



# Experimentelle Charakterisierung intestinaler, GvHD- protektiver myeloider Empfängerzellen nach allogener Stammzelltransplantation

## Experimental Characterization of Intestinal GvHD-Protective Myeloid Host Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von

Maria Helena Ranecky

aus

Offenbach a. M.

Würzburg, April 2022



Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

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

2. Betreuer: Prof. Dr. Manfred Lutz

3. Betreuer: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation *Experimentelle Charakterisierung intestinaler, GvHD-protektiver myeloider Empfängerzellen nach allogener Stammzelltransplantation* eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort, Datum

Unterschrift

## Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled *Experimental Characterization of Intestinal GvHD-Protective Myeloid Host Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation* is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Place, Date

Signature

# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	4
Einleitung.....	6
1. Allogene Stammzelltransplantation und GvHD unter klinischen Gesichtspunkten .....	6
1.1 Allogene Stammzelltransplantation.....	6
1.2 Graft-versus-Host Disease.....	8
2. Myeloide APC in der intestinalen Mukosa und GvHD .....	12
2.1 Dendritische Zellen .....	13
2.2 Makrophagen.....	14
2.3 Pathologische Funktionen myeloider APC in der intestinalen GvHD .....	15
2.4 Protektive Funktionen myeloider APC in der intestinalen GvHD .....	16
2.5 Myeloide Suppressorzellen in der intestinalen GvHD .....	17
3. Zielsetzung und Methodik .....	18
Material und Methoden.....	20
1. Angaben zum Tierversuch .....	20
1.1 Versuchstiere .....	20
1.2 Tierversuchsgenehmigung und Tierhaltung .....	21
1.3 Anästhesie.....	21
2. KM- und T-Zell-Transplantation.....	21
2.1 Experimental- und Kontrollgruppen.....	21
2.2 Myeloablative Bestrahlung .....	22
2.3 Gewinnung der KM-Zellen .....	22
2.4 Gewinnung der T-Zellen.....	23
2.5 Eigentliche Transplantation .....	23
3. Folgezeit.....	23

3.1 Infektionsprophylaxe .....	23
3.2 Injektion von Diphtherietoxin .....	24
3.3 Monitoring der Versuchstiere .....	24
4. Immunfluoreszenzmikroskopie .....	25
4.1 Einbettung der Organe und Herstellung der Schnitte .....	25
4.2 Immunfluoreszenzfärbung .....	25
4.3 Mikroskopie .....	27
5. Durchflusszytometrie und Zellsortierung .....	27
5.1 Grundprinzip .....	27
5.2 Praktische Durchführung .....	28
6. Einzelzell-RNA-Sequenzierung .....	32
6.1 Lyse und Herstellung einer cDNA-Bibliothek .....	32
6.2 Demultiplexierung und Read-Alignment .....	32
6.3 Qualitätskontrolle .....	33
6.4 Normalisierung .....	34
6.5 Dimensionsreduktion, Visualisierung und Identifikation von Clustern .....	35
6.6 Differentielle Genexpressionsanalyse .....	35
Ergebnisse .....	36
1. Charakterisierung der GvHD-protaktiven APC anhand ihrer Oberflächenproteine .....	36
1.1 Experimentelle Grundlagen .....	36
1.2 Analyse der Zellidentität .....	38
1.3 Nähere Charakterisierung der GvHD-protaktiven Mph .....	45
2. Charakterisierung der GvHD-protaktiven APC auf Transkriptomebene .....	52
2.1 Experimentelle Grundlagen .....	52
2.2 Identifikation der Zielzellen .....	55
2.3 Einordnung der GvHD-protaktiven APC als DC oder Mph .....	59

2.4 Detaillierte Charakterisierung von Cluster 4 und Cluster 10 .....	63
2.5 Ontogenetische Einordnung von Cluster 4 und Cluster 10 .....	71
Diskussion .....	74
1. Inhaltliche Diskussion .....	74
1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	74
1.2 Diskussion der Zellidentität.....	74
1.3 Diskussion des antiinflammatorischen Profils .....	75
1.4 Detaillierte Diskussion der Effektorfunktionen .....	76
1.5 Diskussion der Ontogenese .....	79
2. Methodische Stärken und Limitationen .....	80
2.1 Stärken und Limitationen des Mausmodells .....	80
2.2 Limitationen des experimentellen Designs und der Durchführung .....	81
2.3 Diskussion der Interpretation der Einzelzell-Transkriptomanalyse.....	83
3. Ausblick und klinische Implikationen .....	85
3.1 Zur Induktion des antiinflammatorischen GvHD-protectiven Phänotyps .....	85
3.2 Zur therapeutischen Expansion der GvHD-protectiven Mph .....	85
Zusammenfassung.....	87
Literaturverzeichnis.....	89

## Abkürzungsverzeichnis

allo-HSZT:	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation. In experimentellen Versuchsanordnungen ist die Transplantation von Knochenmark und beigemengten T-Zellen gemeint.
APC	Antigen-präsentierende Zelle (engl. <i>Antigen Presenting Cell</i> )
B6	C57BL/6 (Black 6), Inzucht-Mausstamm
cDNA	komplementäre DNS (engl. <i>complementary DNA</i> )
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>Aamage-Associated Molecular Patterns</i> )
DC	dendritische Zelle (engl. <i>Dendritic Cell</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FMO	engl. <i>Fluorescence Minus One</i>
FVB	FVB/N, Inzucht-Mausstamm
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. <i>Graft-versus-Host Disease</i> )
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion (engl. <i>Graft-versus-Leukemia Reaction</i> )
HBSS	engl. <i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (engl. <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
KM	Knochenmark
Lsg	Lösung
mAb	monoklonaler Antikörper (engl. <i>monoclonal Antibody</i> )
MDSC	myeloide Suppressorzelle (engl. <i>Myeloid-Derived Suppressor Cell</i> )
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (engl. <i>Mean Fluorescence Intensity</i> )

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
Mph	Makrophagen
mRNA	Boten-RNS (engl. <i>messenger RNA</i> )
NO	Stickstoffmonoxid (engl. <i>Nitric Oxide</i> )
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PP	Peyerscher Plaques
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
SA	Standardabweichung
Treg	regulatorische T-Zelle
UMAP	engl. <i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>

Bezüglich des Geschlechts wird die männliche Form im Allgemeinen für die männliche und weibliche Form verwendet (bspw. Patient für Patientin und Patient).

Symbole für Gene werden grundsätzlich kursiv und Symbole für Proteine nicht kursiv geschrieben.

## Einleitung

### 1. Allogene Stammzelltransplantation und GvHD unter klinischen Gesichtspunkten

#### 1.1 Allogene Stammzelltransplantation

##### *Einführung*

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) beschreibt die Übertragung von aufgereinigten Knochenmarks- bzw. in das periphere Blut mobilisierten, hämatopoetischen Stammzellen in einen Empfängerorganismus (Léger and Nevill, 2004). Hierbei wird die autologe von der allogenen Transplantation unterschieden, erstere mit Transfusion von empfängereigenen Zellen, letztere von Zellen eines Spenderorganismus. Die allogene HSZT (allo-HSZT) gilt als etablierte und oftmals einzige kurative Therapieoption vieler hämatologischer Neoplasien, Knochenmarksinsuffizienzen und genetischer Erkrankungen wie den primären Immundefektsyndromen (Pai, 2019). Die autologe HSZT kommt daneben bspw. auch in schweren Fällen von Autoimmun- bzw. rheumatologischen Erkrankungen wie der Systemischen Sklerose zum Einsatz (Di Benedetto et al., 2020; Shiratsuchi et al., 2008; Snowden et al., 2017; Swart et al., 2017). Die Indikationsstellung erfolgt nach sorgfältiger Abwägung des krankheitsspezifischen und HSZT-assoziierten Morbiditäts- und Mortalitätsrisikos (Zeiser et al., 2016) primär bei Erstdiagnose oder sekundär nach Ausreizung anderer, bspw. chemotherapeutischer Therapieoptionen.

Die Graft-versus-Host Disease (Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung, GvHD) ist eine der gefürchtetsten Komplikationen der allo-HSZT. Sie bezeichnet eine Immunreaktion des Spenderimmunsystems auf als fremd erkannte Zellen und Gewebestrukturen des Transplantatempfängers. Ihre akute Form (akute GvHD) mit Symptommanifestation klassischerweise vor Tag 100 nach Transplantation (Holler et al., 2019) gilt mit einer spezifischen Mortalität von 15 – 30 % als wichtige und im ersten Jahr nach allo-HSZT sogar als Haupttodesursache der transplantierten Patienten. Mit einer Gesamtinzidenz von 30 – 60 % stellt sie außerdem einen erheblichen Morbiditätsfaktor dar (Zeiser et al., 2016). Die akute GvHD manifestiert sich klinisch in entzündlichen Symptomen vor allem des Darms, der Leber und der Haut. Die protrahiert auftretende chronische GvHD ähnelt dagegen mehr einer sklerosierenden Autoimmunerkrankung (MacDonald et al., 2017; Zeiser et al., 2016). Da sich die vorliegende Arbeit auf die akute GvHD bezieht, wird auf die chronische Form nur am Rande eingegangen.

Wie im folgenden Kapitel näher beschrieben, handelt es sich bei der GvHD um eine komplexe immunologische Interaktion zwischen Spenderzellen und dem Empfängerorganismus, in dem entzündliche und antiinflammatorische Mechanismen ineinandergreifen. Der hierzu noch lückenhafte Forschungsstand und insbesondere die noch immer unzureichenden prophylaktischen und therapeutischen Möglichkeiten (Holler et al., 2019) machen eine weitere Erforschung notwendig. In der vorliegenden Arbeit soll eine physiologisch vorhandene, GvHD-suppressive Zellpopulation im Dünndarm des Transplantatempfängers näher charakterisiert werden. Ein besseres Verständnis ihres Phänotyps, ihrer immunsuppressiven Eigenschaften und ihrer Regulation soll einen Beitrag zur Grundlagenforschung liefern und kann als Anstoß für zelluläre oder gezielt immunmodulierende Therapien dienen.

Im Folgenden wird die allo-HSZT zunächst aus klinischer Sicht erläutert. Es folgt die detaillierte Pathophysiologie der GvHD, um ein besseres Verständnis ihrer Prävention und Therapie zu ermöglichen. Im letzten Teil des aktuellen medizinischen und Grundlagenforschungsstandes wird auf die myeloiden Zellpopulationen der intestinalen Mukosa eingegangen: Histochemische Populationsdefinitionen, ihre Funktionen im Gesunden und während der GvHD sollen eine fundierte Basis für die angestrebte Charakterisierung und Einordnung der GvHD-suppressiven Zellen geben. Den Abschluss der Einleitung bilden die Hauptfragestellungen und ein kurzer Überblick zu Versuchsaufbau und Methoden.

#### *Spenderauswahl und Ablauf der allo-HSZT*

In der Spenderauswahl wird eine möglichst hohe immunologische Übereinstimmung (Matching) zwischen Spender und Empfänger angestrebt. Besondere Bedeutung tragen dabei die humanen Leukozyten-Antigene (HLA), die in der Antigenpräsentation und damit in der Initiierung einer Immunreaktion eine essenzielle Rolle spielen. Die für diese Oberflächenmoleküle codierenden Gene werden im Allgemeinen und bei der Maus als MHC- (Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. *Major Histocompatibility Complex*) und beim Menschen als HLA-Gene bezeichnet (Murphy, 2017). Im besten Falle wird zwischen Stammzellspender und -Empfänger ein 10/10 Matching mit Übereinstimmung der Genorte für HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DRQ1 erreicht (Zeiser et al., 2016). Findet sich in der genetisch sehr nahen Kernfamilie kein HLA-kompatibler Spender, wird die Suche auf die erweiterte

Familie und unverwandte Spender ausgeweitet. Auch Nabelschnurblut mit geringerem immunogenem Risiko (Müller and Müller-Tidow, 2015; Rocha et al., 2000) oder haploidentische Transplantationen mit Übereinstimmung in lediglich der Hälfte der HLA-Loci sind möglich. Weitere Faktoren zur Spenderauswahl sind bspw. Alter, Geschlecht und Status bezüglich einer (durchgemachten) Cytomegalievirus-Infektion (Zeiser et al., 2016).

Die Transplantation beginnt mit der Konditionierung, die einer Immunsuppression und der Elimination maligner Zellen dient und „Platz im Knochenmark“ schafft (Zeiser et al.). Sie wird je nach Indikation und Komorbiditäten des Patienten in Hochdosis oder reduzierter Intensität mittels Chemotherapie oder Bestrahlung durchgeführt. Man unterscheidet zwischen myeloablativen, also die Hämatopoese irreversibel zerstörenden, und nicht-myeloablativen oder intensitätsreduzierten Regimes (Zeiser et al., 2016). An die Konditionierung schließt sich eine prophylaktische Immunsuppression an, gefolgt von der eigentlichen Transplantation mit Transfusion der aufgereinigten Spenderzellen. Da das Immunsystem des Patienten durch die Konditionierung sehr stark geschwächt wird, ist in dieser aplastischen Phase der Schutz vor Infektionen besonders wichtig. Die Regenerationsphase ist durch ein langsames Engraftment, also Anwachsen der transplantierten Zellen mit Wiederbeginn der Hämatopoese, gekennzeichnet. Das Erreichen von  $> 500$  Granulozyten/ $\mu\text{l}$  und  $> 20\,000$  Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  im peripheren Blut gilt als Hinweis für die beginnende Immunrestitution (Carreras et al., 2019). Im Anschluss erfolgen regelmäßige Untersuchungen des Chimärismus` (inwieweit die hämatopoetischen Zellen der Spender- oder noch der Empfängerhämatopoese entstammen) und der minimalen residuellen Erkrankung, um ein fehlendes Engraftment und ein Rezidiv rechtzeitig zu erkennen (Gesinn, 2021; Zeiser et al., 2016). Gefürchtete Komplikationen der allo-HSCT sind neben der GvHD opportunistische Infektionen, insbesondere viraler Erreger wie bspw. die Reaktivierung einer Cytomegalievirus-Infektion (Zeiser et al., 2016), und verschiedene allgemeine und insbesondere vaskuläre Organkomplikationen wie bspw. eine starke Mukositis oder das *Capillary-Leak-Syndrom* der Lunge (Zeiser et al., 2016).

## 1.2 Graft-versus-Host Disease

### *Ursachen und Pathophysiologie*

Die GvHD bezeichnet grundsätzlich eine Reaktion der Spenderlymphozyten gegen Gewebestrukturen des Transplantatempfängers. Ihre immunologische Ursache liegt in der Erkennung von Empfängerantigenen, bzw. der o.g. Antigen-präsentierenden HLA- bzw. MHC-

Moleküle durch die Spenderlymphozyten. Da sich die vorliegende Arbeit auf die Maus bezieht, wird im Folgenden nur der MHC-Begriff verwendet. Eine genetische Disparität zwischen Spender und Empfänger und genetische Unterschiede in „Minor Antigenen“, also auf MHC präsentierten, zelleigenen Proteinen (Reddy and Ferrara, 2008) stellen daher die Hauptrisikofaktoren für das Auftreten einer GvHD dar. Auch Empfänger-bedingte Faktoren wie eine frühere Alloimmunisation, eine aggressive Konditionierung, vorangegangene Infektionen oder ein hohes Alter zum Zeitpunkt der allo-HSCT tragen zum Risiko bei (Holler et al., 2019; Holtan et al., 2014; Zeiser et al., 2016).

Die Kaskade immunologischer Vorgänge zwischen Spender- und Empfängerzellen, die der akuten GvHD zugrunde liegt, wird anhand eines drei Phasen Modells beschrieben (Reddy and Ferrara, 2008):

#### Phase 1: Aktivierung von APC vor Transfusion der Spenderzellen

Die maligne Erkrankung selbst, deren Komplikationen wie bspw. Infektionen und unerwünschte Wirkungen der Konditionierung führen zu einem initialen Gewebeschaden, welcher immunologisch durch das Auftreten von DAMPs (Schaden-assoziierte molekulare Muster, engl. *Damage-Associated Molecular Patterns*) und PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster, engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) gekennzeichnet ist (Holler et al., 2019). Die als Gefahrensignal erkannten molekularen Muster induzieren in Zellen des angeborenen Immunsystems entzündungsfördernde Effektormechanismen wie die Freisetzung von Zytokinen, bspw.  $IL-1\beta$  oder  $TNF-\alpha$ , oder reaktiven Sauerstoffspezies (Zeiser, 2019), wodurch Antigen-präsentierende Zellen (engl. *Antigen Presenting Cells*, APC) aktiviert werden. Diese APC exprimieren nun vermehrt chemotaktische Rezeptoren wie bspw. CCR7 für die Migration in sekundäre lymphatische Organe und Antigenpräsentations- und Kostimulationsmoleküle sowie Zytokine für die Aktivierung der Spender-T-Zellen (Hill and Koyama, 2020; Holler et al., 2019; Murphy, 2017; Reddy and Ferrara, 2008; Zeiser, 2019).

#### Phase 2: Aktivierung, Differenzierung und Migration der Spender-T-Zellen

Die aktivierten Empfänger-APC treten nun in Direktkontakt mit den Spender-T-Zellen. Kernkomponente ist die Erkennung des MHC-Komplexes bzw. der darauf präsentierten Empfängerantigene durch die T-Zellen (Zeiser and Blazar, 2017). In Kombination mit spezifischen Rezeptor-Liganden-Kontakten und löslichen Zytokinen mündet diese

Zellkommunikation in eine antigenspezifischen T-Zell-Aktivierung. Kostimulatorisch wirken bspw. die auf APC exprimierte Moleküle CD80/CD86 in Bindung an CD28 auf T-Zellen oder ICOSL (APC) an ICOS (T-Zellen), inhibitorisch wirken bspw. CD80/86 an CTLA4 oder PD-L1 an PD-1 auf T-Zellen (Hill and Koyama, 2020; Reddy and Ferrara, 2008). Als wichtige Zytokine sind bspw. IL-6 oder IL-23 zu nennen (Hill and Koyama, 2020).

Die Differenzierung der nun alloreaktiven T-Zellen resultiert in Ausbildung spezifischer Effektormechanismen wie der Produktion von TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  in Th1-Zellen (Reddy and Ferrara, 2008) und in Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsproteinen, die die Zellen zur gerichteten Migration in die GvHD-Zielorgane befähigt. Als Homing-Rezeptoren für die intestinale Mukosa gelten CCR9 und Integrin- $\alpha 4\beta 7$  (Holtan et al., 2014).

### Phase 3: Effektorphase

Die von aktivierten Immun-, und ebenfalls aktivierten Parenchym- und Stromazellen freigesetzten Zytokine steigern sich zu einem „Zytokinsturm“. Zelluläre Effektormechanismen von angeborenem und adaptivem Immunsystem, insbesondere der alloreaktiven T-Zellen, verstärken sich wechselseitig und verursachen eine weitreichende Gewebeerstörung. Diese betrifft vor allem die mit Oberflächenepithelien ausgestatteten und in ständigem Antigenkontakt stehenden Organe des Gastrointestinaltrakts, der Haut und Lunge (Reddy and Ferrara, 2008). Gleichzeitig kommt es, ausgehend von verschiedenen zellulären Strukturen des Empfängers, zu einer antiinflammatorischen Gegenreaktion mit Induktion von regulatorischen T-Zellen (Treg) oder Zytokinen wie IL-10 oder TGF- $\beta$ , die jedoch die massive Entzündungsreaktion nicht ausgleichen können (Holler et al., 2019; Lussana et al., 2017). Es kommt zur klinischen Manifestation, der akuten GvHD.

Alloreaktive T-Zellen können sich jedoch nicht nur gegen Empfängergewebestrukturen, sondern auch gegen die nach Induktionstherapie verbleibenden malignen Zellen richten (Reddy et al., 2008). Diese Transplantat-gegen-Leukämie Reaktion (engl. *Graft-versus-Leukemia Reaction*, GvL) trägt maßgeblich zur Vernichtung verbleibender Tumorzellen und damit zur Komplettremission bei. Die Trennung der medizinisch nützlichen GvL- von den lebensbedrohlichen GvHD-Mechanismen ist daher von großer klinischer Relevanz (Negrin, 2015).

### *Symptome und Scoring*

Je nach betroffenem Organsystem ist die akute GvHD durch das Auftreten unterschiedlicher Symptome gekennzeichnet. Zur Einschätzung des Schweregrads und der Überlebenswahrscheinlichkeit wurden verschiedene Scores entwickelt, welche sich an klinischen, histopathologischen und laborchemischen Kriterien orientieren. Immer noch relevant ist der modifizierte Glucksberg-Score von 1974 (Glucksberg et al., 1974), welcher nach Schweregradbeurteilung in den hauptsächlich betroffenen Organen Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt den Gesamtschweregrad der akuten GvHD in Grad I (leicht) bis IV (lebensbedrohlich) einstuft. Oder der retrospektiv entwickelte IBMTR- (*International Bone Marrow Transplant Registry*-) Score von 1997 mit ähnlichen Kriterien (Cahn et al., 2005; Rowlings et al., 1997). Für unsere Tierexperimente verwendeten wir den modifizierten Score nach Cooke (Cooke et al., 1996), der die Symptomlast der Versuchsmäuse klinisch bewertet. Die früh eintretende intestinale akute GvHD manifestiert sich klinisch oft in wässrigen Durchfällen und Tenesmen. Zur histologischen Sicherung sollte je nach Symptomatik eine Biopsie aus dem oberen und/oder unteren Gastrointestinaltrakt erfolgen. Pathologische Kriterien sind die Anzahl der Apoptosen im Kryptenepithel, Nekrosen bzw. Mukosadefekte bis zum vollständigen Epithelverlust (Zeiser et al., 2016). Ein hoher Flüssigkeitsverlust, Malnutrition und Malabsorption und die Translokation von Bakterien über die geschädigte Epithelbarriere machen die intestinale GvHD zu einer lebensbedrohlichen Systemerkrankung. Sie wird daher als schwerwiegendste Komponente der gesamten akuten GvHD eingeschätzt (Holler et al., 2019).

### *Prophylaxe und Therapie*

Da die GvHD eine Immunreaktion des Spendersystems gegen Strukturen des Transplantat-Empfängers darstellt, bestehen Prophylaxe und Therapie grundsätzlich in einer Immunsuppression. Für Infektionsabwehr, die Eliminierung residualer maligner Zellen (GvL-Reaktion) und das Erreichen einer anhaltenden Remission ist jedoch auch eine gewisse Immunkompetenz notwendig. Um die Balance zwischen Immunsuppression und -kompetenz zu halten, kommen neben klassischen Immunsuppressiva auch immunmodulierende Arzneimittel und physikalische Therapien zum Einsatz.

Die Prophylaxe richtet sich in Intensität und Dauer nach dem individuellen Risiko, u.a. nach Alter, Grad der Remission zum Zeitpunkt der Transplantation oder des Spender-Empfänger-

Mismatches (Zeiser et al., 2016). Ein klassisches Schema ist die Kombination von Cyclosporin A oder Tacrolimus mit Methotrexat oder Mycophenolatmofetil kurz vor und nach der Transplantation. Zusätzlich kann bei unverwandten oder Hochrisikokombinationen von verwandten Spendern Antithymozytenglobulin (ATG) eingesetzt werden (Finke et al., 2009). Die Therapie der GvHD richtet sich nach ihrem Schweregrad: Über das klassische Scoring hinaus können mittels kombinierter Biomarker hochgefährdete Patienten identifiziert werden (Hartwell et al., 2018; Levine et al., 2015). Neben einer Intensivierung der Prophylaxe werden als Erstlinientherapie am häufigsten Corticosteroide eingesetzt (Zeiser et al., 2016), auf die jedoch nur ca. die Hälfte aller Patienten suffizient anspricht (Holler et al., 2019). Daher kommen Zweitlinien-Kombinationstherapien zum Einsatz, bestehend aus klassischen Chemotherapeutika und/oder Biologika wie bspw. Basiliximab (monoklonaler anti-CD25-Antikörper/ anti-CD25 mAb), Etanercept (TNF- $\alpha$ -Inhibitor) oder physikalische Verfahren wie die extrakorporale Photopherese (Holler et al., 2019; Wolff et al., 2013). Das Fehlen überzeugender Langzeitergebnisse (Holler et al., 2019) macht jedoch deutlich, wie notwendig neue Konzepte sind, die nicht auf eine generelle Immunsuppression, sondern auf die gezielte Modulation einzelner Komponenten abzielen. Neben der Fortentwicklung medikamentöser Therapien wie bspw. dem JAK1/2-Inhibitor Ruxolitinib (Escamilla Gómez et al., 2020; Teshima et al., 2016; Zeiser et al., 2020) liegt ein wichtiger Forschungsschwerpunkt auf zellbasierten Strategien wie bspw. der Expansion und Modulation von Treg (Brunstein et al., 2016; Di Ianni et al., 2011) oder myeloiden Suppressorzellen (engl. *Myeloid-Derived Suppressor Cells*, MDSC): Ergebnisse präklinischer, klinisch beobachtender und erster interventioneller Studien zeigen vielversprechende Ergebnisse bei jedoch aktuell noch lückenhaftem Forschungsstand (D'Aveni et al., 2020; Lussana et al., 2017). Die vorliegende Arbeit möchte in Charakterisierung einer physiologisch vorhandenen, GvHD-protektiven Zellpopulation zu einem besseren Verständnis beitragen und hier als Anstoß für eine gezielte Immunmodulation dienen.

## 2. Myeloide APC in der intestinalen Mukosa und GvHD

Um der Einordnung und Nomenklatur der GvHD-protektiven Zellen eine gute Basis zu geben, wird zunächst ein allgemeiner Überblick über die großen Populationen intestinaler APC, dendritische Zellen (engl. *Dendritic Cells*, DC) und Makrophagen (Mph), gegeben. Als APC werden in dieser Arbeit grundsätzlich alle MHC II<sup>+</sup> und in der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung alle CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> Zellen gewertet. Als professionelle APC

gelten DC und Mph als potente Aktivatoren und -Modulatoren der antigenspezifischen T-Zell-Antwort. Ihre Funktion in der intestinalen akuten GvHD folgt, verflochten mit dem aktuellen Forschungsstand, in einem eigenen Absatz. In diesem wird auch auf MDSCs eingegangen, eine weitere APC-Population, die in Zusammenhang mit Entzündungssituationen steht. Alle genannten Gene und Proteine beziehen sich auf murine Zellen.

## 2.1 Dendritische Zellen

Klassische DC nehmen durch ihre einzigartige Fähigkeit zur Aktivierung antigenspezifischer naiver T-Zellen eine Schlüsselrolle im adaptiven Immunsystem ein (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019). Nach Antigenerkennung, -aufnahme und -prozessierung in der intestinalen Lamina propria migrieren DC in die darmassoziierten sekundären lymphatischen Organen des GALT (engl. *Gut Associated Lymphatic Tissue*), die Peyerschen Plaques (PP) und mesenterialen Lymphknoten, um dort mit naiven T-Zellen in Kontakt zu treten. Kern der DC-T-Zell-Interaktion ist die Antigenpräsentation via MHC, verbunden mit einer Zellkommunikation über kostimulatorische Rezeptoren, bspw. CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2), und lösliche Zytokine (Murphy, 2017). So werden antigenspezifische inflammatorischen T-Zellen, aber auch tolerogene bzw. immunsuppressive Treg induziert (Cerovic et al., 2014; Murphy, 2017). Im intestinalen Immunsystem nehmen DC somit eine Schlüsselposition in Richtung und Ausgestaltung der Immunantwort ein.

In der vorliegenden Arbeit wird auf plasmazytoide DC, welche phänotypisch und funktionell anders als klassische DC charakterisiert sind (Merad et al., 2013), nicht eingegangen. Die Abkürzung DC bezieht sich hier rein auf klassische DC.

Intestinale DC werden auf Proteomebene grundsätzlich charakterisiert durch Expression von MHC II (*H2*-Gene) und CD11c (Integrin- $\alpha$ X, *Itgax*) (Scott et al., 2015; Varol et al., 2010). CD103 (Integrin- $\alpha$ E, *Itgae*) gilt als Marker der Mehrheit intestinaler DC-Subpopulationen, wird jedoch bspw. auch von intestinalen intraepithelialen Lymphozyten exprimiert (Cerovic et al., 2013; Cheroutre et al., 2011; Murphy, 2017; Scott et al., 2015). Die Marker CD8 $\alpha$  (*Cd8a*), CD11b (Integrin- $\alpha$ E, *Itgae*), Xcr1 (Chemokine C motif receptor 1, *Xcr1*) und CD172 (Signal-regulatory protein  $\alpha$ , *Sirpa*) dienen der Subdifferenzierung der großen CD103<sup>+</sup> intestinalen DC-Subpopulation (Cerovic et al., 2013; Gross et al., 2015; Guilliams et al., 2016; Koscsó et al., 2015; Scott et al., 2015; Sichien et al., 2017; Varol et al., 2010). Allen DC-Subklassen

gemein ist die Expression von CD26 (Dipeptidyl Peptidase 4, *Dpp4*) (Guilliams et al., 2016; Merad et al., 2013), Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3, *Flt3*), CCR7 (*Ccr7*) (Murphy, 2017) und des Transkriptionsfaktors Zbtb46 (Zinc finger and BTB domain containing 46, *Zbtb46*) (Merad et al., 2013; Meredith et al., 2012). Zbtb46 kann als exklusiver DC-Marker verwendet werden (Meredith et al., 2012).

Intestinale DC stammen in Homöostase von aus dem Knochenmark (KM) und Blut einwandernden DC-Vorläuferzellen ab (Merad et al., 2013; Miller et al., 2012), welche lokal und Flt3L-abhängig ausdifferenzieren (Brasel et al., 2000; Karsunky et al., 2003; Merad et al., 2013; Tussiwand and Gautier, 2015). Ob unter inflammatorischen Bedingungen DC auch aus einwandernden Monozyten differenzieren können, wird kontrovers diskutiert (Bogunovic et al., 2009; Ginhoux and Jung, 2014; Guilliams et al., 2014; Zigmond et al., 2012).

## 2.2 Makrophagen

Makrophagen gelten als Wächter der Gewebeintegrität und -homöostase. Sie phagozytieren Debris, initiieren und unterstützen Heilungsvorgänge und stehen als Teil der angeborenen Immunität an vorderster Front der Abwehr extrazellulärer Erreger. Durch ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation und ein breites Zytokinspektrum fungieren sie als Bindeglied zum adaptiven Immunsystem (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019). Im Gegensatz zu DC sind sie nach Antigenkontakt nicht zur Migration ins lymphatische Gewebe und insbesondere nicht zur *initialen* Aktivierung naiver T-Zellen befähigt (Tamoutounour et al., 2012). Eine klare funktionelle Trennung zwischen Mph und DC ist jedoch kaum mehr möglich, da intestinale Mph je nach äußeren Konditionen eine periphere Immun- und spezifisch auch T-Zell-Antwort induzieren (Koscsó et al., 2020; Panea et al., 2015), amplifizieren (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019; Murphy, 2017), und regulieren können (Murai et al., 2009; Varol et al., 2010). Phänotypisch gelten intestinale Mph als „heterogene Population CD45<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> Zellen“ (De Schepper et al., 2018). Wie DC exprimiert auch der Großteil intestinaler Mph MHC II (*H2*-Gene) und CD11c (*Ilgax*) auf intermediärem bis hohem Level (Bain and Schridde, 2018; Cerovic et al., 2014; Farache et al., 2013; Koscsó et al., 2015). Darüber hinaus gilt die Expression folgender Oberflächenantigene im Allgemeinen als charakteristisch, wenn auch nicht exklusiv für Mph: die drei Fcγ-Rezeptoren FcγR-I (CD64, *Fcgr1*) (Tamoutounour et al., 2012), FcγR-II (CD32, *Fcgr2*) und FcγR-III (CD16, *Fcgr3*) (Koscsó et al., 2015), der Hormonrezeptor EMR-1/ F4/80 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-

like 1, *Adgre1*), CD11b (Integrin- $\alpha$ M, *Itgam*) (Gross et al., 2015), MerTK (Tyrosine-protein kinase Mer, *Mertk*) (Joeris et al., 2017) und CSF-1R (CD115, Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor, *Csf1r*) (Mowat and Bain, 2011). Entscheidend ist, dass viele Oberflächenantigene, die lange Zeit als exklusive Mph-Marker gehandelt wurden, bspw. F4/80 (Bain and Schridde, 2018; Gautier et al., 2012; Guilliams et al., 2016), auch von DC-Subpopulationen exprimiert werden und umgekehrt.

Bezüglich der Ontogenese der intestinalen Mukosa-Mph und insbesondere der Mph in ihrer immunzellreichen Lamina propria herrschte lange weitgehend Konsens, dass alle dortigen Mph-Populationen von Ly6c<sup>+</sup> klassischen Monozyten abstammen, die in CCR2-abhängiger Weise aus KM und Blut konstitutiv ins Gewebe migrieren (Bain et al., 2014; Farache et al., 2013; Ginhoux and Jung, 2014; Tsou et al., 2007; Zigmund et al., 2012). Sie erreichen in der intestinalen Lamina propria nach vier bis fünf Tagen ihren je nach äußerem Milieu pro- oder antiinflammatorischen Phänotyp (Bain and Mowat, 2014a; Gross et al., 2015). Für ihre Differenzierung ist der Wachstumsfaktor CSF-1 essenziell (Bain and Mowat, 2014b; Gross et al., 2015). In den letzten Jahren zeigten sich jedoch Hinweise darauf, dass auch in der homöostatischen intestinalen Lamina propria, wie in der Mehrzahl aller anderen Körpergewebe (Ginhoux and Guilliams, 2016), gewebeständige, sich selbst erhaltende Mph-Populationen existieren (De Schepper et al., 2018; Shaw et al., 2018), unabhängig von einer monozytären Erneuerung. Welche Rolle diese Populationen in einer Entzündungssituation spielen, wurde bisher kaum untersucht.

### 2.3 Pathologische Funktionen myeloider APC in der intestinalen GvHD

APC gelten in der akuten GvHD lokalisationabhängig in lymphatischen und peripheren Organen als maßgeblich für Einleitung, Ausgestaltung und Modulation der Immun- und allgemeinen Entzündungsvorgänge. Spender-APC sind darin weniger als Initiatoren, sondern vielmehr als Katalysatoren an der Ausgestaltung der GvHD beteiligt und werden in ihrer Bedeutung den Empfänger-APC untergeordnet (Markey et al., 2018; Reddy et al., 2008). Da sie in der vorliegenden Studie methodisch ausgeschlossen werden, beziehen sich die folgenden Absätze rein auf Empfänger-APC.

DC galten lange als essenziell für die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen und die Induktion organspezifischer Homingrezeptoren wie bspw. Integrin- $\alpha$ 4 $\beta$ 7 für die intestinale Mukosa (Koyama et al., 2015; Shlomchik et al., 1999). Obwohl in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass ihre Präsenz für die GvHD Initiation nicht zwingend nötig ist (Koyama et al.,

2011; Li et al., 2012), dominiert diese Initiatorfunktion ihre Bedeutung für die GvHD in der Literatur. Als ähnlich schädlich gelten Mph: In der chronischen GvHD fungieren sie u.a. als Haupteffektorzellen des fibrotischen Gewebeumbaus in Haut und Lunge (Alexander et al., 2014; MacDonald et al., 2017), in der dermalen akuten GvHD ist ein höhergradiges Mph-Infiltrat mit einer steroidrefraktären, bzw. ausgeprägten akuten GvHD assoziiert (Nishiwaki et al., 2009; Terakura et al., 2015). Ob diese Mph, wie im Kontext inflammatorischer Darmerkrankungen mehrheitlich interpretiert, als aktive Entzündungsmediatoren fungieren (Fadok et al., 1998; Kamada et al., 2008; Platt et al., 2010; Rivollier et al., 2012) oder ihre Akkumulation rein reaktiv bedingt ist blieb bisher ungeklärt.

#### 2.4 Protektive Funktionen myeloider APC in der intestinalen GvHD

Im Gegensatz zu diesen proinflammatorischen Funktionen zeigte Frau Jordan Garrote in unserer Arbeitsgruppe das protektive Potenzial intestinaler Empfänger-APC für die akute GvHD (Jordan Garrote, 2014): Nach Depletion der CD11c<sup>+</sup> APC nach Abschluss der GvHD-Initiationsmechanismen zeigten die Versuchsmäuse deutliche Unterschiede zu nicht-depletierten Tieren: Klinisch wiesen Mäuse ohne CD11c<sup>+</sup> APC eine schwerere GvHD-Symptomatik und höhere Mortalität auf, systemisch eine erhöhte Konzentration inflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  im Serum, und auf Organebene eine verstärkte Gewebedestruktion und erhöhte Konzentration alloreaktiver T-Zellen in der intestinalen Lamina propria. CD11c<sup>+</sup> APC wirken folglich GvHD-protektiv und immunsuppressiv, ihr Fehlen ist mit einer verstärkten GvHD assoziiert. Als immunsuppressiven Hauptmechanismus deuteten die Ergebnisse auf einen direkten Rezeptor-Liganden Kontakt zwischen APC und alloreaktiven T-Zellen via PD-L1 (auf APC) und PD-1 (auf T-Zellen) hin. Passend dazu wiesen Patienten mit einer hohen PD-L1 Expression auf Kolon-APC in klinischen Biopsien eine mildere GvHD auf als Patienten ohne PD-L1 Expression. Frau Jordan Garrote interpretierte die protektiven APC als DC mit Ursprung in nicht-klassischen (CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>CCR2<sup>-</sup>) Monozyten. Evidenz dafür lieferten ihr CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> Phänotyp sowie verschiedene Experimente, die eine ontogenetische CCR2-Unabhängigkeit, eine gering ausgeprägte Flt3L- und eine starke CSF-1-Abhängigkeit zeigten. Da sich DC und Mph bezüglich ihrer Oberflächenantigenausstattung und bezüglich ihrer ontogenetischen Merkmale überschneiden, bleibt die Identität der GvHD-protektiven APC als DC zu hinterfragen.

Die Ergebnisse von Frau Jordan Garrote stehen im Einklang mit einer in der allgemeinen

Diskussion wenig präsenten, protektiven Immunmodulatorfunktion verschiedener APC-Subpopulationen im Verlauf der akuten GvHD. So wurde für DC bspw. eine Reduktion alloreaktiver T-Zellen und Induktion peripherer Toleranzmechanismen nachgewiesen (Markey et al., 2018; Weber et al., 2014). Für CSF-1-explandierte Mph zeigten wegweisende Studien von Hashimoto et al. (Hashimoto et al., 2011) und MacDonald et al. (MacDonald et al., 2010) eine Milderung der Entzündungsreaktion, u.a. durch eine Phagozytose- und Zytokin-vermittelte Reduktion alloreaktiver T-Zellen. Erweitert man das Spektrum von alleinigen Empfänger- auf Spenderzellen, sind für im Transplantat bereits vorhandene oder adoptiv transfundierte MDSC (siehe unten) in präklinischen (D'Aveni et al., 2015; Highfill et al., 2010; Koehn et al., 2015; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2019) und klinischen Studien (Lv et al., 2015; Vendramin et al., 2014) eindrückliche GvHD-protective und sogar -präventive Effekte nachgewiesen. Dass APC, wie auch in anderen entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben (Qualls et al., 2006; Weber et al., 2011), in der GvHD protectiv wirken können, ist eindeutig möglich. Welche intestinale Empfängersubpopulation jedoch für die von Frau Jordan Garrote erstmals beschriebenen Effekte verantwortlich ist, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

## 2.5 Myeloide Suppressorzellen in der intestinalen GvHD

Neben den klassischen, professionellen APC DC und Mph kommen grundsätzlich auch Myeloide Suppressorzellen (MDSC) als GvHD-suppressive Empfängerzellen in Frage. Ihr zentrales Charakteristikum ist die Fähigkeit zur Unterdrückung der adaptiven Immun- und insbesondere der T-Zell-Antwort (Bronte et al., 2016), wodurch sie als regulatorisches Gegengewicht aktiver Immunvorgänge fungieren. MDSC erscheinen erst in Reaktion auf eine pathologische Aktivierung der Hämatopoese, bspw. durch eine maligne Erkrankungen oder in einer chronischen Entzündungssituation (Veglia et al., 2021). Sie können als aktivierte, nicht vollständig ausdifferenzierte myeloide Zellen in KM, Blut oder Milz oder peripher in Randzonen solider Tumoren detektiert werden (Condamine et al., 2015; Gabilovich, 2017). MDSC sind in Mäusen phänotypisch definiert als Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloide Zellen (Gr-1 = Ly6C/Ly6G). Sie werden subdifferenziert in mononukleäre oder monozytäre M-MDSC, polymorphonukleäre/ granulozytäre PNM-MDSC und eine noch nicht vollständig definierte Population früher (early) eMDSC (Bronte et al., 2016). Funktionell wichtig sind inhibitorische Mechanismen wie bspw. PD-L1, der Abbau essenzieller Aminosäuren bspw. durch Arginase 1

und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) oder reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Von ihnen sezernierte Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10 und Wachstumsfaktoren unterstützen außerdem die Gewebeproliferation und -regeneration (Bronte et al., 2016; D'Aveni et al., 2020). Da MDSC peripher bspw. in Tumor-assoziierte Mph ausdifferenzieren können (Kumar et al., 2016; Vinay et al., 2015), fällt eine klare Abgrenzung zu immunsuppressiven Mph schwer.

Für die allo-HSCT und GvHD haben MDSC in den vergangenen zwei Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen (Koehn and Blazar, 2017): In klinischen Studien ist für Patienten mit einer hohen Dichte an Spender-MDSC im Transplantat ein verringertes GvHD-Risiko nachgewiesen (Lv et al., 2015; Vendramin et al., 2014). Auch im Tiermodell ist ihre experimentelle Expansion oder die adoptive Transfusion von MDSC mit einer reduzierten GvHD assoziiert (Billiau et al., 2003; Highfill et al., 2010; Koehn et al., 2015; Koehn and Blazar, 2017; Matta et al., 2016). Aufgrund dieses Potenzials kommen auch sie neben den klassischen APC, DC und Mph, als intestinale GvHD-suppressive Zellen in Frage.

### 3. Zielsetzung und Methodik

#### 3.1 Zielsetzung

Intestinalen Empfänger-APC wurden im Kontext der GvHD protektive immunsuppressive Fähigkeiten, insbesondere gegenüber alloreaktiven T-Zellen, nachgewiesen. Diese Empfänger-APC sollen in dieser Arbeit näher charakterisiert und eingeordnet werden. Sie werden im Mausmodell unter folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Sind die GvHD-suppressiven Empfänger-APC einer definierten Zellpopulation, insbesondere DC oder Mph, zuzuordnen?
2. Über welche molekularen Effektormechanismen supprimieren sie eine inflammatorische Reaktion in der intestinalen Mukosa? Wie regulieren sie alloreaktive T-Zellen?
3. Aus welchen Vorläuferzellen entwickeln sie sich?

Ein tieferes Verständnis könnte die Möglichkeit eröffnen, die Zellpopulation durch Expansion präventiv vor oder durch gezielten Erhalt nach Transplantation zu fördern und einzelne Effektormechanismen mittels Immunmodulation zu verstärken. Eine präventive bzw. therapeutische Nutzung könnte auch im Kontext anderer entzündlicher Darmerkrankungen relevant werden.

### 3.2 Methodik

Die Charakterisierung der GvHD-protectiven Zellen erfolgte anhand eines MHC-disparaten *Major-Mismatch*-allo-HSZT-Mausmodells. Hierzu wurden gesunde Mäuse mit genetischem Hintergrund im Stamm C57BL/6 (H2<sup>b</sup>, im Folgenden B6) myoablativ bestrahlt und mit Knochenmark und beigemengten T-Zellen von Tieren mit genetischem Hintergrund im Stamm FVB/N (H2<sup>q</sup>, im Folgenden FVB) transplantiert. Durch die MHC-Disparität beider Stämme wurde in den Empfängertieren eine akute GvHD induziert. In einem Teil der Experimente verwendeten wir transgene Tiere des Stammes B6.CD11c.DOG als Empfängertiere: In diesen Tieren exprimierten CD11c<sup>+</sup> Zellen den Primaten-Diphtherietoxinrezeptor und waren damit, im Gegensatz zu allen anderen murinen Zellen, empfindlich für Diphtherietoxin (Jung et al., 2002). Die CD11c<sup>+</sup> Zellen dieser Tiere konnten durch intraperitoneale Injektion des Toxins in die Apoptose getrieben und so selektiv zerstört (depletiert) werden. Wie zuvor betont, erfolgte die Depletion erst in der frühen Effektorphase der akuten GvHD, nach Abschluss der T-Zell-Aktivierung. Die Zellanalyse selbst erfolgte am Tag 6 nach allo-HSZT, in der frühen GvHD-Effektorphase. Das Diphtherietoxin-abhängige Mausmodell erlaubte den Vergleich von GvHD-Mäusen mit und ohne CD11c<sup>+</sup> Empfängerzellen und die nähere Charakterisierung der vorhandenen oder fehlenden CD11c<sup>+</sup> Zellpopulation. Da vorangegangene und unsere Experimente bestätigten, dass die CD11c<sup>+</sup> Empfängerzellen grundsätzlich als APC klassifiziert werden können, wird im Folgenden auch von CD11c<sup>+</sup> APC gesprochen.

Für eine umfassende Charakterisierung betrachteten wir die CD11c<sup>+</sup> GvHD-protectiven Empfänger-APC auf zwei Ebenen: Der des Proteoms, also der Proteinausstattung zum Zeitpunkt der Untersuchung, und der des Transkriptoms, also der in Zellkern und Zytoplasma vorliegenden mRNA-Moleküle.

Alle Methoden der Proteomebene konzentrierten sich auf die Oberflächenproteinausstattung der Zellen. Durch die quantitative Durchflusszytometrie wurde eine erste Einordnung und Nomenklatur der GvHD-protectiven APC anhand von Signaturproteinen vorgenommen. Zur gezielten Analyse der Haupteffektorfunktionen in der intestinalen Mukosa ergänzten wir qualitative Immunfluoreszenzfärbungen: Hierin wurden die Zellen im Gewebezusammenhang und insbesondere in Kollokalisierung mit allogenen T-Zellen dargestellt.

Zur Analyse des Transkriptoms führten wir eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung durch: Diese

mit einer hochkomplexen Datenanalyse verbunden Methode erlaubte die Aufschlüsselung der Gesamtheit aller hämatopoetischen Empfängerzellen der intestinalen Mukosa in einzelne Zellpopulationen. Die zwei darin detektierten GvHD-protectiven APC-Populationen wurden detailliert charakterisiert, indem wir ihr Transkriptomprofil mit der Gesamtheit der übrigen Zellen und mit der jeweils anderen GvHD-protectiven Zellpopulation verglichen. Der gesamte Analyseprozess erfolgte auf rein bioinformatischer Grundlage und damit, anders als auf Proteomebene, frei von geltenden Populationsdefinitionen, erwarteten Effektorfunktionen oder ontogenetischen Markern.

## Material und Methoden

Im Folgenden wird zunächst das Mausmodell der akuten GvHD mit Angaben zum Tierversuch erläutert. Anschließend wird die praktische Durchführung der allo-HSZT beschrieben, gefolgt von den zwei Methoden der Proteomanalyse, Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie, sowie der Einzelzell-RNA-Sequenzierung als Methode der Transkriptomanalyse.

### 1. Angaben zum Tierversuch

#### 1.1 Versuchstiere

Alle allo-HSZT-Experimente erfolgten anhand eines *Major-Mismatch*-allo-HSZT-Mausmodells, in dem eine akute GvHD durch die Disparität der MHC-Gene von Spender- und Empfängertieren induziert wurde. Für die Versuche wurden Mäusen des Stammes FVB/N (H2<sup>q</sup>, CD45.1, CD90.1) und des Stammes FVB.L2G85 (H2<sup>q</sup>, CD45.1, CD90.1) als Spendertiere verwendet, im Falle der Einzelzellsequenzierung ein 13 Wochen altes FVB.L2G85 Männchen, in den übrigen Versuchen weibliche Tiere im Alter von 10 – 12 Wochen. Als Empfänger dienten in Bezug auf das Geschlecht mit den Spendern abgestimmte Mäuse des Stammes C57BL/6 (B6) und B6.CD11c.DOG (Jung et al., 2002) (beide H2<sup>b</sup>, CD45.2, CD90.2) im Alter von 8 – 13 Wochen. Teilweise waren die Tiere auf einen Albinohintergrund zurückgekreuzt (dann B6a/J bzw. B6a.CD11c.DOG). Alle Tiere entstammten der hauseigenen Zucht des Zentrums für experimentelle molekulare Medizin Würzburg. Alle Mausstämme gehen zurück auf Zuchtpaare von Jackson Laboratories. Als Knochenmarks- und Bestrahlungskontrollen dienten in der hauseigenen Zucht anfallende Wildtyptiere aus den Stämmen B6a.ins-ova und B6a.Foxp3.Luci.DTR und Mäuse des Stammes B6a/J.

## 1.2 Tierversuchsgenehmigung und Tierhaltung

Die beschriebenen Versuche wurden durch die Regierung von Unterfranken im Tierversuchsantrag, Aktenzeichen 55.2-2531.01-82/14, genehmigt. Die Tierhaltung entsprach den darin festgelegten Regularien. Während der Versuche wurden neben den hausinternen allgemeinen Maßnahmen zur Reduktion des Kontaminations- und Infektionsrisiko folgende Schutzmaßnahmen befolgt: direkter Kontakt zum Tier nur mit Schutzkittel, Spezialschuhen, Haube, Mundschutz und Handschuhen und Abdeckung der Käfige bei Transport mit Filterhauben und der Bestrahlungsboxen mit speziellen Feinfiltern sowie grünen OP-Tüchern zur Abschirmung von außen. Während des Versuchs wurden die Tiere im arbeitsgruppeneigenen Imaginglabor in einem Klimaschrank (Scantainer, Scanbur, Karlslunde, Dänemark) mit Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden in Käfigen mit ein bis fünf Tieren gehalten.

## 1.3 Anästhesie

Zur Sicherstellung ausreichender Analgesie, Hypnose und Muskelrelaxation wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Xylocain (16 µg/ g Körpergewicht, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) und Ketamin (80 µg/ g Körpergewicht, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) betäubt. Die Narkotika wurden hierzu in phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS) gelöst. PBS wurde auf Vorrat hergestellt mit: 80 g NaCl, 14,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 g KCl und 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1000 ml destilliertem Wasser, pH: 6,8. Dieser Grundstock wurde 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt und entspricht im Folgenden dem Begriff PBS. Das Erreichen des Toleranzstadiums wurde durch Ausfall des Zwischenzehenreflexes überprüft. Dieses Narkoseprotokoll wurde vor Tötung der Tiere durch Genickbruch (Streckung) sowie bei retrobulbärer Injektion der Stammzellsuspensionen angewendet und entspricht im Folgenden dem Begriff Anästhesie.

## 2. KM- und T-Zell-Transplantation

### 2.1 Experimental- und Kontrollgruppen

Zur Induktion einer akuten GvHD wurden 3 – 5 myeloablativ bestrahlte Empfängertiere des Stammes B6 bzw. B6.CD11c.DOG mit KM- und T-Zellen von in Bezug auf Geschlecht und Alter abgestimmten Tieren des Stammes FVB/N bzw. FVB.L2G85 transplantiert. Folgende Kontrollgruppen, ebenfalls bestehend aus 3 – 5 Tieren, wurden verwendet:

- Knochenmarkskontrolle: Bestrahlung und allo-HSZT mit reinen Knochenmarkszellen: Überprüfung des Engraftments der Transplantatzellen und Wiederherstellung der Hämatopoese; Beobachtung bis 30 Tage nach allo-HSZT
- Bestrahlungskontrolle: reine Bestrahlung: Überprüfung des myeloablativen und damit tödlichen Effekts der Bestrahlung; Beobachtung bis zur klinischen Manifestation der Knochenmarksaplasie. Ggf. Tötung der Mäuse, sofern der klinische Zustand den im Versuchsprotokoll festgelegten Scoringwert (s. u.) überschritt.
- Unbehandelte Kontrolle: Überprüfung der Haltungsbedingungen, Referenzwert

## 2.2 Myeloablative Bestrahlung

Bis zu neun Empfängertiere wurden in einer mit einem Feinfilter (Feinfilter F5 M5, 1mm Dicke, Alp Filtertechnik, Mönchengladbach, Deutschland) abgedeckten *Mouse Pie Chart Box* (Braintree Scientific Inc., Braintree, MA, USA) mit einer Kumulativdosis von 9 Gy bestrahlt. Diese Ganzkörperbestrahlung erfolgte in einem Faxitron CP-160 X-Ray Bestrahlungssystem (Lincolnshire, IL, USA) in der Tierhaltung des Zentrums für experimentelle und molekulare Medizin und entsprach einer Bestrahlungszeit von 14,4 min.

## 2.3 Gewinnung der KM-Zellen

Nach Anästhesie wurden die Mäuse durch Genickbruch (Streckung) getötet. Nach Desinfektion des Fells mit 70 % Ethanol wurden Haut und Peritoneum eröffnet und die Milz sowie beide Femora und Tibiae unter Mitnahme der umgebenden Muskeln entnommen. Auf einer sterilen Unterlage wurden die Knochen mittels Pinzette und Skalpell weitestmöglich von Muskeln und Sehnen befreit und der Markraum durch Abtrennung der Epiphysen eröffnet. Das Knochenmark wurde durch Spülung mit PBS herausgelöst, die Zellsuspension durch ein 70 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Falconröhrchen filtriert und 5 min bei 1200 Umdrehungen pro Minute (engl. *rounds per minute*, rpm, entspricht je nach Zentrifuge 336 g (hier als Vielfaches der Erdbeschleunigung) bzw. 311 g) und 4 °C zentrifugiert. Sofern nicht anders angegeben, umfasst der Begriff Zentrifugation im Folgenden diese Bedingungen. Es wurden zwei verschiedene Zentrifugen verwendet: eine Heraeus Megafuge 40 Universalzentrifuge, 336 g bei 1200 rpm, mit Rotor: TX-1000 4x 1000 ml Ausschwingrotor, Radius: 209 mm, und eine Heraeus Multifuge 3SR Plus, 311 g bei 1200 rpm, mit Rotor: 75006445 Sorvall Ausschwingrotor, Radius: 192 mm.

Die KM-Zellen wurden in 10 ml PBS resuspendiert und die Zellkonzentration mittels Zählkammer (Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland) manuell bestimmt. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde die Zellsuspension mit sterilfiltriertem PBS auf eine Konzentration von  $5 \times 10^7$  Zellen/ ml eingestellt.

## 2.4 Gewinnung der T-Zellen

### *Herstellung einer Suspension von Splenozyten*

Die zuvor entnommene Milz wurde mehrmals eingeschnitten und mit der Rückseite eines Spritzenstempels durch ein zuvor mit PBS angefeuchtetes  $70 \mu\text{m}$ -Zellsieb gerieben. Die Erythrozyten wurden durch Hinzugabe von 8 ml Lysispuffer (8,99 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 g  $\text{KHCO}_3$  und 0,037 g EDTA (Ethyldiamintetraacetat) in 1000 ml destilliertem Wasser) lysiert und die Lyse nach 2 min durch Hinzugabe von 10 ml PBS gestoppt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen, das übrige Volumen nochmals durch ein  $70 \mu\text{m}$ -Zellsieb filtriert und mit 10 ml PBS auf 13 ml verdünnt.

### *Isolation der T-Zellen*

Die Isolation der T-Zellen erfolgte mittels Dynabeads™ Untouched™ Mouse T Cell Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Prinzip der Negativselektion und dem Protokoll des Herstellers. Die resultierende T-Zell-Suspension wurde mit sterilem PBS auf eine Konzentration von  $6 \times 10^6$  Zellen/ ml eingestellt, die Reinheit der Zellsuspension am gleichen Versuchstag durchflusszytometrisch überprüft (CD45.1, CD4, CD8). In allen Versuchen lag der Anteil  $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$  Zellen unter 5 %.

## 2.5 Eigentliche Transplantation

T- und KM-Zellsuspension wurden in einem Volumenverhältnis von 1:1 gemischt. 2,5 bis 3,5 Stunden nach Bestrahlung wurde den anästhesierten Mäusen  $200 \mu\text{l}$  dieser Suspension und damit gewichtsunabhängig  $5 \times 10^6$  KM- und  $6 \times 10^5$  T-Zellen mittels Insulinspritze in den retroorbitalen Venenplexus injiziert.

## 3. Folgezeit

### 3.1 Infektionsprophylaxe

In der Zeit von 0 – 14 Tagen nach allo-HSZT bzw. alleiniger Bestrahlung erhielten alle bestrahlten Versuchstiere Enrofloxazin (Baytril, Bayer, Leverkusen, Deutschland) zur

Infektionsprophylaxe. Das Antibiotikum wurde in einer Endkonzentration von 12,5 µg/ ml im Trinkwasser gelöst.

### 3.2 Injektion von Diphtherietoxin

Zur Depletion der CD11c-exprimierenden Zellen wurde den Tieren beider Experimentalgruppen der Einzelzell-RNA-Analyse am Tag 2,5, 3,5 und 5 nach allo-HSZT eine Dosis von 1 µl Diphtherietoxin/5 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert (Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). So wurde in den genveränderten, Toxin-empfindlichen B6.CD11c.DOG-Mäusen eine CD11c<sup>+</sup> Zell-Depletion erreicht, die CD11c<sup>+</sup> Zellen der B6 Wildtypiere blieben davon unberührt. Die Dosis wurde anhand des aktuellen Gewichts berechnet und mit PBS auf 300 µl verdünnt. Am Tag 6 nach allo-HSZT lag der Anteil CD11c<sup>+</sup> Zellen in der intestinalen Mukosa der B6.CD11c.DOG-Mäuse in der durchflusszytometrischen Analyse bei < 5,5 %.

### 3.3 Monitoring der Versuchstiere

An den Tagen 1 - 6 bzw. 1 - 30 nach allo-HSZT wurden die Versuchstiere der Experimental- und Kontrollgruppen täglich gewogen und auf Symptome der akuten GvHD untersucht. Anhand der Symptome wurde ein klinischer Scoringwert nach Cooke et al. (Cooke et al., 1996) berechnet. Ein Scoringwert von ≥ 8 Punkten, ein isolierter Wert von 2 im Spontanverhalten oder ein Gewichtsverlust von ≥ 30 % innerhalb von 2 Tagen hätten einen Versuchsabbruch zur Folge gehabt. Hierzu ist es in keinem der Versuche gekommen.

**Tabelle 1: Modifizierter klinischer Score der akuten GvHD nach Cooke et al. 1996 [27]**

	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	
Gewichtsverlust	< 10 %	> 10 %, < 25 %	> 25 %	> 30 %: 2+ P.
Körperhaltung	normal	gekrümmt, aber nur in Ruhe	gekrümmte Haltung schränkt Bewegung ein	
Spontanverhalten	normal	leicht bis mäßig reduziert	fehlend, Bewegung nur nach Provokation	
Fellbeschaffenheit	normal	leicht bis mäßig struppig	sehr struppig/ schlechte Pflege	
Haut	normal	Schuppung an Pfoten/ Schwanz	deutliche Felldefekte	
Augenbefund	normal	Konjunktivitis einseitig oder leicht ausgeprägt beidseitig	schwere Konjunktivitis beidseitig	

Lecken oder Kratzen entzündeter Hautpartien	nein	< 1x/ min	> 1x/ min
Stuhlgang	normal	wenig geformter Kot/Analschleimhaut geschwollen	starke Diarrhö, klebriger verbackender Kot
Atmung	normal	flacher als normal, kein oder geringer Einsatz der Atemhilfsmuskulatur	angestrengt, starker Einsatz der Atemhilfsmuskulatur

#### 4. Immunfluoreszenzmikroskopie

##### 4.1 Einbettung der Organe und Herstellung der Schnitte

Am Tag 5 nach allo-HSZT wurden die Versuchstiere unter Anästhesie getötet und Dünndarm und Milz entnommen. Peyersche Plaques (PP) waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr eindeutig zu identifizieren und konnten somit nicht berücksichtigt werden. Der Darm wurde makroskopisch von Fett und Mesenterium befreit und zusammen mit der Milz in Abschnitten in Einbettmedium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Staufen, Deutschland) in Cryomolds (Plastikschalen) eingebettet. Über Nacht wurden die Gewebelöcke in einem luftdichten Plastiktütchen bei -20 °C gelagert, am folgenden Tag mittels Cryostat (Leica CM1950, Leica, Nussloch, Deutschland) bei -20 °C in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Superfrost-Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgenommen. Die Gewebeschnitte wurden bis zur Färbung bei -20 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

##### 4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte bis auf die Gewebefixierung bei Raumtemperatur. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Objektträger dreimal für je zwei Minuten in einer stehenden und je frisch mit PBS gefüllten Glasküvette gewaschen (entspricht im Folgenden Waschung). Zur Herstellung von Blockierungs- und Antikörperlösungen wurde 20 %iges Normalserum (in PBS) von Esel und Ziege im Mischungsverhältnis 1:1 verwendet. Für Blockierung und Färbung wurden je 150 µl Lösung auf den Schnitt pipettiert und verteilt.

Die Gewebeschnitte wurden sieben Minuten lang in -20 °C kaltem Aceton fixiert, fünf Minuten lang luftgetrocknet und der erkennbare Schnitt mit einem PAP-Pen Liquid Blocker-Stift (Science Services, München, Deutschland) umfahren, um die Antikörpersuspensionen auf dem Gewebe zu halten.

Nach einer Waschung wurden unspezifische Bindungen blockiert: Sofern bei der Färbung ein Biotin-Streptavidin-System verwendet wurde, für jeweils zehn Minuten zunächst mit einer Avidin- und nach einer Waschung mit einer Biotin-Lösung (Blocking Kit: Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sofern kein Biotin-Streptavidin System verwendet wurde, ausschließlich mit 20 %igem Serum (in PBS). Nach nochmaliger Waschung wurden die frisch hergestellten Erstantikörpersuspensionen, bzw. im Falle der Kontrollen reines 20 %iges Serum auf das Gewebe pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Folgende Antikörper und Konzentrationen wurden verwendet:

**Tabelle 2: Für Immunfluoreszenzmikroskopie verwendete Primär- und definitive Antikörper**

Antikörper	Klon	Konjugat	Organismus	Hersteller	Konzentration
F4/80	BM8	Purified	Ratte	Biologend	1:50
CD11c	N418	Purified oder Biotin	Armenischer Hamster	Biologend	1:50
CD45.1	A20	Biotin	Maus	Biologend	1:100
PD-L1 (CD274)	10F.9G1	Purified	Ratte	Biologend	1:100
CD16/ CD32	93	Purified	Ratte	eBioscience	1:200
CD90.1	HIS51	APC	Maus	eBioscience	1:50

Nach Waschung wurden die Sekundärantikörperlösungen auf das Gewebe pipettiert und ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Folgende Sekundärantikörper und Konzentrationen wurden verwendet:

**Tabelle 3: Für Immunfluoreszenzmikroskopie verwendete Sekundärantikörper**

Antikörper	Konjugat	Hersteller	Konzentration
Esel Fab anti-Ratte IgG	Cy3	Dianova	1:400
Esel Fab anti-Kaninchen IgG	Cy3	Dianova	1:200
Ziege IgG anti-Hamster armenisch IgG	A647	Dianova	1:200
Streptavidin	A488	Invitrogen	1:400
Streptavidin	A546	Invitrogen	1:400

Nach abschließender fünfschrittiger Waschung (5x 2min) wurden die Schnitte in *Vectashield® Antifade* Eindeckmedium mit DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

eingedeckt und mit Eindeckmittel (*Entellan*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) versiegelt. Bis zur Mikroskopie wurden sie zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit getrocknet und weiterhin bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

#### 4.3 Mikroskopie

Die Mikroskopie erfolgte an einem Zeiss Fluoreszenzmikroskops des Typs Axio Imager.Z1m (Zeiss, Göttingen, Deutschland) bei 200x und 400x Vergrößerung mit den Objektiven 20x Plan-Apochromat mit 0,8 numerischer Apertur und 40x Plan-Neofluar mit 1,3 numerischer Aparatur/Immersionöl. Die Bilder wurden mit einer Kamera des Typs AxioCam MR3 aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der PC-Software AxioVision (Zeiss, Göttingen, Deutschland), mit der Kontrast und Helligkeit der einzelnen Fluoreszenzkanäle nachträglich angepasst wurden.

### 5. Durchflusszytometrie und Zellsortierung

#### 5.1 Grundprinzip

Mit der durchflusszytometrischen Zellanalyse kann die Expression von Oberflächen- und intrazellulären Proteinen auf oder in einzelnen Zellen quantitativ ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden jedoch nur Oberflächenproteine analysiert. Zusätzlich können weitere Informationen wie Größe und Granularität der Zellen aufgezeichnet werden. Hierzu werden die Zielproteine in oder auf den Zellen zunächst mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert. Die Zellen fließen dann in einem Medium an Lasern verschiedener Wellenlänge vorbei (am verwendeten Gerät drei Laser in den Wellenlängen 633 nm (rot), 488 nm (blau) und 405 nm (violett)). Die Laser regen die Fluoreszenzfarbstoffe an (Exzitation). Wird die aufgenommene Energie wieder abgegeben, wird Licht einer bestimmten, farbstoffspezifischen Wellenlänge ausgesandt (Emission), das in einem Photodetektor in verschiedenen Kanälen aufgezeichnet wird. Die Stärke dieses Signals verhält sich proportional zur Menge der fluoreszierenden Moleküle und damit zur Menge der an die Zelle gebundenen Antikörper. So kann quantitativ ermittelt werden, wie hoch ein Protein auf der Zelle exprimiert ist.

Dadurch, dass die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe über unterschiedliche Exzitations- und Emissionsspektren verfügen, konnten am verwendeten Gerät bis zu acht Farben unterschieden und damit acht verschiedene Antigene analysiert werden. Gleichzeitig kam es durch Überschneidung der Emissionsspektren dazu, dass ein Antikörper in mehreren

Kanälen positive Signale erzeugte. Diese Überschneidung kompensierten wir in der anschließenden Datenanalyse mathematisch und rechneten falsch positive Signale aus benachbarten Kanälen heraus. Die Matrix für diese Berechnungen wurde anhand von Messungen isoliert gefärbter Compensation-Beads aufgestellt. Die Abgrenzung von für einen bestimmten Antikörper positiven und negativen Zellen erfolgte anhand der FMO- (engl. *Fluorescence Minus One*) Methode (Roederer, 2001): Die Zellen wurden hierfür mit allen Antikörpern der Gesamtkombination außer einem inkubiert und ihre Fluoreszenzintensität im Kanal des weggelassenen Antikörpers gemessen. So ließen sich positive Signale, welche durch Einstrahlung der benachbarten Kanäle in den des Antikörpers entstanden (*Spillover*), heraus- und der Grenzwert berechnen, in dem die Zelle als negativ für den Antikörper galt. Bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung wird das Prinzip der Durchflusszytometrie angewendet, um die Zellen nach Eigenschaften zu sortieren. Die Zellen werden hierbei in einzelne Tropfen eines Mediums eingeschlossen und die Tropfen in einer Reihe perlenschnurartig an einem Detektor vorbeigeleitet. Idealerweise enthält ein Tropfen eine einzelne Zelle. Wird ein positives (einen bestimmten Schwellenwert überschreitendes) Signal in einem oder mehreren zuvor eingestellten Kanälen detektiert, wird der Tropfen elektrisch aufgeladen und durch Anwendung eines elektromagnetischen Feldes in eine Richtung abgelenkt. So können alle für ein Protein oder eine Proteinkombination positiven Zellen vom Rest der Zellsuspension separiert und in einem gesonderten Falconröhrchen aufgefangen werden.

## 5.2 Praktische Durchführung

### *Herstellung einer Einzelzellsuspension der Dünndarmwand*

Das folgende Protokoll, orientiert an Duke Geem et al. (Geem et al., 2012), wurde für jede Maus einzeln angewendet:

Lösung (Lsg) 1:  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  freies HBSS (engl. *Hanks Balanced Salt Solution*, Thermofisher, Waltham, MA, USA) mit 5 % fetalem Kälberserum und 2 mM EDTA, 37 °C

Lsg 2:  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  haltiges HBSS (Thermofisher, Waltham, MA, USA) mit 5 % fetalem Kälberserum, 2 mM EDTA, 1,5 mg/ ml Collagenase VIII (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 40 µg/ ml DNase I aus Rinderpankreas (Roche, Basel, Schweiz), 37 °C. Die Enzyme wurden erst kurz vor Verwendung hinzupipettiert, um eine frühzeitige Aktivierung zu verhindern.

Lsg 3:  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  freies HBSS mit 10 % fetalem Kälberserum, 4 °C

Am Tag 6 nach allo-HSZT wurden die Versuchstiere unter Anästhesie getötet. Der Dünndarm wurde ca. 1 cm nach Magenausgang und ca. 1 cm vor dem Zäkum reseziert. Unter Feuchthaltung mit PBS wurden alle makroskopisch erkennbaren PP sowie das Mesenterium entfernt. Der Darm wurde longitudinal aufgeschnitten und in einer mit PBS gefüllten Glasschale in reichlich Volumen mit der Pinzette schnell hin- und hergezogen, um verbleibenden Darminhalt auszuwaschen. Er wurde dann in 1,5 cm langen Abschnitten in ein mit 30 ml Lsg 1 gefülltes Falconröhrchen transferiert.

Die folgenden Schritte erfolgten bei 37°C:

Zur Ablösung der Epithelzellen wurde das Falconröhrchen auf einem orbitalen Schüttler (*Shaker*, Biosan, Riga, Lettland) bei 250 rpm 20 min lang geschüttelt. Die zellhaltige Flüssigkeit wurde abgossen und verworfen und die Darmabschnitte in einem metallenen und zuvor desinfizierten Haushaltssieb aus Draht aufgefangen. Sie wurden dann in ein zweites Falconröhrchen mit 30 ml Lsg 1 transferiert, 20 min Schütteln, Abgießen und Auffangen wurden einmal wiederholt. Die Darmabschnitte wurden auf einem Plastikwiegeschälchen mit einer Schere weitestmöglich zerkleinert. Die noch stückige Gewebesuspension wurde in ein nächstes Falconröhrchen mit 10 ml der Collagenase- und DNase haltigen Lsg 2 übertragen und 20 min bei 200 rpm geschüttelt. Nach einmaligem Vortexen (Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA, 20 s) wurde der Falconröhrcheninhalt in einem GentleMACs Octo Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) weiter zerkleinert, und zwar durch zweimalige Anwendung des Dissoziationsprogramms *m\_intestine\_001*.

Die Zellsuspension wurde unter Verdünnung mit 10 - 15 ml Lsg 3 durch ein 100 µm Zellsieb in ein nächstes 50 ml Falconröhrchen filtriert, 5 min bei 1500 rpm/ 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml Lsg 3 resuspendiert. Filtration und Zentrifugation wurden einmalig wiederholt. Das Pellet der letzten Zentrifugation wurde in 6 ml PBS mit 10 % fetalem Kälberserum resuspendiert und 2/3 davon in ein FACS-Röhrchen überführt. Das Röhrchen enthielt somit eine Zellsuspension der Dünndarmwand ohne die zuvor entfernten makroskopisch sichtbaren PP und ohne Epithelzellen. Da sich die anvisierten APC im Gesunden neben den PP in der intestinalen Mukosa und insbesondere in der Lamina propria konzentrieren (Varol et al., 2010) und auch unsere Mikroskopie eine Lokalisation in der Lamina propria der Mukosa bestätigte, wird im in dieser Arbeit auch von APC bzw. DC und Mph der intestinalen Mukosa gesprochen.

### *Immunfluoreszenzfärbung*

1 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden in entsprechendem Volumen, mindestens aber 100 µl, in eine Schale einer 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde einmalig zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden die Zellen in 100 µl PBS mit 5 % normalem Rattenserum aufgenommen und 10 min bei 4 °C inkubiert.

Zu den 100 µl Zellsuspensionen wurde 100 µl der jeweils frisch verdünnten Antikörper-Lösung pipettiert und gemischt. Die angegebenen Antikörperkonzentrationen entsprechen den endgültigen Konzentrationen nach Zusammenpipettieren. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4 °C und Dunkelheit wurde die Mikrotiterplatte zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden abschließend in 200 µl PBS aufgenommen.

Für die Zellsortierung wurden je 4 ml der Mukosa-Zellsuspension verwendet, die Blockade erfolgte mit 500 µl PBS mit 5 % normalem Rattenserum, die Färbung mit 500 µl Antikörperlösung. Die hierfür verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 kursiv geschrieben, die Lebend-Tot Farbstoffe färben apoptotische Zellen an. Am Ende wurden die Zellen in 2 ml PBS mit 10 % fetalem Kälberserum aufgenommen und auf Eis zum durchflusszytometrischen Zellsortiergerät (FACS Aria III, Becton Dickinson, BD, Heidelberg) transportiert.

***Tabelle 4: Für die Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung verwendete Antikörper***

Antigen	Klon	Konjugat	Hersteller	Konzentration
LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	-	Violett, detektierbar in Pacific Blue	ThermoFisher	1:1600
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	-	Gelb, detektierbar in AmCyan	Biolegend	1:200
CD8a	53-6.7	APC	Biolegend	1:1600
CD4	RM4-5	PerCP/Cy5.5	Biolegend	1:1600
CD45.1	A20	Alexa Fluor 488	Biolegend	1:1600
CD45.2	104	APC/Cy7	Biolegend	1:800
CD45.2	104	FITC	Biolegend	1:1600
CD11c	N418	Alexa Fluor 647	Biolegend	1:1600
I-A <sup>b</sup>	AF6-120.1	PE	Biolegend	1:1600
I-A <sup>b</sup>	AF6-120.1	PerCp/Cy5.5	Biolegend	1:1600
CD90.1	HIS51	PerCP/Cy5.5	eBioscience	1:6400
CD90.1	OX-7	Alexa Fluor 488	Biolegend	1:3200
F4/80	BM8	Pacific Blue	Biolegend	1:400

CD64	X54-5/7.1	PE-Cy7	Biolegend	1:400
CD16/ CD32	93	APC-Cy7	Biolegend	1:800
PD-L1 (CD274)	10F.9G2	PE-Cy7	Biolegend	1:1600
CD115	AFS98	PE	Biolegend	1:600
<i>Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit</i>	-	<i>Gelb, detektierbar in AmCyan</i>	<i>Biolegend</i>	<i>1:100</i>
CD45.2	104	APC/Cy7	<i>Biolegend</i>	<i>1:400</i>

Für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung wurden die kursiv geschriebenen *Zombie Aqua* und der anti-CD45.2-Antikörper in APC/Cy7 verwendet.

#### *Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung*

Die durchflusszytometrische Zellanalyse erfolgte an einem BD FACS-Canto II-Gerät (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland), das mit der FACS-Diva Software (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland) bedient wurde. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software FlowJo, Version 10.1 (FlowJo, Ashland, OR, USA). Die statistische Analyse erfolgte mit der Software GraphPad Prism, Version 7. Sofern nicht anders angegeben wurde ein ungepaarter t-Test mit Signifikanzniveau  $p < 0,05$  durchgeführt.

Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung erfolgte an einem FACS Aria III-Gerät (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland). Direkt vor dem Sortieren wurde die Zellsuspensionen einmalig über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Falconröhrchen gefiltert und währenddessen immer wieder durch Hoch- und Herunterpipettieren in einer 1000 µl Pipette durchmischt, um einer Verstopfung des Geräts vorzubeugen. Selektiert („gesortet“) wurden lebendige hämatopoetische Empfängerzellen (*Zombie Aqua*<sup>-</sup>CD45.2<sup>+</sup>). Die Zellen beider Experimentalgruppen mit und ohne CD11c-Zell-Depletion wurden jeweils in einem 4 ml FACS-Röhrchen in 10 µl RPMI-Medium (engl. *Roswell Park Memorial Institute* Medium) mit 10 % fetalem Kälberserum aufgefangen. Die Zellen aller drei Mäuse einer Versuchsgruppe wurden somit zu einer einzigen Probe vereint. Die beiden Proben, im Folgenden *CD11c.depl* (CD11c<sup>+</sup> Zell-depletiert, CD11c<sup>+</sup> Zellen nicht mehr präsent) und *CD11c.präs* (nicht CD11c<sup>+</sup> Zell-depletiert, CD11c<sup>+</sup> Zellen präsent) bezeichnet, wurden auf Eis zum RNA-Sequenzierungslabor gebracht. Sie enthielten folgende Zellzahlen:

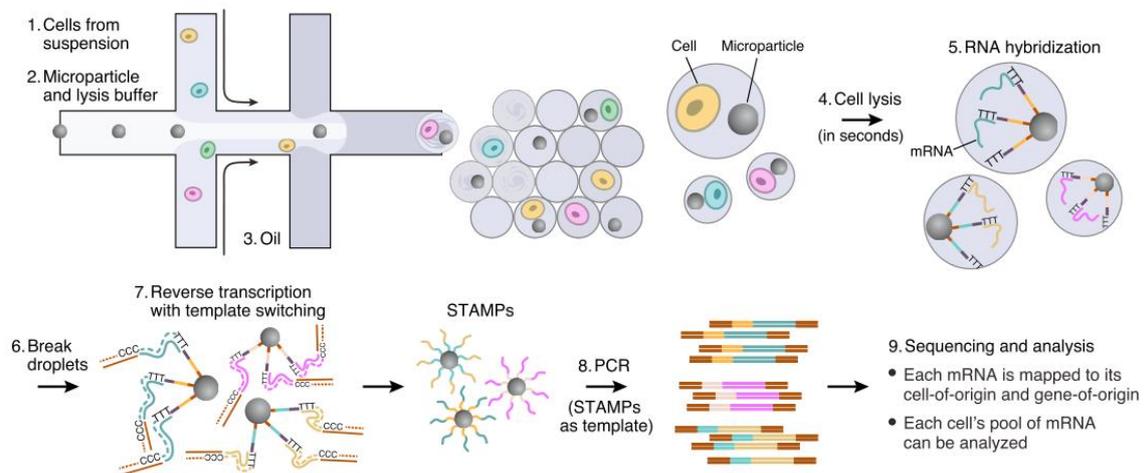
*CD11c.depl*: 1500 Zellen pro Maus = 4500 Zellen

*CD11c.präs*: 1500 Zellen<sub>Maus1</sub> + 2300 Zellen<sub>Maus2</sub> + 500 Zellen<sub>Maus3</sub> = 4300 Zellen

## 6. Einzelzell-RNA-Sequenzierung

### 6.1 Lyse und Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Die CD45.2<sup>+</sup> Zellen aus *CD11c.präs* und *CD11c.depl* wurden als je eine separate Probe nach dem Droplet-Sequencing Verfahren (Macosko et al., 2015) prozessiert (Abbildung 1). Dies erfolgte mit Geräten und Lösungen der 10X Genomics GemCode Technologie anhand der Anweisungen des Herstellers (10X Genomics, Leiden, Niederlande), in der Arbeitsgruppe Dr. A.E. Saliba, Helmholtz-Zentrum Würzburg. Hierzu wurden die Zellen zunächst in Tropfen (*Droplets*) getrennt voneinander aufgebrochen, ihre mRNA mittels zellspezifischer Barcodes und transkriptspezifischer UMIs (engl. *unique molecular identifier*) markiert und an einen Mikropartikel im Tropfen gebunden. Diese mRNA-besetzten Mikropartikel werden in Abbildung 1 als *STAMPS* bezeichnet: *Single-cell Transcriptomes Attached to MicroParticles*. Die Tropfen wurden dann aufgebrochen und die mRNA mittels PCR amplifiziert. Die so entstandenen cDNA-Libraries aus *CD11c.präs* und *CD11c.depl* wurden in einem Illumina HiSeq 2500 Gerät (Illumina, San Diego, CA, USA) sequenziert. Die Zuordnung der cDNA-Moleküle zu den ursprünglichen Einzelzellen und Proben *CD11c.präs* und *CD11c.depl* blieb im gesamten Prozess erhalten.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Droplet-Sequencing-Verfahrens (Macosko et al., 2015)**

Mit freundlicher Genehmigung des Verlages

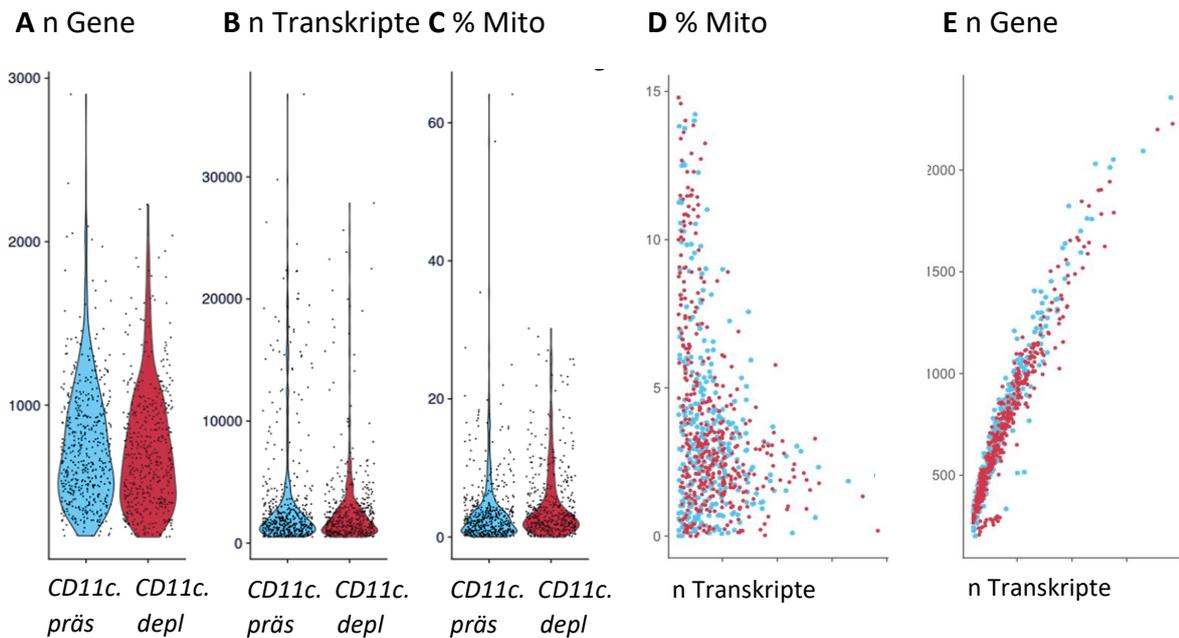
## 6.2 Demultiplexierung und Read-Alignment

Die Rohdaten beider cDNA-Bibliotheken wurden mit der Software CellRanger (Version 2.02) demultiplexiert. Dieser Schritt diente der Zuordnung aller sequenzierten cDNA-Moleküle zum jeweils ursprünglichen mRNA-Molekül (Transkript) und somit der Aufstellung aller einer Zelle zugeordneten mRNA-Sequenzen. Die Transkripte wurden unter Berücksichtigung des Spleißprozesses mittels STAR Aligner (Dobin et al., 2013) den Genen des Mausreferenzgenoms zugeordnet (engl. *read mapping*). Sequenzierungsfehler in den unterschiedlichen Transkript-Sequenzen (dem der ursprünglichen mRNA, des Barcodes und UMIs) wurden auf statistischem Wege korrigiert. Alle Dateien, die nicht sicher dem Genom, einem UMI und einer Einzelzelle zugeordnet werden konnten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Aus den resultierenden Daten wurde eine Gen-Barcode-Matrix mit der Anzahl der detektierten Transkripte pro Gen und Einzelzelle und damit eine erste Darstellung der Einzelzell-Genexpressionsprofile generiert. Ribosomale und mitochondriale Gene wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

## 6.3 Qualitätskontrolle

In der Qualitätskontrolle wurden solche Einzelzellen aus der Analyse entfernt, deren Eigenschaften in hohem Maße durch technische und nicht durch biologische Varianz bedingt waren (Abbildung 2). Entfernt wurden: Zellen mit sehr niedriger Anzahl detektierter Gene (A), Zellen mit sehr hoher Transkript-Anzahl (B), wahrscheinlich bedingt durch Einschluss zweier Zellen in einem Tropfen im Drop-Sequenzierungs-Verfahren und Zellen mit einem hohen Anteil mitochondrialer RNA (C) als wahrscheinlich apoptotische Zellen. Auch ein hoher Anteil mitochondrialer RNA in Relation zur Anzahl der Transkripte (D) oder eine niedrige Anzahl zugeordneter Gene in Relation zur Anzahl der Transkripte (E) galt als Ausschlusskriterium.

Nach abgeschlossener Qualitätskontrolle wurden die Einzelzellen der beiden Datensätze *CD11c.präs* und *CD11c.depl* zu einem einzigen Datensatz kombiniert, mit darin jedoch erhaltener Zuordnung zu *CD11c.präs* und *CD11c.depl*.



A - C) Violindiagramme mit Verteilung der Kennmesswerte innerhalb der Einzelzellen (schwarze Punkte) und Proben bzw. Datensätze (Violinform). CD11c.präs: blau, CD11c.depl: rot

D, E) Punktdiagramme mit Verteilung der Kennmesswerte bezogen aufeinander.

#### 6.4 Normalisierung

Um die Genexpressionswerte der Einzelzellen untereinander vergleichbar zu machen, wurden sie mittels *global scaling* normalisiert (Vallejos et al., 2017). Folgende zell- und prozessbezogenen Faktoren wurden hierbei besonders berücksichtigt: eine hohe Heterogenität der Einzelzellen, welche u.a. zu einer *zero inflation* (viele Gene wurden in vielen Zellen überhaupt nicht detektiert) führt, ein niedriger RNA-Gehalt der Einzelzellen und eine niedrige Sequenzierungstiefe. So wurden die Genexpressionswerte unter Verwendung einer logarithmischen Skalierung und des Medians an das Expressionsniveau von organisatorischen Genen (engl. *house keeping genes*), also von Genen, die in allen Körperzellen auf ähnlichem Niveau exprimiert sind, orientiert. Am Ende dieses Schrittes wurden die normalisierten Werte nochmals logarithmisch transformiert und in einer neuen, multidimensionalen Einzelzell-Genexpressionsmatrix aufgezeichnet.

## 6.5 Dimensionsreduktion, Visualisierung und Identifikation von Clustern

Die weitere Analyse erfolgte mittels unterschiedlicher Funktionen von Seurat, Version 3, einem informatischen Analysepaket in der Programmiersprache R, konzipiert für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung (Dr. Rahul Satija, New York City, NY, USA). Sie wurde von Dr. C. Liang der AG Prof. T. Dandekar, Biozentrum Würzburg Hubland, durchgeführt.

Zur Dimensionsreduktion erfolgte zunächst eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA). Diese diente der Ermittlung rein informatisch definierter Hauptkomponenten, welche sich entlang der höchsten Expressionsvariabilität aller im kombinierten Datensatz detektierten Gene erstreckten. Für jede Einzelzelle wurden so mehrere Hauptkomponentenwerte errechnet. Auf dieser Grundlage erfolgte die Visualisierung der Ergebnisse in einem UMAP-Diagramm (engl. *Uniform Manifold Approximation and Projection* (McInnes et al., 2018)). In diesem zweidimensionalen Koordinatensystem sind die Einzelzellen anhand ihrer Ähnlichkeit (ermittelt durch die Hauptkomponentenwerte) in unterschiedlicher Entfernung zueinander angeordnet, wobei Nähe im Koordinatensystem als Ähnlichkeit im Genexpressionsprofil aufgefasst werden kann. Anhand dieser Ähnlichkeitsanalyse wurden die Zellen in zwölf verschiedene Cluster eingeteilt, wobei ein Cluster eine Gruppe von Zellen mit ähnlichem Genexpressionsprofil umfasst. Die Einteilung erfolgte durch den bioinformatischen Algorithmus als *unsupervised analysis*, frei von biologischen Zellpopulationsdefinitionen.

## 6.6 Differentielle Genexpressionsanalyse

Es wurden nun die signifikant differentiell und besonders hoch exprimierten Gene der einzelnen Cluster identifiziert, die die jeweiligen Cluster auszeichneten. Hierzu wurde die Seurat-Funktion „*FindMarkers*“ angewandt. Pro Gen und Cluster wurden folgende Parameter bestimmt: die Prozentzahlen *pct.1* und *pct.2*, mit denen das Gen im betreffenden Cluster (*pct.1*) im Vergleich zur Gesamtheit der übrigen Zellen (*pct.2*) überhaupt detektiert wurde, die durchschnittliche Expression im entsprechenden Cluster im Vergleich zur Expression in der Gesamtheit der übrigen Zellen, ausgedrückt als durchschnittliche relative Änderung (engl. *fold change*, im Folgenden auch Foldchange genannt) im natürlichen Logarithmus (*avg\_logFC*) und der entsprechende p-Wert, also die Wahrscheinlichkeit, mit dem die differentielle Genexpression durch Zufall bedingt ist, wobei ein Signifikanzniveau von  $p < 0,01$  angenommen wurde.

Die Visualisierung der signifikant differentiell exprimierten Gene erfolgte in Form von

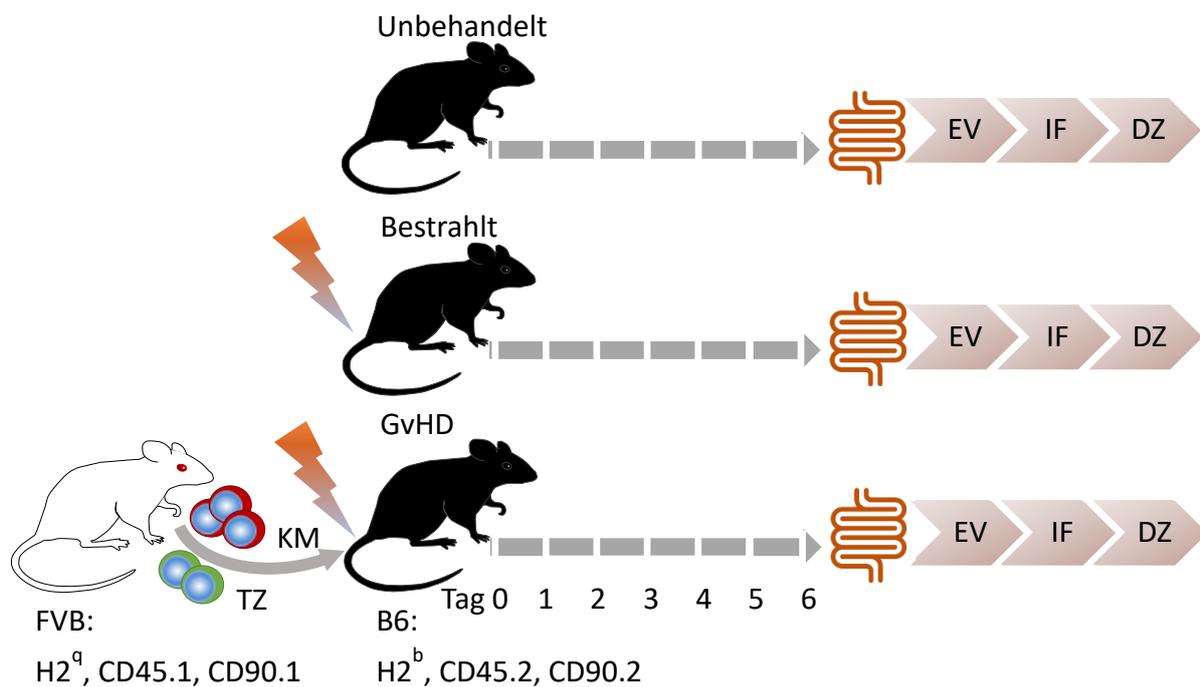
*Heatmaps* (Bsp.: Abbildung 14), welche mittels des informatischen Analysepakets MAST (*Model-based Analysis of Single Cell Transcriptomics*) erstellt wurden. Die Visualisierung der Expression einzelner Gene im gesamten Datensatz erfolgte in Form von UMAP-Diagrammen als Featureplot oder Violindiagrammen (Bsp.: Abbildung 16) mit Funktionen des Seurat-Analysepakets.

## Ergebnisse

### 1. Charakterisierung der GvHD-protectiven APC anhand ihrer Oberflächenproteine

#### 1.1 Experimentelle Grundlagen

In allen folgenden Experimenten transplantierten wir Empfängerermäuse mit genetischem Hintergrund im Stamm B6 mit KM- und beigemengten T-Zellen aus allogenen FVB/N Spendermäusen (Abbildung 3). Durch die unterschiedlichen MHC-Haplotypen von Spender- und Empfängerermäusen ( $H2^q$  und  $H2^b$ ) induzierten wir so eine akute GvHD. Am sechsten Tag nach allo-HSZT, also in der frühen GvHD-Effektorphase, töteten wir die Empfängerermäuse, entnahmen den Dünndarm und entfernten die PP. Wir trugen das Epithel mechanisch ab. Durch enzymatischen Verdau (EV) des übrigen Gewebes erhielten wir eine Zellsuspension der Dünndarmwand, die wir nach Immunfluoreszenzfärbung (IF) durchflusszytometrisch analysierten. Da sich die anvisierten APC nach Entfernung der PP in der intestinalen Lamina propria konzentrierten, die einzelnen Mukosaschichten aber durch die Entzündungssituation nicht mehr klar abgegrenzt waren, wird in den folgenden Ergebnissen von APC der intestinalen Mukosa gesprochen.

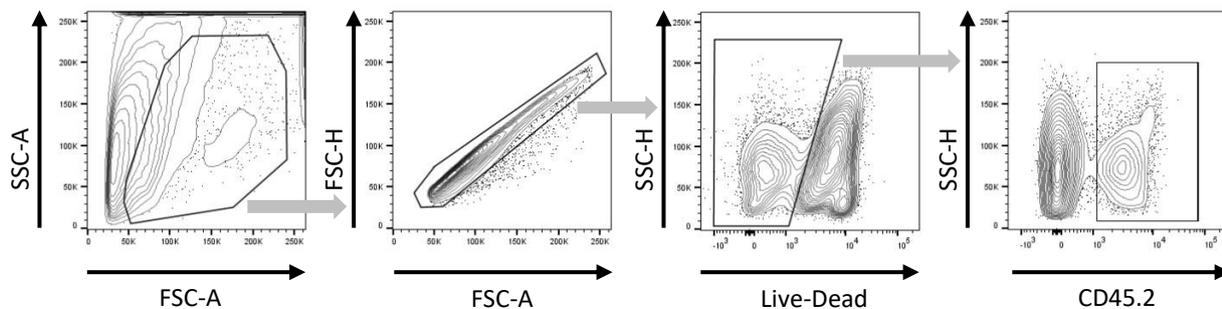


**Abbildung 3: Schematischer Versuchsaufbau bis zur durchflusszytometrischen Analyse der APC in der murinen intestinalen Mukosa**

*KM: Knochenmarkszellen, TZ: T-Zellen, Zeitskala: Tage nach allo-HSZT, EV: Enzymatischer Verdau, IF: Immunfluoreszenzfärbung, DZ: Durchflusszytometrische Analyse. Für Spender- und Empfängermause sind Stamm, MHC-Haplotyp und kongene Oberflächenantigene auf hämatopoetischen Zellen angegeben.*

In der durchflusszytometrischen Analyse schlossen wir Zellkonglomerate und tote Zellen aus und wählten allein die hämatopoetischen Zellen des Transplantatempfängers als Ausgangspopulation (Abbildung 4). Da CD45.2 als kongener Marker auf allen hämatopoetischen Zellen des Empfängers (und nicht des Spenders) exprimiert war, konnten wir hiermit Spender- und Empfängerzellen unterscheiden. Hämatopoetische Spenderzellen konnten hingegen an der Expression von CD45.1 bzw. CD90.1 für Spender-T-Zellen erkannt werden. In fast allen durchflusszytometrischen Experimenten verglichen wir die intestinalen Empfängerzellen von Mäusen mit akuter GvHD am Tag 6 nach myeloablativer Bestrahlung und allo-HSZT mit denen unbehauelter und allein myeloablativ bestrahlter Mäuse. Die Gruppen werden im Folgenden bezeichnet als *GvHD*, *Bestrahlt* und *Unbehandelt*. *Bestrahlt* wurde hinzugefügt, um die entzündlichen Effekte alleiniger ionisierender Bestrahlung von

denen der zellulär-immunologisch vermittelten akuten GvHD zu subtrahieren. *Unbehandelt* wies mit 50 – 70 % lebendiger hämatopoetischer Empfängerzellen (Anteil an der Gesamtheit der intestinalen Mukosazellen) in allen Experimenten deutlich höhere Werte auf als *Bestrahlt* (10 - 30 %) und *GvHD* (5 – 30 %).



**Abbildung 4: Strategie zur durchflusszytometrischen Auswahl der hämatopoetischen Empfängerzellen (CD45.2<sup>+</sup>) in der intestinalen Mukosa**

Repräsentative Konturdiagramme der Einzelzellsuspension aus der intestinalen Mukosa einer GvHD-Maus am Tag 6 nach allo-HSZT. CD45: Kongener Oberflächenmarker zur Unterscheidung von hämatopoetischen Spender- (CD45.1<sup>+</sup>) und Empfängerzellen (CD45.2<sup>+</sup>). Gatingstrategie: 1. Selektion der Zellen, Ausschluss von Debris, 2. Selektion von Einzelzellen, Ausschluss von Zellkonglomeraten, 3. Selektion lebendiger Zellen, Ausschluss toter Zellen, 4. Selektion der CD45.2<sup>+</sup> Zellen. Bis auf 3. setzten wir Grenzwerte und Gates für alle Proben gleich.

## 1.2 Analyse der Zellidentität

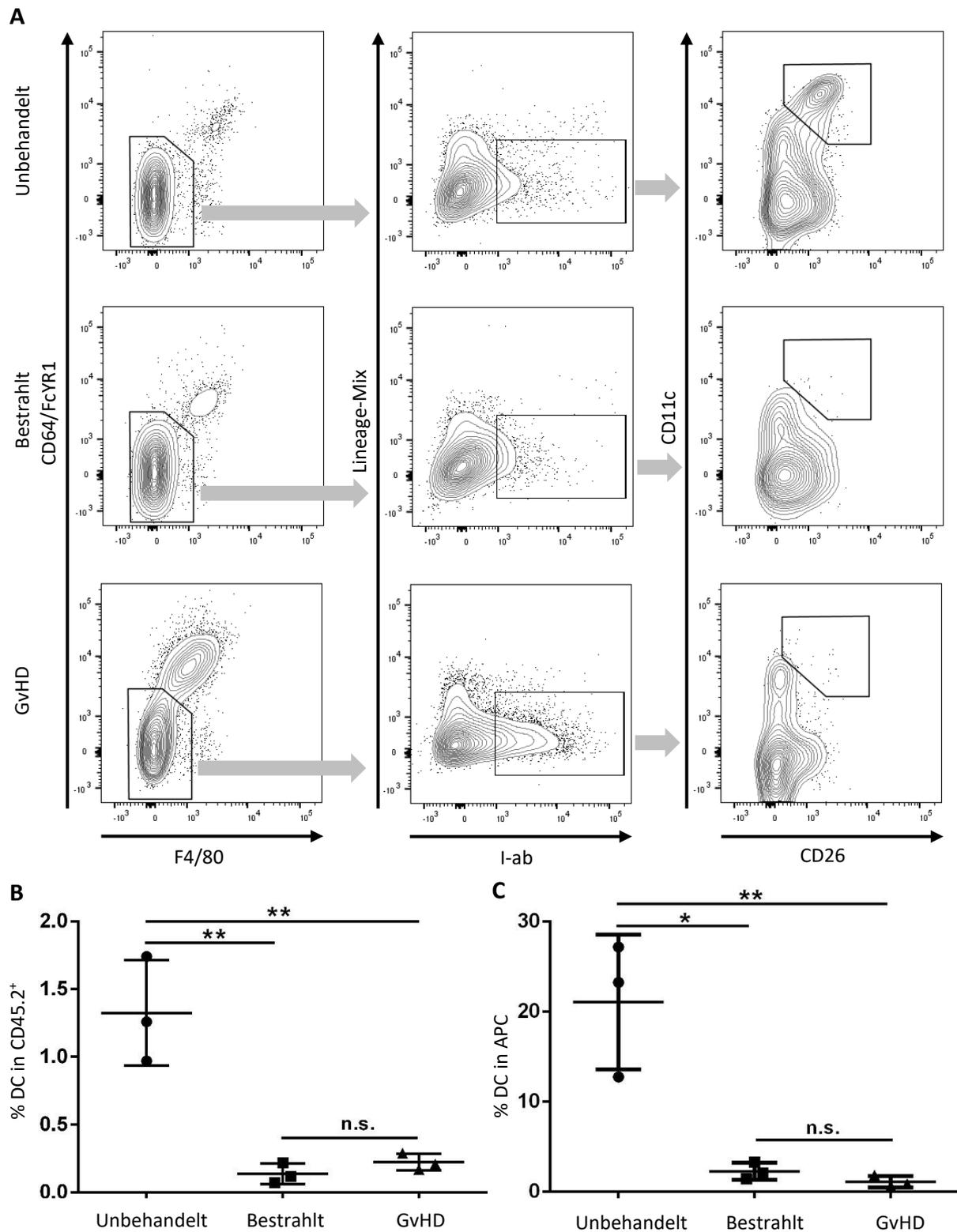
In vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass Versuchsmäuse nach allo-HSZT kürzer überleben und eine stärkere intestinale Entzündung aufweisen, wenn CD11c<sup>+</sup> Empfängerzellen und insbesondere APC in der frühen Effektorphase experimentell depletiert wurden und folglich nicht mehr vorhanden waren (Jordan Garrote, 2014). APC wirkten also im Umkehrschluss GvHD-protektiv. Wir analysierten daher zunächst, ob diese Zellen als DC oder Mph eingeordnet werden können. Für die Experimente wurde keine Depletion vorgenommen, sondern die nach Bestrahlung und allo-HSZT in der intestinalen Mukosa verbleibenden CD11c<sup>+</sup> Empfängerzellen analysiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzmikroskopie unter Verwendung von in der

Literatur beschriebenen Oberflächenmarkern und Markerkombinationen (siehe Einleitung, Kapitel 2.1 und 2.2).

### 1.2.1 Dendritische Zellen

Zur Analyse der DC bedienten wir uns der von Williams et al. 2016 (Williams et al., 2016) etablierten Kombination von Oberflächenmarkern und seiner Gatingstrategie (Abbildung 5). Die Antikörperkombination Lineage-Mix diente dem Ausschluss von CD3<sup>+</sup> T-Zellen, CD19<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup> B-Zellen und NK1.1<sup>+</sup> natürlichen Killerzellen. Als DC definierten wir CD45.2<sup>+</sup>CD64<sup>-</sup>F4/80<sup>-</sup>Lineage-Mix-I-ab<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD26<sup>+</sup> Zellen. I-ab entspricht dem MHC II-Haplotypen H2<sup>b</sup> des Empfängermausstamms und markiert daher den Empfänger-MHC II-Rezeptor. Am Tag 6 nach allo-HSZT bzw. alleiniger Bestrahlung konnten wir in der intestinalen Mukosa nur verschwindend geringe Zahlen von DC finden (Abbildung 5B): Ihr Anteil an allen hämatopoetischen Empfängerzellen lag bei *GvHD* und *Bestrahlt* unter 0,3 %, in *Unbehandelt* hingegen bei 1 bis 1,8 %. Auch innerhalb der APC (definiert als CD45.2<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>I-Ab<sup>+</sup> Zellen, siehe auch Abbildung 6) lag der Anteil von DC in *Bestrahlt* und *GvHD* ähnlich niedrig (Abbildung 5C). *Bestrahlt* und *GvHD* erhielten als gemeinsamen Behandlungsschritt nur die myeloablative Bestrahlung. Dass sie einen vergleichbaren, sehr geringen DC-Anteil aufwiesen, legte den Faktor Bestrahlung als ausschlaggebend für das Verschwinden der DC-Population nahe.

Bei so geringen DC-Anteilen erschien es sehr unwahrscheinlich, dass DC für den GvHD- protektiven Effekt verantwortlich sein können.



**Abbildung 5: Quantifizierung der DC in der intestinalen Mukosa**

Durchflusszytometrische Analyse eines Experiments, drei Versuchsgruppen mit drei Mäusen pro Gruppe. Gating ausgehend von den CD45.2<sup>+</sup> Empfängerzellen. Lineage-Mix: CD3, CD45R, CD19 und NK1.1. I-ab entspricht dem MHC II-Haplotypen H2<sup>b</sup> des Empfängermausstammes

B6.

A) Repräsentative Konturdiagramme je einer Maus der drei Versuchsgruppen mit Gatingstrategie: 1. Ausschluss CD64<sup>+</sup> und/oder F4/80<sup>+</sup> Zellen, 2. Selektion I-ab<sup>+</sup> Zellen, Ausschluss der T-, B- und NK-Zellen, 3. DC. Gating anhand FMO und für alle Proben gleichermaßen.

B) Punktdiagramm mit statistischer Analyse zum Anteil der DC innerhalb der CD45.2<sup>+</sup> Zellen der intestinalen Mukosa in %. Durchschnittswerte (horizontale Striche) mit Standardabweichung (SA, vertikale Begrenzungen): Unbehandelt: 1,3 +/- 0,24 %, Bestrahlt: 0,14 +/- 0,04 %, GvHD: 0,22 +/- 0,04 %, ungepaarter t-Test: p-Werte: Unbehandelt vs. Bestrahlt: 0,0066, Unbehandelt vs. GvHD: 0,0084, Bestrahlt vs. GvHD: 0,1996.

C) Punktdiagramm mit statistischer Analyse zum Anteil der DC innerhalb der APC (CD45.2<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>I-Ab<sup>+</sup>) in %. Durchschnittswerte mit SA: Unbehandelt: 21,1 +/- 4,3 %, Bestrahlt: 2,3 +/- 0,6 %, GvHD: 1,1 +/- 0,4 %, ungepaarter t-Test: p-Werte: Unbehandelt vs. Bestrahlt: 0,0124, Unbehandelt vs. GvHD: 0,0099, Bestrahlt vs. GvHD: 0,1514.

Sterne zeigen statistische Signifikanz mit \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

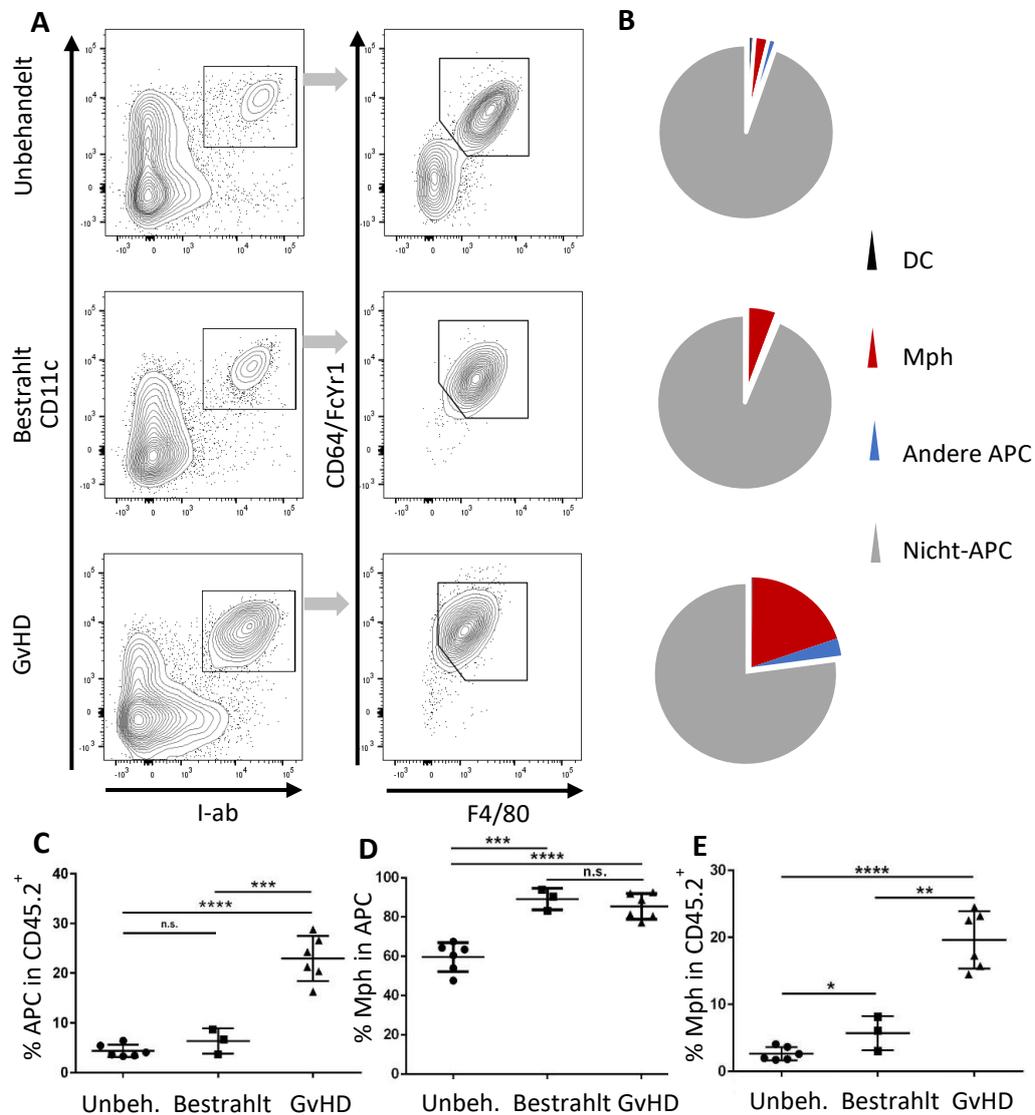
### 1.2.2 Makrophagen

Mph wurden definiert als CD45.2<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>I-ab<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 6A).

Bezogen auf die verbleibenden hämatopoetischen Empfängerzellen nahm die APC-Population in GvHD im Vergleich zu *Unbehandelt* und *Bestrahlt* signifikant zu (Abbildung 6A, B, herausgehobener Kreisanteil, C). Der DC-Anteil innerhalb dieser APC hatte in *Bestrahlt* und *GvHD* aber abgenommen (Abbildung 5C). Folglich mussten andere Zellen ihren Anteil ersetzen und, im Falle der *GvHD*, die APC-Population darüber hinaus sogar ergänzen. Für diese nicht-DC Subpopulation kamen am ehesten Mph oder andere Zellen der monozytären Linie in Frage.

Wir zeigten in zwei unabhängigen Experimenten, dass der Mph-Anteil an APC in *GvHD* und *Bestrahlt* tatsächlich signifikant zunahm (Abbildung 6B, D). Mph machten in *GvHD* und *Bestrahlt* fast die gesamte APC-Population aus. Bemerkenswerterweise lag der Mph-Anteil an den CD45.2<sup>+</sup> Zellen der intestinalen Mukosa in *GvHD* deutlich höher als in den anderen Gruppen, und zwar durchschnittlich siebenmal so hoch wie in *Unbehandelt* und 3,5mal so hoch wie in *Bestrahlt* (Abbildung 6E). Diese Ergebnisse waren hoch relevant, weil die *GvHD*, und nicht die alleinige Bestrahlung ausschlaggebend für die Zunahme der APC- und

insbesondere der Mph-Population war. Wir vermuteten daher in ihnen die gesuchten GvHD-  
 protektiven APC.



**Abbildung 6: Quantifizierung der Mph in der intestinalen Mukosa**

Durchflusszytometrische Analyse zweier gepoolter Experimente mit einmal drei und einmal zwei Versuchsgruppen (ohne Bestrahlt), je drei bzw. sechs Mäuse pro Gruppe. Gating ausgehend von den CD45.2<sup>+</sup> Empfängerzellen.

A) Repräsentative Konturdiagramme je einer Maus der drei Versuchsgruppen mit Gatingstrategie: 1. Selektion der APC, 2. Selektion der Mph. Gating anhand FMO und für alle Proben gleichermaßen.

B) Kreisdiagramm mit durchschnittlichen Anteilen der DC (schwarz), Mph (rot), anderen APC (blau) und nicht-APC (grau) innerhalb der CD45.2<sup>+</sup> Zellen der intestinalen Mukosa.

*Der herausgehobene Anteil entspricht den APC mit unterschiedlichen Subpopulationen.*

*C) Punktdiagramm mit statistischer Analyse zum Anteil der APC innerhalb der CD45.2<sup>+</sup>*

*Mukosazellen in %: Durchschnittswerte mit SA: Unbehandelt: 4,4 +/- 0,5 %, Bestrahlt: 6,3 +/- 1,4 %, GvHD: 23 +/- 1,9 %, ungepaarter t-Test: p-Werte: Unbehandelt vs. Bestrahlt: 0,1476, Unbehandelt vs. GvHD: < 0,0001, Bestrahlt vs. GvHD: 0,0007.*

*D) Punktdiagramm mit statistischer Analyse zum Anteil der Mph innerhalb der APC in %:*

*Durchschnittswerte mit SA: Unbehandelt: 59,6 +/- 3 %, Bestrahlt: 89,2 +/- 3,2 % GvHD: 85,4 +/- 2,6 %, ungepaarter t-Test: p-Werte: Unbehandelt vs. Bestrahlt; 0,0005, Unbehandelt vs. GvHD: < 0,0001, Bestrahlt vs. GvHD: 0,4287.*

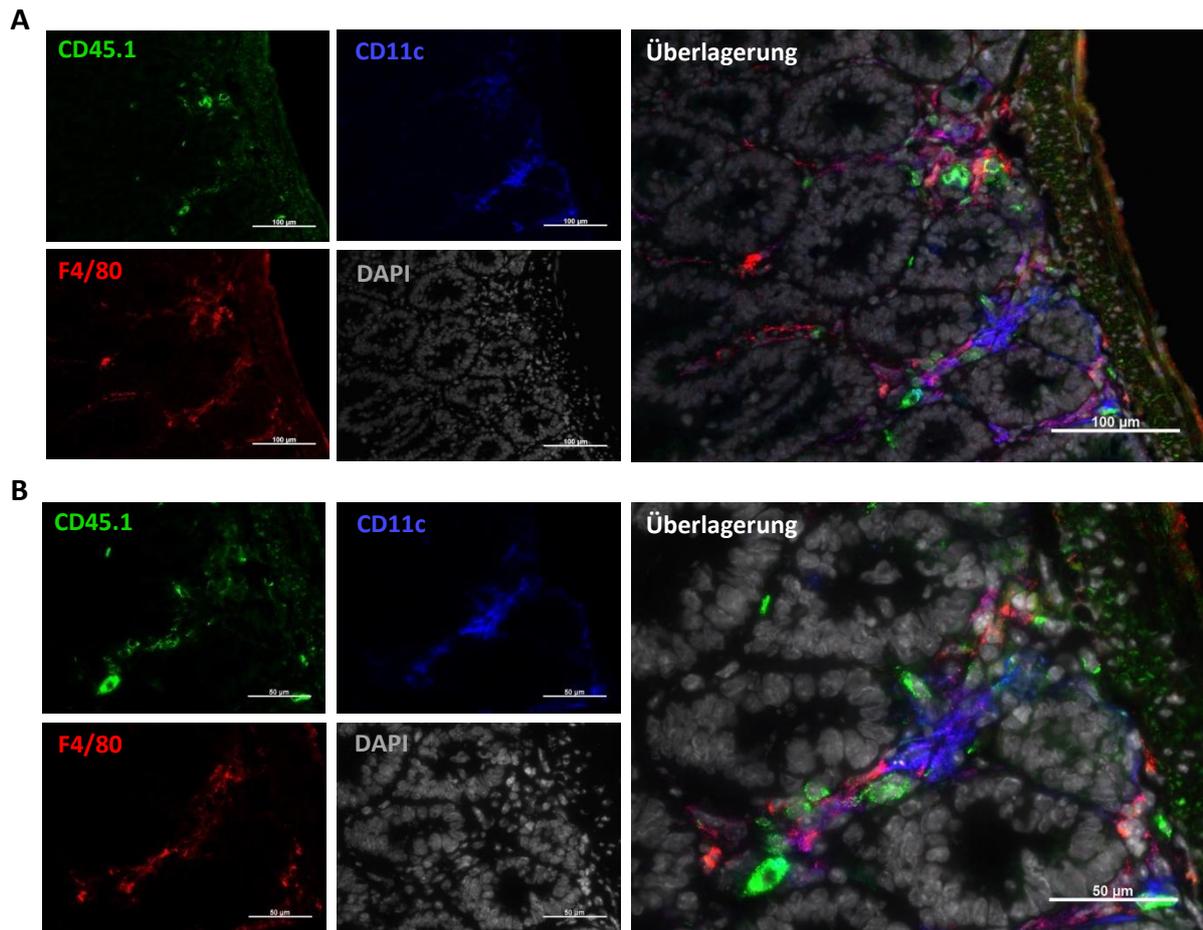
*E) Punktdiagramm mit statistischer Analyse zum Anteil der Mph innerhalb der CD45.2<sup>+</sup>*

*Mukosazellen in %. Durchschnittswerte mit SA: Unbehandelt: 2,6 +/- 0,4 %, Bestrahlt: 5,7 +/- 1,4 %, GvHD: 19,6 +/- 1,8 %, ungepaarter t-Test: p-Werte: Unbehandelt vs. Bestrahlt: 0,0293, Unbehandelt vs. GvHD: < 0,0001, Bestrahlt vs. GvHD: 0,0014.*

### *1.2.3 Direktkontakt von Mph mit allogenen T-Zellen in der intestinalen Mukosa*

Frau Jordan Garrote hatte bereits gezeigt, dass während der akuten GvHD Empfänger-APC in der Dünndarmschleimhaut mit allogenen T-Zellen (CD45.1<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup>) in direkten Kontakt treten (Kokalisation (Jordan Garrote, 2014)). Bisher war jedoch ungeklärt, ob es sich bei diesen APC um DC, Mph oder andere myeloide Empfängerzellen handelt. Um diese Kokalisation auch spezifisch für Mph zu zeigen, untersuchten wir Dünndarmpräparate von GvHD-Mäusen am Tag 6 nach allo-HSZT immunfluoreszenzmikroskopisch (Abbildung 7). Wir verwendeten CD45.1 (grün) als kongenen Marker hämatopoetischer Spenderzellen, CD11c (blau) vereinfachend für APC im Allgemeinen und F4/80 (rot) für Mph.

Die hämatopoetischen Spenderzellen waren tatsächlich in direktem Kontakt mit APC und/oder Mph. Auf den APC und/oder Mph konnte außerdem kein CD45.1, also keine Spenderzellmarkierung, nachgewiesen werden. Sie mussten also weiterhin aus der Empfängerhämatopoese stammen.



**Abbildung 7: Kolokalisation von Empfänger-APC und/oder -Mph mit Spenderzellen in der intestinalen Mukosa**

Dünndarmpräparat einer GvHD-Maus am Tag 6 nach allo-HSZT. Verwendete Antikörper und Farben: Kongener Spenderzellmarker anti-CD45.1: AF488 (grün), anti-CD11c: A647 (blau), anti-F4/80: Cy3 (rot).

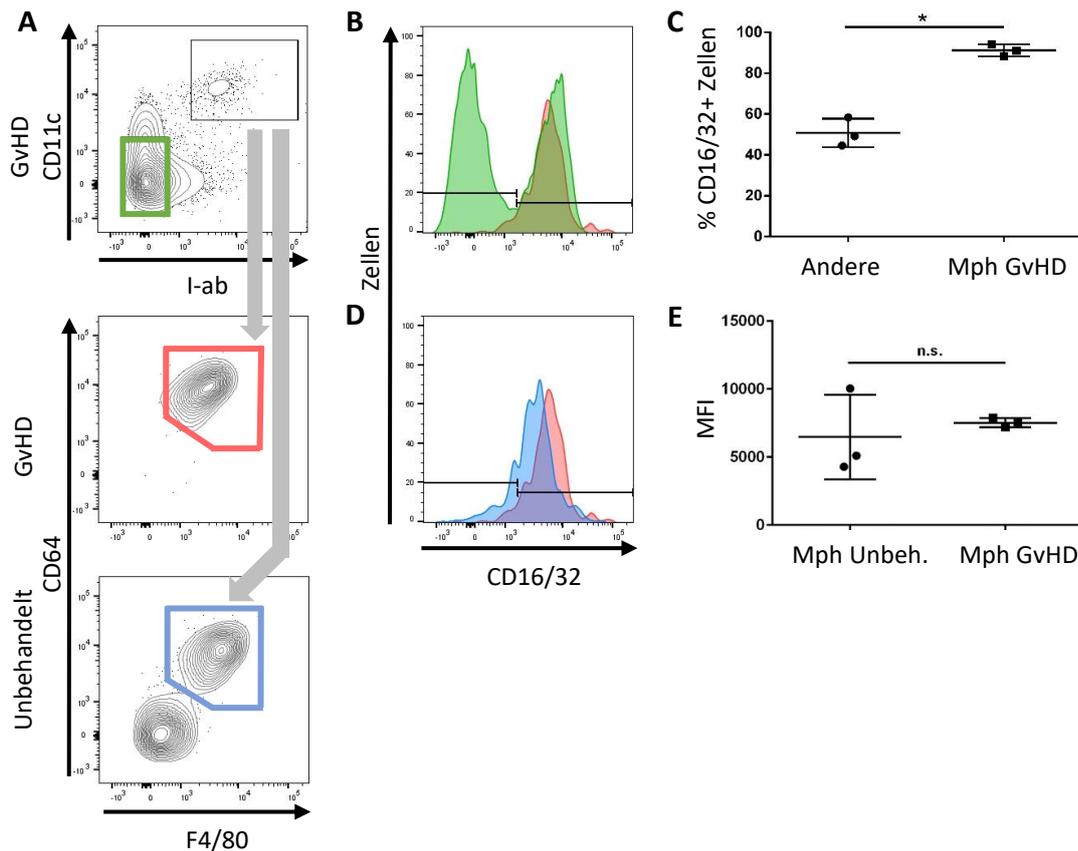
### 1.3 Nähere Charakterisierung der GvHD-protectiven Mph

Die GvHD-protectiven Mph wurden nun auf die Expression der beiden Fcγ-Rezeptoren III und II (CD16 und CD32), des CSF-1-Rezeptors (CD115) und von PD-L1 (CD274) untersucht.

#### 1.3.1 Fcγ-Rezeptoren

Intestinale Mph sind im Allgemeinen charakterisiert durch eine hohe Expression der Fcγ-Rezeptoren III und II, CD16 und CD32. Die Frage war, ob intestinale Empfänger-Mph während der GvHD eine ähnlich hohe Expression von CD16/32 aufweisen wie Mph unbehandelter Mäuse. Wir verglichen daher die CD16/32 Expression auf intestinalen Empfänger-Mph in *GvHD* mit *Unbehandelt*. Für eine relative Einordnung verglichen wir außerdem die CD16/32-Expression auf *GvHD*-Mph mit der Expression auf anderen hämatopoetischen nicht-APC während der akuten GvHD (Abbildung 8). Andere Zellen (hier *Andere*), definiert als CD45.2<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>I-ab<sup>-</sup> Zellen, diente als Referenzpopulation. Der verwendete Antikörper bindet ein von beiden Fcγ-Rezeptoren geteiltes Epitop.

Wir wiesen nach, dass Empfänger-Mph der intestinalen Mukosa während der akuten GvHD zu nahezu 100 % auch CD16/CD32 exprimieren (Abbildung 8B, rote Kontur, und C). In *anderen* Zellen (grüne Kontur) lag dieser Anteil bei nur ca. 50 %. Für Mph aus *GvHD* und *Unbehandelt* konnte, gemessen an der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), kein signifikanter Unterschied in der CD16/32 Expression nachgewiesen werden (Abbildung 8D, rote und blaue Kontur, E): Sie exprimierten CD16/32 auf einem vergleichbaren Niveau.



**Abbildung 8: CD16/32-Expression auf Empfänger-Mph und anderen Zellen der intestinalen Mukosa nach allo-HSZT im Vergleich zu Mph unbehandelte Mäuse**

Durchflusszytometrische Analyse eines Experiments mit zwei Versuchsgruppen Unbehandelt und GvHD, je drei Mäuse pro Gruppe. Gating ausgehend von den CD45.2<sup>+</sup> Empfängerzellen.

A) Repräsentative Konturdiagramme zur Veranschaulichung der selektierten Mph.

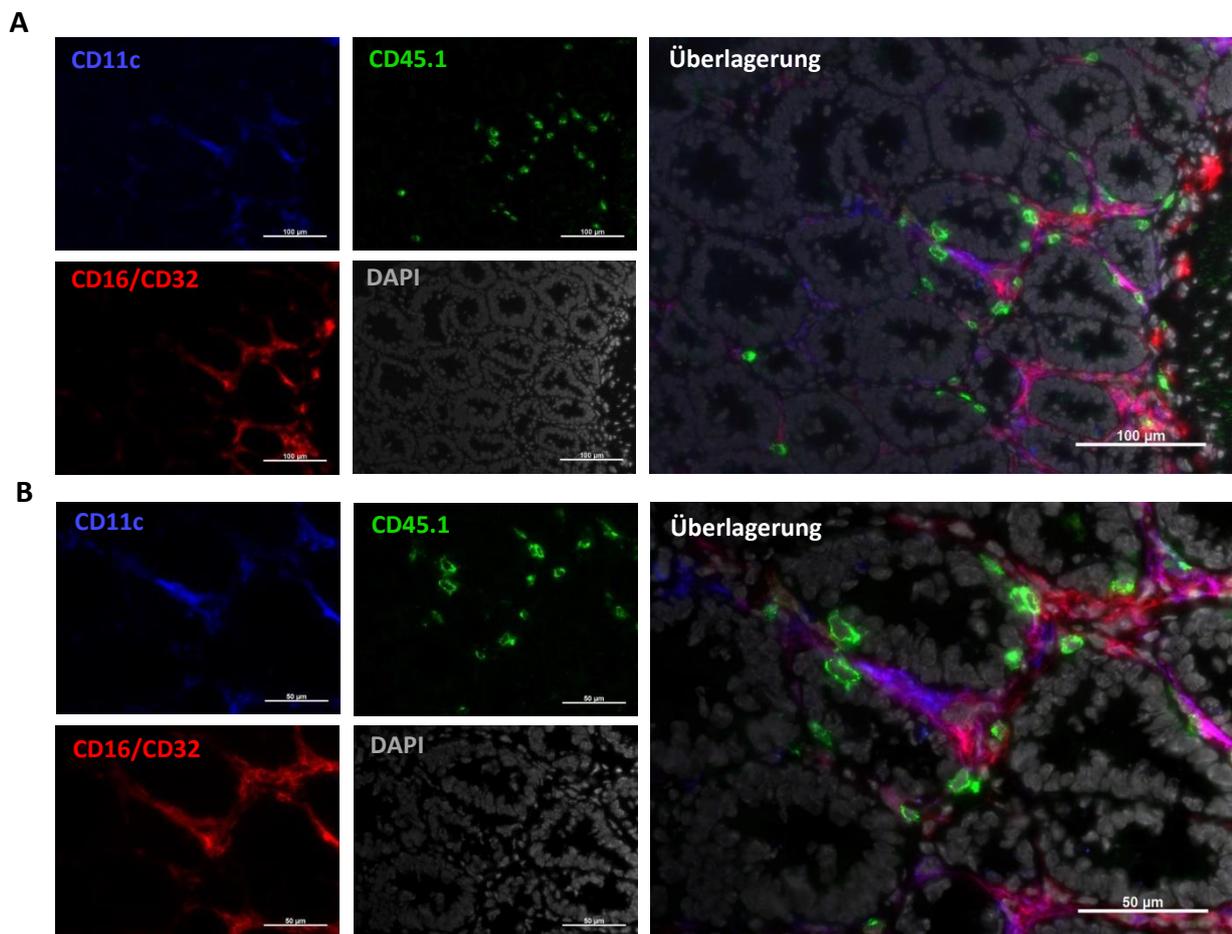
B) Repräsentatives Histogramm einer GvHD-Maus mit Häufigkeit der Zellen, welche CD16/32 auf dem auf der x-Achse aufgetragenem Niveau exprimieren, Vergleich von Mph (rot) mit anderen Zellen (CD45.2<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>I-ab<sup>-</sup>, grün). Darstellung modal. Grenzwert +/- anhand FMO.

C) Punktdiagramm mit statistischer Analyse zum Anteil der CD16/32<sup>+</sup> Zellen in Andere und Mph in den drei GvHD-Mäusen in %. Gepaarter t-Test, p-Wert 0,015. Durchschnittswerte mit SA: Andere: 50,8 +/- 4 %, Mph: 91,2 +/- 1,7 %. Durchschnittlicher Unterschied: 40,4 +/- 8,5 %.

D) Repräsentative Histogramme der CD16/32 Expression in Mph in GvHD (rot) und Unbehandelt (blau), gezeigt für je eine Maus. Darstellung modal.

E) Punktdiagramm mit statistischer Analyse der MFI für CD16/32 in Mph in Unbehandelt und GvHD, ungepaarter t-Test. Punktdiagramm mit statistischer Analyse. p-Wert 0,596, Durchschnittswerte mit SA: Unbehandelt: 6481 +/- 1796, GvHD: 7521 +/- 197.

Wir untersuchten die CD16/32-Expression auf intestinalen APC immunfluoreszenz-mikroskopisch, um auch hier eine Kolo­kalisierung mit Spenderzellen nachzuweisen. Hierzu verwendeten wir wieder ein Dünndarmpräparat einer GvHD-Maus am Tag 6 nach allo-HSZT (Abbildung 9). Die meisten CD11c<sup>+</sup> Zellen (blau) wiesen auch CD16/32 (rot) auf (Überlagerung: violett). Die hämatopoetischen Spenderzellen (CD45.1<sup>+</sup>, grün) waren eng an den CD16/32<sup>+</sup> APC lokalisiert. Am Tag 6 nach allo-HSZT fand sich kein Hinweis auf eine Abstammung der CD16/32<sup>+</sup> APC vom Spender.



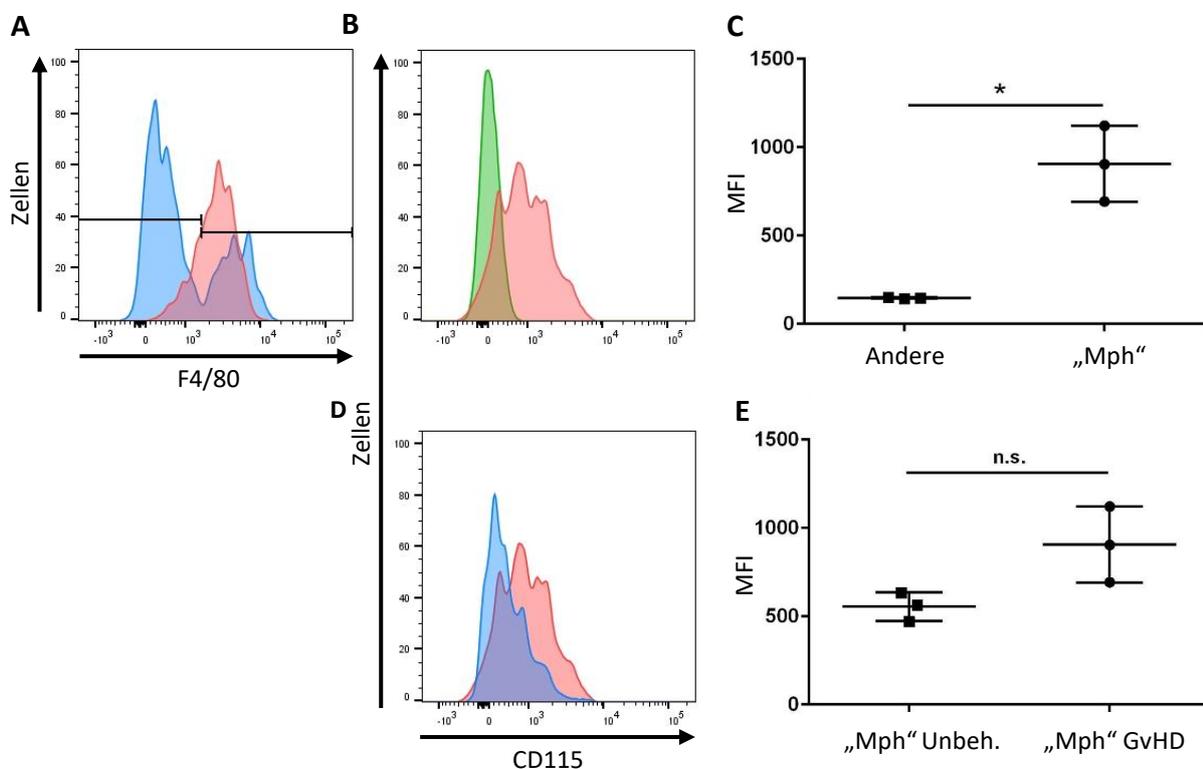
**Abbildung 9: Kolo­kalisierung von CD16/32<sup>+</sup> Empfänger-APC in Kontakt mit Spenderzellen in der intestinalen Mukosa**

Dünndarmpräparat einer GvHD-Maus am Tag 6 nach allo-HSZT. Verwendete Antikörper und Farben: Kongener Spenderzellmarker anti-CD45.1: AF488 (grün), anti-CD11c: A647 (blau), anti-CD16/32: Cy3 (rot).

### 1.3.2 CSF-1 Rezeptor

CSF-1 (M-CSF) gilt als wichtiger Wachstumsfaktor intestinaler Mph, der CSF-1-Rezeptor, CD115, als ein wichtiger Oberflächenmarker (Bain and Schridde, 2018; Gross et al., 2015). In anderen Studien wurde gezeigt, dass eine Depletion CD115<sup>+</sup> Zellen eine akute GvHD verstärkt (MacDonald et al., 2010) und ihre Expansion die akute GvHD abschwächt (Hashimoto et al., 2011). Dies legte eine protektive Rolle CD115<sup>+</sup> bzw. CSF-1-sensitiver Zellen nahe.

Aufgrund der im Labor vorhandenen Kombinationen von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen war die gleichzeitige Messung von CD115 und CD64 nicht möglich. Daher quantifizierten wir die CD115-Expression auf allein F4/80<sup>+</sup> APC („Mph“). Als Referenzpopulation dienten wieder *andere* Zellen (siehe Abbildung 8). Wir analysierten die MFI, weil keine Abgrenzung einer CD115<sup>+</sup> von einer CD115<sup>-</sup> Population möglich war. Wir zeigten, dass intestinale Empfänger-„Mph“ in *GvHD* grundsätzlich CD115 exprimieren (Abbildung 10B und C). „Mph“ in *GvHD* und *Unbehandelt* exprimierten CD115 auf einem ähnlichen Niveau (Abbildung 10D und E).



**Abbildung 10: CD115-Expression auf Empfänger-„Mph“ und anderen Zellen der intestinalen Mukosa nach allo-HSZT im Vergleich zu „Mph“ unbehandelter Mäuse**

*Durchflusszytometrische Analyse eines Experiments mit zwei Versuchsgruppen Unbehandelt und GvHD, je drei Mäuse pro Gruppe.*

*A) Definition der F4/80<sup>+</sup> APC als „Mph“: Exemplarische Histogramme der (CD45.2<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>I-ab<sup>+</sup>) APC je einer Maus für GvHD (rot) und Unbehandelt (blau).*

*B) Repräsentative Histogramme der CD115 Expression in „Mph“ (rot) und anderen Zellen (CD4521<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>I-ab<sup>-</sup>, siehe Abbildung 8A, grün) einer GvHD-Maus. Darstellung modal.*

*C) Punktdiagramm mit statistischer Analyse der MFI für CD115 in „Mph“ und anderen Zellen: Gepaarter t-Test, p-Wert: 0,026, Durchschnittswert für andere: 147 +/- 2, für „Mph“: 906 +/- 124, durchschnittlicher Unterschied: 760 +/- 217.*

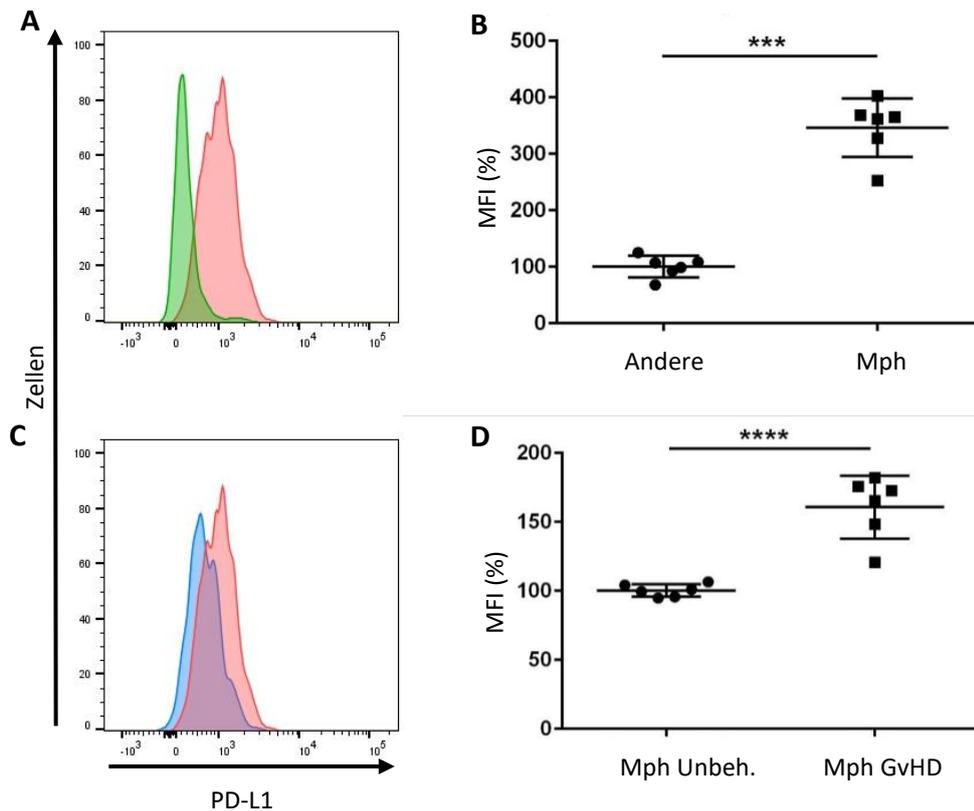
*D) Repräsentative Histogramme der CD115-Expression in „Mph“ je einer Maus aus Unbehandelt (blau) und GvHD (rot). Darstellung modal.*

*E) Punktdiagramm mit statistischer Analyse der MFI für CD115 in „Mph“ in Unbehandelt und GvHD. Ungepaarter t-Test, p-Wert: 0,057. Durchschnittswerte für Unbehandelt: 555 +/- 48, für GvHD: 906 +/- 124.*

### *1.3.3 PD-L1*

Frau Jordan Garrote hatte bereits gezeigt, dass PD-L1 (CD274) für die Unterdrückung allogener T-Zellen durch Empfänger-APC eine wichtige Rolle spielt (Jordan Garrote). Wir strebten daher eine Analyse der PD-L1 Expression auf Empfänger-Mph der intestinalen Mukosa an.

Im Vergleich zu *anderen* Zellen wiesen Empfänger-Mph eine deutlich höhere PD-L1 Expression auf (Abbildung 9A und B). Auffälligerweise zeigten sie in *GvHD* im Vergleich zu *Unbehandelt* eine mehr als 1,5-mal so hohe MFI für PD-L1. Die PD-L1-abhängige T-Zell-Suppression durch intestinale Mph erschien damit als plausibler Mechanismus.



**Abbildung 11: PD-L1-Expression auf Empfänger-Mph und anderen Zellen der intestinalen Mukosa nach allo-HSZT im Vergleich zu Mph unbehandelter Mäuse**

Durchflusszytometrische Analyse eines Experiments mit zwei Versuchsgruppen Unbehandelt und GvHD, je 3 Mäuse pro Gruppe, Gatingstrategie zur Auswahl der Mph siehe Abbildung 8.

A) Repräsentative Histogramme der PD-L1-Expression in Mph (rot) und anderen Zellen (grün) einer GvHD Maus. Darstellung modal.

B) Punktdiagramm mit statistischer Analyse der PD-L1-Expression in Mph und anderen Zellen: Für die Statistik wurden zwei Experimente mit je 3 Mäusen pro Gruppe gepoolt. Aus der MFI der anderen Zellen wurde der Durchschnitt berechnet (somit 100 %) und anhand des Durchschnitts die Prozentwerte aller MFI korreliert. Durchschnittswerte: andere Zellen: 100 +/- 7,8 %, Mph: 246,3 +/- 21,1 %, gepaarter t-Test. Signifikanz: p-Wert: < 0,0001.

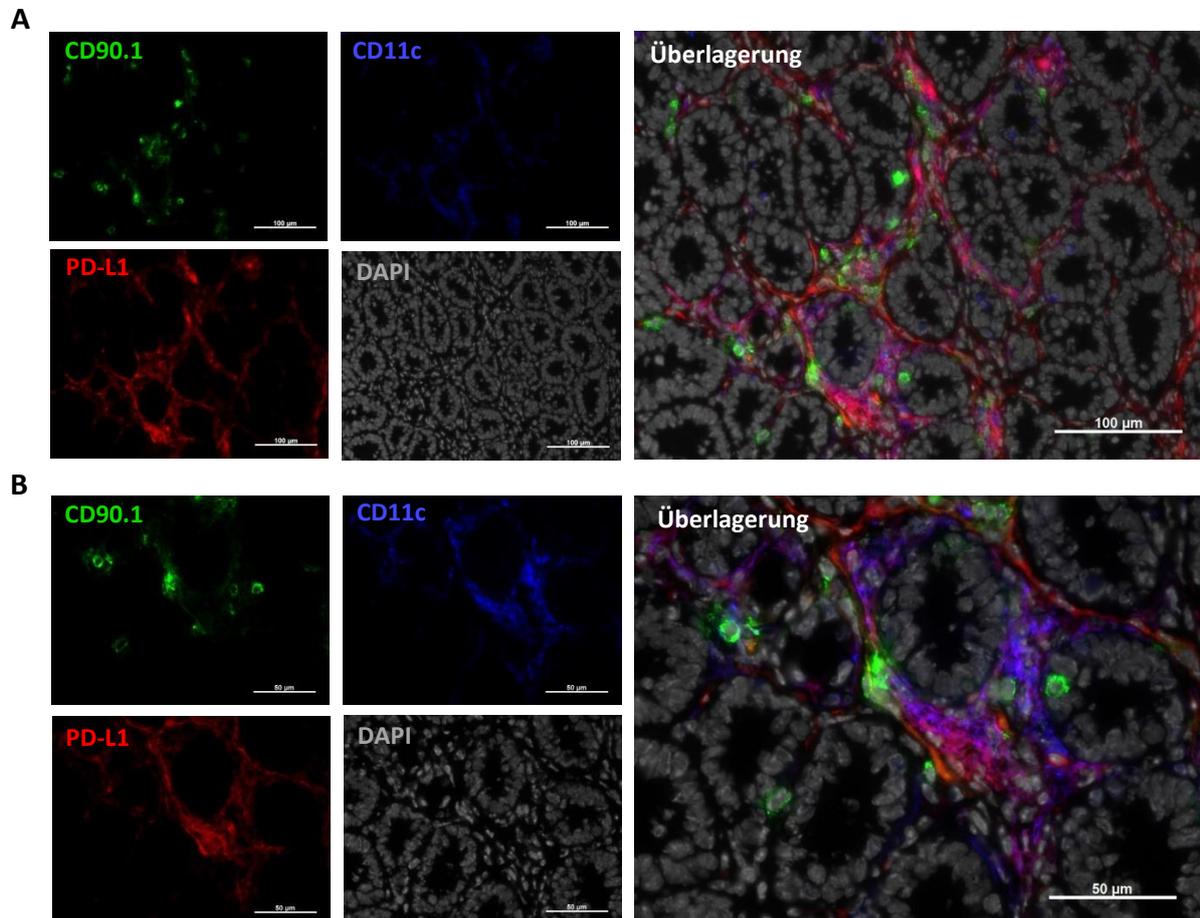
Durchschnittlicher Unterschied: 346,2 +/- 57,6 %.

C) Repräsentative Histogramme der PD-L1-Expression in Mph in Unbehandelt (blau) und GvHD (rot) je einer Maus.

D) Punktdiagramm mit statistischer Analyse der PD-L1-Expression in Mph in Unbehandelt und GvHD, analog zu B, jedoch ungepaarter t-Test. Signifikanz: p < 0,0001.

Durchschnittswerte für Unbehandelt: 100 +/- 1,8 %, für GvHD: 161 +/- 9 %.

Auch histologisch wiesen wir in der intestinalen Mukosa von GvHD-Mäusen eine deutliche Expression von PD-L1 auf APC nach (Abbildung 12). Die PD-L1<sup>+</sup> Zellen standen in engem Kontakt mit allo-genen CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen.



**Abbildung 12: PD-L1<sup>+</sup> intestinale APC in engem Kontakt mit allo-genen T-Zellen**

*Dünndarmpräparat einer GvHD-Maus am Tag 6 nach allo-HSZT. Verwendete Antikörper und Farben: anti-CD90.1: AF488 (grün), anti-CD11c: A647 (blau), anti-PD-L1: Cy3 (rot).*

Die Charakterisierung der GvHD-protectiven intestinalen APC auf Proteomebene lieferte also zusammenfassend folgende Ergebnisse: 1. eine Einordnung als Mph unter Ausschluss einer DC-Identität, 2. die Expression der Fcγ-Rezeptoren CD16/32 sowie des CSF-1-Rezeptors CD115 auf der ihrer Zelloberfläche, 3. eine Kolokalisation mit allo-genen hämatopoetischen und allo-genen T-Zellen und 4. Die Expression von PD-L1 im Allgemeinen und in Direktkontakt mit allo-genen T-Zellen.

## 2. Charakterisierung der GvHD-protektiven APC auf Transkriptomebene

Wir schlossen der Charakterisierung der GvHD-protektiven Empfänger-APC auf Proteinebene aus folgenden Gründen eine Transkriptomanalyse an: 1. Die Mph-Identität der Zielzellen sollte auf Transkriptomebene bestätigt werden. 2. Die Charakterisierung der Zielzellen sollte erweitert und präzisiert werden, insbesondere im Hinblick auf solche Eigenschaften, die einer Analyse der Oberflächenproteine nicht zugänglich waren (bspw. intrazelluläre Signalwege). 3. Durch die rein bioinformatische Datenanalyse bot die Einzelzell-RNA-Sequenzierung die Chance, neue, zum Zeitpunkt der Arbeit noch unbekannte Eigenschaften und Zusammenhänge zu entdecken.

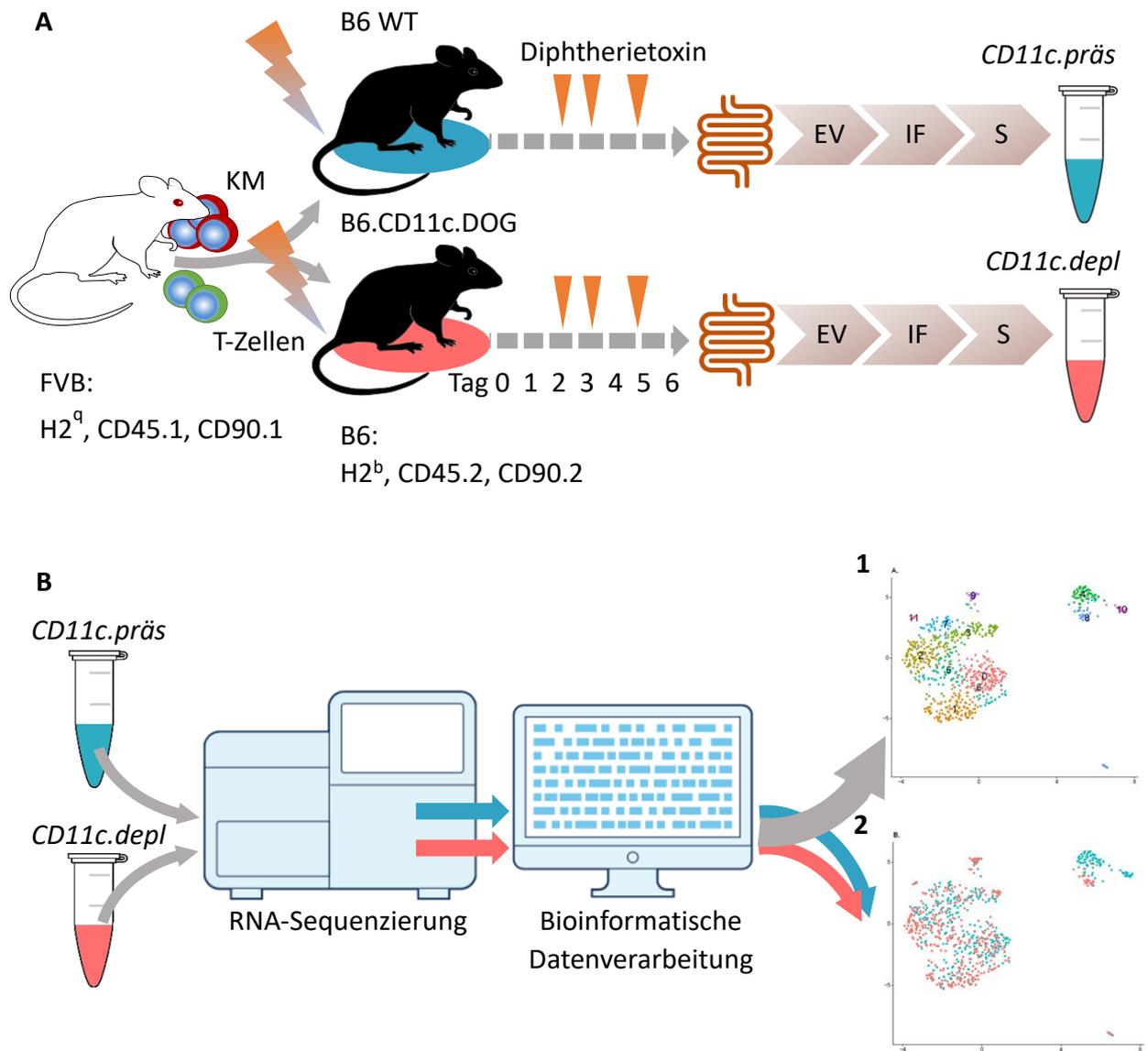
### 2.1 Experimentelle Grundlagen

Für die Einzelzell-Transkriptomanalyse wurden je drei transgene B6.CD11c.DOG- und drei B6 Wildtypmäuse myeloablativ bestrahlt und anschließend mit KM und T-Zellen einer MHC-disparaten Spendermaus mit genetischem Hintergrund im Stamm FVB transplantiert, um eine akute GvHD auszulösen. Beide Gruppen erhielten im Anschluss Diphtherietoxin. Hierdurch wurde jedoch nur in B6.CD11c.DOG-Mäusen eine Depletion der CD11c<sup>+</sup> Zellen induziert, die CD11c<sup>+</sup> Zellen der B6-Wildtypmäuse blieben davon unberührt und folglich in der intestinalen Mukosa präsent (durchflusszytometrische Validierung siehe Anhang). Am Tag 6 nach allo-HSZT prozessierten wir den Dünndarm der Mäuse beider Gruppen separat und erhielten so je drei Zellsuspensionen. Für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurden mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (engl. *sorting*) allein die hämatopoetischen Empfängerzellen (CD45.2<sup>+</sup>) ausgewählt. Wir vereinten diese CD45.2<sup>+</sup> Zellen einer Gruppe zu je einer einzigen Probe: einmal *CD11c.depl* aus den transplantierten B6.CD11c.DOG-Mäusen, in denen die CD11c<sup>+</sup> Zellen depletiert, also nicht mehr vorhanden waren, und einmal *CD11c.präs* aus den transplantierten B6-Wildtypmäusen, in denen die CD11c<sup>+</sup> Zellen noch präsent waren.

Wir wählten diese Methode, um 1. die GvHD protektiven CD11c<sup>+</sup> Zellen als vorhandene bzw. fehlende Zellpopulation eindeutig nachzuweisen und 2. ihrer Charakterisierung ein breites Referenzspektrum in Form der übrigen hämatopoetischen Empfängerzellen zu Grunde zu legen.

Die Einzelzellen der zwei Proben wurden nun mit denselben Parametern RNA-sequenziert und die Daten bioinformatisch verarbeitet. Nach Ausschluss ca. eines Viertels aller RNA-

sequenzierten Zellen anhand der bioinformatischen Qualitätskriterien übernahmen wir insgesamt 797 Zellen in die Analyse. Davon stammten 384 aus *CD11c.präs.* (blau) und 413 aus *CD11c.depl.* (rot). Insgesamt detektierten wir 10 554 Gene. Für die Analyse kombinierten wir alle Zellen aus *CD11c.depl* und *CD11c.präs* in einem einzigen Datensatz. Die ursprüngliche Zuordnung der Einzelzellen zu *CD11c.depl* und *CD11c.präs* blieb in der gesamten Analyse erhalten.



**Abbildung 13: Schematischer Versuchsaufbau zur Einzelzell-RNA-Sequenzierung**

A) Experimenteller Teil bis zum Probenerhalt: EV: Enzymatischer Verdau, IF: Immunfluoreszenzfärbung, S: Fluoreszenzaktivierte Sortierung der hämatopoetischen Empfängerzellen der intestinalen Mukosa (CD45.2<sup>+</sup>)

B) Informatischer Teil: Die Zellen beider Proben wurden mit denselben Parametern RNA-sequenziert und bioinformatisch analysiert. Die Analyse erfolgte in einem kombinierten Datensatz (1), mit erhaltener Zuordnung zu den Ursprungsproben (2). CD11c.präs. blau, CD11c.depl. rot. 1 und 2: UMAP-Diagramme, Näheres siehe Abbildung 14.

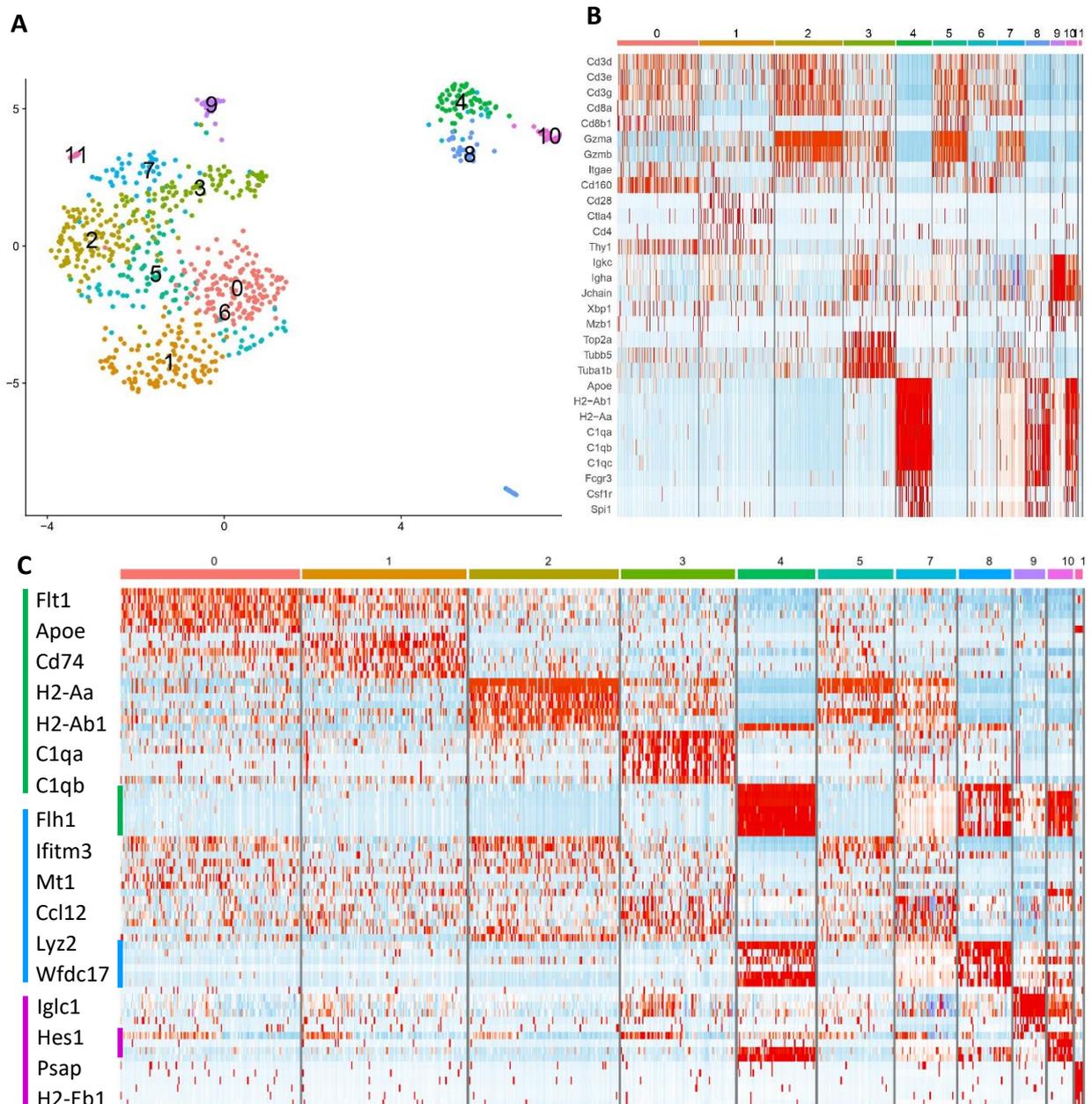
## 2.2 Identifikation der Zielzellen

### 2.2.1 Einteilung und Zuordnung der Zellcluster

Alle Einzelzellen (beide Proben kombiniert) wurden anhand der Ähnlichkeit zueinander in einem UMAP-Diagramm (engl. *Uniform Manifold Approximation and Projection*) angeordnet. Hierin entspricht jeder Punkt einer einzelnen Zelle. Die ursprüngliche Zuordnung zu den Proben *CD11c.präs* und *CD11c.depl* blieb jedoch über die gesamte Analyse erhalten (blaue Punkte: Zellen aus *CD11c.präs*, rote Punkte: Zellen aus *CD11c.depl*). Die räumliche Nähe der Punkte im Koordinatensystem spiegelt eine Ähnlichkeit der Zellen im Genexpressionsprofil wider.

Alle Einzelzellen wurden in zwölf verschiedene Cluster eingeteilt (Abbildung 14A). Ein Cluster entsprach dabei einer Gruppe von Zellen mit ähnlichem Genexpressionsprofil. Hierzu wurden beide Proben kombiniert. Ein Cluster enthielt daher Zellen aus *CD11c.präs* und *CD11c.depl* in unterschiedlicher Zusammensetzung.

Wir ordneten die zwölf Cluster anschließend definierten Zellpopulationen zu, indem wir die für ein Cluster charakteristischen, signifikant hoch exprimierten Gene mit literaturbekanntem Transkriptomsignaturen abglichen. Abbildung 14B zeigt die Expression dieser manuell ausgewählten Signaturgenen in allen Clustern und Zellen (Bsp: *H2-Ab1*, codierend für ein Protein des MHC II-Komplexes und damit charakteristisch für APC, war in Cluster 4 und 10 und etwas weniger in Cluster 8 exprimiert.) Die für die Fragestellung zentralen APC lokalisierten wir so in Cluster 4, 8 und 10. Abbildung 14C zeigt die Expression der rein bioinformatisch bestimmten, am höchsten exprimierten Gene der einzelnen Cluster (für Cluster 4 bspw. *Flt1*, *ApoE* und weitere).



**Abbildung 14: Einteilung der RNA-sequenzierten Einzelzellen in zwölf Cluster mit Lokalisation der APC in Cluster 4, 8 und 10**

A) UMAP-Diagramm der zwölf Cluster. Punkte repräsentieren einzelne Zellen, Farben die Clusterzuteilung. Der Abstand der Punkte zueinander veranschaulicht die Ähnlichkeit hinsichtlich des Genexpressionsprofils.

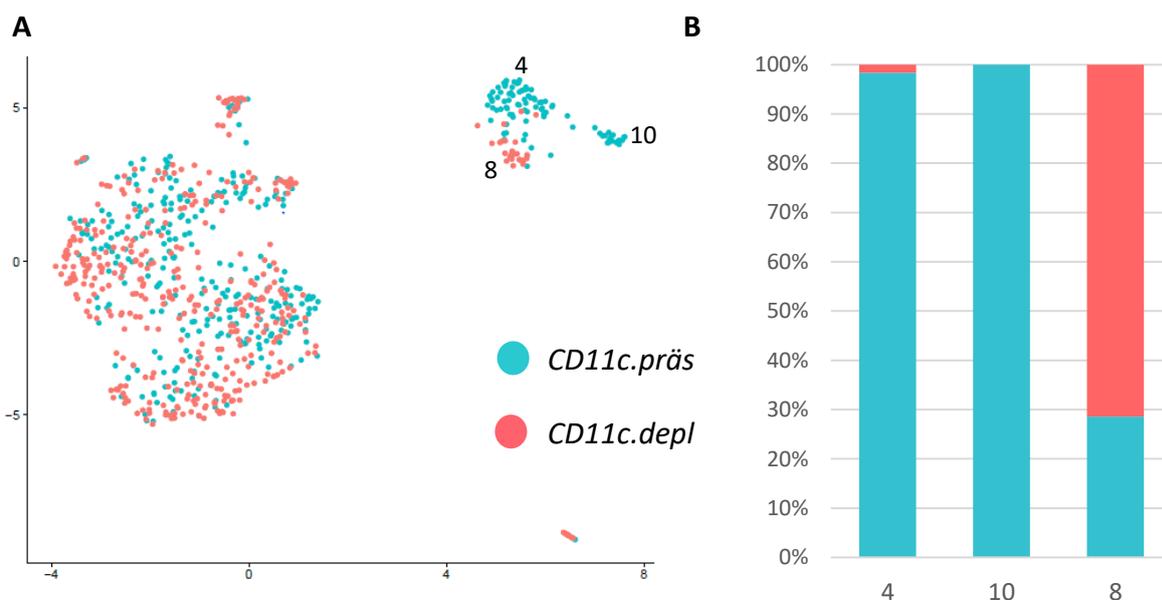
B) Heatmap mit Expression manuell ausgewählter Signaturgene (Zeilen) definierter Zellpopulationen in entsprechenden Zellen und Clustern (Spalten). Die farblichen Abstufungen zeigen eine hohe (rot) oder geringe (blau) Expression des betreffenden Gens. Die Skalierung erfolgte logarithmisch anhand der normalisierten Expressionswerte.

C) Heatmap mit Expression der rein bioinformatisch selektierten, am höchsten exprimierten Gene für die einzelnen Cluster, gemessen an der Foldchange unter Voraussetzung  $p < 0,01$ .

Farbcodierung wie B). Hervorgehoben sind die am höchsten exprimierten Gene der APC-Cluster 4 (grün), 8 (blau) und 10 (violett). Eine detaillierte Abbildung mit den am höchsten exprimierten Genen der übrigen Cluster findet sich im Anhang.

### 2.2.2 Identifikation der GvHD-protektiven APC

Legte man die Zellcluster der beiden Datensätze *CD11c.depl* und *CD11c.präs* visuell übereinander, fiel Folgendes auf: Die Zellen in Cluster 4 und Cluster 10 stammten fast vollständig aus *CD11c.präs* (blau). Oder umgekehrt: In Cluster 4 und Cluster 10 fehlten die in *CD11c.depl* (rot) depletierten Zellen. Das hinsichtlich des Genexpressionsprofils ähnliche Cluster 8 hingegen enthielt mehrheitlich Zellen aus *CD11c.depl* (70 %). Wir lokalisierten also die visuell sowie prozentual augenscheinlich depletierten bzw. präsenten, GvHD-protektiven Zellen in Cluster 4 und Cluster 10.



**Abbildung 15: Lokalisation der GvHD-protektiven APC in Cluster 4 und 10**

- a) UMAP-Diagramm mit Zuordnung der Zellen zu *CD11c.präs* (blau) und *CD11c.depl* (rot)
- b) Säulendiagramm mit prozentualer Zusammensetzung der APC-Cluster 4, 10 und 8, die Prozentwerte beziehen sich auf die Gesamtzellzahl des Clusters. Genaue Angaben: Cluster 4: 62 Zellen, 98 % *CD11c.präs*, 2 % *CD11c.depl*, Cluster 10: 20 Zellen, 100 % *CD11c.präs*, 0 % *CD11c.depl*, Cluster 8: 42 Zellen, 29 % *CD11c.präs*, 71 % *CD11c.depl*

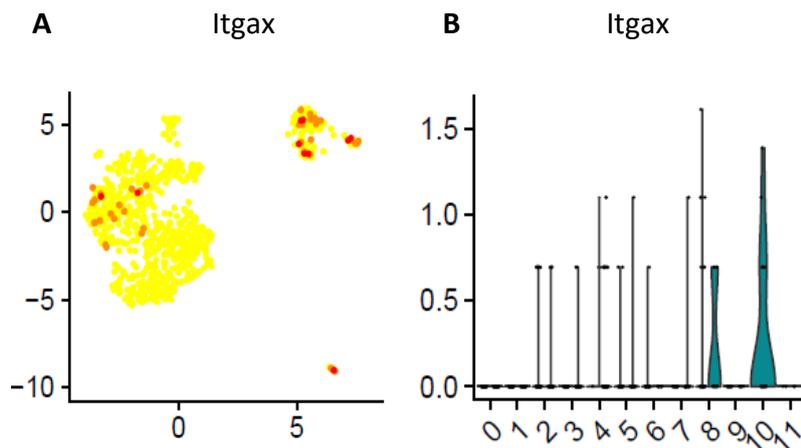
Im nächsten Schritt sollte validiert werden, dass die präsenten bzw. depletierten APC in Cluster 4 und 10 auch tatsächlich das Gen für CD11c, *Itgax*, exprimierten. Nur so konnten wir sicher sein, dass sich diese Cluster auch mit den CD11c<sup>+</sup> APC deckten, denen in den eingangs beschriebenen Depletionsversuchen eine GvHD-protective Funktion nachgewiesen worden war.

Hierzu analysierten wir die Expression von *Itgax* im gesamten Datensatz (Abbildung 16). Es wurden beide Datensätze kombiniert und die differentielle Genexpression für *Itgax* in einem Featureplot farblich codiert: Rote Punkte stehen für Zellen mit vergleichsweise hoher *Itgax*-Expression, gelbe Punkte für Zellen mit vergleichsweise niedriger *Itgax*-Expression und orangefarbene Punkte für Zellen mit intermediärer *Itgax*-Expression. So konnten wir zeigen, dass Cluster 4, 8 und 10 grundsätzlich *Itgax*-exprimierende Zellen enthielten.

Um herauszufinden, ob diese Zellen aus *CD11c.präs* oder *CD11c.depl* stammten, ordneten wir die *Itgax*-exprimierenden Zellen den Datensätzen *CD11c.präs* und *CD11c.depl* zu: Abbildung 16B zeigt diese Zuordnung in Form eines Violindiagramms mit differentielle Expression von *Itgax* innerhalb der einzelnen Cluster: Das Diagramm zeigt die einzelnen Clusterzellen (einzelne Punkte), welche *Itgax* auf dem auf der y-Achse aufgetragenen Niveau exprimieren. Sofern viele Clusterzellen *Itgax* auf ähnlichem Niveau und vergleichsweise hoch exprimierten, verbinden sich die Punkte zu einer Violinform, wie in Cluster 8 und 10.

Wir stellten fest, dass die *Itgax*-exprimierenden Zellen in Cluster 8 und 10 fast ausschließlich *CD11c.präs* und nicht *CD11c.depl* zugeordnet waren. Dieses Ergebnis deckte sich mit unserem Versuchsaufbau, nach dem nur noch *CD11c.präs* und nicht *CD11c.depl* *Itgax*-exprimierende Zellen enthalten sollte.

Nach dieser Validierung konnten wir auf die *Itgax*-exprimierenden APC-Cluster 4, 8 und 10, und spezifisch auf die präsenten/depletierten GvHD-protectiven Cluster 4 und 10 fokussieren.



**Abbildung 16: Expression von Itgax (CD11c) im kombinierten Datensatz**

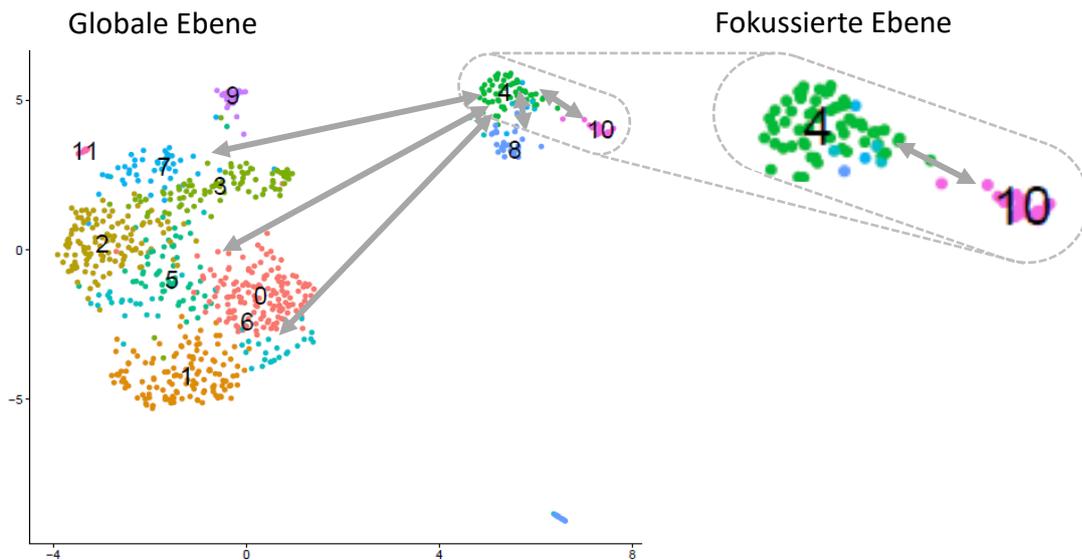
A) UMAP-Diagramm (Featureplot) der Itgax-Expression im kombinierten Datensatz: Farbcodierung visualisiert die differentielle Expression mit rot: hoher und gelb: niedriger Expression in den einzelnen Zellen (Punkte).

B) Violindiagramm, Farbcodierung entspricht der Zuordnung zu CD11c.präs (blau) und CD11c.depl (rot, nicht vorhanden).

### 2.3 Einordnung der GvHD-protektiven APC als DC oder Mph

Zur Validierung der Mph-Identität auf Transkriptomebene führten wir eine differentielle Genexpressionsanalyse durch. Wir verglichen die Expression ausgewählter Gene in Cluster 4 und 10 jeweils mit der durchschnittlichen Expression in der Gesamtheit der übrigen Cluster bzw. Zellen (Abbildung 17). Diese Analyse- und Vergleichsebene eines Clusters mit der Gesamtheit der übrigen Cluster wird im Folgenden als globale Ebene bezeichnet.

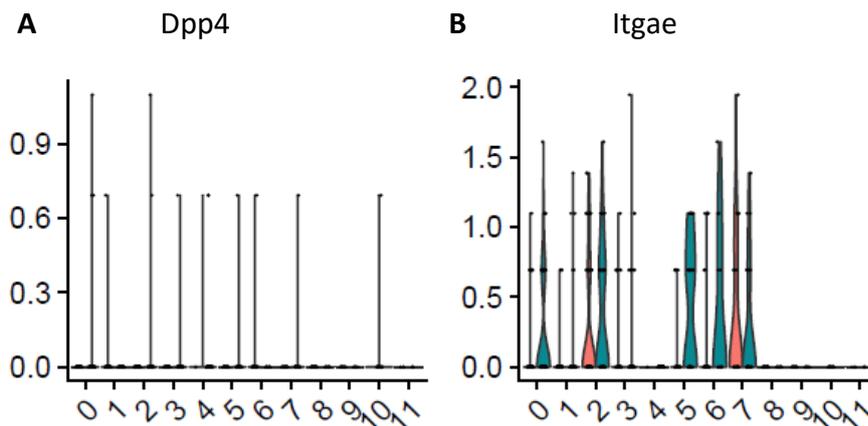
Ein Vergleich auf fokussierter Ebene bezeichnet dagegen die differentielle Genexpressionsanalyse von Cluster 4 und Cluster 10 gegeneinander, unter Ausschluss aller übrigen Cluster. Sie macht die Unterschiede beider Cluster deutlich und wird in Abschnitt 2.4 relevant. Die vollständigen Ergebnisse beider Analysen sind als Tabellen im Anhang zu finden.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung der Vergleichsebenen am Beispiel Cluster 4**

### 2.3.1 Ausschluss einer DC-Identität

Um eine DC-Identität ausschließen zu können, prüften wir die Expression der essenziellen und exklusiv in DC exprimierten Gene *Zbtb46* (Zinc finger and BTB domain-containing protein 46) (Meredith et al., 2012) und *Flt3* (Rezeptor Tyrosin Kinase Flt3) (Karsunky et al., 2003), sowie der aus der DC-Proteomsignatur abgeleiteten wichtigen, jedoch nicht essenziellen und nicht exklusiv in DC exprimierten Gene *Dpp4* (CD26) (Guilliams et al., 2016), *Ccr7* (Chemokinrezeptor für das Homing in lymphatisches Gewebe) und *Itgae* (Integrin- $\alpha$ E, CD103, Abbildung 18). Bemerkenswerterweise konnten wir im gesamten Datensatz weder *Zbtb46* noch *Flt3* noch *Ccr7* nachweisen. *Dpp4* wiesen wir ausschließlich in wenigen verstreuten Zellen nach, *Itgae* hingegen in verschiedenen Clustern, bemerkenswerterweise jedoch gar nicht in den fokussierten Clustern 4 und 10. Somit konnten wir für Cluster 4 und 10 eine DC-Identität ausschließen.



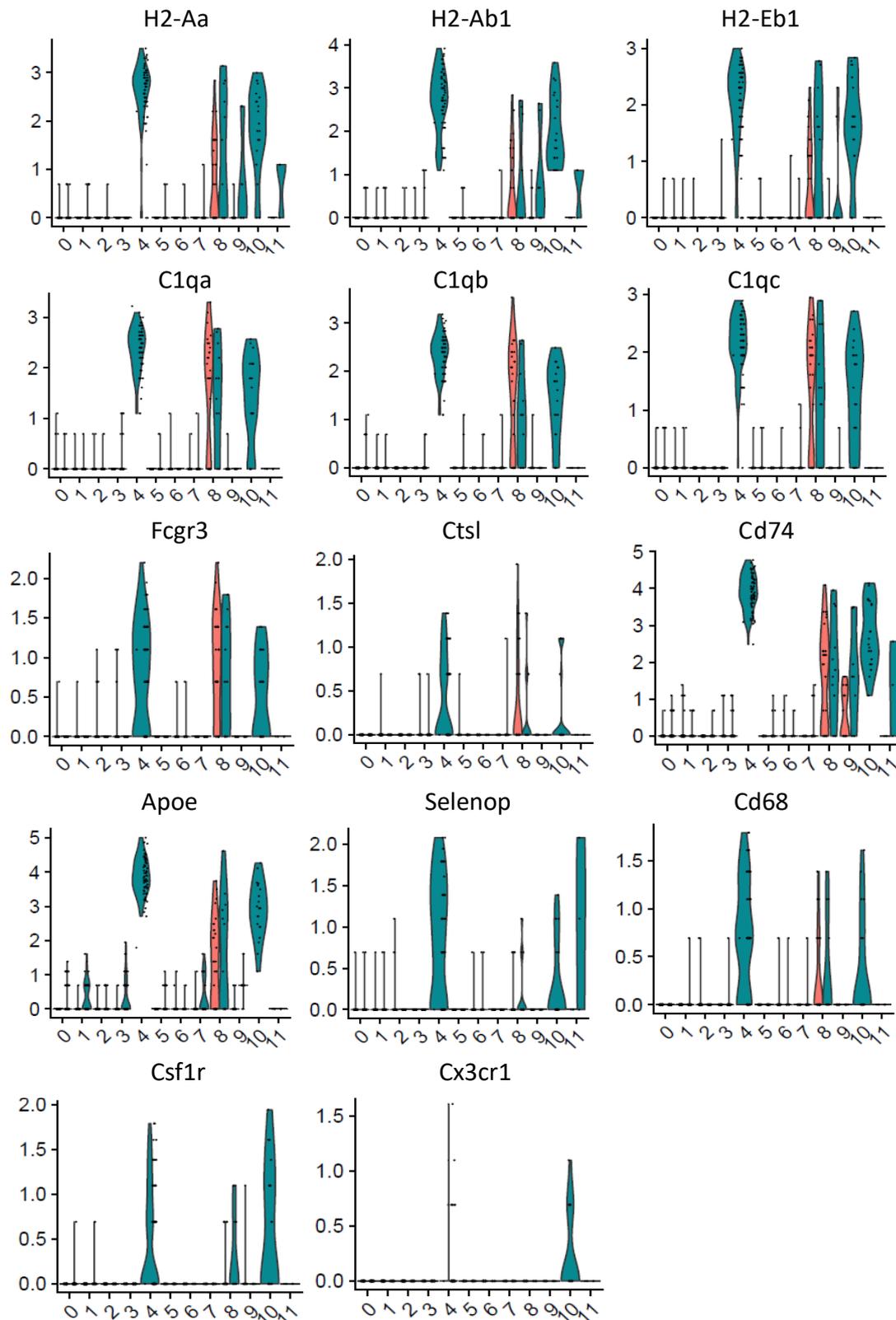
**Abbildung 18: Expression der DC-Signaturgene *Dpp4* (CD26) und *Itgae* (Integrin- $\alpha$ E) in den verschiedenen Clustern**

Violindiagramme, *CD11c.präs*: blau, *CD11c.depl*: rot, weitere Erläuterungen siehe Abbildung 16

### 2.3.2 Bestätigung einer Mph-Identität

Zur Bestätigung der Mph-Identität überprüften wir die Expression der von Gautier et al. veröffentlichten Mph-Signaturgene (Gautier et al., 2012) in Cluster 4 und 10 (Abbildung 19): Viele dieser Gene waren auf globaler Ebene in beiden Clustern signifikant hoch exprimiert (Abbildung 19 und Tabellen 5-7). Es fiel jedoch auf, dass Cluster 4 eine viel ausgeprägtere Mph-Signatur als Cluster 10 aufwies: Die Mehrheit der Signaturgene (*H2-Gene*, *Cd74*, *ApoE*, *C1q-Gene*, *Fcgr3*) zeigte sich bereits global und vor allem im fokussierten Vergleich in Cluster 4 signifikant höher exprimiert. Die Signaturgene *Selenop* und *Ctsl* detektierten wir sogar nur in Cluster 4. Alle nicht in Abbildung 19 dargestellten, in der Publikation aufgelisteten Gene konnten wir weder auf globaler noch auf fokussierter Ebene als differentiell exprimiert detektieren. Insgesamt konnten wir damit für beide Cluster eine Mph-Identität bestätigen. Diese war in Cluster 4 deutlicher ausgeprägt als in Cluster 10.

Zur Festigung der Mph-Transkriptomsignatur prüften wir außerdem die Expression des CSF-1/M-CSF-Rezeptorgens *Csf1r*, welches sich in beiden Clustern ähnlich hoch exprimiert zeigte, sowie des in der Proteomsignatur intestinaler Mph wichtigen *Cx3cr1* (C-X3-C Chemokinrezeptor). Letzteres wiesen wir im gesamten Datensatz in nur sehr wenigen Zellen auf niedrigem Expressionsniveau nach. Bemerkenswerterweise waren diese ausschließlich in Cluster 4 und 10 lokalisiert.



**Abbildung 19: Expression wichtiger Mph-Signaturgene in den verschiedenen Clustern**

Violindiagramme, CD11c.präs: blau, CD11c.depl: rot, weitere Erläuterungen siehe Abbildung

In Zusammenschau der Ergebnisse schlossen wir eine DC-Identität der GvHD-protectiven APC auch auf Transkriptomenebene aus. Beide Cluster zeigten in der globalen Analyse deutliche Mph-Charakteristika, Cluster 4 wies jedoch auf globaler und fokussierter Ebene eine sehr viel deutlichere Mph-Signatur auf als Cluster 10 (siehe auch Tabellen 5 - 7).

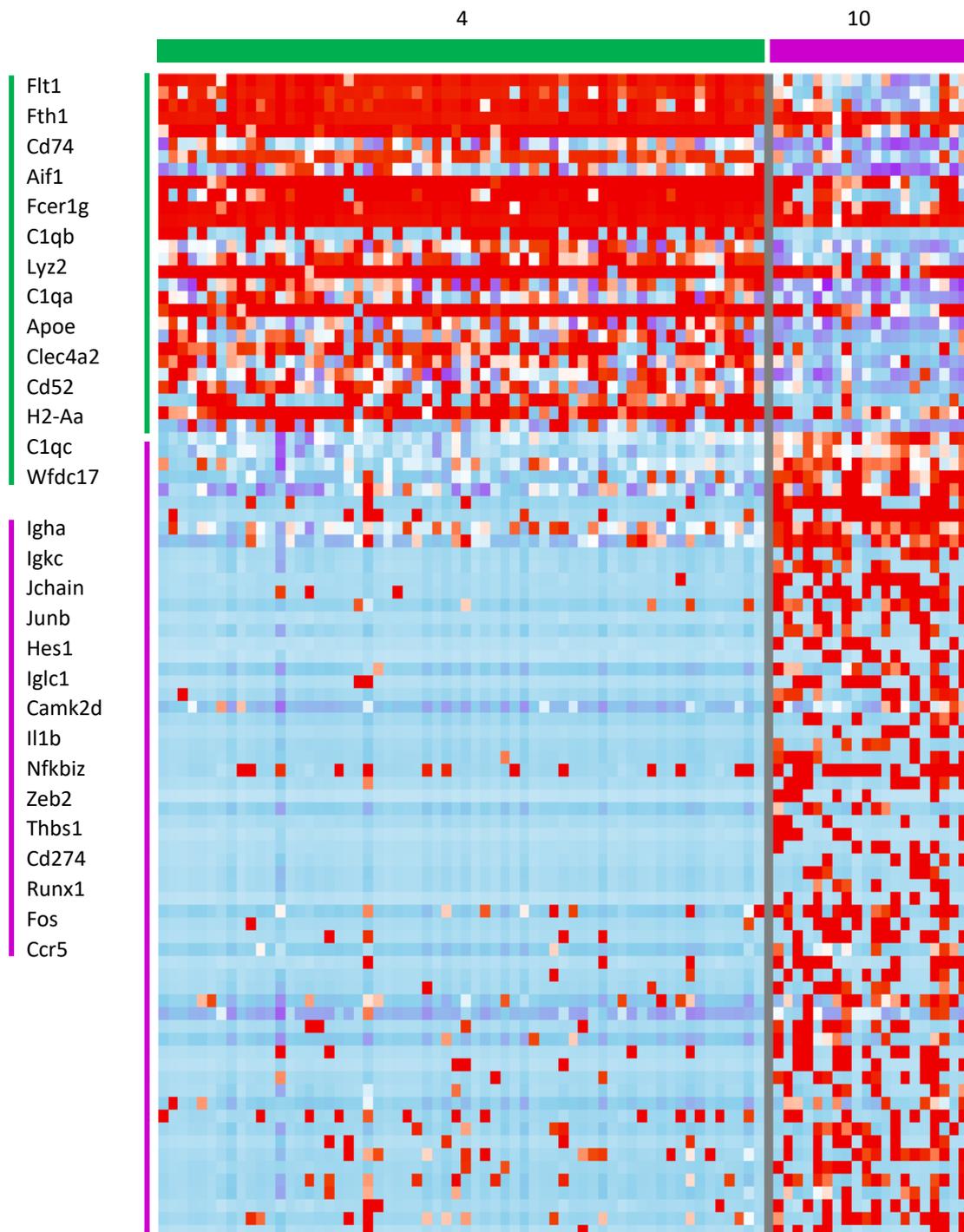
#### 2.4 Detaillierte Charakterisierung von Cluster 4 und Cluster 10

Im nächsten Schritt sollten die Eigenschaften der GvHD-suppressiven APC in Cluster 4 und Cluster 10 im Detail analysiert und die Unterschiede zwischen beiden Clustern herausgearbeitet werden. Wir wählten hierfür eine Kombination aus fokussierter und globaler Analyse. Zur Übersichtlichkeit wird zunächst die fokussierte Analyse skizziert, die beide Cluster miteinander und nicht mit der Gesamtheit der übrigen Zellen vergleicht und ihre Unterschiede deutlich macht (Abbildung 17). Die eigentliche, detaillierte Charakterisierung folgt anhand beider Analyseebenen im letzten Abschnitt des Ergebnisteils, unterteilt in die Bereiche Effektorfunktionen, Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren, und Sonstiges.

##### 2.4.1 Fokussierte Analyse

Die fokussierte differentielle Genexpressionsanalyse verglich Cluster 4 mit Cluster 10 und ergab für Cluster 4 insgesamt 169 und für Cluster 10 insgesamt 94 signifikant hoch exprimierte Gene. Diese Gene können umgekehrt im anderen Cluster als niedrig exprimiert betrachtet werden. Aus diesen charakteristischen Genen wurden rein bioinformatisch anhand eines Scores aus p-Wert und Foldchange die am relevantesten differentiell exprimierten Gene ausgewählt (Abbildung 20, einzelne Zeilen). Für die weitere Analyse wählten wir aus dieser bioinformatischen Auswahl manuell die nach Literaturrecherche biologisch relevantesten Gene aus. Sie sind in Abbildung 20 grün oder violett hervorgehoben. Die vollständige Liste der bioinformatisch relevanten Gene für beide Cluster findet sich im Anhang.

Für die detaillierte Charakterisierung verwendeten wir nur die zweifach, nach bioinformatischer und biologischer Relevanz selektierten Gene.



**Abbildung 20: Fokussierter Vergleich von Cluster 4 und Cluster 10**

Heatmap mit Expression aller signifikant differentiell exprimierten Gene der fokussierten Analyse, welche den bioinformatisch gesetzten Score aus  $\log_{10}(\text{p-Wert}) \times \text{avg\_LogFC}$  (Foldchange) überschritten (einzelne Zeilen). Aus diesen wurden manuell die biologisch relevantesten ausgesucht (grün und violett markierte Listen). Erläuterungen zur Heatmap siehe Abbildung 14.

## 2.4.2 Detaillierte Charakterisierung auf fokussierter Ebene

### Allgemeines

Zur Eingrenzung und Übersichtlichkeit wählten wir für Cluster 4 und 10 aus den signifikant hoch exprimierten Genen der globalen Ebene (analog zur fokussierten Ebene) nur die biologisch relevantesten Gene aus.

Wir verwendeten diese Auswahl als Basis der detaillierten Charakterisierung, weil die globale Ebene ein breites Referenzspektrum bot: Mph wurden nicht nur mit anderen APC, sondern bspw. auch mit T- oder B-Zellen verglichen. Anhand dieser groß gefassten Vergleichsebene konnten individuelle Charakteristika der Cluster 4 und Cluster 10 Zellen vor dem Hintergrund aller anderen hämatopoetischen Zellen abgebildet werden. Gemeinsame Eigenschaften wurden für beide Cluster deutlich. Anhand der fokussierten Analyse konnten dann die Unterschiede zwischen beiden Clustern herausgearbeitet werden.

In den folgenden Tabellen sind für alle Gene die Foldchanges der globalen Analyse (wievielmals so hoch das Gen im betrachteten Cluster exprimiert ist, verglichen mit der Expression in allen anderen Clustern) im natürlichen Logarithmus angegeben. Bsp: *Wfdc17* (Tabelle 5, antipathogene oder gewebewirksame Faktoren): Eine Foldchange von 0,599 in Cluster 10 bedeutet, dass die Cluster 10-Zellen das *Wfdc17*-Gen durchschnittlich 1,8mal ( $e^{0,599}$ mal) so hoch exprimieren wie der Durchschnitt aller anderen hämatopoetischen Zellen. Eine Foldchange von 2 für Cluster 4 bedeutet, dass die Cluster 4-Zellen das *Wfdc17*-Gen ca. siebenmal so hoch exprimieren wie der Durchschnitt aller anderen hämatopoetischen Zellen. Das Gen wurde außerdem in 70 % der Cluster 10-Zellen und 94 % der Cluster 4-Zellen überhaupt detektiert (eingeklammerte Zahlen). Auf fokussierter Ebene war *Wfdc17* in Cluster 4 signifikant höher exprimiert als in Cluster 10 (Größer-/Kleiner-Zeichen).

Zur Übersichtlichkeit teilten wir alle relevanten Gene ein in die beiden Hauptkategorien „Effektorfunktionen“ (Abschnitt 2.4.3, Tabelle 5) und „Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren“ (Abschnitt 2.4.4, Tabelle 6). Sofern Gene bestimmter weiterer Eigenschaften vermehrt exprimiert waren, wurden sie in der Subkategorie „Sonstige“ (Abschnitt 2.4.5, Tabelle 7) zusammengefasst.

### 2.4.3 Effektorfunktionen

Die meisten Gene dieses Bereichs sind je nach Kontext sowohl pro- als auch antiinflammatorisch, bzw. sowohl Gewebeintegritäts-förderlich als auch destruktiv konnotiert. Daher verzichteten wir auf eine diesbezügliche Einordnung.

**Tabelle 5: Gene des Bereichs Effektorfunktionen und ihre differentielle Expression in Cluster 4 und 10**

	Gen	Protein	Cluster 10		Cluster 4
Immunmod. Direktkontakt	Cd274	PD-L1	0.431 (50)	>	n.s.
	H2-Ab1*	H-2 Klasse II (MHC II)	1.407 (100)	<	2.511 (100)
Immunmod. mittels sezernierter Faktoren	Il1b	Interleukin 1β	0.948 (75)	>	n.s.
	Il18bp	Interl. 18 Binding Protein	n.s.	<	0.528 (44)
	Thbs1	Thrombospondin 1	0.687 (50)	>	n.s.
	Ptgs2	PG-Synthase 2 (COX-2)	n.s.	>	n.s.
	Ccl24	CCL24	0.617 (65)	<	1.738 (86)
	Ccl8	CCL8	0.463 (45)	n.s.	1.202 (55)
	Cxcl16	CXCL16	n.s.	n.s.	0.665 (50)
	ApoE	Apolipoprotein E	1.376 (100)	<	3.15 (100)
	Ftl1	Ferritin Leichtkette	n.s.	<	2.024 (100)
	Fth1	Ferritin Schwere Kette	n.s.	<	1.437 (100)
Antipathogene- oder gewebe-wirksame sezernierte Faktoren	Lyz2	Lysozym C-2	n.s.	<	1.484 (96)
	Adamdec1	(eine Metalloproteinase)	n.s.	n.s.	0.426 (42)
	Dnase1l3	DNase γ	n.s.	n.s.	0.621 (57)
	Wfdc17	Activated Mph/Microglia WAP domain protein	0.599 (70)	<	2.01 (94)
	C1qa**	Complement 1q	0.893 (80)	<	2.029 (100)
	Igk1	Immunglobulin λ	0.755 (100)	>	n.s.
	Selenop	Selenoprotein P	n.s.	<	1.058 (66)

Auswahl der biologisch relevanten Gene der globalen und/oder fokussierten Analyse. Für die Spalten Cluster 4 und Cluster 10 werden die differentiellen Expressionswerte als gerundete In Foldchanges der globalen Analyse angegeben. Die Klammern umschließen den Anteil aller Clusterzellen in %, in denen das Gen überhaupt detektiert wurde. Vergleichszeichen symbolisieren die differentielle Expression in der fokussierten Analyse. n.s.: nicht signifikant.

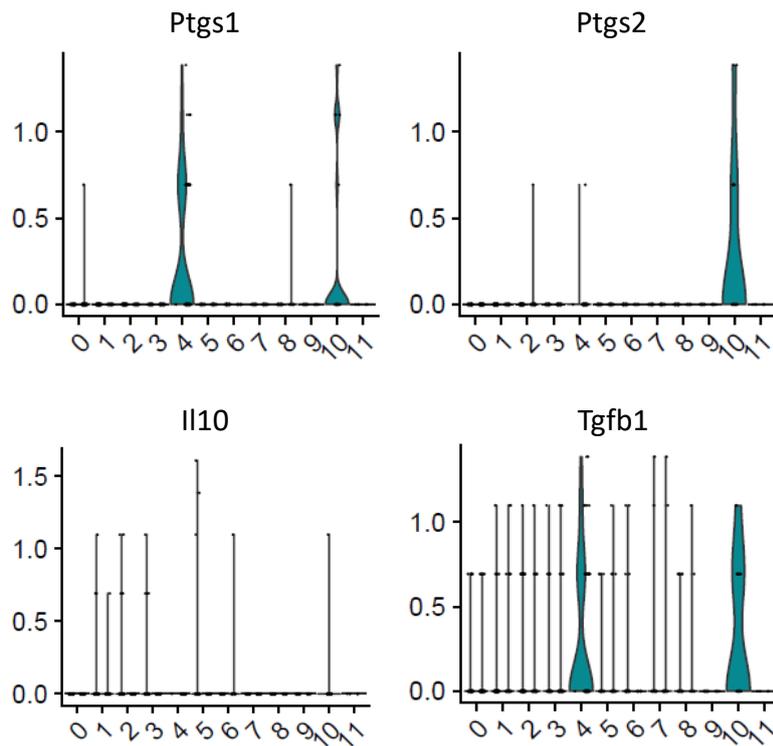
\* Stellvertretend für alle detektierten H2-Gene und Cd74, \*\* Stellvertretend für C1qa, b und c: Alle weisen eine ähnliche Expression auf.

Für den Bereich Effektorfunktionen zeigten sich insgesamt also folgende Muster: Cluster 10 wies mit hoher Expression von *Cd274* (PD-L1), *Il1b* (Interleukin 1 $\beta$ ), *Thbs1* (Thrombospondin 1) und *Ptgs2* (COX-2) eine starke immunmodulative Signatur auf, insbesondere bezogen auf das adaptive Immunsystem. Außerdem fanden sich verschiedene Immunglobulingene (*Igkc1* auf globaler und *Igkc1*, *Igkc*, *Igha* und *Jchain* auf fokussierter Ebene, siehe Anhang). Cluster 4 hingegen zeigte eine stärkere Chemokin- (*Ccl24*, *Ccl8*, *Cxcl16*) und deutliche Ferritin- (*Ftl1*, *Fth1*) Expression. Außerdem waren in ihm die Effektorgene der Mph-Signatur (bspw. *Apoe* oder die *C1q*-Gene) signifikant höher exprimiert als in Cluster 10. Alle Gene im Bereich Pathogenabwehr und Gewebeintegrität waren in Cluster 4 hoch und bis auf *Adamdec1* und *Dnase1l3* auch signifikant höher exprimiert als in Cluster 10.

Bemerkenswerterweise konnten wir in keinem der beiden Cluster Gene mit eindeutig proinflammatorischer Effektorfunktion, wie bspw. *Il6*, *Il12a/b*, *Il23a*, *Tnfa* oder *Nos2* (iNos) (Bain and Schridde, 2018) detektieren.

In der fokussierten Analyse fiel auf, dass *Ptgs2*, codierend für Cyclooxygenase-2 (COX-2), in Cluster 10 ca. 1,5mal so hoch exprimiert war wie in Cluster 4. Wir suchten daher nach anderen Genen der Prostaglandinsynthese, die einen wichtigen Effektormechanismus der GvHD-protectiven Mph hätten darstellen können. Sie und insbesondere *Ptgs1* (Cyclooxygenase-1, COX-1) waren zwar in beiden Clustern exprimiert, jedoch nicht signifikant mehr als in allen anderen Clustern (Abbildung 21).

Zusätzlich suchten wir aktiv nach Genen, welche insbesondere im Gastrointestinaltrakt mit immunsuppressiven Effektorfunktion assoziiert sind (alle nicht signifikant differentiell exprimiert und daher nicht in Tabelle 5 aufgeführt). Von diesen wiesen wir *Tgfb1* (TGF- $\beta$ 1) in beiden Clustern, *Il10* (Interleukin 10) hingegen nur sehr gering in Cluster 10 nach. Nicht detektierbar zeigten sich die Enzym-codierenden und in der Mph-Klassifikation wichtigen Gene *Arg1* (Arginase 1), *Nos2* (iNOS, induzierbare NO-Synthase) und *Ido1* (Indolamin-Dioxygenase).



**Abbildung 21: Expression selektierter Gene mit immunsuppressiver Effektorfunktion in den verschiedenen Clustern**

Violindiagramme, CD11c.präs: blau, CD11c.depl: rot, weitere Erläuterungen siehe Abbildung 16. Bis auf Ptgs2 waren die Gene weder auf globaler noch auf fokussierter Ebene signifikant differentiell exprimiert.

#### 2.4.4 Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren

Zur Übersichtlichkeit teilten wir die Gene des Bereichs Signaltransduktion entsprechend ihrer Lokalisation in die drei Subkategorien Rezeptoren, intrazelluläre Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren ein. Wichtig ist, dass die codierten Proteine Teile eines komplexen Netzwerks sind, in dem sich Input-Signale und Output-Effektormechanismen überschneiden können. Die Tabelle gibt daher keinen linearen Signalweg vor. Die C-Typ- (*Clec*) und S-Typ- (*Lgals3*) Lektine wurden trotz möglicher Funktion als lösliche Rezeptoren (Effektorfunktion) dem intrazellulären Bereich zugeordnet.

**Tabelle 6: Gene des Bereichs Signaltransduktion und ihre differentielle Expression in Cluster 4 und 10**

	Gen	Protein	Cluster 10		Cluster 4
Wachstumsfaktor-Rezeptoren	Csf1r	CSF-1/ M-CSF-Rez. (CD115)	0.767 (50)	n.s.	0.598 (44)
	Csf-2ra	CSF-2/ GM-CSF-Rez. $\alpha$ (CD116)	0.487 (45)	n.s.	n.s.
Fc-Rezeptoren	Fcgr3	Fc $\gamma$ Rez III (CD16)	0.436 (55)	n.s.	0.864 (68)
	Fcgr4	Fc $\gamma$ Rez. IV (CD16-2)	n.s.	n.s.	0.455 (44)
	Fcer1g	Fc $\epsilon$ Rez. I $\gamma$ Kette	n.s.	<	1.175 (100)
Lektine	Clec1b	CLEC-2	n.s.	<	0.465 (42)
	Clec4a2	DCIR	n.s.	<	0.57 (53)
	Clec4n	Dectin-2	n.s.	<	1.036 (76)
	Lgals3	Galectin-3	n.s.	<	0.964 (66)
Sonstige Rezeptoren	Cd300c 2	MAIR-II/ LMIR2	n.s.	n.s.	0.548 (48)
	Il4ra	IL-4 Rezeptor $\alpha$	n.s.	>	n.s.
	Msr1	CD204	0.436 (50)	n.s.	n.s.
Intrazelluläre Signaltransduktion	Camk2d	Ca <sup>++</sup> /Calmodulin dependent Protein Kinase II	0.639 (65)	>	n.s.
	Aif1	Allograft Inflammatory Factor 1	0.534 (70)	<	1.926 (97)
	Rgs1	Regulator of G-Protein Signaling 1	1.04 (90)	>	n.s.
	Cdkn2a	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1	0.993 (75)	>	n.s.
	Malt1	MALT1	n.s.	>	n.s.
	Nfkbiz	NF- $\kappa$ B Inhibitor $\zeta$ (Zeta)	0.498 (45)	>	n.s.
Transkriptionsfaktoren	Hes1	Hes-1	1.406 (80)	>	n.s.
	Runx1	Runx-1/ AML-1	0.576 (45)	>	n.s.
	Junb	Jun-B	0.894 (90)	>	n.s.
	Jund	Jun-D	n.s.	>	- 0.442 (6)
	Maf	Maf	n.s.	>	n.s.
	Mafb	Maf-B	0.762 (50)	n.s.	n.s.
	Fos	c-Fos	0.814 (60)	>	n.s.
		Zeb-2	0.645 (50)	>	n.s.
	Spi.1	PU.1	n.s.	n.s.	0.524 (48)
Cebpb	C/EBP $\beta$	0.747 (70)	n.s.	n.s.	

Erläuterungen siehe Tabelle 5

Für den Bereich Signaltransduktion zeigten sich insgesamt also folgende Muster:  
 Beide Cluster exprimierten das M-CSF-Rezeptor- und wichtige Mph-Signaturgen *Csf1r* auf einem vergleichbaren Niveau. Cluster 4 zeigte eine deutliche Anreicherung von Fc-Rezeptorgenen, Cluster 10 dagegen mehr Transkriptionsfaktorgene, insbesondere des AP-1 Transkriptionsfaktorkomplexes (*Junb, Jund, Maf, Mafb* und *Fos*).

Aufgrund des entzündlichen Milieus in der intestinalen Mukosa während der akuten GvHD hätten wir in beiden Clustern Gene inflammatorischer Signalkaskaden erwartet. Bis auf die potenziell inflammatorischen Lektine in Cluster 4 konnten wir in beiden Clustern jedoch keine Anreicherung von *Pattern Recognition Receptors (PRR)* wie bspw. *Toll-like, Nod-like* oder *Rig I-like Receptors* erkennen. Auch Inflammasom-kodierende Gene wie bspw. *Casp1, Pycard, Nlrp3* oder *Aim2* waren nicht signifikant hoch exprimiert.

#### 2.4.5 Sonstige

Wir eröffneten vier weitere Subkategorien, für die sich auf globaler Ebene eine Genanreicherung feststellen ließ. Die Proteinprodukte der Subkategorie Oberflächenproteine dienen teilweise als histochemische Marker.

**Tabelle 7: Sonstige Gene und ihre differentielle Expression in Cluster 4 und 10**

	Gen	Protein	Cluster 10		Cluster 4
Zytoskelett	Actb	Aktin B	-0.957 (95)	<	n.s.
	Arpc1b	ARP2/3 Komplex	n.s.	<	0.452 (66)
	Cfl1	Cofilin 1	-0.509 (60)	<	0.587 (98)
	Tmsb4x	Thymosin $\beta$ 4	-0.652 (100)	<	1 (1)
	Pfn1	Profilin	-0.602 (100)	<	0.475 (100)
	Myl6	Myosin	n.s.	<	0.464 (94)
			Leichtpolypeptid 6		
Lysosomale Enzyme	Ctsb	Cathepsin B	0.749 (80)	n.s.	1.081 (81)
	Ctsc	Cathepsin C	n.s.	n.s.	0.535 (60)
	Ctsh	Pro-Cathepsin H	0.492 (55)	n.s.	0.878 (60)
	Ctsl	Cathepsin L1	n.s.	n.s.	0.453 (42)
	Ctss	Cathepsin S	1 (80)	<	1.851 (98)
	Ctsz	Cathepsin Z	n.s.	<	1.068 (81)
	Psap	Prosaposin	1.423 (80)	n.s.	1.399 (94)
Oberflächen- und Membranproteine	Cd9	Tetraspanin (CD9)	n.s.	n.s.	0.603 (57)
	Cd63	Tetraspanin (CD63)	0.49 (45)	n.s.	1.189 (77)
	Cd81	Tetraspanin (CD81)	0.527 (65)	<	1.261 (86)
	Cd52	Campath-1 (CD52)	n.s.	<	0.477 (94)
	Cd68	Macrosialin (CD68)	n.s.	n.s.	0.812 (69)
	Ms4a7	Ms4a7 Protein	0.753 (65)	n.s.	1.203 (79)

Weitere MDSC-Gene*	Ifitm2	Interferon induziertes Transmembranprot. 2	n.s.	<	1.011 (77)
	Dusp1	Dualspezifische Proteinphosphatase	0.5 (55)	>	n.s.
	TXn1	Thioredoxin	n.s.	<	n.s.
	Btg1	BTG1	n.s.	>	-0.819 (37)
	Pla2g7	PAF Acetylhydrolase	0.651 (45)	n.s.	0.875 (71)
	Ubb	Polyubiquitin B	n.s.	<	n.s.
	Npl	N-Acetylneuraminat Lyase	n.s.	<	0.992 (68)
	Sonstige	Malat1	lncRNA Malat1	1.432 (100)	>

Erläuterungen siehe Tabelle 5, \*: nach Alshetaiwi et al. (Alshetaiwi et al., 2020), andere der darin erwähnten Gene wurden bereits in anderen Kategorien genannt.

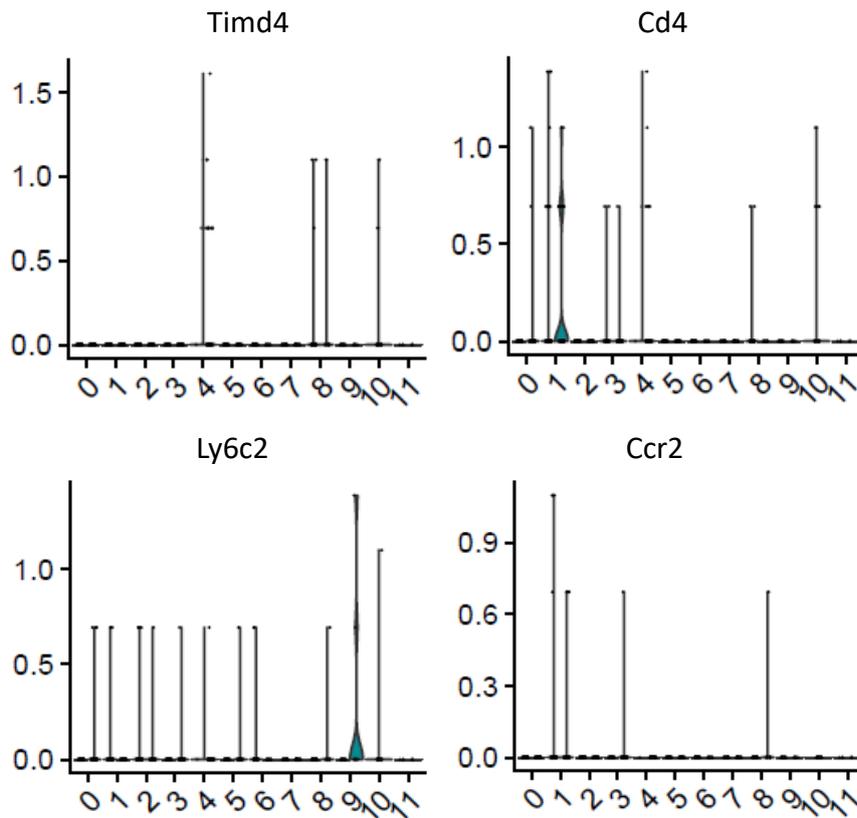
Für Cluster 4 fiel eine sehr deutliche Expression von Zytoskelett-assoziierten Genen auf. Bemerkenswerterweise waren diese in Cluster 10 nicht nur im fokussierten Vergleich, sondern sogar im Vergleich zu allen anderen Zellen deutlich unterexprimiert. Beide Cluster wiesen eine signifikante Expression der für verschiedene lysosomale Cathepsine codierenden *Cts*-Gene auf, mit etwas deutlicherer Anreicherung in Cluster 4. Weil Cluster 10 in seinem bisherigen Profil deutliche Parallelen mit M-MDSC aufwies, suchten wir fokussiert nach weiteren MDSC-charakteristischen Genen, die einer Einzelzell-RNA-Analyse im Brustkrebskontext (Mausmodell (Alshetaiwi et al., 2020)) entnommen wurden. Von diesen ließ sich jedoch keine Mehranreicherung in Cluster 10 erkennen. Uneingeordnet blieb das Gen *Malat1* (eine *long non coding RNA/lncRNA*): Dieses stand in der fokussierten und globalen Analyse an erster Stelle der in Cluster 10 hoch exprimierten Gene, für Cluster 4 hingegen in der globalen Analyse an zweiter Stelle der differentiell herunterregulierten Gene.

## 2.5 Ontogenetische Einordnung von Cluster 4 und Cluster 10

Unter ontogenetischen Gesichtspunkten werden Mph der intestinalen Mukosa und insbesondere der intestinalen Lamina propria eingeteilt in residente Mph-Populationen mit Ursprung in gewebeständigen Vorläuferzellen der embryonalen Hämatopoese und Mph-Populationen mit Ursprung in Monozyten der adulten Hämatopoese. Erstere werden durch eine lokale Selbsterneuerung aufrechterhalten, letztere verlangen eine konstante Einwanderung von Monozyten aus dem Blut mit Ausdifferenzierung im Gewebe. Für eine entsprechende Einordnung der Cluster 4- und Cluster 10-Mph analysierten wir die

Expression von *Timd4* und *Cd4*, die von Shaw et al. (Shaw et al., 2018) als ontogenetische Marker residenter Mph-Populationen herausgestellt wurden und glichen ihre Signatur mit publizierten Transkriptomprofilen beider Ursprünge (De Schepper et al., 2018) ab. Zur Analyse eines monozytären Ursprungs untersuchten wir die Expression von Monozyten-Signaturgenen (Haage et al., 2019; Jordão et al., 2019; Monaghan et al., 2019) und glichen die Transkriptomprofile des „Monozyten-Wasserfalls“ (Tamoutounour et al., 2012) hin zu Colon-Mph (Schridde et al., 2017) mit den Transkriptomprofilen beider Cluster ab (Abbildung 22).

In beiden Clustern konnten wir kein einziges auf einen embryonalen oder monozytären Ursprung hindeutendes Gen signifikant differentiell exprimiert detektieren (Abbildung 22, alle anderen rein tabellarisch analysiert), insbesondere kein *Ccr2* oder *Ly6c2*. *Timd4* zeigte sich in beiden Clustern ähnlich wenig exprimiert. Auch im Abgleich der unterschiedlichen Entwicklungsstufen von Monozyten zu Mph fanden sich keine übereinstimmenden Gene in unserem Datensatz. Allerdings zeigte Cluster 4 eine Mehranreicherung von Genen, die wir den P4 Colon-Mph zuordnen würden (Metalloproteinasen, Phagozytose, Komplement oder Chemokine), ohne dass wir genau die von Schridde *et al.* (Schridde et al., 2017) aufgelisteten Gene gefunden hätten. Ein Ursprung der GvHD-protektiven Mph in gewebeständigen, embryonalen Vorläuferzellen oder Monozyten der adulten Hämatopoese konnte somit nicht belegt werden.



**Abbildung 22: Expression wichtiger ontogenetischer Marker intestinaler Mph in den verschiedenen Clustern**

Violindiagramme, Auswahl anhand (De Schepper et al., 2018; Shaw et al., 2018),  
 Hinzunahme von *Ly6c* und *Ccr2* als monozytäre Signaturgene. *CD11c.präs*: blau, *CD11c.depl*:  
 rot, weitere Erläuterungen siehe Abbildung 16. Alle Gene nicht signifikant differentiell  
 exprimiert.

## Diskussion

### 1. Inhaltliche Diskussion

#### 1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die akute GvHD ist eine Hauptkomplikation der allo-HSZT, der Darm eines ihrer wichtigsten Manifestationsorte. Im Mausmodell bewirkt das Fehlen von Empfänger-APC in der Effektorphase der akuten GvHD eine schwerere Symptomatik und kürzeres Überleben der Versuchstiere und auf histologischer Ebene eine deutlichere Entzündung und eine höhere Dichte alloreaktiver T-Zellen in der intestinalen Mukosa. Die folglich GvHD-protektiven Empfänger-APC wurden in dieser Studie näher charakterisiert. Wir ordneten sie auf Proteom- und Transkriptomebene als Mph ein und schlossen eine Identität als DC aus. Die Expression von PD-L1 und Kolo-kalisation mit alloreaktiven T-Zellen legte eine direkte T-Zell-Suppression via PD-L1/PD-1 als wichtigen Mechanismus der GvHD-Suppression nahe. Mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurden die GvHD-protektiven Mph in zwei verschiedene Populationen unterteilt: Cluster 4 mit starker Mph-Signatur und gewebe- und antipathogener Funktion und Cluster 10 mit weniger ausgeprägter Mph-, jedoch M-MDSC-ähnlicher Signatur und stark immunmodulativem Profil. Eine hohe CSF-1-Rezeptor-Expression lieferte wichtige ontogenetische Hinweis, der Ursprung beider Populationen in embryonalen, gewebebeständigen Vorläuferzellen oder Monozyten blieb jedoch offen.

#### 1.2 Diskussion der Zellidentität

##### 1.2.1 Ausschluss der DC-Identität

Dass DC in unseren Experimenten nicht für die GvHD-Protektion verantwortlich sind, verwundert nicht: Zwar leisten sie unter homöostatischen Bedingungen einen wichtigen Beitrag zur intestinalen Immuntoleranz, ändern in einem entzündlichen Milieu wie bspw. einer Kolitis jedoch Phänotyp und Effektorfunktion und induzieren eine zumeist inflammatorische Immunantwort (Farache et al., 2013; Gross et al., 2015). Im Kontext der intestinalen akuten GvHD sind sie vor allem in der Initiationsphase von Relevanz: Hier gelten sie als kompetenteste, wenn auch nicht unbedingt nötige Initiatoren der organspezifischen Entzündungsreaktion und können andererseits, auf protektiver Seite, Treg induzieren und zu einer Reduktion/Modulation zytotoxischer T-Zellen beitragen (Koyama and Hill, 2019; Markey et al., 2018; Weber et al., 2014).

In der Effektorphase der akuten GvHD konnten wir in der intestinalen Mukosa jedoch keine DC mehr detektieren. Wir gehen daher davon aus, dass die DC zum Analysezeitpunkt bereits

aus der intestinalen Lamina propria in die mesenterialen Lymphknoten migriert sind. Eine hocheffektive Immunmodulation und Gewebeprotektion und dort von aus scheint Zusammenschau der Ergebnisse unwahrscheinlich.

### 1.2.2. Diskussion der Mph-Identität

Mph und ihre funktionelle Bedeutung für den Krankheitsverlauf nach allo-HSZT sind in unterschiedlichem Kontext untersucht worden: In retrospektiven histopathologischen Studien wurde gezeigt, dass die Präsenz von Mph in Hautbiopsien von allo-HSZT-Patienten mit einer therapierefraktären GvHD und geringeren Überlebenschancen assoziiert ist (Nishiwaki et al., 2009). Es blieb jedoch offen, ob diese Mph als Akteure zur GvHD beitragen oder umgekehrt erst in Reaktion auf eine bereits bestehende Entzündung in die Haut einwandern (Terakura et al., 2015). In experimentellen CSF-1-Rezeptorabhängigen Expansions- und Depletionsstudien am Tiermodell konnte die Rolle von Mph für die GvHD feiner differenziert werden: So führte eine Depletion von insbesondere Spender-Mph zwei Wochen nach allo-HSZT zu einer milderen chronischen kutanen GvHD, eine Expansion hingegen zu einer schwereren (Alexander et al., 2014). Diese Daten sprechen für eine proinflammatorische Rolle von Spender-Mph in der GvHD. Wurden jedoch allein Empfänger-Mph kurz vor Transplantation depletiert, führte das zu einer schwereren Entzündung und einem kürzeren Überleben der Versuchstiere (Hashimoto et al., 2011; MacDonald et al., 2010). Eine Expansion der Empfänger-Mph kurz vor Transplantation führte hingegen zu einem verbesserten klinischen Outcome (Hashimoto et al., 2011). Unsere Studie ergänzte in der detaillierten Charakterisierung der Empfänger-Mph mögliche protektive Effektorfunktionen, allgemein im Bereich der Gewebeintegrität und speziell im Bereich der T-Zell-Suppression. Sie bestätigt und differenzierte damit die in den vorherigen Studien nachgewiesene GvHD-protective Funktion der Mph.

### 1.3 Diskussion des antiinflammatorischen Profils

Die Induktion steriler oder T-Zell-abhängiger, GvHD-vergleichbarer Colitiden führte in experimentellen Studien zur Herausbildung unterschiedlicher Populationen fast ausschließlich inflammatorischer myeloider Zellen (Bain et al., 2012; Platt et al., 2010; Rivollier et al., 2012; Zigmund et al., 2012). Daher hätten wir auch in der akuten GvHD für Mukosa-Mph ein inflammatorisches Profil erwartet, beginnend mit der Hochregulation von Genen inflammatorischer Signalkaskaden wie bspw. *Pattern Recognition Receptors (PRR)*. Wir konnten jedoch in beiden Clustern keinen einzigen *Toll-like, Nod-like* oder *Rig I-like*

*Receptor* oder assoziierte Adaptorproteingene wie *Myd88* detektieren (Takeuchi and Akira, 2010). Auch Inflammasomkomponenten, bspw. der NLR-Familie (Schroder and Tschopp, 2010), und auch sämtliche Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie (Oeckinghaus and Ghosh, 2009) sahen wir nicht. Einzelne hochregulierte Gene wie *Malt1*, *Nfkbiz*, *Camk2d* und *Aif1* können zwar auf eine inflammatorische Aktivierung hindeuten, gleichzeitig aber sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effektorfunktionen induzieren (Hörber et al., 2016; Liu et al., 2008; Oeckinghaus and Ghosh, 2009; Pereira et al., 2008; Tian et al., 2006; Totzke et al., 2006; Watano et al., 2001; Yamamoto et al., 2004; Yang et al., 2005). Die untersuchten Mph unterscheiden sich bezüglich ihrer Signaltransduktion also deutlich von proinflammatorischen Mph im Kontext anderer Colitiden.

Bezüglich des Mechanismus dahinter lassen die Transkriptomdaten vermuten, dass in beiden Mph-Clustern negative Feedback-Mechanismen aktiv sind, um die Mph in einem anergen oder sogar antiinflammatorischen Zustand zu halten. Für folgende nachgewiesene Gene sind solche Effekte beschrieben: In Cluster 4 die C1q-Gene (Benoit et al., 2012; Fraser et al., 2006), *Flt1* (Ferritin (Fan et al., 2014)), *Wfdc17* (AMWAP-Protein, (Karlstetter et al., 2010)), *Tgfb1* (Smythies et al., 2005) und *ApoE* (Grainger et al., 2004), und in Cluster 10 insbesondere *Hes1* (Hairy and Enhancer of Split-1). *Hes1* wird in Mph auf inflammatorische Stimulation hin induziert und wirkt als Transkriptionsrepressor proinflammatorischer Gene (Hu et al., 2008). So könnte *Hes1* als negativem Feedbackinhibitor eine Schlüsselrolle zukommen.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die intestinalen Empfänger-Mph schon auf Ebene der Signaltransduktion relativ anerg auf die äußere Entzündungssituation in der Mukosa reagieren. Die darüber hinaus protektiven Effektorfunktionen werden in den folgenden Absätzen diskutiert.

#### 1.4 Detaillierte Diskussion der Effektorfunktionen

Anhand der spezifisch hochregulierten Gene der Cluster 4- und Cluster 10-Mph wird deutlich, dass nicht allein die Suppression alloreaktiver T-Zellen, sondern verschiedene weitere Effektorfunktionen dazu beitragen, dass die Entzündungsreaktion im Dünndarm milder ausfällt und die Versuchstiere länger überleben. Dies gilt insbesondere für die Cluster 4-Mph. Die wichtigsten Gene werden thematisch strukturiert und nach zellulärem Mechanismus zusammengefasst. Anhand dessen wird für beide Cluster ein GvHD-protektives Effektorprofil skizziert.

#### 1.4.1 Cluster 4

##### Anti-pathogenes und gewebeprotectives Effektorprofil

Die Transkriptomdaten der Cluster 4-Mph deuten auf folgende GvHD-protective Effektorfunktionen hin:

1. Enzymgesteuerte Reorganisation der entzündlich veränderten Extrazellulärmatrix: *Adamdec1* (eine Matrixmetalloproteinase), *Dnase1b3*, verschiedene *Cts* (Cathepsin-) Gene (Medina and Radomski, 2006; O'Shea and Smith, 2014; Shi et al., 2017).
2. Phagozytose von Erythrozyten, Hämaufnahme und -speicherung: Ferritin (*Ft1 und Fth1*) (Ertault-Daneshpouy et al., 2004; Hentze et al., 2010).
3. Schutz des Gewebes vor oxidativem Stress: *Selenop* (Selenoprotein P) (Barrett et al., 2015)
4. Pathogenabwehr: Opsonierung: Komplement-codierende *C1q*-Gene, antibakterielle und bakteriolytische Wirkung: *Wfdc17* (rekombinantes AMWAP) (Karlstetter et al., 2010), *Lyz2* (Lysozym C-2) (Benoit et al., 2012)), Antigen degradierung: Cathepsingene (Shi et al., 1999; Turk et al., 2012), Antigenpräsentation: *H2*-Gene.
5. Zell- und Membranmotilität (bspw. bei der Phagozytose): *Actb* (Aktin B), *Myl6* (Myosin) (Lee and Dominguez, 2010) und aktinbindende Proteine (*Cfl1*, *Tmsb4x* und *Pfn1*).

In Zusammenschau dieser Eigenschaften schlagen wir für Cluster 4 eine Nomenklatur als gewebeprotective und antipathogene Mph (englisch: *tissue protective and antipathogenic Mph*) vor.

#### 1.4.2 Cluster 10:

##### Immun- und speziell T-Zell-suppressives Effektorprofil

Folgende GvHD-protective Effektorfunktionen sind anhand der Transkriptomdaten für die Cluster 10-Mph denkbar:

1. Suppression der alloreaktiven T-Zellen in direktem Zellkontakt: Für die akute GvHD gilt der Rezeptor-Ligandenkontakt via PD-L1/PD-1 schon lange als wichtiger Mechanismus der T-Zell-Suppression: Eine Blockade von PD-1 führte zu einem verkürzten Überleben der Versuchstiere und einer deutlicheren Entzündungsreaktion (Blazar et al., 2003; Hill and Koyama, 2020), wobei im Nebeneffekt auch nützliche GvL-Mechanismen geschwächt wurden (Hill and Koyama, 2020).

In unserer Studie spricht die Hochregulation von PD-L1 (*Cd274*) und der *H2*-Gene, der durchflusszytometrische Nachweis einer deutlichen PD-L1-Expression auf intestinalen

Empfänger-Mph und ihre Kolo­kalisierung mit allogenen T-Zellen in der intestinalen Mukosa für eine PD-L1-abhängige Suppression der alloreaktiven T-Zellen. Ob und inwieweit auch die GvL oder andere PD-L1-Liganden von der Suppression betroffen sind, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

2. Immunmodulation durch sezernierte Zytokine: Thrombospondin 1 (*Thbs1*) und TGF-β1 (*Tgfb1*) können einzeln oder synergistisch eine allgemein oder spezifisch immunsuppressive Wirkung ausüben (Banovic et al., 2005; Fang et al., 2015; Ihara et al., 2017; Saban et al., 2010). Das deutlich hochregulierte Interleukin-1β (*Il1b*) passt als lokaler und systemischer Entzündungsmediator nicht in ein antientzündliches Effektorprofil (Dinarello et al., 2012; Murphy, 2017). Wie auch TGF-β1 kann Il-1β je nach Situation jedoch sowohl proinflammatorisch als auch immunsuppressiv wirken (Bent et al., 2018; Gabrilovich, 2017).

3. Immunmodulation durch Prostaglandine: Über COX-2 (*Ptgs2*) werden verschiedene pro- und antiinflammatorische Zytokine synthetisiert, allen voran PGE2, welches im gesunden und entzündeten Gastrointestinaltrakt gewebe­protektiv und -regenerativ wirkt. Eine selektive Ausschaltung von COX-2 kann eine Kolitis verschlimmern (Bain and Mowat, 2014a; Dellas; Ishikawa et al., 2011). *Ptgs2* könnte somit auch eine protektive Funktion haben.

In Zusammenschau der ausgewählten Eigenschaften schlagen wir für Cluster 10 eine Nomenklatur als speziell immunsuppressive Mph (englisch: *particular immunosuppressive Mph*) vor.

#### Diskussion der Cluster 10 Zellen als MDSC

In unserer Studie zeigen die Cluster 10-Mph deutliche Parallelen mit Einzelzell-RNA-sequenzierten M-MDSC im Brustkrebsmodell (Alshetaiwi et al., 2020). Sie erfüllen auch im Effektorprofil bspw. mit Expression von *Cd274* (PD-L1) charakteristische M-MDSC-Eigenschaften, insbesondere die Fähigkeit zur T-Zell-Suppression (Bronte et al., 2016). Die relative Anergie auf die äußere Entzündungssituation, die wir in Analyse der Signaltransduktion feststellen konnten, ist für eine effektive, dauerhafte T-Zell-Suppression durch MDSC sogar notwendig (Koehn et al., 2015). Auch der Nachweis einer nur gering ausgeprägten Mph-Signatur passt gut, sind MDSC doch als nicht vollständig ausgereifte Zellen einem myelozytären Intermediärstadium zuzuordnen.

Trotz dieser wichtigen Charakteristika sprechen folgende Argumente gegen eine MDSC-Identität: Im Mausmodell wurde eine Expansion myeloider Zellen in der Milz erst ab Tag 10

bzw. 14 nach allo-HSZT beschrieben (Billiau et al., 2003; Wang et al., 2013). Wir aber wiesen die immunsuppressiven myeloiden Zellen bereits ab Tag 6 nach allo-HSZT nach. Bis auf wenige Ausnahmen handelte es sich in fast allen Studien im allo-HSZT-Kontext um Spender- und nicht, wie bei uns, um Empfängerzellen. Zwar können Empfänger-MDSC durch eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit inflammatorischen Zytokinen vor allo-HSZT grundsätzlich induziert werden (Matta et al., 2016). Da wir unsere Versuchstiere jedoch ohne Vorbehandlung transplantierten, fällt diese Möglichkeit weg. Abgesehen davon fehlen im Profil der GvHD-protektiven Mph wichtige, MDSC-definierende Effektorenzyme wie Arginase 1 und NO-Synthase 2/ iNOS (Bronte et al., 2016). Und bezüglich ihrer Ansiedlung wäre eine periphere Lokalisation in der Dünndarmschleimhaut zwar möglich, aber untypisch, wurden in diesbezüglichen Studien mindestens parallel auch MDSC in Blut und sekundären lymphatischen Organen wie der Milz detektiert (Ibrahim et al., 2018; Okano et al., 2017). Aufgrund dieser deutlichen Unterschieden zu MDSC bleiben wir trotz der eingangs genannten Parallelen bei einer Einordnung der Cluster 10-Zellen als speziell immunsuppressive Mph und nicht als M-MDSC.

### 1.5 Diskussion der Ontogenese

Mit seinen homöostatisch-gewebeprotektiven Effektorfunktionen und in Bezug auf sein übriges Transkriptomprofil wies Cluster 4 starke Ähnlichkeit mit ausdifferenzierten P4 Colon-Mph der unbehandelten Maus auf (Schridde et al., 2017). Wir gehen daher am ehesten von einem Fortbestand einer tolerogenen *Steady-State*-Mph-Population aus, wie sie auch für andere Colitiden in experimentellen Studien beschrieben ist (Qualls et al., 2006; Weber et al., 2011). In der Quantifizierung der intestinalen Mph in unbehandelten, bestrahlten und GvHD-Mäusen beobachteten wir aber eine deutliche Zunahme der Mph-Population während der akuten GvHD. Sofern Cluster 4 den Fortbestand der *Steady-State*-Population repräsentiert, muss Cluster 10 den neu hinzugekommenen Anteil ausmachen. Bezüglich ihres Ursprungs in embryonalen, gewebeständigen Vorläuferzellen oder Monozyten kann in beide Richtungen argumentiert werden:

Einerseits wurde anhand von Parabioseexperimenten gezeigt, dass am Tag 3 nach allo-HSZT die intestinalen Mph noch immer vom ursprünglichen Organismus und nicht vom parabiologischen Partner abstammen (Jordan Garrote, 2014). Zudem exprimieren intestinale Mph während der GvHD zu ca. 70 % Tim4 (T-cell Immunoglobulin and Mucin Domain-containing Protein 4, Le et al., AG Beilhack, Daten bisher unveröffentlicht), welches als

Marker gewebeständiger, sich lokal selbsterneuernder intestinaler Mph-Populationen gilt (Shaw et al., 2018). Der Anteil Tim4<sup>+</sup> Mph lag im *Steady State* bei nur ca. 50 %. Diese Daten sprechen für einen Ursprung der GvHD-protectiven Mph in der intestinalen Mukosa selbst, unabhängig von zirkulierenden und damit auch dem parabiotischen Partner entstammenden Monozyten.

Andererseits gehen wir nach myeloablativer Bestrahlung in hämatopoetischen Zellen von einer reduzierten Proliferationsfähigkeit aus, auch wenn hier Ausnahmen wie bspw. die Mikroglia des ZNS beschrieben sind (Hashimoto et al., 2013). Eine Einwanderung bereits vorliegender oder ausdifferenzierender Monozyten scheint damit plausibler als eine Proliferation der gewebeständigen Stamm- bzw. Vorläuferzellen. Auch erfordert eine Differenzierung in den speziellen Phänotyp eine hohe Flut an Stimuli, denen die gewebeständige Vorläuferzelle in viel niedrigerem Maße ausgesetzt ist als der neu einwandernde Monozyt.

Ganz unabhängig vom Ursprung der GvHD-protectiven Mph lautet jedoch die entscheidende Frage: Was veranlasst die gewebeständige Vorläuferzelle bzw. den entzündlich ausgeschwemmten Empfängermonozyten zur Annahme eines immunsuppressiven Phänotyps? Wo doch in anderen entzündlichen Darmerkrankungen fast ausschließlich proinflammatorische neue Zellpopulationen beschrieben sind (Bain et al., 2012; Platt et al., 2010; Rivollier et al., 2012; Zigmund et al., 2012)? Eine Antwort hierauf wäre nicht nur für die akute GvHD, sondern auch im Gesamtkontext inflammatorischer Darmerkrankungen hochinteressant und relevant.

## 2. Methodische Stärken und Limitationen

### 2.1 Stärken und Limitationen des Mausmodells

Die GvHD ist eine immunologische Systemerkrankung mit hoch komplexer Interaktion zwischen Spender- und Empfängerzellen (Billingham, 1966; Reddy and Ferrara, 2008). Tierwohl-orientierte in-vitro Experimente können zwar wichtige Teilaspekte, jedoch nie die Gesamtheit der Immunmechanismen erfassen. Insbesondere im Bereich der gastrointestinalen GvHD fällt der fein differenzierte Organaufbau des Darms besonders ins Gewicht, für den zumindest zum Zeitpunkt der Experimente keine murinen oder humanen *Tissue Engineering*-Modelle für immunologische Studien existierten und Tierexperimente hätten ersetzen können.

Eine Übertragung unserer Ergebnisse in die Klinik bleibt dennoch eingeschränkt: Zunächst

verwendeten wir als Empfänger stets gesunde Mäuse. Der Patient hingegen ist gezeichnet von einer im Regelfall malignen Erkrankung des hämatopoetischen Systems mit allgemeiner und nicht selten auch gastrointestinaler Beeinträchtigung (Ebert and Hagspiel, 2012). Die Ausgangsbedingungen der allo-HSZT sind damit grundsätzlich unterschiedlich.

Folgende Unterschiede zwischen Maus und Mensch sind darüber hinaus relevant:

Unterschiede des Immunsystems, der Immunzellen und ihrer proportionalen Zusammensetzung (Schroeder and DiPersio, 2011), eine homogene Mausgenetik durch Verwendung von Inzucht-Stämmen (Reddy and Ferrara, 2008; Zeiser and Blazar, 2016) und die meist ebenfalls eher homogene intestinale Flora bei Haltung unter keimreduzierten Bedingungen. Wir messen diesem Faktor große Bedeutung bei, da die kommensale Flora einen großen Einfluss auf die immunologische Prägung der Mononukleären Phagozyten in Homöostase und Inflammation hat (Grainger et al., 2013; Niess and Adler, 2010). Dies ist auch für die gastrointestinale GvHD relevant (Teshima et al., 2016).

Als Prozedere-bezogene Unterschiede zwischen Mausmodell und Patienten sehen wir besonders: die Nicht-Anwendung einer GvHD-Prophylaxe, das Konditionierungsregime mittels einzeitiger, kumulativer Bestrahlung ohne chemotherapeutische Kombination (Zeiser and Blazar, 2016), die adoptive Transfusion und Selektion allogener T-Zellen aus Splenozyten und den Grad des immunologischen Mismatches zwischen Spender und Empfänger: Wir verwendeten hier ein MHC-disparates *Major-Mismatch*-Modell, während im Patienten die akute GvHD bei oft erfolgreichem MHC-Matching insbesondere durch Minorantigene bedingt ist. Jedoch kann dadurch ebenfalls das volle Spektrum der MHC-disparaten GvHD induziert werden (Reddy and Ferrara, 2008).

## 2.2 Limitationen des experimentellen Designs und der Durchführung

Bezüglich des transgenen CD11c.DOG Mausmodells gingen Jung *et al.* bei Erstveröffentlichung nach damaliger Definition von einer reinen Depletion von DC aus (Jung et al., 2002). CD11c ist jedoch auf verschiedenen Zellen, darunter insbesondere verschiedene APC-Populationen inklusive Mph, exprimiert (Hume, 2008). In Anbetracht der unterschiedlichen CD11c<sup>+</sup> Mph-Populationen der intestinalen Mukosa konnten wir von einer weitreichenden APC- und insbesondere Mph-Depletion ausgehen.

Für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung erhielten beide Gruppen, transgene B6.CD11c.DOG-Mäuse und B6-Wildtypmäuse Diphtherietoxin. Nebeneffekte des Toxins auf den klinischen GvHD-Verlauf in Wildtypmäusen ohne Toxinrezeptor fielen in Vorexperimenten nicht auf

(Jordan Garrote, 2014). Für transgene Tiere sind hingegen relevante Nebeneffekte der Toxinanwendung nachgewiesen, insbesondere eine Neutrophilie (Tittel et al., 2012) und/oder Monozytose (van Blijswijk et al., 2013). Diese Populationsverschiebungen werden zurückgeführt auf einen Anstieg von Wachstumsfaktoren durch Wegfall der aufnehmenden mononukleären Phagozyten. Experimentell wurde dies insbesondere gezeigt für die auch GvHD-relevanten (D'Aveni et al., 2015; Highfill et al., 2010) Faktoren Flt-3-Ligand (Birnberg et al., 2008) und G-CSF (Jiao et al., 2014; Sivakumaran et al., 2016). Dass ein sehr kurzfristiges Wachstumsfaktorungleichgewicht auch in unserem Modell Effekte zeigte, ist nicht auszuschließen, aber unwahrscheinlich: Die zusätzliche Population myeloider Zellen (Cluster 10) bildete sich nicht in den transgenen, sondern in Wildtypmäusen, die kein potenzielles Überangebot an Wachstumsfaktoren aufwiesen. Wir konnten die neue Population damit wirklich auf die GvHD selbst und nicht auf die Auswirkungen der Toxinbehandlung zurückführen.

Bezüglich der *CD11c/Itgax*-Expression wunderte, dass in allen drei Mph-Clustern (Cluster 4, 8 und 10) *Itgax*-exprimierende Zellen enthalten waren, die nicht nur aus der Probe *CD11c.präs* stammten. Die Probe *CD11c.depl* hätte nach Protokoll eigentlich keine *CD11c*<sup>+</sup> Zellen mehr enthalten sollen. Jedoch werden erstens durch die *CD11c*<sup>+</sup> Zell-Depletion nur solche Zellen erfasst, die das *CD11c*-Protein bereits in relevanter Menge exprimieren. Es ist daher gut möglich, dass einige Zellen intrazellulär bereits eine hohe *Itgax*-RNA Expression aufwiesen, ohne dass schon *CD11c*-Proteine auf der Zelloberfläche vorhanden waren. Zweitens werden durch die Depletion nicht 100 %, sondern in unseren Händen nur 90 bis 98 % aller *CD11c*<sup>+</sup> Zellen erreicht. Folglich bleiben bis zu 10 % *CD11c*<sup>+</sup> Zellen auch in *CD11c.depl* präsent. Trotz dieser möglichen Fehlerquellen gehen wir in Zusammenschau der Vorexperimente, der parallelen durchflusszytometrischen Kontrollanalysen, die für beide Proben eine passende *CD11c*-Zellzahl nachwies, und der klinischen Verläufe von einer ausreichenden Vertrauenswürdigkeit aus.

Folgende weitere Faktoren hätten das Transkriptomprofil der GvHD-protectiven Mph beeinflussen können: die Bestrahlung, die in verschiedenen Studien relevante Auswirkungen auf die RNA-Expression von Mph hatte (Meng et al., 2010; Teresa Pinto et al., 2016; Wunderlich et al., 2019) und der Stress, der infolge des Versuchsaufbaus von der Tötung der Mäuse bis zur Sequenzierung auf die Zellen eingewirkt hat. Außerdem war die Clustereinteilung auch deutlich von der Zellzyklusphase abhängig (Kiselev et al., 2019), auf

die wir experimentell keinen Einfluss hatten.

Auf technischer Ebene stellt das verwendete *Drop-Seq*-Protokoll eine vergleichsweise kosteneffiziente Methode mit für unsere Zwecke hoher technischer Validität dar (Macosko et al., 2015; Vallejos et al., 2017; Ziegenhain et al., 2017). Die Anzahl der in einem Cluster zusammengefassten Zellen lag jedoch mit bspw. 20 für Cluster 10 bedenklich niedrig (Haque et al., 2017). Auch die Sequenzierungstiefe blieb mit am Oberrand ca. 30 000 detektierten und gemappten RNA Fragmenten weit hinter heute gängigen Techniken zurück. In der statistischen Analyse wurde zur Berechnung der Signifikanz der nicht-adjustierte p-Wert verwendet, der eine hohe Fehleranfälligkeit für multiple Testungen aufweist (Jafari and Ansari-Pour, 2019).

Für die durchflusszytometrischen Analysen sind als Fehlerquellen insbesondere die verwendeten Enzyme von Relevanz, die, wenn auch schonender als Alternativen (Autengruber et al., 2012; Reichard and Asosingh, 2019) auch die Oberflächenproteine der Zelle angreifen können. Außerdem schränken die strategische Hierarchie und manuelle Definition der Gates (Maecker et al., 2012; Mair et al., 2016) die Validität der Ergebnisse ein. Die noch immer kontroverse Diskussion um APC-Populationsdefinitionen, die sich bspw. in der Wertung einer CD103- und CX3CR1-Expression auf intestinalen DC oder Mph zeigt (Cеровic et al., 2013; Schulz et al., 2009; Scott et al., 2015), macht eine eindeutige Aussage zudem schwierig.

### 2.3 Diskussion der Interpretation der Einzelzell-Transkriptomanalyse

Im Gegensatz zur stark untersucherabhängigen Proteomanalyse liegt die Stärke der Einzelzell-RNA-Sequenzierung in der *unsupervised*, also unvoreingenommenen Analyse, rein anhand bioinformatischer Algorithmen und unabhängig von vorab bekannten Populationsdefinitionen. Auf diesem Wege war uns die Subdifferenzierung von Zellpopulationen wie der Cluster 4- und Cluster 10-Mph, oder die Entdeckung bisher unbekannter Eigenschaften wie bspw. von *Thbs1* als möglichen Effektormechanismus möglich (Villani and Satija, 2017). Trotzdem birgt auch die rein bioinformatische Datenauswertung ihre Tücken: Die einzelnen Analyseschritte und Parameter liegen in den gewählten bioinformatischen Programmierpaketen verborgen und sind selbst den durchführenden Bioinformatikern nur schwer zugänglich. Ihre Auswahl aus einem schnell wachsenden, recht jungen und somit wenig validierten Angebot – die erste Einzelzell-RNA-Sequenzierungsstudie wurde 2009 veröffentlicht (Tang et al., 2009) – beeinflusst das

Ergebnis maßgeblich (Kiselev et al., 2019; Stegle et al., 2015): So wurde der vorliegende Datensatz in zwei verschiedenen bioinformatischen Arbeitsgruppen im Abstand von zwei Jahren unabhängig voneinander analysiert. Die Ergebnisse wiesen erhebliche Differenzen auf: Insbesondere zeigte die in dieser Arbeit nicht dargestellte Analyse nicht zwei verschiedene, sondern nur ein einziges Cluster GvHD-protektiver Mph mit entsprechend anderem Expressionsprofil als Cluster 4 und Cluster 10. Je nach Auflösung bzw. Wahl der Grenzwerte wäre eine weitere Subdifferenzierung und damit die Entdeckung einer dritten Mph Population zweifelsfrei möglich gewesen.

Bezüglich der Interpretation der Transkriptomdaten mussten wir uns auf „folklore“ Populationsdefinitionen (Kiselev et al., 2019) verlassen, die oft von der Proteinsignatur abgeleitet waren. Eine objektivere, rein RNA-basierte Zuordnung hätte Transkriptomatlanten wie die „Tabula Muris“ (Hume et al., 2010; Schaum et al., 2018) erfordert. Diese befanden sich zum Zeitpunkt der Arbeit jedoch noch im Aufbau. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht detektierte Schlüsselgene wie *Zbtb46* trotz intensiver Recherche unter anderer Nomenklatur sehr wohl nachweisbar gewesen wären. Und zuletzt sei erwähnt, dass der Hauptteil der signifikant differentiell exprimierten Gene in der Interpretation keine Beachtung fand, da sie entweder bisher kaum beschrieben waren oder keinem funktionellen Bereich zugeordnet werden konnten. Den Rückgriff auf in verschiedenen Publikationen veröffentlichte Transkriptomprofile, Datenbanken und die selektive Literaturrecherche nach einzelnen Genen beurteilen wir als nicht objektiv und höchst anfällig für Verzerrungen und Fehlinterpretationen.

In Zusammenschau der Limitationen der Einzelzellsequenzierung werten wir die detaillierte Charakterisierung der GvHD-suppressiven Mph auf aktuellem Forschungsstand als Hinweis und Grundlage für weitere Experimente. Für eine tiefergehende Validierung sollte zunächst die grundsätzliche Existenz zweier differenter Mph-Populationen auf Protein- und Transkriptomebene, bspw. im *Bulk-Sequencing*-Verfahren, überprüft werden. Eine pauschale Übertragung der Resultate von Protein- auf Transkriptomebene sollte vermieden werden, da erstens die zelluläre Konzentration eines Proteins nur zu ca. 40 % mit der Menge der zugehörigen mRNA korreliert (Powell et al., 2000) und zweitens die gemessene Genexpression nur eine Momentaufnahme darstellt, die wichtige posttranskriptionelle Regulationsmechanismen ausschließt (Vogel and Marcotte, 2012). Anschließend sollten die Resultate vertieft und auf funktioneller Ebene validiert werden.

### 3. Ausblick und klinische Implikationen

Nach den dargestellten Ergebnissen interessieren insbesondere folgenden Fragen: Welche intrinsischen Stimuli induzieren in den neu hinzugekommenen, höchst wahrscheinlich monozytären Zellen (insbesondere Cluster 10) den beobachteten immunsuppressiven Phänotyp? Wie lassen sich die protektiven Populationen expandieren? Und sind sie möglicherweise therapeutisch nutzbar?

#### 3.1 Zur Induktion des antiinflammatorischen GvHD-protaktiven Phänotyps

Zahlreiche Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die intestinale bakterielle Flora einen hohen Einfluss auf die Induktion von GvHD-protaktiven Mph besitzt: Zum einen fördert ein breites bakterielles Spektrum die Anzahl, Diversität und Toleranz intestinaler Mph im Generellen (Kang et al., 2020; Rivollier et al., 2012; Scott et al., 2018; Ueda et al., 2010), zum anderen haben Patienten mit vielen unterschiedlichen Bakterien im Darm auch ein reduziertes Risiko, an einer schweren GvHD zu erkranken (Taur et al., 2014).

Interessanterweise scheinen kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat für beide Effekte, die Induktion eines tolerogenen Mph-Phänotyps und den Schutz vor einer GvHD, relevant zu sein (Chang et al., 2014; Markey et al., 2020; Mathewson et al., 2016; Schulthess et al., 2019; Scott et al., 2018). Die verbindende Hypothese, dass intestinale Mph Haupt- oder Mitvermittler des GvHD-protaktiven Effekts von Butyrat sein könnten, liegt nahe.

Jedoch greift diese Argumentation alleine zu kurz: In der Mehrzahl aller Studien im Feld der akuten entzündlichen Darmerkrankungen kommt es zur klassischer Ausdifferenzierung proinflammatorischer Effektor-APC (Bain et al., 2012; Platt et al., 2010; Rivollier et al., 2012; Zigmund et al., 2012). Die intestinale Flora und ihre Metaboliten wie Butyrat sind in diesen Konstellationen ebenso vorhanden wie in der akuten GvHD. Die Induktion des immunsuppressiven und GvHD-protaktiven Mph-Phänotyps muss also von weiteren, GvHD-spezifischen Faktoren abhängen, die uns bisher unbekannt sind.

#### 3.2 Zur therapeutischen Expansion der GvHD-protaktiven Mph

Bezüglich einer therapeutischen Expansion lieferten unsere Ergebnisse starke Hinweise auf eine CSF-1-Abhängigkeit der GvHD-protaktiven Mph, unabhängig von einer monozytären oder gewebeständig embryonalen Abstammung. Da es nach allo-HSZT zu einem Anstieg der CSF-1-Konzentration in Serum und Leber kommt (Praloran et al., 1990) und wir für CSF-2 als

Wachstumsfaktor der Notfallhämatopoese von einem ähnlichen Anstieg ausgehen, scheinen diese beiden Faktoren als intrinsische Stimuli plausibel. Inwieweit sie jedoch auch in Richtung eines antiinflammatorischen Phänotyps wirken, bleibt fraglich: CSF-1 induziert nicht nur GvHD-protective Mph (Hashimoto et al., 2011), sondern auch Mph-Populationen, die durch ihre profibrotischen Eigenschaften negative Effekte auf die kutane chronische GvHD haben (Alexander et al., 2014). Für CSF-2 sind ähnlich schädliche Effekte beschrieben (Becher et al., 2016; Tugues et al., 2018), andererseits jedoch ebenso protective Effekte im intestinalen System und speziell in Kolitismodellen (Däbritz et al., 2015; Egea et al., 2010; Mortha et al., 2014). Sowohl CSF-1 als auch CSF-2 sollten demnach nur mit Vorsicht zur Stärkung der protectiven Mph in Betracht gezogen werden.

Eine Translation in die Klinik sehen wir jedoch vor allem aus anderen Gründen kritisch: Mit der Gabe hämatologischer Wachstumsfaktoren könnten wir nicht nur GvHD-protective Mph, sondern insbesondere auch die malignen Zellen der hämatologischen Grunderkrankung stärken. Zwar ist die Gabe von rekombinantem CSF-2 (Molgramostim) oder G-CSF (Filgrastim, in unseren Daten keine Rezeptorexpression detektiert) zur Verkürzung der Aplasiephase in der Klinik nicht im Generellen mit einer erhöhten Mortalität oder Rezidivrate assoziiert (Battiwalla and McCarthy, 2009; Khoury et al., 2006; Singhal et al., 1997). Bei lebensbedrohlich erkrankten Patienten das Risiko einer Malignomstärkung einzugehen, scheint jedoch auf aktueller Datenlage unverantwortlich. Da bisher auch keine Studie einen protectiven Einfluss der Wachstumsfaktoren auf das GvHD-Auftreten oder ihren Schweregrad zeigte, bleiben weitere Überlegungen für eine systemische Verabreichung zunächst hinfällig. Auch eine topische Anwendung der Wachstumsfaktoren in der intestinalen Mukosa wäre mit deutlichen pharmakologischen Hürden verbunden, bei oraler Gabe bspw. die Überwindung des enzymreichen, sauren Magenmilieus, die Aufnahme in die geschädigte Mukosa und die Überwindung der Basallamina. Auf intravenösem Wege wäre eine Infusion der Faktoren mit Coating in spezielle Protein-/Lipidhüllen mit Homing in die intestinale Mukosa eine sehr elegante Möglichkeit. Sie bleibt ohne bisherige Evidenz solcher Partikel jedoch Zukunftsmusik.

## Zusammenfassung

Die akute Graft-versus-Host Disease (GvHD) und speziell ihre intestinale Manifestation ist eine schwere Komplikation der allogenen Stammzelltransplantation mit erheblichem Einfluss auf Mortalität und Morbidität der Patienten. Pathophysiologisch stellt sie eine Immunreaktion von Spender-T-Zellen auf Empfängergergewebestrukturen dar. In Versuchsmäusen ist die experimentelle Depletion CD11c<sup>+</sup> Antigen-präsentierender Empfängerzellen in der frühen GvHD-Effektorphase assoziiert mit einem schlechteren klinischen Outcome, einer höheren Dichte alloreaktiver T-Zellen und einer verstärkten Entzündungsreaktion in der intestinalen Mukosa. Ziel der Studie war eine umfassende Charakterisierung und systematische Einordnung der folglich GvHD-protectiven intestinalen CD11c<sup>+</sup> Empfängerzellen.

Bezüglich ihrer Oberflächenproteinsignatur analysierten wir die myeloiden Zellen der intestinalen Mukosa am Tag 6 nach allogener Stammzelltransplantation. Mittels durchflusszytometrischer Analyse und Vergleich zwischen gesunden, allein bestrahlten und GvHD-Mäusen ordneten wir die CD11c<sup>+</sup> Empfängerzellen als Makrophagen ein und schlossen eine Identität als dendritische Zellen aus. In der Immunfluoreszenzmikroskopie wiesen wir ihre Kolokalisation mit allogenen T-Zellen nach und bestätigten darin eine PD-L1 Expression als möglichen T-Zell-Suppressionsmechanismus. Bezüglich ihres Transkriptom führten wir eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung intestinaler hämatopoetischer Empfängerzellen aus CD11c<sup>+</sup> Zell-depletierten und nicht depletierten Mäusen durch. Auf rein bioinformatischer Grundlage wurden die Einzelzellen kombiniert und anhand ihrer Transkriptomprofile in Cluster eingeteilt. Der Vergleich beider Versuchsgruppen offenbarte zwei unterschiedliche präsenzte bzw. depletierte und damit GvHD-protective Zellcluster: Cluster 4 enthielt Zellen mit deutlicher Makrophagensignatur und gewebeprotectivem, antipathogenem Effektorprofil, welches in Kombination mit weiteren Genen ein Kontinuum der in Homöostase vorhandenen Makrophagen nahelegte. Cluster 10 dagegen enthielt Zellen mit immun- und spezifisch T-Zell-suppressivem Effektorprofil, weniger deutlicher Makrophagensignatur und Ähnlichkeit zu myeloiden Suppressorzellen. Somit lieferte die Studie wichtige Hinweise auf einen Mechanismus der GvHD- bzw. T-Zell-Suppression und Gewebeprotectioin in Form von physiologisch vorhandenen bzw. im Laufe der GvHD auftretenden Empfängermakrophagen.

## Summary

Acute Graft-versus-host disease (GvHD) is an immunoreaction of donor T cells against host tissue structures after allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT). Especially intestinal GvHD greatly contributes to the patients' morbidity and mortality. Experimental depletion of CD11c<sup>+</sup> antigen-presenting host cells in the early effector phase of GvHD is associated with a worse clinical outcome, an increase of alloreactive T cell numbers and more severe inflammation in the small intestinal mucosa in mice. In this study we aimed to characterize and systematically classify intestinal CD11c<sup>+</sup> host cell populations protecting from acute GvHD on proteome and transcriptome level.

To address the protein expression signature we analyzed the surface antigens of intestinal CD11c<sup>+</sup> antigen-presenting cells of host mice on day 6 after allo-HCT. By flow cytometric analysis and comparison of healthy, GvHD-, and mice only receiving myeloablative irradiation, we classified the GvHD-protective cells as macrophages and ruled out a dendritic cell identity. Utilizing immunofluorescence microscopy we localized intestinal host macrophages in close contact with allogeneic T cells and confirmed their expression of PD-L1 as possible mechanism of alloreactive T cell suppression. Concerning the transcriptome signature, we performed a single-cell RNA sequencing of host intestinal hematopoietic cells of GvHD-mice with and without CD11c<sup>+</sup> cell depletion. Single cells were combined and clustered by transcriptional profiling based on bioinformatic calculation. In comparison of both groups we detected two different present, respectively depleted and hence GvHD-protective cell populations: Cluster 4 containing tissue-protective and antipathogenic cells with a distinct macrophage signature, suggesting a continuum of steady state's macrophages. And Cluster 10 containing cells with highly immunomodulatory and T cell suppressive capacities, less distinct macrophage signature, and some similar features to myeloid-derived suppressor cells.

This study details the characteristics of host intestinal macrophages that can regulate alloreactive T cells in the small intestinal mucosa, suppress lethal acute GvHD and protect the tissue from inflammatory destruction.

## Literaturverzeichnis

- Alexander, K.A., Flynn, R., Lineburg, K.E., Kuns, R.D., Teal, B.E., Olver, S.D., Lor, M., Raffelt, N.C., Koyama, M., Leveque, L., *et al.* (2014). CSF-1-dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation* 124, 4266-4280.
- Alshetaiwi, H., Pervolarakis, N., McIntyre, L.L., Ma, D., Nguyen, Q., Rath, J.A., Nee, K., Hernandez, G., Evans, K., Torosian, L., *et al.* (2020). Defining the emergence of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer using single-cell transcriptomics. *Science Immunology* 5, eaay6017.
- Autengruber, A., Gereke, M., Hansen, G., Hennig, C., and Bruder, D. (2012). Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2, 112-120.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nature immunology* 15, 929-937.
- Bain, C.C., and Mowat, A.M. (2014a). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological reviews* 260, 102-117.
- Bain, C.C., and Mowat, A.M. (2014b). The monocyte-macrophage axis in the intestine. *Cell Immunol* 291, 41-48.
- Bain, C.C., and Schridde, A. (2018). Origin, Differentiation, and Function of Intestinal Macrophages. *Frontiers in immunology* 9, 2733.
- Bain, C.C., Scott, C.L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Williams, M., Malissen, B., Agace, W.W., and Mowat, A.M. (2012). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal immunology* 6, 498.
- Banovic, T., MacDonald, K.P., Morris, E.S., Rowe, V., Kuns, R., Don, A., Kelly, J., Ledbetter, S., Clouston, A.D., and Hill, G.R. (2005). TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood* 106, 2206-2214.
- Barrett, C.W., Reddy, V.K., Short, S.P., Motley, A.K., Lintel, M.K., Bradley, A.M., Freeman, T., Vallance, J., Ning, W., Parang, B., *et al.* (2015). Selenoprotein P influences colitis-induced tumorigenesis by mediating stemness and oxidative damage. *The Journal of clinical investigation* 125, 2646-2660.
- Battiwalla, M., and McCarthy, P.L. (2009). Filgrastim support in allogeneic HSCT for myeloid malignancies: a review of the role of G-CSF and the implications for current practice. *Bone Marrow Transplantation* 43, 351-356.
- Becher, B., Tugues, S., and Greter, M. (2016). GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity* 45, 963-973.
- Benoit, M.E., Clarke, E.V., Morgado, P., Fraser, D.A., and Tenner, A.J. (2012). Complement protein C1q directs macrophage polarization and limits inflammasome activity during the uptake of apoptotic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 188, 5682-5693.
- Bent, R., Moll, L., Grabbe, S., and Bros, M. (2018). Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? *Int J Mol Sci* 19, 2155.

Billiau, A.D., Fevery, S., Rutgeerts, O., Landuyt, W., and Waer, M. (2003). Transient expansion of Mac1+Ly6-G+Ly6-C+ early myeloid cells with suppressor activity in spleens of murine radiation marrow chimeras: possible implications for the graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactivity of donor lymphocyte infusions. *Blood* *102*, 740-748.

Billingham, R.E. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* *62*, 21-78.

Birnberg, T., Bar-On, L., Sapoznikov, A., Caton, M.L., Cervantes-Barragán, L., Makia, D., Krauthgamer, R., Brenner, O., Ludewig, B., Brockschneider, D., *et al.* (2008). Lack of Conventional Dendritic Cells Is Compatible with Normal Development and T Cell Homeostasis, but Causes Myeloid Proliferative Syndrome. *Immunity* *29*, 986-997.

Blazar, B.R., Carreno, B.M., Panoskaltis-Mortari, A., Carter, L., Iwai, Y., Yagita, H., Nishimura, H., and Taylor, P.A. (2003). Blockade of Programmed Death-1 Engagement Accelerates Graft-Versus-Host Disease Lethality by an IFN- $\gamma$ -Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology* *171*, 1272-1277.

Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., *et al.* (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* *31*, 513-525.

Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J.L., and Maliszewski, C.R. (2000). Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* *96*, 3029-3039.

Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., *et al.* (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications* *7*, 12150.

Brunstein, C.G., Miller, J.S., McKenna, D.H., Hippen, K.L., DeFor, T.E., Sumstad, D., Curtsinger, J., Verneris, M.R., MacMillan, M.L., Levine, B.L., *et al.* (2016). Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood* *127*, 1044-1051.

Cahn, J.-Y., Klein, J.P., Lee, S.J., Milpied, N.I., Blaise, D., Antin, J.H., Leblond, V.r., Ifrah, N., Jouet, J.-P., Loberiza, F., *et al.* (2005). Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* *106*, 1495-1500.

Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M., and Kröger, N. (2019). In *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*, E. Carreras, C. Dufour, M. Mohty, and N. Kröger, eds. (Cham (CH)).

Cerovic, V., Bain, C.C., Mowat, A.M., and Milling, S.W. (2014). Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference? *Trends in immunology* *35*, 270-277.

Cerovic, V., Houston, S.A., Scott, C.L., Aumeunier, A., Yrlid, U., Mowat, A.M., and Milling, S.W. (2013). Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal immunology* *6*, 104-113.

Chang, P.V., Hao, L., Offermanns, S., and Medzhitov, R. (2014). The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *111*, 2247-2252.

Cheroutre, H., Lambolez, F., and Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature reviews Immunology* *11*, 445-456.

Condamine, T., Mastio, J., and Gabrilovich, D.I. (2015). Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Leukocyte Biology* 98, 913-922.

Cooke, K., Kobzik, L., Martin, T., Brewer, J., Delmonte, J.J., Crawford, J., and Ferrara, J. (1996). An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88, 3230-3239.

D'Aveni, M., Notarantonio, A.B., Bertrand, A., Boulangé, L., Pochon, C., and Rubio, M.T. (2020). Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Context of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in immunology* 11.

D'Aveni, M., Rossignol, J., Coman, T., Sivakumaran, S., Henderson, S., Manzo, T., Santos e Sousa, P., Bruneau, J., Fouquet, G., Zavala, F., *et al.* (2015). G-CSF mobilizes CD34+ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* 7, 281ff.

Däbritz, J., Weinhage, T., Varga, G., Wirth, T., Walscheid, K., Brockhausen, A., Schwarzmaier, D., Brückner, M., Ross, M., Bettenworth, D., *et al.* (2015). Reprogramming of Monocytes by GM-CSF Contributes to Regulatory Immune Functions during Intestinal Inflammation. *The Journal of Immunology* 194, 2424-2438.

De Schepper, S., Verheijden, S., Aguilera-Lizarraga, J., Viola, M.F., Boesmans, W., Stakenborg, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., Boeckx, B., Dierckx de Casterle, I., *et al.* (2018). Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell* 175, 400-415.e413.

Dellas, C. *Kurzlehrbuch Pharmakologie*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 150 ff.

Di Benedetto, P., Ruscitti, P., Cipriani, P., and Giacomelli, R. (2020). Haematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis: Challenges and perspectives. *Autoimmunity Reviews* 19, 102662.

Di Ianni, M., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Castellino, F., Bonifacio, E., Del Papa, B., Zei, T., Ostini, R.I., Cecchini, D., *et al.* (2011). Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 117, 3921-3928.

Dinarello, C.A., Simon, A., and van der Meer, J.W. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* 11, 633-652.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)* 29, 15-21.

Ebert, E.C., and Hagspiel, K.D. (2012). Gastrointestinal manifestations of leukemia. *J Gastroenterol Hepatol* 27, 458-463.

Egea, L., Hirata, Y., and Kagnoff, M.F. (2010). GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4, 723-731.

Ertault-Daneshpouy, M., Leboeuf, C., Lemann, M., Bouhidel, F., Ades, L., Gluckman, E., Socié, G.r., and Janin, A. (2004). Pericapillary hemorrhage as criterion of severe human digestive graft-versus-host disease. *Blood* 103, 4681-4684.

Escamilla Gómez, V., García-Gutiérrez, V., López Corral, L., García Cadenas, I., Pérez Martínez, A., Márquez Malaver, F.J., Caballero-Velázquez, T., González Sierra, P.A., Viguria Alegría, M.C., Parra

- Salinas, I.M., *et al.* (2020). Ruxolitinib in refractory acute and chronic graft-versus-host disease: a multicenter survey study. *Bone Marrow Transplantation* 55, 641-648.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation* 101, 890-898.
- Fan, Y., Zhang, J., Cai, L., Wang, S., Liu, C., Zhang, Y., You, L., Fu, Y., Shi, Z., Yin, Z., *et al.* (2014). The effect of anti-inflammatory properties of ferritin light chain on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in murine macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 2775-2783.
- Fang, L.L., Yu, H.Q., Wu, R.J., He, C., Li, M., Yan, H., Li, J.J., Wang, S., Liu, Z.G., Liu, Z.J., *et al.* (2015). Thrombospondin 1 Modulates Monocyte Properties to Suppress Intestinal Mucosal Inflammation. *Journal of innate immunity* 7, 601-611.
- Farache, J., Zigmond, E., Shakhar, G., and Jung, S. (2013). Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunology and cell biology* 91, 232-239.
- Finke, J., Bethge, W.A., Schmoor, C., Ottinger, H.D., Stelljes, M., Zander, A.R., Volin, L., Ruutu, T., Heim, D.A., Schwerdtfeger, R., *et al.* (2009). Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 10, 855-864.
- Fraser, D.A., Bohlsion, S.S., Jasinskiene, N., Rawal, N., Palmarini, G., Ruiz, S., Rochford, R., and Tenner, A.J. (2006). C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *Journal of Leukocyte Biology* 80, 107-116.
- Gabrilovich, D.I. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 5, 3-8.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., *et al.* (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature immunology* 13, 1118-1128.
- Geem, D., Medina-Contreras, O., Kim, W., Huang, C.S., and Denning, T.L. (2012). Isolation and characterization of dendritic cells and macrophages from the mouse intestine. *J Vis Exp*, e4040-e4040.
- Gesinn, S., Hermann, A. (2021). Allogene Stammzelltransplantation - Informationen für Patienten und Angehörige. UKR.
- Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439-449.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature reviews Immunology* 14, 392-404.
- Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C.D., Neiman, P.E., Clift, R.A., Lerner, K.G., and Thomas, E.D. (1974). Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 18, 295-304.

- Grainger, D.J., Reckless, J., and McKilligin, E. (2004). Apolipoprotein E Modulates Clearance of Apoptotic Bodies In Vitro and In Vivo, Resulting in a Systemic Proinflammatory State in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* *173*, 6366-6375.
- Grainger, J.R., Wohlfert, E.A., Fuss, I.J., Bouladoux, N., Askenase, M.H., Legrand, F., Koo, L.Y., Brenchley, J.M., Fraser, I.D.C., and Belkaid, Y. (2013). Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nature Medicine* *19*, 713-721.
- Gross, M., Salame, T.M., and Jung, S. (2015). Guardians of the Gut - Murine Intestinal Macrophages and Dendritic Cells. *Frontiers in immunology* *6*, 254.
- Guilliams, M., Dutertre, C.A., Scott, C.L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Pijck, S., *et al.* (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* *45*, 669-684.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature reviews Immunology* *14*, 571-578.
- Haage, V., Semtner, M., Vidal, R.O., Hernandez, D.P., Pong, W.W., Chen, Z., Hambardzumyan, D., Magrini, V., Ly, A., Walker, J., *et al.* (2019). Comprehensive gene expression meta-analysis identifies signature genes that distinguish microglia from peripheral monocytes/macrophages in health and glioma. *Acta Neuropathologica Communications* *7*, 20.
- Haque, A., Engel, J., Teichmann, S.A., and Lönnberg, T. (2017). A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Med* *9*, 75.
- Hartwell, M.J., Özbek, U., Holler, E., Renteria, A.S., Major-Monfried, H., Reddy, P., Aziz, M., Hogan, W.J., Ayuk, F., Efebera, Y.A., *et al.* (2018). An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival. *JCI Insight* *2*.
- Hashimoto, D., Chow, A., Greter, M., Saenger, Y., Kwan, W.H., Leboeuf, M., Ginhoux, F., Ochando, J.C., Kunisaki, Y., van Rooijen, N., *et al.* (2011). Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *The Journal of experimental medicine* *208*, 1069-1082.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., *et al.* (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* *38*, 792-804.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., and Camaschella, C. (2010). Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* *142*, 24-38.
- Highfill, S.L., Rodriguez, P.C., Zhou, Q., Goetz, C.A., Koehn, B.H., Veenstra, R., Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Serody, J.S., Munn, D.H., *et al.* (2010). Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* *116*, 5738-5747.
- Hill, G.R., and Koyama, M. (2020). Cytokines and costimulation in acute graft-versus-host disease. *Blood* *136*, 418-428.
- Holler, E., Greinix, H., and Zeiser, R. (2019). *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th edition. Chapter 43.

Holtan, S.G., Pasquini, M., and Weisdorf, D.J. (2014). Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. *Blood* 124, 363-373.

Hörber, S., Hildebrand, D.G., Lieb, W.S., Lorscheid, S., Hailfinger, S., Schulze-Osthoff, K., and Essmann, F. (2016). The Atypical Inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\zeta$ , Controls Macrophage Interleukin-10 Expression. *The Journal of biological chemistry* 291, 12851-12861.

Hu, X., Chung, A.Y., Wu, I., Foldi, J., Chen, J., Ji, J.D., Tateya, T., Kang, Y.J., Han, J., Gessler, M., *et al.* (2008). Integrated Regulation of Toll-like Receptor Responses by Notch and Interferon- $\gamma$  Pathways. *Immunity* 29, 691-703.

Hume, D.A. (2008). Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth. *The Journal of Immunology* 181, 5829-5835.

Hume, D.A., Summers, K.M., Raza, S., Baillie, J.K., and Freeman, T.C. (2010). Functional clustering and lineage markers: Insights into cellular differentiation and gene function from large-scale microarray studies of purified primary cell populations. *Genomics* 95, 328-338.

Ibrahim, M.L., Klement, J.D., Lu, C., Redd, P.S., Xiao, W., Yang, D., Browning, D.D., Savage, N.M., Buckhaults, P.J., Morse, H.C., 3rd, *et al.* (2018). Myeloid-Derived Suppressor Cells Produce IL-10 to Elicit DNMT3b-Dependent IRF8 Silencing to Promote Colitis-Associated Colon Tumorigenesis. *Cell Rep* 25, 3036-3046.e3036.

Ihara, S., Hirata, Y., and Koike, K. (2017). TGF- $\beta$  in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *Journal of Gastroenterology* 52, 777-787.

Ishikawa, T.-O., Oshima, M., and Herschman, H.R. (2011). Cox-2 deletion in myeloid and endothelial cells, but not in epithelial cells, exacerbates murine colitis. *Carcinogenesis* 32, 417-426.

Jafari, M., and Ansari-Pour, N. (2019). Why, When and How to Adjust Your P Values? *Cell J* 20, 604-607.

Jiao, J., Dragomir, A.-C., Kocabayoglu, P., Rahman, A.H., Chow, A., Hashimoto, D., Leboeuf, M., Kraus, T., Moran, T., Carrasco-Avino, G., *et al.* (2014). Central role of conventional dendritic cells in regulation of bone marrow release and survival of neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 192, 3374-3382.

Joeris, T., Muller-Luda, K., Agace, W.W., and Mowat, A.M. (2017). Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. *Mucosal immunology* 10, 845-864.

Jordan Garrote, A.-L. (2014). The role of host dendritic cells during the effector phase of intestinal graft-versus-host disease : Die Rolle der dendritischen Zellen in der akuten Graft-versus-Host Reaktion.

Jordão, M.J.C., Sankowski, R., Brendecke, S.M., Sagar, Locatelli, G., Tai, Y.-H., Tay, T.L., Schramm, E., Armbruster, S., Hagemeyer, N., *et al.* (2019). Single-cell profiling identifies myeloid cell subsets with distinct fates during neuroinflammation. *Science* 363, 7554.

Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., *et al.* (2002). In vivo depletion of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells abrogates priming of CD8<sup>+</sup> T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211-220.

Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M.T., Sugita, A., Koganei, K., *et al.* (2008). Unique CD14<sup>+</sup> intestinal macrophages contribute to the

pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- $\gamma$  axis. *The Journal of clinical investigation* *118*, 2269-2280.

Kang, B., Alvarado, L.J., Kim, T., Lehmann, M.L., Cho, H., He, J., Li, P., Kim, B.-H., Larochele, A., and Kelsall, B.L. (2020). Commensal microbiota drive the functional diversification of colon macrophages. *Mucosal immunology* *13*, 216-229.

Karlstetter, M., Walczak, Y., Weigelt, K., Ebert, S., Van den Brulle, J., Schwer, H., Fuchshofer, R., and Langmann, T. (2010). The Novel Activated Microglia/Macrophage WAP Domain Protein, AMWAP, Acts as a Counter-Regulator of Proinflammatory Response. *The Journal of Immunology* *185*, 3379-3390.

Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I.L., and Manz, M.G. (2003). Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* *198*, 305-313.

Khoury, H.J., Loberiza, F.R., Jr., Ringdén, O., Barrett, A.J., Bolwell, B.J., Cahn, J.-Y., Champlin, R.E., Gale, R.P., Hale, G.A., Urbano-Ispizua, A., *et al.* (2006). Impact of posttransplantation G-CSF on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *107*, 1712-1716.

Kiselev, V.Y., Andrews, T.S., and Hemberg, M. (2019). Challenges in unsupervised clustering of single-cell RNA-seq data. *Nature Reviews Genetics* *20*, 273-282.

Koehn, B.H., Apostolova, P., Haverkamp, J.M., Miller, J.S., McCullar, V., Tolar, J., Munn, D.H., Murphy, W.J., Brickey, W.J., Serody, J.S., *et al.* (2015). GVHD-associated, inflammasome-mediated loss of function in adoptively transferred myeloid-derived suppressor cells. *Blood* *126*, 1621-1628.

Koehn, B.H., and Blazar, B.R. (2017). Role of myeloid-derived suppressor cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Leukoc Biol* *102*, 335-341.

Koscsó, B., Gowda, K., Schell, T.D., and Bogunovic, M. (2015). Purification of dendritic cell and macrophage subsets from the normal mouse small intestine. *J Immunol Methods* *421*, 1-13.

Koscsó, B., Kurapati, S., Rodrigues, R.R., Nedjic, J., Gowda, K., Shin, C., Soni, C., Ashraf, A.Z., Purushothaman, I., Palisoc, M., *et al.* (2020). Gut-resident CX3CR1 hi macrophages induce tertiary lymphoid structures and IgA response in situ. *Science Immunology* *5*.

Koyama, M., Cheong, M., Markey, K.A., Gartlan, K.H., Kuns, R.D., Locke, K.R., Lineburg, K.E., Teal, B.E., Leveque-El Mouttie, L., Bunting, M.D., *et al.* (2015). Donor colonic CD103+ dendritic cells determine the severity of acute graft-versus-host disease. *The Journal of experimental medicine* *212*, 1303-1321.

Koyama, M., and Hill, G.R. (2019). The primacy of gastrointestinal tract antigen-presenting cells in lethal graft-versus-host disease. *Blood* *134*, 2139-2148.

Koyama, M., Kuns, R.D., Olver, S.D., Raffelt, N.C., Wilson, Y.A., Don, A.L., Lineburg, K.E., Cheong, M., Robb, R.J., Markey, K.A., *et al.* (2011). Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med* *18*, 135-142.

Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., and Gabrilovich, D.I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology* *37*, 208-220.

Lee, S.H., and Dominguez, R. (2010). Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* *29*, 311-325.

- Léger, C.S., and Nevill, T.J. (2004). Hematopoietic stem cell transplantation: a primer for the primary care physician. *Canadian Medical Association Journal* *170*, 1569-1577.
- Levine, J.E., Braun, T.M., Harris, A.C., Holler, E., Taylor, A., Miller, H., Magenau, J., Weisdorf, D.J., Ho, V.T., Bolaños-Meade, J., *et al.* (2015). A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study. *Lancet Haematol* *2*, e21-29.
- Li, H., Demetris, A.J., McNiff, J., Matte-Martone, C., Tan, H.S., Rothstein, D.M., Lakkis, F.G., and Shlomchik, W.D. (2012). Profound depletion of host conventional dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, and B cells does not prevent graft-versus-host disease induction. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *188*, 3804-3811.
- Liu, X., Yao, M., Li, N., Wang, C., Zheng, Y., and Cao, X. (2008). CaMKII promotes TLR-triggered proinflammatory cytokine and type I interferon production by directly binding and activating TAK1 and IRF3 in macrophages. *Blood* *112*, 4961-4970.
- Lüllmann-Rauch, R., and Asan, E. (2019). *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, 304 ff.
- Lussana, F., Di Ianni, M., and Rambaldi, A. (2017). Tregs: hype or hope for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation* *52*, 1225-1232.
- Lv, M., Zhao, X.S., Hu, Y., Chang, Y.J., Zhao, X.Y., Kong, Y., Zhang, X.H., Xu, L.P., Liu, K.Y., and Huang, X.J. (2015). Monocytic and promyelocytic myeloid-derived suppressor cells may contribute to G-CSF-induced immune tolerance in haplo-identical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol* *90*, 9-16.
- MacDonald, K.P.A., Hill, G.R., and Blazar, B.R. (2017). Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood* *129*, 13-21.
- MacDonald, K.P.A., Palmer, J.S., Cronau, S., Seppanen, E., Olver, S., Raffelt, N.C., Kuns, R., Pettit, A.R., Clouston, A., Wainwright, B., *et al.* (2010). An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* *116*, 3955-3963.
- Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., *et al.* (2015). Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* *161*, 1202-1214.
- Maecker, H.T., McCoy, J.P., and Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature Reviews Immunology* *12*, 191-200.
- Mair, F., Hartmann, F.J., Mrdjen, D., Tosevski, V., Krieg, C., and Becher, B. (2016). The end of gating? An introduction to automated analysis of high dimensional cytometry data. *European journal of immunology* *46*, 34-43.
- Markey, K.A., Kuns, R.D., Browne, D.J., Gartlan, K.H., Robb, R.J., Martins, J.P., Henden, A.S., Minnie, S.A., Cheong, M., Koyama, M., *et al.* (2018). Flt-3L Expansion of Recipient CD8 $\alpha$ (+) Dendritic Cells Deletes Alloreactive Donor T Cells and Represents an Alternative to Posttransplant Cyclophosphamide for the Prevention of GVHD. *Clin Cancer Res* *24*, 1604-1616.
- Markey, K.A., Schluter, J., Gomes, A.L.C., Littmann, E.R., Pickard, A.J., Taylor, B.P., Giardina, P.A., Weber, D., Dai, A., Docampo, M.D., *et al.* (2020). The microbe-derived short-chain fatty acids butyrate and propionate are associated with protection from chronic GVHD. *Blood* *136*, 130-136.

Mathewson, N.D., Jenq, R., Mathew, A.V., Koenigsnecht, M., Hanash, A., Toubai, T., Oravecz-Wilson, K., Wu, S.R., Sun, Y., Rossi, C., *et al.* (2016). Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nature immunology* 17, 505-513.

Matta, B.M., Reichenbach, D.K., Zhang, X., Mathews, L., Koehn, B.H., Dwyer, G.K., Lott, J.M., Uhl, F.M., Pfeifer, D., Feser, C.J., *et al.* (2016). Peri-alloHCT IL-33 administration expands recipient T-regulatory cells that protect mice against acute GVHD. *Blood* 128, 427-439.

McInnes, L., Healy, J., and Melville, J. (2018). Umap: Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction. arXiv preprint arXiv:180203426.

Medina, C., and Radomski, M.W. (2006). Role of Matrix Metalloproteinases in Intestinal Inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318, 933-938.

Meng, Y., Beckett, M.A., Liang, H., Mauceri, H.J., van Rooijen, N., Cohen, K.S., and Weichselbaum, R.R. (2010). Blockade of tumor necrosis factor alpha signaling in tumor-associated macrophages as a radiosensitizing strategy. *Cancer Res* 70, 1534-1543.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology* 31, 563-604.

Meredith, M.M., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Kamphorst, A.O., Schreiber, H.A., Guermonprez, P., Idoyaga, J., Cheong, C., Yao, K.H., Niec, R.E., *et al.* (2012). Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *The Journal of experimental medicine* 209, 1153-1165.

Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jojic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., *et al.* (2012). Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nature immunology* 13, 888-899.

Monaghan, K.L., Zheng, W., Hu, G., and Wan, E.C.K. (2019). Monocytes and Monocyte-Derived Antigen-Presenting Cells Have Distinct Gene Signatures in Experimental Model of Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology* 10.

Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S.P., Belkaid, Y., and Merad, M. (2014). Microbiota-Dependent Crosstalk Between Macrophages and ILC3 Promotes Intestinal Homeostasis. *Science* 343, 1249288.

Mowat, A.M., and Bain, C.C. (2011). Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Journal of innate immunity* 3, 550-564.

Müller, L.P., and Müller-Tidow, C. (2015). The indications for allogeneic stem cell transplantation in myeloid malignancies. *Dtsch Arztebl Int* 112, 262-270.

Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nature immunology* 10, 1178-1184.

Murphy, K.M., Weaver, C. (2017). *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, 222 ff, 356 ff, 514 ff.

Negrin, R.S. (2015). Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia. *Hematology* 2015, 225-230.

Niess, J.H., and Adler, G. (2010). Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *184*, 2026-2037.

Nishiwaki, S., Terakura, S., Ito, M., Goto, T., Seto, A., Watanabe, K., Yanagisawa, M., Imahashi, N., Tsukamoto, S., Shimba, M., *et al.* (2009). Impact of macrophage infiltration of skin lesions on survival after allogeneic stem cell transplantation: a clue to refractory graft-versus-host disease. *Blood* *114*, 3113-3116.

O'Shea, N.R., and Smith, A.M. (2014). Matrix Metalloproteases Role in Bowel Inflammation and Inflammatory Bowel Disease: An Up to Date Review. *Inflammatory Bowel Diseases* *20*, 2379-2393.

Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*, a000034-a000034.

Okano, S., Abu-Elmagd, K., Fairchild, R.L., Fujiki, M., Khanna, A., Osman, M., Costa, G., Miller, C., and Hashimoto, K. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Intestinal Transplant Patients and Suppress Anti-Donor T-Cell Responses to Donor Epithelial Stem Cells. *Transplantation* *101*.

Pai, S.-Y. (2019). Treatment of primary immunodeficiency with allogeneic transplant and gene therapy. *Hematology* *2019*, 457-465.

Panea, C., Farkas, A.M., Goto, Y., Abdollahi-Roodsaz, S., Lee, C., Koscsó, B., Gowda, K., Hohl, T.M., Bogunovic, M., and Ivanov, II (2015). Intestinal Monocyte-Derived Macrophages Control Commensal-Specific Th17 Responses. *Cell Rep* *12*, 1314-1324.

Pereira, C., Schaer, D.J., Bachli, E.B., Kurrer, M.O., and Schoedon, G. (2008). Wnt5A/CaMKII Signaling Contributes to the Inflammatory Response of Macrophages and Is a Target for the Antiinflammatory Action of Activated Protein C and Interleukin-10. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *28*, 504-510.

Platt, A.M., Bain, C.C., Bordon, Y., Sester, D.P., and Mowat, A.M. (2010). An Independent Subset of TLR Expressing CCR2-Dependent Macrophages Promotes Colonic Inflammation. *The Journal of Immunology* *184*, 6843-6854.

Powell, M.J., Thompson, S.A.J., Tone, Y., Waldmann, H., and Tone, M. (2000). Posttranscriptional Regulation of IL-10 Gene Expression Through Sequences in the 3'-Untranslated Region. *The Journal of Immunology* *165*, 292-296.

Praloran, V., Raventos-Suarez, C., Bartocci, A., Lucas, J., Stanley, E.R., and Gibbons, J.J., Jr. (1990). Alterations in the expression of colony-stimulating factor-1 and its receptor during an acute graft-vs-host reaction in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *145*, 3256-3261.

Qualls, J.E., Kaplan, A.M., Van Rooijen, N., and Cohen, D.A. (2006). Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *Journal of Leukocyte Biology* *80*, 802-815.

Reddy, P., and Ferrara, J.L.M. (2008). Mouse models of graft-versus-host disease. In *StemBook* (Cambridge (MA)).

Reddy, P., Negrin, R., and Hill, G.R. (2008). Mouse models of bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* *14*, 129-135.

Reichard, A., and Asosingh, K. (2019). Best Practices for Preparing a Single Cell Suspension from Solid Tissues for Flow Cytometry. *Cytometry Part A* *95*, 219-226.

- Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., and Kelsall, B.L. (2012). Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *The Journal of experimental medicine* 209, 139-155.
- Rocha, V., Wagner, J.E., Sobocinski, K.A., Klein, J.P., Zhang, M.-J., Horowitz, M.M., and Gluckman, E. (2000). Graft-Versus-Host Disease in Children Who Have Received a Cord-Blood or Bone Marrow Transplant from an HLA-Identical Sibling. *New England Journal of Medicine* 342, 1846-1854.
- Roederer, M. (2001). Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 45, 194-205.
- Rowlings, P.A., Przepiorka, D., Klein, J.P., Gale, R.P., Passweg, J.R., Henslee-Downey, P.J., Cahn, J.Y., Calderwood, S., Gratwohl, A., Socié, G., *et al.* (1997). IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol* 97, 855-864.
- Saban, D.R., Bock, F., Chauhan, S.K., Masli, S., and Dana, R. (2010). Thrombospondin-1 Derived from APCs Regulates Their Capacity for Allosensitization. *The Journal of Immunology* 185, 4691-4697.
- Schaum, N., Karkanas, J., Neff, N.F., May, A.P., Quake, S.R., Wyss-Coray, T., Darmanis, S., Batson, J., Botvinnik, O., Chen, M.B., *et al.* (2018). Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature* 562, 367-372.
- Schridde, A., Bain, C.C., Mayer, J.U., Montgomery, J., Pollet, E., Denecke, B., Milling, S.W.F., Jenkins, S.J., Dalod, M., Henri, S., *et al.* (2017). Tissue-specific differentiation of colonic macrophages requires TGF $\beta$  receptor-mediated signaling. *Mucosal immunology* 10, 1387-1399.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* 140, 821-832.
- Schroeder, M.A., and DiPersio, J.F. (2011). Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Disease Models & Mechanisms* 4, 318-333.
- Schulthess, J., Pandey, S., Capitani, M., Rue-Albrecht, K.C., Arnold, I., Franchini, F., Chomka, A., Ilott, N.E., Johnston, D.G.W., Pires, E., *et al.* (2019). The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity* 50, 432-445.e437.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *The Journal of experimental medicine* 206, 3101-3114.
- Scott, C.L., Bain, C.C., Wright, P.B., Sichien, D., Kotarsky, K., Persson, E.K., Luda, K., Guilliams, M., Lambrecht, B.N., Agace, W.W., *et al.* (2015). CCR2(+)CD103(-) intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells. *Mucosal immunology* 8, 327-339.
- Scott, N.A., Andrusaite, A., Andersen, P., Lawson, M., Alcon-Giner, C., Leclaire, C., Caim, S., Le Gall, G., Shaw, T., Connolly, J.P.R., *et al.* (2018). Antibiotics induce sustained dysregulation of intestinal T cell immunity by perturbing macrophage homeostasis. *Science Translational Medicine* 10, eaao4755.
- Shaw, T.N., Houston, S.A., Wemyss, K., Bridgeman, H.M., Barbera, T.A., Zangerle-Murray, T., Strangward, P., Ridley, A.J.L., Wang, P., Tamoutounour, S., *et al.* (2018). Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *The Journal of experimental medicine* 215, 1507-1518.

Shi, G.-P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K.J., Riese, R., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (1999). Cathepsin S Required for Normal MHC Class II Peptide Loading and Germinal Center Development. *Immunity* *10*, 197-206.

Shi, G., Abbott, K.N., Wu, W., Salter, R.D., and Keyel, P.A. (2017). Dnase1L3 Regulates Inflammasome-Dependent Cytokine Secretion. *Frontiers in immunology* *8*.

Shiratsuchi, M., Motomura, S., Abe, Y., Shiokawa, S., and Nishimura, J. (2008). Long-term follow-up after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* *27*, 1207-1209.

Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., and Emerson, S.G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* *285*, 412-415.

Sichien, D., Lambrecht, B.N., Guilliams, M., and Scott, C.L. (2017). Development of conventional dendritic cells: from common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal immunology* *10*, 831-844.

Singhal, S., Powles, R., Treleaven, J., Horton, C., and Mehta, J. (1997). Long-term safety of GM-CSF (molgramostim) administration after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic malignancies: five-year follow-up of a double-blind randomized placebo-controlled study. *Leuk Lymphoma* *24*, 301-307.

Sivakumaran, S., Henderson, S., Ward, S., Sousa, P.S.E., Manzo, T., Zhang, L., Conlan, T., Means, T.K., D'Aveni, M., Hermine, O., *et al.* (2016). Depletion of CD11c<sup>+</sup> cells in the CD11c.DTR model drives expansion of unique CD64<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> monocytes that are poised to release TNF- $\alpha$ . *European journal of immunology* *46*, 192-203.

Smythies, L.E., Sellers, M., Clements, R.H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W.H., Orenstein, J.M., and Smith, P.D. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *The Journal of clinical investigation* *115*, 66-75.

Snowden, J.A., Badoglio, M., Labopin, M., Giebel, S., McGrath, E., Marjanovic, Z., Burman, J., Moore, J., Rovira, M., Wulffraat, N.M., *et al.* (2017). Evolution, trends, outcomes, and economics of hematopoietic stem cell transplantation in severe autoimmune diseases. *Blood Advances* *1*, 2742-2755.

Stegle, O., Teichmann, S.A., and Marioni, J.C. (2015). Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nat Rev Genet* *16*, 133-145.

Swart, J.F., Delemarre, E.M., van Wijk, F., Boelens, J.-J., Kuball, J., van Laar, J.M., and Wulffraat, N.M. (2017). Haematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Nature Reviews Rheumatology* *13*, 244-256.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* *140*, 805-820.

Tamoutounour, S., Henri, S., Lelouard, H., de Bovis, B., de Haar, C., van der Woude, C.J., Woltman, A.M., Reyat, Y., Bonnet, D., Sichien, D., *et al.* (2012). CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *European journal of immunology* *42*, 3150-3166.

- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B.B., Siddiqui, A., *et al.* (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature methods* *6*, 377-382.
- Taur, Y., Jenq, R.R., Perales, M.-A., Littmann, E.R., Morjaria, S., Ling, L., No, D., Gobourne, A., Viale, A., Dahi, P.B., *et al.* (2014). The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *124*, 1174-1182.
- Terakura, S., Martin, P.J., Shulman, H.M., and Storer, B.E. (2015). Cutaneous macrophage infiltration in acute GvHD. *Bone Marrow Transplantation* *50*, 1135-1137.
- Teresa Pinto, A., Laranjeiro Pinto, M., Patrícia Cardoso, A., Monteiro, C., Teixeira Pinto, M., Filipe Maia, A., Castro, P., Figueira, R., Monteiro, A., Marques, M., *et al.* (2016). Ionizing radiation modulates human macrophages towards a pro-inflammatory phenotype preserving their pro-invasive and pro-angiogenic capacities. *Sci Rep* *6*, 18765.
- Teshima, T., Reddy, P., and Zeiser, R. (2016). Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* *22*, 11-16.
- Tian, Y., Kelemen, S.E., and Autieri, M.V. (2006). Inhibition of AIF-1 expression by constitutive siRNA expression reduces macrophage migration, proliferation, and signal transduction initiated by atherogenic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol* *290*, C1083-1091.
- Tittel, A.P., Heuser, C., Ohliger, C., Llanto, C., Yona, S., Hämmerling, G.J., Engel, D.R., Garbi, N., and Kurts, C. (2012). Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice. *Nature methods* *9*, 385-390.
- Totzke, G., Essmann, F., Pohlmann, S., Lindenblatt, C., Jänicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2006). A novel member of the I $\kappa$ B family, human I $\kappa$ B-zeta, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding. *The Journal of biological chemistry* *281*, 12645-12654.
- Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., and Charo, I.F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation* *117*, 902-909.
- Tugues, S., Amorim, A., Spath, S., Martin-Blondel, G., Schreiner, B., De Feo, D., Lutz, M., Guscetti, F., Apostolova, P., Haftmann, C., *et al.* (2018). Graft-versus-host disease, but not graft-versus-leukemia immunity, is mediated by GM-CSF-licensed myeloid cells. *Science Translational Medicine* *10*, eaat8410.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* *1824*, 68-88.
- Tussiwand, R., and Gautier, E.L. (2015). Transcriptional Regulation of Mononuclear Phagocyte Development. *Frontiers in immunology* *6*, 533.
- Ueda, Y., Kayama, H., Jeon, S.G., Kusu, T., Isaka, Y., Rakugi, H., Yamamoto, M., and Takeda, K. (2010). Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *Int Immunol* *22*, 953-962.
- Vallejos, C.A., Risso, D., Scialdone, A., Dudoit, S., and Marioni, J.C. (2017). Normalizing single-cell RNA sequencing data: challenges and opportunities. *Nature methods* *14*, 565-571.

- van Blijswijk, J., Schraml, B.U., and Sousa, C.R.e. (2013). Advantages and limitations of mouse models to deplete dendritic cells. *European journal of immunology* *43*, 22-26.
- Varol, C., Zigmund, E., and Jung, S. (2010). Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nature reviews Immunology* *10*, 415-426.
- Veglia, F., Sanseviero, E., and Gabrilovich, D.I. (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nature Reviews Immunology* *21*, 485-498.
- Vendramin, A., Gimondi, S., Bermema, A., Longoni, P., Rizzitano, S., Corradini, P., and Carniti, C. (2014). Graft Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell Content Predicts the Risk of Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Transplantation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Mobilized Peripheral Blood Stem Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* *20*, 2049-2055.
- Villani, A.C., and Satija, R. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *356*.
- Vinay, D.S., Ryan, E.P., Pawelec, G., Talib, W.H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W.K., Whelan, R.L., Kumara, H.M.C.S., *et al.* (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology* *35*, S185-S198.
- Vogel, C., and Marcotte, E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* *13*, 227-232.
- Wang, D., Yu, Y., Haarberg, K., Fu, J., Kaosaard, K., Nagaraj, S., Anasetti, C., Gabrilovich, D., and Yu, X.-Z. (2013). Dynamic change and impact of myeloid-derived suppressor cells in allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* *19*, 692-702.
- Watano, K., Iwabuchi, K., Fujii, S., Ishimori, N., Mitsuhashi, S., Ato, M., Kitabatake, A., and Onoé, K. (2001). Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line. *Immunology* *104*, 307-316.
- Weber, B., Saurer, L., Schenk, M., Dickgreber, N., and Mueller, C. (2011). CX3CR1 defines functionally distinct intestinal mononuclear phagocyte subsets which maintain their respective functions during homeostatic and inflammatory conditions. *European journal of immunology* *41*, 773-779.
- Weber, M., Rudolph, B., Stein, P., Yogeve, N., Bosmann, M., Schild, H., and Radsak, M.P. (2014). Host-derived CD8<sup>+</sup> dendritic cells protect against acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* *20*, 1696-1704.
- Wolff, D., Ayuk, F., Elmaagacli, A., Bertz, H., Lawitschka, A., Schleuning, M., Meyer, R.-G., Gerbitz, A., Hilgendorf, I., Hildebrandt, G.C., *et al.* (2013). Current Practice in Diagnosis and Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Results from a Survey among German-Austrian-Swiss Hematopoietic Stem Cell Transplant Centers. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* *19*, 767-776.
- Wunderlich, R., Rühle, P.F., Deloch, L., Rödel, F., Fietkau, R., Gaipl, U.S., and Frey, B. (2019). Ionizing radiation reduces the capacity of activated macrophages to induce T-cell proliferation, but does not trigger dendritic cell-mediated non-targeted effects. *International Journal of Radiation Biology* *95*, 33-43.
- Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., *et al.* (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B $\zeta$ . *Nature* *430*, 218-222.

- Yang, Z.F., Ho, D.W., Lau, C.K., Lam, C.T., Lum, C.T., Poon, R.T.P., and Fan, S.T. (2005). Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. *International Immunology* 17, 1391-1397.
- Zeiser, R. (2019). Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology* 187, 563-572.
- Zeiser, R., and Blazar, B.R. (2016). Preclinical models of acute and chronic graft-versus-host disease: how predictive are they for a successful clinical translation? *Blood* 127, 3117-3126.
- Zeiser, R., and Blazar, B.R. (2017). Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med* 377, 2167-2179.
- Zeiser, R., Dreger, P., Finke, J., Greinix, H., Holler, E., Luft, T., Mielke, S., Scheid, C., and Wolff, D. (2016). Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Hämatopoetische Stammzelltransplantation und Zelluläre Therapie e V
- Zeiser, R., von Bubnoff, N., Butler, J., Mohty, M., Niederwieser, D., Or, R., Szer, J., Wagner, E.M., Zuckerman, T., Mahuzier, B., *et al.* (2020). Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med* 382, 1800-1810.
- Zhang, J., Chen, H.-M., Ma, G., Zhou, Z., Raulet, D., Rivera, A.L., Chen, S.-H., and Pan, P.-Y. (2019). The mechanistic study behind suppression of GVHD while retaining GVL activities by myeloid-derived suppressor cells. *Leukemia* 33, 2078-2089.
- Ziegenhain, C., Vieth, B., Parekh, S., Reinius, B., Guillaumet-Adkins, A., Smets, M., Leonhardt, H., Heyn, H., Hellmann, I., and Enard, W. (2017). Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Molecular Cell* 65, 631-643.e634.
- Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliyah, E., Satpathy, A.T., Friedlander, G., Mack, M., Shpigel, N., Boneca, I.G., Murphy, K.M., *et al.* (2012). Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* 37, 1076-1090.

## Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Droplet-Sequencing-Verfahrens (Macosko et al., 2015).....	32
Abbildung 2: Verteilung der Kennmesswerte für CD11c.präs und CD11c.depl.....	34
Abbildung 3: Schematischer Versuchsaufbau bis zur durchflusszytometrischen Analyse der APC in der murinen intestinalen Mukosa .....	37
Abbildung 4: Strategie zur durchflusszytometrischen Auswahl der hämatopoetischen Empfängerzellen (CD45.2 <sup>+</sup> ) in der intestinalen Mukosa .....	38
Abbildung 5: Quantifizierung der DC in der intestinalen Mukosa .....	40
Abbildung 6: Quantifizierung der Mph in der intestinalen Mukosa .....	42
Abbildung 7: Kolokalisation von Empfänger-APC und/oder -Mph mit Spenderzellen in der intestinalen Mukosa .....	44
Abbildung 8: CD16/32-Expression auf Empfänger-Mph und anderen Zellen der intestinalen Mukosa nach allo-HSZT im Vergleich zu Mph unbehandelter Mäuse .....	46
Abbildung 9: Kolokalisation von CD16/32 <sup>+</sup> Empfänger-APC in Kontakt mit Spenderzellen in der intestinalen Mukosa .....	47
Abbildung 10: CD115-Expression auf Empfänger-„Mph“ und anderen Zellen der intestinalen Mukosa nach allo-HSZT im Vergleich zu „Mph“ unbehandelter Mäuse.....	48
Abbildung 11: PD-L1-Expression auf Empfänger-Mph und anderen Zellen der intestinalen Mukosa nach allo-HSZT im Vergleich zu Mph unbehandelter Mäuse .....	50
Abbildung 12: PD-L1 <sup>+</sup> intestinale APC in engem Kontakt mit allogenen T-Zellen.....	51
Abbildung 13: Schematischer Versuchsaufbau zur Einzelzell-RNA-Sequenzierung .....	54
Abbildung 14: Einteilung der RNA-sequenzierten Einzelzellen in zwölf Cluster mit Lokalisation der APC in Cluster 4, 8 und 10 .....	56
Abbildung 15: Lokalisation der GvHD-protektiven APC in Cluster 4 und 10.....	57
Abbildung 16: Expression von Itgax (CD11c) im kombinierten Datensatz.....	59
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Vergleichsebenen am Beispiel Cluster 4.....	60
Abbildung 18: Expression der DC-Signaturgene Dpp4 (CD26) und Itgae (Integrin- $\alpha$ E) in den verschiedenen Clustern.....	61

Abbildung 19: Expression wichtiger Mph-Signaturgene in den verschiedenen Clustern.....	62
Abbildung 20: Fokussierter Vergleich von Cluster 4 und Cluster 10.....	64
Abbildung 21: Expression selektierter Gene mit immunsuppressiver Effektorfunktion in den verschiedenen Clustern.....	68
Abbildung 22: Expression wichtiger ontogenetischer Marker intestinaler Mph in den verschiedenen Clustern.....	73

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Modifizierter klinischer Score der akuten GvHD nach Cooke et al. 1996 [27].....	24
Tabelle 2: Für Immunfluoreszenzmikroskopie verwendete Primär- und definitive Antikörper .....	26
Tabelle 3: Für Immunfluoreszenzmikroskopie verwendete Sekundärantikörper .....	26
Tabelle 4: Für die Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung verwendete Antikörper .....	30
Tabelle 5: Gene des Bereichs Effektorfunktionen und ihre differentielle Expression in Cluster 4 und 10.....	66
Tabelle 6: Gene des Bereichs Signaltransduktion und ihre differentielle Expression in Cluster 4 und 10.....	69
Tabelle 7: Sonstige Gene und ihre differentielle Expression in Cluster 4 und 10.....	70

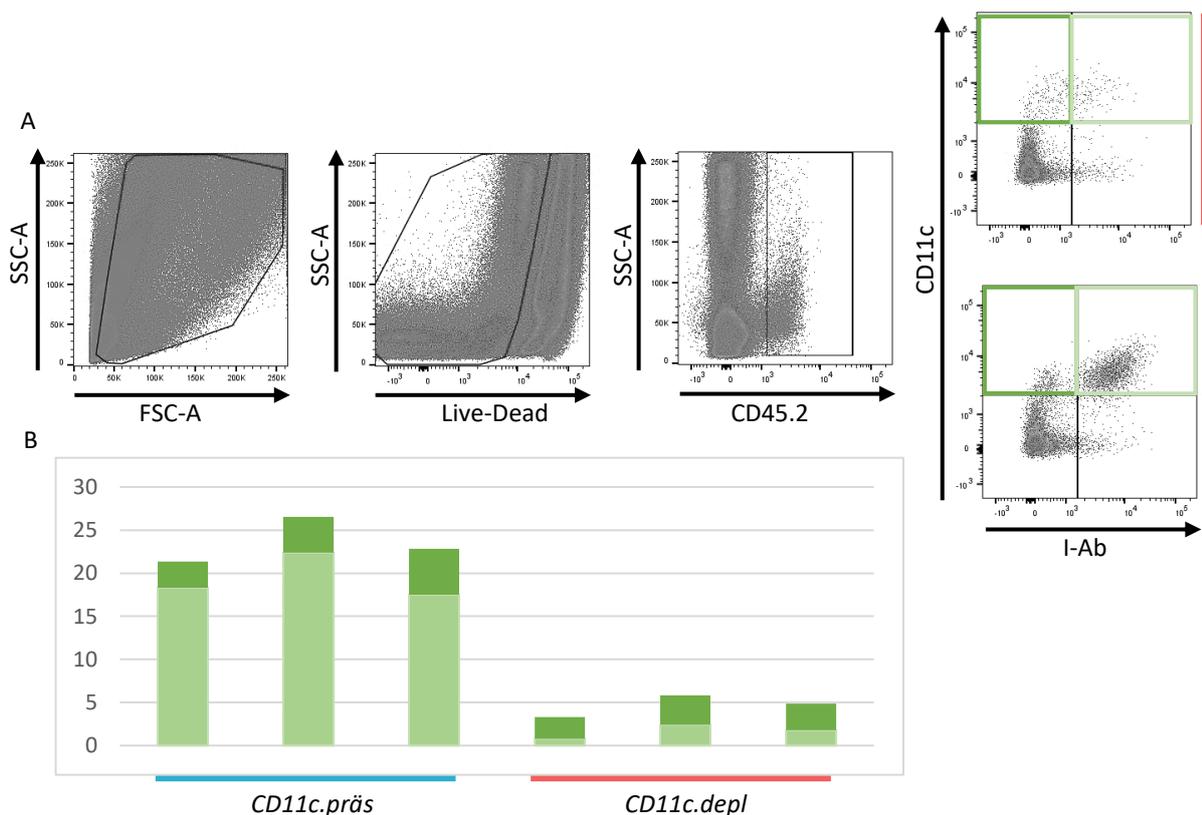
## Weitere Abbildungen und Tabellen

### **Abbildung A1: Bestätigung der Depletion $CD11c^+$ Zellen für die Einzelzell-RNA-Sequenzierungs-Analyse**

Durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspensionen der intestinalen Mukosa der je drei Mäuse der Versuchsgruppen  $CD11c.depl$  (rot) und  $CD11c.präs$  (blau).

A) Repräsentative Punktdiagramme je einer Maus der Versuchsgruppen. Gatingstrategie ähnlich wie in Abbildung 4: 1. Selektion der Zellen, Ausschluss von Debris, 2. Selektion lebendiger Zellen, Ausschluss toter Zellen, 3. Selektion der  $CD45.2^+$  Zellen. 4. Analyse der  $CD11c$ - und  $I$ -Ab-Expression in den hämatopoetischen Empfängerzellen ( $CD45.2^+$ ): oben exemplarisch für eine  $CD11c.depl$ -Maus (rot), unten für eine  $CD11c.präs$ -Maus (blau).

B) Säulendiagramm zur Darstellung des Depletionserfolgs: Pro Maus (Säulen) sind die Prozentwerte der  $CD11c^+$  Zellen in der intestinalen Mukosa gezeigt, aufgespalten in  $CD11c^+I$ -Ab<sup>+</sup> (APC, hellgrün) und  $CD11c^+I$ -Ab<sup>-</sup> (dunkelgrün), als Anteil an allen  $CD45.2^+$  Zellen.





**Tabelle A1: Vollständige Tabellen aller hochregulierten Gene von Cluster 4 und Cluster 10 der globalen Analyse**

Aufgeführt sind alle Gene, die im jeweiligen Cluster im Vergleich zur Gesamtheit aller übrigen Zellen signifikant hochreguliert waren. Signifikanzniveau  $p < 0,01$  gemessen an der Fold-Change.

*avg\_logFC*: durchschnittliche Expression im entsprechenden Cluster im Vergleich zur Expression in der Gesamtheit der übrigen Zellen, ausgedrückt als durchschnittliche relative Änderung (engl. fold change/ FC) im natürlichen Logarithmus (*avg\_logFC*).

*p\_val*: p-Wert: Wahrscheinlichkeit, mit dem die differentielle Expression durch Zufall bedingt ist (Signifikanzniveau:  $p < 0,01$ )

*pct.1* und *pct.2*: Anteil der Zellen, in dem das Gen im betreffenden Cluster (*pct.1*) im Vergleich zur Gesamtheit der übrigen Zellen (*pct.2*) überhaupt detektiert wurde.

**Cluster 4**

<i>Symbol</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_logFC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>
Apoe	3.07791327202089e-82	3.15018073306371	1	0.185
Cd74	1.24088205708671e-78	3.11849759528383	1	0.147
H2-Ab1	6.30237085243674e-71	2.51149716286798	1	0.097
H2-Aa	1.05418957896291e-68	2.36789711090766	0.968	0.088
C1qb	3.159721563595e-66	2.03784315876037	1	0.087
C1qa	5.73279609393631e-64	2.02903833067326	1	0.098
Ftl1	1.16603929128936e-86	2.02429486803082	1	0.799
Wfdc17	1.85482284332709e-49	2.00984995269087	0.935	0.103
Aif1	1.88492732149939e-65	1.9260934811537	0.968	0.078
H2-Eb1	3.92206567442514e-57	1.91286571133598	0.935	0.071
C1qc	1.02686934084745e-61	1.894700028381	0.984	0.087
Ctss	2.29612756024118e-64	1.85123528632843	0.984	0.204
Ccl24	4.09808322810627e-47	1.73750986789749	0.855	0.065
Tyrobp	3.1500382913008e-51	1.49790887984102	0.984	0.302
Lyz2	1.15060021704603e-50	1.48377011976296	0.952	0.09
Fth1	1.35052677024217e-54	1.43656394175876	1	0.856
Psap	2.09501889154189e-43	1.39932767986293	0.935	0.21
Svbp	1.39558227852381e-44	1.32941049508969	0.806	0.137
Acp5	3.91303556900574e-46	1.29459751339657	0.919	0.161
Sat1	2.61274649181286e-42	1.29459067197725	0.887	0.166
Cd81	3.05617747714907e-53	1.26074469755851	0.855	0.05
Lgmn	1.56840274352968e-40	1.24242013131527	0.774	0.053
Ms4a7	2.34516695799825e-48	1.2032309645293	0.79	0.034
Ccl8	1.78587752550348e-27	1.20156577097353	0.548	0.033
Cd63	8.57648988410351e-40	1.1885934646689	0.774	0.052
Fcer1g	8.54704338882606e-34	1.17517637706052	1	0.607
Lst1	7.62077572255694e-45	1.14013025816136	0.839	0.068
Ctsb	2.73758155346733e-29	1.08090157267224	0.806	0.25
Ctsz	1.47100109441773e-34	1.0677290441157	0.806	0.12
Selenop	1.51455121537228e-37	1.057756605049	0.661	0.039
Clec4n	6.59734936074329e-41	1.03566942767443	0.758	0.044
H2-DMb1	1.53238315638141e-46	1.02644984241988	0.806	0.042

Ifitm2	2.71620223360057e-34	1.01093420053971	0.774	0.08
Tmsb4x	1.5319973752731e-27	1.00104633309752	1	0.993
Npl	1.49514698511951e-39	0.992431118585615	0.677	0.029
H2-DMA	2.64262079575707e-34	0.974715671099661	0.71	0.075
Lgals3	3.37050556423751e-20	0.963880877437758	0.661	0.208
Gng5	2.04308521837628e-31	0.890484342037801	0.903	0.41
Ctsh	2.09754598473482e-27	0.878131601027746	0.597	0.049
Gm2a	4.50086271398212e-29	0.874859024134721	0.71	0.121
Pla2g7	4.03425811105774e-39	0.874541293307825	0.71	0.034
Fcgr3	3.56810931628078e-28	0.86447536490666	0.677	0.071
Gnl2	2.14726184893848e-32	0.847529149615413	0.597	0.033
Pf4	8.39587207322944e-36	0.814836498726634	0.613	0.02
Cd68	3.79469571503253e-37	0.811937342061112	0.694	0.037
Tspan13	2.89202445614065e-26	0.810290401620009	0.71	0.144
Ecm1	4.59320963892865e-28	0.805157655075733	0.581	0.042
Ifitm3	7.33254470400492e-19	0.799435584643434	0.565	0.079
Apol7c	7.30715501911827e-26	0.769924130956186	0.516	0.027
Cstb	1.53511546707781e-19	0.763164085898467	0.742	0.242
Gabarap	2.61075911461251e-21	0.762706319510144	0.774	0.336
Ms4a6c	3.09735423485804e-33	0.749969516426641	0.661	0.041
Prdx5	1.19948512035184e-17	0.749457002534839	0.758	0.312
Cst3	6.92098124078622e-18	0.7436650267891	0.726	0.303
Atox1	6.82530582362258e-19	0.724148816804899	0.806	0.41
Cyba	1.42235676438676e-19	0.722201640638844	0.903	0.604
Npc2	1.16071782010771e-17	0.697299618971621	0.629	0.264
Rgs10	3.56267139242201e-19	0.69159621376715	0.548	0.112
Ms4a6d	3.15017438673725e-23	0.668139498179009	0.532	0.05
Cxcl16	2.62816990506145e-25	0.665351327036609	0.5	0.024
Atp6v1g1	1.64452944900272e-16	0.660250514422573	0.758	0.361
Vamp8	1.03993893108553e-17	0.630445836292474	0.774	0.288
Dnase1l3	2.64947375965942e-26	0.620511449189755	0.565	0.038
Mt1	8.81132327017163e-14	0.619733019698971	0.629	0.166
Cd9	2.85249809094955e-20	0.602781797354633	0.565	0.073
Csf1r	1.09357559507968e-19	0.597707087096056	0.435	0.029
Ly86	1.03631613658794e-20	0.589068273989653	0.435	0.026
Lamp1	1.25399512913316e-14	0.5884893221807	0.516	0.11
Cfl1	3.60568504868332e-16	0.586694214455018	0.984	0.846
Unc93b1	7.0074606162433e-22	0.579469698597854	0.516	0.048
Prdx1	2.05769665173421e-13	0.577673037789041	0.839	0.514
Clec4a2	2.10101662518639e-33	0.570225280646987	0.532	0.011
H3f3a	2.47016339246829e-13	0.563757784192488	0.758	0.457
Cd300c2	1.31252638031157e-23	0.547632957618393	0.484	0.029
Serf2	1.61749216010832e-15	0.540720753431248	0.984	0.857
Ctsc	1.14816132911807e-11	0.53490681716637	0.597	0.21
Itm2b	2.19437563652967e-11	0.533301273729738	0.919	0.782
Il18bp	3.60678987048135e-20	0.528137440710242	0.435	0.029
Spi1	1.88870112232242e-20	0.524255269609331	0.484	0.039
Cox8a	5.80337184097027e-13	0.513080044207797	0.919	0.761
Atpif1	2.35581023471827e-09	0.512092733599448	0.613	0.317
Sem1	3.56858375512676e-10	0.51179791358493	0.823	0.563
Ifi272a	8.27744906446638e-09	0.500830015210935	0.661	0.28
Anxa5	1.37977122209196e-12	0.493835801709787	0.452	0.107
Gngt2	2.88230298005068e-09	0.493378031044892	0.645	0.381
Atp5l	5.66102215476579e-11	0.492993932710997	0.887	0.77
Tmem256	3.5469160460141e-11	0.491734645301162	0.677	0.322
Cox6b1	5.95753481625487e-09	0.478905248898354	0.839	0.623
Cd52	4.58524990742287e-10	0.476744978509991	0.935	0.869
Pfn1	4.15394240341444e-11	0.474728954897948	1	0.973
Clec1b	1.25976014138731e-22	0.465120307059165	0.419	0.015
Myl6	2.17966303805348e-13	0.464347774646674	0.935	0.845

Sdcbp	1.84055929408918e-08	0.461514402016409	0.516	0.199
Fcgr4	5.02754306284021e-21	0.454663518864201	0.435	0.03
Ctsl	5.37744917953238e-18	0.453312582214162	0.419	0.031
Arpc1b	2.77554066332181e-08	0.452323437814511	0.661	0.498
Gpx1	1.298240737842e-08	0.451188550906812	0.468	0.15
Cox7c	4.15456430987174e-09	0.44993485160124	0.855	0.675
Blvrb	1.55625442031227e-16	0.44509406784805	0.452	0.049
Atp6v1f	6.23759483510632e-09	0.436124274686875	0.565	0.422
Cox6a1	3.70694407212397e-08	0.433912909907828	0.677	0.484
Akr1a1	5.8590637656412e-10	0.433075442499754	0.532	0.23
Adamdec1	1.09030228862069e-21	0.426041440906993	0.419	0.018
Uqcr11	1.67286391855641e-07	0.42504327080249	0.661	0.403
Ntpcr	4.38600400394948e-18	0.411129440123943	0.452	0.041

## Cluster 10

<i>Symbol</i>	<i>p_val</i>	<i>avg_logFC</i>	<i>pct.1</i>	<i>pct.2</i>
Malat1	3.25622606307397e-12	1.43220477202814	1	0.915
Psap	3.17698724665759e-13	1.42260091319912	0.8	0.252
H2-Ab1	1.65310683835594e-16	1.4066717294781	1	0.145
Hes1	6.89844024159213e-21	1.40597128921409	0.8	0.027
Apoe	6.18643806874489e-14	1.37642573607414	1	0.229
H2-Eb1	2.14038108427435e-12	1.3549824193205	0.85	0.12
Cd74	2.32509678231027e-14	1.29542941481427	1	0.193
H2-Aa	5.50182696039518e-13	1.23124273793061	0.9	0.138
H3f3b	1.20296091736953e-12	1.04940942493345	0.95	0.902
Rgs1	9.4456541042531e-11	1.04001243624754	0.9	0.495
Sat1	5.23163559568106e-11	1.02648166750919	0.9	0.205
Ctss	3.85908042204996e-07	1.0002678759312	0.8	0.251
Cdkn1a	3.12866791510489e-12	0.993131123918021	0.75	0.084
C1qc	3.44663300642359e-10	0.956243537202766	0.8	0.14
Il1b	1.5769445778137e-16	0.948215531520473	0.75	0.033
Mt1	1.26108612949705e-05	0.919247631560692	0.65	0.19
Junb	1.33419177083106e-08	0.894232219996923	0.9	0.381
C1qa	1.18934338398175e-09	0.892817375688513	0.8	0.152
C1qb	6.25139922442793e-12	0.891334958528466	0.85	0.14
Dnase1l3	1.357855392384e-13	0.83926333339624	0.75	0.062
Lgmn	7.88712834109357e-10	0.814989332590671	0.7	0.094
Fos	1.09498302406318e-06	0.814397811048612	0.6	0.142
Btg2	2.75039189928803e-07	0.776304988233585	0.65	0.163
Csf1r	2.83920191230967e-08	0.766975042731812	0.5	0.049
Mafb	2.06417301485985e-09	0.761956211619869	0.5	0.035
Igfc1	9.1710089633452e-09	0.755489278109845	1	0.828
Ms4a7	2.67598588995379e-09	0.753437732849694	0.65	0.079
Ctsb	2.27891783965745e-06	0.74891141406545	0.8	0.281
Cebpb	5.84820343350771e-06	0.746667519104779	0.7	0.243
Hk2	1.66932804325129e-11	0.723873944840735	0.55	0.032
Arf4	4.24943887238033e-11	0.687159138715323	0.65	0.171
Thbs1	6.29688947373911e-15	0.686732790382282	0.5	0.004
Ubl3	4.50924942809675e-10	0.666304093019257	0.55	0.089
Pik3r1	1.50306730879392e-07	0.659440648094274	0.45	0.106
Tspan13	3.40746512946707e-05	0.654025472406498	0.55	0.179
Pla2g7	2.40021580794003e-05	0.650730576509645	0.45	0.077
Zfp36	1.20948920908656e-06	0.647446501308455	0.45	0.073
Zeb2	9.24456874022968e-10	0.64539941768673	0.5	0.04
Camk2d	8.9253698290824e-11	0.638688483545016	0.65	0.066
Slc15a3	1.13234420179501e-09	0.621309356940763	0.5	0.027
Ccl24	3.72209429831703e-08	0.616608114436776	0.65	0.113

Rnf149	2.73449080021694e-05	0.614172980775847	0.55	0.197
Acp5	1.70268133862119e-06	0.605210494033414	0.75	0.206
Wfdc17	2.8976433002149e-07	0.598799730299415	0.7	0.154
Runx1	1.40306140833278e-08	0.576063930936786	0.45	0.028
H2-DMb1	2.68636203384242e-05	0.557901256868182	0.5	0.091
Neat1	0.000127237896866646	0.557366068201407	0.45	0.165
Fam46a	7.71982357649764e-11	0.551143272763138	0.55	0.03
Churc1	1.76841502531742e-05	0.548664956748671	0.65	0.36
Ms4a6c	7.21655922813712e-06	0.537682077935373	0.5	0.079
Aif1	2.47571930442002e-09	0.53352291486223	0.7	0.133
Cd81	1.01902559546992e-08	0.527251837904583	0.65	0.099
Ifi207	5.52745959622499e-09	0.525456869124104	0.45	0.022
Atp2b1	5.65764448788238e-06	0.524213860884507	0.5	0.102
Apol7c	4.55075558555528e-06	0.520787244167859	0.45	0.055
Rab14	5.16216293836759e-06	0.510924628765824	0.45	0.138
Mpeg1	1.46778961260594e-08	0.509417043443067	0.5	0.037
Dusp1	0.000100545241459393	0.499672751968389	0.55	0.139
Nfkbiz	3.92215476992312e-06	0.497990665785404	0.45	0.075
Pxdc1	4.22114595096e-11	0.497713887483056	0.55	0.027
Ctsh	3.97942628486721e-07	0.491316157377448	0.55	0.08
Cd63	0.000280817800684659	0.490022496136227	0.45	0.099
Csf2ra	6.40468758768329e-08	0.48656826126814	0.45	0.031
Svbp	0.00416406711389024	0.485284014516289	0.5	0.181
Lst1	1.53128013287373e-05	0.477693845249614	0.55	0.117
Nisch	3.34875700180863e-06	0.474536778696847	0.45	0.073
Jchain	8.17181391946934e-06	0.473720118790291	1	0.803
Ccl8	8.93189818317245e-06	0.463077860892775	0.45	0.063
Sgk1	5.74147979580445e-11	0.458487187184177	0.45	0.012
Ly86	1.52845450908149e-06	0.446731974072644	0.45	0.048
Snrnp70	0.000345082015688495	0.436738080412792	0.45	0.194
Msr1	7.33472385799853e-08	0.436137407641248	0.5	0.05
Fcgr3	4.70684888198536e-06	0.435717151278685	0.55	0.107
Grn	2.85541785880874e-05	0.431464501941856	0.45	0.071
Cd274	1.12121682315466e-08	0.430881921092288	0.5	0.037
Slc3a2	0.00274986232992614	0.42931982756975	0.45	0.171
AC149090.1	0.00148106365157622	0.416271487202859	0.5	0.153

**Tabelle A2: Vollständige Tabellen aller hochregulierten Gene von Cluster 4 und Cluster 10 der fokussierten Analyse**

Aufgeführt sind alle Gene, die im jeweiligen Cluster im Vergleich zum anderen signifikant hochreguliert waren. Signifikanzniveau  $p < 0,01$  gemessen an der Fold Change.

Angegeben ist außerdem der Score aus  $\log_{10}(p\text{-Wert}) \times \text{avg\_LogFC}$ , der als Orientierung für die Aufnahme des Gens in die Heatmap, Dissertation Abbildung 20, diente. Legende zu den übrigen Spalten siehe Tabelle A1. pct.2 bezieht sich auf das jeweils andere Cluster.

**Cluster 4**

Gensymbol	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	score
Tmsb4x	3.68689560095246e-20	1.51503672225613	1	1	3.41369663692189e-16	294.422224631699
Ftl1	1.2944069046701e-19	1.8041586818371	1	0.9	1.19849135303405e-15	340.768214103922
Rps29	8.04585841530962e-16	1.17318098416562	1	1	7.44966030673517e-12	177.084954436917
Tyrobp	3.0559884032488e-12	1.19631895477449	0.984	0.5	2.82953966256807e-08	137.75431280415
Pfn1	1.80361365861171e-11	1.01852930794328	1	1	1.66996588650858e-07	109.429327097774
Fth1	1.66100170652429e-09	1.22090641685538	1	0.95	1.53792148007084e-05	107.191065085933
Cd74	2.05327080393375e-09	0.901221751208885	1	1	1.90112343736226e-05	78.2941242066759
Rpl41	8.37617114290528e-09	0.932454699172037	1	0.95	7.755496861216e-05	75.3139413906512
B2m	2.1886428706818e-08	0.718915863115918	1	1	0.000202646443396428	55.0676977176105
Cf1	2.55607346959373e-08	1.02432273493837	0.984	0.6	0.000236666842549684	77.770952487132
Aif1	2.73861023746953e-08	1.03436751367723	0.968	0.7	0.000253567921887304	78.22373056044
Serf2	3.09212155025959e-08	0.903587667617902	0.984	0.7	0.000286299534338535	67.8571156157037
Ubb	5.80994036296461e-08	0.938069257868885	1	0.95	0.000537942378206894	67.8770810734027
Fcer1g	9.41855692951149e-08	0.833629079010991	1	0.95	0.000872064186103469	58.5709094111216
Rpl35	1.01391819609629e-07	0.835127324766948	0.984	0.85	0.000938786857765553	58.4087807326125
Myl6	1.15813582606478e-07	0.837497555788912	0.935	0.65	0.00107231796135338	58.0908446813247
AW112010	1.48807923099127e-07	1.0185463065069	1	0.95	0.00137781255997482	69.5399651450188
C1qb	2.31548166709196e-07	0.763792944985196	1	0.85	0.00214390447556045	50.6804012675942
Rps23	2.96469901001123e-07	0.888141288607666	0.968	0.85	0.0027450148133694	57.9780355455676
Sh3bgr13	3.00870229323289e-07	0.930020924686057	0.952	0.55	0.00278575745330433	60.6524379100978
Lyz2	4.77408868402988e-07	1.02735618501732	0.952	0.45	0.00442032871254327	64.9403095923154
C1qa	6.0727100210808e-07	0.757044000250003	1	0.8	0.00562272220851872	47.0625294725155
Rps28	6.52898979717563e-07	0.789248370804975	1	1	0.00604519165320492	48.8162272562176
Apoe	6.98436934989601e-07	0.838233942889049	1	1	0.00646682758106871	51.6006153089518
Rps9	1.05259137729281e-06	0.804000059965798	0.919	0.7	0.00974594356235411	48.0610347282353
Clec4a2	1.15767461901012e-06	0.582395816267243	0.532	0	0.0107189092974147	34.5734237911709
Rpl23	1.99555074506103e-06	0.901122510400984	0.871	0.45	0.01847680434852	51.3634174043817
Ndufb8	3.2958434268212e-06	0.609064063349404	0.5	0	0.0305162142889375	33.3890955519026
Cd52	4.03418123412622e-06	0.753139091187921	0.935	0.9	0.0373524840467747	40.6261647204655
Rpl37a	4.3979864459676e-06	0.800586699045605	0.984	0.85	0.040720956503214	42.8853968856291
2010107E04Rik	4.49192801170981e-06	0.854513372177912	0.629	0.05	0.0415907614604211	45.6956769163408
Gng5	5.96958803024292e-06	0.795532136105207	0.903	0.5	0.0552724155720192	41.5590414171852
Rpl38	6.3004549742766e-06	0.793454628366381	0.952	0.8	0.0583359126068271	41.2646242662916
Atp5j	6.76281650625966e-06	0.909253405153579	0.677	0.15	0.0626169180314582	47.0072408028518
Tmem256	6.97851049318264e-06	0.774767708914699	0.677	0.1	0.0646140286563781	39.9488613176011
Ndufa3	8.7457172992414e-06	0.85224836554706	0.79	0.25	0.0809765964736761	43.1084657321538
Atp5e	8.75589461622066e-06	0.877421862974782	0.871	0.4	0.0810708282515871	44.3773609496078
Fau	1.04816726171535e-05	0.638257010736289	1	0.9	0.0970498067622245	31.782450858088
Atp5k	1.38572328200274e-05	0.872327608453039	0.71	0.15	0.128304118680633	42.3804970784724
H2-Aa	1.74746670569547e-05	0.634622535568139	0.968	0.9	0.161797942280343	30.1927452077777
Cox8a	1.96452552115042e-05	0.773824460927769	0.919	0.6	0.181895418003317	36.421923422886
Rps27	2.51240995462317e-05	0.70117935225721	0.984	0.9	0.232624037698559	32.2536155980314
Ndufa4	2.71248086728349e-05	0.71442457900723	0.661	0.1	0.251148603501778	32.6251508459661
Tma7	2.72647582523984e-05	0.824312037660834	0.774	0.3	0.252444396658957	37.6248850351738
Rps14	2.98748853093019e-05	0.67831116135355	0.935	0.75	0.276611563078826	30.6915027457812
Cox6b1	3.22179353847977e-05	0.859560701505156	0.839	0.35	0.298305863727842	38.6106268677488
Rpl39	3.2770955360847e-05	0.792529130845438	0.968	0.7	0.303426275686083	35.5410552393339
C1qc	3.38194863910427e-05	0.613526058052855	0.984	0.8	0.313134624494664	27.4297254193008
Rpl37	5.47004289549017e-05	0.71442457900723	0.968	0.9	0.506471271693435	30.4488417698897

Atp5l	5.50281801501732e-05	0.818164348767323	0.887	0.45	0.509505920010454	34.8490137655762
Rpl18a	6.81073713251244e-05	0.638851152515991	0.919	0.85	0.630606151099327	26.6196873966926
Cops9	8.96915694023391e-05	0.556678928262113	0.548	0.05	0.830454241096258	22.5301788877098
Smdt1	0.000102353886413513	0.667577605710442	0.661	0.15	0.947694634302717	26.6356499332096
Gngt2	0.000111490293468925	0.814508037564213	0.645	0.15	1	32.1955718633396
Ifitm2	0.000115896634195412	0.720981979553389	0.774	0.25	1	28.3773400897438
Cox7c	0.000120783959179687	0.767187381374141	0.855	0.45	1	30.058330551077
Prdx5	0.000123768942502993	0.809734758811555	0.758	0.3	1	31.6394813864172
Rpl23a	0.000124107490422275	0.759448260381186	0.919	0.65	1	29.6655831827975
Nme2	0.000138877651282546	0.437213806422745	0.371	0	1	16.8649438732368
Sem1	0.000142522203684538	0.751987680582879	0.823	0.35	1	28.922329564086
Rpl10	0.000143621533719355	0.698097685719802	0.903	0.7	1	26.8263613175278
Uqcr11	0.000160588556348512	0.699578070890236	0.661	0.15	1	26.5439886479212
Selenow	0.000164864217147189	0.758549383916168	0.516	0.05	1	28.6949643515269
Uba52	0.000173963638339322	0.603198943897006	0.935	0.75	1	22.6775147314489
Taldo1	0.000184203141080534	0.603198943897006	0.516	0.05	1	22.5276888629101
Rpl31	0.000190614849218287	0.647453952901047	0.935	0.65	1	24.0842722940321
Atp6v1g1	0.00021119161809042	0.753575486569055	0.758	0.35	1	27.6963356094345
Rpl32	0.000234228851736993	0.734890409599521	0.952	0.8	1	26.679164612544
Rpl17	0.00025280776513711	0.693147180559945	0.871	0.65	1	24.9339568559228
Rps11	0.000257779934684933	0.589094337715464	1	0.9	1	21.1411282917451
Itm2b	0.000269195288593502	0.703440943873266	0.919	0.7	1	25.1123671924647
Prdx1	0.000269948734363985	0.702321556835987	0.839	0.4	1	25.0638807634717
Rpl35a	0.000296170486391696	0.76798802192932	0.919	0.7	1	27.0981364993272
Elob	0.000302512303376228	0.727048732235627	0.758	0.3	1	25.5867130943987
Chchd2	0.000332696197108583	0.687756331925069	0.629	0.15	1	23.9198362245288
Ctsz	0.00034164993905718	0.701179352257209	0.806	0.4	1	24.3058118534905
Ifitm3	0.000347536862970513	0.953459497658075	0.565	0.1	1	32.9801556654475
Rps17	0.000360461122939912	0.642338852234276	0.758	0.3	1	22.1166360330517
Rpl19	0.000373793405717109	0.705613949325075	0.887	0.6	1	24.1839892746899
Rpl34	0.000445213681279099	0.684571615857549	0.855	0.5	1	22.9429487629338
Vamp8	0.00045407745024138	0.636259806157894	0.774	0.35	1	21.2693385949671
Gsto1	0.00048795113206923	0.372675285285174	0.323	0	1	12.3416029600344
Wfdc17	0.000511896026511119	1.02414976944455	0.935	0.7	1	33.7029074337691
Oaz1	0.000560118358115702	0.660357357736954	0.726	0.25	1	21.472973546919
Rps16	0.000584730497291608	0.679119634192477	0.887	0.8	1	21.9562383140596
Rplp0	0.000590703974983846	0.751987680582879	0.839	0.55	1	24.278900653705
H3f3a	0.000693477687948524	0.686065714447161	0.758	0.4	1	21.6725929989307
Lamtor5	0.000731275393780861	0.383725121471759	0.306	0	1	12.0333091440679
Ndufa8	0.000731275393780861	0.372675285285174	0.306	0	1	11.6867952272451
Ndufs5	0.000731275393780861	0.372675285285174	0.306	0	1	11.6867952272451
Cnih4	0.000731275393780861	0.350202429433115	0.306	0	1	10.9820646618322
Gnl2	0.000738203293586394	0.707823894975878	0.597	0.15	1	22.1677987726076
Ppia	0.000823900449189904	0.605416239705654	0.952	0.8	1	18.6717951791153
Gm11808	0.000832975653116487	0.597299221769817	0.79	0.4	1	18.393039261639
Atp1f1	0.00085685195196493	0.727496660574583	0.613	0.2	1	22.3130079513772
Psme2	0.00085873009924587	0.610524983989079	0.613	0.2	1	18.7195709795097
Rps25	0.00088903443893133	0.69882363856475	0.823	0.55	1	21.3216781615607
Cox6a1	0.000948575962654003	0.723779184174451	0.677	0.3	1	21.8793227825287
Ndufa7	0.00106494122453756	0.551463269497817	0.452	0.05	1	16.393207221753
Ctss	0.00108185408540798	0.544262086194291	0.984	0.8	1	16.1418953638362
Rpl22	0.00108881498793098	0.478035800943	0.29	0	1	14.1644202459946
Ccl24	0.00109919997871271	0.831421760006275	0.855	0.65	1	24.6011320841047
Anxa5	0.00110141675259752	0.569007579148727	0.452	0.05	1	16.8315191480075
Rps19	0.00112120119353678	0.560273899179972	0.935	0.95	1	16.5298530047082
Cox6c	0.0011700537194648	0.597837000755621	0.774	0.35	1	17.5273505045397
Dynlrb1	0.0013318936300108	0.53972936994834	0.516	0.1	1	15.5200824244818
Atp5h	0.00134171000689715	0.609713624918199	0.645	0.2	1	17.513056510889
Gabarap	0.00137932545520305	0.641125995809067	0.774	0.5	1	18.3383400254126
1810037117Rik	0.00140168868558045	0.562376949376751	0.597	0.15	1	16.0465738684689
Actb	0.00144785387414461	1.28998220364439	1	0.95	1	36.6261456626931
Rplp1	0.00148374823048505	0.616944864801641	0.952	0.75	1	17.4511479033133
Rpl15	0.00150220141313661	0.629006827852878	0.694	0.35	1	17.7585726035136
Ndufb11	0.00161122298846834	0.394654192003949	0.274	0	1	11.022077304829
Gpsm3	0.00161122298846836	0.327212911208416	0.274	0	1	9.13854730432262
Acp5	0.00162700511953254	0.522640107179754	0.919	0.75	1	14.5743999400063
Ostf1	0.001691091851859	0.496904285247383	0.435	0.05	1	13.7733559780204
Slc25a5	0.00170199405040773	0.585133936499367	0.516	0.1	1	16.2026042378786
Rps4x	0.00180233983672261	0.552604496440508	0.79	0.4	1	15.1643698853528

Uqcrb	0.00182213457122038	0.564509398946827	0.694	0.25	1	15.4642808474138
Rps6	0.00197623643878644	0.514849774065716	0.839	0.55	1	13.922367299511
Myl12a	0.00198678234308728	0.46545701873614	0.694	0.25	1	12.5759491030651
Clec4n	0.00201990536034518	0.660357357736954	0.758	0.35	1	17.7944448648414
Cotl1	0.00202996383956105	0.674746095189054	0.532	0.15	1	18.1676175464758
Txn1	0.00204074810621393	0.569007579148727	0.419	0.05	1	15.3075021968153
Rps12	0.00211910795353254	0.619114399202905	0.774	0.45	1	16.5541712850739
Rps18	0.00217764760625961	0.627296495476066	0.855	0.65	1	16.6987104804414
Rpl13	0.00223551618314066	0.536660644290523	0.935	0.8	1	14.2248460789868
Minos1	0.00225056159479435	0.660357357736954	0.597	0.2	1	17.4843418303177
Atox1	0.00227262171074425	0.674541992728911	0.806	0.5	1	17.831334431198
Snrpb	0.00237052809662547	0.350202429433115	0.258	0	1	9.19335621114279
Gm2000	0.00237052809662547	0.315516871445225	0.258	0	1	8.28280658851139
Sumo1	0.00237052809662549	0.315516871445225	0.258	0	1	8.28280658851138
Tmc6	0.00237052809662549	0.303682413798222	0.258	0	1	7.97213374454883
H2-Ab1	0.00249759120586887	0.547597231148953	1	1	1	14.2511009927717
Clec1b	0.00257743932968586	0.392675951991843	0.419	0.05	1	10.1656403944342
Ost4	0.00259327253605895	0.561417409882051	0.532	0.15	1	14.51910667187
Rpl9	0.00268204456184052	0.514849774065716	0.823	0.55	1	13.2395370439837
Ubl5	0.00330047240425953	0.612566693900606	0.613	0.25	1	15.2003763097355
Arpc2	0.00361944690641193	0.577290759038341	0.484	0.1	1	14.0937329146841
Cox14	0.00362592572137247	0.310981716279834	0.468	0.1	1	7.58976098220459
H2-DMa	0.00365649000105521	0.557173121501724	0.71	0.3	1	13.5779502063815
Sec61g	0.00381864590003089	0.594510791939368	0.774	0.4	1	14.3758096444679
Ndufc2	0.00383964117200526	0.478035800943	0.403	0.05	1	11.5479555879397
Arpc1b	0.00408982066749834	0.699799089788251	0.661	0.3	1	16.7132718131395
Rps24	0.00409646678661132	0.530304229488757	0.903	0.8	1	12.6614937329958
Eif1	0.00423442274229633	0.438985286071127	0.903	0.6	1	10.4180242109047
Cd81	0.00424444186967998	0.571229577840947	0.855	0.65	1	13.550590429255
Ifi2712a	0.00425071324593241	0.590247791549928	0.661	0.25	1	13.9979518019638
Sri	0.00427992769089147	0.468903317379727	0.468	0.1	1	11.1062731460192
Tpt1	0.00442666963471956	0.503631348131963	0.935	0.75	1	11.8550935773191
Usmg5	0.00442988615036857	0.603198943897006	0.694	0.35	1	14.1969351923326
Lgals3	0.00463470399785419	0.788974735559048	0.661	0.35	1	18.4144967336694
Cstb	0.0051428161939902	0.549691789849435	0.742	0.35	1	12.5813401739563
Rpl27	0.00522284358410631	0.547370494344064	0.806	0.65	1	12.4915036282076
Lst1	0.005374488452144	0.524555816577893	0.839	0.55	1	11.9056485798967
Ndufb4	0.00543835276881167	0.487514544897544	0.387	0.05	1	11.0399259184846
Selenop	0.00578750202745943	0.676357699083396	0.661	0.3	1	15.1335633329383
Cox5b	0.0058796845554466	0.607247532423006	0.645	0.3	1	13.5455426291023
Gpx1	0.00606907316967385	0.520595415361796	0.468	0.1	1	11.5409632880387
Cox17	0.00636413706656776	0.507234955635262	0.597	0.2	1	11.1402008479179
Rpl36a	0.00735538564087597	0.514403445113874	0.613	0.35	1	10.9742550754046
Rplp2	0.00766575459663134	0.478035800943	0.903	0.7	1	10.1125848694705
Rps27a	0.00772366929662872	0.478035800943	0.887	0.75	1	10.0969590346583
Rpl6	0.00787177508275224	0.521520912882739	0.79	0.5	1	10.9724209830261
Bloc1s1	0.00789691804295476	0.421946334291956	0.452	0.1	1	8.87160045388987
Npl	0.00812718543035899	0.599396657947267	0.677	0.35	1	12.5277487775791
Ntprcr	0.00906190237516414	0.32822352271434	0.452	0.1	1	6.7048865150212
Hnrnpa3	0.00912952807730599	0.444134249267319	0.516	0.15	1	9.05834750416657
Rpl26	0.00936573250214869	0.511511730139389	0.871	0.8	1	10.3758018918186
Bst2	0.00985702447451568	0.431515785308107	0.435	0.1	1	8.65730341585955

## Cluster 10

Gensymbol	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	score
Malat1	2.07806299616323e-28	4.10222135342739	1	0.323	1.92407852814754e-24	1135.59091556839
Igha	1.17647242919457e-15	1.07400059566867	1	1	1.08929582219125e-11	160.342040893241
Igkc	3.93498991314608e-13	0.884103752865084	1	0.984	3.64340716058195e-09	109.673568970223
Jchain	1.78612054987239e-10	0.8965625204137	1	0.79	1.65376901712684e-06	87.3977145178224
Junb	9.78720646659797e-09	1.1314021114911	0.9	0.274	9.06197446742306e-05	90.617856017889
H3f3b	1.15069052569989e-08	1.17514666045396	0.95	0.839	0.000106542435774552	93.2953806208437
Cdkn1a	1.32720377522935e-08	1.04178995280141	0.75	0.081	0.000122885797548486	82.0624445719196
Hes1	1.39461304404129e-08	1.2682612942083	0.8	0.145	0.000129127221747783	99.6288528808975
Igcl1	4.92846780838482e-08	0.772768303067035	1	1	0.000456326834378351	56.4684060636696
Rgs1	7.20692287935159e-08	1.07275338440959	0.9	0.468	0.000667288989399164	76.6187299417549

Neat1	1.38578388432848e-07	0.78845736036427	0.45	0	0.00128309729849974	54.0748065752433
AC160336.1	1.3857838843285e-07	0.500775287912489	0.45	0	0.00128309729849975	34.344694073271
HK2	1.92559221129831e-07	0.74946750079313	0.55	0.016	0.00178290582844111	50.3300079536101
Camk2d	1.97925111409929e-07	0.640281558804442	0.65	0.048	0.00183258860654453	42.9212685442693
Btg2	4.13517729940407e-07	0.937246097050143	0.65	0.081	0.00382876066151823	59.8291595742119
Asph	9.20214874622727e-07	0.587786664902119	0.4	0	0.00852026952413183	35.4794540728149
Nktr	9.2021487462273e-07	0.405465108108164	0.4	0	0.00852026952413186	24.4743229818732
Gm31243	9.20214874622732e-07	0.405465108108164	0.4	0	0.00852026952413188	24.4743229818732
Synj1	9.20214874622734e-07	0.470003629245736	0.4	0	0.0085202695241319	28.3699395947631
Rsrp1	1.32083303285564e-06	0.701839451803876	0.5	0.016	0.0122295930512104	41.2622087170004
Fam46a	1.61497614977205e-06	0.556037966587539	0.55	0.032	0.0149530641707394	32.204795373494
AC149090.1	1.72973804665764e-06	0.583436940775653	0.5	0.016	0.016015644574003	33.6177512422985
Rbm39	4.60112469503914e-06	0.797628931839053	0.7	0.145	0.0426018135513674	42.5705408417931
Bclaf1	5.73479296749257e-06	0.559615787935423	0.35	0	0.0530984480860137	29.3321622264173
Coq10b	5.73479296749266e-06	0.667829372575655	0.35	0	0.0530984480860145	35.004158063918
R3hdm1	5.73479296749272e-06	0.405465108108164	0.35	0	0.0530984480860151	21.252381695766
Klf6	5.73479296749272e-06	0.559615787935423	0.35	0	0.0530984480860151	29.3321622264172
Pik3r1	7.08944888518451e-06	0.772457019017829	0.45	0.016	0.0656412072279234	39.7768053686368
Ii1b	8.44914358531497e-06	0.797395967365081	0.75	0.21	0.0782306204564313	40.4533910220009
Nfkbiz	8.75038305831026e-06	0.571786323555678	0.45	0.016	0.0810197967368947	28.9207974903902
Gdap10	3.38003554798233e-05	0.500775287912489	0.3	0	0.312957491387684	22.3900573939896
Rbm25	3.38003554798233e-05	0.438254930931155	0.3	0	0.312957491387684	19.594723009699
Malt1	3.38003554798233e-05	0.405465108108164	0.3	0	0.312957491387684	18.1286642151328
Atp13a3	3.38003554798233e-05	0.336472236621213	0.3	0	0.312957491387684	15.0439386113428
Dnajb4	3.38003554798233e-05	0.336472236621213	0.3	0	0.312957491387684	15.0439386113428
Ccar1	3.38003554798234e-05	0.336472236621213	0.3	0	0.312957491387685	15.0439386113428
Slc38a2	3.38003554798235e-05	0.438254930931155	0.3	0	0.312957491387686	19.594723009699
Hspa1b	3.38003554798235e-05	0.405465108108164	0.3	0	0.312957491387686	18.1286642151328
Tiparp	3.38003554798235e-05	0.336472236621213	0.3	0	0.312957491387686	15.0439386113428
Arf4	3.57161649701149e-05	0.685115008862681	0.65	0.145	0.330695971458294	30.4679905807508
Nisch	4.00253881108841e-05	0.527867089620842	0.45	0.032	0.370595068518676	23.2138233340076
Zeb2	4.2879726169541e-05	0.630626823578611	0.5	0.065	0.39702338460378	27.5441904536107
Pim1	4.62253955212969e-05	0.527867089620842	0.45	0.032	0.428000937131688	22.8836684192408
Thbs1	4.88338111973095e-05	0.615588946214071	0.5	0.048	0.452152257875889	26.5397593050021
Cbl	6.28095449932606e-05	0.373716409793584	0.45	0.032	0.5815535770926	15.7034676914073
Tra2a	6.36813628601403e-05	0.453522403061944	0.45	0.032	0.589625738722039	19.029744025775
Churc1	8.16215616405486e-05	0.738359523381493	0.65	0.177	0.75573403922984	30.1855778571767
Btg1	0.000143160172632746	0.794929874869888	0.7	0.371	1	30.5585176686242
Atp2b1	0.000148184161923711	0.54948056604138	0.5	0.065	1	21.0407000086005
Srsf2	0.000153872728908944	0.579333529191061	0.45	0.048	1	22.0890509406516
Cd274	0.000157808463559887	0.392445394899861	0.5	0.065	1	14.9202625910436
Runx1	0.00018415522920434	0.5526652821089	0.45	0.048	1	20.6410310762903
Adam19	0.000191452691234117	0.42275074439519	0.45	0.048	1	15.7176127881959
Smchd1	0.000199390488273395	0.304723538306633	0.35	0.016	1	11.2756715677432
Hspa1a	0.000213071040859069	0.772457019017829	0.35	0.016	1	28.3605707618775
Tra2b	0.0002141086048608	0.408401967781474	0.45	0.048	1	14.9857624524562
Nampt	0.000282292996996401	0.607331260975089	0.4	0.21	1	21.5560078111926
Ranbp2	0.000292705773055228	0.389464766761723	0.35	0.016	1	13.7620051420228
Crtc3	0.000310298717168431	0.355563215086042	0.35	0.016	1	12.4739398949236
Snrnp70	0.000316581290708643	0.590271138229781	0.45	0.065	1	20.6566255745541
Dennd4a	0.000316625502945593	0.355563215086042	0.35	0.016	1	12.4427715345304
Leng8	0.000322126954836648	0.320471895274772	0.35	0.016	1	11.1907918405612
Zfp36	0.000413725982456898	0.664379110383503	0.45	0.081	1	22.4778534280941
Fos	0.000529071537591404	0.773004514240922	0.6	0.194	1	25.3273816083296
Sgk1	0.000580426311211291	0.407483272264402	0.45	0.065	1	13.1871892517547
Dnajb6	0.000618478665761972	0.453070016716296	0.45	0.065	1	14.5375456122253
Ccr5	0.000678496490057868	0.556037966587539	0.35	0.032	1	17.6177982675331
Jund	0.000721774752722801	0.466425807897852	0.45	0.065	1	14.6532253141296
Rnf149	0.000880599842089052	0.677484619996989	0.55	0.145	1	20.6986550698727
Jun	0.000884038070875665	0.525266307920785	0.4	0.048	1	16.0391592066373
Tnfaip2	0.000895857667433441	0.687909607793697	0.4	0.048	1	20.9658406379514
Dusp1	0.00101612436648201	0.538338389488138	0.55	0.177	1	16.11275403921
Spty2d1	0.00108009909535243	0.527867089620842	0.35	0.032	1	15.6593693449238
Foxn3	0.00108681835354472	0.39100204608061	0.3	0.016	1	11.5886869137069
Gm42418	0.00125558915268654	0.373716409793584	0.35	0.032	1	10.8420827598022
Ndel1	0.00125558915268654	0.373716409793584	0.35	0.032	1	10.8420827598022
Nrip1	0.00133784090527601	0.373716409793584	0.35	0.032	1	10.7390980443506
Ptgs2	0.0013684519433397	0.389464766761723	0.3	0.016	1	11.153376901106
Prpf38b	0.00147897226494385	0.406506232616575	0.3	0.016	1	11.5042888644791

Ccn1	0.00148735001056979	0.320471895274772	0.3	0.016	1	9.06162106978286
Luc7l2	0.00154216259169009	0.438254930931155	0.3	0.016	1	12.323158206693
Maf	0.00176644791762877	0.377630309114721	0.45	0.081	1	10.3957816184091
Ptprc	0.00257229176394801	0.487045095100587	0.6	0.194	1	12.6129083122639
Son	0.00287043408336526	0.520493029168127	0.4	0.065	1	13.2312056533637
Ubl3	0.00289182972169316	0.510575592510781	0.55	0.242	1	12.9626324429567
Pabpc1	0.00384542661205955	0.525266307920785	0.5	0.129	1	12.6854727146987
Rab14	0.0046510885138081	0.504504316472356	0.45	0.113	1	11.7672876994074
Gzma	0.00490629896122466	0.438254930931155	0.8	0.484	1	10.1203844270607
Vps37b	0.00532968690948533	0.304723538306633	0.3	0.032	1	6.9272750242372
Lacc1	0.00559045179092835	0.304723538306633	0.3	0.032	1	6.86405948813343
Spon1	0.00723594146752365	0.393803168360321	0.4	0.113	1	8.42937633115956
Stk17b	0.00727591463785536	0.39100204608061	0.3	0.048	1	8.36006325022451
Il4ra	0.00809857529475173	0.34294475112683	0.35	0.065	1	7.17300283796855
Rbms1	0.00897676214119407	0.39100204608061	0.3	0.048	1	8.00334378437687
Soat1	0.00984898781767456	0.438254930931155	0.3	0.065	1	8.79406025631504

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Andreas Beilhack für die wissenschaftliche Leitung, Motivation und Unterstützung, und Herrn Prof. Manfred Lutz und Herrn Prof. Matthias Eyrich für die konstruktiven Gespräche, Anregungen und Ratschläge. Ich danke in meinem Labor Ana-Laura Jordan Garrote, Katja Jarick, Musga Qureischi, Duc-Dung Le und Haroon Shaikh für den gemeinsamen Austausch, die praktische Einführung und Unterstützung, dem gesamten Laborteam für das Miteinander, Rat und Tat und Sabine Stöckel-Eckard für die zuverlässige, wertschätzende Organisation im Hintergrund. Ich danke Chunguang Liang, Herrn Prof. Thomas Dandekar, Ehsan Vafadarnejad und Antoine-Emmanuel Saliba für die RNA-Analysen und ganz besonders für die geduldigen Erklärungen. Und ich danke der GSLS für alles, was ich in dem Stipendienprogramm lernen und erfahren durfte.

Ich danke meiner Familie, Mama und Papa, für die wissenschaftliche Neugierde, die ihr mir mit auf den Weg gegeben habt, eure Geduld, das liebevolle Gehaltensein und den immer sicheren Hafen, und meinen Geschwistern Simon, Hannah und Eva für euer Zuhören, Mitdenken und so manche wertvolle und kreative Idee fernab der Labor- und Medizinrealität. Ich danke meiner Bibcrew, allen voran Ines, Carla und Anna: Ohne euch hätte ich das niemals geschafft. Und ich danke meinen Mitbewohnern Max, Simon und Lorenz, und allen anderen Menschen, die mich in den Jahren begleitet und mir Perspektiven eröffnet haben.