukleotid komplementär zur Vorlage in die Nukleotidkette eingebaut wird. Die schlussendlich eingebaute Base wird anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung bildlich detektiert und anschließend abgespalten, um den Einbau des nächsten Nukleotides zu ermöglichen. Die Zuordnung der Basen (*base calling*) erfolgt hierbei direkt anhand der Signalintensitätsmessungen während jeder Runde, wodurch die Rohfehlerrate drastisch gesenkt wird.

Die Basenzuordnung und die Zuweisung der Sequenzierungs-Abschriften zu ihren ursprünglichen Proben (*demultiplexing*) anhand der vorher angefügten Adapter wurde mit dem Programm bcl2fastq v2.18.0.12 durchgeführt. Die Adapter-Sequenzen wurden mit der Software Cutadapt Version 1.12. entfernt (Martin 2011). Die Sequenzierungs-Abschriften wurden anschließend durch das Programm STAR Version 2.5.2b (Dobin, Davis et al. 2013) mit der Maus Referenz Sequenz GENCODE M8 abgeglichen und durch die quantMode Einstellung in *Read Counts per Gene* (RPG) ausgegeben. Die weitere Datenauswertung erfolgte anhand der DESeq2 Pipeline in R (Love, Huber et al. 2014). Anhand dieser Werte wurde die \log_2 *Fold Change* und damit die Veränderung der Transkriptionsrate eines Gens zwischen zwei Vergleichsgruppen berechnet. Die berechneten \log_2 *Fold Change* Wert wurden anschließend in Zusammenschau aller veränderten Transkripte durch ein Schrumpfungs-Verfahren korrigiert. Zur weiterführenden Analyse wurden nur detektierte Transkripte mit einer FDR $<10\%$ verwendet. Zur Regulierung der FDR und p-Wert Adjustierung wurde die Benjamini-Hochberg-Prozedur

Material und Methoden

(Benjamini and Hochberg 1995) genutzt. Für die Qualitätskontrolle mittels Hauptkomponentenanalyse und Korrelations Heatmaps wurden die normalisierten *Read counts* durch eine \log_2 basierte Transformation in regularisierte logarithmisierte RPG-Werte (rlog RPG) umgewandelt. Die weiterführende Analyse der Daten erfolgte mit der Software R, sowie IPA®.

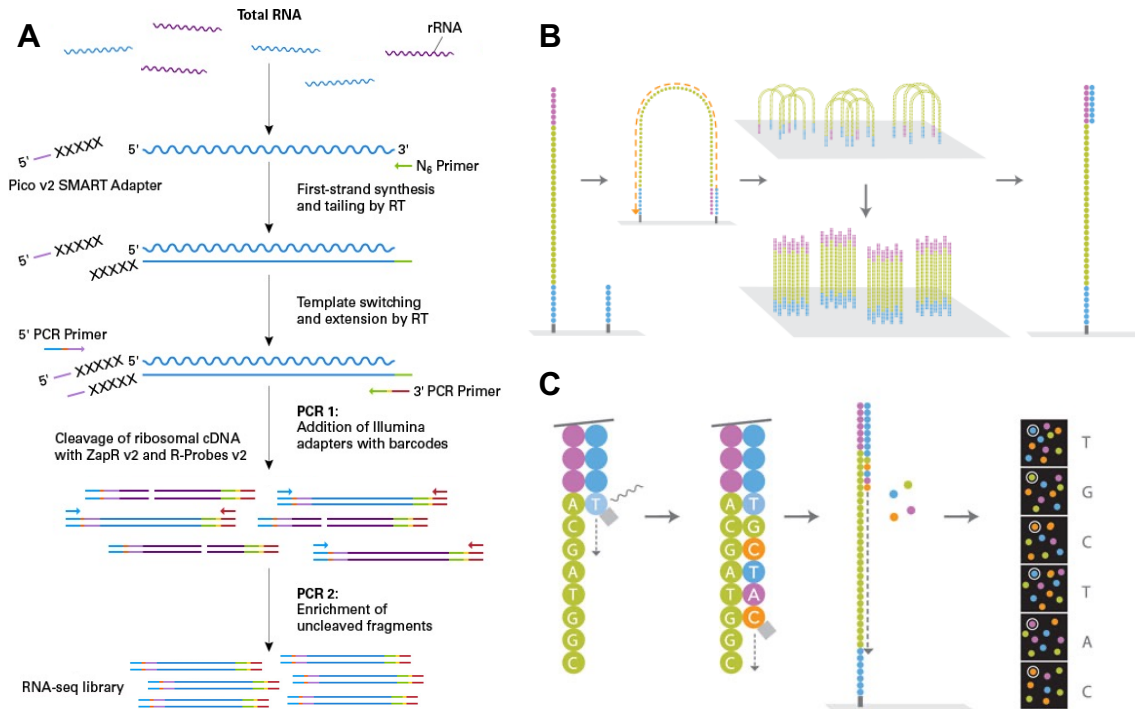


Abbildung 7: Erstellung der Sequenzierungsbibliothek und Ablauf der Illumina RNA Sequenzierung-durch-Synthese. (A) Durch Primer mit zufälliger Basenfolge werden alle RNA Fragmente in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase (RT) hängt beim Erreichen des 5' Endes des Vorlagenstranges einige Nucleotide an das 3' Ende der cDNA (XXXXX). Durch die Bindung des Pico v2 SMART Adapter an den Nucleotid-Anhang (XXXXX) wird beim Vorlagenstrangwechsel die vollständige Transkription des RNA Stranges ermöglicht. Die Illumina Adapter inklusive Barcode werden angefügt und die cDNA mittels PCR amplifiziert. Die ribosomale cDNA wird durch ZapR gespalten und die übrige cDNA mittels PCR angereichert. Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Takara Bio USA, Inc. "Figure 2. Schematic of technology in the SMARTer® Stranded Total RNA-Seq kit v2-Pico Input Mammalian", SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit - Pico Input Mammalian User Manual, ©2018 Takara Bio Inc. (B) Die Einzelstrang cDNA bindet über die Illumina Adapter an die Flow Cell. Durch Brückenamplifizierung werden dichte Cluster von cDNA Strängen gebildet. (C) Sequenzierung-durch-Synthese basiert auf der Methode der zyklischen reversiblen Termination. Jedes der vier Nucleotide ist mit einem Fluoreszenzmarker und einem reversiblen Terminator modifiziert. Die Sequenzierung erfolgt durch bildliche Detektion der komplementär zur Vorlage eingebauten Nucleotide. Durch die Abspaltung des reversiblen Terminators der Nucleotide kann nach deren Detektion ein neues Nucleotid eingebaut werden und somit die cDNA jedes Clusters Base für Base sequenziert werden. Abbildung (B) und (C) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von illumina (www.illumina.com).

3.3.12. Durchflusszytometrie

Die zu analysierenden Zellsuspensionen wurden zu einer maximalen Zellzahl von 1×10^6 und in einem Endvolumen von maximal 200 μl in eine 96-Well Platte pipettiert. Nach dem Zentrifugieren und Verwerfen der Überstände wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine 5-minütige Inkubation mit

100 μ l 5 % normalen Rattenserum (NRS) in PBS bei 4 °C blockiert. Antikörper wurden in der entsprechenden Endkonzentration hinzugefügt und bei Dunkelheit und 4 °C für weitere 30 min inkubiert. Nach Zentrifugierung wurden die Zellpellets in 200 μ l PBS resuspendiert. Die Auswertung der FACS Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes FlowJo Version X. Aufgrund einer möglichen Überlappung von Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome wurde für jede durchflusszytometrischen Analyse eine Kompensationsreihe mitgeführt. Zur besseren Differenzierung positiver und negativer Zellpopulationen wurde für jeden Antikörper auch eine Fluoreszenzminus-eins (FMO) Kontrolle mitgeführt (Herzenberg, Tung et al. 2006).

3.3.12.1. Durchflusszytometrische Analyse von Spender T-Zellen

Zur genaueren Charakterisierung des Phänotyps der alloreaktiven Spender T-Zellen in und um die PP während der akuten GvHD, wurden an Tag 3,5 nach allogener SZT die Versuchstiere geopfert und deren Milz, Blut und Dünndarm entnommen. Unter mikroskopischer Visualisierung mittels eines binokularen Stereomikroskops wurden die PP aus den entsprechenden Dünndarmabschnitten herausgeschnitten und durch ein Zellsieb (70 μ m) gedrückt. Die *Lamina Propria*-Bereiche in direkter Nähe zu den PP mit einem maximalen Abstand von 0,2-0,3 cm zur ursprünglichen PP Grenze wurden ebenfalls ausgeschnitten und pro Maus zu je einer Probe zusammengefasst (*Lamina Propria* nahe der PP; NtPP). Abschließend wurden *Lamina Propria* Abschnitte, welche in größerem Abstand (>1 cm) keinen PP trugen, ausgeschnitten und zu einer weiteren Probe zusammengefasst (*Lamina Propria* fern der PP; FtPP). Die jeweiligen Darmabschnitte wurden longitudinal eröffnet, von Fäkalien und Unreinheiten wie Fettgewebe befreit und in kleine Stücke geschnitten. Durch den Einsatz von Kollagenase VIII (1.5mg/ml), DNase I (40 μ g/ml) und eines GentleMACS Octo Dissociators wurden die T-Zellen aus dem Epithel und der *Lamina Propria* der jeweiligen Darmabschnitte isoliert. Zur Isolierung von T-Zellen aus dem entnommenen Blut wurde dieses für 10 min mit FACS Lysis Puffer inkubiert. Die Gewinnung einer Einzelzellsuspension aus der Milz wird in Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben.

Die verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper sind Tabelle 1 zu entnehmen. Neben CD3, CD90.1, CD4, CD8 und einer Lebend/Tod Färbung wurde zur Phänotypisierung CD27, 4-1BB, CD69 und CD44 gefärbt. In einem weiteren Cocktail wurden zur Charakterisierung der T-Zellen die Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR9 sowie die Integrine Integrin α 4 β 7, Integrin α L und Integrin α E ergänzt. Zur Bestimmung der

Material und Methoden

Differenzierungsmarker wurden die intrazellulären Marker T-bet und Ror γ unter Zuhilfenahme eines *Transcription Factor Staining Kits* verwendet. Die Gating Strategie zur Identifizierung der Spender T-Zellen erfolgte durch Gating auf Einzelzellen, Lymphozyten, lebendige Zellen sowie CD3⁺CD90.1⁺ Zellen (Abbildung 8, D). Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der Software Flow Jo X, die graphische Visualisierung und statistische Analyse wurde in Graphpad Prism 8 durchgeführt.

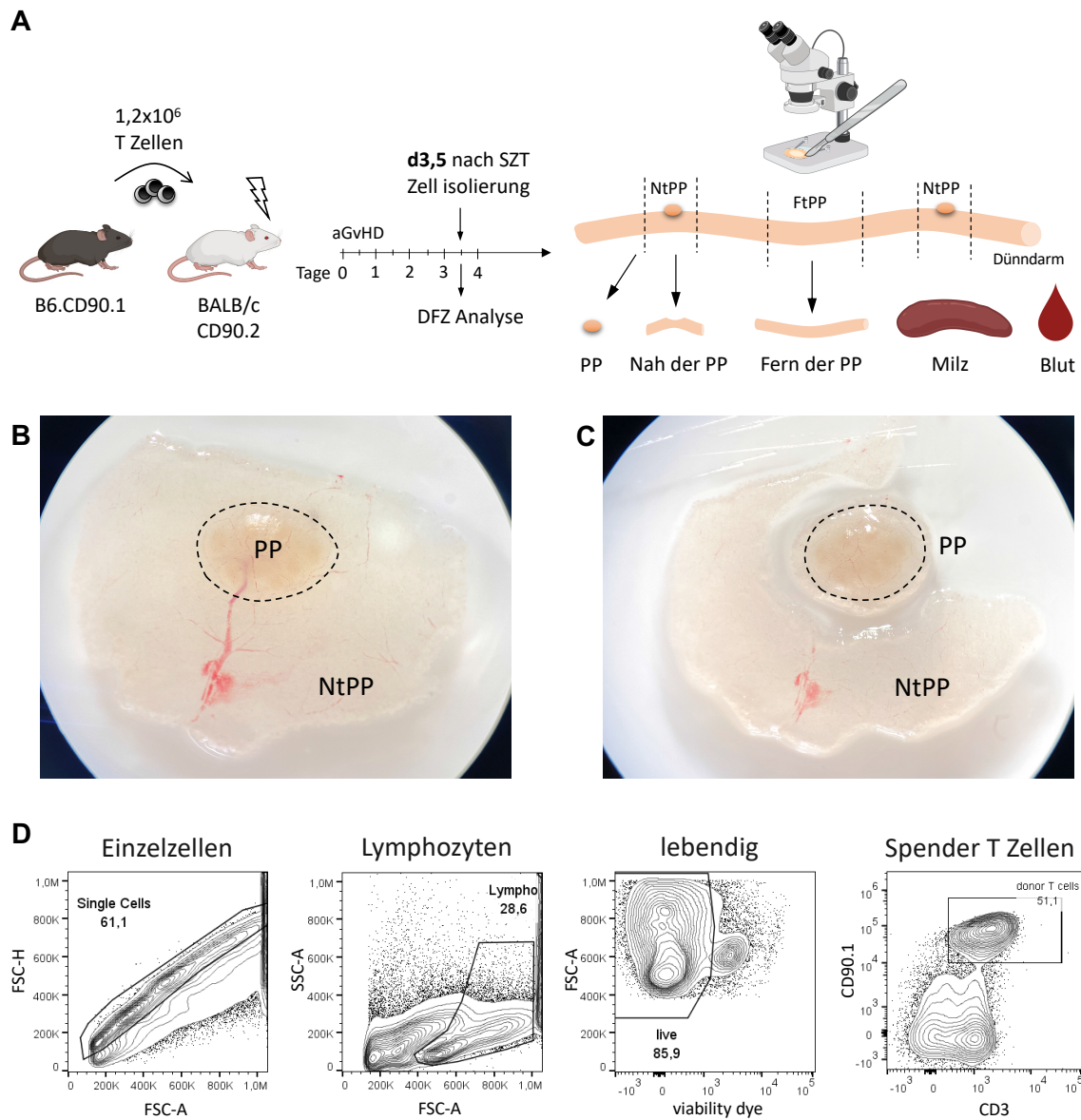


Abbildung 8: Versuchsschema zur durchflusszytometrischen Analyse von Spender T-Zellen aus unterschiedlichen Organen und Darmabschnitten. (A) Zur Induktion einer aGVHD wurden $1,2 \times 10^6$ CD90.1⁺ C57BL/6 T-Zellen in eine myeloaktiv bestrahlte CD90.2⁺ BALB/c Maus injiziert. An Tag 3,5 nach allogener SZT wurden die Mäuse geopfert und der Dünndarm, sowie die Milz und Blut entnommen. Unter einem binokularen Stereomikroskop wurden die PP sowie *Lamina Propria* Bereiche nah und fern der PP ausgeschnitten. (B) PP (umrandet; \varnothing 0,1-0,2 cm) mit angrenzender *Lamina Propria* (NtPP; $<0,3$ cm Abstand zur PP Grenze) vor dem Ausschneiden. (C) PP aus angrenzender *Lamina Propria* herausgeschnitten. (D) Gating Strategie zur selektiven Betrachtung lebendiger Spender T-Zellen in den einzelnen Proben. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

3.3.13. Immunfluoreszenzfärbung

Die bei -20 °C gelagerten histologischen Präparate wurden für 5 min bei RT aufgetaut und anschließend für 7 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert. Die Präparate wurden für weitere 5 min bei RT getrocknet und mit einem hydrophoben Stift umrandet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte nach 3-maligem Waschen mit PBS die Inkubation mit 150 µl Blocklösung (5 % Serum in PBS) für 15-30 min bei RT. Bei der Verwendung biotinylierter Antikörper erfolgten die Blockschritte unter Zusatz von Avidin bzw. Biotin. Im Anschluss daran wurden die Schnitte 3-mal in PBS gewaschen, 150 µl des Antikörpermixes, welcher die zu färbenden Antikörper in den jeweiligen Endkonzentrationen enthielt, auf den Gewebeschnitt pipettiert und für 1 h bei RT und Dunkelheit inkubiert. Nach drei weiteren PBS Waschschritten erfolgte eine 30-minütige bis einstündige, dunkle Inkubation bei RT mit 150 µl des Sekundärantikörpermixes. Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde bei jeder Färbung zusätzlich eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Nach einem erneuten Waschschriff wurden die Schnitte mit einem DAPI enthaltendem Medium eingebettet, mit einem Deckgläschen bedeckt und mit Entellan versiegelt. Die Objektträger wurden für 1h bei RT getrocknet und innerhalb von 7 Tagen mikroskopiert.

Für die Analysen möglichst großer Darmbereiche, wurde eine 20-fache Vergrößerung (0,6 Zoom) und eine Mosaik-Aufnahme-Funktion mit Autofokussierung des LSM 780 verwendet. Jede Aufnahme enthielt einen PP und durch Aneinanderreihung der einzelnen Mosaik-Aufnahmen die angrenzende Darmschleimhaut bis mindestens 2000 µm Entfernung zum PP (Abbildung 9). Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 1 und 2 zu entnehmen.

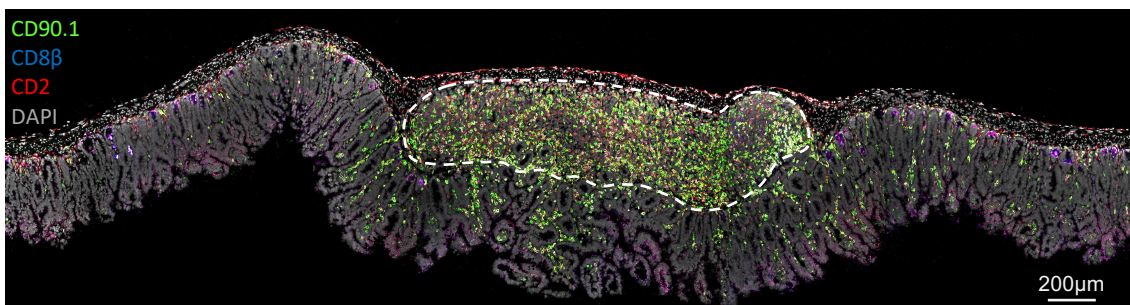


Abbildung 9: Konfokalmikroskopische Aufnahme. Mikroskopie eines Immunfluoreszenz gefärbten Darmabschnittes mit PP (zentral im Bild, umrandet) an Tag 4 nach allogener SZT. Mosaik-Aufnahmefunktion (2x8). 20x Objektiv. Autofokussierung durch Fluoreszenzsignal.

3.3.13.1. Auswertung der Immunfluoreszenz Bilder

Die Auswertung der Immunfluoreszenz Bilder erfolgte mit Hilfe der Software IMARIS. Bei jeder analysierten Darmaufnahme wurde zuerst der PP markiert und eine Abstandsfunktion generiert, welche allen Pixeln innerhalb des PP den Wert null und außerhalb den Wert entsprechend ihres Abstandes zum PP in μm zuschrieb. Für alle gefärbten Zellen der einzelnen Fluoreszenzfarben wurde anschließend eine Oberfläche generiert, welche die Größe der Zelle und deren Fluoreszenzsignale erfasste. Hierdurch konnte für jede Oberfläche die Intensität jedes Kanales auf jeder Zelle analysiert werden. Zudem konnte durch die vorher generierte Abstandsfunktion die Entfernung der einzelnen Oberflächen bzw. Zellen zum PP beurteilt werden. Um die intestinalen Zellpopulationen während der GvHD beurteilen zu können, wurden für die zu beurteilenden Marker die medianen Intensitäten der Oberflächen gegeneinander dargestellt (Abbildung 10, A).

Zur Beurteilung der intestinalen Zellgradienten wurde die Zelldichte in Abhängigkeit vom Abstand zum PP kalkuliert (Abbildung 10, B). Am Rande des PP sitzende Zellen ($<25 \mu\text{m}$ Abstand zur PP Grenze) wurden aus der Zellzahlkalkulation ausgeschlossen. Die berechnete Zellzahl wurde pro $500 \mu\text{m}$ Entfernungsschritt auf die jeweilige Fläche der Darmschleimhaut in diesem Abschnitt normalisiert.

Für die Expressionsanalyse (Abbildung 10, C) wurde die Summe der medianen Intensitäten der für den betrachteten Marker positiven Oberflächen durch die Gesamtzahl der für diesen Marker positiven Zellen in diesem Abschnitt dividiert. Die Ergebnisse der Analysen wurden jeweils aus mehreren Replikaten zusammengefasst und mit Hilfe der Software Graphpad PRISM statistisch ausgewertet und visualisiert.

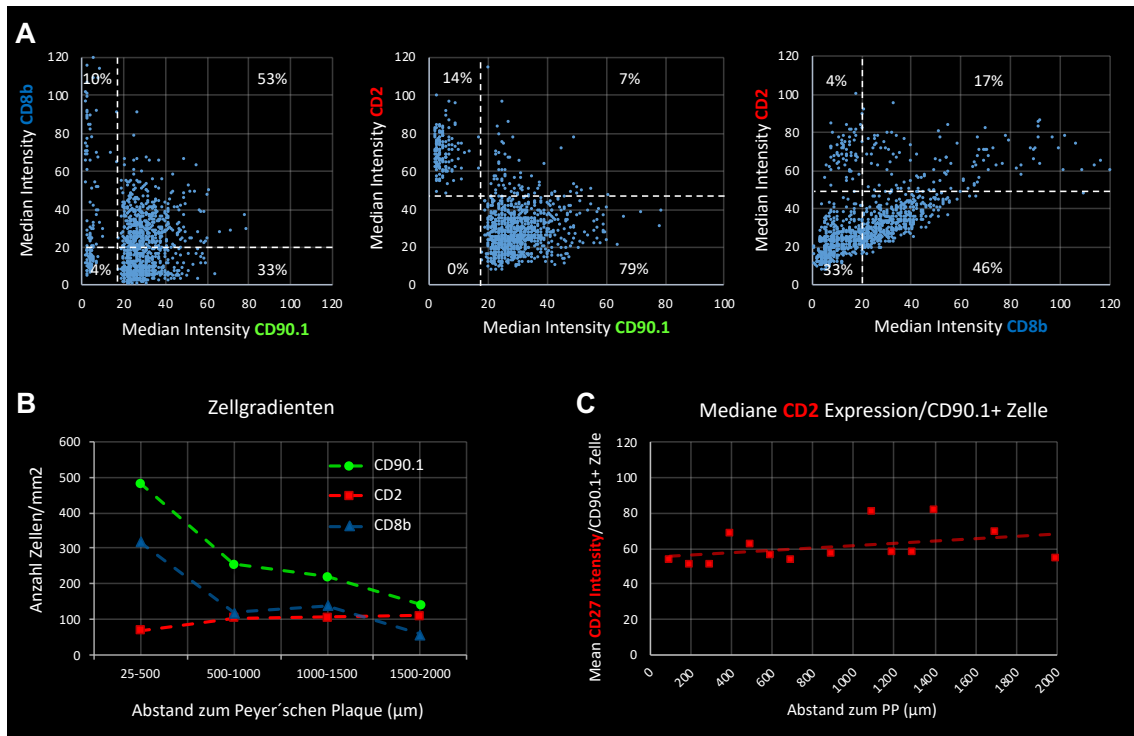


Abbildung 10: Darstellung einer beispielhaften Immunfluoreszenz Auswertung für CD2. (Oben) links ist die Intensität/Expression der Oberflächen/Zellen für CD90.1 gegen CD8β dargestellt. In der Mitte ist die CD90.1 Expression der Zellen gegen die CD2 Expression und rechts die Expression von CD8β gegen die von CD2 aufgetragen. (Unten) Links sind die Anzahl an CD90.1, CD2 und CD8β Zellen in Abhängigkeit vom Abstand zum PP dargestellt. Der Graph rechts visualisiert die durchschnittliche CD2 Expression auf CD90.1 Zellen in Abhängigkeit ihres Abstandes zum PP.

3.3.14. Migrationsanalysen

Zur funktionellen Testung der Faktoren, welche durch die RNA Sequenzierung und Immunfluoreszenzfärbungen als bedeutende Faktoren des intestinalen T-Zell-Homing während der akuten GvHD identifiziert wurden, wurden *in vitro* Migrationsanalysen in Form von Transwell- und Chemotaxiskammer-Versuchen durchgeführt. Die hierfür verwendeten rekombinanten Proteine sind Tabelle 3 zu entnehmen.

3.3.14.1. *In vitro* T-Zell Stimulation

Die für die Stimulation verwendeten T-Zellen wurden durch Anreicherung aus Splenozytenlösungen der Milzen von C57BL/6 Spendertieren gewonnen (s. Abschnitt 3.3.2.1.). Die aufgereinigten T-Zellen wurden zu einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ T-Zellen/ml in Stimulationsmedium aufgenommen und zu je 15×10^6 T-Zellen/Well in einer 6 Well Platte ausgesät. Durch die Zugabe eines Antikörpers gegen CD3 (30 ng/ml) zusammen mit rekombinantem IL-2 (50 IE/ml) wurden die T-Zellen über 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert. Durch Zusatz von Retinolsäure (1 mM) wurden, vergleichbar zur T-Zell Stimulation in den mesenterischen Lymphknoten oder

PP *in vivo*, spezifische Faktoren des intestinalen Homings auf den aktivierten T-Zellen induziert. Die aktivierten T-Zellen wurden nach drei Tagen Stimulation geerntet und ein Aliquot zur durchflusszytometrischen Analyse des Stimulationserfolges entnommen. Um eine Verfälschung des Migrationsverhaltens zu verhindern, wurde für die weiterführenden Versuche FCS-freies Migrationsmedium verwendet.

3.3.14.2. Transwell-Migrationsassay

Für die Migrationsversuche wurden Transwell-Einsätze für 24 Well Platten mit einer Porengröße von 3 µm verwendet. Hierbei wurde in ein Well einer 24 Well Platte 600 µl Migrationsmedium und das zu untersuchende Chemokin in der gewünschten Konzentration gegeben. Ein Transwell-Einsatz wurde in dieses Well gesetzt und mit $0,5 \times 10^6$ *in vitro* stimulierten T-Zellen in 200 µl Migrationsmedium befüllt. Die 24 Well Platte mit den Transwell-Einsätzen wurde anschließend für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 4 h wurden die nach unten migrierten Zellen mit Hilfe eines Zeiss Vert.A1 Zellkulturmikroskops manuell ausgezählt.

3.3.14.3. Gewinnung *in vivo* stimulierter T-Zellen

Zur Gewinnung *in vivo* stimulierter T-Zellen wurden myeloablativ bestrahlte BALB/c Mäuse mit C57BL/6 Knochenmarkzellen und T-Zellen transgener C57BL/6.Dendra2⁺ Mäuse, welche das grünfluoreszierende Protein Dendra in allen Zellen exprimieren, transplantiert. Im Rahmen der hierdurch ablaufenden GvHD werden die in den mesenterischen Lymphknoten und PP aktivierten naiven T-Zellen speziell für das Homing in den Darm geprägt. Aufgrund der schwierigen Isolation und vergleichsweise geringen Anzahl an aktivierten T-Zellen aus den PP wurden mesenterische Lymphknoten verwendet (s. Abschnitt 5.10). An den Tagen 4 und 5 nach allogener SZT wurden die Tiere geopfert und die mesenterischen Lymphknoten entnommen. Die Lymphknoten wurden sorgfältig von umgebendem Fettgewebe gereinigt und mehrfach eingeschnitten. Mit einem Spritzenstempel wurden diese anschließend durch ein 70 µm Zellsieb gerieben und mit weiteren 5 ml Migrationsmedium gespült. Nach Zentrifugation für 8 min bei 311 g und RT wurden die Zellen in 5 ml Migrationsmedium resuspendiert. Nach weiteren 5 min Zentrifugierung bei RT wurden die Zellen in 37 °C warmem Migrationsmedium auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt.

3.3.14.4. Migrationsanalyse in der Lebendzellmikroskopie

Zur Untersuchung der Migration *in vivo* aktivierter Spender T-Zellen wurden Objektträger mit μ -Slides Chemotaxis-Kammern entsprechend den Herstellerangaben verwendet (Abbildung 11). Zur Temperatur- und Gasäquibration wurden die μ -Slides Chemotaxis und das verwendete Medium über 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die zu untersuchenden *in vivo* aktivierten T-Zellen wurden zu einer Konzentration von 7×10^6 T-Zellen/ml in die Untersuchungskammer der μ -Slides geladen. Die mit T-Zellen beladenen μ -Slides wurden für 45 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die an die Untersuchungskammer grenzenden Reservoir Kammern wurde mit Medium beziehungsweise Medium und dem zu untersuchenden Chemokin beladen (Abbildung 11). Als Positiv- beziehungsweise Negativ-Kontrolle diente Medium mit beziehungsweise ohne 25% FCS. Die μ -Slides wurden bei 37°C und 5% CO₂ an einem LSM 780 Konfokalmikroskop mikroskopiert, welches mit einem Pecon Inkubationssystem P-Set 2000 ausgestattet wurde. Bilder der Untersuchungskammern wurden alle 60 s über einen Zeitraum von 3 h mit Hilfe des Zyklusmodus akquiriert. Durch den Positionsmodus des LSM 780 wurden alle Untersuchungskammern direkt nacheinander mit nur kurzer Verzögerung vollautomatisch mikroskopiert. Das Nachverfolgen der migrierenden Spender T-Zellen erfolgte anhand ihrer GFP Fluoreszenz mithilfe des Programm IMARIS. Für die Auswertung der Direktionalität der migrierenden Zellen und die Quantifizierung der Migrationseigenschaften wurde das Programm MATLAB genutzt. Insgesamt wurden für jede Analyse über 90 einzelne Zellen nachverfolgt, wobei nur Zellen mit einer Nachverfolgungszeit von mindestens 30 min in die Analyse eingeschlossen wurden.

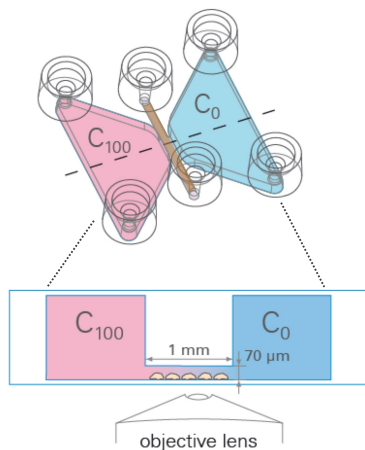


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines μ -Slide Chemotaxis-Kammersystems. Untersuchungskammer (braun eingefärbt) mit angrenzenden Reservoir Kammern (C₁₀₀ und C₀). In die Reservoir Kammer C₁₀₀ (links, rosa) wird das zu untersuchende Chemokin geladen, in die Kammer C₀ (rechts, blau) wird nur das Medium ohne Chemokin gegeben. Nach kurzer Zeit stellt sich ein Chemokin-Gradient mit hoher Zeitstabilität von C₀ nach C₁₀₀ ein, welchem die Zellen folgend nach links (in Richtung C₁₀₀) migrieren. Kammerkomplex 2 und 3 werden für Positiv-Kontrollen mit 25 % FCS und Negativ-Kontrollen mit reinem Migrationsmedium verwendet. Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von ibidi (www.ibidi.com).

3.3.15. Photokonversion und *in vivo* 2-Photononen Mikroskopie

Die Experimente zum Nachweis einer direkten Migration von aktivierten T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* wurden durch Dr. Katja Jarick geleitet und durchgeführt. Mein Beitrag hierzu umfasste insbesondere die Mithilfe in den Photokonversions-Operationen, der Zellisolierung, sowie Diskussion der Daten. Aufgrund der grundlegenden Bedeutung für die in dieser Arbeit adressierte Fragestellung sind die Ergebnisse dieser mit Einverständnis von Dr. Katja Jarick kurz zusammengefasst dargestellt. Eine ausführliche Erläuterung der verwendeten Methodik und der Ergebnisse sind der gemeinsamen Publikation (Jarick, Mokhtari et al. 2018) sowie der Doktorthesis von Dr. Katja Jarick (Jarick 2019) zu entnehmen. Kurz zusammengefasst wurden zur Induktion einer aGvHD $1,2 \times 10^6$ T-Zellen von C57BL/6.Dendra2⁺ Mäuse in myeloablativ bestrahlte BALB/c Mäuse injiziert. Durch die Expression des photokonvertierbaren Fluorochroms Dendra2 auf allen Spender T-Zellen kann durch Applikation von UV-Licht das exprimierte Fluoreszenzprotein irreversibel von grün nach rot fluoreszierend geändert werden (Gurskaya, Verkhusha et al. 2006). Hierdurch können gezielt Spender T-Zellen photokonvertiert und somit markiert werden. Aufgrund der Farbstabilität und Farberhaltung selbst nach mehrfacher Zellteilung können die Zellen zu späteren Zeitpunkten wiedererkannt und von unkonvertierten grünfluoreszierenden Spender T-Zellen unterschieden werden. An Tag 3 nach allogener SZTation wurden die behandelten Mäuse mit Ketamin und Xylazin anästhesiert und eine PP tragende Dünndarmschlinge operativ externalisiert. Mit Hilfe einer sterilen Schablone aus Aluminiumfolie mit einem Lochdurchmesser von ca. 2 mm, welche um den zu bestrahlenden PP gelegt wurde, und einer UV-Lampe wurden gezielt die T-Zellen innerhalb eines PP photokonvertiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Photokonversion wurden die Mäuse erneut anästhesiert und die zuvor photokonvertierte Dünndarmschlinge externalisiert. Unter Einsatz intravitale 2-Photonenmikroskopie konnte die Migration der durch Photokonversion markierten T-Zellen an der Grenze zwischen PP und anliegender *Lamina Propria in vivo* untersucht werden. Die Nachverfolgung der T-Zellmigration erfolgte mittels der Software IMARIS. Die anschließende Analyse der T-Zell Laufwege bezüglich Geschwindigkeit, Direktionalität und Drehwinkel wurde von Dr. Zeinab Mokhtari in Matlab durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Allogene SZT im MHC-inkompatiblem Mausmodell

Um Faktoren zu identifizieren, welche die Migration von T Zellen aus den PP in die *Lamina Propria* während der akuten GvHD beeinflussen, führten wir eine allogene SZT im MHC-inkompatiblem Mausmodell durch. Hierbei wurde durch die Transplantation der myeloablativ bestrahlten Mäuse mit 5×10^6 Knochenmarkszellen und $1,2 \times 10^6$ MHC-inkompatiblen T-Zellen eine akute GvHD induziert (s. Abschnitt 3.3.1). Die transplantierten T-Zellen wurden isoliert (s. Abschnitt 3.3.2.1) und, wie nachfolgend (Abbildung 12, A, unten) repräsentativ für die Transplantationsreihe LMD2 dargestellt, ausgehend von den isolierten Splenozyten bis zu einer Reinheit von annähernd 90% T-Zellen aufgereinigt. Das Verhältnis von CD4 zu CD8 T Zellen betrug 4:5. Die T-Zellkontamination der transplantierten Knochenmarkszellen betrug nach Depletion weniger als 0,1% (Abbildung 12, A, oben). Die aufgereinigten Zellsuspensionen zeigten in der durchflusszytometrischen Kontrolle eine Vitalität von >93%.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Induktion einer GvHD sowie zum Monitoring der Kinetik dieser wurde an den Tagen 2,4 und 6 nach allogener SZT eine Biolumineszenzbildgebung durchgeführt (Abbildung 12, B). Die Gruppe der mit Knochenmark- und T-Zellen (KM+T) transplantierten Mäusen zeigte hierbei an Tag 2 nach allogener SZT ein für die Initiationsphase der GvHD typisches Signal der Spender T-Zellen in den SLO. An Tag 4 nach allogener SZT zeigte sich bei dieser Gruppe, aufgrund der weiteren Proliferation und beginnender Migration der aktivierten T-Zellen zu ihren Effektororganen, ein zunehmendes BLI Signal in den SLO sowie ein vermehrtes Signal im Bauchraum. An Tag 6 nach allogener SZT war bei einem Großteil der KM+T Mäuse die GvHD schon so ausgeprägt, dass diese aufgrund eines zu hohen Gewichtsverlustes und klinischen GvHD Scores vorzeitig geopfert werden mussten, um weitere Qualen der Tiere zu verhindern. In den BLI-Analysen der KM+T Gruppe an Tag 6 nach allogener SZT (Abbildung 12, B) stellte sich, entsprechend der fortschreitenden Infiltration und Zerstörung der Effektororgane durch die transplantierten T-Zellen, ein verstärktes BLI Signal der Leber, des Darmes und der Haut dar. Da die Mäuse, die nur mit Knochenmarkszellen transplantierten Kontrollen, nicht mit Luciferase-positiven T-Zellen transplantiert wurden, wiesen diese zu keinem Zeitpunkt nach allogener SZT ein BLI Signal auf.

Ergebnisse

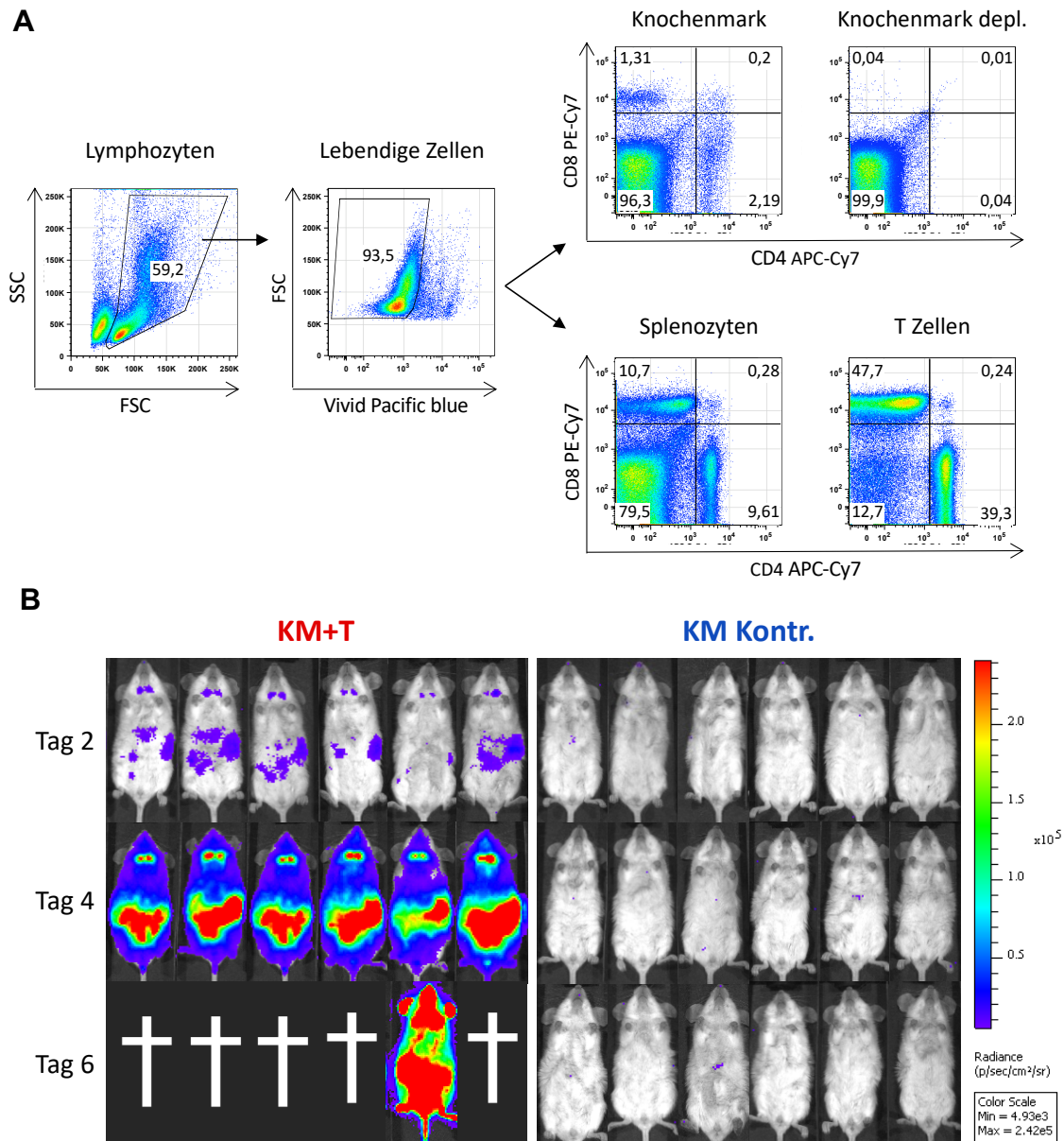


Abbildung 12: Aufreinigungsanalyse der transplantierten Zellen und Biolumineszenz-Signale der experimentellen Gruppen. (A) Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkdepletion und T-Zellanreicherung vor allogener SZT. (Links) Darstellung der Gating Strategie für Lymphozyten und lebendige Zellen (>90%). (Rechts) Nach der Depletion betrug die T-Zellkontamination des Knochenmarks <0,1% (oben). Die T-Zellen wurden bis zu einer Reinheit von etwa 90% angereichert (unten). Dargestellt ist eine repräsentative Reinheitsanalyse der Transplantation LMD2. (B) Biolumineszenz Bildgebung der mit Knochenmark- und T-Zell transplantierten Mäuse sowie der nur mit Knochenmark transplantierten Kontrollmäuse an den Tagen 2,4 und 6 nach allogener SZT. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Transplantationsreihen LMD1 & LMD2. Tag 2 und 4 zeigt u.a. die Mäuse, deren Organproben weiterführend für die MS-Analyse und RNA Sequenzierung verwendet wurden.

Entsprechend der ablaufenden GvHD entwickelten die Mäuse der KM+T Gruppe einen deutlichen Gewichtsverlust nach allogener SZT (Abbildung 13, A-B). Auch die nur mit Knochenmarkszellen (KM) transplantierten Mäuse und Bestrahlungskontrollen zeigten in den ersten Tagen nach Bestrahlung eine typische Gewichtsabnahme. Aufgrund der Bestrahlung und der damit einhergehenden Belastung zeigten diese ebenso zu Beginn einen leichtgradig

Ergebnisse

erhöhten klinischen GvHD Score. Da jedoch in den KM Kontrollen durch die Transplantation von Knochenmarkstammzellen das hämatopoetische System rekonstituiert wurde, erholten sich diese nachhaltig von den Folgen der Konditionierung (Abbildung 13, A-B). Das fehlende Engraftment und Versterben der KM Kontrollen in der Versuchsreihe LMD2 wird in Abschnitt 5.1 diskutiert. Im Gegensatz zu den KM Kontrollen erholten sich die Bestrahlungskontrollen nur kurzfristig und erlagen nach einiger Zeit der durch die myeloablative Konditionierung bedingten Anämie. Die unbehandelten Kontrollen, welche weder bestrahlt noch transplantiert wurden, zeigten wie erwartet keinen Gewichtsverlust. Die Tiere der Transplantationsreihe LMD1 hatten mit einem Gewicht von durchschnittlich 19,5 g (Alter 10,3 Wochen) vergleichbare Ausgangswerte wie die der Transplantationreihe LMD2 (19,9 g, 11,6 Wochen).

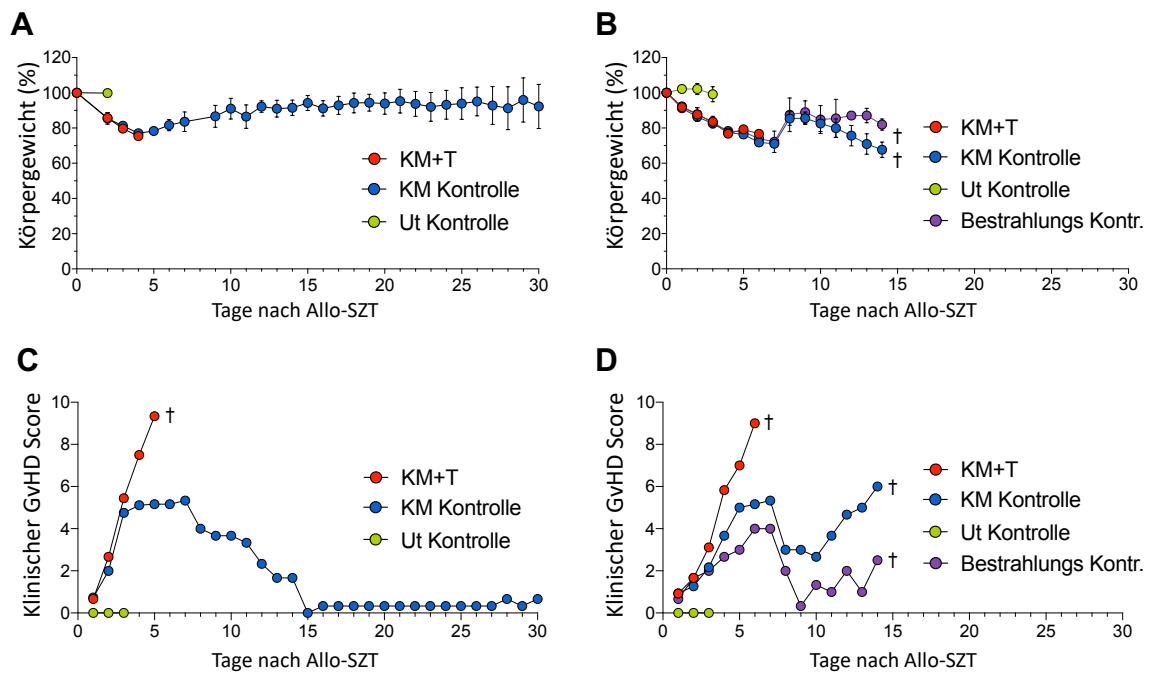


Abbildung 13: Gewichtscurven und klinischer GvHD Score. Gewichtscurven der experimentellen Vergleichsgruppen KM+T, KM Kontrolle, Bestrahlungskontrolle und Ut Kontrolle der Transplantationen LMD1 (A) und LMD2 (B). Dargestellt ist das prozentuale Gewicht der Mäuse in Bezug auf ihr Ausgangsgewicht in Abhängigkeit von der Zeit nach allogener SZT in Tagen. Mäuse mit einem GvHD Summen-Score ≥ 8 wurden zur Leidenslinderung getötet (†). Gesamtpunktwert des klinischen GvHD Scores bezogen auf den Tag nach allogener SZT für die Transplantationen LMD1 (C) und LMD2 (D). †, verstorbene oder aufgrund eines hohen GvHD Scores zur Leidenslinderung getötete Mäuse.

Auch das an Tag 6 nach allogener SZT durchgeführte Histopathologie Scoring der transplantierten Mäuse konnte eine deutliche GvHD in den KM+T transplantierten Tieren nachweisen. Die KM+T transplantierten Mäuse zeigten dabei deutliche histopathologische GvHD Kennzeichen, wie Apoptose der Darmschleimhautkrypten, hepatozelluläre Schädigung sowie Immunzellinfiltration in den Effektororganen Darm, Leber und Lunge

Ergebnisse

(Abbildung 14). Aufgrund der Bestrahlung und der damit einhergehenden Gewebeerstörung und Inflammation zeigten die mit Knochenmark transplantierten Mäuse ebenfalls einen leichtgradig erhöhten histopathologischen Score ohne jedoch eine GvHD zu entwickeln.

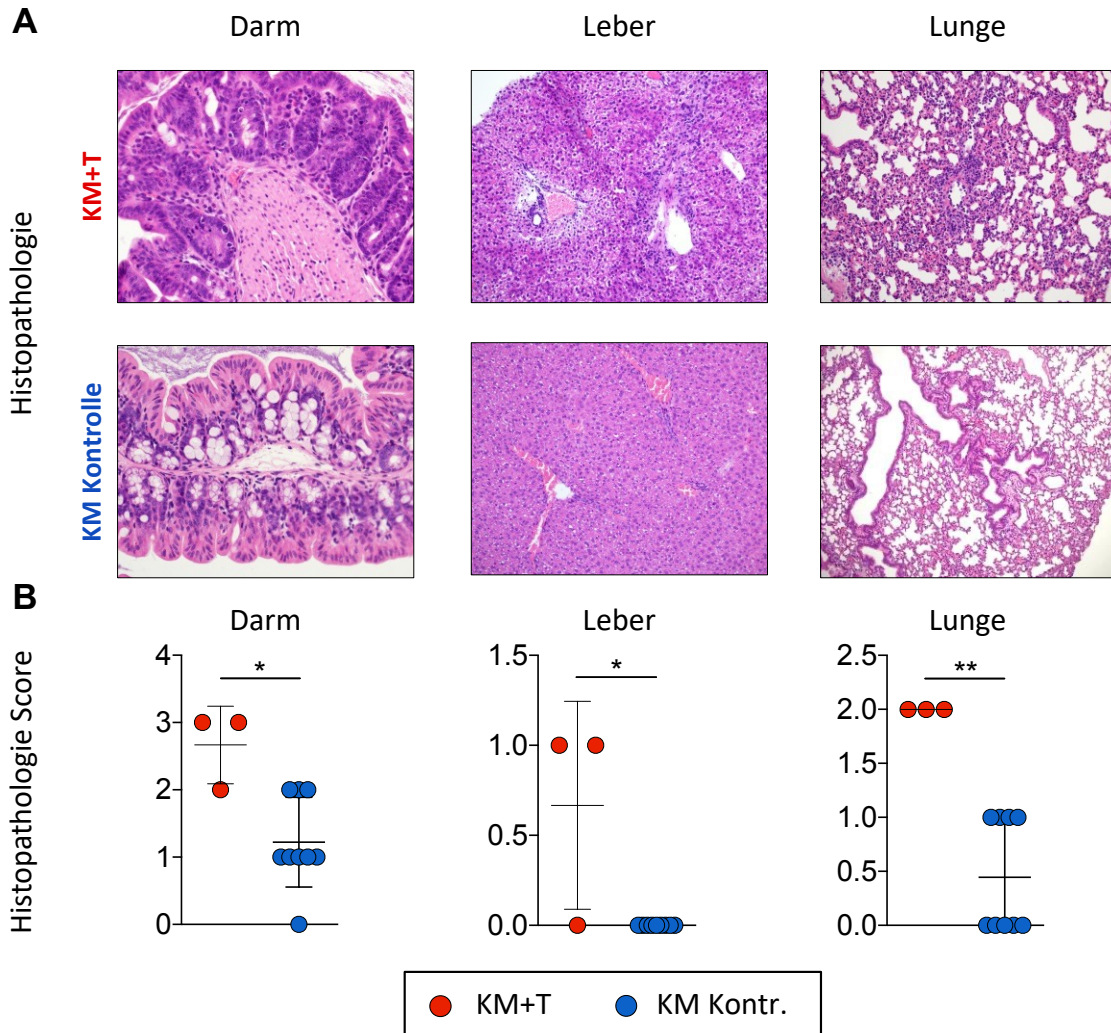


Abbildung 14: Histopathologischer GvHD Score. (A) Repräsentative histopathologische Scoring Bilder aus Darm, Leber und Lunge der KM+T Mäuse (mit GvHD) und der KM Kontroll Mäuse (ohne GvHD) Tag 6 nach Transplantation. H.E. gefärbt. Darm in 10x, Leber und Lunge in 5x Vergrößerung mikroskopiert. (B) Auswertung des histopathologischen GvHD Scores für Darm, Leber und Lunge. Gepoolte Daten aus Transplantation LMD1 und LMD2. KM Kontrolle n=9; KM+T n=3. Mann-Whitney-Test. * p-Wert $\leq 0,05$. ** p-Wert $\leq 0,01$.

Zusammenfassend bestätigt sowohl die Biolumineszenz Bildgebung wie auch das klinische und histopathologische Scoring der Versuchstiere die erfolgreiche Induktion einer akuten GvHD durch die Transplantation von MHC-inkompatiblen T-Zellen in myeloablativ bestrahlte Empfängermäuse.

4.2. Zeitpunkt der T-Zellinfiltration in den Darm nach allogener SZT

Zur Bestimmung des Untersuchungszeitpunktes für die RNAseq und Massenspektrometrie Analysen wurde für das von uns verwendete MHC-inkompatible Mausmodell der Zeitpunkt der T-Zellinfiltration in den Darm mittels Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt. Hierfür wurden histologische Präparate der mit Knochenmark- und T-Zellen transplantierten Mäusen an den Tagen 2,5, 3 und 4 nach allogener SZT mittels Immunfluoreszenz Antikörpern gegen CD90.1, CD4 und CCL21 sowie mit DAPI gefärbt (Abbildung 15).

An Tag 2.5 nach allogener SZT konnten in der *Lamina Propria* sowohl weit entfernt der PP als auch in direkter Nähe zu den PP kaum Spender T-Zellen detektiert werden (Abbildung 15, oben). In den PP ließen sich zu diesem Zeitpunkt eine starke Expression von CCL21 sowie bereits einige CD90.1⁺ Spender T-Zellen nachweisen.

An Tag 3 nach allogener SZT konnte in der *Lamina Propria* weit entfernt der PP weiterhin keine Spender T-Zellen gefunden werden, wohingegen sich in direkter Nähe zu den PP bereits einige, vor allem CD4 negative, Spender T-Zellen zeigten (Abbildung 15, mitte). Auch die Anzahl an Spender T-Zellen innerhalb der PP war zu diesem Zeitpunkt weiterhin stark zunehmend.

An Tag 4 nach allogener SZT konnten auch weit entfernt der PP eine Infiltration der *Lamina Propria* mit Spender T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 15, unten). Zudem wies auch die *Lamina Propria* nah der PP eine zunehmende Infiltration mit Spender T-Zellen auf.

Diese Daten zeigen, dass die T-Zellinfiltration der *Lamina Propria* bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach allogener SZT beginnt und einer auffälligen Verteilung unterliegt. So scheinen T-Zellen zuerst in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP zu infiltrieren, wohingegen die Infiltration von Bereichen weit entfernt der PP erst zu einem späteren Zeitpunkt einsetzt.

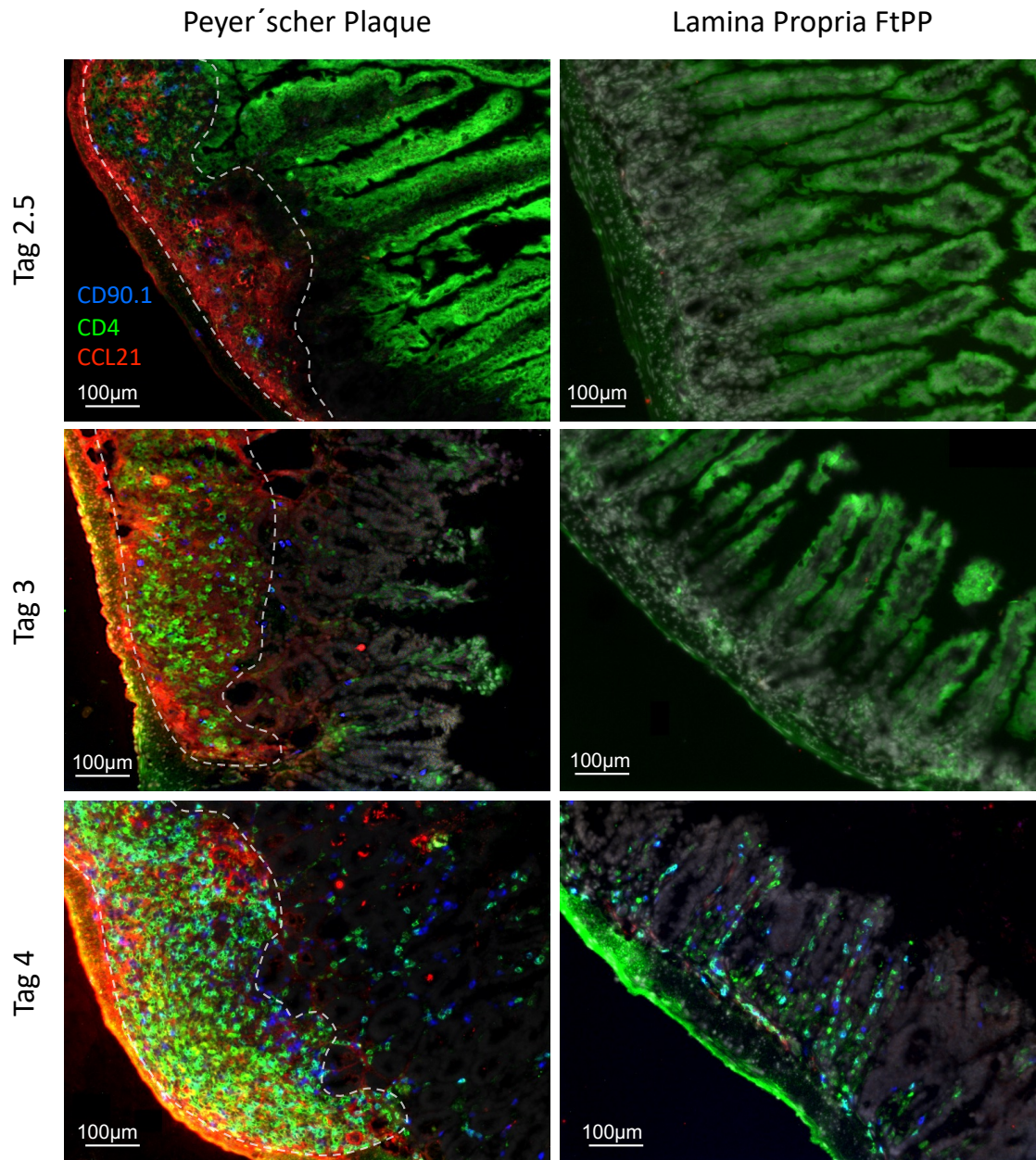


Abbildung 15: Kinetik der T-Zell Infiltration in die intestinale *Lamina Propria*. Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von PP tragenden Darmabschnitten der KM+T Mäuse an Tag 2.5, 3 und 4 nach allogener SZT. Die linke Spalte zeigt repräsentative Aufnahmen von PP-Abschnitten mit angrenzender *Lamina Propria* (NtPP). Die rechte Spalte zeigt Aufnahmen der *Lamina Propria* weit entfernt der PP (FtPP). Die Färbung wurde mit IF Antikörpern gegen CD90.1 (APC; blau), CD4 (A488; grün), CCL21 (Cy3; rot) und mit DAPI durchgeführt. Alle Bilder wurden mit einem 10x Objektiv aufgenommen.

4.3. Intestinale T-Zellverteilung während der frühen aGvHD

Bei genauerer Analyse der zuvor beobachteten intestinalen T-Zellverteilung während der frühen aGvHD stellte sich eine deutliche Akkumulation von Spender T-Zellen nahe der PP dar (Abbildung 16, A). In Immunfluoreszenzuntersuchungen der intestinalen *Lamina Propria* an den Tagen 2.5, 3 und 4 nach allogener SZT zeigte sich entsprechend ein deutlicher Gradient der CD90.1⁺ Spender T-Zellen mit hohen T-Zellzahlen nahe der PP

Ergebnisse

und abnehmenden Zellzahlen in zunehmender Entfernung zu diesen (Abbildung 16, B). Dieser intestinale T-Zellgradient zeigte sich mit fortschreitender Zeit nach allogener SZT zunehmend rückläufig und war ab Tag 6 nach allogener SZT nahezu vollständig aufgehoben (Abbildung 16, C).

Zusammenfassend legen diese Beobachtungen eine frühe Einwanderung von T Zellen in *Lamina Propria* Bereiche nahe der PP entweder per direkter Migration aus den benachbarten PP oder per selektiver vaskulärer Infiltration über die Blutbahn nahe.

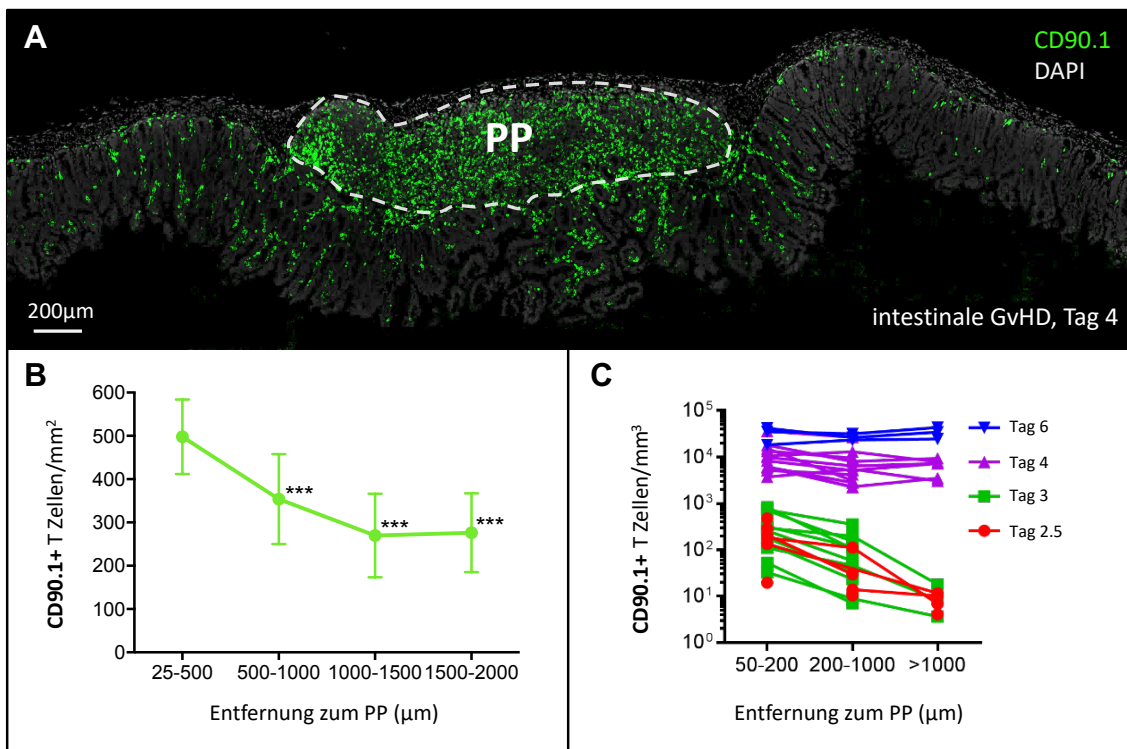


Abbildung 16: Intestinaler T-Zellgradient der frühen GvHD. (A) Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) Aufnahme eines PP tragenden Dünndarmabschnitts an Tag 4 nach allogener SZT. CD90.1+ Spender T-Zellen (grün), Zellkernfärbung mittels DAPI (grau). (B) Anzahl der CD90.1+ Spender T-Zellen pro mm² intestinaler *Lamina Propria* in Abhängigkeit von der Entfernung zum PP. Immunfluoreszenzmikroskopie Analysen an Tag 4 nach allogener SZT (n=14). *** p-Wert < 0,001, gepaarter t-Test. (C) Anzahl CD90.1+ Spender T-Zellen pro mm³ intestinaler *Lamina Propria* in Abhängigkeit von der Entfernung zum PP. Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM) Aufnahmen intestinaler *Lamina Propria* zu den Zeitpunkten Tag 2.5, 3, 4 (n=12) und 6 (n=3) nach allogener SZT. LSFM Daten (C) freundlicherweise bereitgestellt von Katja Jarick.

4.4. Migrationsverhalten aktivierter T-Zellen an der Grenze zwischen Peyerschem Plaque und *Lamina Propria*

Zur Analyse der T-Zellmigration an der Grenze der PP zur *Lamina Propria* (LP) wurden die T-Zellen innerhalb der PP durch Photokonversion markiert und anschließend ihre Migrationswege mittels intravitaler 2-Photonenmikroskopie (s. Abschnitt 3.3.15) untersucht (Abbildung 17 A).

Ergebnisse

Hierbei konnte bereits an Tag 3 nach allogener SZT eine direkte Migration von einzelnen T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* nachgewiesen werden (Abbildung 17 B, oben), welche sich an Tag 3,5 nach allogener SZT weiter verdeutlichte (Abbildung 17 B, unten) (Jarick 2019).

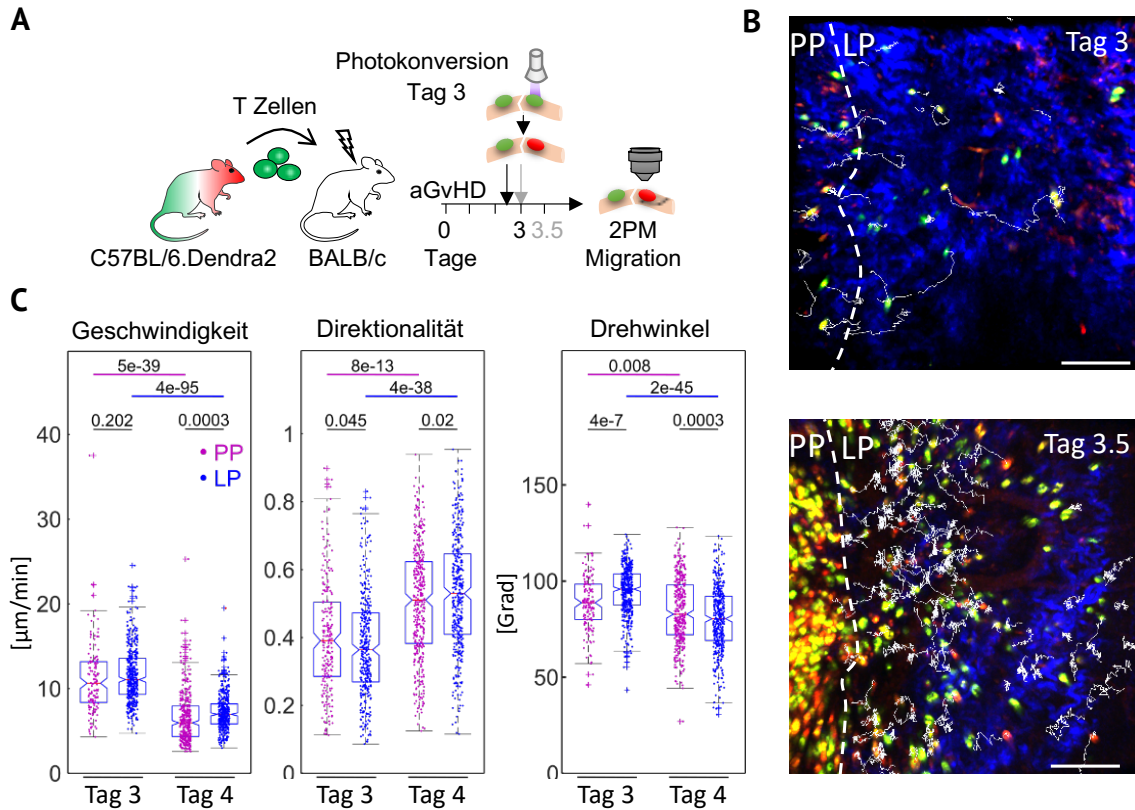


Abbildung 17: Aktivierte T-Zellen migrieren direkt aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria*. (A) Zur GvHD Induktion wurden $1,2 \times 10^6$ Dendra2⁺ T-Zellen in myeloablativ bestrahlte BALB/c Mäuse injiziert. Nach Photokonversion eines PP an Tag 3 nach allogener SZT erfolgte die 2-Photonenmikroskopie der PP Grenzen an den Tagen 3, 3,5 und 4 nach allogener SZT. (B) Repräsentative Aufnahmen der PP Grenzen (gestrichelte Linie) mit photokonvertierten T-Zellen (rot/gelb) und ihren Migrationswegen (dünne Linien) an Tag 3 (oben) und Tag 3,5 (unten) nach allogener SZT. Maßstabsbalken 100µm. (C) Analyse des Migrationsverhaltens der photokonvertierten T-Zellen innerhalb der PP und in der *Lamina Propria* (LP) an Tag 3 und Tag 4 nach allogener SZT bezüglich Geschwindigkeit (µm/min), Direktionalität und Drehwinkel. Daten und Abbildung freundlicherweise bereitgestellt von Katja Jarick (Jarick 2019).

Zur Analyse des Migrationsverhaltens wurde die Geschwindigkeit, die Direktionalität und der Drehwinkel der migrierenden Zellen untersucht (Abbildung 17, C). Die Direktionalität beschreibt dabei den Quotienten aus dem direkten Verbindungsweg zwischen Start und Endpunkt eines Migrationswegs (Nettodistanz) und der tatsächlich zurückgelegten Wegstrecke. Der Drehwinkel beschreibt den Winkel der einzelnen Migrationsschritte zueinander und kann als gegenläufiger Marker der Direktionalität gesehen werden. Betrachtet man die Migrationsgeschwindigkeit der T-Zellen so migrierten diese in der *Lamina Propria* schneller als innerhalb der PP und an Tag 3 nach allogener SZT insgesamt schneller als an Tag 4. An Tag 4 zeigten die T-Zellen eine geradlinigere Migration mit höherer Direktionalität als an Tag 3.

Ergebnisse

Dabei wiesen die T-Zellen an Tag 4 eine höhere Direktionalität in der *Lamina Propria* als innerhalb der PP auf, wohingegen an Tag 3 die Zellen innerhalb der PP geradliniger migrierten. Im Einklang mit diesen Befunden zeigten an Tag 4 die T-Zellen in der *Lamina Propria* niedrigere Drehwinkel, wohingegen an Tag 3 die T-Zellen innerhalb der PP niedrigere Drehwinkel aufwiesen.

Die intravitale 2-Photonenmikroskopie bestätigt eine direkte Migration von Spender T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* in der frühen intestinalen aGvHD. Die T-Zellmigration weist dabei insgesamt ein eher zufälliges Bewegungsmuster mit einem geringen Maß an Direktionalität auf.

4.5. Laser-Mikrodissektion zur Gewinnung von RNA und Proteinproben aus intestinalen murinen Kryoschnitten

Um Faktoren zu identifizieren, welche die Migration von T Zellen im Rahmen des intestinalen T-Zell-Homings beeinflussen, wurde die Laser-Mikrodissektion (LMD) zur Gewinnung von intestinalen RNA und Proteinproben angewandt (s. Abschnitt 3.3.9). Die durch LMD aus den intestinalen Kryoschnitten der Mäuse an Tag 4 nach allogener SZT gewonnenen Proben wiesen eine gute RNA Integrität mit durchschnittlichen RIN Werten von 6-8 und einer Konzentration von 5-10 ng/µl auf. Die gute RNA Integrität spiegelt sich auch in der Qualität der daraus resultierenden RNA Sequenzierungsdaten wider, wie beispielweise anhand der Korrelationsanalysen zu erkennen ist. Die Proben der KM+T Gruppe korrelierten untereinander stark und ließen sich deutlich von denen der KM und Ut Kontrollgruppe abgrenzen (Abbildung 18). Die Proben der KM Kontrolle glichen somit eher denen der unbehandelten Mäuse (Ut Kontrolle) und unterschieden sich beide deutlich von denen der KM+T Gruppe (Abbildung 18, A, B). Auch innerhalb der KM+T Gruppe konnte man die *Lamina Propria* Bereiche nah (NtPP) und weit entfernt der PP (FtPP) anhand von Korrelationsanalysen ihrer Transkriptionsprofile (Abbildung 18, C) deutlich voneinander abgrenzen.

Die Proteinqualität der Proben für die Massenspektrometrie konnte nur bedingt durch vorangestellte Analysen beurteilt werden. Die tatsächlich vorhandene Probenqualität für die Proteinexpressionsanalyse lässt sich aber anhand der resultierenden Massenspektrometrie Ergebnisse erkennen, welche später dargestellt werden (s. Abschnitt 4.7).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Laser-Mikrodissektion kombiniert mit RNA Sequenzierung eine erfolgreiche Methodik zur Transkriptomanalyse selektiver Gewebebereiche darstellt.

Ergebnisse

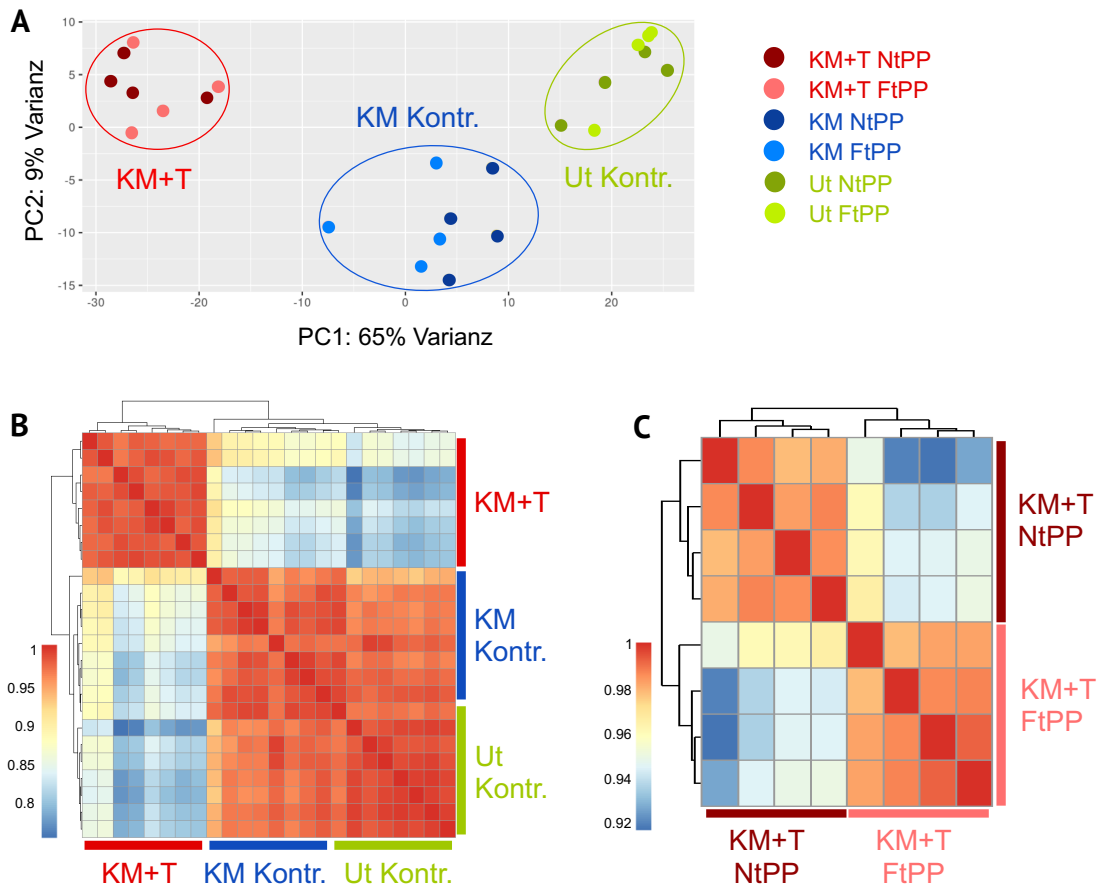


Abbildung 18: Darstellung der Hauptkomponentenanalyse und Korrelations Heatmaps der RNaseq Daten. (A) zeigt die Hauptkomponentenanalyse der einzelnen Proben. Die KM+T Gruppe lässt sich hierbei deutlich von den KM und Ut Kontrollen abgrenzen. (B) zeigt die Korrelationsheatmap für die Proben der KM+T, KM Kontroll und Ut Kontroll Gruppe. (C) zeigt die Korrelationsheatmap für die Proben der KM+T Gruppe nah (NtPP) und weit entfernt (FtPP) des PP. Für die dargestellten Korrelationsheatmaps wurden die Daten aller differenziell exprimierten Gene mit einer FDR<10% verwendet.

4.6. Ergebnisse der RNA Sequenzierung

Die RNA Sequenzierung konnte insgesamt über 46000 Gene detektieren. Im Vergleich der KM+T und der KM Gruppe an Tag 4 nach allogener SZT konnten über 7200 Transkripte mit einer FDR<10% entdeckt werden. Bei einer $\text{Log}_2 \text{ Fold Change}$ (Log_2FC) von ≥ 1 bzw. ≥ 2 zeigten sich 1599 bzw. 324 Transkripte signifikant verändert (adj. p-Wert<0,05). Im Vergleich der *Lamina Propria* Bereichen nah und fern der PP innerhalb der KM+T Gruppe konnten 142 Transkripte mit einer FDR<10% detektiert werden.

Die Heatmap-Darstellung des Vergleichs KM+T vs. KM Kontrolle vs. Ut Kontrolle zeigt, dass nahezu alle Gene, die in der KM+T Gruppe hochreguliert waren, sowohl in der KM als auch in der Ut Kontrolle kaum vermehrt exprimiert wurden (Abbildung 19). Lediglich jene Transkripte, die in der KM+T Gruppe insbesondere nah am PP detektiert wurden, zeigten zum Teil auch eine vermehrte Expression in der Ut, nicht jedoch in der KM Kontrolle.

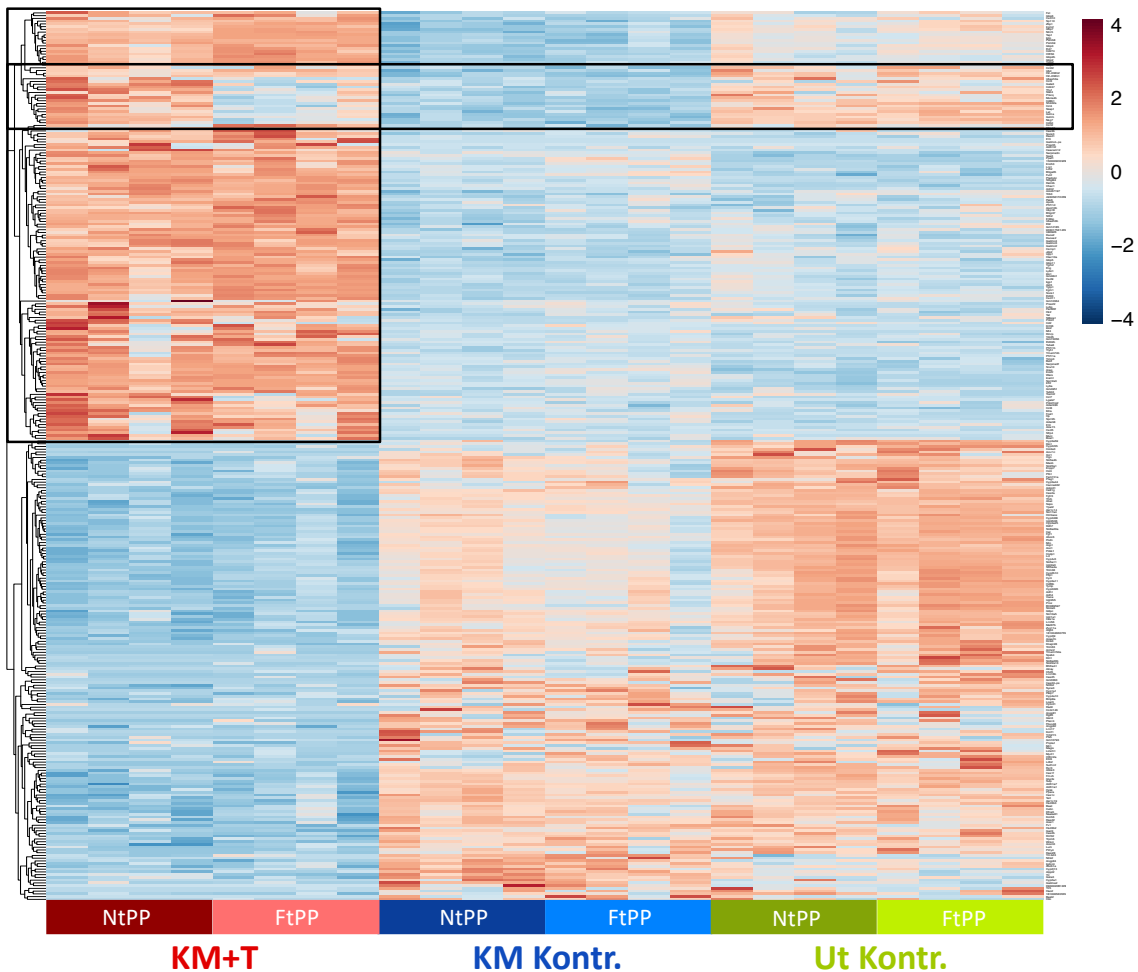


Abbildung 19: Heatmap RNAseq KM+T vs. KM Kontrolle vs. Ut Kontrolle: Dargestellt sind alle differenziell exprimierte Gene mit einer FDR <10%, adj. p-Wert <0,05 und einer Log2FC >2 für den Vergleich KM+T vs. KM Kontrolle. Die normalisierten Expressionswerte der Gene sind farblich skaliert nach dem Z-Score dargestellt. Die Spalten zeigen die Gruppen KM+T, KM Kontrolle und Ut Kontrolle (je 4 Mäuse) mit den jeweiligen *Lamina Propria* Bereichen nahe (NtPP, dunkel) und weit entfernt (FtPP, hell) der PP.

4.6.1. Vergleich der Transkriptionsprofile der KM+T Gruppe und KM Kontrollgruppe

Mit einer Log2 *Fold Change* (KM+T vs. KM Kontrolle) von 6,7 zeigte sich in der KM+T Gruppe die Expression des Gens *Pla2g4c* am stärksten hochreguliert und im Vergleich zu den Kontrollgruppen etwa um das 100-fache erhöht (Abbildung 20). Auch die Gene *Socs1* (Log2FC 5,2), *Rtnlb* (Log2FC 5,2) und *Ly6a* (Log2FC 4,4) waren in der KM+T Gruppe deutlich erhöht exprimiert. Des Weiteren wurde innerhalb der KM+T Gruppe eine starke Hochregulierung des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 (*Ido1*; Log2FC 4,6) detektiert.

In der KM+T Gruppe konnten auch einige bekannte Faktoren der GvHD und der damit einhergehenden Immunreaktion, wie IFN- γ (*Ifng*; Log2FC 5,2) und die verbundenen IFN- γ -induzierten Proteine (*Iigp1*, *Igtp*; Log2FC 4,4 bzw. 4,2),

Ergebnisse

mit deutlich erhöhter Expression gefunden werden. Auch $\text{TNF-}\alpha$ (Tnf; Log_2FC 1,9) zeigte sich in der KM+T Gruppe stark erhöht, wurde jedoch kaum in der KM und Ut Kontrolle detektiert.

Eine weitere auffällige Hochregulierung einer Gruppe von Genen in der KM+T Gruppe war die der Gasdermine mit *Gsdmcl-ps* (Log_2FC 5,0), *Gsdmc2* (Log_2FC 4,6), *Gsdmc3* (Log_2FC 3,9) und *Gsdmc4* (Log_2FC 3,2). Lediglich das Gasdermin A2 (Log_2FC -2,77) zeigte sich im Vergleich zur KM Kontrolle in der KM+T Gruppe vermindert exprimiert.

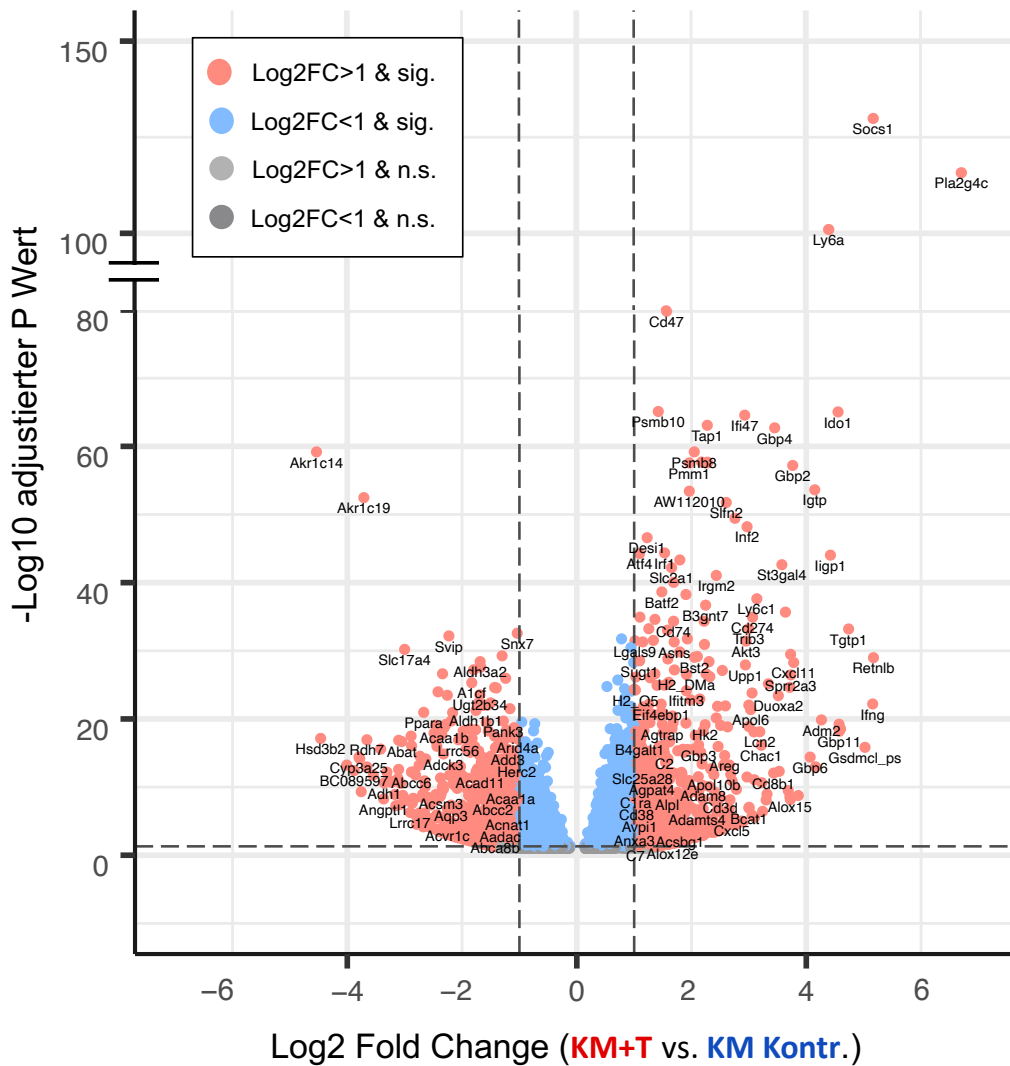


Abbildung 20: Vergleich der RNAseq-Transkriptionsprofile der KM+T vs. KM Kontrollgruppe in einem Vulkanplot. Dargestellt sind alle differenziell exprimierten Gene des Vergleiches KM+T vs. KM Kontrolle mit einer $\text{FDR} < 10\%$. Die eingezeichneten Grenzwerte entsprechen einem adjustierten p -Wert $< 0,05$ und einer $\text{Log}_2 \text{Fold Change} > 1$ (2fach gesteigert). $\text{Log}_2\text{FC} = \text{Log}_2 \text{Fold Change}$; sig. = signifikant (adj. p -Wert $< 0,05$); n.s. = nicht signifikant (adj. p -Wert $> 0,05$).

4.6.1.1. Oberflächenmarker und Zelltypen der intestinalen aGvHD

Zur Analyse der Zellen, welche im Rahmen der intestinalen aGvHD bedeutsam sind, wurden die RNAseq Daten im Hinblick auf Oberflächen- und Zellmarker untersucht. Der Vergleich der Transkriptionsprofile der GvHD entwickelnden KM+T Gruppe und der KM Kontrolle konnte insbesondere eine starke Expression von Thy1 (CD90; Log₂ FC KM+T vs KM 2,8) und Untereinheiten des T-Zell Korezeptors CD3 (CD3d; CD3z; CD3e; CD3g Log₂FC 2,5; 2,4; 1,2; 1,0) innerhalb der KM+T Gruppe nachweisen (Abbildung 21, S. 60). Weiterhin konnte auch eine vermehrte Expression von CD8b (Log₂FC 3,4), was insbesondere von zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird, innerhalb der KM+T Gruppe gefunden werden. Auch die Granzyme Gzma (Log₂FC 2,4), Gzmb (Log₂FC 3,0), Gzmk (Log₂FC 1,8), sowie NKG7 (Log₂FC 2,1) und FasL (Log₂FC 1,7), welche vor allem von zytotoxischen T-Zellen und NK Zellen exprimiert werden, zeigten eine vermehrte Expression innerhalb der KM+T Gruppe. In der Ut Kontrolle, nicht aber in der KM Kontrolle, konnte ebenfalls eine gewisse Expression an CD90, CD3, CD8b, Granzymen, NKG7 und FasL, nachgewiesen werden. Im Vergleich zu CD8 zeigte CD4 (Log₂FC 0,7) nur eine leicht erhöhte Expression in der KM+T Gruppe.

Weiterhin waren insbesondere die Transkriptionsfaktoren des T_H1 Subtyps wie T-bet (Tbx21; Log₂FC 1,9) und STAT4 (Log₂FC 2,3) in der KM+T Gruppe deutlich erhöht. Auch der Interleukin-12 Rezeptor (Il12rb1; Log₂FC 1,6), welcher maßgeblich die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu T_H1 Zellen fördert, wurde in der KM+T Gruppe und Ut Kontrolle vermehrt exprimiert. Neben dem bereits erwähnten T_H1 Transkriptionsfaktor T-bet zeigte sich mit GATA3 (Log₂FC 2,6) auch ein bedeutender Transkriptionsfaktor des T_H2 Phänotyps in der KM+T Gruppe deutlich hochreguliert. Allerdings wird GATA3 beispielsweise auch von Blutgefäßen exprimiert und andere T_H2 typische Transkriptionsfaktoren wie DEC2 (BHLHE41; Log₂FC -3,2) und MAF (Log₂FC -0,9) wiesen eine deutliche Herunterregulierung im Vergleich zur KM Kontrolle auf. Interleukin-4 Rezeptor (il4ra; Log₂FC 1,3), sowie das T_H2 Zytokin Interleukin-13 (Il13; Log₂FC 3,7), wurden jedoch wiederum vermehrt in der KM+T Gruppe exprimiert. Sowohl GATA3 des T_H2 Typs als auch STAT4 und T-bet des T_H1 Typs wiesen eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der KM+T Gruppe auf und zeigten auch in der Ut Kontrolle eine gewisse Expression. Dagegen zeigte der für den T_H17 Subtyp bedeutende Transkriptionsfaktor ROR γ t (Rorc; Log₂FC -1,5) und Ahr (Log₂FC -0,5), welcher sowohl von T_H17 als auch T_H22 Zellen exprimiert wird, eine niedrigere Expression in der KM+T Gruppe im Vergleich zur KM und Ut Kontrolle.

Ergebnisse

Des Weiteren wurde auch das SLAM assoziierte Protein SAP (Sh2d1a; Log₂FC 1,6) in der KM+T Gruppe vermehrt exprimiert. SAP wird, wie das in der KM+T Gruppe ebenfalls erhöhte SLAMF1 (Log₂FC 1,9), unter anderem von NK1.1⁺ NK T und CD4⁺ folliculären T-Helferzellen exprimiert. Auch zeigte sich in der KM+T Gruppe eine vermehrte Expression von NKG2GD (KLRK1; Log₂FC 1,4) und CD160 (Log₂FC 1,0), welche sich sowohl auf NK Zellen, NK T-Zellen als auch auf aktivierten CD8 T-Zellen finden. CD160 wird zudem auch von intraepithelialen Lymphozyten exprimiert.

Auch die Alpha Kette des Interleukin-2 Rezeptors (CD25; Log₂FC 3,3) zeigte eine deutlich erhöhte Expression innerhalb der KM+T Gruppe. GITR (Tnfrsf18; Log₂FC 1,6), CTLA4 (Log₂FC 1,2; n.s.) und Interleukin-10 (Il10; Log₂FC 3,1) wurden ebenfalls innerhalb der KM+T Gruppe vermehrt exprimiert, wenngleich keine Expression des spezifischen regulatorischen T-Zelltranskriptionsfaktors FOXP3 detektiert werden konnte. Weitere typische Transkriptionsfaktoren, wie FOXO3 (Log₂FC -1) für natürliche regulatorische T Zellen, sowie SMAD2 und SMAD3 (Log₂FC -0,5 bzw. -0,9) für induzierbare regulatorische T Zellen waren im Vergleich zur KM Kontrolle sogar erniedrigt.

In der KM+T Gruppe zeigte sich eine vermehrte Expression von CD44 (Log₂FC 0,9) sowie des Interleukin-15 Rezeptors (Il15r; Log₂FC 1,5), ohne jedoch den für Effektor Memory T-Zellen typischen Transkriptionsfaktor BLIMP1 nachweisen zu können. Als Hinweis auf naive T-Zellen zeigten sich in der KM+T Gruppe nur der Chemokinrezeptor CCR7 (Log₂FC 1,6), sowie der für naive CD8 T-Zellen typische Transkriptionsfaktor RUNX3 (Log₂FC 0,9) erhöht. Dabei wird CCR7 unter anderem auch von aktivierten dendritischen Zellen exprimiert. Der für naive CD4 T-Zellen typische Transkriptionsfaktor THPOK konnte hingegen nicht detektiert werden.

Als weiterer Oberflächenmarker konnte Ly6G (Log₂FC 2,4) als Marker für neutrophile Granulozyten mit deutlich erhöhter Expression in der KM+T Gruppe nachgewiesen werden. Auch der Oberflächenmarker Ly6C (Log₂FC 3,1), welcher sowohl von nicht patrollierenden klassischen Monozyten als auch Effektor sowie Memory T-Zellen und Neutrophilen exprimiert wird, zeigte sich in der GvHD deutlich vermehrt exprimiert. Weiterhin zeigten sich auch die für Monozyten typischen Oberflächenmarker Fcγ-Rezeptor III (CD16/FCGR3; Log₂FC 0,6) und Fcγ-Rezeptor II (CD32/FCGR2 Log₂FC 1,1) in der KM+T Gruppe erhöht. In der KM+T Gruppe konnte zudem eine vermehrte Expression von KLF2 (Log₂FC 1,2) und CEBPB (Log₂FC 0,8) detektiert werden, welche vor allem als Transkriptionsfaktoren von Ly6C- nicht-

Ergebnisse

klassischen Monozyten bedeutsam sind. Andere klassische Monozyten Marker wie CD11b und CD115 konnten nicht detektiert werden. Sialophorin (CD43; Log₂FC 1,9), welches sich auf der Oberfläche von T-Zellen, Monozyten und Granulozyten findet, war ebenso wie CD14 (Log₂FC 0,9) als Marker für Monozyten und Makrophagen in der KM+T Gruppe hochreguliert. Unter den allgemeinen Makrophagen-Markern zeigte sich in der KM+T Gruppe lediglich eine leicht erhöhte Expression von CD68 (Log₂FC 0,5), wohingegen F4/80 sowie CD64 nicht detektiert werden konnte und MerTK (Log₂FC -1,1) im Vergleich zur KM Kontrolle sogar vermindert exprimiert wurde. Allerdings konnten einige Transkriptionsfaktoren und Marker der Makrophagen Subtypen M1, wie IRF5 (Log₂FC 1,0), Interleukin-1 β (Il1b; Log₂FC 1,3), TLR2 (Log₂FC 1,1) und SOCS3 (Log₂FC 2,1), sowie des Subtyps M2, wie MRC1 (Log₂FC 1,9), ARG1 (Log₂FC 1,7) und CD163 (Log₂FC 1,7), in der KM+T Gruppe mit deutlich erhöhter Transkriptionsrate gefunden werden.

Die Genexpression des Transkriptionsfaktor IRF 8 (Log₂FC 1,6) sowie der Oberflächenmarker Ly6C (Log₂FC 3,1) und CD317 (BST2; Log₂FC 2,1) als Marker für plasmazytoide dendritische Zellen war in der KM+T Gruppe stark erhöht. Typisch für konventionelle dendritische Zellen vom Typ 1 zeigten sich die Transkriptionsfaktoren IRF8 (Log₂FC 1,6), NFIL3 (Log₂FC 1,3) und BATF3 (Log₂FC 1,9) in der KM+T Gruppe vermehrt exprimiert. CLEC10A (Log₂FC 2,7) als Marker für konventionelle dendritische Zellen vom Typ 2 wies ebenfalls eine vermehrte Expression in der KM+T Gruppe auf. Weitere typische Marker für dendritische Zellen wie beispielsweise CD11c konnten nicht detektiert werden. In der KM+T Gruppe wurden eine Reihe von MHC-II Genen wie H2-DMb1 (Log₂FC 2,2), H2-DMb2 (Log₂FC 2,1), H2-DMA (Log₂FC 1,9), H2-Ab1 (Log₂FC 1,6) verstärkt exprimiert gefunden. CD40 (Log₂FC 1,7) und CD40L (Log₂FC 1,4; n.s.) wurden beide vermehrt in der KM+T Gruppe exprimiert, wobei die Ut Kontrolle nur mäßige und die KM Kontrolle kaum eine Expression dieser Marker zeigte.

Als Zeichen der Antiinflammation und Gegenregulation zeigte sich in der KM+T Gruppe eine vermehrte Expression von Interleukin-10 (Il10; Log₂FC 3,1) und PD-L1 (CD274; Log₂FC 3,1). Neben Interleukin-10 zeigte auch Interleukin-13 (Il13; Log₂FC 3,7) in der KM+T Gruppe eine starke Expression, wohingegen die KM und Ut Kontrolle unauffällig blieb. Unter den Zytokinen konnte weiterhin auch eine vermehrte Expression des Interleukin-21 Rezeptors (Il21r; Log₂FC 1,6) in der KM+T Gruppe detektiert werden. Dieser zeigte nicht nur eine auffällige Verteilung innerhalb der KM+T Gruppe, sondern wurde auch in der Ut Kontrolle exprimiert. Auch die Gamma Kette des

Ergebnisse

Interleukin-2 Rezeptors (CD132; Log₂FC 1,4) zeigte eine deutliche Expression in der KM+T Gruppe und Ut Kontrolle. Interleukin-1 α (Il1a; Log₂FC 1,6), welches entscheidend an der akuten Phase einer Entzündung beteiligt ist, zeigte eine deutliche Expression in der KM+T Gruppe und Ut Kontrolle, nicht jedoch in der KM Kontrolle. Der ebenfalls in der KM+T Gruppe erhöhte Interleukin-1 Rezeptor II (Il1R2; Log₂FC 1,8) fungiert als Decoy-Rezeptor, indem er Interleukin-1 α und Interleukin-1 β bindet und somit die Bindung und Signaltransduktion über ihren regulären Rezeptor verhindert. Auch das vor allem von T_H17 Zellen produzierte proinflammatorische Interleukin-17 (Il17d; Log₂FC 1,5) wurde innerhalb der KM+T Gruppe vermehrt exprimiert.

Zudem soll an dieser Stelle die vermehrte Expression zahlreicher kostimulatorischer Marker innerhalb der KM+T Gruppe hervorgehoben werden. So waren insbesondere Gene der TNF Rezeptor Superfamilie wie CD27 (TNFRSF7, Log₂FC 1,1), OX40 (TNFRSF4, Log₂FC 1,7) und 4-1BB (TNFRSF9, Log₂FC 1,9) in der KM+T Gruppe in Ihrer Expression deutlich hochreguliert (Abbildung 24, S 66). CD27 wurde innerhalb der KM+T Gruppe vor allem in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP exprimiert (s. Abschnitt 4.6.2.1). Im Gegensatz hierzu zeigten Ox40 und 4-1BB eine gleichmäßige Expression in der KM+T Gruppe. CD27 zeigte auch eine gleichmäßige Expression in der Ut Kontrolle, wohingegen Ox40 und 4-1BB sowohl in der KM als auch der Ut Kontrolle nur vereinzelt exprimiert wurde. Von den zugehörigen Liganden konnte nur 4-1BB Ligand (TNFSF9, Log₂FC 1,3) mit einer signifikant erhöhten Expression detektiert werden.

Weiterhin zeigte auch das Zelladhäsionsmolekül und kostimulatorischer Marker CD2 (Log₂FC 3,1) eine deutliche Expression in der KM+T Gruppe, wohingegen sonst nur die Ut Kontrolle eine leichte Expression hiervon aufwies. Auffällig war auch hier das Verteilungsmuster innerhalb der KM+T Gruppe (s. Abschnitt 4.6.2.1). Auch der CD2 Bindungspartner CD48 (SLAMF2, Log₂FC 2,0) zeigte sich sowohl in der KM+T Gruppe als auch in der Ut Kontrolle mit hoher Expression bei annähernd negativer KM Kontrolle (Abbildung 24, S. 66).

Die Analyse der Oberflächenmarker und Zelltypen zeigt eine überwiegende Expression von T-Zellassozierten Genen während der akuten intestinalen GvHD. Dabei prädominieren insbesondere zytotoxische T-Zellen (T_C) und Typ1 T-Helferzellen (T_H1), wohingegen beispielsweise Typ2 und Typ17 T-Helferzellen (T_H2 bzw. T_H1) eine eher untergeordnete Rolle während der akuten intestinalen GvHD spielen.

Ergebnisse

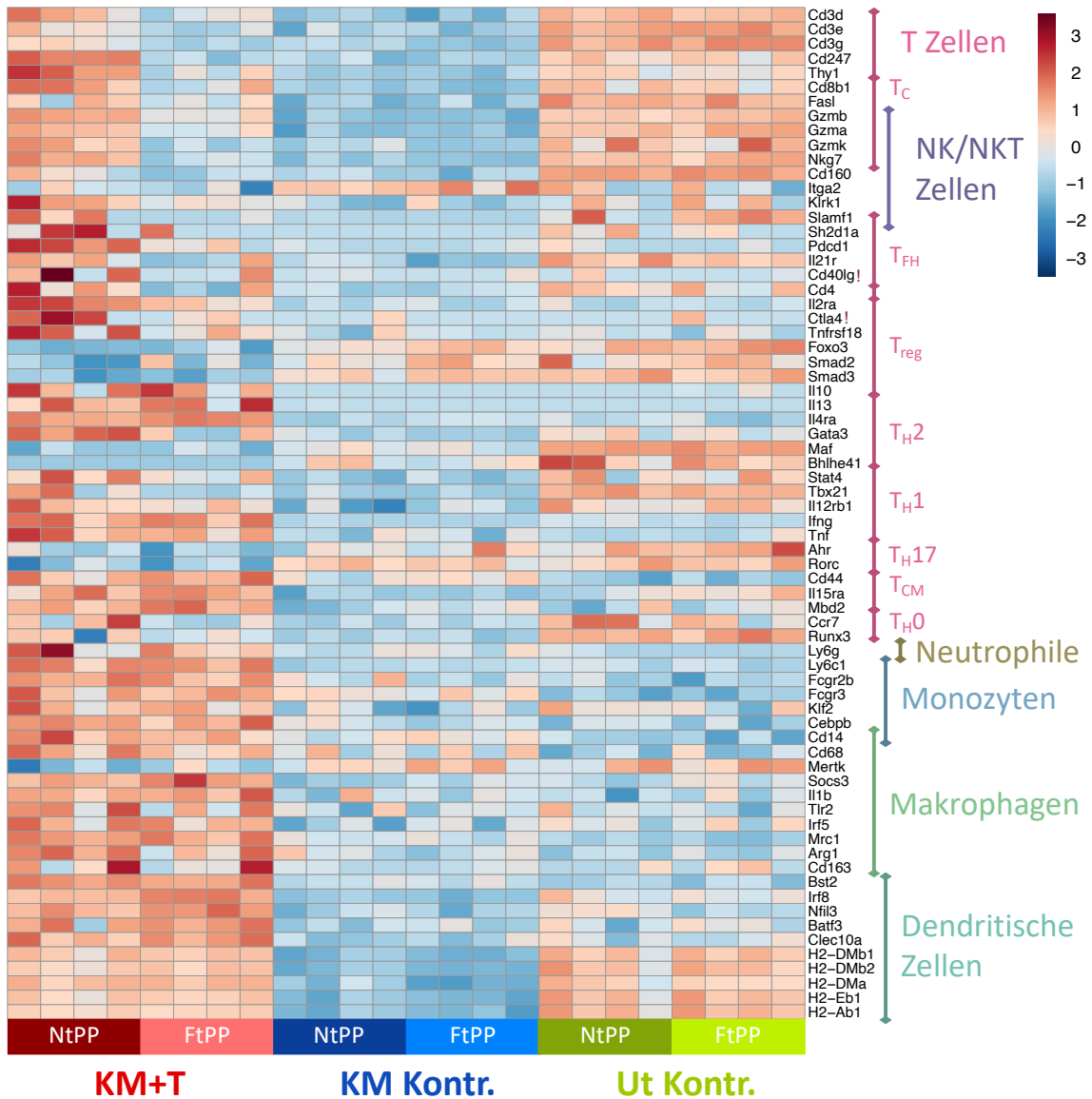


Abbildung 21: Oberflächenmarker und Zelltypen der intestinalen aGvHD. Dargestellt sind ausgewählte differentiell exprimierte Gene des Vergleiches KM+T vs. KM Kontrolle vs. Ut Kontrolle mit einer FDR<10%. Mit Ausnahme der markierten Gene (!) CD40lg und Ctla4 zeigten alle Gene einen adj. p-Wert <0,05 für den Vergleich KM+T vs. KM-Kontrolle. Innerhalb der experimentellen Gruppen sind jeweils die Expressionswerte nahe (NtPP; dunkel) und weit entfernt der PP (FtPP; hell) abgebildet. Die normalisierten Expressionswerte der Gene sind farblich skaliert nach dem Z-Score dargestellt. Die Visualisierung der Daten wurde ohne hierarchisches Clustering mit dem Programmpaket Pheatmap in R durchgeführt. Zytotoxische T-Zelle (T_c); folliculäre T-Helferzelle (T_{fh}); regulatorische T-Zelle (T_{reg}); T-Helferzelle Typ 1 (T_{H1}); T-Helferzelle Typ 2(T_{H2}); T-Helferzellen Typ 17 (T_{H17}); Zentrale Memory T-Zellen (T_{cm}); Naive T-Zellen (T_{H0}). Als Grundlage der Analyse diente unter anderem das Computermodell seq-ImmuCC (Chen, Quan et al. 2018).

4.6.1.2. Chemokine der intestinalen aGvHD

Zur Identifizierung von Chemokinen welche generell während der intestinalen GvHD exprimiert werden und somit eine Rolle im intestinalen T-Zell-Homing spielen könnten, wurden die Transkriptionsprofile der GvHD entwickelnden KM+T Gruppe mit denen der KM- und Ut-Kontrolle verglichen. Dabei konnten einige signifikant veränderte Chemokine detektiert werden, welche anhand ihres Transkriptionsprofils in fünf Cluster eingeteilt werden können (Abbildung 22). Das Chemokin CCL9 (Log₂FC KM+T vs. KM -1,3), welches sich relativ selektiv nur in der KM Kontrolle und mäßig in der KM+T Gruppe, jedoch nicht in der Ut Kontrolle exprimiert zeigte, bildet das erste Cluster.

Das zweite Cluster wird von den Chemokinen CCL28 (Log₂FC -1,4), CCL25 (Log₂FC -1,4), CCL6 (Log₂FC -0,9), sowie den Chemokinrezeptoren CXCR4 (Log₂FC -1,2) und CX3CR1 (Log₂FC -1,4) gebildet. Diese Chemokine beziehungsweise Chemokinrezeptoren wurden insbesondere in der Ut Kontrolle und mäßig auch in der KM Kontrolle, jedoch kaum in der KM+T Gruppe exprimiert.

Das dritte Cluster wird aus jenen Chemokinen und Chemokinrezeptoren gebildet, welche in der Ut Kontrolle und insbesondere in den *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP der KM+T Gruppe, nicht jedoch in der KM Kontrolle exprimiert wurden. Hierzu zählen neben den Chemokinrezeptoren CCR5 (Log₂FC 1), CCR9 (Log₂FC 1,1), CXCR6 (Log₂FC 1,2) und CCR7 (Log₂FC 1,6) auch die Chemokine CCL22 (Log₂FC 2,2), CCL5 (Log₂FC 0,5), CCL4 (Log₂FC 2,5) und CCL3 (Log₂FC 2,4).

Die Chemokine CXCL14 (Log₂FC 0,6), CXCL2 (Log₂FC 1,7), CCL7 (Log₂FC 2,3), CCL8 (Log₂FC 2,4), CCL11 (Log₂FC 1,7) und CCL17 (Log₂FC 1,3) sowie der Chemokinrezeptor CCR1 (Log₂FC 0,6) bilden das vierte Cluster. Dies ist durch eine hohe Expression in der KM+T Gruppe, insbesondere in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP, und einer nur sporadischen Expression in der KM Kontrolle und weniger noch in der Ut Kontrolle, charakterisiert.

Die Chemokine des fünften Clusters zeigten eine gleichmäßig verstärkte Expression innerhalb der KM+T Gruppe, eine nur schwache Expression in der Ut Kontrolle und nahezu keine Expression in der KM Kontrollgruppe. Hierzu zählen CCL24 (Log₂FC 2,0), CXCL5 (Log₂FC 2,7), CX3CL1 (Log₂FC 0,8), CXCL10 (Log₂FC 2,7), CXCL11 (Log₂FC 3,8) und CXCL9 (Log₂FC 3,7).

Ergebnisse

Die vermehrte Detektion der Faktoren Selektin P Ligand (Selplg; Log2FC 1,5), des Interzellulären Adhensions Molekül 1 (ICAM-1; Log2FC 2,3), der Integrine $\beta 7$ (Itgb7; Log2FC 1,7) sowie des Integrins αL (Log2FC 0,8), welche neben Chemokinen das T-Zell-Homing im Rahmen der GvHD beeinflussen, werden in Abschnitt 4.6.2.2 behandelt.

Zusammenfassend sind insbesondere die in der KM+T Gruppe am stärksten hochregulierten Chemokine CCL3, CCL4 und CCL8 sowie CXCL5, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 hervorzuheben. Mit Ausnahme von CXCL5, welches chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt, sind diese Chemokine mitunter stark chemotaktisch für T-Zellen und können entsprechend bedeutende Faktoren für das intestinale T-Zell-Homing während der akuten intestinalen GvHD darstellen.

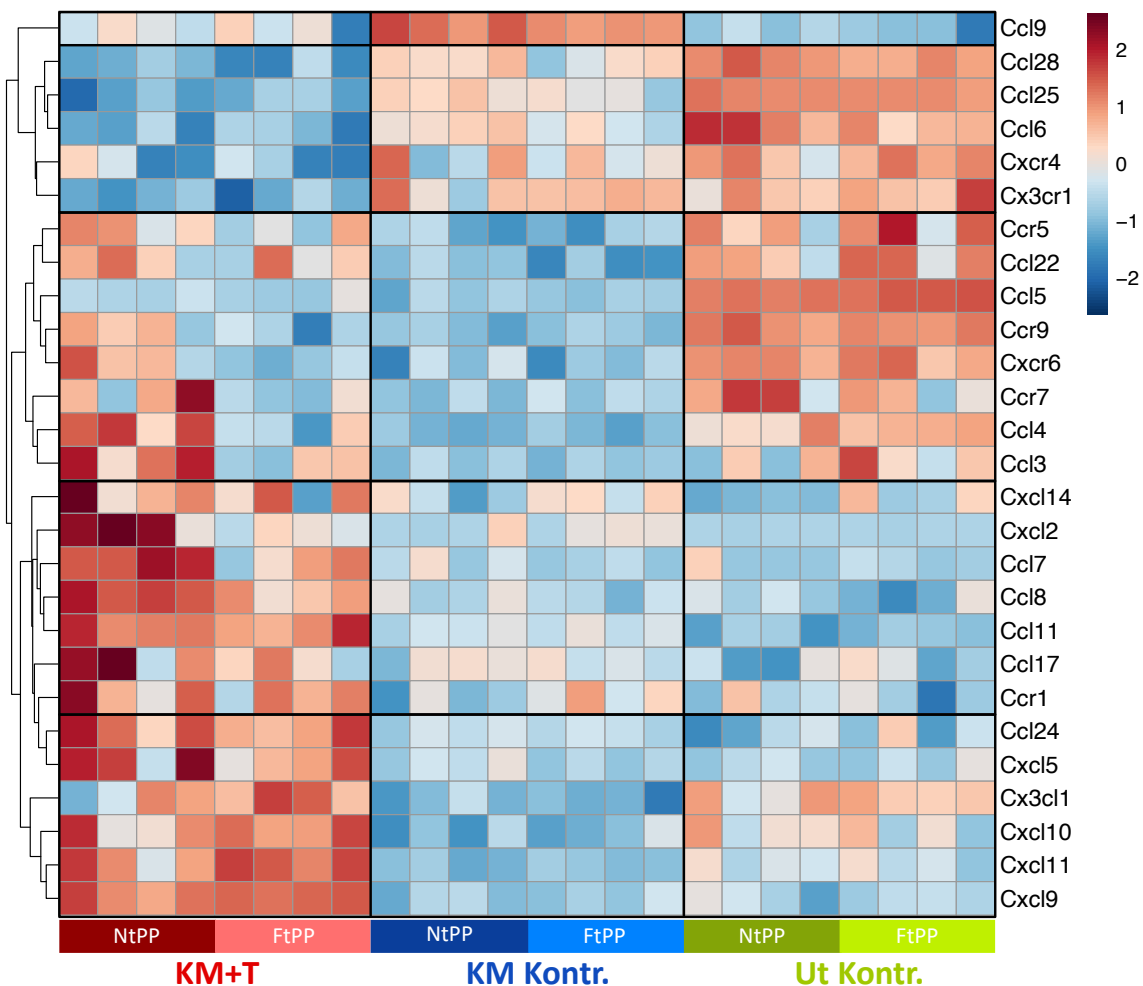


Abbildung 22: Chemokine der intestinalen akuten GvHD. Dargestellt sind alle Chemokine des Vergleiches KM+T vs. KM Kontrolle vs. Ut Kontrolle mit einer FDR <10% und adj. p-Wert <0,05. Die Spalten zeigen für jede experimentelle Gruppe KM+T, KM Kontrolle und Ut Kontrolle die einzelnen Replikate (je 4 Mäuse) mit den jeweiligen *Lamina Propria* Bereichen nahe (NtPP, dunkel) beziehungsweise fern der PP (FtPP, hell). Die normalisierten Expressionswerte der Gene sind farblich skaliert nach dem Z-Score dargestellt. Hierarchisches Clustering der Chemokine anhand der Expressionswerte und Visualisierung der Daten wurde mit dem Programmpaket Pheatmap in R durchgeführt.

4.6.2. Vergleich der Transkriptionsprofile zwischen *Lamina Propria* Bereichen nah und fern der PP während der aGvHD

Um Faktoren zu identifizieren die speziell für die direkte Migration von T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* von Bedeutung sind wurden die Transkriptionsprofile der *Lamina Propria* Bereiche nah (NtPP) und fern (FtPP) der PP innerhalb der KM+T Gruppe an Tag 4 nach allogener SZT miteinander verglichen. Dabei konnten bei einer FDR<10% insgesamt 142 differentiell exprimierte Gene detektiert werden (Abbildung 23).

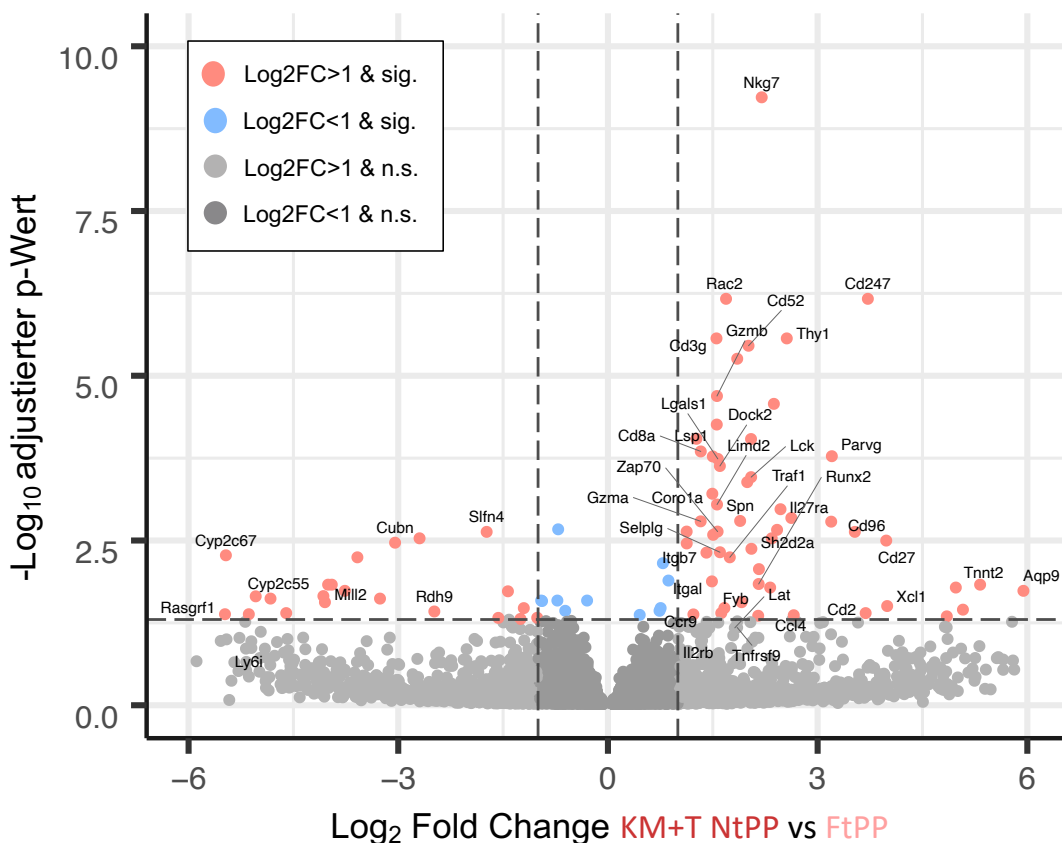


Abbildung 23: Vergleich der RNAseq-Transkriptionsprofile der KM+T NtPP vs. FtPP *Lamina Propria* Bereiche in einem Vulkanplot. Dargestellt sind alle Transkripte des Vergleichs der *Lamina Propria* Bereiche nah (NtPP) und fern (FtPP) der PP innerhalb der KM+T Gruppe mit einer FDR<10%. Die eingezeichneten Grenzwerte entsprechen einem adjustierten p-Wert <0,05 und einer Log₂ Fold Change (Log₂FC) >1. sig. = signifikant (adj. p-Wert <0,05); n.s. = nicht signifikant (adj. p-Wert >0,05).

4.6.2.1. Oberflächen- und Zellmarker nahe der Peyerschen Plaques

Die Analyse von Oberflächen- und Zellmarker während der akuten GvHD konnte eine deutlich höhere Expression T-Zellassoziierter Gene nahe der PP nachweisen (Abbildung 24, S. 66). So zeigten sich beispielsweise CD90 (Thy1; Log₂FC KM+T NtPP vs KM+T FtPP 2,3) und Untereinheiten des T-Zell Korezeptors CD3 (CD3z Log₂FC 3,0; CD3g Log₂FC 1,5; CD3d Log₂FC 1,5

Ergebnisse

n.s., CD3e Log2FC 1,3 n.s.) innerhalb der KM+T Gruppe in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP stärker exprimiert als in Bereichen mit weiter Entfernung zu diesen. Als Hinweis auf das dabei vorliegende Überwiegen eines CD8⁺ zytotoxischen T-Zell-Phänotyps kann die vermehrte Detektion von CD8a (Log2FC 1,3), der Granzyme K, B und A (Gzmk n.s., Log2FC 2,0; Gzmb Log2FC 1,5; Gzma Log2FC 1,3) sowie NKG7 (Log2FC 2,1) gesehen werden. Die Granzyme und NKG7 werden dabei, wie auch der Marker CD160 (n.s., Log2FC 1,5), neben zytotoxischen T-Zellen, auch von NK T-Zellen und NK Zellen exprimiert.

Zu den Genen, welche während der GvHD vor allem in direkter Nähe zu den PP stark hochreguliert waren, zählte insbesondere der Oberflächenmarker CD2 (Log2FC 2,5). Dieser findet sich als Zelladhäsionsmolekül und kostimulatorischer Faktor vor allem auf der Oberfläche von T-Zellen und NK Zellen. CD2 zeigte nur eine geringe Expression in der KM und Ut Kontrolle und wies keine deutlichen Expressionsunterschiede zwischen den *Lamina Propria* Bereichen nah und fern der PP innerhalb der Kontrollgruppen auf. Auch dessen Ligand CD48 (FDR>10%, n.s., Log2FC 1,0) wies eine, wenn auch nicht signifikant, höhere Expression nahe der PP auf.

Weiterhin zeigten auch die Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie CD27 (Tnfrsf7; Log2FC 2,4) und 4-1BB (Tnfrsf9/CD137; n.s., Log2FC 1,6) innerhalb der KM+T Gruppe eine deutlich erhöhte Expression in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP im Vergleich zu weit entfernt von diesen. Auch Ox40 (TNFRSF4, FDR>10%, n.s., Log2FC 1,0) und 4-1BBL (TNFSF9, FDR>10%, n.s., Log2FC 0,5) zeigten eine auffällige, wenn auch nicht signifikante, Verteilung innerhalb der KM+T Gruppe. 4-1BB zeigte eine selektive Expression für Bereiche nahe der PP in der KM+T Gruppe, wohingegen die KM und Ut Kontrolle unabhängig von der Entfernung zu den PP kaum eine Expression aufwies. CD27 dagegen zeigte neben der selektiven Expression in den *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP innerhalb der KM+T Gruppe nur in der Ut Kontrolle eine mäßige Expression, ohne aber einen Verteilungsgradienten aufzuweisen.

Wie CD27 zeigten auch die Oberflächenmarker CD96 (Log2FC 2,2) und CD52 (Log2FC 1,9) in der KM+T Gruppe eine selektive Erhöhung in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP. Dabei zeigte sich wie bei CD27 nur in der Ut Kontrolle eine gewisse Expression von CD96 und CD52, ohne jedoch eine auffällige Verteilung abhängig von der Entfernung zu den PP zu zeigen.

Ergebnisse

Auch weitere Zellmarker (s. Abschnitt 4.6.1.1), welche nicht den Grenzwert einer $FDR < 10\%$ erfüllten, zeigten dennoch eine auffällige Verteilung innerhalb der KM+T Gruppe (Abbildung 24) und sollen im Folgenden beschrieben werden. So zeigten die Marker KLRK1 ($FDR > 10\%$; n.s.; Log_2FC 1,3), SLAMF1 ($FDR > 10\%$; n.s.; Log_2FC 3,6) und SAP (Sh2d1a; $FDR > 10\%$; n.s.; Log_2FC 1,7), welche wie CD160 (s.o.) unter anderem von NK T-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und NK Zellen exprimiert werden, eine tendenziell höhere Expression nahe der PP. Auffällig war weiterhin, dass CD160 in der Ut Kontrolle relativ gleichmäßig exprimiert wurde und SLAMF1 innerhalb der Ut Kontrolle in weiterer Entfernung zu den PP sogar vermehrt exprimiert wurde. Die Marker SLAMF1 und SAP wurden, wie auch PD-1 (Pdc1, $FDR > 10\%$; n.s.; Log_2FC 2,5) und Interleukin-21 Rezeptor (Il21r; $FDR > 10\%$; n.s.; Log_2FC 1,2) mit einer tendenziell höheren Expression nah der PP detektiert. PD-1 wurde dabei sowohl in der KM Kontrolle als auch der Ut Kontrolle kaum exprimiert. Der Interleukin-21 Rezeptor zeigte eine gleichmäßige Expression innerhalb der Ut Kontrolle ohne Verteilungsgradienten.

Betrachtet man Marker, welche unter anderem auf regulatorischen T-Zellen exprimiert werden, wie CD25 (Il2ra; $FDR > 10\%$; n.s.; Log_2FC 2,1), CTLA4 ($FDR > 10\%$; n.s.; Log_2FC 2,6) und GITR (TNFRSF18; $FDR > 10\%$; n.s.; Log_2FC 1,5), so zeigten auch diese innerhalb der KM+T Gruppe nah der PP eine vermehrte Expression. Die typischen Transkriptionsfaktoren regulatorischer T-Zellen wie FOXO3, SMAD2 und SMAD3 wurden allerdings, wie in Abschnitt 4.6.1.1 beschrieben, in der KM+T Gruppe kaum detektiert.

Betrachtet man die Transkriptionsfaktoren T-bet (Tbx21, $FDR > 10\%$; n.s. Log_2FC 3,3) und STAT4 ($FDR > 10\%$; n.s., Log_2FC 1,1) der T_H1 - sowie GATA3 ($FDR > 10\%$; n.s. Log_2FC 2,1) der T_H2 -Zellen, so konnte für alle innerhalb der KM+T Gruppe eine höhere Expression nahe der PP beobachtet werden. Interessanterweise waren auch Marker, die auf das Vorliegen naiver T-Zellen hinweisen können, wie CCR7 ($FDR > 10\%$; n.s., Log_2FC 2,5) und RUNX3 ($FDR > 10\%$; n.s., Log_2FC 0,5), innerhalb der KM+T Gruppe nahe der PP vermehrt exprimiert worden. Auch der Interleukin-27 Rezeptor (Il27ra; $FDR < 10\%$, n.s., Log_2FC 2,0) wurde vermehrt nahe der PP exprimiert.

Zusammenfassend weist die RNA Sequenzierung auf eine Akkumulation von Markern für zytotoxische Spender T-Zellen (Thy1, CD3, CD8a, Granzyme, NKG7) in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP während der frühen intestinalen aGvHD hin. Zudem ist insbesondere die vermehrte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD2 und CD27 nahe der PP hervorzuheben.

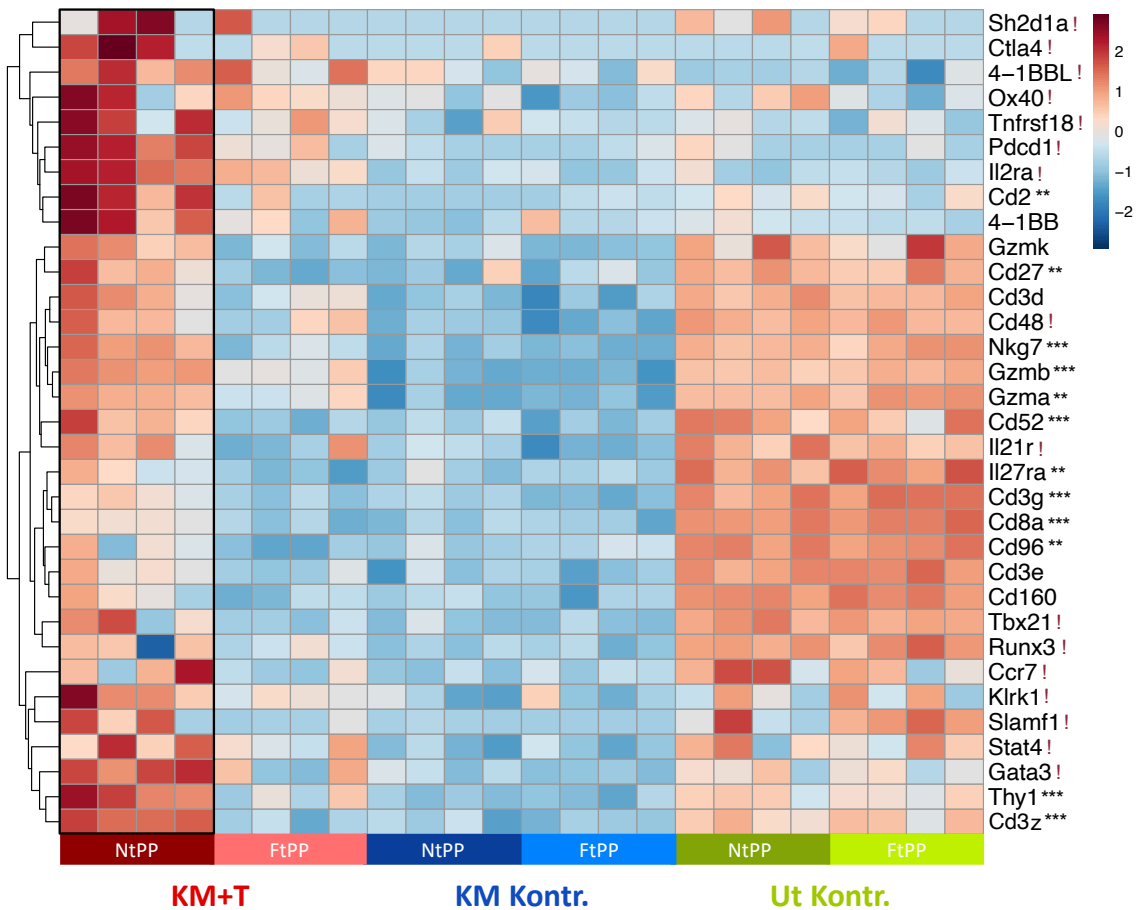


Abbildung 24: Oberflächen- und Zellmarker mit vermehrter Expression nahe der PP während der intestinalen aGvHD. Dargestellt ist die Expression ausgewählter Oberflächenmarker für die experimentellen Vergleichsgruppen KM+T, KM Kontrolle und Ut Kontrolle. Die Spalten zeigen für jede experimentelle Gruppe die einzelnen Replikate (je 4 Mäuse) mit den jeweiligen *Lamina Propria* Bereichen nahe (NtPP) und fern der PP (FtPP). Die normalisierten Expressionswerte der Gene sind farblich skaliert nach dem Z-Score dargestellt. Hierarchisches Clustering und Datenvisualisierung wurde mit dem Programmpaket Pheatmap in R durchgeführt. Alle extra markierten Gene (!) wiesen eine FDR>10% für den Vergleich KM+T NtPP vs. FtPP aber eine FDR<10% für den Vergleich KM+T vs. KM Kontrolle auf. Nicht markierte Gene wiesen eine FDR<10% für die Vergleiche KM+T vs. KM Kontrolle sowie KM+T NtPP vs. FtPP auf. Signifikanzniveau für den Vergleich KM+T NtPP vs. FtPP: ** adj. p-Wert<0,01; *** adj. p-Wert<0,001;

4.6.2.2. Aktivierungsmarker und migrationsfördernde Faktoren nahe der Peyerschen Plaques

Unter den differentiell exprimierten Genen für den Vergleich der *Lamina Propria* Bereiche nah und fern der PP innerhalb der KM+T Gruppe konnten auch zahlreiche Signaltransduktionsmoleküle gefunden werden. So wurden die Untereinheiten des CD3 Komplexes, allen voran CD3z (CD247; Log₂FC 3,0), innerhalb der KM+T Gruppe fast ausschließlich nahe der PP exprimiert. In der Ut Kontrolle dagegen zeigte die Expression von CD3z keine Abhängigkeit vom Abstand zu den PP. Auch die im weiteren T-Zellrezeptor Signaltransduktionsweg benötigten Kinasen Lck (Log₂FC 1,8) und ZAP70 (Log₂FC 1,4) sowie die Adaptermoleküle LAT (n.s., Log₂FC 1,5) und GRAP

Ergebnisse

(FDR>10%; n.s.; Log₂FC 1,3) zeigten innerhalb der KM+T Gruppe eine fast ausschließliche Expression nahe der PP. Im Gegensatz hierzu zeigten die genannten Gene in der Ut Kontrolle eine gleichmäßige Expression in der *Lamina Propria* und wurden in der KM Kontrolle nur minimal exprimiert.

Des Weiteren zeigten auch die dem LAT:GADS:SLP-76-Komplex nachgeschalteten Gene Fyb (ADAP; n.s.; Log₂FC 1,4), SKAP1 (FDR>10%, n.s.; Log₂FC 1,3), sowie die Rho GTPase Rac2 (Log₂FC 1,6) und zugehörige GTP-Austauscher und Regulationsfaktoren Dock2 (Log₂FC 1,5), Def6 (n.s.; Log₂FC 1,2), Rasgrp2 (Log₂FC 2,0) und Arhgdib (Log₂FC 1,4) ein ähnliches Expressionsmuster innerhalb der KM+T Gruppe. Während diese Gene innerhalb der KM+T Gruppe vermehrt in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP exprimiert wurden, zeigte sich in Bereichen mit größerem Abstand zu den PP und in der gesamten KM Kontrollgruppe dagegen nur eine geringe Expression. Wie auch die übrigen Gene des T-Zellrezeptorsignalweges wiesen auch diese Gene innerhalb der Ut Kontrolle eine gleichmäßige Expression ohne Hinweis auf einen Gradienten auf.

Darüber hinaus wurden auch Gene weiterer Signaltransduktionswege wie Parvin- γ (Parvg; Log₂FC 2,4) und Limd2 (Log₂FC 1,4) sowie die Aktin-bindenden Moleküle Coro1 α (Log₂FC 1,4) und L-Plastin (Lcp1; Log₂FC 0,8) innerhalb der KM+T Gruppe insbesondere in der *Lamina Propria* nahe der PP vermehrt exprimiert. Auch hier zeigte sich wiederum kaum eine Expression in Bereichen fern der PP oder in der KM Kontrolle und eine nahezu gleichmäßige Expression in der Ut Kontrolle.

Auch für einige Homingfaktoren wie Selektin P Ligand (Selplg; Log₂FC 1,5), Sialophorin (Spn/CD43; Log₂FC 1,7), LPAM-1/Integrin α 4 β 7 (Itgb7; Log₂FC 1,3) oder LFA-1/Integrin α L β 2 (Itgal; Log₂FC 1,3) konnte im Vergleich der Transkriptionsprofile zwischen *Lamina Propria* Bereichen nah und fern der PP innerhalb der KM+T Gruppe eine vermehrte Expression nahe der PP nachgewiesen werden. Von den Homingfaktoren zeigte nur Selektin P eine vereinzelte Expression innerhalb der KM Kontrolle, jedoch ohne Hinweis auf einen Gradienten und wies im Gegensatz zu den anderen genannten Genen eine nur sehr schwache Expression in der Ut Kontrolle auf.

Die einzigen auffällig verteilten Chemokine und Chemokinrezeptoren für den Vergleich der *Lamina Propria* Bereiche nahe und fern der PP innerhalb der KM+T Gruppe waren CCL4 (Log₂FC 1,7), XCL1 (n.s.; Log₂FC 1,9) und CCR9 (n.s.; Log₂FC 1,3). Die zugehörigen Partner CCR5 (FDR>10%, n.s.; Log₂FC 0,6), XCR1 (FDR>10%; n.s.; Log₂FC 0,1) und CCL25 (FDR>10%;

Ergebnisse

n.s.; Log2FC -0,5) waren nicht signifikant verändert. Die genannten Chemokine und Rezeptoren wiesen innerhalb der KM+T Gruppe eine vermehrte Expression nahe der PP auf, zeigten keine Expression in der KM Kontrolle und eine gleichmäßige Expression in der Ut Kontrolle. Die am stärksten veränderten Chemokine CCL4 und XCL1 werden unter anderem von T und NK Zellen, CCL4 aber auch von Neutrophilen, Epithel, Endothel und APCs exprimiert.

Zusammenfassend zeigt die RNA Sequenzierung die vermehrte Expression einer Vielzahl an Faktoren T-Zellrezeptorassoziierter Signalwege, wie CD3z, Zap70, Lck, Lat, Fyb in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP während der akuten GvHD. Darüber hinaus ist insbesondere die vermehrte Expression zahlreicher migrationsfördernder Faktoren wie Coro1 α , Parvin- γ , Dock2, Rac2 und Limd2 sowie des Chemokines CCL4 nahe der PP hervorzuheben.

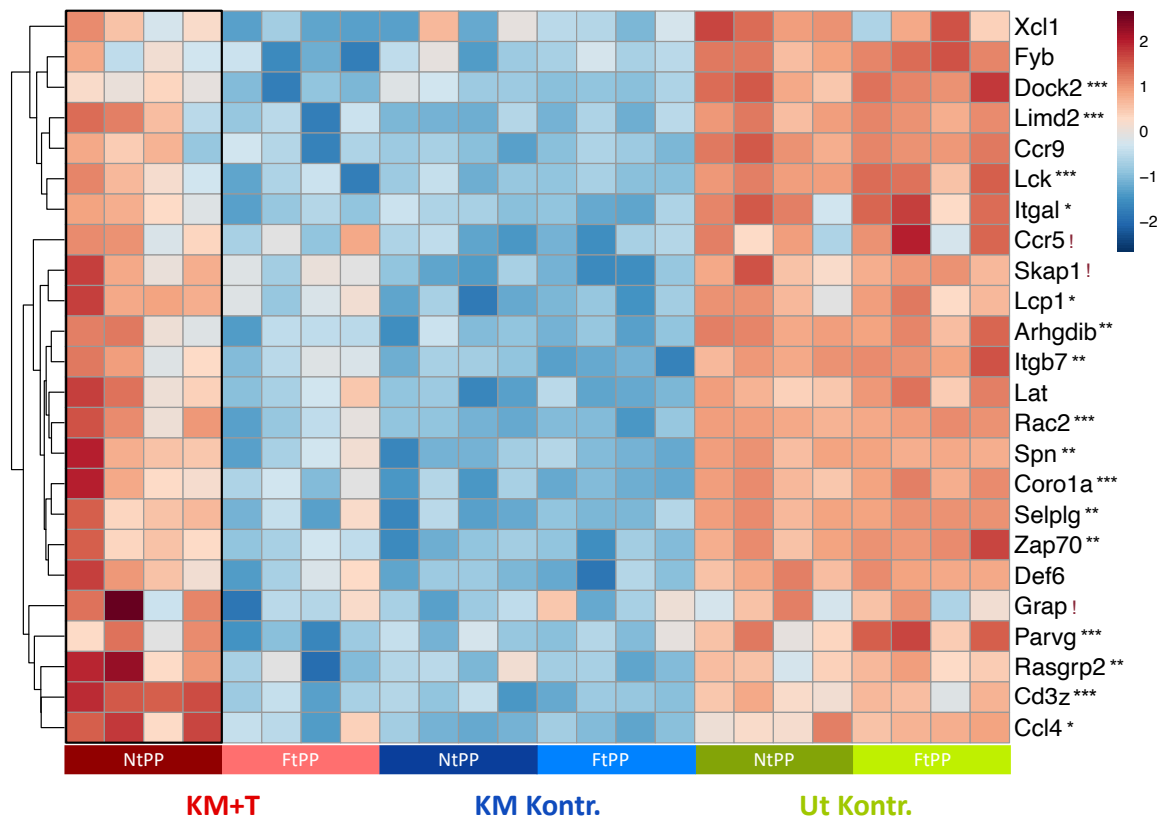


Abbildung 25: Aktivierungs-/Signaltransduktionsmoleküle und migrationsfördernde Faktoren der intestinalen aGvHD nahe der PP. Dargestellt ist die Expression ausgewählter Gene für die experimentellen Gruppen KM+T, KM Kontrolle und Ut Kontrolle. Die Spalten zeigen für jede experimentelle Gruppe die einzelnen Replikate (je 4 Mäuse) mit den jeweiligen *Lamina Propria* Bereichen nahe (NtPP) und fern der PP (FtPP). Die normalisierten Expressionswerte der Gene sind farblich skaliert nach dem Z-Score dargestellt. Hierarchisches Clustering anhand der Expressionswerte und Visualisierung der Daten wurde mit dem Programmpaket Pheatmap in R durchgeführt. Signifikanzniveau für den Vergleich KM+T NtPP vs. FtPP: * adj. p-Wert<0,05; ** adj. p-Wert<0,01; *** adj. p-Wert<0,001; Alle extra markierten Gene (!) wiesen eine FDR>10% für den Vergleich KM+T NtPP vs. FtPP aber eine FDR<10% für den Vergleich KM+T vs. KM Kontrolle auf. Nicht markierte Gene wiesen eine FDR<10% für die Vergleiche KM+T vs. KM Kontrolle sowie KM+T NtPP vs. FtPP auf.

4.7. Ergebnisse der Massenspektroskopie

Zur Validierung der RNAseq Ergebnisse auf Proteinniveau wurden Massenspektrometrie Analysen der lasermikrodissezierten, intestinalen Gewebeproben durchgeführt. Aufgrund der hohen Abundanz häufig exprimierter Proteine und der im Gegensatz zur RNA Sequenzierung fehlenden Möglichkeit der Amplifizierung, zeigte die Massenspektrometrie nur eine geringe Auflösung des Proteoms. Insgesamt zeigten sich nur 412 der insgesamt 3611 identifizierten Proteine signifikant verändert. Nach Adjustierung des p-Wertes zeigten sich jedoch bei einer FDR<1% keine Proteine mehr signifikant verändert. Die Daten wurden weiterhin als Box-plot Ausreißer betrachtet und die $Q1 - 1,5x/3x$ IQR bzw. $Q3 + 1,5x/3x$ IQR, welche im weiteren als IQR1,5 bzw. IQR3 bezeichnet werden, als Grenzwerte zur Einschätzung des Signifikanzniveaus gewählt (Abbildung 26).

Das innerhalb der GvHD entwickelnden KM+T Gruppe am stärksten exprimierte Protein war Pla2g4c (Log2 *Fold Change* KM+T vs. KM Kontrolle 5,7; IQR3). Pla2g4c war bereits in der RNA Sequenzierung eines der am stärksten veränderten Gene und zeigte auch auf Proteinebene eine deutlich höhere Expression in der KM+T Gruppe im Vergleich zur KM Kontrolle. Darüber hinaus konnten, wie auch in der RNA Sequenzierung, einige IFN- γ -assoziierte Proteine, wie die IFN- γ -induzierten GTPasen (Iigp1; Log2FC 1,9; IQR3 bzw. Igtp; Log2CF 1,8; IQR3), mit vermehrter Expression in der KM+T Gruppe detektiert werden. Interessanterweise zeigten sich auch die Rho-Guaninnukleotid Austauschfaktoren 2 (Arhgef2; Log2FC 2,0; IQR1,5) und 31 (Ect2/Arhgef31; Log2FC 3,4; IQR3) in der KM+T Gruppe deutlich vermehrt exprimiert. Auch die Serin/Threonin Protein Kinasen Pak4 (Log2FC 1,9; IQR3) und Akt1 (n.s.; Log2FC 1,9), welche beide mit der Rho GTPase Rac interagieren, zeigten eine erhöhte Expression in der KM+T Gruppe. Pak4 fungiert hierbei wie auch das Cdc42 Effektor Protein 4 (Cdc42ep4; n.s.; Log2FC 1,1) als Effektor der Proteine Cdc42 und Rac und verbindet die Signalkaskade der Rho GTPase Familie mit dem Zytoskelett. Sowohl Pak4 als auch Akt1 sind als Teil dieser Signalkaskade bedeutende Faktoren für die Zellmotilität.

Zusätzlich konnte auch für einige Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (Log2FC 0,9; IQR1,5), CEACAM-1 (Log2FC 0,9; IQR1,5), PECAM-1 (n.s.; Log2FC 1,3) und VCAM-1 (Log2FC 1,8; IQR3) eine vermehrte Expression in der KM+T Gruppe detektiert werden. Ein weiteres in der KM+T Gruppe vermehrt exprimiertes Protein war das Adaptermolekül Paxillin (Pxn; Log2FC

Ergebnisse

2,0; IQR3). Paxillin findet sich vor allem an Fokalkontakten und spielt bei der Adhärenz von Zellen an die Extrazellulär Matrix eine Rolle. Hierdurch wirkt Paxillin auch an der Protrusion des vorderen Zellpoles migrierender Zellen mit. Auch die bereits in der RNA Sequenzierung detektierte Indolamin-2,3-Dioxygenase (Ido1; Log₂FC 2,6; IQR3) war auf Proteinniveau in der KM+T Gruppe vermehrt exprimiert. Aufgrund der geringen Auflösung der Massenspektrometrie im Vergleich der laser-mikrodissezierten *Lamina Propria* Bereichen fern der PP zwischen den Gruppen KM+T und KM Kontrolle, wurde auf die Durchführung einer Massenspektrometrie zur Validierung der RNA Sequenzierungsergebnisse des Vergleiches der *Lamina Propria* Bereiche nah und fern der PP innerhalb der KM+T Gruppe auf Proteinebene verzichtet.

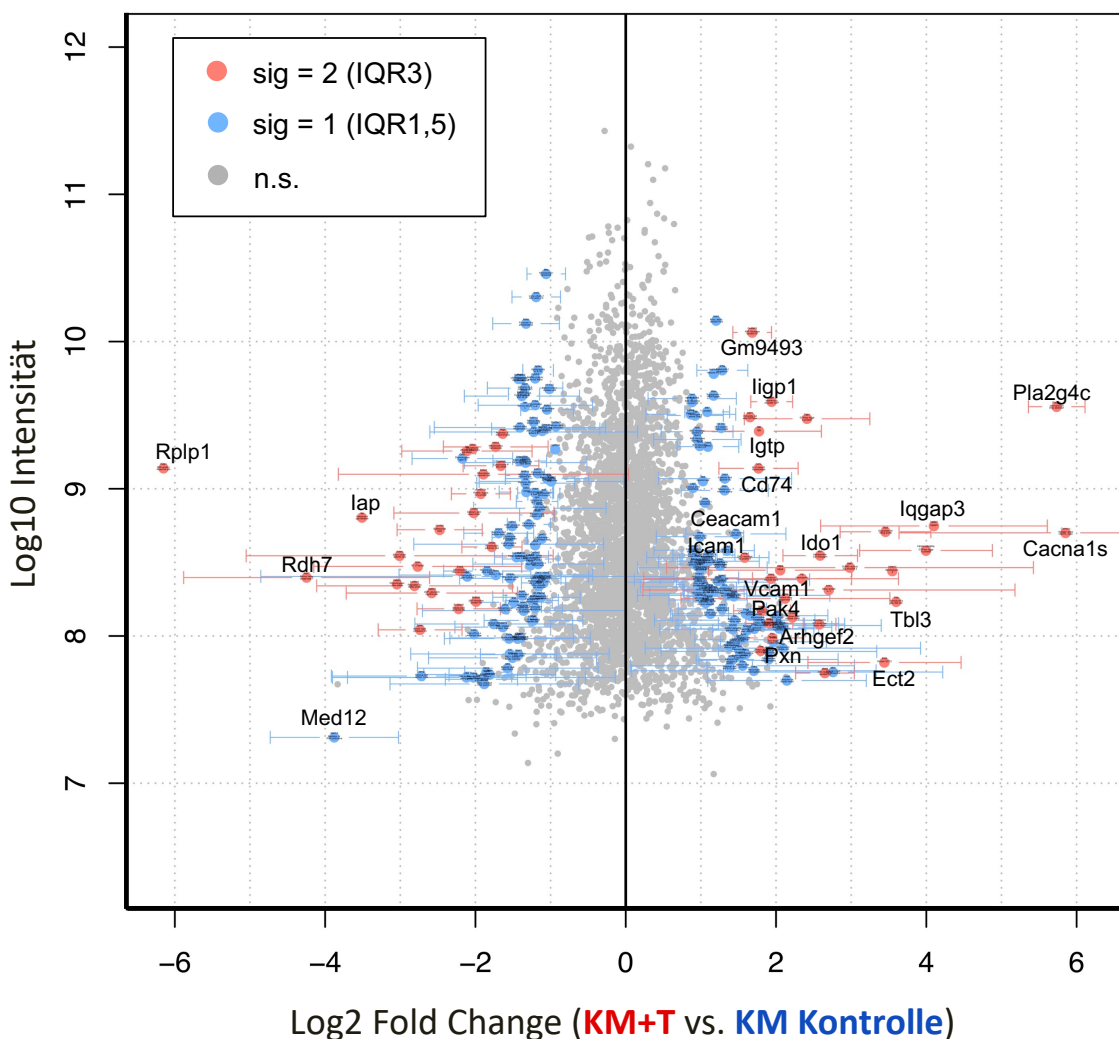


Abbildung 26: Darstellung der Massenspektrometrie Ergebnisse als Box-plot Ausreißer. Aufgetragen ist die Log₂ Fold Change der markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierungs-Intensitäten (LFQ-Intensität) der Proteine für den Vergleich KM+T vs. KM Kontrolle gegen den Log₁₀ der Intensität der detektierten Proteine. Zur Einschätzung des Signifikanzniveaus wurde das 1,5 bzw. 3-fache des Interquartilabstands (IQR) ober bzw. unterhalb des 1./3. Quartils als Grenzwert gewählt (s. Abschnitt 3.3.10.3).

4.8. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Validierung der tatsächlichen Expression der in der RNA Sequenzierung detektierten Gentranskripte, sowie zur Analyse der Kolo-kalisation und Koexpression dieser Proteine während der intestinalen aGvHD wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Zuerst wurden die Chemokine, welche der RNA Sequenzierung zu Folge eine bedeutende Rolle während der akuten intestinalen GvHD spielen, auf Proteinebene validiert.

Allen voran zeigten die IFN- γ -induzierten Chemokine, wie repräsentativ durch Immunfluoreszenzfärbung des Chemokins CXCL9 dargestellt, eine deutliche Expression während der akuten intestinalen GvHD (Abbildung 27). Die KM und Ut Kontrolle hingegen stellten sich komplett negativ für CXCL9 dar.

Auch die Expression von CCL4 während der akuten GvHD konnte in Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden. So zeigten nur die GvHD entwickelnden KM+T transplantierten Mäuse ein deutliches Immunfluoreszenzsignal für CCL4, wohingegen die Färbungen der KM und Ut Kontrolle negativ blieben. Auffällig für CCL4 zeigte sich insbesondere dessen Lokalisation in den Darmkrypten sowie die am ehesten einer parakrinen Funktion anmutende Expression im Darmlumen. Das unspezifische Binden der Antikörper wurde durch Negativ-Kontrollfärbungen überprüft (s. Abschnitt 3.3.13). Da diese Kontrollen für alle Chemokine negativ waren, sind sie im Folgenden nicht mit abgebildet.

Entgegen der RNA Sequenzierungsergebnisse, welche eine Herunterregulierung von CCL25 Transkripten während der GvHD detektierten, konnte in den Immunfluoreszenzfärbungen eine deutliche Expression von CCL25 in der intestinalen *Lamina Propria* während der akuten GvHD bestätigt werden. Hierbei zeigten nur die KM+T transplantierten GvHD entwickelnden Mäuse eine Expression, nicht jedoch die KM und Ut Kontrollgruppen.

Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte die in der RNA Sequenzierung detektierte vermehrte Expression der Chemokine CXCL9 und CCL4 auf Proteinebene validiert werden. Weiterhin zeigt CCL25, entgegen seines Transkriptionsprofils in der RNA Sequenzierung, eine deutliche Expression während der intestinalen akuten GvHD.

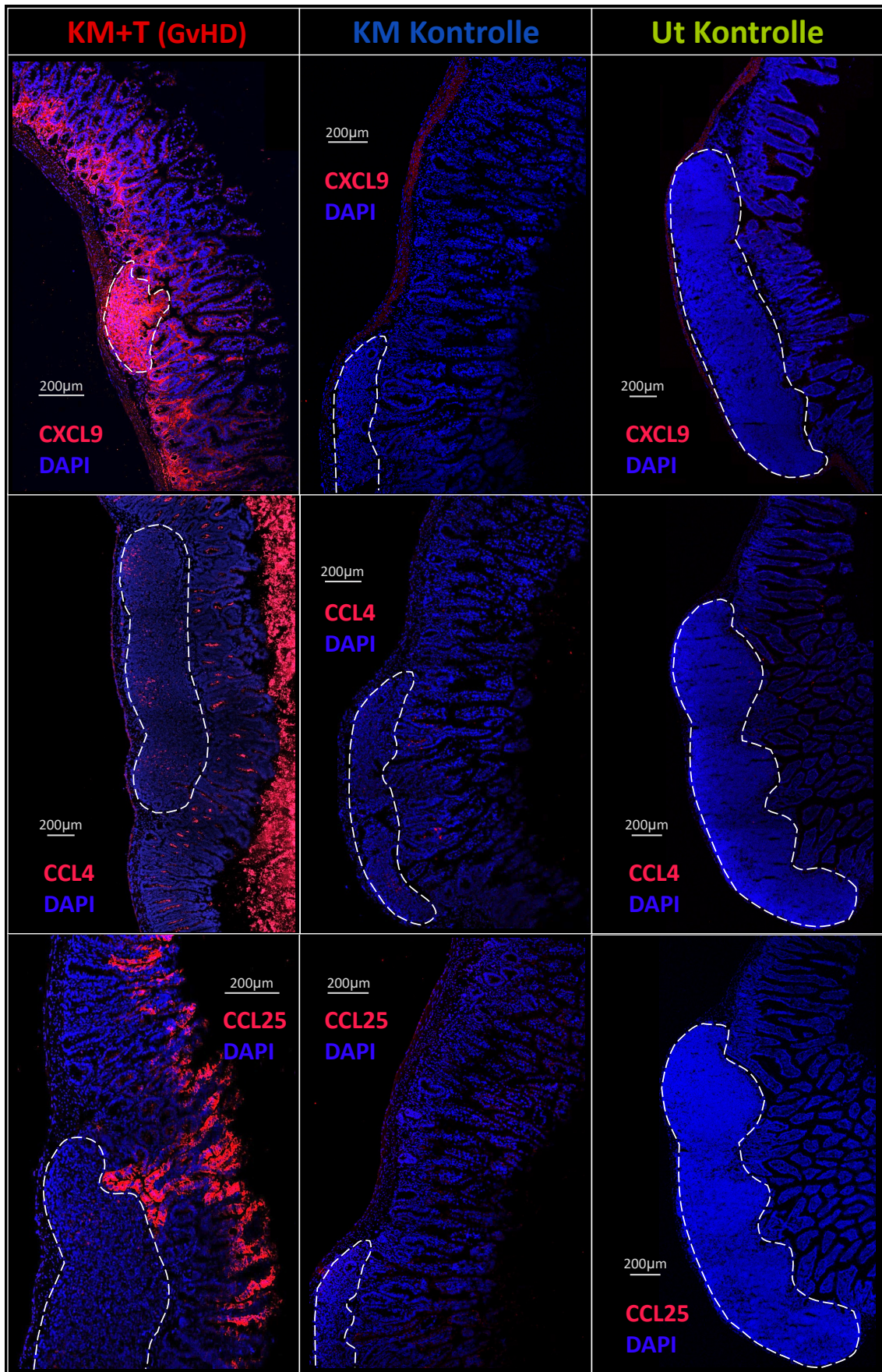


Abbildung 27: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen der Chemokine CXCL9, CCL4 und CCL25. Immunfluoreszenzfärbungen histologischer Dünndarmpräparate mit PP bzw. isolierten lymphatischen Follikeln (gestrichelte Umrandung) der experimentellen Gruppen KM+T (links), KM Kontrolle (mitte) und Ut Kontrolle (rechts) an Tag 4 nach allogener SZT. Mikroskopie unter 20x Vergrößerung.

Ergebnisse

Weiterhin wurde die Immunfluoreszenz auch genutzt, um die in der RNA Sequenzierung detektierten Oberflächenmarker zu überprüfen und deren Kollokalisation mit anderen Immunzellmarkern weiterführend zu analysieren.

Zuerst wurde der kongene Marker CD90.1 zur Identifizierung von Spender T-Zellen in der *Lamina Propria* der GvHD entwickelnden Mäuse an Tag 4 nach allogener SZT untersucht. Dabei konnte der bereits in Voruntersuchungen aufgefallene intestinale T-Zellgradient während der akuten GvHD, durch Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden (Abbildung 28). Die Spender T-Zellen zeigten hierbei eine deutlich höhere Zelldichte in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP mit einer rasch abnehmenden Dichte mit zunehmender Entfernung zu den PP. In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass dieser Gradient nur für die Frühphase der intestinalen GvHD, vor allem zwischen Tag 2,5 bis 4 nach allogener SZT, besteht. Mit dem Beginnen der Effektorphase der GvHD und der vermehrten Infiltration von T-Zellen über die Blutbahn in die intestinale *Lamina Propria* war der Gradient ab Tag 6 nach allogener SZT nahezu vollständig aufgehoben (Abbildung 16, S. 50).

Um die in der Frühphase der akuten GvHD nahe der PP vermehrt auftretenden Spender T-Zellen genauer zu phänotypisieren, wurden diese mit dem bereits in der RNA Sequenzierung vermehrt detektierten Markern CD8 β für zytotoxische T-Zellen und CD4 für T-Helferzellen gefärbt. Dabei zeigten die Kurvenverläufe für die Zellzahlen der CD90.1⁺CD8 β ⁺ beziehungsweise CD90.1⁺CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit der Entfernung zu den PP einen überwiegend CD8 β ⁺ zytotoxischen Phänotyp der Spender T Zellen nahe der PP an Tag 4 nach allogener SZT (Abbildung 28, A). Der prozentuale Anteil an CD8 β ⁺CD90.1⁺ Zellen unter den CD90.1⁺ Spender T-Zellen betrug circa 60% nahe der PP (Abbildung 28, B). Im Gegensatz hierzu zeigten nur knapp 36% der CD90.1⁺ Spender T-Zellen nahe der PP eine Koexpression von CD4 und damit einen T-Helferzell-Phänotyp. Mit zunehmender Entfernung zu den PP glich sich das Verhältnis von zytotoxischen T-Zellen zu T-Helferzellen mehr und mehr an und zeigte sogar eine, wenn auch geringe, Dominanz der T-Helferzellen ab einem Abstand von über 1000 μ m zu den PP.

Die Immunfluoreszenzfärbungen bestätigen die in der RNA Sequenzierung vermehrte Detektion T-Zellassoziierter Gene nahe der PP und zeigen einen deutlichen intestinalen Spender T-Zell-Gradienten. Dabei sind an Tag 4 nach allogener SZT die überwiegende Mehrzahl der Spender T-Zellen nahe der PP CD8 β ⁺ zytotoxische T-Zellen.

Ergebnisse

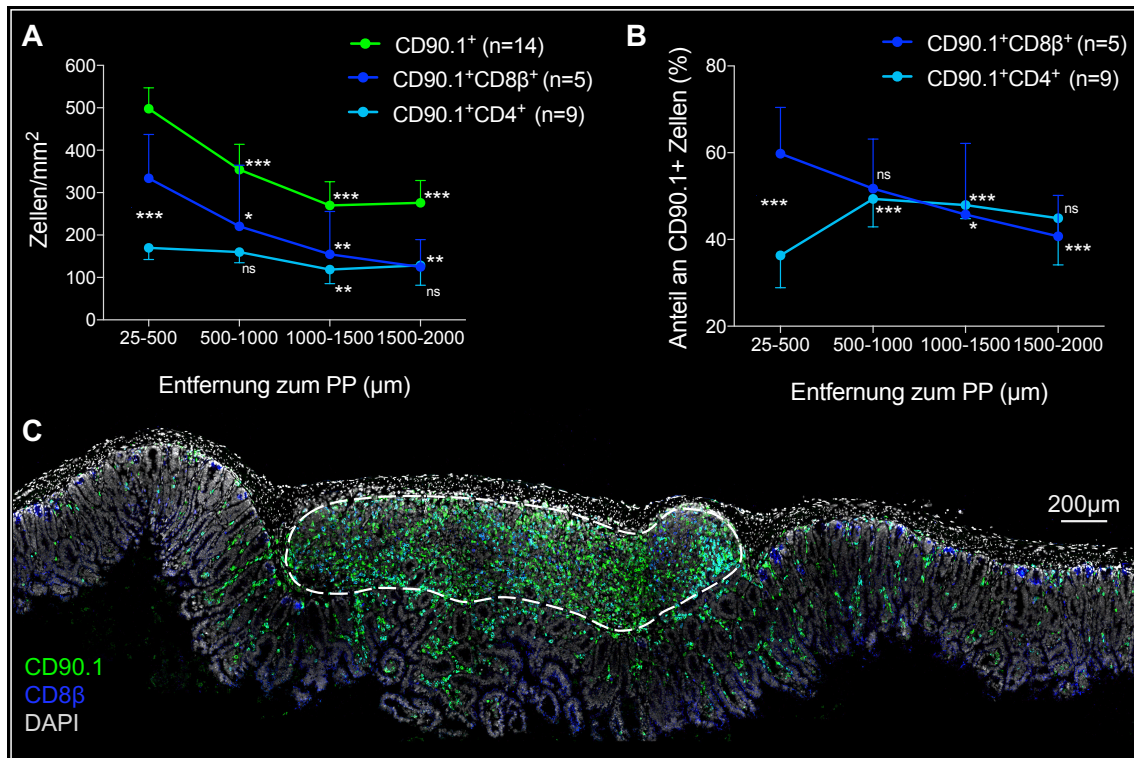


Abbildung 28: Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD90.1, CD4 und CD8β. (A) Anzahl positiver Zellen pro mm² *Lamina Propria*. (B) Anteil der CD90.1+ Zellen, welche auch CD8β+ bzw. CD4+ sind. (C) Repräsentative Darstellung einer Immunfluoreszenzfärbung eines PP (umrandet) tragenden histologischen Dünndarmpräparates als Grundlage der obigen Auswertung. Intestinale GvHD Tag 4 nach allogener SZT. Mann-Whitney-Test zum Vergleich CD4 vs. CD8β für den Bereich 25-500 µm, sowie CD4 bzw. CD8β des Bereichs 25-500 µm gegen die Bereiche mit weiter Entfernung zum PP. * p-Wert<0,05; ** p-Wert<0,01; *** p-Wert<0,001; n.s. nicht signifikant.

Weiterhin wurden auch die in der RNA Sequenzierung während der GvHD stark hochregulierten und insbesondere nahe der PP vermehrt exprimierten Oberflächenmarker CD2 und CD27 mittels Immunfluoreszenzfärbungen validiert. Auch für CD2 und CD27 konnte ein gradueller, jedoch nicht signifikant unterschiedlicher Verlauf in der intestinalen *Lamina Propria* nachgewiesen werden (Abbildung 29, A-C). Unter den CD90.1+ Spender T-Zellen innerhalb der PP exprimierte ein signifikant größerer Anteil CD27, wohingegen die *Lamina Propria* Bereiche nah und fern der PP nur eine tendenziell unterschiedliche anteilmäßige Expression hierfür aufwiesen. Im Vergleich hierzu blieb der Anteil an CD2+ Spender T-Zellen unabhängig von der Entfernung zu den PP annähernd gleich. Die Intensität von CD2 und CD27 und somit die Expressionsstärke dieser Oberflächenmarker stand nicht in Zusammenhang mit der Entfernung dieser zu den PP (Abbildung 29, E-F).

Zusammenfassend zeigen die Immunfluoreszenzfärbungen von CD27 und CD2 eine leichtgradig, wenn auch nicht signifikant erhöhte Anzahl an CD2+ und CD27+ Zellen nahe der PP. Weiterhin weist die Expressionsstärke von CD2 und CD27 auf Spender T-Zellen keinen graduellen Verlauf auf.

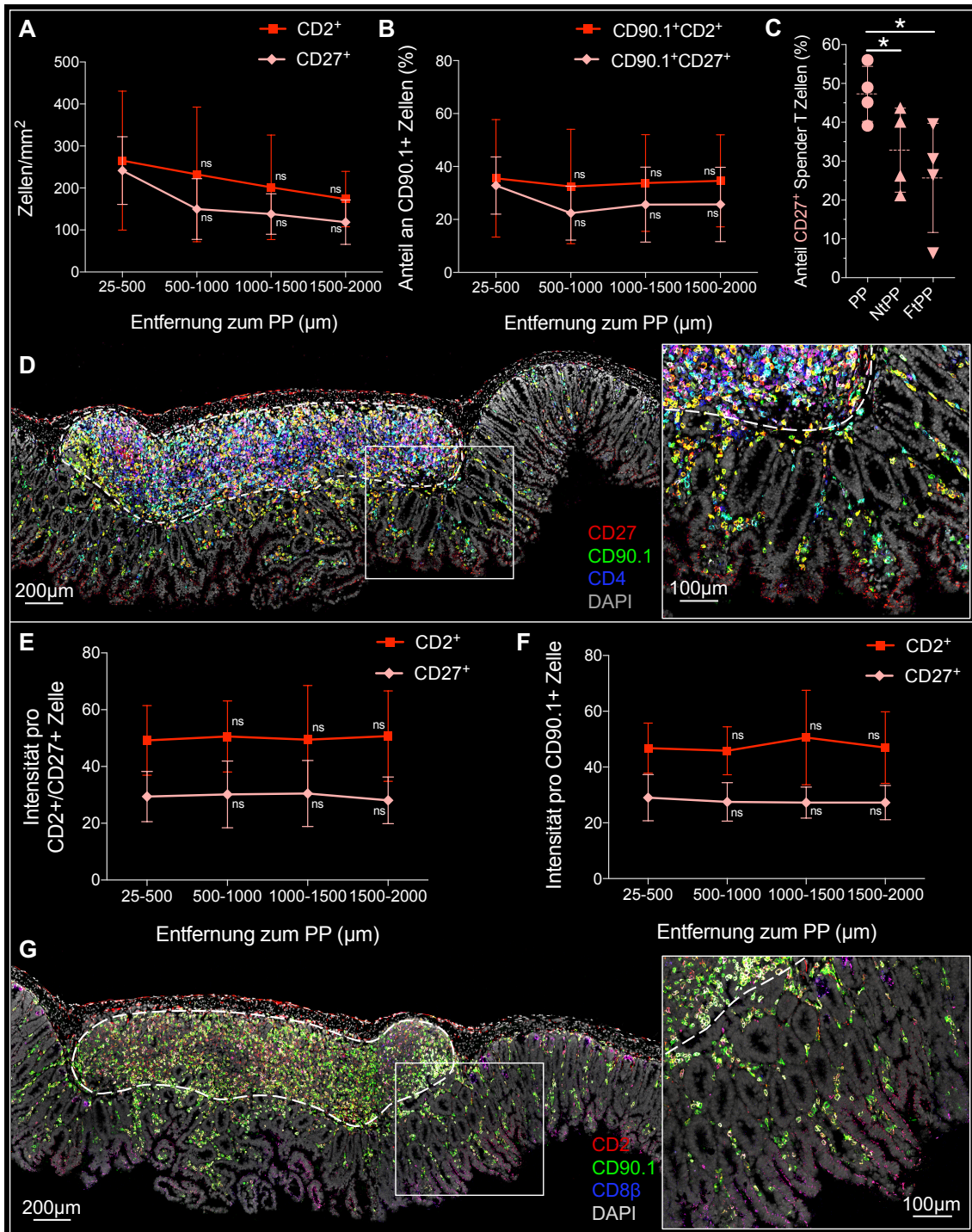


Abbildung 29: Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD2 und CD27. (A) Anzahl positiver Zellen pro mm² Lamina Propria (n=4). (B) Anteil an CD90.1⁺ Zellen der auch CD2⁺ bzw. CD27⁺ ist (n=3). (C) Anteil an CD90.1⁺CD27⁺ Spender T-Zellen innerhalb des PP, in den Bereichen nah (NtPP; <500 μm) und fern des PP (FtPP; >1500 μm) (n=4). CD2- bzw. CD27-Intensität auf CD2⁺ bzw. CD27⁺ Zellen (E; n=3) bzw. CD90.1⁺ Zellen (F; n=3). Repräsentative Darstellung von Immunfluoreszenzfärbungen eines PP (umrandet) tragenden histologischen Dünndarmpräparats für CD27 (D) bzw. CD2 (G) als Grundlage der Auswertung. Intestinale GvHD Tag 4 nach allogener SZT. Mann-Whitney-Test. * p-Wert<0,05; n.s. nicht signifikant.

Ergebnisse

Auch Marker der vermehrten Zellmotilität und Migration wie $\text{Coro1}\alpha$ und $\text{Parvin-}\gamma$ konnten durch Immunfluoreszenzfärbungen genauer untersucht werden (Abbildung 30). Dabei konnte die vermehrte Detektion der beiden Gene nahe der PP in der RNA Sequenzierung nicht durch eine erhöhte Anzahl exprimierender Zellen nahe der PP erklärt werden (Abbildung 30, A). Gleichfalls konnte auch unter den CD90.1^+ Zellen, welche in höherer Anzahl nahe der PP vorkommen, kein erhöhter Anteil an $\text{Coro1}\alpha^+$ und $\text{Parvin-}\gamma^+$ Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 30, B). So exprimierten nur 6% bzw. 4% der T-Zellen nahe der PP $\text{Coro1}\alpha$ bzw. $\text{Parvin-}\gamma$. Auch für die Expression von $\text{Coro1}\alpha$ bzw. $\text{Parvin-}\gamma$ auf $\text{Coro1}\alpha^+$ bzw. $\text{Parvin-}\gamma^+$ Zellen zeigte sich kein Unterschied in Abhängigkeit des Abstandes zu den PP (Abbildung 30, D). Dies lässt darauf schließen, dass auf Proteinebene vermutlich keine vermehrte Expression der Proteine $\text{Coro1}\alpha$ und $\text{Parvin-}\gamma$ pro Zelle vorliegt. Interessanterweise zeigte sich jedoch bei ausschließlicher Betrachtung der CD90.1^+ Spender T-Zellen eine tendenziell erhöhte Intensität und daher eine vermehrte Expression von $\text{Coro1}\alpha$ auf Spender T-Zellen nahe der PP im Vergleich zu T-Zellen in weiter Entfernung (Abbildung 30, E). Eine ähnliche Analyse für $\text{Parvin-}\gamma$ konnte aufgrund des geringen Anteils an $\text{Parvin-}\gamma^+$ Spender T-Zellen nicht durchgeführt werden.

Die Immunfluoreszenzfärbungen bestätigen die Expression von $\text{Coro1}\alpha$ und $\text{Parvin-}\gamma$ nahe der PP, wobei an Tag 4 nach allogener SZT nur ein geringer Anteil der Spender T-Zellen diese Proteine exprimiert. Obwohl die Intensität von $\text{Coro1}\alpha$ und $\text{Parvin-}\gamma$ auf $\text{Coro1}\alpha^+$ bzw. $\text{Parvin-}\gamma^+$ Zellen keinen graduellen Verlauf aufweist, kann die isolierte Betrachtung von CD90.1^+ $\text{Coro1}\alpha^+$ Zellen eine tendenziell höhere $\text{Coro1}\alpha$ Expression auf Spender T-Zellen nahe der PP nachweisen.

Ergebnisse

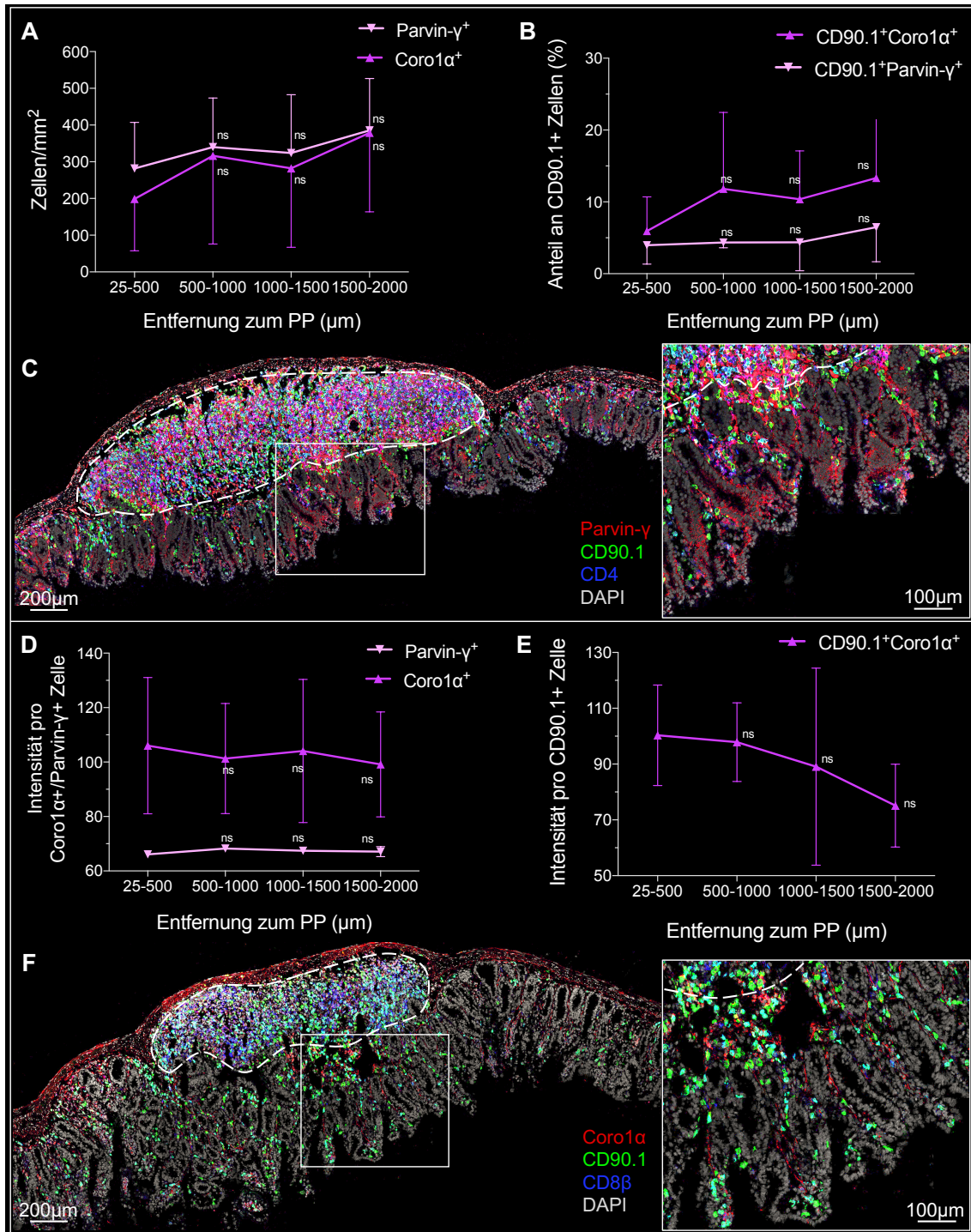


Abbildung 30: Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen für Coro1α und Parvin-γ. (A) Anzahl positiver Zellen pro mm² *Lamina Propria* (n=3). (B) Anteil an CD90.1⁺ Zellen, der auch Coro1α⁺ bzw. Parvin-γ⁺ ist (n=3). Coro1α bzw. Parvin-γ-Intensität auf Coro1α⁺ bzw. Parvin-γ⁺ Zellen (D; n=3) bzw. CD90.1⁺ Zellen (E; n=3). Repräsentative Darstellung von Immunfluoreszenzfärbungen eines PP (umrandet) tragenden histologischen Dünndarmpräparats für Parvin-γ (C) bzw. Coro1α (F) als Grundlage der Auswertung. Intestinale GvHD Tag 4 nach allogener SZT. Mann-Whitney-Test. n.s. nicht signifikant.

4.9. Ergebnisse der durchflusszytometrischen T-Zellanalyse während der frühen aGVHD

Zur weiteren Charakterisierung der T-Zellen während der frühen intestinalen GvHD wurden durchflusszytometrische Analysen (s. Abschnitt 3.3.12.1) durchgeführt. Hierbei stellte sich, wie bereits in den Untersuchungen zuvor, an Tag 3,5 nach allogener SZT ein intestinaler T-Zellgradient mit einer hohen Anzahl an Spender T-Zellen in direkter Nähe zu den PP (NtPP) dar, wohingegen sich mit zunehmender Entfernung zu den PP eine signifikant geringere Anzahl an Spender T-Zellen zeigte (Abbildung 31, A). Ebenso konnten zu diesem Zeitpunkt nur vereinzelt zirkulierende Spender T-Zellen in der Blutbahn gefunden werden. Bei separater Betrachtung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ Spender T-Zellen konnte gezeigt werden, dass obwohl sich in den PP und in *Lamina Propria* Bereichen fern der PP (FtPP) eine CD8 Dominanz abzeichnete, nahe der PP (NtPP) noch ein sehr ausgeglichenes CD4 zu CD8 Verhältnis vorherrschte (Abbildung 31, B). Vergleicht man weiterhin den Anteil der CD4⁺ bzw. CD8⁺ Spender T-Zellen in diesen Bereichen (NtPP) mit denen innerhalb der PP, so zeigte sich nahe der PP ein signifikant niedrigerer Anteil an CD8⁺ T-Zellen. Im Gegensatz hierzu war der Anteil an CD4⁺ Spender T-Zellen in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP signifikant höher als in Bereichen fern der PP und sogar höher als innerhalb der PP selbst.

Die analysierten Spender T-Zellen zeigten nahezu alle unabhängig ihrer Lokalisation einen CD62L⁻ und T-bet⁺ Phänotyp (Abbildung 31, C). CD44 wurde anteilmäßig am meisten auf T-Zellen innerhalb der PP und weniger auf jenen in der *Lamina Propria*, hier jedoch tendenziell mehr in Bereichen nah als fern der PP, exprimiert.

Zur weiteren Charakterisierung wurden auch die bereits durch RNA Sequenzierung an Tag 4 nach allogener SZT detektierten kostimulatorischen Moleküle CD27 und 4-1BB untersucht (Abbildung 31, D). Während 4-1BB eine nahezu gleichmäßige Expression aufwies, zeigten an Tag 3,5 nach allogener SZT mit zunehmendem Abstand zum PP tendenziell mehr Spender T-Zellen eine Expression von CD27. Hierbei erwies sich, dass CD27 vor allem auf CD8⁺ Spender T-Zellen und in der Milz anteilmäßig mehr als in den PP exprimiert wird. Während der Anteil an CD27⁺CD4⁺ Spender T-Zellen sowohl für die PP als auch die *Lamina Propria* Bereiche nah und fern der PP annähernd gleich war, zeigten sich unter den CD8⁺ Spender T-Zellen in der *Lamina Propria* nahe der PP sogar mehr CD27⁺ als innerhalb der PP selbst (Abbildung 31, E).

Ergebnisse

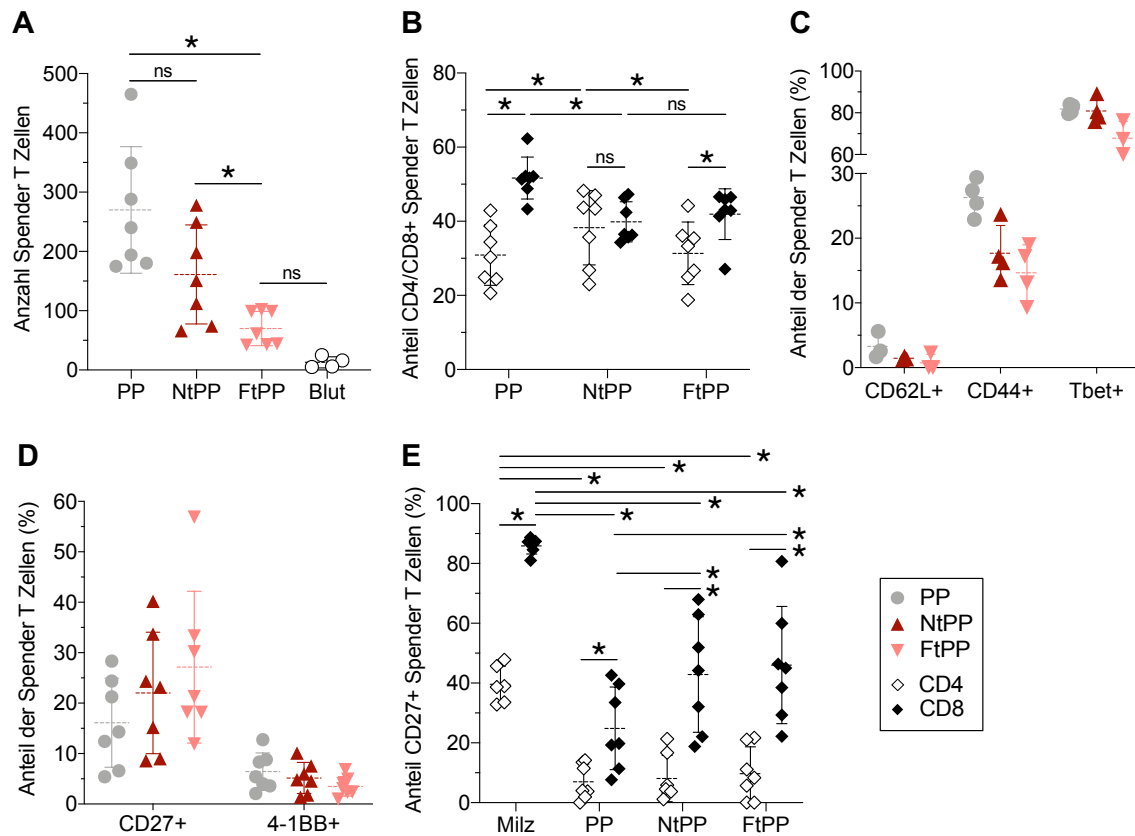


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Analyse der Spender T-Zellen an Tag 3,5 nach allogener SZT. (A) Anzahl der pro Maus durchflusszytometrisch gemessenen CD90.1⁺CD3⁺ Spender T-Zellen innerhalb der PP (grau), in den *Lamina Propria* Bereichen nah (NtPP; dunkelrot) und fern (FtPP; hellrot) der PP, sowie im Blut (weiß). (B) Anteil der CD4⁺ bzw. CD8⁺ Spender T-Zellen in den Bereichen PP, sowie nah (NtPP) und fern (FtPP) des PP. Prozentuale Expression der Marker CD62L, CD44 und des Transkriptionsfaktors Tbet (C; n=4), sowie der kostimulatorischen Moleküle CD27 und 4-1BB (D; n=7) auf Spender T-Zellen in den Bereichen PP, NtPP und FtPP. (E) Anteilmäßige Verteilung der CD27 Expression zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Spender T-Zellen für die Bereiche Milz, PP, NtPP und FtPP. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten aus zwei unabhängigen Experimenten. PP, NtPP, FtPP n=7; Blut n=4. ns nicht signifikant; * p-Wert <0,05. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für paarige Stichproben.

Betrachtet man die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren und Integrinen (Itg), so zeigten die Spender T-Zellen in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP eine signifikant höhere Expression von CCR5, CCR9 und Integrin $\alpha 4\beta 7$ als jene in weiter Entfernung zu den PP (Abbildung 32, A). Interessanterweise exprimierten dabei die Spender T-Zellen der an die PP angrenzenden *Lamina Propria* Bereiche sogar anteilmäßig mehr CCR5 als jene innerhalb der PP. Im Gegensatz dazu war die Expression von CCR9, Integrin $\alpha 4\beta 7$ und Integrin αE am höchsten auf Spender T-Zellen innerhalb der PP. Die Spender T-Zellen innerhalb der PP wiesen zudem eine höhere Integrin $\alpha 4\beta 7$ und Integrin αE Expression auf als jene innerhalb der Milz. Bei differenzierterer Betrachtung der Expression der Chemokinrezeptoren fiel auf, dass sowohl CCR5 als auch CCR9 während der intestinalen GvHD insbesondere von CD8⁺ Spender T-Zellen exprimiert wurde (Abbildung 32, B-C). Lediglich in der Milz zeigten die CD4⁺ Spender T-Zellen eine höhere CCR5

Ergebnisse

Expression. Wie CCR9 zeigten auch Integrin $\alpha 4\beta 7$ und Integrin αE eine signifikante höhere Expression auf $CD8^+$ Spender T-Zellen innerhalb der PP und der *Lamina Propria* (Abbildung 32, D-E). In der Milz wiesen jedoch wiederum die $CD4^+$ Spender T-Zellen die höhere Integrin αE Expression auf. Ähnlich wie CCR5, CCR9 und Integrin $\alpha 4\beta 7$ konnte auch für Integrin αE eine anteilmäßig höhere Expression auf Spender T-Zellen nahe und eine niedrigere Expression auf jenen fern der PP nachgewiesen werden. Dagegen wiesen mit zunehmender Entfernung zu den PP mehr Spender T-Zellen eine Expression von Integrin αL auf (Abbildung 32, F). Integrin αL wurde vor allem auf den Spender T-Zellen der Milz exprimiert, wohingegen die T-Zellen der PP kaum eine Expression des Integrins zeigten. Für Integrin αL zeigte sich zudem keine signifikant unterschiedliche Expression auf $CD4^+$ und $CD8^+$ Spender T-Zellen.

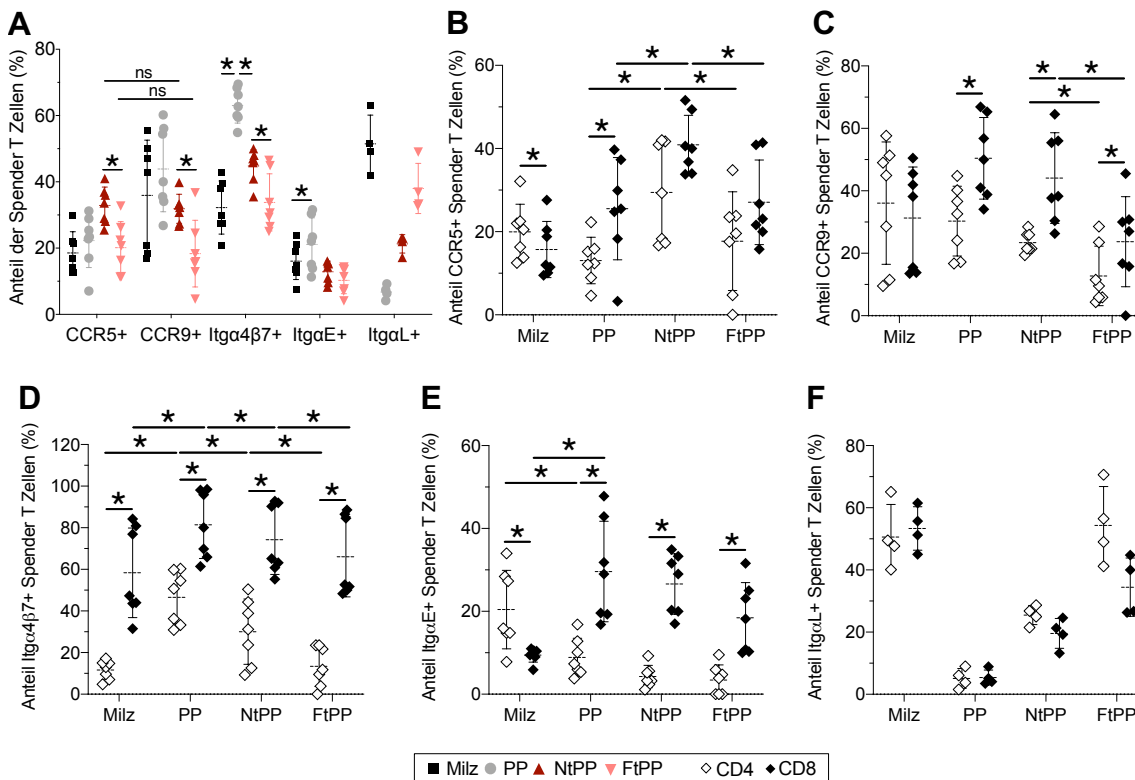


Abbildung 32: Chemokinin und Integrin Expression der Spender T-Zellen an Tag 3,5 nach allogener SZT. (A) Prozentualer Anteil der CCR5⁺, CCR9⁺, Itga4β7⁺, ItgaE⁺ (n=7) und ItgaL⁺ (n=4) Spender T-Zellen (CD90.1/CD3⁺) in der Milz, im PP, sowie in *Lamina Propria* Bereichen nah (NtPP) und fern (FtPP) der PP. Prozentuale Expression von CCR5 (B), CCR9 (C), Itga4β7 (D), ItgaE (E) und ItgaL (F) auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ Spender T-Zellen in der Milz, im PP, sowie in *Lamina Propria* Bereichen nah (NtPP) und fern (FtPP) der PP. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten aus zwei unabhängigen Experimenten. ns nicht signifikant; * p-Wert <0,05. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für paarige Stichproben.

Die durchflusszytometrische Spender T-Zellanalyse bestätigt den intestinalen T-Zellgradienten an Tag 3,5 nach allogener SZT und zeigt ein ausgeglichenes Verhältnis an $CD4^+$ und $CD8^+$ Spender T-Zellen nahe der PP zu diesem Zeitpunkt. Die den Darm infiltrierenden Spender T-Zellen zeigen dabei einen $CD62L^-Tbet^+$ T-Zellphänotyp. $CD27$ wird insbesondere von $CD8^+$ Spender

T-Zellen der Milz exprimiert und zeigt keine auffälligen Unterschiede zwischen *Lamina Propria* Bereichen nahe und fern der PP an Tag 3,5 nach allogener SZT. Die Spender T-Zellen nahe der PP zeigen eine vermehrte Expression der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR9 sowie des Integrins $\alpha 4\beta 7$.

4.10. Ergebnisse der Migrationsanalysen

4.10.1. Ergebnisse der in-vitro Transwell-Migrationsversuche

Durch Transwell-Migrationsversuche wurde das chemotaktische Potential der durch RNA Sequenzierung und Immunfluoreszenzfärbung identifizierten Chemokinkandidaten funktionell getestet (s. Abschnitt 3.3.14.2). Zuerst wurde das Chemokin CXCL11, welches in der RNA Sequenzierung während der aGvHD die deutlichste Hochregulation aller Chemokine zeigte, analysiert. Da CCL25 in den Immunfluoreszenzuntersuchungen eine deutliche Expression während der akuten intestinalen GvHD zeigte wurde auch dieses bezüglich des Migrationsverhaltens in-vitro aktivierter T-Zellen untersucht. Betrachtet man die Ergebnisse der Migrationsversuche, so zeigte sich insbesondere CXCL11 als starkes Chemokin für *in vitro* aktivierte T-Zellen, wohingegen CCL25 eine lediglich geringe chemoattraktive Wirkung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle aus alleinigem Medium zeigte.

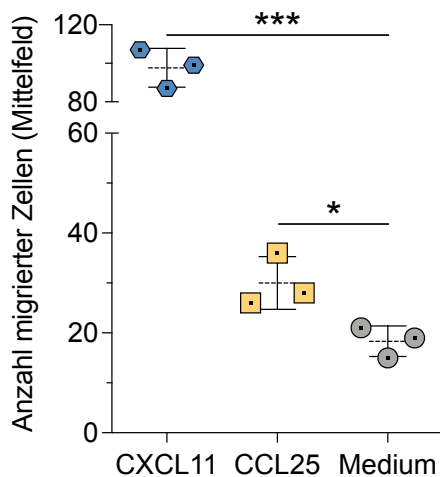


Abbildung 33: CXCL11 und CCL25 Transwell-Migrationsversuch. 5×10^5 *In vitro* stimulierte T-Zellen wurden in 200 μ l Medium des oberen Wells mit einer Porengröße von 3 μ m gegeben. Die Endkonzentration der Chemokine im unteren Well betrug 100 ng/ml. Das Transwellssystem wurde für 4 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Anzahl der migrierten Zellen wurden mikroskopisch im Mittelfeld des unteren Wells manuell ausgezählt. Ungepaarter t-Test. *** p-Wert <0,001, * p-Wert <0,05.

4.10.2. Ergebnisse der Life-Mikroskopie Migrationsanalyse

Die Chemotaxiskammer Versuche wurden mit *in vivo* aktivierten T-Zellen, welche direkt aus den sekundär lymphatischen Organen während der akuten GvHD isoliert wurden, durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.14.3 ff.). Hierbei wurde insbesondere das in der RNA Sequenzierung während der aGvHD am stärksten veränderte Chemokine CXCL11 und das innerhalb der KM+T Gruppe vermehrt nahe der PP exprimierte Chemokin CCL4 genauer untersucht.

Ergebnisse

Hierbei zeigte sich die Migration aktivierter, allogener T-Zellen gegenüber CXCL11 bereits an Tag 4 nach SZT deutlich gerichtet, wohingegen CCL4 zu diesem Zeitpunkt noch keine gerichtete Migration induziert. An Tag 5 nach SZT zeigten sowohl CXCL11 als auch CCL4 eine deutlich gerichtete Migration der T-Zellen entlang des Chemokingradienten. Die Negativkontrolle mit reinem Medium zeigte in beiden Versuchen keine gerichtete Migration. Die Positivkontrolle aus 25% FCS in Medium hingegen bewirkte jeweils eine stark gerichtete Migration der aktivierten T-Zellen entlang des Gradienten.

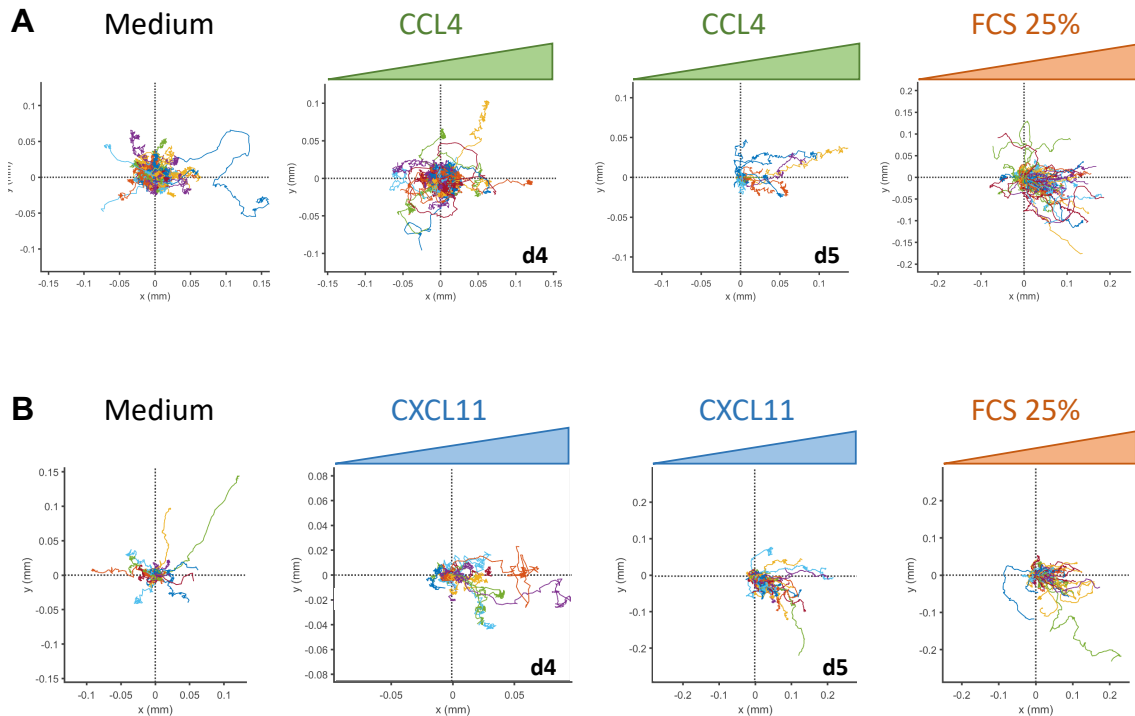


Abbildung 34: *in vivo* Migrationsanalysen. Fluoreszenzmarkierte T-Zellen wurden an Tag 4 bzw. Tag 5 nach allogener SZT aus den mesenterischen Lymphknoten gewonnen und in eine ibidi μ -Slide Migrationskammer geladen. Zur Etablierung eines Chemokingradienten wurden rekombinante Proteine für CXCL11 (400 ng/ml) und CCL4 (500ng/ml) verwendet. Die beobachteten Zelltracks sind jeweils mit ihrem Startpunkt im Koordinatenursprung und ihrer von hier ausgehenden Migration in X/Y-Richtung dargestellt. (A) Dargestellt sind alle Zelltracks der Negativkontrolle Medium (n=232), CCL4 Tag 4 nach allo SZT (n=430), CCL4 Tag 5 nach allo SZT (n=98), sowie der Positivkontrolle FCS 25% (n=253). (B) Dargestellt sind alle Zelltracks der Negativkontrolle Medium (n=77), CXCL11 Tag 4 nach allo SZT (n=59), CXCL11 Tag 5 nach allo SZT (n=219), sowie der Positivkontrolle FCS 25% (n=124).

Zusammenfassend konnte diese Arbeit einige bedeutende Faktoren des intestinalen T-Zell-Homings während der aGvHD aufzeigen. Insbesondere Faktoren, welche eine direkte Migration der Spender T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* fördern können, konnten hierbei nachgewiesen werden. Die infiltrierenden Spender T-Zellen konnten zudem genauer charakterisiert werden, was neue Möglichkeiten zur Therapie der aGvHD eröffnet.

5. Diskussion

5.1. Dynamik der aGvHD im MHC-inkompatiblem SZT Mausmodell

Die MHC-inkompatible Transplantation von Spender T-Zellen einer C57BL/6 Maus in eine myeloablativ bestrahlte BALB/c Empfängermaus führt aufgrund der MHC Inkompatibilität zur Induktion einer akuten GvHD (van Leeuwen, Guiffre et al. 2002, Reddy, Negrin et al. 2008). Wie in den Biolumineszenz Bildgebungen zu erkennen, zeigt sich bereits ab dem 2. Tag nach allogener SZT eine sichtbare Akkumulation der Spender T-Zellen in den SLO wie den zervikalen Lymphknoten und der Milz. Aufgrund der vermehrten Aktivierung und Proliferation der Zellen sind die BLI Signale an Tag 4 nach allogener SZT weiter zunehmend. Die diffuse Signalverteilung im Bauchraum ist zudem als Zeichen der bereits begonnen Migration der T-Zellen zu ihren Effektororganen, insbesondere dem Gastrointestinaltrakt, zu deuten. Interessanterweise konnte in ex vivo BLI Bildgebungen bereits nachgewiesen werden, dass zu frühen Zeitpunkten der aGvHD zuerst die Dünndarmbereiche nahe der PP eine Infiltration durch Spender T-Zellen aufweisen (Beilhack, Schulz et al. 2005). Mit fortgeschrittener Infiltration der Effektororgane stellt sich an Tag 6 nach allogener SZT, entsprechend des nahezu ubiquitär ausgebreiteten BLI Signals, bereits eine ausgeprägte GvHD dar.

Entsprechend der schnell verlaufenden aGvHD zeigten die mit Knochenmark und T-Zellen transplantierten Mäuse in den Tagen 2-6 nach Transplantation rasch ansteigende GvHD Scoring Werte sowie gegensinnig deutlich abfallende Gewichtskurven. Für das vergleichsweise frühe Versterben der Mäuse in der mit Knochenmark und T-Zellen transplantierten Gruppe können dabei verschiedene Gründe eruiert werden. Einerseits fehlen durch die T-Zelldepletion des Knochenmarks möglicherweise auch gegenregulierende Zellen, wie regulatorische T Zellen, welche nachgewiesenermaßen einen protektiven Effekt haben (Edinger, Hoffmann et al. 2003). Andererseits wurde durch das engmaschige BLI Monitoring zur Überwachung der GvHD Kinetik und der damit verbundenen Anästhesierung mit Ketamin/Xylazin, trotz adäquater Gewichtsadaptierung, die Belastung der Mäuse vermutlich zusätzlich erhöht.

Überraschenderweise zeigte sich in der zweiten Transplantationsreihe auch ein Versterben der nur mit Knochenmark transplantierten Mäuse an Tag 14 der allogenen SZT. Aufgrund des zeitlichen Verlaufes ist dies am ehesten auf ein fehlendes Engraftment des Transplantates zurückzuführen. Dabei haben T-Zelldepletierte Knochenmarktransplantate, aufgrund einer erhöhten

Diskussion

Anfälligkeit für Abstoßung durch Empfänger NK und T-Zellen, generell ein erhöhtes Risiko für Graftversagen (Murphy, Kumar et al. 1990). Weitere Risikofaktoren für ein Graftversagen stellen eine zu geringere Anzahl an transplantierten Zellen und eine niedrige Vitalität dieser dar (Mattsson, Ringdén et al. 2008). Im Menschen können zudem sogar Infektionen insbesondere durch CMV, EBV aber auch Parvovirus B19 eine Transplantatabstoßung induzieren (Reddehase, Dreher-Stumpp et al. 1992, McKisic, Macy et al. 1998). Eine Auswirkung des fehlenden Engraftments auf die Aussagekraft der nur mit Knochenmark transplantierten Mäuse als Kontrollgruppe ist aufgrund des späten Auftretens im Vergleich zu dem gewählten frühen Observationszeitraum dennoch nicht zu erwarten. Entsprechend zeigten die Sequenzierungsdaten der Mäuse auch keine Auffälligkeiten in ihrem Clusterverhalten im Vergleich zu den anderen Gruppen.

Die RNA Sequenzierung konnte eine deutliche intestinale Inflammation der GvHD entwickelnden Mäuse (KM+T) nachweisen. So zeigten sich neben einer vor allem CD90⁺CD8⁺ geprägten T-Zellinvasion sowohl in der RNA Sequenzierung als auch der Massenspektrometrie eine deutliche Expression der T_H1 Zytokine IFN- γ , TNF α und IL-2, sowie ihrer assoziierten Signalmoleküle. Das während der aGvHD am stärksten hochregulierte Gen Phospholipase A2 Gruppe 4C (PLA2G4C) ist an der Hydrolyse von Phosphoglycerolipiden zu freien Fettsäuren und Lysophospholipiden beteiligt. Beide Endprodukte dienen als Vorstufen in der Produktion von Signalmolekülen (Underwood, Song et al. 1998).

Als Zeichen der Inflammation und Gewebeerstörung zeigte sich auch eine vermehrte Expression von Gasdermin C (GSDMC) und Resistin like beta (RTNLB) in der intestinalen *Lamina Propria*. Für einige Gasdermine konnte eine Aktivierung durch inflammatorische Caspasen gezeigt werden, was zu einer Anlagerung an die Zellmembran mit Porenbildung und somit zum Zelltod führt (Feng, Fox et al. 2018). Diese stark entzündliche Form des Zelltodes, auch Pyroptose genannt, findet häufig in mit Bakterien infizierten Zellen statt und ist ein entscheidender Mechanismus der angeborenen Immunabwehr (Shi, Gao et al. 2017). Das von intestinalen Becherzellen produzierte Resistin like beta ist ein wichtiger Faktor der epithelialen Barrierefunktion und damit einhergehend ein Regulator für die Empfänglichkeit für Inflammation (Hogan, Seidu et al. 2006). Dabei ist die Induktion von Resistin like beta nicht nur unabhängig von T_H1 oder T_H2 Zytokinen, sondern kann selbst durch Stimulation von Makrophagen die Sekretion von TNF α , IL-6 und Chemokinen wie CCL5 induzieren (Barnes, Vidrich et al. 2007).

Diskussion

Darüber hinaus können jedoch auch einige Gegenregulatoren und antiinflammatorische Faktoren nachgewiesen werden. Das während der aGvHD am zweitstärksten hochregulierte Gen SOCS1 (Suppressor of Cytokine signaling 1) gehört zur Gruppe der STAT induzierten STAT Signaling Inhibitoren und ist ein Gegenregulator vermehrter Zytokinsignaltransduktion (Starr, Willson et al. 1997). Durch den Abbau der für T-Zellen essenziellen Aminosäure Tryptophan und die daraus entstehenden Metaboliten inhibiert IDO1 die Proliferation allogener T-Zellen (Terness, Bauer et al. 2002). Dieser vor allem durch Empfänger APC vermittelte Effekt führt zu einer Abschwächung der intestinalen GvHD (Jasperson, Bucher et al. 2009).

Als Zeichen der Antiinflammation und Gegenregulation zeigte sich in der aGvHD entwickelnden KM+T Gruppe auch eine Erhöhung von IL-10 und PD-L1. PD-L1 ist ein kostimulatorisches Molekül der B7-Familie und wird vor allem auf APCs wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Durch Bindung an seinen, vor allem auf T-Zellen exprimierten, Rezeptor PD-1 kann die T-Zell Rezeptor vermittelte Aktivierung und Proliferation dieser inhibiert werden (Freeman, Long et al. 2000). Gleichzeitig wird durch die Bindung von PD-L1 an PD1 auch die Bildung von IL-10 sowohl durch die APC (vor allem Makrophagen) als auch T-Zellen (vor allem T_H2 Zellen) gesteigert (Dong, Zhu et al. 1999, Said, Dupuy et al. 2010).

IL-10 vermittelt seine immunsuppressive Wirkung nicht nur durch die APC vermittelte Inhibierung der Zytokinproduktion von T_H1 Zellen (Fiorentino, Zlotnik et al. 1991), sondern auch direkt durch die Inhibierung der IL-2 vermittelten T-Zellproliferation (de Waal Malefyt, Yssel et al. 1993). Die besondere Stellung von IL-10 in der intestinalen Homöostase zeigte sich auch dadurch, dass IL-10 defiziente Mäuse eine chronische Enterokolitis entwickeln (Kühn, Löhler et al. 1993, Davidson, Leach et al. 1996). Zudem kann IL-10 die Expression von CXCR3 auf T_H1 Zellen herunterregulieren und hierdurch mit deren Darminfiltration im Rahmen intestinaler Entzündungsgeschehen interferieren (Wadwa, Klopffleisch et al. 2016).

5.2. IFN- γ -induzierbare Chemokine und MIP sind entscheidende Faktoren des intestinalen T-Zell-Homings während der aGvHD

Passend zu dem T_H1 dominierten inflammatorischen Milieu der intestinalen aGvHD (Snider and Liang 2001) konnte an Tag 4 nach allogener SZT eine hohe Expression der Zytokine IFN- γ , TNF α sowie IL-2 nachgewiesen werden. Nach der Transplantation werden diese insbesondere von den in den SLO aktivierten und zu T_H1 und T_C1 Effektorzellen differenzierenden alloreaktiven Spender T-Zellen produziert (Rus, Svetic et al. 1995). Die in die Zirkulation gelangten Zytokine bewirken zusammen mit weiteren durch die Konditionierung freigesetzten inflammatorischen Stimuli die Produktion der IFN- γ -induzierten Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 in den GvHD Zielorganen (Dwinell, Lügering et al. 2001, Wysocki, Panoskaltis-Mortari et al. 2005). Die Interaktion dieser Chemokine mit ihrem Rezeptor CXCR3 ist vermutlich ein bedeutender Faktor für die frühe Zielorganinfiltration während der aGvHD (Duffner, Lu et al. 2003).

Im Einklang mit anderen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass neben den IFN- γ -induzierbaren Chemokinen auch die Makrophagen inflammatorischen Proteine (MIP) CCL4 (MIP-1 β) und CCL3 (MIP-1 α) während der frühen aGvHD stark exprimiert werden (Bouazzaoui, Spacenko et al. 2009). Diese Chemokine werden unter anderem von T-Zellen (insbesondere CD8⁺) und Epithelzellen produziert (Cook, Smithies et al. 1999). Durch die Sekretion dieser T-Zell-tropen Chemokine können bereits eingewanderte Effektor T-Zellen die weitere T-Zellinfiltration in die GvHD Zielorgane wahrscheinlich subsidiär verstärken (Wysocki, Panoskaltis-Mortari et al. 2005). Diese postulierte sequenzielle Infiltration spiegelt sich auch in der unterschiedlichen Chemoattraktion von CXCL11 und CCL4 auf die aktivierten Spender T-Zellen wider. In der Live-Mikroskopie der während der akuten GvHD aktivierten T-Zellen zeigt sich bereits an Tag 4 nach allogener SZT eine ausgeprägte Chemoattraktion nahezu aller Spender T-Zellen gegenüber CXCL11. Dagegen migrieren zu diesem Zeitpunkt nur wenige der aktivierten T-Zellen gezielt entlang eines CCL4 Gradienten. Dennoch sollte die von Wysocki et al. (2005) beschriebene sequenzielle Infiltration durch die unterschiedlichen Chemokine nicht als starre Abfolge betrachtet werden, sondern zeigt vermutlich einen eher fließenden Übergang mit potenziellen Überlappungen. Darüber hinaus fördert auch das während der akuten GvHD vermehrt exprimierte CCL25, welches ein bekanntes Chemokin für das intestinale Homing von T-Zellen darstellt, die Migration von aktivierten T-Zellen (Svensson, Marsal et al. 2002).

Diskussion

Auch weitere Faktoren, wie beispielsweise Selectin P Ligand, ICAM-1, Integrin $\beta 7$ und Integrin αL beeinflussen neben Chemokinen das intestinale T-Zell-Homing während der aGvHD. Die Interaktion von Selektin P Ligand auf der Oberfläche von T-Zellen mit P und/oder E Selektin auf Endothelzellen bewirkt im Rahmen der transendothelialen Migration die Anlagerung und das Rollen der T-Zellen entlang des Endothels (Ley, Laudanna et al. 2007). ICAM-1 ist ein Glycoprotein, welches auf der Oberfläche von Endothelien sowie einigen Immunzellen exprimiert wird (Hubbard and Rothlein 2000) und insbesondere für die transendotheliale Leukozyten Migration bedeutsam ist (Smith, Marlin et al. 1989). Im Rahmen des intestinalen T-Zell-Homings werden nach Bindung von Chemokinen an ihre zugehörigen Rezeptoren einige Adhensionsmoleküle an der T-Zelloberfläche aktiviert und in ihrer Expression hochreguliert (Koboziev, Karlsson et al. 2010). Hierdurch werden unter anderem auch die Integrine LPAM-1 (Integrin $\alpha 4\beta 7$), sowie LFA-1 (Integrin $\alpha L\beta 2$) aktiviert. Durch die Bindung von LPAM-1 und LFA-1 auf der T-Zelloberfläche an ihre entsprechenden Partner MAdCAM-1 bzw. ICAM-1 auf Endothelzellen wird das durch Selektine und ihre zugehörigen Liganden vermittelte initiale Rollen der T-Zellen zu einem festen Arrest (Koboziev, Karlsson et al. 2010). Diese Faktoren spielen dadurch für die anschließend stattfindende transendotheliale Migration von Immunzellen eine entscheidende Rolle und sind somit maßgeblich an der Rekrutierung von zirkulierenden T-Zellen zum Ort der Entzündung beteiligt.

Dennoch sollte hierdurch keine alleinige systemische Genese der intestinalen T-Zellinfiltration während der frühen aGvHD geschlussfolgert werden. So wird ICAM-1 unter inflammatorischen Bedingungen neben Endothelzellen auch auf Fibroblasten der *Lamina Propria* hochreguliert (Musso, Condon et al. 1999) und könnte über Integrin $\alpha L\beta 2$ auch eine mesenchymale und direkte Migration der Spender T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* ermöglichen. Die Expression von LFA-1 (Integrin $\alpha L\beta 2$) am führenden Zellpol kontrolliert über die Verbindung mit dem Zytoskelett, u.a. durch alpha-Aktinin, die T-Zellmigration und unterstreicht weiterhin die Bedeutung der Integrine in einer am ehesten mesenchymalen Form der interstitiellen T-Zellmigration (Stanley, Smith et al. 2008, Overstreet, Gaylo et al. 2013). Das Integrin LPAM-1 (Integrin $\alpha 4\beta 7$) kann neben MAdCAM-1 auch an das in der EZM enthaltene Fibronectin (Rüegg, Postigo et al. 1992) binden und somit möglicherweise auch die interstitielle Migration dieser entlang der EZM fördern.

5.3. Die T-Zellinfiltration des Darmes beginnt bereits ab Tag 2,5 nach allogener SZT

Nach der Transplantation gelangen die allogenen Spender T-Zellen vermittelt durch die Chemokine CCL19 und CCL21 rasch in die SLO (Förster, Schubel et al. 1999, Gunn, Kyuwa et al. 1999). Schon an Tag 2,5 und 3 nach allogener SZT zeigen sich, bei weiterhin zunehmender Proliferation der T-Zellen innerhalb der PP, bereits vereinzelt T-Zellen in der *Lamina Propria*. Diese T-Zellen befinden sich dabei fast ausschließlich in Bereichen nahe der PP. Beginnend ab Tag 4 kommt es mit fortschreitender Zeit nach allogener SZT durch ein vermehrtes vaskuläres Homing der T-Zellen über die Blutbahn zu einer nahezu ubiquitären T-Zellinfiltration der *Lamina Propria*.

In anderen Untersuchungen der ablaufenden aGvHD im MHC inkompatiblen Mausmodell konnten mittels BLI Untersuchungen an Tag 4 nach allogener SZT Spender T-Zellen im Darm nachgewiesen werden (Beilhack, Schulz et al. 2005). Interessanterweise zeigte sich auch hier der Beginn der Darminfiltration insbesondere in Darmabschnitten nahe der PP. Der zeitliche Unterschied im Vergleich zu unseren Untersuchungen lässt sich dabei unter anderem in der unterschiedlichen Sensitivität der Nachweismethoden erklären. So ist das Auflösungsvermögen und die Sensitivität für einzelne Zellen der Immunfluoreszenzmikroskopie deutlich höher als die der BLI Analyse.

Trotz dem frühen Nachweis von Spender T-Zellen in der *Lamina Propria* zeigte sich in der durchflusszytometrischen T-Zellanalyse wie auch in früheren Studien über die Kinetik des MHC inkompatiblen C57BL/6 nach BALB/c Mausmodells an Tag 3 bzw. 3,5 nach allogener SZT kaum Spender T-Zellen im peripheren Blut (Bäuerlein, Riedel et al. 2013). Eine rein vaskuläre Herkunft der frühen intestinalen Spender T-Zellen erscheint daher eher unwahrscheinlich.

5.4. T-Zellen formen einen Gradienten um den PP in der frühen aGvHD

Entsprechend der vorhergehenden Beobachtungen mit Beginn der intestinalen T-Zellinfiltration in *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP, formen die T-Zellen in der frühen Phase der aGvHD einen Gradienten mit hohen T-Zellzahlen nahe der PP und abnehmender Zellzahl mit zunehmender Entfernung zu diesen. Mit Beginn des vaskulären Homings und ubiquitärer Infiltration der T-Zellen in die intestinale *Lamina Propria* wird dieser Gradient ab Tag 4 nach allogener SZT zunehmend überlagert.

Im Gegensatz zu anderen Lymphknoten werden PP nicht von einer starren Bindegewebskapsel umgeben, sondern sind nach luminal nur durch ein spezialisiertes Follikel-assoziiertes Epithel inklusive den sogenannten M Zellen zur intestinalen *Lamina Propria* abgegrenzt (Wolf and Bye 1984). Berücksichtigt man zudem die Tatsache, dass PP entsprechend ihrer Lage immunologisch durch einen engen Austausch mit der *Lamina Propria* gekennzeichnet sind (Owen 1977, Jung, Hugot et al. 2010), legt dies die Vermutung nahe, dass es auch eine direkte Migration von Spender T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* geben kann.

Eine alternative Erklärungshypothese, dass der frühe T-Zellgradient durch ein selektives Homing von T-Zellen über die Blutbahn in *Lamina Propria* Bereiche nahe der PP entsteht, ist nicht nur aufgrund der allenfalls vereinzelt T-Zellen im peripheren Blut zu diesen Zeitpunkten unwahrscheinlich (Bäuerlein, Riedel et al. 2013). In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass sich auch bei Blockierung der Auswanderung von Spender T-Zellen aus Lymphknoten und PP in die systemische Zirkulation durch Fingolimod (FTY720; (Cyster and Schwab 2012) ein früher intestinaler T-Zellgradient um die PP ausbildet (Jarick 2019).

Die Etablierung des intestinalen T-Zellgradienten wurde in unseren Experimenten nur an myeloablativ konditionierten Mäusen untersucht. Dieser T-Zellgradient muss jedoch auch für andere in der klinischen Anwendung zunehmend bedeutendere Konditionierungsregime, insbesondere solcher mit reduzierter Intensität (RIC) und einem damit verbundenen geringeren mucosalen Schaden, evaluiert werden (Johansson, Brune et al. 2001, Turner, Kambouris et al. 2008).

5.5. Aktivierte T-Zellen migrieren direkt aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria*

Der Nachweis einer direkten Migration der T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* während der frühen aGvHD konnte bereits durch *in vivo* Mikroskopie photokonvertierter T-Zellen erbracht werden (Jarick 2019). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass neben nicht photokonvertierten PP keine photokonvertierten T-Zellen detektiert werden können. Dies ist als ein weiteres Indiz zu sehen, dass eine durch vaskuläres Homing ausgelöste T-Zellinfiltration der *Lamina Propria* Bereiche nahe der PP zumindest in den frühen Phasen der aGvHD an Tag 3 und 3,5 nach allogener SZT keine Rolle spielt.

Diskussion

Betrachtet man das Migrationsverhalten der direkt migrierenden Spender T-Zellen so ist hervorzuheben, dass diese in unseren Beobachtungen zu frühen Zeitpunkten, wie Tag 3 nach allogener SZT, nur ein geringes Maß an Direktionalität und ein eher zufälliges Bewegungsmuster (*random walk*) aufweisen. Eine Chemokin-geführte Migration würde ein eher geradliniges Migrationsmuster erwarten lassen, wie es bspw. an Tag 4 nach allogener SZT zu sehen ist. Zudem zeigen die Spender T-Zellen an Tag 3 eher ein sich durch die EZM schlingendes amöboides Migrationsmuster, wohingegen an Tag 4 die T-Zellen insbesondere entlang der EZM Matrix entsprechend einer eher mesenchymalen Migration wandern (Yamada and Sixt 2019).

Mit der Aktivierung naiver T-Zellen verändert sich deren Migrationsmuster von einer eher zufälligen Bewegung (*random walk*) zu einem vermehrt informationsbasierten Bewegungsmuster (*Lévy walk*) (Krummel, Bartumeus et al. 2016). Die Direktionalität der Bewegung ist dabei maßgeblich abhängig von äußeren Einflussfaktoren wie Chemokinen (Chemotaxis) (Hugues, Scholer et al. 2007) und extrazellulären Stimuli (Haptotaxis) (Overstreet, Gaylo et al. 2013). Die geringere Direktionalität der T-Zellbewegung innerhalb der *Lamina Propria* an Tag 3 im Vergleich zu Tag 4 nach allogener SZT lässt sich demnach unter anderem dadurch erklären, dass an Tag 3 nahe der PP die Chemokingradienten vermutlich noch nicht so stark ausgeprägt sind wie an Tag 4. Dennoch sollte der Einfluss von Chemokinen auf das Migrationsverhalten an Tag 3 nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da dieses auch vom Fortbewegungsmechanismus der Zellen abhängig ist. So kann auch eine amoeboider Fortbewegung entlang des Wegs des geringsten Widerstandes oder eine mesenchymale Fortbewegung Chemokin-geführt sein und aufgrund von Hindernissen oder der EZM Struktur auf den ersten Blick ungerichtet erscheinen (Yamada and Sixt 2019). Ebenso ist mit zunehmender Stimulation und Aktivierung innerhalb der PP die Chemoattraktion der bereits gebildeten T-Zell-APC-Cluster auf antigen-naive T-Zellen höher, welches wiederum eine höhere Direktionalität der T-Zellmigration innerhalb der PP an Tag 4 im Vergleich zu Tag 3 erklärt. So werden beispielweise vermittelt durch CCL4 naive CD8⁺ T-Zellen zum Ort der Interaktion von CD4⁺ T-Zellen und APC geleitet (Castellino, Huang et al. 2006).

Für die Transkriptom- und Proteomanalysen durch RNA Sequenzierung und Massenspektrometrie wurde der Untersuchungszeitpunkt Tag 4 nach allogener SZT ausgewählt. Zwar zeigen sich zu diesem Zeitpunkt bereits vaskulär eingewanderte T-Zellen in den Bereichen fern der PP, dennoch ist eine ausreichende Anzahl an T-Zellen entscheidend, um eine genügende Abundanz

der zu analysierenden T-Zelltranskripte über das gesamte Transkriptom zu erreichen. Zudem zeigt sich zu diesem Zeitpunkt neben den bereits frühzeitig ausgewanderten T-Zellen weiterhin eine direkte Migration der T-Zellen in die angrenzende *Lamina Propria* (Jarick 2019). Migrationsfördernde Faktoren innerhalb der direkt migrierenden T-Zellen sowie in deren Umgebung sollten somit auch zu diesem Zeitpunkt weiterhin nachweisbar sein.

5.6. Aktivierte T-Zellen nahe der PP haben einen hoch-motilen Phänotyp

In den *Lamina Propria* Bereichen nahe der PP sind entsprechend dem intestinalen T-Zellgradienten während der frühen aGvHD einige T-Zellmarker Gene deutlich erhöht (CD3d, CD3g, CD3e, CD8a). Die vermehrte Expression der Faktoren CD3z, CD27, CD2, LCK, ZAP70 sowie des LAT:GADS:SLP-76-Komplexes weisen auf aktivierte T-Zellen mit einer deutlich erhöhten Aktivität T-Zellassoziierter Signalwege nahe der PP hin.

Auch die nachgeschalteten Gene und Regulatoren der Zelladhäsion wie FYB (ADAP), SKAP1 (SKAP55), RIAM (Apbb1ip), der RAP1 GTP-Austauschfaktor RASGRP2 sowie LFA-1 (Integrin α L β 2) weisen eine vermehrte Expression in T-Zellen nahe der PP auf (Griffiths, Krawczyk et al. 2001, Wang, Liu et al. 2007). Diese Faktoren sind entscheidende Regulatoren der LFA-1 (Integrin α L β 2) Affinität, welche nicht nur die Bindung zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle verstärkt (Billadeau, Nolz et al. 2007), sondern auch die Interaktion der T-Zellen mit ihrer Umgebung und somit die Migration dieser mit ermöglicht (Walling and Kim 2018). So konnte in Studien gezeigt werden, dass der Verlust von ADAP/SKAP1 durch gestörte Regulierung der LFA-1 Affinität die intranodale Motilität von T-Zellen innerhalb von Lymphknoten reduziert (Kliche, Worbs et al. 2012). T-Zellen nutzen die Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 vermutlich nicht nur, um auf der Suche nach ihrem passenden Antigen entlang dendritischer Fortsätze schnell innerhalb der Lymphknoten zu migrieren (Katakai, Habiro et al. 2013), sondern könnten in ähnlicher Weise auch eine Migration entlang der ICAM-1 exprimierenden Fibroblasten der *Lamina Propria* vollziehen (Musso, Condon et al. 1999). Dabei ist zu beachten, dass nicht nur der T-Zellrezeptor- sondern auch der Chemokinrezeptorsignalweg über eine „Inside-Out“ Signalkaskade zur Aktivierung von Integrinen wie LFA-1 führt und somit eine mesenchymale Form der T-Zellmigration begünstigen kann (Hogg, Patzak et al. 2011).

Diskussion

Darüber hinaus weisen weitere Faktoren während der frühen aGvHD auf einen hoch-motilen Phänotyp der T-Zellen nahe der PP hin. So werden VAV, WASp, RhoGDI2 (Arhgdib) ARP2/3 (ACTR3b), Rac2 und Dock2, welche innerhalb der T-Zellrezeptor-, Chemokin- und S1P-Rezeptorsignalkaskade für die zytoskelettale Reorganisation und somit für die Motilität der Zellen verantwortlich sind, vermehrt nahe der PP exprimiert (Kehrl 2006, Burkhardt, Carrizosa et al. 2008, Thelen and Stein 2008, Kumari, Curado et al. 2014). Der GTP Austauschfaktor Dock2 ist ein Aktivator der Rho GTPase Rac2. Der GDP Dissoziationsinhibitor RhoGID2 (Arhgdib) dagegen hat neben seiner inhibierenden insbesondere eine stabilisierende Wirkung auf Rac2 und reguliert dessen zelluläre Lokalisation (Garcia-Mata, Boulter et al. 2011).

Dock2 fungiert als ein zentraler Mediator der zytoskelettalen Reorganisation während der Lymphozyten Migration (Fukui, Hashimoto et al. 2001). So zeigen T-Zellen mit fehlendem Dock2 eine reduzierte Lamellipodium Formierung und laterale Motilität sowohl entlang des Endothels als auch der extrazellulären Matrix (Shulman, Pasvolsky et al. 2006). Gleichermäßen zeigen Rac2^{-/-} und Dock2^{-/-} T-Zellen auch eine verminderte interstitielle Migration innerhalb von Lymphknoten und weisen eine defiziente Auswanderung aus diesen auf (Nombela-Arrieta , Mempel et al. 2007, Faroudi, Hons et al. 2010). Weiterhin weisen Dock2^{-/-} T-Zellen auch eine deutlich eingeschränkte migratorische Aktivität gegenüber Chemokinen auf, was dessen entscheidende Rolle im Rahmen der T-Zellchemotaxis unterstreicht (Fukui, Hashimoto et al. 2001). Interessanterweise ist die Chemokin getriggerte transendotheliale Migration von T-Zellen jedoch unabhängig von Dock2 (Shulman, Pasvolsky et al. 2006). Die defiziente Auswanderung von Dock2^{-/-} T-Zellen aus den SLO ist demnach am ehesten auf deren verminderte Motilität und reduzierte S1P vermittelten Migration zu den efferenten lymphatischen Gefäßen zurückzuführen (Nombela-Arrieta , Mempel et al. 2007).

Auch die Aktin-bindenden Proteine Coro1 α und L-Plastin, welche einen weiteren ausschlaggebenden Faktor der Zellmotilität darstellen, werden verstärkt nahe der PP exprimiert. Dabei ist die vermehrte Expression von Coro1 α nahe der PP während der aGvHD entsprechend der Immunfluoreszenzanalysen nicht etwa durch eine vermehrte Anzahl an Coro1 α ⁺ Zellen, sondern eher durch eine hochregulierte Coro1 α -Expression der T-Zellen zu erklären. So zeigt sich eine hohe Coro1 α Expressionsstärke in T-Zellen nahe der PP und eine eher abnehmende Expressionsstärke mit zunehmender Entfernung zu diesen. Dieser Expressionsgradient bildet sich dabei jedoch nur für T-Zellen, nicht aber für Coro1 α ⁺ Zellen allgemein.

Coro1 α übt eine inhibitorische Funktion auf Arp2/3 aus und stellt somit ein Gegenregulator von Rac2 dar (Föger, Rangell et al. 2006). Vergleichbar mit Dock2 und Rac2 zeigen auch Coro1 α und L-Plastin defiziente T-Zellen eine reduzierte Motilität innerhalb der Lymphknoten und eine verminderte Auswanderung aus diesen (Shiow, Roadcap et al. 2008, Morley, Wang et al. 2010, Cyster and Schwab 2012). Da die Auswanderung der aktivierten T-Zellen aus den Lymphknoten einen entscheidenden Schritt in der Pathogenese der aGvHD darstellt, konnte entsprechend auch gezeigt werden, dass Coro1 α defiziente T-Zellen eine vergleichsweise abgeschwächte akute GvHD entwickeln (Fulton, Coghill et al. 2011). Coro1 α scheint bedeutsam für die transendotheliale Migration und Gewebeinfiltration von Neutrophilen zu sein (Pick, Begandt et al. 2017), wohingegen dessen Bedeutung für die T-Zellinfiltration bisher wenig untersucht ist. L-Plastin ist als Aktin-bindendes Protein insbesondere für die Aktin-Stabilität verantwortlich und reguliert die Polarisierung und Migration in Chemokin-stimulierten T-Zellen (Freeley, O'Dowd et al. 2012).

Zusammenfassend unterstreicht die eingeschränkte Motilität bei Ausfall von Coro1 α , L-Plastin oder Rac2 ebenso wie das Zusammenspiel von Dock2 und RhoGDI2 die Bedeutung dieser Faktoren und deren enge Regulation für die zytoskelettale Reorganisation im Rahmen der T-Zellmigration (Munoz, Biro et al. 2014).

Die zytoskelettale Reorganisation und Motilität der Zellen kann jedoch nicht nur durch T-Zell-, Chemokin- oder Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptorsignalkaskaden beeinflusst werden, sondern auch direkt durch die Interaktion der Zelle mit ihrer Umgebung. Dabei können die bereits erwähnten Integrine auch wie Sinnesorgane und Mechanosensoren der Zellen fungieren und mit Hilfe von *Outside-In* Signalkaskaden wichtige Informationen über die Umgebung direkt ins Zellinnere weiterleiten (Legate, Wickström et al. 2009, Walling and Kim 2018). Vermittler dieser Signalkaskade sind unter anderem Paxillin, Talin, und der Src/FAK Komplex, welche zusammen mit VAV, Rac2, RhoGDI2 (Arghdib), Dock2, WASp und Arp2/3 (ACTR3b) abhängig von äußeren Stimuli die dynamische Regulation von Fokalkontakten und Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts steuern (Abram and Lowell 2009, Liu, Wang et al. 2019). Darüber hinaus kann durch Integrin-EZM-Interaktionen auch die direkte Weiterleitung von Kräften von der Umgebung auf das intrazelluläre Aktin Zytoskelett erfolgen (Walling and Kim 2018).

Diskussion

Eine weitere wichtige Verbindung zwischen Integrinen und Zytoskelett stellt der Parvin- γ -Integrin-Linked-Kinase (ILK) Komplex dar (Wickström, Lange et al. 2010). Dieser sich insbesondere am führenden Zellpol befindende Komplex ist für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität sowie der Interaktion dieser mit dem Substrat und somit für die Zellmotilität und Migration von entscheidender Bedeutung (Yoshimi, Yamaji et al. 2006). Entsprechend ihrer Bedeutung für die Zellmigration zeigen ILK defiziente Zellen auch eine reduzierte Chemotaxis (Liu, Sinha et al. 2005). Interessanterweise zeigen Parvin- $\gamma^{-/-}$ T-Zellen eine normale Einwanderung in Lymphknoten, was eine wesentliche Rolle für die transendotheliale Migration unwahrscheinlich macht (Chu, Thievensen et al. 2006). Das ILK-aktivierende Gen *Lmd2* (Peng, Talebzadeh-Farrooji et al. 2014) und das nur auf T-Zellen und monozytären Zellen exprimierte Parvin- γ zeigen beide eine deutlich erhöhte Expression nahe der PP während der aGvHD. Dies ist als ein weiteres Indiz für das hohe Maß an Zellmotilität nahe der PP zu sehen.

Zusammenfassend zeigen die T-Zellen nahe der PP, entsprechend der vermehrten Expression T-Zellrezeptor assoziierter Signalproteine (CD3z, LAT, Lck, ZAP70, etc.) und Expression von Markern wie CD69, einen hoch aktivierten Phänotyp. Gleichzeitig weist die hohe Abundanz an Regulatoren der zytoskelettalen Umstrukturierung und Zellfortbewegung (Rac2, Dock2, Coro1 α , Parvin- γ , etc.) auf den hoch-motilen Charakter dieser Zellen hin. Die anteilmäßig eher geringe Expression von Coro1 α und Parvin- γ auf T-Zellen nahe der PP ist dabei am ehesten dem Untersuchungszeitpunkt (Tag 4 nach allogener SZT) geschuldet. So beginnt die direkte Auswanderung der aktivierten und hoch-motilen T-Zellen in die *Lamina Propria* nahe der PP bereits zu früheren Zeitpunkten als dem Untersuchungszeitpunkt (s. Abschnitt 5.3). An Tag 4 nach allogener SZT sind somit bereits auch einige T-Zellen aus der Blutbahn über transendotheliale Migration in die *Lamina Propria* nahe der PP infiltriert, was beispielsweise auch an der vermehrten Expression von PSGL-1 zu erkennen ist.

Die zytoskelettale Reorganisation durch Dock2, Rac2 und Coro1 α sowie die Zell-EZM-Interaktionen durch Integrine und ihre Signalkaskaden sind nicht nur für die während der mesenchymalen Migration entscheidende Lamellipodium Formierung und Ausbildung von Fokalkontakten notwendig (Hall 1998, Föger, Rangell et al. 2006, Steffen, Ladwein et al. 2013). Die genannten Faktoren und Signalwege sind ebenso ausschlaggebend für die zelluläre Verformbarkeit und Interaktion mit der Umgebung im Rahmen der durch das Interstitium gleitenden und sich durch die extrazelluläre Matrix

zwängenden amoeboiden Migration (Friedl and Weigelin 2008, Lämmermann, Bader et al. 2008). Für einige Faktoren der zytoskelettalen Reorganisation wie Dock2 und Parvin- γ konnte bereits gezeigt werden, dass diese entbehrlich für die transendotheliale T-Zellmigration sind und somit möglicherweise entscheidende Mediatoren der direkten Migration darstellen.

Ein Schwachpunkt der RNA Sequenzierung ist das die gefundenen Transkripte nicht ihrem jeweiligen ursprünglichen Zelltyp zugeordnet werden können. Außerdem wird hierdurch nur das Transkriptom, also die Gesamtheit der vorhandenen Proteinbaupläne abgebildet, nicht aber deren tatsächliche Expression. Durch Immunfluoreszenzfärbungen oder durchflusszytometrische Analysen konnte jedoch für einige der detektierten Faktoren die tatsächliche Expression auf T-Zellen während der aGvHD direkt nachgewiesen werden.

5.7. T-Zellen nahe der PP zeigen eine vermehrte Expression von CCR5, CCR9 und Integrin $\alpha 4\beta 7$

Die Bedeutung von CCR5 und CCR9 für die T-Zellmigration während der aGvHD wurde schon häufig beschrieben (Murai, Yoneyama et al. 2003, Wysocki, Panoskaltsis-Mortari et al. 2005, Inamoto, Murata et al. 2010, Palmer, Sale et al. 2010). Spender T-Zellen nahe der PP weisen an Tag 3,5 nach allogener SZT eine höhere Expression von CCR5, CCR9 und Integrin $\alpha 4\beta 7$ als T-Zellen fern der PP auf. Auffällig ist dabei insbesondere, dass nahe der PP sogar mehr Spender T-Zellen CCR5 exprimieren als innerhalb der PP.

Bereits in die *Lamina Propria* infiltrierte T-Zellen können über die Produktion von CCL4 weitere, insbesondere CD8⁺ Spender T-Zellen anziehen (Cook, Smithies et al. 1999). Dieser bereits für andere GvHD Zielorgane beschriebene Effekt (Serody, Burkett et al. 2000) ist wohlmöglich auch ein wesentlicher Treiber zur Etablierung des intestinalen T-Zellgradienten. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass die Blockierung von CCR5 eine spezifische Möglichkeit zur Prophylaxe der intestinalen GvHD darstellt (Reshef, Luger et al. 2012, Moy, Huffman et al. 2017). Die detektierte hohe Koexpression von CCR9 auf CCR5⁺ Spender T-Zellen erklärt aber auch, warum durch die alleinige Blockierung eines Chemokinrezeptors über Escapemechanismen dennoch eine schwere aGvHD entstehen kann. Darüber hinaus ist CCR5 auch für die Migration regulatorischer T-Zellen zu den Lymphgeweben und GvHD Zielorganen von großer Bedeutung und stellt somit auch einen wichtigen gegenregulatorischen Faktor der GvHD dar (Wysocki, Jiang et al. 2005).

Diskussion

Das Integrin $\alpha 4\beta 7$ wird insbesondere von aus den PP stammenden $CD8^+$ Spender T-Zellen hochreguliert und ist ein wichtiger Mediator der intestinalen T-Zellinfiltration während der akuten intestinalen GvHD (Chen, McDonough et al. 2013). Integrin $\alpha 4\beta 7$ kann neben MAdCAM-1 auch an das in der EZM enthaltene Fibronectin binden (Rüegg, Postigo et al. 1992) und könnte somit auch eine interstitielle Migration der Spender T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* entlang der EZM fördern. Durch die Produktion von Retinsäure durch Vitamin A verstoffwechselnde Enzyme in den PP wird die Expression von Integrin $\alpha 4\beta 7$ und CCR9 auf den hier aktivierten Spender T-Zellen verstärkt (Iwata, Hirakiyama et al. 2004). Der dadurch geprägte spezifische Darm-Tropismus der aktivierten Spender T-Zellen stellt einen weiteren Angriffspunkt zur Therapie der intestinalen GvHD dar (Aoyama, Saha et al. 2013). Entsprechend der Bedeutung für die Entwicklung einer akuten intestinalen GvHD wurde die Blockade von Integrin $\alpha 4\beta 7$ in Studien bereits erfolgreich zur Therapie dieser eingesetzt (Danylesko, Bukauskas et al. 2019). Eine ebenso in Betracht kommende Inhibierung von CCR9 birgt das Risiko über eine Verminderung CCR9 exprimierender tolerogener, plasmazytoider dendritischer Zellen die GvHD weiter zu verstärken (Hadeiba, Sato et al. 2008).

Vergleichbar mit Integrin $\alpha 4\beta 7$ wird auch Integrin $\alpha E\beta 7$ (CD103) während der akuten GvHD insbesondere auf in den PP aktivierten $CD8^+$ Spender T-Zellen exprimiert (Beilhack, Schulz et al. 2008) und zeigt eine tendenziell höhere Expression auf Spender T-Zellen nah im Vergleich zu fern der PP. Die TGF- β abhängige Expression von Integrin $\alpha E\beta 7$ auf $CD8^+$ Spender T-Zellen führt dabei zu einer vermehrten Retention dieser Zellen in der *Lamina Propria* (El-Asady, Yuan et al. 2005), was die Ausbildung des intestinalen T-Zellgradienten weiter begünstigt. Die Verstärkung der intestinalen GvHD durch die vermehrte Retention von $CD8^+$ Spender T-Zellen, macht Integrin $\alpha E\beta 7$ auch zu einer möglichen Zielstruktur für die GvHD Therapie und Prophylaxe (Anthony, Hamadani et al. 2011). Allerdings weisen insbesondere Integrin $\alpha E\beta 7^+$ $CD4^+$ regulatorische T-Zellen auch einen lindernden Effekt auf die chronische GvHD auf (Zhao, Zhang et al. 2008).

Im Gegensatz zu den anderen Integrinen wird Integrin αL ($\alpha L\beta 2$, LFA-1) vor allem auf den Spender T-Zellen in der Milz und in *Lamina Propria* Bereichen fern der PP exprimiert und spielt demnach insbesondere für die nachfolgende vaskuläre Infiltration in den Darm eine Rolle (Luster, Alon et al. 2005). Durch

die Blockierung von Integrin α L β 2 konnte in Studien auch bereits eine GvHD Minderung, wenn auch mit weniger durchschlagendem Erfolg, erzielt werden (Yusuf-Makagiansar, Anderson et al. 2002, Wang, Li et al. 2009).

Obwohl die interstitielle Migration von Leukozyten meist als amoeboid, integrin-unabhängige Migration beschrieben wird, zeigen manche Studien dies nur für steady state Bedingungen und dendritische Zellen (Lämmermann, Bader et al. 2008). Insbesondere für T-Zellen wurde jedoch bereits die Bedeutung der Integrine für die mesenchymale, interstitielle Migration während der Inflammation gezeigt (Overstreet, Gaylo et al. 2013, Kim 2014).

5.8. Die während der frühen aGvHD ausgeglichene CD4/CD8 T-Zellratio nahe der PP geht rasch in eine CD8 Dominanz über

Während der frühen GvHD zeigen sich an Tag 3,5 nach allogener SZT in *Lamina Propria* Bereichen fern der PP signifikant mehr CD8⁺ als CD4⁺ Spender T-Zellen. Der Anteil an CD8⁺ Spender T-Zellen ist zudem zwischen den Bereichen nah und fern der PP nicht signifikant unterschiedlich. Die zu diesem Zeitpunkt bereits vereinzelt vaskulär in den Darm infiltrierenden T-Zellen scheinen demnach insbesondere CD8⁺ Spender T-Zellen zu sein. Nahe der PP zeigt sich während der frühen GvHD eine ausgeglichene CD4 zu CD8 Ratio mit einem signifikant höheren Anteil an CD4⁺ Spender T-Zellen als fern der PP und sogar als innerhalb der PP selbst. Dies ist entweder dadurch zu erklären, dass die direkt aus den PP auswandernden Spender T-Zellen zu diesem Zeitpunkt vor allem CD4⁺ Spender T-Zellen sind oder dass vaskulär infiltrierende CD4⁺ Spender T-Zellen insbesondere in Bereichen nahe der PP in die *Lamina Propria* einwandern.

Mit Fortschreiten der GvHD zeigt sich an Tag 4 nach allogener SZT fern der PP ein ausgeglichenes CD4 zu CD8 Verhältnis. Dies ist am ehesten auf eine gleichmäßigere Infiltration beider Spender T-Zelltypen über die Blutbahn in die *Lamina Propria* zurückzuführen. Dagegen stellt sich nahe der PP während der frühen Effektorphase (Tag 4 nach allogener SZT) ein Überwiegen der CD8⁺ Spender T-Zellen ein. Die späte Effektorphase der intestinalen GvHD ist gekennzeichnet von einer massiven Infiltration insbesondere CD8 geprägter Spender T-Zellen in die *Lamina Propria* (Schattenfroh, Hoffman et al. 1995). Diese Infiltration von CD8⁺ Spender T-Zellen scheint nahe der PP früher zu beginnen als in Bereichen fern der PP, was auf eine vermehrte direkte Migration

von nun insbesondere CD8⁺ Spender T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* zurückzuführen sein könnte. Alternativ könnte auch eine vaskuläre Infiltration selektiv in *Lamina Propria* Bereiche nahe der PP durch CD8⁺ Spender T-Zellen stattfinden. Beide Theorien würden das Entstehen des frühen, insbesondere CD8 geprägten, intestinalen T-Zellgradienten erklären.

Die Beobachtungen lassen sich auch mit der von Beilhack, Schulz et al. (2005) beschriebenen Kinetik in einem ähnlichen MHC-inkompatiblen Mausmodell (FVB/N nach BALB/c) vergleichen. Die Initiationsphase der GvHD ist eine insbesondere durch CD4⁺ Spender T-Zellen geprägte Phase. Entsprechend scheinen die ersten den Darm infiltrierenden Spender T-Zellen insbesondere CD4⁺ T-Zellen zu sein. Auch hier wurde diese frühe Infiltration insbesondere in Darmbereichen nahe der PP beobachtet. Aus bereits anfangs diskutierten Gründen scheint sich in unserem Mausmodell eine noch rapidere GvHD Kinetik zu zeigen, was unter anderem an dem frühen Versterben der Mäuse zu erkennen ist. Aufgrund dessen zeigen sich auch an Tag 3,5 nach allogener SZT bereits CD8⁺ Spender T-Zellen der Effektorphase in der *Lamina Propria*.

5.9. Die *Lamina Propria* infiltrierenden T-Zellen exprimieren die kostimulatorischen Marker CD27 und CD2

Die mit zunehmender Entfernung zu den PP an Tag 3,5 nach allogener SZT anteilmäßig höhere CD27 Expression auf T Zellen lässt auf eine Herkunft dieser Zellen aus der Blutbahn schließen. Entsprechend wird CD27 dabei vor allem auf T-Zellen in der Milz und insbesondere auf CD8⁺ Spender T-Zellen exprimiert. Mit Fortschreiten der GvHD kehren sich diese Verhältnisse um mit einer höheren Expression von CD27 auf Spender T-Zellen nahe der PP. Die Zunahme der CD27 Expression nahe der PP könnte demnach auf eine selektive vaskuläre Infiltration dieser *Lamina Propria* Bereiche durch CD27⁺ Spender T-Zellen, welche in anderen SLO wie der Milz aktiviert wurden, zurückzuführen sein. Weiterhin könnten CD27⁺ Spender T-Zellen aber auch zu späteren Zeitpunkten direkt aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* einwandern. Für letzteres spricht unter anderem die deutlich ansteigende Anzahl an CD27⁺ Spender T-Zellen in den PP mit Fortschreiten der GvHD.

Obwohl die Stimulation von CD27 durch CD70 die Expansion und zytotoxische Aktivität antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen steigert (Arens, Schepers et al. 2004), zeigen CD70 defiziente Empfänger Mäuse eine stärkere

Diskussion

GvHD. Die unterschiedlichen Effekte können unter anderem durch die von der Antigen Last abhängigen Überleben- oder Apoptose-induzierenden Effekte der CD27/CD70 Kostimulation erklärt werden (Wensveen, Unger et al. 2012).

Für im peripheren Blut zirkulierende CCR9⁺ CD4⁺ T-Zellen mit mucosalem Phänotyp wurde bereits gezeigt, dass diese durch eine Stimulation über CD2 vermehrt IFN- γ und IL-10 produzieren können (Papadakis, Landers et al. 2003). Die während der akuten GvHD insbesondere in der Milz aktivierten CCR9⁺ CD4⁺ CD2⁺ Spender T-Zellen könnten nach Infiltration der *Lamina Propria* durch Interaktion mit ihrem, ebenfalls während der aGvHD vermehrt in der *Lamina Propria* exprimierten, Liganden CD48 ein wichtiger Mediator der intestinalen GvHD sein. Entsprechend wurde in Studien bereits die therapeutische Wirkung von anti-CD2 Antikörpern oder neutralisierender Fusionsproteine wie Alefacept für die refraktäre akute und chronische GvHD gezeigt (Przepiorka, Phillips et al. 1998, Shapira, Abdul-Hai et al. 2009).

Darüber hinaus wiesen auch die kostimulatorischen Marker OX40 und 4-1BB eine vermehrte Expression während der akuten GvHD auf. 4-1BB zeigt dabei eine höhere Expression in *Lamina Propria* Bereichen nahe im Vergleich zu fern der PP. Die Interaktion von OX40 und 4-1BB mit ihren ebenfalls während der GvHD vermehrt exprimierten Liganden (OX40L/4-1BBL) verstärkt die durch die CD4⁺ und CD8⁺ Spender T-Zellen vermittelte GvHD induzierte Letalität (Blazar, Kwon et al. 2001, Blazar, Sharpe et al. 2003). OX40 konnte sich zudem bereits als suffizienter diagnostischer Marker für bildgebende Untersuchungen zur frühen Diagnose der akuten GvHD, beispielsweise mittels Immuno-PET, erweisen (Alam, Simonetta et al. 2020).

Dies öffnet den Raum für zukünftige Untersuchungen bezüglich der Bedeutung der kostimulatorischen Marker CD2 und CD27 für die akute GvHD und für neue therapeutische sowie diagnostische Möglichkeiten.

5.10. CXCL11 und CCL4 fördern die Migration von Spender T-Zellen

Sowohl das zur Gruppe der IFN- γ -induzierbaren Chemokine (CXCL9, CXCL10, CXCL11) zählende CXCL11 als auch CCL4 als Vertreter der Makrophagen inflammatorischen Proteine (MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4) fördern die Migration *in vivo* aktivierter Spender T-Zellen während der akuten GvHD (Duffner, Lu et al. 2003, Bouazzaoui, Spacenko et al. 2009). Dabei konnte in unseren Migrationsversuchen gezeigt werden, dass CXCL11 und CCL4 neben der transendothelialen Migration auch eine mesenchymale Migration aktivierter Spender T-Zellen entlang von Kollagen fördern können. Entsprechend verdeutlicht dies eine mögliche Rolle der Chemotaxis für die direkte Migration der Spender T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria*. Dabei werden die CXCR3⁺ Spender T-Zellen durch CXCL11 chemotaktisch früher beeinflusst als CCR5⁺ Spender T-Zellen durch CCL4. Dies zeigt, dass entsprechend der eingangs beschriebenen sequenziellen transendothelialen Infiltration des Darmes (Wysocki, Panoskaltsis-Mortari et al. 2005) auch die Darminfiltration durch direkte Migration sequenziell, vermutlich initial durch CXCR3 und anschließend auch durch CCR4, gestützt wird. Die Migrationsversuche unterstreichen zudem die teilweise gemeinsamen Mechanismen für die transendotheliale und direkte Migration, wobei insbesondere die Bedeutung der vorher beschriebenen intrazellulären Regulatoren weiter funktionell untersucht werden sollte.

Zusammenfassend sollte die direkte Migration demnach nicht als funktionell eigenständiger Mechanismus der Darminfiltration, sondern viel mehr als Alternativroute für das intestinale T-Zell-Homing der in den PP aktivierten Spender T-Zellen gesehen werden.

Eine Einschränkung der Migrationsversuche ist, dass die während der GvHD aktivierten Spender T-Zellen aufgrund der schwierigen Isolation *in vivo* stimulierter T-Zellen aus den PP nur aus den mesenterischen Lymphknoten isoliert werden konnten. Auch wenn diese ein ähnliches inflammatorisches Milieu aufweisen, sollte eine weitere Analyse mit aus den PP isolierten aktivierten Spender T-Zellen in einer die EZM abbildenden dreidimensionalen Matrix erfolgen.

6. Konklusion

In den PP aktivierte und maßgeblich für die T-Zellinfiltration des Darmes verantwortliche Spender T-Zellen wandern nicht nur über die Blutbahn und transendotheliale Migration in den Darm ein, sondern können auch auf direktem Wege von den PP in die angrenzende *Lamina Propria* migrieren. Für das intestinale T-Zell-Homing während der akuten GvHD sind dabei unabhängig von der Migrationsroute initial besonders die IFN- γ -induzierbaren Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 verantwortlich. Die direkt migrierenden Spender T-Zellen scheinen gekennzeichnet zu sein durch einen aktivierten und hoch-motilen Phänotyp. Insbesondere die intrazellulären Regulatoren der zytosekelettalen Reorganisation Dock2, Coro1 α und Parvin- γ scheinen hierfür von besonderer Bedeutung zu sein. Neben der durch Chemotaxis und Integrine vermittelten mesenchymalen Migration könnten diese insbesondere eine amoeboid Migration der Spender T-Zellen aus den PP in die *Lamina Propria* fördern.

Die zu einem frühen Zeitpunkt der intestinalen GvHD direkt einwandernden T-Zellen fungieren vermutlich als eine Art Pionier-Zellen und können durch die Produktion von Chemokinen wie CCL3, CCL4 und CCL5 die sequenzielle Infiltration weiterer Spender T-Zellen in den Darm verstärken. Diese insbesondere durch CCR5 und CCR9 sowie die Intgerine $\alpha 4\beta 7$ und $\alpha E\beta 7$ vermittelte sequenzielle Infiltration kann ebenfalls sowohl durch transendotheliale wie auch direkte Migration erfolgen. Die im Verlauf zunehmend transendothelial infiltrierenden insbesondere CD8⁺ Spender T-Zellen aus der systemischen Zirkulation sind vor allem durch eine hohe Expression von CD27 und Integrin $\alpha L\beta 2$ gekennzeichnet.

Aufgrund des initiierenden und potenzierenden Effektes erscheint die direkte Migration von aktivierten T-Zellen aus den PP in die angrenzende *Lamina Propria* für die intestinale Inflammation ein ausschlaggebender Mechanismus zu sein. Diese Alternativroute sollte daher für zukünftige therapeutische Konzepte zur Behandlung der akuten intestinalen GvHD und intestinalen Inflammation im Allgemeinen unbedingt Berücksichtigung finden.

7. Literaturverzeichnis

Abram, C. L. and C. A. Lowell (2009). "The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling." Annual Review of Immunology **27**(1): 339-362.

Alam, I. S., F. Simonetta, L. Scheller, A. T. Mayer, S. Murty, O. Vermesh, T. W. Nobashi, J. K. Lohmeyer, T. Hirai and J. Baker (2020). "Visualization of Activated T Cells by OX40-ImmunoPET as a Strategy for Diagnosis of Acute Graft-versus-Host Disease." Cancer Research **80**(21): 4780-4790.

Ansel, K. M., V. N. Ngo, P. L. Hyman, S. A. Luther, R. Förster, J. D. Sedgwick, J. L. Browning, M. Lipp and J. G. Cyster (2000). "A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles." Nature **406**(6793): 309-314.

Anthony, B., M. Hamadani, J.-J. Wang, A. Gaughan and G. Hadley (2011). "CD103 blockade reduces CD8 T cell accumulation during GVHD, but does not attenuate GVL effects. (169.35)." The Journal of Immunology **186**(1 Supplement): 169.135-169.135.

Aoyama, K., A. Saha, J. Tolar, M. J. Riddle, R. G. Veenstra, P. A. Taylor, R. Blomhoff, A. Panoskaltsis-Mortari, C. A. Klebanoff, G. Socié, D. H. Munn, W. J. Murphy, J. S. Serody, L. M. Fulton, T. Teshima, R. A. Chandraratna, E. Dmitrovsky, Y. Guo, R. J. Noelle and B. R. Blazar (2013). "Inhibiting retinoic acid signaling ameliorates graft-versus-host disease by modifying T-cell differentiation and intestinal migration." Blood **122**(12): 2125-2134.

Arens, R., K. Schepers, M. A. Nolte, M. F. van Oosterwijk, R. A. W. van Lier, T. N. M. Schumacher and M. H. J. van Oers (2004). "Tumor Rejection Induced by CD70-mediated Quantitative and Qualitative Effects on Effector CD8+ T Cell Formation." Journal of Experimental Medicine **199**(11): 1595-1605.

Barnes, S. L., A. Vidrich, M. L. Wang, G. D. Wu, F. Cominelli, J. Rivera-Nieves, G. Bamias and S. M. Cohn (2007). "Resistin-like molecule beta (RELMbeta/FIZZ2) is highly expressed in the ileum of SAMP1/YitFc mice and is associated with initiation of ileitis." J Immunol **179**(10): 7012-7020.

Bäuerlein, C. A., S. S. Riedel, J. Baker, C. Brede, A.-L. J. Garrote, M. Chopra, M. Ritz, G. F. Beilhack, S. Schulz, R. Zeiser, P. G. Schlegel, H. Einsele, R. S. Negrin and A. Beilhack (2013). "A diagnostic window for the treatment of acute graft-versus-host disease prior to visible clinical symptoms in a murine model." BMC Medicine **11**(1): 134.

Beilhack, A., S. Schulz, J. Baker, G. F. Beilhack, R. Nishimura, E. M. Baker, G. Landan, E. I. Herman, E. C. Butcher, C. H. Contag and R. S. Negrin (2008). "Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs." Blood **111**(5): 2919-2928.

- Beilhack, A., S. Schulz, J. Baker, G. F. Beilhack, C. B. Wieland, E. I. Herman, E. M. Baker, Y.-A. Cao, C. H. Contag and R. S. Negrin (2005). "In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets." Blood **106**(3): 1113-1122.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological) **57**(1): 289-300.
- Billadeau, D. D., J. C. Nolz and T. S. Gomez (2007). "Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton." Nature Reviews Immunology **7**(2): 131-143.
- Blattman, J. N., R. Antia, D. J. Sourdive, X. Wang, S. M. Kaech, K. Murali-Krishna, J. D. Altman and R. Ahmed (2002). "Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells." J Exp Med **195**(5): 657-664.
- Blazar, B. R., B. S. Kwon, A. Panoskaltis-Mortari, K. B. Kwak, J. J. Peschon and P. A. Taylor (2001). "Ligation of 4-1BB (CDw137) Regulates Graft-Versus-Host Disease, Graft-Versus-Leukemia, and Graft Rejection in Allogeneic Bone Marrow Transplant Recipients." The Journal of Immunology **166**(5): 3174-3183.
- Blazar, B. R., A. H. Sharpe, A. I. Chen, A. Panoskaltis-Mortari, C. Lees, H. Akiba, H. Yagita, N. Killeen and P. A. Taylor (2003). "Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients." Blood **101**(9): 3741-3748.
- Bouazzaoui, A., E. Spacenko, G. Mueller, S. Miklos, E. Huber, E. Holler, R. Andreesen and G. C. Hildebrandt (2009). "Chemokine and chemokine receptor expression analysis in target organs of acute graft-versus-host disease." Genes & Immunity **10**(8): 687-701.
- Brok, H. P., P. J. Heidt, P. H. van der Meide, C. Zurcher and J. M. Vossen (1993). "Interferon-gamma prevents graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice." J Immunol **151**(11): 6451-6459.
- Brownlie, R. J. and R. Zamoyska (2013). "T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded." Nature Reviews Immunology **13**(4): 257-269.
- Burkhardt, J. K., E. Carrizosa and M. H. Shaffer (2008). "The Actin Cytoskeleton in T Cell Activation." Annual Review of Immunology **26**(1): 233-259.
- Campbell, J. J., G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D. P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu and E. C. Butcher (1999). "The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells." Nature **400**(6746): 776-780.

- Castellino, F., A. Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker and R. N. Germain (2006). "Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell–dendritic cell interaction." Nature **440**(7086): 890-895.
- Chen, E. A., T. Souaiaia, J. S. Herstein, O. V. Evgrafov, V. N. Spitsyna, D. F. Rebolini and J. A. Knowles (2014). "Effect of RNA integrity on uniquely mapped reads in RNA-Seq." BMC research notes **7**: 753-753.
- Chen, Y. B., S. McDonough, H. Chen, J. Kennedy, C. Illiano, E. C. Attar, K. K. Ballen, B. R. Dey, S. L. McAfee, M. Jagasia, R. Soiffer, T. R. Spitzer and J. Ritz (2013). "Expression of $\alpha 4\beta 7$ integrin on memory CD8+ T cells at the presentation of acute intestinal GVHD." Bone Marrow Transplantation **48**(4): 598-603.
- Chen, Z., L. Quan, A. Huang, Q. Zhao, Y. Yuan, X. Yuan, Q. Shen, J. Shang, Y. Ben, F. X.-F. Qin and A. Wu (2018). "seq-ImmuCC: Cell-Centric View of Tissue Transcriptome Measuring Cellular Compositions of Immune Microenvironment From Mouse RNA-Seq Data." Frontiers in Immunology **9**(1286).
- Chu, H., I. Thievensen, M. Sixt, T. Lämmermann, A. Waisman, A. Braun, A. A. Noegel and R. Fässler (2006). " γ -Parvin Is Dispensable for Hematopoiesis, Leukocyte Trafficking, and T-Cell-Dependent Antibody Response." Molecular and Cellular Biology **26**(5): 1817-1825.
- Cook, D. N., O. Smithies, R. M. Strieter, J. A. Frelinger and J. S. Serody (1999). "CD8+ T cells are a biologically relevant source of macrophage inflammatory protein-1 alpha in vivo." J Immunol **162**(9): 5423-5428.
- Cooke, K. R., L. Kobzik, T. R. Martin, J. Brewer, J. Delmonte, Jr., J. M. Crawford and J. L. Ferrara (1996). "An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin." Blood **88**(8): 3230-3239.
- Cooke, K. R., K. Olkiewicz, N. Erickson and J. L. Ferrara (2002). "The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease." J Endotoxin Res **8**(6): 441-448.
- Cox, J., M. Y. Hein, C. A. Luber, I. Paron, N. Nagaraj and M. Mann (2014). "Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ." Molecular & Cellular Proteomics **13**(9): 2513-2526.
- Cox, J. and M. Mann (2008). "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." Nature Biotechnology **26**(12): 1367-1372.
- Cyster, J. G. and S. R. Schwab (2012). "Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs." Annual Review of Immunology **30**(1): 69-94.

- Danylesko, I., A. Bukauskas, M. Paulson, V. Peceliunas, T. Gedde-Dahl d.y, A. Shimoni, R. Shouval, L. Griskevicius, Y. Floisand and A. Nagler (2019). "Anti- $\alpha 4\beta 7$ integrin monoclonal antibody (vedolizumab) for the treatment of steroid-resistant severe intestinal acute graft-versus-host disease." Bone Marrow Transplantation **54**(7): 987-993.
- Davidson, N. J., M. W. Leach, M. M. Fort, L. Thompson-Snipes, R. Kühn, W. Müller, D. J. Berg and D. M. Rennick (1996). "T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice." J Exp Med **184**(1): 241-251.
- de Waal Malefyt, R., H. Yssel and J. E. de Vries (1993). "Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation." J Immunol **150**(11): 4754-4765.
- DKMS. (2021). "Wir besiegen Blutkrebs, Grundlegende Informationen." from <https://www.dkms.de/de/grundlegende-informationen>.
- Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson and T. R. Gingeras (2013). "STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner." Bioinformatics **29**(1): 15-21.
- Dong, H., G. Zhu, K. Tamada and L. Chen (1999). "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion." Nature Medicine **5**(12): 1365-1369.
- Duffner, U., B. Lu, G. C. Hildebrandt, T. Teshima, D. L. Williams, P. Reddy, R. Ordemann, S. G. Clouthier, K. Lowler, C. Liu, C. Gerard, K. R. Cooke and J. L. Ferrara (2003). "Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD." Exp Hematol **31**(10): 897-902.
- Dwinell, M. B., N. Lügering, L. Eckmann and M. F. Kagnoff (2001). "Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells." Gastroenterology **120**(1): 49-59.
- Edinger, M., P. Hoffmann, J. Ermann, K. Drago, C. G. Fathman, S. Strober and R. S. Negrin (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation." Nature Medicine **9**(9): 1144-1150.
- El-Asady, R., R. Yuan, K. Liu, D. Wang, R. E. Gress, P. J. Lucas, C. B. Drachenberg and G. A. Hadley (2005). "TGF- β -dependent CD103 expression by CD8+ T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease." Journal of Experimental Medicine **201**(10): 1647-1657.
- Faroudi, M., M. Hons, A. Zachacz, C. Dumont, R. Lyck, J. V. Stein and V. L. Tybulewicz (2010). "Critical roles for Rac GTPases in T-cell migration to and within lymph nodes." Blood **116**(25): 5536-5547.

- Feng, S., D. Fox and S. M. Man (2018). "Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death." Journal of Molecular Biology **430**(18, Part B): 3068-3080.
- Ferrara, J. L., J. E. Levine, P. Reddy and E. Holler (2009). "Graft-versus-host disease." Lancet **373**(9674): 1550-1561.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Howard, K. W. Moore and A. O'Garra (1991). "IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells." J Immunol **146**(10): 3444-3451.
- Föger, N., L. Rangell, D. M. Danilenko and A. C. Chan (2006). "Requirement for Coronin 1 in T Lymphocyte Trafficking and Cellular Homeostasis." Science **313**(5788): 839-842.
- Förster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Müller, E. Wolf and M. Lipp (1999). "CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs." Cell **99**(1): 23-33.
- Freeley, M., F. O'Dowd, T. Paul, D. Kashanin, A. Davies, D. Kelleher and A. Long (2012). "L-Plastin Regulates Polarization and Migration in Chemokine-Stimulated Human T Lymphocytes." The Journal of Immunology **188**(12): 6357-6370.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood and T. Honjo (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med **192**(7): 1027-1034.
- Friedl, P. and B. Weigelin (2008). "Interstitial leukocyte migration and immune function." Nature Immunology **9**(9): 960-969.
- Fukui, Y., O. Hashimoto, T. Sanui, T. Oono, H. Koga, M. Abe, A. Inayoshi, M. Noda, M. Oike, T. Shirai and T. Sasazuki (2001). "Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration." Nature **412**(6849): 826-831.
- Fulton, L. M., J. Coghill, M. L. West, N. Foger, J. Bear and J. S. Serody (2011). "Impaired Donor T Cell Egress From Recipient Lymphoid Tissue Profoundly Diminishes Acute GvHD." Blood **118**(21): 4022-4022.
- Garcia-Mata, R., E. Boulter and K. Burridge (2011). "The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs." Nature Reviews Molecular Cell Biology **12**(8): 493-504.

Gaud, G., R. Lesourne and P. E. Love (2018). "Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling." Nature Reviews Immunology **18**(8): 485-497.

Giebel, S., M. Labopin, J. Holowiecki, B. Labar, M. Komarnicki, V. Koza, T. Masszi, M. Mistrik, A. Lange, A. Hellmann, A. Vitek, J. Pretnar, J. Mayer, P. Rzepecki, K. Indrak, W. Wiktor-Jedrzejczak, J. Wojnar, M. Krawczyk-Kulis, S. Kyrz-Krzemien and V. Rocha (2009). "Outcome of HLA-matched related allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients with acute leukemia in first complete remission treated in Eastern European centers. Better results in recent years." Annals of Hematology **88**(10): 1005-1013.

Gooley, T. A., J. W. Chien, S. A. Pergam, S. Hingorani, M. L. Sorrow, M. Boeckh, P. J. Martin, B. M. Sandmaier, K. A. Marr, F. R. Appelbaum, R. Storb and G. B. McDonald (2010). "Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation." N Engl J Med **363**(22): 2091-2101.

Griffiths, E. K., C. Krawczyk, Y.-Y. Kong, M. Raab, S. J. Hyduk, D. Bouchard, V. S. Chan, I. Kozieradzki, A. J. Oliveira-dos-Santos and A. Wakeham (2001). "Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap." Science **293**(5538): 2260-2263.

Gunn, M. D., S. Kyuwa, C. Tam, T. Kakiuchi, A. Matsuzawa, L. T. Williams and H. Nakano (1999). "Mice Lacking Expression of Secondary Lymphoid Organ Chemokine Have Defects in Lymphocyte Homing and Dendritic Cell Localization." Journal of Experimental Medicine **189**(3): 451-460.

Gurskaya, N. G., V. V. Verkhusha, A. S. Shcheglov, D. B. Staroverov, T. V. Chepurnykh, A. F. Fradkov, S. Lukyanov and K. A. Lukyanov (2006). "Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light." Nat Biotechnol **24**(4): 461-465.

Hadeiba, H., T. Sato, A. Habtezion, C. Oderup, J. Pan and E. C. Butcher (2008). "CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease." Nature Immunology **9**(11): 1253-1260.

Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-514.

Harris, A. C., R. Young, S. Devine, W. J. Hogan, F. Ayuk, U. Bunworasate, C. Chanswangphuwana, Y. A. Efebera, E. Holler, M. Litzow, R. Ordemann, M. Qayed, A. S. Renteria, R. Reshef, M. Wölfl, Y. B. Chen, S. Goldstein, M. Jagasia, F. Locatelli, S. Mielke, D. Porter, T. Schechter, Z. Shekhovtsova, J. L. Ferrara and J. E. Levine (2016). "International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium." Biol Blood Marrow Transplant **22**(1): 4-10.

Harris, T. H., E. J. Banigan, D. A. Christian, C. Konradt, E. D. Tait Wojno, K. Norose, E. H. Wilson, B. John, W. Weninger, A. D. Luster, A. J. Liu and C. A. Hunter (2012). "Generalized Lévy walks and the role of chemokines in migration of effector CD8⁺ T cells." Nature **486**(7404): 545-548.

Herzenberg, L. A., J. Tung, W. A. Moore, L. A. Herzenberg and D. R. Parks (2006). "Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed." Nature Immunology **7**(7): 681-685.

Hill, G. R., J. M. Crawford, K. R. Cooke, Y. S. Brinson, L. Pan and J. L. Ferrara (1997). "Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines." Blood **90**(8): 3204-3213.

Hill, L., A. Alousi, P. Kebriaei, R. Mehta, K. Rezvani and E. Shpall (2018). "New and emerging therapies for acute and chronic graft versus host disease." Ther Adv Hematol **9**(1): 21-46.

Hogan, S. P., L. Seidu, C. Blanchard, K. Groschwitz, A. Mishra, M. L. Karow, R. Ahrens, D. Artis, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos and M. E. Rothenberg (2006). "Resistin-like molecule beta regulates innate colonic function: barrier integrity and inflammation susceptibility." J Allergy Clin Immunol **118**(1): 257-268.

Hogg, N., I. Patzak and F. Willenbrock (2011). "The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function." Nature Reviews Immunology **11**(6): 416-426.

Hubbard, A. K. and R. Rothlein (2000). "Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades." Free Radical Biology and Medicine **28**(9): 1379-1386.

Hugues, S., A. Scholer, A. Boissonnas, A. Nussbaum, C. Combadière, S. Amigorena and L. Fetler (2007). "Dynamic imaging of chemokine-dependent CD8⁺ T cell help for CD8⁺ T cell responses." Nature Immunology **8**(9): 921-930.

Inamoto, Y., M. Murata, A. Katsumi, Y. Kuwatsuka, A. Tsujimura, Y. Ishikawa, K. Sugimoto, M. Onizuka, S. Terakura, T. Nishida, T. Kanie, H. Taji, H. Iida, R. Suzuki, A. Abe, H. Kiyoi, T. Matsushita, K. Miyamura, Y. Kodera and T. Naoe (2010). "Donor single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD." Bone Marrow Transplantation **45**(2): 363-369.

Iwata, M., A. Hirakiyama, Y. Eshima, H. Kagechika, C. Kato and S. Y. Song (2004). "Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells." Immunity **21**(4): 527-538.

Jarick, K. J. (2019). Migration of allogenic T cells in intestinal lymphoid structures during acute Graft-versus-Host Disease. Doctoral Thesis Doctoral thesis for a doctoral degree at the Graduate School of Life Sciences, Section Infection and Immunity, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Germany

- Jarick, K. J., Z. Mokhtari, L. Scheller, J. Hartweg, S. Thusek, D.-D. Le, M. Ranecky, H. Shaikh, M. Qureishi, K. G. Heinze and A. Beilhack (2018). "Photoconversion of Alloreactive T Cells in Murine Peyer's Patches During Acute Graft-Versus-Host Disease: Tracking the Homing Route of Highly Proliferative Cells In Vivo." Frontiers in Immunology **9**(1468).
- Jasperson, L. K., C. Bucher, A. Panoskaltsis-Mortari, A. L. Mellor, D. H. Munn and B. R. Blazar (2009). "Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality." Blood **114**(24): 5062-5070.
- Johansson, J. E., M. Brune and T. Ekman (2001). "The gut mucosa barrier is preserved during allogeneic, haemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning." Bone Marrow Transplant **28**(8): 737-742.
- Jung, C., J.-P. Hugot and F. Barreau (2010). "Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine." International Journal of Inflammation **2010**: 823710.
- Kägi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Bürki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner and P. Golstein (1994). "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity." Science **265**(5171): 528-530.
- Katakai, T., K. Habiro and T. Kinashi (2013). "Dendritic Cells Regulate High-Speed Interstitial T Cell Migration in the Lymph Node via LFA-1/ICAM-1." The Journal of Immunology **191**(3): 1188-1199.
- Kehrl, J. H. (2006). "Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration." Immunologic Research **34**(3): 211-227.
- Kim, C. H. (2014). "Crawling of effector T cells on extracellular matrix: role of integrins in interstitial migration in inflamed tissues." Cellular & Molecular Immunology **11**(1): 1-4.
- Kliche, S., T. Worbs, X. Wang, J. Degen, I. Patzak, B. Meineke, M. Togni, M. Moser, A. Reinhold, F. Kiefer, C. Freund, R. Förster and B. Schraven (2012). "CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by 2 independent ADAP/SKAP55 modules." Blood **119**(3): 777-785.
- Koboziev, I., F. Karlsson and M. B. Grisham (2010). "Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation." Ann N Y Acad Sci **1207 Suppl 1**(Suppl 1): E86-93.
- Krenger, W. and J. L. Ferrara (1996). "Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm." Immunol Res **15**(1): 50-73.
- Krummel, M. F., F. Bartumeus and A. Gérard (2016). "T cell migration, search strategies and mechanisms." Nature Reviews Immunology **16**(3): 193-201.
- Krummel, M. F., F. Bartumeus and A. Gérard (2016). "T cell migration, search strategies and mechanisms." Nature Reviews Immunology **16**(3): 193.

- Kühn, R., J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky and W. Müller (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-274.
- Kumari, S., S. Curado, V. Mayya and M. L. Dustin (2014). "T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling." Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1838**(2): 546-556.
- Lämmermann, T., B. L. Bader, S. J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Söldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Förster, D. R. Critchley, R. Fässler and M. Sixt (2008). "Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing." Nature **453**(7191): 51-55.
- Legate, K. R., S. A. Wickström and R. Fässler (2009). "Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling." Genes & development **23**(4): 397-418.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nature Reviews Immunology **7**(9): 678-689.
- Liu, E., S. Sinha, C. Williams, M. Cyrille, E. Heller, S. B. Snapper, K. Georgopoulos, R. St-Arnaud, T. Force, S. Dedhar and R. E. Gerszten (2005). "Targeted Deletion of Integrin-Linked Kinase Reveals a Role in T-Cell Chemotaxis and Survival." Molecular and Cellular Biology **25**(24): 11145-11155.
- Liu, W., X. Wang, S. Wang, X. Ba, T. Xu, X. Wang and X. Zeng (2019). "RhoGDI2 positively regulates the Rho GTPases activation in response to the β 2 outside-in signaling in T cells adhesion and migration on ICAM-1." Journal of Leukocyte Biology **106**(2): 431-446.
- Love, M. I., W. Huber and S. Anders (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." Genome Biology **15**(12): 550.
- Luster, A. D., R. Alon and U. H. von Andrian (2005). "Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets." Nature Immunology **6**(12): 1182-1190.
- Mapara, M. Y., C. Leng, Y. M. Kim, R. Bronson, A. Lokshin, A. Luster and M. Sykes (2006). "Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR." Biol Blood Marrow Transplant **12**(6): 623-634.
- Martin, M. (2011). "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads." 2011 **17**(1): 3.
- Mattsson, J., O. Ringdén and R. Storb (2008). "Graft Failure after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation." Biology of Blood and Marrow Transplantation **14**(1, Supplement): 165-170.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-305.

McKisic, M. D., J. D. Macy, Jr., M. L. Delano, R. O. Jacoby, F. X. Paturzo and A. L. Smith (1998). "Mouse parvovirus infection potentiates allogeneic skin graft rejection and induces syngeneic graft rejection." Transplantation **65**(11): 1436-1446.

Mellado, M., J. M. Rodríguez-Frade, S. Mañes and C. Martínez-A (2001). "Chemokine Signaling and Functional Responses: The Role of Receptor Dimerization and TK Pathway Activation." Annual Review of Immunology **19**(1): 397-421.

Miller, M. J., S. H. Wei, I. Parker and M. D. Cahalan (2002). "Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node." Science **296**(5574): 1869-1873.

Miyasaka, M. and T. Tanaka (2004). "Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas." Nat Rev Immunol **4**(5): 360-370.

Morley, S. C., C. Wang, W.-L. Lo, C.-W. J. Lio, B. H. Zinselmeyer, M. J. Miller, E. J. Brown and P. M. Allen (2010). "The Actin-Bundling Protein L-Plastin Dissociates CCR7 Proximal Signaling from CCR7-Induced Motility." The Journal of Immunology **184**(7): 3628-3638.

Moser, B., M. Wolf, A. Walz and P. Loetscher (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." Trends Immunol **25**(2): 75-84.

Moy, R. H., A. P. Huffman, L. P. Richman, L. Crisalli, X. K. Wang, J. A. Hoxie, R. Mick, S. G. Emerson, Y. Zhang, R. H. Vonderheide, D. L. Porter and R. Reshef (2017). "Clinical and immunologic impact of CCR5 blockade in graft-versus-host disease prophylaxis." Blood **129**(7): 906-916.

Munoz, M. A., M. Biro and W. Weninger (2014). "T cell migration in intact lymph nodes in vivo." Current Opinion in Cell Biology **30**: 17-24.

Murai, M., H. Yoneyama, T. Ezaki, M. Suematsu, Y. Terashima, A. Harada, H. Hamada, H. Asakura, H. Ishikawa and K. Matsushima (2003). "Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction." Nature Immunology **4**(2): 154-160.

Murphy, W. J., V. Kumar, J. C. Cope and M. Bennett (1990). "An absence of T cells in murine bone marrow allografts leads to an increased susceptibility to rejection by natural killer cells and T cells." The Journal of Immunology **144**(9): 3305-3311.

Musso, A., T. P. Condon, G. A. West, C. de la Motte, S. A. Strong, A. D. Levine, C. F. Bennett and C. Focchi (1999). "Regulation of ICAM-1-mediated fibroblast-T cell reciprocal interaction: Implications for modulation of gut inflammation." Gastroenterology **117**(3): 546-556.

Nathan, R., W. M. Getz, E. Revilla, M. Holyoak, R. Kadmon, D. Saltz and P. E. Smouse (2008). "A movement ecology paradigm for unifying organismal

movement research." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(49): 19052-19059.

Nishimura, R., J. Baker, A. Beilhack, R. Zeiser, J. A. Olson, E. I. Segal, M. Karimi and R. S. Negrin (2008). "In vivo trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity." Blood **112**(6): 2563-2574.

Nombela-Arrieta, C. s., T. R. Mempel, S. F. Soriano, I. Mazo, M. P. Wymann, E. Hirsch, C. Martínez-A., Y. Fukui, U. H. von Andrian and J. V. Stein (2007). "A central role for DOCK2 during interstitial lymphocyte motility and sphingosine-1-phosphate-mediated egress." Journal of Experimental Medicine **204**(3): 497-510.

Okada, T. and J. G. Cyster (2007). "CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node." J Immunol **178**(5): 2973-2978.

Overstreet, M. G., A. Gaylo, B. R. Angermann, A. Hughson, Y.-M. Hyun, K. Lambert, M. Acharya, A. C. Billroth-MacLurg, A. F. Rosenberg, D. J. Topham, H. Yagita, M. Kim, A. Lacy-Hulbert, M. Meier-Schellersheim and D. J. Fowell (2013). "Inflammation-induced interstitial migration of effector CD4⁺ T cells is dependent on integrin α V." Nature Immunology **14**(9): 949-958.

Owen, R. L. (1977). "Sequential Uptake of Horseradish Peroxidase by Lymphoid Follicle Epithelium of Peyer's Patches in the Normal Unobstructed Mouse Intestine: An Ultrastructural Study." Gastroenterology **72**(3): 440-451.

Palmer, L. A., G. E. Sale, J. I. Balogun, D. Li, D. Jones, J. J. Molldrem, R. F. Storb and Q. Ma (2010). "Chemokine Receptor CCR5 Mediates AlloImmune Responses in Graft-versus-Host Disease." Biology of Blood and Marrow Transplantation **16**(3): 311-319.

Papadakis, K. A., C. Landers, J. Prehn, E. A. Kouroumalis, S. T. Moreno, J.-C. Gutierrez-Ramos, M. R. Hodge and S. R. Targan (2003). "CC Chemokine Receptor 9 Expression Defines a Subset of Peripheral Blood Lymphocytes with Mucosal T Cell Phenotype and Th1 or T-Regulatory 1 Cytokine Profile." The Journal of Immunology **171**(1): 159-165.

Papadakis, K. A., J. Prehn, V. Nelson, L. Cheng, S. W. Binder, P. D. Ponath, D. P. Andrew and S. R. Targan (2000). "The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system." J Immunol **165**(9): 5069-5076.

Peng, H., M. Talebzadeh-Farooji, M. J. Osborne, J. W. Prokop, P. C. McDonald, J. Karar, Z. Hou, M. He, E. Kebebew, T. Orntoft, M. Herlyn, A. J. Caton, W. Fredericks, B. Malkowicz, C. S. Paterno, A. S. Carolin, D. W. Speicher, E. Skordalakes, Q. Huang, S. Dedhar, K. L. B. Borden and F. J. Rauscher (2014). "LIMD2 Is a Small LIM-Only Protein Overexpressed in Metastatic Lesions That

Regulates Cell Motility and Tumor Progression by Directly Binding to and Activating the Integrin-Linked Kinase." Cancer Research **74**(5): 1390-1403.

Pham, T. H., T. Okada, M. Matloubian, C. G. Lo and J. G. Cyster (2008). "S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress." Immunity **28**(1): 122-133.

Pick, R., D. Begandt, T. J. Stocker, M. Salvermoser, S. Thome, R. T. Böttcher, E. Montanez, U. Harrison, I. Forné, A. G. Khandoga, R. Coletti, L. T. Weckbach, D. Brechtefeld, R. Haas, A. Imhof, S. Massberg, M. Sperandio and B. Walzog (2017). "Coronin 1A, a novel player in integrin biology, controls neutrophil trafficking in innate immunity." Blood **130**(7): 847-858.

Plotkin, J., S. E. Prockop, A. Lepique and H. T. Petrie (2003). "Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus." J Immunol **171**(9): 4521-4527.

Pribila, J. T. and J. Shimizu (2003). "Signal transduction events regulating integrin function and T cell migration." Immunologic Research **27**(1): 107-128.

Przepiorka, D., G. L. Phillips, V. Ratanatharathorn, M. Cottler-Fox, L. H. Sehn, J. H. Antin, D. LeBherz, M. Awwad, J. Hope and J. B. McClain (1998). "A Phase II Study of BTI-322, a Monoclonal Anti-CD2 Antibody, for Treatment of Steroid-Resistant Acute Graft-Versus-Host Disease." Blood **92**(11): 4066-4071.

Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser and C. R. Mackay (1998). "The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions." J Clin Invest **101**(4): 746-754.

Rappsilber, J., Y. Ishihama and M. Mann (2003). "Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics." Anal Chem **75**(3): 663-670.

Reddehase, M. J., L. Dreher-Stumpp, P. Angele, M. Balthesen and M. Šušá (1992). "Hematopoietic stem cell deficiency resulting from cytomegalovirus infection of bone marrow stroma." Annals of Hematology **64**(1): A125-A127.

Reddy, P., R. Negrin and G. R. Hill (2008). "Mouse models of bone marrow transplantation." Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation **14**(1 Suppl 1): 129-135.

Reshef, R., S. M. Luger, E. O. Hexner, A. W. Loren, N. V. Frey, S. D. Nasta, S. C. Goldstein, E. A. Stadtmauer, J. Smith, S. Bailey, R. Mick, D. F. Heitjan, S. G. Emerson, J. A. Hoxie, R. H. Vonderheide and D. L. Porter (2012). "Blockade of Lymphocyte Chemotaxis in Visceral Graft-versus-Host Disease." New England Journal of Medicine **367**(2): 135-145.

RKI. (2021). "Zentrum für Krebsregisterdaten, Krebsarten." from https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html.

Romagnani, P., F. Annunziato, E. Lazzeri, L. Cosmi, C. Beltrame, L. Lasagni, G. Galli, M. Francalanci, R. Manetti, F. Marra, V. Vanini, E. Maggi and S. Romagnani (2001). "Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta+ CD8+ single-positive T cells, TCRgammadelta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus." Blood **97**(3): 601-607.

Rüegg, C., A. A. Postigo, E. E. Sikorski, E. C. Butcher, R. Pytela and D. J. Erle (1992). "Role of integrin alpha 4 beta 7/alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering." J Cell Biol **117**(1): 179-189.

Rus, V., A. Svetic, P. Nguyen, W. C. Gause and C. S. Via (1995). "Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells." J Immunol **155**(5): 2396-2406.

Said, E. A., F. P. Dupuy, L. Trautmann, Y. Zhang, Y. Shi, M. El-Far, B. J. Hill, A. Noto, P. Ancuta, Y. Peretz, S. G. Fonseca, J. Van Grevenynghe, M. R. Boulassel, J. Bruneau, N. H. Shoukry, J.-P. Routy, D. C. Douek, E. K. Haddad and R.-P. Sekaly (2010). "Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection." Nature Medicine **16**(4): 452-459.

Schattenfroh, N. C., R. A. Hoffman, S. A. McCarthy and R. L. Simmons (1995). "Phenotypic analysis of donor cells infiltrating the small intestinal epithelium and spleen during graft-versus-host disease." Transplantation **59**(2): 268-273.

Schmidt, T. H., O. Bannard, E. E. Gray and J. G. Cyster (2013). "CXCR4 promotes B cell egress from Peyer's patches." J Exp Med **210**(6): 1099-1107.

Serody, J. S., S. E. Burkett, A. Panoskaltsis-Mortari, J. Ng-Cashin, E. McMahon, G. K. Matsushima, S. A. Lira, D. N. Cook and B. R. Blazar (2000). "T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1alpha is critical to the recruitment of CD8(+) T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease." Blood **96**(9): 2973-2980.

Shapira, M. Y., A. Abdul-Hai, I. B. Resnick, M. Bitan, P. Tsirigotis, M. Aker, B. Gesundheit, S. Slaviv and R. Or (2009). "Alefacept treatment for refractory chronic extensive GVHD." Bone Marrow Transplantation **43**(4): 339-343.

- Shen, N., P. Ffrench, D. Guyotat, M. Ffrench, D. Fiere, P. A. Bryon and M. Dechavanne (1994). "Expression of adhesion molecules in endothelial cells during allogeneic bone marrow transplantation." Eur J Haematol **52**(5): 296-301.
- Shi, J., W. Gao and F. Shao (2017). "Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death." Trends in Biochemical Sciences **42**(4): 245-254.
- Shiow, L. R., D. W. Roadcap, K. Paris, S. R. Watson, I. L. Grigorova, T. Lebet, J. An, Y. Xu, C. N. Jenne and N. Föger (2008). "The actin regulator coronin 1A is mutant in a thymic egress-deficient mouse strain and in a patient with severe combined immunodeficiency." Nature immunology **9**(11): 1307.
- Shulman, Z., R. Pasvolsky, E. Woolf, V. Grabovsky, S. W. Feigelson, N. Erez, Y. Fukui and R. Alon (2006). "DOCK2 regulates chemokine-triggered lateral lymphocyte motility but not transendothelial migration." Blood **108**(7): 2150-2158.
- Smith, C., S. Marlin, R. Rothlein, C. Toman and D. Anderson (1989). "Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro." The Journal of clinical investigation **83**(6): 2008-2017.
- Snider, D. and H. Liang (2001). "Early Intestinal Th1 Inflammation and Mucosal T Cell Recruitment During Acute Graft-Versus-Host Reaction." The Journal of Immunology **166**(10): 5991-5999.
- Stanley, P., A. Smith, A. McDowall, A. Nicol, D. Zicha and N. Hogg (2008). "Intermediate-affinity LFA-1 binds alpha-actinin-1 to control migration at the leading edge of the T cell." Embo j **27**(1): 62-75.
- Starr, R., T. A. Willson, E. M. Viney, L. J. L. Murray, J. R. Rayner, B. J. Jenkins, T. J. Gonda, W. S. Alexander, D. Metcalf, N. A. Nicola and D. J. Hilton (1997). "A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling." Nature **387**(6636): 917-921.
- Steffen, A., M. Ladwein, G. A. Dimchev, A. Hein, L. Schwenkmezger, S. Arens, K. I. Ladwein, J. M. Holleboom, F. Schur, J. V. Small, J. Schwarz, R. Gerhard, J. Faix, T. E. B. Stradal, C. Brakebusch and K. Rottner (2013). "Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation." Journal of Cell Science **126**(20): 4572-4588.
- Svensson, M., J. Marsal, A. Ericsson, L. Carramolino, T. Brodén, G. Márquez and W. W. Agace (2002). "CCL25 mediates the localization of recently activated CD8 $\alpha\beta$ ⁺ lymphocytes to the small-intestinal mucosa." The Journal of Clinical Investigation **110**(8): 1113-1121.
- Terness, P., T. M. Bauer, L. Röse, C. Dufter, A. Watzlik, H. Simon and G. Opelz (2002). "Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites." J Exp Med **196**(4): 447-457.

Thelen, M. and J. V. Stein (2008). "How chemokines invite leukocytes to dance." Nature Immunology **9**(9): 953-959.

Tomura, M., N. Yoshida, J. Tanaka, S. Karasawa, Y. Miwa, A. Miyawaki and O. Kanagawa (2008). "Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(31): 10871-10876.

Turner, B. E., M. E. Kambouris, L. Sinfield, J. Lange, A. M. Burns, R. Lourie, K. Atkinson, D. N. Hart, D. J. Munster and A. M. Rice (2008). "Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem-cell transplant determines the kinetics of acute graft-versus-host disease." Transplantation **86**(7): 968-976.

Underwood, K. W., C. Song, R. W. Kriz, X. J. Chang, J. L. Knopf and L.-L. Lin (1998). "A Novel Calcium-independent Phospholipase A2, cPLA2-gamma, That Is Prenylated and Contains Homology to cPLA2." Journal of Biological Chemistry **273**(34): 21926-21932.

van Leeuwen, L., A. Guiffre, K. Atkinson, S. P. Rainer and W. A. Sewell (2002). "A two-phase pathogenesis of graft-versus-host disease in mice." Bone Marrow Transplant **29**(2): 151-158.

Wadwa, M., R. Klopffleisch, A. Adamczyk, A. Frede, E. Pastille, K. Mahnke, W. Hansen, R. Geffers, K. S. Lang, J. Buer, J. Büning and A. M. Westendorf (2016). "IL-10 downregulates CXCR3 expression on Th1 cells and interferes with their migration to intestinal inflammatory sites." Mucosal Immunology **9**(5): 1263-1277.

Walling, B. L. and M. Kim (2018). "LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation." Frontiers in Immunology **9**(952).

Wang, H., H. Liu, Y. Lu, M. Lovatt, B. Wei and C. E. Rudd (2007). "Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion." Mol Cell Biol **27**(19): 6863-6875.

Wang, Y., D. Li, D. Jones, R. Bassett, G. E. Sale, J. Khalili, K. V. Komanduri, D. R. Couriel, R. E. Champlin, J. J. Mollndrem and Q. Ma (2009). "Blocking LFA-1 Activation with Lovastatin Prevents Graft-versus-Host Disease in Mouse Bone Marrow Transplantation." Biology of Blood and Marrow Transplantation **15**(12): 1513-1522.

Wensveen, F. M., P.-P. A. Unger, N. A. M. Kragten, I. A. M. Derks, A. ten Brinke, R. Arens, R. A. W. van Lier, E. Eldering and K. P. J. M. van Gisbergen (2012). "CD70-Driven Costimulation Induces Survival or Fas-Mediated Apoptosis of T Cells Depending on Antigenic Load." The Journal of Immunology **188**(9): 4256-4267.

Wickström, S. A., A. Lange, E. Montanez and R. Fässler (2010). "The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase!" The EMBO Journal **29**(2): 281-291.

Wolf, J. L. and W. A. Bye (1984). "The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system." Annu Rev Med **35**: 95-112.

Wu, C. and S. Dedhar (2001). "Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors : a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes." Journal of Cell Biology **155**(4): 505-510.

Wysocki, C. A., Q. Jiang, A. Panoskaltsis-Mortari, P. A. Taylor, K. P. McKinnon, L. Su, B. R. Blazar and J. S. Serody (2005). "Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease." Blood **106**(9): 3300-3307.

Wysocki, C. A., A. Panoskaltsis-Mortari, B. R. Blazar and J. S. Serody (2005). "Leukocyte migration and graft-versus-host disease." Blood **105**(11): 4191-4199.

Yamada, K. M. and M. Sixt (2019). "Mechanisms of 3D cell migration." Nature Reviews Molecular Cell Biology **20**(12): 738-752.

Yoshimi, R., S. Yamaji, A. Suzuki, W. Mishima, M. Okamura, T. Obana, C. Matsuda, Y. Miwa, S. Ohno and Y. Ishigatsubo (2006). "The γ -Parvin-Integrin-Linked Kinase Complex Is Critically Involved in Leukocyte-Substrate Interaction." The Journal of Immunology **176**(6): 3611-3624.

Yusuf-Makagiansar, H., M. E. Anderson, T. V. Yakovleva, J. S. Murray and T. J. Siahaan (2002). "Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases." Medicinal Research Reviews **22**(2): 146-167.

Zeiser, R. and B. R. Blazar (2017). "Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy." N Engl J Med **377**(22): 2167-2179.

Zhao, D., C. Zhang, T. Yi, C.-L. Lin, I. Todorov, F. Kandeel, S. Forman and D. Zeng (2008). "In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease." Blood **112**(5): 2129-2138.

Zhao, H., T. Doyle, O. Coquoz, F. Kalish, B. Rice and C. Contag (2005). "Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection *in vivo*." Journal of Biomedical Optics **10**(4): 041210.

Abbildung 7 (A) bereitgestellt von Takara Bio USA inc. 2560 Orchard Parkway, San Jose 95131, USA. www.takarabio.com. (B) und (C) bereitgestellt von illumina inc., 5200 Illumina Way, San Diego 92122, USA. www.illumina.com.

Abbildung 11 bereitgestellt von ibidi GmbH, Lochhamer Schlag 11, 82166 Gräfelfing, Deutschland. www.ibidi.com

