

**Humane invariante natürliche Killer-T-Zellen
unterdrücken die Alloreaktivität von T-Zellen und
kontrollieren das Tumorstadium *in vitro***

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Hannes Schmid
aus Kirchheim/Teck

Tübingen
2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

24.02.2020

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

PD Dr. Dominik Schneidawind

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1 Allogene Stammzelltransplantation.....	1
1.2 Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (GvHD).....	2
1.2.1 Pathogenese der GvHD.....	3
1.2.2 Klinik und Therapie.....	6
1.3 iNKT-Zellen.....	8
1.3.1 Entwicklung, Subpopulationen und Funktionen von iNKT-Zellen.....	8
1.3.2 iNKT-Zellen in der GvHD-Prävention.....	11
1.3.3 iNKT-Zellen in der Tumorthherapie.....	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Materialien.....	16
2.1.1 Geräte.....	16
2.1.2 Glas- und Plastikwaren.....	17
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.4 Antikörper, Tetramere, Lebend/Tot-Farbstoffe.....	18
2.1.5 Zytokine und Stimulanzen.....	20
2.1.6 Gebrauchsfertige Kits.....	21
2.1.7 Verwendete Zelllinien und primäre Zellen.....	21
2.1.8 Medien und Puffer.....	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Generierung primärer Zellen für Zellkulturexperimente.....	23
2.2.2 Charakterisierung von expandierten iNKT-Zellen.....	29
2.2.3 Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von iNKT-Zellen.....	30
2.2.4 Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion.....	33
2.2.5 iNKT-Zell-vermittelte Tumorlyse.....	39
2.2.6 Durchflusszytometrische Analysen.....	39
2.2.7 Statistik.....	43
3. Ergebnisse.....	44
3.1 Expansion von iNKT-Zellen.....	44
3.2 Charakterisierung expandierter iNKT-Zellen.....	46

3.3 Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von expandierten iNKT-Zellen in einer humanen MLR	48
3.4 Vergleichende Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von CD4-CD8-, CD4+CD8- und CD4-CD8+ iNKT-Zell-Subpopulationen.....	52
3.5 Transwell-Assay zur Analyse der Zellkontakt-abhängigen inhibitorischen Eigenschaften von expandierten iNKT-Zellen.....	53
3.6 Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Treg-Expansion	54
3.7 Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von iNKT-Zellen auf mittels CD3/CD28-Bead aktivierte T-Zellen	55
3.8 Apoptoseassays zur Analyse der iNKT-Zell-induzierten DC- Apoptose.....	57
3.9 Analyse der Aktivierung allogener T-Zellen durch apoptotische Mo-DCs	60
3.10 Analyse der dosisabhängigen Apoptoseinduktion von allogenen Mo-DCs durch iNKT-Zellen und T-Zellen.....	61
3.11 Vergleichende Analyse von iNKT-Zell-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs	62
3.12 Analyse der kontaktabhängigen Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs durch expandierte iNKT-Zellen	63
3.13 Blockade von Schlüsselmolekülen der Apoptoseinduktion zur Identifizierung des Mechanismus der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion in DCs	65
3.14 Bestimmung der freigesetzten zytolytischen Moleküle und Zytokine von iNKT-Zellen nach der Kultur mit allogenen Mo-DCs	68
3.15 Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die iNKT-Zell- vermittelte Apoptoseinduktion	71
3.16 Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion in typischerweise in Transplantaten enthaltenen Zellen	72
3.17 Analyse der direkten Tumorzelllyse durch expandierte iNKT-Zellen.....	75
4. Diskussion	79
4.1 iNKT-Zell-vermittelte Toleranzinduktion	80
4.1.1 iNKT-Zell-vermittelte Toleranzinduktion durch die Eliminierung allogener DCs.....	80
4.1.2 iNKT-Zell-vermittelte Expansion von Tregs.....	83
4.1.3 Weitere iNKT-Zell-vermittelte Mechanismen zur Prävention einer GvHD	84
4.2 iNKT-Zell vermittelte Apoptoseinduktion	84
4.2.1 Direkte Interaktion von expandierten iNKT-Zellen und Mo-DCs.....	85
4.2.2 Von iNKT-Zellen freigesetzte Faktoren zur Apoptoseinduktion.....	86
4.3 iNKT-Zell-vermittelte Tumorkontrolle	89
4.4 iNKT-Zellen in der klinischen Anwendung	89

4.4.1 Mögliche Ansätze zur Verwendung von iNKT-Zellen in der klinischen Anwendung.....	89
4.4.2 GMP-konforme Expansion von iNKT-Zellen	91
5. Zusammenfassung	94
6. Verzeichnisse	96
6.1 Literaturverzeichnis.....	96
6.2 Abkürzungsverzeichnis.....	105
6.3 Abbildungsverzeichnis	107
6.4 Tabellenverzeichnis	108
7. Anhang	109
8. Danksagung	116

1. Einleitung

1.1 Allogene Stammzelltransplantation

In Deutschland erkranken jährlich schätzungsweise 14.000 Patienten an einer Leukämie. Trotz der Entwicklung neuer Antileukämika stellt die allogene Stammzelltransplantation (SZT) besonders für Patienten mit prognostisch ungünstigen genetischen Mutationen die letzte kurative Therapieoption dar (Copelan, 2006, Döhner *et al.*, 2017). Unter einer allogenen SZT versteht man die Übertragung von Blutstammzellen von einem passenden Familien- oder Fremdspender zu einem Empfänger, während bei einer autologen SZT die Stammzellen vom Empfänger selbst stammen. Ziel dabei ist die Wiederherstellung einer gesunden Knochenmarkfunktion und einer damit verbundenen Regeneration des Blut- und Immunsystems sowie der Eliminierung verbliebener Tumorzellen durch die Immunzellen des Stammzelltransplantats (Jenq and van den Brink, 2010).

Heutzutage können Spenderstammzellen auf zwei unterschiedliche Arten gewonnen werden: Entweder durch die direkte Entnahme von Knochenmark aus dem Beckenknochen oder durch die Apherese von G-CSF-mobilisierten Stammzellen aus dem Blut des Spenders (Copelan, 2006). G-CSF-mobilisierte Stammzellen kommen aktuell in 80 % der Transplantationen zur Anwendung, während Knochenmark nur noch in 20 % der Transplantationen gespendet wird (D'Souza *et al.*, 2017).

Vor Beginn der eigentlichen Transplantation dient eine hochdosierte Chemotherapie und/oder Radiotherapie dazu, möglichst viele Tumorzellen aus dem Körper des Empfängers zu eliminieren. Durch dieses myeloablative Konditionierungsregime soll zum einen die Tumorlast reduziert und zum anderen damit Raum für die im Anschluss reinfundierten Stammzellen geschaffen werden.

Je nach Grunderkrankung, Remissionsstatus vor Transplantation, Rezidivrisiko und patientenspezifischen Komorbiditäten kann auch ein schonenderes, nichtmyeloablatives oder intensitätsreduziertes Konditionierungsregime angewendet werden.

Nach erfolgter SZT erhält der Stammzellempfänger eine immunsuppressive Therapie um das Einwachsen von Stammzellen zu erleichtern und Abstoßungsreaktionen zu vermeiden.

Die Auswahl der Stammzellspender erfolgt hauptsächlich anhand der Humanen Leukozyten-Antigene (HLA), welche im Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: *major histocompatibility complex*; MHC) kodiert sind (Krensky *et al.*, 1990, Petersdorf *et al.*, 1995). Für eine SZT ist vor allem die Übereinstimmung der HLA-A-, -B-, -C-, -DRB1- und -DQB1-Allele relevant. Wenn diese 10 Allele bei Spender und Empfänger übereinstimmen (10/10 kompatibel) und beide Parteien verwandt sind, spricht man von einem „*matched related donor*“ (MRD). Liegt bei vollständiger HLA-Übereinstimmung kein Verwandtschaftsverhältnis vor, handelt es sich um einen „*matched unrelated donor*“ (MUD). Unterscheiden sich Spender und Empfänger in mindestens einem Allel, ist dies als eine Transplantation von einem „*mismatched unrelated donor*“ (MMUD) definiert (Lee *et al.*, 2007; Loiseau *et al.*, 2007).

Zur Behandlung von Leukämien wurden im Jahr 2014 innerhalb der EU in 96 % der Fälle allogene, und nur in den restlichen 4 % autologe Stammzellen transplantiert (Passweg *et al.*, 2015). Dies liegt zum einen daran, dass autologe Stammzellen häufig erworbene Mutationen tragen und damit ein hohes Risiko besteht, dass diese erneut entarten. Zum anderen sind bei der allogene SZT mittransplantierte CD4+ und CD8+ Spender-T-Zellen in der Lage, im Empfänger verbliebene Tumorzellen zu erkennen und diese zu eliminieren. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt“ (engl.: *graft-versus-leukemia-effect*; GvL) (Bleakley *et al.*, 2015). Besonders wichtig ist dieser für Patienten mit nicht myeloablativen Konditionierungsregimes oder bei denen sich durch Chemo- und Radiotherapie keine vollständige Remission erreichen lässt.

1.2 Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (GvHD)

Eine der häufigsten Komplikationen nach einer allogenen SZT ist die Entwicklung einer Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl.: *graft-versus-host-disease*; GvHD).

Eine GvHD entsteht, wenn Spender-T-Zellen aus dem Transplantat nicht nur verbliebene Tumorzellen, sondern auch Zellen und Gewebe des Empfängers als „fremd“ erkennen. Dies resultiert in der Aktivierung und Proliferation alloreaktiver T-Zellen, welche im Anschluss Zellen und Organe des Wirts schädigen können (Abbildung 1) (Ferrara *et al.*, 2009).

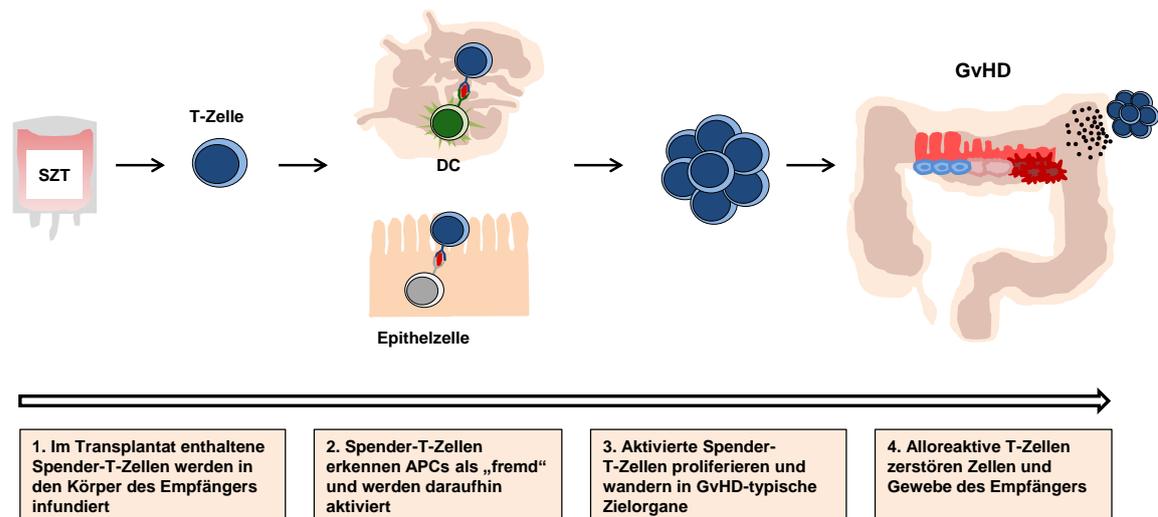


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung einer GvHD

Naive Spender-T-Zellen sind die Initiatoren einer GvHD. Diese gelangen als Teil des Transplantats in den Körper des Empfängers. Dort werden sie meist durch antigenpräsentierende Zellen (engl.: *antigen presenting cells*; APCs) im Lymphknoten oder durch Epithelzellen in der Peripherie aktiviert. Einmal aktiviert, kommt es zur Proliferation der alloreaktiven T-Zellen, welche im Folgenden die Zerstörung von Zellen und Geweben des Wirts verursachen.

verändert nach Koyama *et al.*, Blood 2016

Die Depletion von T-Zellen aus Stammzelltransplantaten führte zwar im Rahmen klinischer Studien zu einer signifikant reduzierten GvHD-Inzidenz, resultierte aber durch den Verlust des GvL-Effekts in deutlich erhöhten Rückfallraten (Horowitz *et al.*, 1990; Marmont *et al.*, 1991)

1.2.1 Pathogenese der GvHD

Bei gematchten Transplantationen werden alloreaktive T-Zellen ausschließlich durch das Erkennen von Alloantigenen aktiviert. Diese sind in der Literatur als minor Histokompatibilitäts-Antigene (mHAs) definiert (Spierings, 2014).

Bei mHAs handelt es sich um 9-12 Aminosäuren große Peptide, die sich aufgrund von Polymorphismen zwischen Spender und Empfänger unterscheiden (Dzierzak-Mietla *et al.*, 2012).

Da mHAs von MHC-I- und MHC-II-Komplexen präsentiert werden, können sowohl CD4⁺ T-Helferzellen als auch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen durch diese aktiviert und damit alloreaktiv werden (Nimer *et al.*, 1994; Herrera *et al.*, 1999).

CD4⁺ Spender-T-Zellen werden durch exogene mHAs des Empfängers aktiviert. Hierbei nehmen APCs des Spenders oder des Empfängers über die Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen Zellen des Empfängers alloreaktive mHAs auf und präsentieren diese über MHC-II-Komplexe (Shlomchik *et al.*, 1999).

CD8⁺ Spender-T-Zellen werden hingegen durch endogene mHAs aktiviert, die ausschließlich auf der Oberfläche der Empfänger-Zellen über MHC-I-Komplexe präsentiert werden, aktiviert (Koyama and Hill, 2016).

Da also sowohl alloreaktive CD4⁺ T-Helferzellen als auch alloreaktive CD8⁺ zytotoxische T-Zellen durch mHAs aktiviert werden, sind beide Populationen an der Entstehung einer GvHD beteiligt (Herrera *et al.*, 1999; Arora *et al.*, 2009).

Bei „ungematchten“ Transplantationen hingegen werden alloreaktive Spender-T-Zellen hauptsächlich durch „fremde“ MHC-Komplexe aktiviert (Reiser *et al.*, 2000; Macdonald *et al.*, 2009). Durch die bestehende HLA-Inkompatibilität werden 1-10 % der Spender-T-Zellen durch APCs des Empfängers aktiviert (Colf *et al.*, 2007).

Neben diesem direkten Weg der T-Zell-Aktivierung können Spender-T-Zellen auch indirekt aktiviert werden. Dies geschieht wie bei der gematchten SZT über die Präsentation von mHAs (Chakraverty and Sykes, 2007). Auch hier ist die T-Zell-Aktivierung sowohl MHC-I- als auch MHC-II-vermittelt (Shlomchik *et al.*, 1999; Teshima *et al.*, 2002).

Die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen im Rahmen der Pathogenese einer GvHD ist in Abbildung 2 nochmals schematisch dargestellt.

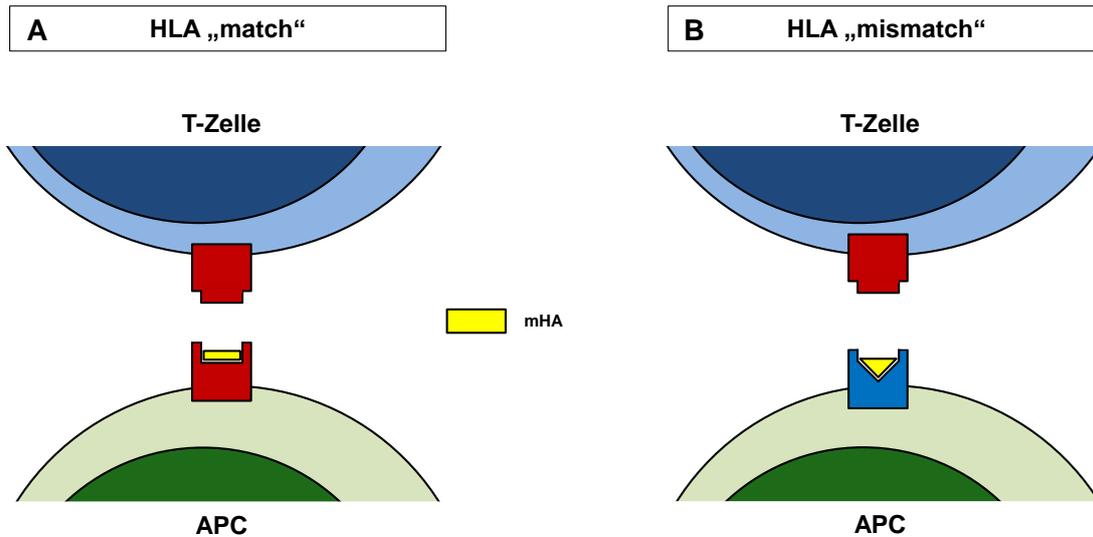


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung alloreaktiver T-Zellen bei der Pathogenese einer GvHD

(A) Bei einer HLA „gematchten“ SZT erkennen T-Zellen des Spenders mHAs des Empfängers als fremd, die ihnen über einen MHC präsentiert werden, der sowohl auf Spender- und Empfänger-APCs identisch exprimiert wird.

(B) Bei der „ungematchten“ SZT werden Spender-T-Zellen hauptsächlich dadurch aktiviert, indem sie fremde MHC-Komplexe des Empfängers erkennen. Spender-T-Zellen können ebenfalls wie in „gematchten“ SZTs durch mHAs aktiviert werden (A), allerdings spielt dies bei der „ungematchten“ SZT eine untergeordnete Rolle.

verändert nach Koyama *et al.*, Blood 2016

Bereits mehrere Studien haben untersucht, ob Spender-APCs, Empfänger-APCs oder beide Populationen für die Initiation einer GvHD von Nöten sind. Dabei zeigte sich, dass nur APCs des Empfängers alleine in der Lage sind, eine GvHD robust zu induzieren (Shlomchik *et al.*, 1999; Koyama *et al.*, 2012)

Spender-APCs hingegen waren ausschließlich imstande, eine bestehende GvHD zu verstärken, diese jedoch nicht alleine zu initiieren (Matte *et al.*, 2004; Koyama *et al.*, 2012).

In der Hoffnung, durch die Depletion bestimmter Subpopulationen von APCs die Entstehung einer GvHD zu verhindern, versuchten weitere zu Studien klären, welche APCs im Speziellen für die Initiation einer GvHD verantwortlich sind.

Durch den Transfer von DCs in MHC-defiziente Mäuse konnte gezeigt werden, dass Empfänger-DCs alleine fähig sind, eine GvHD auszulösen (Duffner *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse sind von hoher Relevanz, da DCs im Rahmen der Konditionierung mit Ganzkörperbestrahlung (TBI) aktiviert werden und im Körper verbleiben, was ein erhöhtes GvHD-Risiko im Vergleich zu den anderen Konditionierungsprotokollen mit

sich bringt (Zhang *et al.*, 2002). Andere APCs, wie in etwa B-Zellen, waren in ähnlichen Studien nicht in der Lage, eine GvHD eigenständig zu induzieren (Koyama *et al.*, 2009).

Studien mit immunkompetenten Mäusen, in denen CD11c+ DCs konditional ausgeknockt wurden, zeigten jedoch, dass CD11c+ DCs nicht zwingend benötigt werden, um eine GvHD auszulösen (Li *et al.*, 2011; Koyama *et al.*, 2012). Offensichtlich waren in diesem Fall andere Zellen in der Lage, eine GvHD zu induzieren: Vor allem nicht-professionelle APCs wie Fibroblasten und Epithelzellen, welche durch die Konditionierung aktiviert werden, stellen sehr effektive Induktoren einer GvHD dar (Kündig *et al.*, 1995; Hershberg *et al.*, 1998; Toubai *et al.*, 2012).

1.2.2 Klinik und Therapie

Im klinischen Alltag unterscheidet man - abhängig vom zeitlichen Auftreten - die akute GvHD (aGvHD, < 100 Tage nach allogener SZT) von der chronischen GvHD (cGvHD, > 100 Tage nach allogener SZT). Zusätzlich zu dieser rein zeitlichen Einordnung dienen seit 2005 auch klinische Parameter der Unterscheidung der aGvHD von der cGvHD.

Typischerweise äußert sich eine aGvHD durch eine Entzündung und Nekrose der Haut (Dermatitis), der Leber (Hepatitis) und des Magen-Darm-Trakts (Gastroenteritis), während eine cGvHD eher dem Krankheitsbild einer spontanen Autoimmunerkrankung oder einer Sklerodermie ähnelt. Die betroffenen Organe sind dabei meist die Haut, die Augen, der Mund und die Gelenke der Patienten.

Eine aGvHD begünstigt häufig das Auftreten einer cGvHD. Zudem besteht die Möglichkeit, dass akute und chronische GvHD zeitgleich auftreten (*overlapping* GvHD). Die aGvHD wird anhand der Glucksberg-Kriterien nach ihrem Schweregrad in die Stadien I-IV eingeteilt (Przepiorka *et al.*, 1995). Die cGvHD kann anhand der Seattle-Kriterien und der Kriterien des National Institutes of Health (NIH) in eine milde, moderate und schwere chronische GVHD unterteilt werden (Lee *et al.*, 2004; Filipovich *et al.*, 2005).

Eine aGvHD tritt auch heute noch bei ca. 50 % aller Patienten mit allogener HLA-kompatibler SZT auf und kann zu erheblichen Gewebe- und Organschäden führen, welche bei Therapieresistenz sogar tödlich enden (Ferrara *et al.*, 2009). Um die Entstehung einer GvHD zu verhindern, werden Patienten vor einer Transplantation

nach Leitlinientherapie der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V. (DAG-KBT) prophylaktisch mit den Immunsuppressiva Cyclosporin A oder Tacrolimus in Kombination mit Methotrexat oder Mycophenolat behandelt (Storb R *et al.*, 1986).

Cyclosporin A und Tacrolimus wirken durch die Blockade von Calcineurin immunsuppressiv und verhindern somit die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen (Huai *et al.*, 2002). Methotrexat hingegen ist ein Folsäureantagonist und wirkt zytostatisch (Allegra *et al.*, 1985). Mycophenolat hemmt die Bildung von Purinen, die für die Proliferation von B- und T-Zellen unerlässlich sind (Allison and Eugui, 2005). Eine noch effektivere Immunsuppression kann durch die Gabe von Anti-T-Zell-Immunglobulinen erreicht werden (Finke *et al.*, 2009). Diese binden spezifisch an T-Zellen und depletieren diese (Mohty, 2007). Alle nach aktueller Leitlinie ergriffenen Prophylaxemaßnahmen zielen somit primär auf eine breite Inhibition der T-Zell-Antwort ab.

Entwickeln Patienten trotz erfolgter Prophylaxe eine GvHD, wird diese entsprechend der DAG-KBT-Leitlinie immunsuppressiv mit intravenösem Cyclosporin A und Mycophenolat sowie anti-inflammatorisch durch die Gabe des Glucocorticoids Prednisolon behandelt. Trotzdem sterben 15-20 % aller allogenen Stammzell-transplantierten Patienten an einer nicht behandelbaren refraktären GvHD, weshalb mit Nachdruck nach neuen Strategien zur Prävention und Therapie der GvHD gesucht wird (Blazar *et al.*, 2012; Anasetti *et al.*, 2012).

Die stark immunsuppressive Therapie der GvHD ist mit schweren Nebenwirkungen verbunden. Zum einen steigt die Wahrscheinlichkeit für opportunistische Infektionen und die natürliche Immunrestitution wird behindert (Martinez and Urbano-Ispizua, 2011). Zum anderen führt eine Unterdrückung der T-Zell-Aktivität unweigerlich zu einer Reduktion des GvL-Effekts und somit zu einem erhöhten Rezidivrisiko (Zhang *et al.*, 2018). Die Balance zwischen GvHD und GvL stellt klinisch gesehen die Hauptherausforderung nach einer SZT dar. Bei der Suche nach neuen Therapieoptionen wird die Entkopplung von GvH und GvL angestrebt. Unter diesem Aspekt wird auch eine mögliche Therapie der GvHD auf Basis von invarianten natürlichen Killer-T-(iNKT)-Zellen evaluiert.

1.3 iNKT-Zellen

Bei iNKT-Zellen handelt es sich um T-Zellen, die dadurch definiert sind, dass sie alle einen semi-invarianten T-Zellrezeptor (TCR) besitzen mit dem sie anders als konventionelle T-Zellen keine Peptide, sondern Glykolipide, die ihnen über das MHC-I-ähnliche Molekül CD1d präsentiert werden (Bendelac, 1995). Der TCR humaner iNKT-Zellen setzt sich aus der V α 24Ja18- α -Kette und der V β 11- β -Kette zusammen (Lantz, 1994). In iNKT-Zellen von Mäusen paart sich die TCR-V α 14Ja18- α -Kette mit den TCR- β -Ketten V β 8, V β 7 oder V β 2 (Koseki *et al.*, 1990). Neben iNKT-Zellen, welche auch als Typ I NKT-Zellen bezeichnet werden, gibt es außerdem Typ II NKT-Zellen. Diese zeigen eine höhere Variabilität in ihrem TCR-Repertoire und sind bisher weniger gut charakterisiert (Lantz, 1994). Diese Arbeit befasst sich ausschließlich mit iNKT-Zellen des Typs I.

Zusätzlich zu ihrem semi-invarianten TCR exprimieren iNKT-Zellen typische Marker von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), wie beispielsweise KLRB1, NKG2D und NCAM-1 (Makino *et al.*, 1995). Da iNKT-Zellen bereits Minuten nach ihrer Aktivierung große Mengen an Zytokinen freisetzen können und damit zahlreiche Immunantworten beeinflussen, werden sie als „*innate-like*“ Immunzellen bezeichnet (Godfrey and Kronenberg, 2004). In gesunden Erwachsenen beträgt der Anteil der iNKT-Zellen an den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) durchschnittlich 0,1-0,2 % (Gumperz *et al.*, 2002).

1.3.1 Entwicklung, Subpopulationen und Funktionen von iNKT-Zellen

iNKT-Zellen entwickeln sich wie konventionelle T-Zellen im Thymus aus TCR-rearrangierten CD4-CD8- Vorläuferzellen. Im CD4+CD8+-Stadium werden iNKT-Zellen mit semi-invariantem TCR durch CD1d+ kortikale Thymozyten positiv selektiert und beginnen daraufhin mit der Expression ihres Master-Transkriptionsfaktors PLZF (Benlagha *et al.*, 2005; Kovalovsky *et al.*, 2008). Anschließend migrieren iNKT-Zellen aus dem Thymus in ihre Zielorgane, wo sie vollständig ausdifferenzieren und gewebespezifisch verbleiben (Mackay *et al.*, 2016).

In der Peripherie werden iNKT-Zellen durch die Erkennung von Glykolipiden aktiviert. Das erstbeschriebene und heute prototypische von iNKT-Zellen erkannte Glykolipid ist α -Galactosylceramide (α -GalCer) (Kawano *et al.*, 1997). Dieses wurde aus dem

marinen Schwamm *Agelas mauritianus* isoliert, stammt ursprünglich wahrscheinlich aber aus Proteobakterien (Brennan *et al.*, 2013). Synthetisch hergestelltes α -GalCer wird unter dem Namen KRN7000 vertrieben. Ein als PBS-44 bekanntes α -GalCer-Derivat ist durch eine ungesättigte Bindung in der Acylkette besser in Wasser löslich. Eine weitere Verbesserung wurde in dem Analogon PBS-57 mit einer zusätzlichen Acetamid-Gruppe am C6-Atom der Galaktose erreicht (Freigang *et al.*, 2012). Mit PBS-57 beladene CD1d-Moleküle wurden im Jahr 2006 von Liu *et al.* tetramerisiert und wahlweise mit den Fluorochromen APC, FITC oder PE gelabelt. Diese Fluorochrom-markierten PBS-57-Tetramere werden vom semi-invarianten TCR der iNKT-Zellen spezifisch gebunden, was eine präzise, durchflusszytometrische Identifikation von iNKT-Zellen ermöglicht (Liu *et al.*, 2006).

Neben α -GalCer sind iNKT-Zellen auch in der Lage, andere ceramid-basierte und glycerol-basierte Glykolipide zu erkennen. Dabei kann es sich sowohl um Fremd- als auch Eigenantigene handeln. Bakterielle Glykolipid-Antigene wurden beispielsweise in *Borrelia burgdorferi* (Kinjo *et al.*, 2006) und *Streptococcus pneumoniae* (Kinjo *et al.*, 2011) gefunden. Ein potenzielles Selbstantigen von iNKT-Zellen stellt Isoglobotrihexosylceramide (iGb3) dar (Zhou *et al.*, 2004). Da iGb3 allerdings von den meisten Menschen nicht synthetisiert wird, lässt dessen biologische Relevanz fraglich erscheinen (Christiansen *et al.*, 2008). Aus dem humanen Thymus wurde das iNKT-aktivierende Glykolipid plasmalogenes lysophosphatidylethanolamin (plasmalogenes lysoPE) identifiziert (Facciotti *et al.*, 2012). Dieses dient möglicherweise als Selbstantigen bei der Positivselektion während der Entwicklung von iNKT-Zellen. Ob dieses auch bei der Aktivierung von iNKT-Zellen in der Peripherie eine Rolle spielt, ist aktuell noch ungeklärt. Die Präsentation von Glykolipiden findet dabei immer über das hoch-konservierte, monomorphe, und MHC-I-ähnliche Molekül CD1d statt, welches vor allem von professionellen APCs wie DCs, Monozyten und Makrophagen, aber auch B-Zellen, Epithelzellen und Parenchymzellen exprimiert wird (Brigl and Brenner, 2004).

Humane iNKT-Zellen können in CD4-CD8-, CD4+CD8- und CD4-CD8+ Populationen unterteilt werden. In Mäusen existieren dagegen nur CD4-CD8- und CD4+CD8- iNKT-Zellen (Brennan *et al.*, 2013). Während CD4+CD8- iNKT-Zellen Th1- und Th2-Zytokine freisetzen können, sezernieren CD4-CD8- iNKT-Zellen fast ausschließlich Th1-Zytokine (Lee *et al.*, 2002). Das Zytokinprofil CD4-CD8+ iNKT-Zellen ähnelt sehr stark dem von CD4-CD8- iNKT-Zellen, außer dass CD4-CD8+ iNKT-Zellen weniger IL-4

produzieren (Takahashi *et al.*, 2002). CD4-CD8+ und CD4-CD8- iNKT-Zellen werden deshalb zytolytische Eigenschaften zugeschrieben, während CD4+CD8- iNKT-Zellen eher als immunregulatorisch angesehen werden (O'Reilly *et al.*, 2011). Die Aufgaben und Eigenschaften von iNKT-Zellen sind allerdings nicht strikt, sondern eher plastisch (Berzins *et al.*, 2011). Anhand ihres Zytokinprofils, ihrer Oberflächenmarker und ihrer Transkriptionsfaktoren können iNKT-Zellen analog zu T-Zellen zusätzlich in Th1-like, Th2-like und Th17-like iNKT-Zellen unterteilt werden (Niemeyer *et al.*, 2008).

iNKT-Zellen werden in der Literatur als Regulatoren zahlreicher Immunantworten beschrieben und setzen dazu beispielsweise die Zytokine IFN- γ , TNF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21 und GM-CSF frei (Coquet *et al.*, 2008). Zumeist geht dem eine Aktivierung der iNKT-Zellen auf Basis einer direkten TCR-CD1d-Interaktion voraus. iNKT-Zellen können somit regulatorischen Einfluss auf DCs, NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen nehmen (Abbildung 3) (Schmieg *et al.*, 2003; Kawakami *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2003; Fujii *et al.*, 2004; Leadbetter *et al.*, 2008; De Santo *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2012).

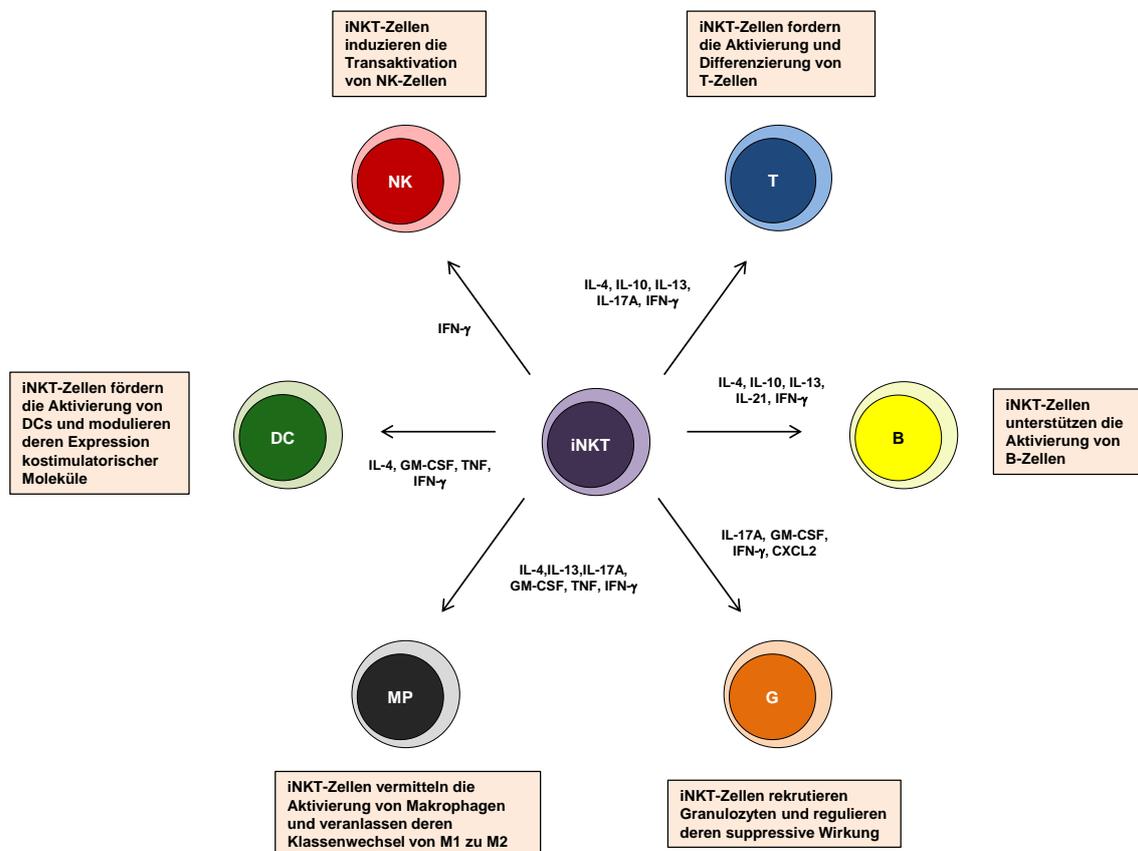


Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Rolle von iNKT-Zellen bei der Regulation von Immunantworten im Zusammenspiel mit anderen Immunzellen

Hier dargestellt sind bekannte Interaktionen von iNKT-Zellen mit NK-Zellen (NK), T-Zellen (T), B-Zellen (B), Granulozyten (G), Makrophagen (MP) und DCs sowie die zur Interaktion verwendeten Zytokine.

verändert nach Brennan *et al.*, Nature Reviews Immunology 2013

Dass iNKT-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunregulation zukommt, zeigen Studien an iNKT-Zell-defizienten Mäusen, die zwar prinzipiell gesund sind, jedoch eine Prädisposition zur Entwicklung von Autoimmunerkrankheiten und Krebs sowie eine deutliche Beeinträchtigung der Immunabwehr von Pathogenen aufweisen (Berzins *et al.*, 2011).

1.3.2 iNKT-Zellen in der GvHD-Prävention

1.3.2.1 Studien im Mausmodell

Daten verschiedener Mausstudien mit der Verwendung unterschiedlichster Mausmodelle zeigten, dass iNKT-Zellen in der Lage sind, die Entstehung einer GvHD nach allogener SZT zu reduzieren. Die Arbeitsgruppe von Samuel Strober konnte demonstrieren, dass Empfänger-iNKT-Zellen in stammzelltransplantierten Mäusen, nach vorheriger intensitätsreduzierter Konditionierung (engl.: *reduced intensity conditioning*; RIC) mit totaler Lymphozythenbestrahlung (engl.: *total lymphocyte irradiation*; TLI) und Anti-Thymozythen-Globulingabe (ATG) relativ expandieren und so das Auftreten einer GvHD verringern, ohne dabei den GVL-Effekt zu limitieren (Lan *et al.*, 2003; Pillai *et al.*, 2007). iNKT-Zellen bewerkstelligten diese Prävention einer GvHD durch eine IL-4-abhängige Expansion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) (Pillai *et al.*, 2009). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in Transplantationsversuchen mit vorheriger Ganzkörperbestrahlung (Haraguchi *et al.*, 2005).

Ein anderer Ansatz, um den Effekt von iNKT-Zellen nach allogener SZT zu überprüfen, war die Gabe des iNKT-Zell-Stimulans α -GalCer am Tag der Transplantation. Die Applikation von α -GalCer führte in mehreren Studien zu einer signifikant reduzierten GvHD-Inzidenz (Morecki *et al.*, 2004; Hashimoto *et al.*, 2005; Duramad *et al.*, 2011). Auch hier zeigte sich eine Aktivierung und Expansion von Tregs sowie eine IL-4- und STAT6-vermittelte Th2-Polarisierung von Spender-T-Zellen.

Auch der adoptive Transfer von iNKT-Zellen konnte im Mausmodell die Entstehung einer GvHD nach allogener SZT verhindern. Transferierte CD4⁺ iNKT-Zellen migrierten hierbei wie konventionelle T-Zellen in die Lymphknoten und GvHD-typische Zielorgane. Dort verhinderten sie das Auftreten einer GvHD bei persistierendem GvL-Effekt (Schneidawind *et al.*, 2014; Schneidawind *et al.*, 2015). iNKT-Zellen für den adoptiven Transfer können dabei sowohl vom Spender, vom Empfänger als auch von einer dritten Partei stammen (Schneidawind *et al.*, 2015). Mechanistisch wurde die iNKT-Zell-vermittelte GvHD-Prävention auch beim adoptiven Transfer auf eine Expansion von Tregs und die Th2-Polarisation von T-Zellen zurückgeführt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass iNKT-Zellen in allen gezeigten Mausmodellen eine GvHD verhindern konnten. Die iNKT-Zell-vermittelte Toleranz wurde immer im Zusammenhang mit einer Expansion von Tregs beobachtet. Häufig zeigte sich auch eine Induktion von Th2-polarisierten T-Zellen.

1.3.2.2 Humane Studien

Nicht nur Mausstudien, sondern auch humane klinische und präklinische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen iNKT-Zellen und der Prävention einer GvHD nach allogener SZT.

Eine der ersten humanen Studien zu diesem Thema untersuchte die Korrelation der iNKT-Zell-Rekonstitution und des Auftretens einer GvHD nach allogener SZT (Haraguchi *et al.*, 2004). Dabei wurde die Anzahl an iNKT-Zellen im peripheren Blut von Patienten bestimmt, welche zuvor myeloablativ und ohne T-Zell-Depletion konditioniert wurden. In der Studienpopulation der knochenmarktransplantierten Patienten korrelierte die Anzahl an iNKT-Zellen im Blut negativ mit der GvHD-Inzidenz. Im Gegensatz dazu waren beim Auftreten einer GvHD sowohl CD4⁺ als auch CD4⁻ iNKT-Zellen signifikant reduziert.

Da das in der Arbeitsgruppe von Strober verwendete RIC mit TLI und ATG-Gabe in Mausstudien in einer relativen Expansion von iNKT-Zellen und damit einer Reduktion der GvHD-Inzidenz resultierte, sollte dieses im Rahmen einer klinischen Studie an Patienten getestet werden (Lowsky R *et al.*, 2005). Im Verlauf dieser Studie erkrankten nur 2 von 37 Patienten an einer aGvHD. 62 % der Patienten erlangten eine komplette Remission, was eine deutliche Verbesserung gegenüber den bisher angewendeten RIC-Regimen darstellte. Außerdem wiesen Patienten dieser Studienpopulation eine

10-fach höhere Expansion von iNKT-Zellen im Vergleich zu standardmäßig konditionierten Patienten auf. Im Rahmen einer Validierungsstudie wurden weitere 111 Patienten untersucht (Kohrt *et al.*, 2009). Auch hier zeigte sich unter dem Einsatz der RIC mit TLI und ATG-Gabe eine äußerst geringe aGvHD-Rate von nur 5,4 %.

Auch für einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an im Transplantat enthaltenen iNKT-Zellen und der Entstehung einer GvHD gibt es eine überzeugende Datenlage. Chaidos und Kollegen konnten in einer Kohorte von 78 Geschwisterspendern zeigen, dass die Anzahl an CD4- iNKT-Zellen die einzige Zellpopulation im Transplantat war, welche mit dem Auftreten einer GvHD negativ korrelierte (Chaidos *et al.*, 2012). Interessanterweise spielte in dieser Studie die im Transplantat enthaltene Anzahl an Tregs keine Rolle für die Ausprägung einer aGvHD.

Auch Rubio *et al.* kamen bei der Untersuchung einer Kohorte von 117 nicht verwandten Patienten-Spender-Paaren zu den gleichen Ergebnissen (Rubio *et al.*, 2017).

Eine weitere Studie mit 80 Patienten bestätigte, dass eine höhere Anzahl an iNKT-Zellen im Transplantat mit einem signifikant höheren GvHD-freien Überleben verbunden war, die Anzahl der Tregs jedoch nicht mit einer geringeren GvHD-Inzidenz zusammenhing (Malard *et al.*, 2016). Patienten, deren Transplantate weniger iNKT-Zellen als im Median enthielten, zeigten ein signifikant reduziertes GvHD-freies Überleben nach 2 Jahren.

Um das therapeutische Potenzial einer gezielt herbeigeführten Erhöhung der iNKT-Zellzahl zu testen, wurde im Rahmen einer Phase 2A Studie mit 29 Patienten liposomales α -GalCer mit dem Namen RGI-2001 am Tag der Transplantation einmalig appliziert (Chen *et al.*, 2017). Bei der Auswertung zeigte sich jedoch keine signifikante Expansion von iNKT-Zellen.

Zusammenfassend wird aus diesen klinischen Studien deutlich, dass sowohl eine schnellere Rekonstitution von iNKT-Zellen nach allogener SZT als auch eine höhere Anzahl an iNKT-Zellen im Transplantat mit einer geringeren GvHD-Rate einhergeht. Anders als im Mausmodell konnte dabei der Effekt der iNKT-Zell-vermittelten Toleranzinduktion nicht eindeutig mit der Expansion von Tregs in Verbindung gebracht werden.

1.3.3 iNKT-Zellen in der Tumorthherapie

In der Tumorthherapie könnten iNKT-Zellen eingesetzt werden, da sie anti-tumorale Effekte durch direkte und indirekte Mechanismen vermitteln. Die direkte Lyse von Tumorzellen bewirken aktivierte iNKT-Zellen durch die Freisetzung von Perforin und verschiedenen Granzymen aus ihren Granula (Dao *et al.*, 1998).

Die Aktivierung von iNKT-Zellen findet dabei durch CD1d+ Tumorzellen statt (Bassiri *et al.*, 2014).

Außerdem können iNKT-Zellen Tumorzellen auch zellkontaktabhängig über die Todesliganden FASL, TRAIL und NKG2D eliminieren (Wingender *et al.*, 2010; Kuylenstierna *et al.*, 2011). Indirekte anti-tumorale Effekte vermitteln iNKT-Zellen durch die Aktivierung von zytotoxischen NK-Zellen und CD8+ T-Zellen über IFN- γ (Crowe *et al.*, 2002).

Auf Basis entsprechender Effektivitätsnachweise *in vitro* und in Mausstudien wurden iNKT-Zellen bereits im Rahmen von Patientenstudien zur Tumorkontrolle eingesetzt (Toura *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2001).

In der klinischen Anwendung stellt die Injektion von α -GalCer in Krebspatienten einen möglichen Ansatz dar. Dabei sollen im Körper befindliche iNKT-Zellen aktiviert werden, um das Potenzial ihrer anti-tumoralen Eigenschaften auszunutzen. In Patienten zeigte die Administration von α -GalCer zwar keine Nebenwirkungen, anders als im Mausmodell war allerdings keine effektive Anti-Tumor-Kontrolle zu beobachten (Giaccone *et al.*, 2002; Hayakawa *et al.*, 2003).

Eine Erklärung dafür ist, dass iNKT-Zellen möglicherweise nach ihrer Aktivierung aufgrund fehlender Kostimulation inert werden und somit in ihrer Anti-Tumor-Wirkung limitiert sind. Die notwendige Kostimulation könnte durch die simultane Injektion von mit α -GalCer beladenen DCs erzielt werden. In Phase I-Studien zeigten sich in Probanden nach einer Behandlung mit α -GalCer-beladenen DCs neben einer guten Verträglichkeit erhöhte IL-12- und IFN- γ -Spiegel, was für eine effektive Aktivierung von iNKT-Zellen sprach (Nieda *et al.*, 2004). In einer weiteren Studie mit demselben Ansatz konnte zudem eine sekundäre Aktivierung von B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen und eine Reduktion tumor-assoziiertes Immunglobulins nachgewiesen werden (Richter *et al.*, 2013).

Ein Ansprechen dieses iNKT-Zell-stimulierenden Therapieansatzes ist jedoch ausschließlich in Patienten mit einer suffizienten Menge eigener iNKT-Zellen erfolgversprechend.

Der adoptive Transfer *ex vivo* expandierter iNKT-Zellen ist dagegen für alle Patienten eine praktikable Therapieoption. Die Reinfusion von expandierten iNKT-Zellen in einer Phase-I-Studie blieb ohne erkennbare Nebenwirkungen für den Patienten und resultierte in einer Aktivierung anderer Immunzellpopulationen (Exley *et al.*, 2017). Große Erfolge zeigte in einer klinischen Studie für Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren die Kombination beider Ansätze. Die zeitgleiche Applikation von expandierten iNKT-Zellen und mit α -GalCer-beladenen DCs führte in 50 % der Patienten zu einem verbesserten klinischen Ergebnis (Uchida *et al.*, 2008).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in humanen Zellkulturexperimenten mit Primärzellen überprüft werden, ob expandierte iNKT-Zellen in der Lage sind, die Entstehung einer GvHD zuverlässig zu verhindern. Ein weiteres Ziel war die Aufklärung der immunbiologischen Mechanismen, die der Toleranzinduktion durch iNKT-Zellen zugrunde liegen. Zudem sollte das anti-leukämische Potenzial expandierter iNKT-Zellen ermittelt werden. Die daraus gewonnenen Ergebnisse sollen als Grundlage für eine mögliche zelluläre Therapie für die GvHD-Prävention auf Basis von iNKT-Zellen dienen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Absaugpumpe, Vacusafe	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Amnis® ImageStream®XMk II	Amnis/Luminex, Austin TX, USA
BD FACS Aria	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
BD FACS LSR-Fortessa	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
BD FACS Lyric mit Autosampler	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Brutschrank, HeraCell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
Kühlschrank +4° C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
-20° C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
-80° C	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Laborabzug	Waldner, Wangen, Deutschland
MACS Magnet, quadroMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter, MP220	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipetteboy accu-jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Stepper Pipette, Handy-Step	Brand, Wertheim, Deutschland
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstofftank, Chronos 420	Cryotherm, Kirchen, Deutschland
Tischwaage	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
Vortexer	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen, Megafuge 1.0R Multifuge X3R	Unitylab, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

2.1.2 Glas- und Plastikwaren

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Glas- und Plastikwaren

Glaswaren	
Glasware	Hersteller
Bechergläser	Schott, Mainz, Deutschland
Glasflaschen (250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l)	Schott, Mainz, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Plastikwaren	
Plastikware	Hersteller
Combi-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Brand, Wertheim, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Einmalspritzen	Braun, Wertheim, Deutschland
FACS-Röhrchen	Falcon, Corning, New York, USA
MACS-Säulen (LS, LD, MS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Pipettenspitzen (1250 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl)	Biosphere, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland TipOne, Starlap, Milton Keynes, Großbritannien Nerbepius, Winsen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten (50 ml, 25 ml, 10 ml, 2 ml)	Corning, New York, USA
Sterilfilter (0,20 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Insert 24 well PET 0,4 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellfilter (0,70 µm)	Falcon, Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen (25 cm ³ , 75 cm ³)	Falcon, Corning, New York, USA
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well) TC-behandelt, Flachboden, Rundboden, V-Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland Corning, New York, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland Falcon, Corning, New York, USA

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Biocoll Separating Solution (1,077 g/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors)	eBioscience Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's PBS	gibco, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA
FBS	Biochrom, Berlin, Deutschland

FcR Blocking Reagent	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Hepes Buffer	gibco, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Minimum Essential Medium	gibco, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Natrium Citrate	Merck, Darmstadt, Deutschland
One Comp Beads	eBioscience Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Lonza, Verviers, Belgien
Polystyrene Latex beads	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propidium Iodide	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
RPMI Medium 1640 + GlutaMAX	gibco, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Sodium Pyruvate	gibco, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Staurosporine	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20 (Polysorbat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Antikörper, Tetramere, Lebend/Tot-Farbstoffe

2.1.4.1 Antikörper, Tetramere und Lebend/Tot-Farbstoffe für durchflusszytometrische Analysen

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper, Lebend/Tot-Farbstoffe und Tetramere für durchflusszytometrische Färbungen

Extrazelluläre Antikörper				
Antikörper	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
CD1c	L161	APC-Cy7	1:20	Biologend, Koblenz, Deutschland
CD3	HIT3a	APC	1:100	Biologend, Koblenz, Deutschland
CD3	HIT3a	PerCP-Cy 5.5	1:400	Biologend, Koblenz, Deutschland
CD3	OKT3	BV605	1:400	Biologend, Koblenz, Deutschland
CD4	RPA-T4	BV421	1:400	Biologend, Koblenz, Deutschland
CD8	HIT8a	FITC	1:600	Biologend, Koblenz, Deutschland
CD8	HIT8a	AF700	1:200	Biologend, Koblenz, Deutschland
CD11c	MJ4-27G12	APC	1:50	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD14	M5E2	BV785	1:100	Biologend, Koblenz, Deutschland

CD20	2H7	BV510	1:200	Biolegend, Koblenz, Deutschland
CD25	BC96	BV711	1:40	Biolegend, Koblenz, Deutschland
CD34	4H11	APC	1:50	Biolegend, Koblenz, Deutschland
CD56	HCD56	BV510	1:50	Biolegend, Koblenz, Deutschland
CD127	A019D5	PE-Cy7	1:200	Biolegend, Koblenz, Deutschland
CD303	201a	PerCP-Cy 5.5	1:20	Biolegend, Koblenz, Deutschland
CD1d	51.1	PE	1:100	Biolegend, Koblenz, Deutschland
HLA-DR	L243	BV650	1:100	Biolegend, Koblenz, Deutschland
HLA-DR	L243	APC-Cy7	1:100	Biolegend, Koblenz, Deutschland
Intrazelluläre Antikörper				
Antikörper	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
IFN- γ	4S.B3	APC	1:100	eBioscience Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
IL-10	JES3-19F1	APC	1:100	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
IL-4	MP4-25D2	APC	1:100	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Tetramere				
Tetramer	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
CD1d-PBS57-Tetramer	-	PE	1:1000	NIH Tetramer Core Facility, Atlanta, GA, USA
CD1d-PBS57-Tetramer	-	APC	1:1000	NIH Tetramer Core Facility, Atlanta, GA, USA
Annexin PI Färbung				
Antikörper/ Lebend/Tot-Farbstoff	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
Annexin V	-	FITC	1:40	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
PI	-	-	1:20	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Lebend/Tot-Farbstoffe				
Lebend/Tot-Farbstoff	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
7-AAD	-	-	1:40	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Fixable viability dye eFluor506	-	-	1:1000	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Fixable viability dye eFluor 780	-	-	1:1000	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

2.1.4.2 Blockierende Antikörper/Reagenzien und IgG Kontrollen

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten blockierenden Antikörper/Reagenzien

Antikörper/Reagenzien			
Antikörper/Reagenzien	Klon	Konzentration	Hersteller
CD1d	51.1	10 µg/ml	Biologend, Koblenz, Deutschland
CMA	-	100nM	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FASL	NOK-1	5 µg/ml	Biologend, Koblenz, Deutschland
NKG2D	149810	5 µg/ml	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
TRAIL	RIK-2	10 µg/ml	Biologend, Koblenz, Deutschland
Transport Inhibition Cocktail eBioscience 500x	-	1x	eBioscience Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
ZVAD-FMK	-	100µM	AdooQ Bioscience, Irvine, CA, USA
IgG Kontrollen			
Antikörper/Reagenzien	Klon	Konzentration	Hersteller
Mouse IgG1, k LEAF	-	entsprechend der Antikörperkonzentration	Biologend, Koblenz, Deutschland
Mouse IgG2b,k LEAF	-	entsprechend der Antikörperkonzentration	Biologend, Koblenz, Deutschland

2.1.5 Zytokine und Stimulanzen

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Zytokine und Stimulanzen

Zytokine		
Zytokin	Konzentration	Hersteller
GM-CSF	200 µg/ml	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
hIL-2	100 IE/ml	Novartis, Nürnberg, Deutschland
hIL-4	100 µg/ml	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Stimulanzen		
Stimulans	Konzentration	Hersteller
Dynabeads™	für 1x10 ⁶ T-Zellen 25µl Beads	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
KRN7000	100 ng/ml	Abcam, Berlin, Deutschland
PBS-44	100 ng/ml	erhalten von Paul Savage, BYU, Utah, USA
PBS-57	100 ng/ml	erhalten von Paul Savage, BYU, Utah, USA

2.1.6 Gebrauchsfertige Kits

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten gebrauchsfertigen Kits

Kit	Hersteller
AnnexinV-FITC/PI Kit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-iNKT-Microbeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Blood DC Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD19 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD3 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD34 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CFSE Cell Division Tracker Kit	Biolegend, Koblenz, Deutschland
Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
LEGENDplex™ Human CD8/NK 13-plex	Biolegend, Koblenz, Deutschland
NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.7 Verwendete Zelllinien und primäre Zellen

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Zelllinien und primären Zellen

Zelllinien		
Zellen	Charakteristik	Bezogen von:
K562	Zelllinie CML	ATCC, Manassas, VA, USA
Jurkat	Zelllinie t-ALL	ATCC, Manassas, VA, USA
Molt-4	Zelllinie t-ALL	ATCC, Manassas, VA, USA
THP-1	Zelllinie AML	ATCC, Manassas, VA, USA
Primäre Zellen		
Zellen	Charakteristik	Bezogen von:
PBMCs	Aus Buffy Coats, Nabelschnurblut und Knochenmark	Transfusionsmedizin, Frauenklinik, DKMS, Tübingen, Deutschland
Primäre AML BE-3	FAB M1 Blasten: 99 %	AG Salih, Tübingen, Deutschland
Primäre AML EE-3	FAB M1 Blasten: 95 %	AG Salih, Tübingen, Deutschland
Primäre AML EF-2	FAB M5 Blasten: 99 %	AG Salih, Tübingen, Deutschland
Primäre AML GA-3	FAB M5 Blasten: 91 %	AG Salih, Tübingen, Deutschland
Primäre AML MV-1	FAB M1 Blasten: 94 %	AG Salih, Tübingen, Deutschland
Primäre AML SR-6	FAB M5 Blasten: 92 %	AG Salih, Tübingen, Deutschland

2.1.8 Medien und Puffer

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Medien und Puffer

Medium	
Medium/Puffer	Zusammensetzung
Einfriermedium	RPMI 1640+Glutamax 20 % FBS 10 % DMSO
iNKT-Medium	RPMI 1640+Glutamax 10 % FBS 5,5 µM 2-ME 0,1 mM MEM NEAA 1 mM Natrium-Pyruvate 100 IE PenStrep 10 mM HEPES
Mo-DC-Medium	RPMI 1640+Glutamax 10 % FBS 0,08 % µM 2-ME 0,1 mM MEM NEAA 1 mM Natrium-Pyruvate 100 IE PenStrep
RPMI-Medium	RPMI 1640+Glutamax 10 % FBS
Puffer	
Medium/Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS 2 % FBS
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA
PI RNASE-Färbepuffer	69 µM PI 38 mM Natrium Citrat RNase 100 µg/ml

2.2 Methoden

2.2.1 Generierung primärer Zellen für Zellkulturexperimente

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von iNKT-Zellen auf die Alloreaktivität von T-Zellen sowie deren antitumoralen Eigenschaften analysiert werden. Dazu wurden Zellkulturexperimente mit humanen, meist primären, Zellen durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Die Gewinnung, Generierung, Herkunft und Behandlung dieser Zellen werden im folgenden Teilabschnitt genauer beschrieben.

2.2.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden in PBS gelöste Zellen mit 0,1 % Trypanblaulösung in einem definierten Verhältnis gemischt (Verdünnungsfaktor). Im Anschluss wurden die lebenden Zellen mittels Neubauerzählkammer ausgezählt und die Anzahl anhand folgender Formel berechnet:

Lebendzellzahl pro ml Zellsuspension =

$$\frac{\text{Lebende Zellen}}{\text{Anzahl Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (Volumenfaktor der Zählkammer)}$$

Tote Zellen, die aufgrund ihrer löchrigen Zellmembran Trypanblau aufgenommen haben und somit bei lichtmikroskopischer Betrachtung als blau erscheinen, wurden nicht mitgezählt.

2.2.1.2 Isolation von PBMCs

Für die Gewinnung von PBMCs dienten standardmäßig Buffy Coats als Ausgangsmaterial. Diese wurden vom Zentrum für klinische Transfusionsmedizin in Tübingen gemäß der Ethikvoten 483/2015BO2 und 137/2017BO2 bezogen. Bei Buffy Coats handelt es sich um Leukozytenkonzentrate, die als Nebenprodukte bei der Verarbeitung einer Vollblutspende zu Erythrozytenkonzentraten entstehen. Für die Isolation von PBMCs wurde das im Buffy Coat enthaltene Leukozytenkonzentrat mit 160 ml PBS 1:3 verdünnt und auf eine Ficoll-Lösung überschichtet. Durch die

anschließende Zentrifugation von 18 min bei 800 g und die spezifische Dichte der im Ficoll enthaltenen Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymere ($d=1,077$ g/ml) trennten sich die Blutbestandteile der Leukozytenkonzentrate in Thrombozyten im Überstand, PBMCs in der Interphase und Granulozyten sowie Erythrozyten im Zellpellet auf. Zur Isolation der PBMCs wurde die Interphase mit einer Pipette abgenommen und anschließend 2-mal in 50 ml PBS für 5 min bei 450 g gewaschen. Zur Beseitigung der verbliebenen Thrombozyten erfolgte ein weiterer Waschschrift in 40 ml PBS für 10 min bei 130 g. Im letzten Schritt wurde die Anzahl der isolierten PBMCs bestimmt (siehe 2.2.1.1) und je nach Bedarf wurden die frisch isolierten PBMCs wahlweise in PBS oder Medium gelöst und danach direkt verwendet oder in Einfriermedium weggefroren.

Neben Buffy Coats diente Nabelschnurblut beziehungsweise Knochenmark als Ausgangsmaterial für die Isolation von mononukleären Zellen. Nabelschnurblut beziehungsweise Knochenmark wurde verwendet, wenn im Anschluss eine Isolation von CD34+ Stammzellen erfolgen sollte. Der Grund dafür ist, dass PBMCs aus Nabelschnurblut und Knochenmark eine deutlich höhere Anzahl an CD34+ Stammzellen als Buffy Coats aufweisen. Nabelschnurblut wurde dazu von Patientinnen der Frauenklinik des Universitätsklinikum Tübingen gemäß des Ethikvotums 751/2015BO2 bezogen. Knochenmark wurde von Knochenmarkspendern der DMKS für die Medizinische Klinik II in Tübingen laut Ethikvotum 309/2018BO2 verwendet. Die Aufreinigung von PBMCs aus Nabelschnurblut und Knochenmark erfolgte identisch zu dem aus Buffy Coats.

2.2.1.3 Differenzierung dendritischer Zellen aus Monozyten (Mo-DCs)

Zur Generierung von Mo-DCs wurden zunächst Monozyten aus PBMCs aufgereinigt. Hierzu wurden frisch aufgereinigte PBMCs aus Buffy Coats in 1,5 ml DC-Medium bei einer Zelldichte von 4×10^6 /ml Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Danach wurden die PBMCs für 1,5 h im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit setzten sich die PBMCs auf dem Boden ab. Im Anschluss wurden die Zellkulturplatten mit Medium und warmen PBS über den Rand gewaschen. Dabei wurden die nicht adhärenen Zellen entfernt. Fast ausschließlich adhärenente Monozyten blieben an der Zellkulturplatte haften. Diese wurden daraufhin in 3 ml Mo-DC Medium aufgenommen, das zuvor mit 100 ng/ml GM-CSF und 50 ng/ml hIL-4 supplementiert wurde. Im Verlauf der 6-tägigen Kultur erfolgte alle 2 Tage (Tag 2, Tag 4) eine erneute Zugabe von 100

ng/ml GM-CSF und 50 ng/ml hIL-4, was in einer Differenzierung der Monozyten zu DCs resultierte (Mo-DCs). Diese wurden an Tag 6 durch kräftiges Resuspendieren von der Zellkulturplatte gelöst, in PBS aufgenommen und darin gezählt. Im Anschluss erfolgte die Überprüfung der Reinheit der Mo-DCs mittels durchflusszytometrischer Analyse mit folgendem Panel:

Tabelle 10: FACS-Panel zur Überprüfung der Reinheit von Mo-DCs

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
CD11c	APC	MJ4-27G12	1:50
HLA-DR	BV650	L243	1:100
LD	eFluor506	-	1:1000

Die extrazelluläre FACS-Färbung wurde wie in 2.2.6.1 beschrieben durchgeführt. DCs wurden aus der Population der lebenden Lymphozyten als CD11c+HLA-DR+ Zellen definiert.

2.2.1.4 Expansion von iNKT-Zellen

Da iNKT-Zellen im Durchschnitt nur 0,1 % der lebenden Lymphozyten ausmachen, mussten diese vor einer experimentellen Verwendung expandiert werden. Dazu wurden frisch isolierte PBMCs von gesunden Spendern (Buffy Coats) für 7 Tage in iNKT-Medium mit 100 ng/ml α -GalCer und 100 IE/ml hIL-2 inkubiert. Je nach Bedarf wurde die iNKT-Zell-Expansion in großem oder kleinem Maßstab durchgeführt. Die Expansion von iNKT-Zellen im kleinen Maßstab erfolgte in 24-Well-Flachbodenplatten in 1 ml iNKT-Medium pro Well bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml. In großem Maßstab erfolgte die Expansion ebenfalls bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml, in T25-Zellkulturflaschen in 20 ml iNKT-Medium. An Tag 7 wurde die iNKT-Zell-Expansion mit folgendem FACS-Panel durchflusszytometrisch bestimmt:

Tabelle 11: FACS-Panel zur Bestimmung des prozentualen Anteils an iNKT-Zellen

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
CD3	PerCP-Cy-5.5	HIT3a	1:400
CD4	BV421	RPA-T4	1:400
CD8	FITC	HIT8a	1:600
PBS57-CD1d-Tetramer	PE	-	1:1000
LD	eFluor 506	-	1:1000

Die FACS-Färbung wurde wie in 2.2.6.1 beschrieben durchgeführt. iNKT-Zellen wurden dabei als CD3+PBS57-CD1d-Tetramer+ definiert.

Bei einer suffizienten Expansion der iNKT-Zellen innerhalb der ersten 7 Tage (prozentualer Anteil der iNKT-Zellen von ca. > 0,3 % iNKT) erfolgte eine autologe Restimulation der kultivierten iNKT-Zellen mit Feederzellen. Als Feederzellen dienten aufgetaute autologe PBMCs, welche zuvor für 4 h mit 100 ng/ml Glykolipid beladen wurden. Zur weiteren Expansion der iNKT-Zellen wurden die Feederzellen mit 30 Gray zur Proliferationsinhibition bestrahlt und in frischem iNKT-Medium supplementiert mit 100 ng/ml α -GalCer und 100 IE/ml hIL-2 zu den bereits expandierten Zellen gegeben und für weitere 7 Tage kultiviert. Auch hier wurde eine Zellkonzentration von 2×10^6 /ml mit einem Verhältnis von kultivierten Zellen zu Feederzellen von 1:2 angestrebt. In kleinem Maßstab erfolgte die Expansion von Tag 7 bis Tag 14 in 12-Well Flachbodenplatten in 2 ml iNKT-Medium. In großem Maßstab erfolgte die Expansion zu diesem Zeitpunkt in T125-Zellkulturflaschen bei ansonsten gleichen Bedingungen. An Tag 14 wurde der prozentuale Anteil an iNKT-Zellen in der Kultur erneut durchflusszytometrisch bestimmt und je nach Verwendungszweck mittels MACS oder FACS aufgereinigt (siehe 2.2.1.5). Für gezielte Experimente wurde die iNKT-Zell-Expansion nicht wie beschrieben an Tag 14 beendet, sondern es erfolgte eine weitere Restimulation und Expansion bis Tag 21. Dabei erfolgte die Expansion in kleinem Maßstab in 5 ml iNKT-Medium in 6-Well-Flachbodenplatten und in großem Maßstab erneut in T75-Zellkulturflaschen in 40 ml iNKT-Medium. Die weitere Kultur erfolgte auch hier durch die Stimulation mit 100 ng/ml α -GalCer und 100 IE/ml hIL-2 bei einer definierten Zelldichte von 2×10^6 /ml und einem Verhältnis von kultivierten Zellen zu Feederzellen von 1:2.

2.2.1.5 Isolation von iNKT-Zellen

Zur Isolation von iNKT-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Aufreinigungsmethoden verwendet: Expandierte iNKT-Zellen wurden mittels MACS und FACS isoliert. Bei der MACS-basierten Aufreinigung wurden iNKT-Zellen mit Hilfe von Anti-iNKT-Beads nach dem Herstellerprotokoll in einem QuadroMACS mit LS-Säulen aufgereinigt. Für die FACS-basierte iNKT-Zell-Isolierung wurden iNKT-Zellen mit dem nachfolgenden Panel gefärbt:

Tabelle 12: FACS-Panel zur Isolation von expandierten iNKT-Zellen

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
CD3	APC	HIT3a	1:100
CD4	BV421	RPA-T4	1:400
CD8	FITC	HIT8a	1:600
PBS57-Tetramer	PE	-	1:1000

Die genaue Durchführung der extrazellulären FACS-Färbung wird in Kapitel 2.6.6.1 beschrieben. Die Exklusion toter Zellen fand anhand des FSC-SSC Plots statt, da die Färbung mit einem Lebend/Tot-Farbstoff die Viabilität der aufgereinigten Zellen negativ beeinflusst hätte und sie somit für eine weitere experimentelle Verwendung ungeeignet gewesen wären. Die eigentliche Aufreinigung fand an einem BD FACS Aria statt. iNKT-Zellen wurden auch hier als CD3+PBS57-Tetramer+ definiert. Anders als die MACS-Isolation ermöglichte die FACS-basierte Aufreinigung eine Isolation der CD4+CD8-, CD4-CD8+ und CD4-CD8- iNKT-Zell-Subpopulationen. Nach erfolgter Isolation wurde die Lebendanzahl an iNKT-Zellen bestimmt und deren Reinheit mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

2.2.1.6 Isolation von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, DCs und Stammzellen

Zur Isolation von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, DCs und Stammzellen wurden folgende Kits nach dem Protokoll des Herstellers verwendet:

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Microbeads für die Isolation von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, DCs und Stammzellen

Zellpopulation	Isolationskit
T-Zellen	CD3-Microbeads, human
B-Zellen	CD19-Microbeads, human
Monozyten	CD14-Microbeads, human
NK-Zellen	NK Cell Isolation Kit, human
DCs	Blood DC Isolation Kit II, human
Stammzellen	CD34-Microbeads, human

Die Isolation von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und DCs erfolgte aus PBMCs von Buffy Coats, während die Isolation von Stammzellen aus mononukleären Zellen von Nabelschnurblut und Knochenmark erfolgte. Die jeweiligen Isolationen wurden an einem QuadroMACS mit LS-Säulen durchgeführt. Lediglich die Aufreinigung von CD34+ Stammzellen erfolgte an einem QuadroMACS mit LD-Säulen

und einem MiniMACS mit MS-Säulen. Nach der Isolation wurde die Reinheit der isolierten Zellen mittels Durchflusszytometrie und folgender Marker bestimmt:

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Antikörper für die Überprüfung der Reinheit von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, DCs und Stammzellen

Zellpopulation	Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
T-Zellen	CD3	BV605	OKT3	1:400
B-Zellen	CD20	BV510	2H7	1:200
Monozyten	CD14	BV785	M5E2	1:100
NK-Zellen	CD56	BV510	HCD56	1:50
DCs	mDCs: CD1c	APC-Cy7	L161	1:120
	pDCs: CD303	PerCP-Cy5.5	201a	1:20
Stammzellen	CD34	APC	4H11	1:50

Die FACS-Färbung wurde hierfür wie in 2.6.6.1 beschrieben durchgeführt.

2.2.1.7 CFSE-Markierung von T-Zellen

Um T-Zellen zu selektieren und deren Proliferation bestimmen zu können wurden diese mittels CFSE markiert. Hierfür wurden frisch isolierte T-Zellen (siehe 2.6.6.1) für 5 min in 1 ml einer 5 μ M CFSE-Lösung aufgenommen und im Dunkeln inkubiert. Diese Färbereaktion wurde durch die Zugabe von 20 ml FBS abgestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 450 g für 5 min wurden die CFSE-markierten T-Zellen in PBS mit 5% FCS bei 450 g für 5 min gewaschen anschließend gezählt (siehe 2.2.1.1) und in iNKT-Medium zur weiteren Kultur aufgenommen.

2.2.1.8 Kultur von Tumorzellen

Die Kultur von Jurkat und Molt-4 Tumorzelllinien erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS. Ein Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Hierfür wurden die Tumorzelllinien bei 450 g für 5 min pelletiert. Das alte Medium wurde daraufhin mit einer Pasteurpipette abgenommen und das Zellpellet wieder in frischem Medium gelöst. Die Tumorzellen wurden am Vortag jedes Experiments gesplittet, sodass sie sich am Tag des Experiments in der Wachstumsphase befanden. Da sich primäre Tumorzellen nicht langfristig kultivieren lassen, wurden diese lediglich im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, in 40 ml PBS bei 450 g zentrifugiert und direkt für die weitere Nutzung in iNKT-Medium gelöst. Primäre Tumorzellen wurden von der AG

Salih bezogen. Dabei handelte es sich immer um PBMCs aus Primärblut von noch unbehandelten Patienten bei Erstdiagnose mit einem Blastenanteil von über 90 %.

2.2.2 Charakterisierung von expandierten iNKT-Zellen

2.2.2.1 Bestimmung der iNKT-Zell-Proliferation

Um die *ex vivo* Expansion von iNKT-Zellen zu beschreiben, wurde der prozentuale Anteil an iNKT-Zellen in der Kultur an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 mittels Durchflusszytometrie und der Verwendung des in 2.2.1.4 dargestellten Panels bestimmt. Die extrazelluläre FACS-Färbung wurde wie in 2.2.6.1 beschrieben durchgeführt. iNKT-Zellen wurden aus der Population der lebenden Lymphozyten als CD3+PBS57-CD1d Tetramer+ definiert. Neben dem am Durchflusszytometer gemessenen prozentualen Anteils an iNKT-Zellen in der Kultur wurde auch die absolute Zellanzahl in der Kultur an den Tagen 0, 7, 14 und 21 mittels Neubauerzählkammer bestimmt (siehe 2.2.1.1). Aus den absoluten Gesamtzellzahlen und dem prozentualen Anteil an iNKT-Zellen wurden die absoluten iNKT-Zellzahlen anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{absolute Anzahl an iNKT - Zellen} = \frac{\text{absolute Anzahl Gesamtzellen}}{100} \times \% \text{Anteil an iNKT - Zellen in Kultur}$$

Die Marker CD4 und CD8 ermöglichten zusätzlich eine Unterteilung in die iNKT-Zell-Subpopulationen CD4+CD8-, CD4-CD8+ und CD4-CD8-. Ihr prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation der iNKT-Zellen wurde an Tag 0 und Tag 21 gegenübergestellt, um die relative Expansion der einzelnen iNKT-Zell-Subpopulationen zu bestimmen.

2.2.2.2 Bestimmung der Zytokinproduktion von iNKT-Zellen

Zur Bestimmung des Zytokinprofils von iNKT-Zellen wurden diese vor ihrer Expansion an Tag 0 und nach ihrer Expansion an Tag 21 mittels intrazellulärer Zytokinfärbung untersucht. Zur Identifikation wurden iNKT-Zellen zuerst extrazellulär gefärbt, wie in 2.2.6.1 näher beschrieben wird. Anschließend wurde die intrazelluläre Zytokinfärbung wie in 2.2.6.2 beschrieben durchgeführt. Die Färbungen erfolgten dabei mit folgendem Panel:

Tabelle 15: FACS-Panel für die Bestimmung der Zytokinproduktion von iNKT-Zellen

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
Extrazelluläres FACS-Panel			
CD3	PerCP Cy 5.5	HIT3a	1:400
CD4	BV 421	RPA-T4	1:400
CD8	FITC	HIT8a	1:600
PBS57-CD1d-Tetramer	PE	-	1:1000
LD	eFluor 506	-	1:1000
Intrazelluläres FACS-Panel			
IFN- γ	4S.B3	APC	1:100
IL-10	JES3-19F1	APC	1:100
IL-4	MP4-25D2	APC	1:100

Da alle 3 untersuchten Zytokine mit APC-gelabelten Antikörpern detektiert werden sollten, wurden die Proben nach der extrazellulären Färbung aufgeteilt und die Zytokine separat angefärbt.

Die Änderung der Zytokinproduktion wurde folgendermaßen berechnet:

$$x - \text{fache Änderung der Zytokinproduktion} = \frac{\% \text{ Zytokinproduktion Tag 21}}{\% \text{ Zytokinproduktion Tag 0}}$$

2.2.3 Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von iNKT-Zellen

Als Modell für die Alloreaktivität von T-Zellen und die Entstehung einer GvHD wurden gemischte Lymphozyten-Reaktionen (MLRs) durchgeführt. Hierzu wurden CFSE-markierte CD3+ T-Zellen zusammen mit Mo-DCs von unterschiedlichen Spendern im Verhältnis 1:1 für 7 Tage in iNKT-Medium ohne die weitere Zugabe von Zytokinen kultiviert. Aufgrund der HLA-Inkompatibilität werden hierbei alloreaktive T-Zellen aktiviert, welche daraufhin proliferieren. Die T-Zell-Aktivierung wurde an Tag 3 mit Hilfe des Aktivierungsmarkers CD25 durchflusszytometrisch bestimmt. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand einer CFSE-Färbung an Tag 7 überprüft. Die durchflusszytometrische Färbung wurde wie in 2.2.6.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde folgendes Färbepanel verwendet:

Tabelle 16: FACS-Panel zur Analyse der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation alloreaktiver T-Zellen innerhalb einer MLR

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
CD3	BV605	OKT3	1:400
CD4	BV421	RPA-T4	1:400
CD8	AF700	HIT8a	1:200
CD25	BV711	BC96	1:80
CD127	PE-Cy7	A019D5	1:200
CD1d-PBS57-Tetramer	PE	-	1:1000
LD	eFluor 780	-	1:1000
CFSE	CFSE		

2.2.3.1 Bestimmung der Anzahl an iNKT-Zellen für eine effektive Inhibition der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation in einer MLR

Um zu sehen, ob iNKT-Zellen einen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation haben, wurden expandierte iNKT-Zellen in zunehmenden Mengen in die MLR gegeben. Die MLR erfolgte hierfür in einer 96-Well-Rundbodenplatte mit 1×10^5 CD3⁺ T-Zellen und 1×10^5 allo genen Mo-DCs in 200 μ l iNKT-Medium. Für die Bestimmung der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation wurde das in 2.2.3 dargestellte FACS-Panel verwendet. Die Verwendung der Marker CD4 und CD8 ermöglichte die Analyse von alloreaktiven CD4⁺ und CD8⁺ Spender-T-Zellen.

2.2.3.2 Analyse der suppressiven Eigenschaften CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ und CD4⁻CD8⁻ iNKT-Zell-Subpopulationen in einer MLR

In weiteren MLRs sollte geklärt werden, ob es bezüglich des Einflusses auf die T-Zell-Aktivierung Unterschiede zwischen den iNKT-Zellsubpopulationen CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ und CD4⁻CD8⁻ gibt. Hierzu wurden expandierte iNKT-Zellen in diese Subpopulationen mittels FACS separiert und im Verhältnis 5:1:1 (iNKT-Zellen : MoDCs : T-Zellen) in die MLR gegeben. Die MLR erfolgte hierfür in einer 96-Well-Rundbodenplatte mit 1×10^5 T-Zellen und 1×10^5 allo genen Mo-DCs in 200 μ l iNKT-Medium. Für die Bestimmung der T-Zell-Aktivierung wurde das in 2.2.3 dargestellte FACS-Panel verwendet.

2.2.3.3 Analyse der suppressiven Eigenschaften von iNKT-Zellen ohne direkten Zellkontakt in einem MLR-Transwell-Assay

Weiterhin stellte sich die Frage, ob iNKT-Zellen auch ohne direkten Zellkontakt einen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung haben. Dazu wurden iNKT-Zellen in 5-fachem Überschuss einerseits direkt zur MLR gegeben und andererseits durch ein Transwell mit der Porengröße von 0,3 µm getrennt. Da iNKT-Zellen diese Membran nicht passieren können, sind in diesem Fall ausschließlich von iNKT-Zellen sezernierte lösliche Faktoren in der Lage, die T-Zell-Aktivierung zu beeinflussen. Die MLR erfolgte hierfür in einer 24-Well-Flachbodenplatte mit $0,5 \times 10^6$ T-Zellen und $0,5 \times 10^6$ allogenen Mo-DCs in 1 ml iNKT-Medium. Für die Bestimmung der T-Zell-Aktivierung wurden das in 2.2.3 dargestellte FACS-Panel verwendet.

2.2.3.4 Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von iNKT-Zellen auf mittels CD3/CD28 Bead stimulierte T-Zellen

Zur weiteren Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von iNKT-Zellen wurden T-Zellen mittels CD3+CD28+ Dynabeads stimuliert und sowohl mit als auch ohne die Zugabe von iNKT-Zellen kultiviert. Im Ansatz ohne iNKT-Zellen wurden 1×10^5 CD3+ T-Zellen durch die Zugabe von 1×10^5 Dynabeads (2,5 µl Beads) in einer 96-Well-Rundbodenplatte in 200 µl iNKT-Medium ohne die weitere Zugabe von Zytokinen für 3 Tage stimuliert. Um zu überprüfen, ob iNKT-Zellen in der Lage sind, die Dynabead-vermittelte Aktivierung von T-Zellen zu verhindern, wurden diese in 5-fachem Überschuss zu den mit Dynabeads stimulierten T-Zellen gegeben. Für die Bestimmung der T-Zell-Aktivierung wurde das in 2.2.3 dargestellte FACS-Panel verwendet.

2.2.3.5 Bestimmung der Anzahl regulatorischer T-Zellen in der MLR

Um zu überprüfen, ob die iNKT-Zell-vermittelte Inhibition der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation über die Expansion von Tregs bewerkstelligt wurde, fand eine Bestimmung der Anzahl an Tregs in den in 2.2.3.1 beschriebenen MLRs statt. Hierfür wurden 1×10^5 allogene Mo-DCs mit 1×10^5 CD3+ CFSE-markierten T-Zellen mit expandierten iNKT-Zellen im Verhältnis 1:1:5 in einer 96-Well-Rundbodenplatte in 200 µl iNKT-Medium für 3 und 7 Tage kultiviert. Als Kontrolle dienten 1×10^5 CD3+

CFSE-markierter T-Zellen, die alleine unter sonst gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Der prozentuale Anteil an Tregs wurde anhand des in 2.2.3 gezeigten FACS-Panels an Tag 3 und 7 als CD127^{lo}CD25⁺ definiert.

2.2.3.6 Bestimmung der T-Zell-Aktivierung durch apoptotische DCs

Um zu analysieren, ob apoptotische DCs in der Lage sind die Aktivierung allogener T-Zellen zu vermitteln, wurden HLA-inkompatible T-Zellen zusammen mit apoptotischen DCs kultiviert und dann auf ihre Aktivierung hin untersucht. Die Apoptoseinduktion wurde dabei zum einen durch die Kokultur mit iNKT-Zellen vermittelt, zum anderen durch die Inkubation mit Staurosporin. Für die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion wurden 1×10^5 Mo-DCs mit HLA-inkompatiblen iNKT-Zellen im Verhältnis 1:5 in 200 μ l iNKT-Medium in einer 96-Well-Rundbodenplatte für 18 h inkubiert. Für eine vergleichbar starke Apoptoseinduktion in MoDCs durch Staurosporin wurden 1×10^5 Mo-DC in 200 μ l iNKT-Medium in einer 96-Well-Rundbodenplatte für 18 h mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Nach erfolgter Apoptoseinduktion wurden die Mo-DCs 3 mal in PBS bei 400 g für 5 min gewaschen und anschließend mit 1×10^5 CFSE-markierten allogenen CD3⁺ T-Zellen für 3 Tage in 200 μ l iNKT-Medium in einer 96-Well-Rundbodenplatte inkubiert. Nach 3 Tagen erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der T-Zell-Aktivierung mit dem in 2.2.3. dargestellten FACS-Panel. Als Kontrolle diente eine gemeinsame Kultur von CD3⁺ CFSE markierten T-Zellen und Mo-DCs vom selben Spender, in denen bei sonst gleichen Kulturbedingungen keine Apoptose induziert wurde.

2.2.4 Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion

Für die Ermittlung der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion wurden expandierte iNKT-Zellen in erster Linie mit Mo-DCs, aber auch mit anderen im Transplantat befindlichen Primärzellen in iNKT-Medium ohne die Zugabe von Zytokinen kultiviert.

2.2.4.1 Analyse des zeitlichen Ablaufs der iNKT-Zell-vermittelten Mo-DC-Apoptoseinduktion

Um zu testen, wie lange iNKT-Zellen für die Induktion der Apoptose in allogenen DCs benötigen, wurden 5×10^5 expandierte iNKT-Zellen mit 1×10^5 Mo-DCs für 1 h, 2 h, 4 h,

6 h und 8 h in einer 96-Well-Rundbodenplatte in 200 µl iNKT-Medium inkubiert. Die Analyse der Apoptose erfolgte mittels Annexin V/PI-Assay, welcher wie in 2.2.6.3 beschrieben durchgeführt wurde. Um ausschließlich die Apoptose von DCs identifizieren zu können, wurden iNKT-Zellen mittels CD3 und dem FSC-SSC ausgeschlossen. Eine Positivselektion der DCs mittels CD11c/HLA-DR-Färbung war nicht möglich, da diese unter Apoptose teilweise herunterreguliert wurde. Das FACS-Panel wurde deshalb folgendermaßen durchgeführt:

Tabelle 17: FACS-Panel zur Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion mittels Annexin V/PI-Assay

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
CD3	APC	HIT3a	1:100
Annexin V	FITC		1:20
PI	PI		1:40

Um den weiteren Verlauf der iNKT-Zell-vermittelten DC-Apoptose verfolgen zu können, wurden 5×10^5 expandierte iNKT-Zellen mit 1×10^5 allogenen Mo-DCs für 4 und 18 h in einer 96-Well-Rundbodeplatte in 200 µl iNKT-Medium inkubiert. Die Analyse der Apoptose erfolgte zum einen durch einen wie in 2.2.6.4 beschriebenen Nicoletti-Assay, zum anderen durch einen Annexin V/PI-Assay, der mittels ImageStream dokumentiert wurde. Die Analyse mittels ImageStream-Assay wird in 2.2.6.5 beschrieben. Das Färbepanel für den Nicoletti-Assay stellte sich folgendermaßen dar:

Tabelle 18: FACS-Panel zur Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptose mittels Nicoletti-Assay

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
CD3	APC	HIT3a	1:100
PI	PI		in PI RNASE Färbepuffer

Folgendes Färbepanel wurde für den Annexin-V/PI-Assay mit anschließender Image Stream-Analyse verwendet:

Tabelle 19: FACS-Panel zur Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs mittels Annexin V/PI-Assay und anschließenden ImageStream-Analysen

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
HLA-DR	APC-Cy7	L243	1:100
Annexin V	FITC		1:40
PI	PI		1:20
PBS57-CD1d-Tetramer	PE		1:1000

2.2.4.2 Bestimmung der nötigen Anzahl an iNKT-Zellen zur Apoptoseinduktion in Mo-DC

Um zu eruieren, wie viele iNKT-Zellen zur Induktion einer Apoptose in Mo-DCs benötigt werden, wurden diese mit 1×10^5 allogenen Mo-DCs für 4 h in aufsteigenden Mengen in 200 μ l iNKT-Medium in einer 96-Well-Rundbodenplatte kultiviert. Um die Spezifität von iNKT-Zellen hinsichtlich der Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs nachzuweisen, wurden parallel ebenfalls mittels MACS isolierte CD3⁺ T-Zellen in aufsteigenden Mengen zu 1×10^5 allogenen Mo-DCs gegeben und für 4 h kultiviert. Die Analyse der Apoptoseinduktion erfolgte im Anschluss mittels Annexin V/PI-Assay (siehe 2.2.6.3) mit dem in 2.2.4.1 dargestellten FACS-Panel.

2.2.4.3 Analyse der CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ und CD4⁻CD8⁻ iNKT-Zell-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs

Um zu testen, ob alle iNKT-Zell-Subpopulationen (CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ und CD4⁻CD8⁻) in der Lage sind, die Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs zu induzieren, wurden 1×10^5 allogene Mo-DCs mit jeweils 1×10^5 der oben genannten, expandierten und gesorteten iNKT-Zell-Subpopulationen für 4 h in 200 μ l iNKT-Medium in einer 96-Well-Rundbodenplatte inkubiert. Die Analyse der Apoptoseinduktion erfolgte mittels Annexin V/PI-Assay (siehe 2.2.6.3) unter der Verwendung des in 2.2.4.1 dargestellten FACS-Panels.

2.2.4.4 Transwell-Assay zur Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs ohne direkten Zellkontakt

Um zu überprüfen, ob iNKT-Zellen allogene Mo-DCs ohne direkten Zell-Zell-Kontakt in Apoptose führen können, wurden expandierte iNKT-Zellen in einem Verhältnis von 5:1 zu 1×10^5 allogenen Mo-DCs gegeben und für 4 h zusammen inkubiert. Zum einen erfolgte die Inkubation der allogenen DCs mit expandierten iNKT-Zellen direkt in einer 24-Well-Flachbodenplatte in 1 ml iNKT-Medium, zum anderen getrennt durch ein Transwell mit einer Porengröße von 0,3 μ m. Nach erfolgter Kokultur wurde die Viabilität der allogenen Mo-DCs mittels Annexin V/PI-Assay (siehe 2.2.6.3) bestimmt. Zusätzlich wurden iNKT-Zellen und Mo-DCs, die für 4 h direkt zusammen kultiviert wurden, mittels ImageStream auf eine mögliche Interaktion untersucht. Dazu wurden

sie mit dem in 2.2.4.1 gezeigten Panel gefärbt und am ImageStream analysiert (siehe 2.2.6.5).

2.2.4.5 Blockade typischer Apoptosewege zur Entschlüsselung des Mechanismus der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion

Zur Klärung der Fragestellung, über welche Moleküle und Signalwege iNKT-Zellen die Apoptose in allogenen Mo-DCs induzieren, wurden verschiedene neutralisierende Antikörper und Reagenzien in die Kokultur von iNKT-Zellen und Mo-DCs gegeben. Folgende Antikörper, IgG-Kontrollen und blockierende Reagenzien wurden hierfür verwendet:

Tabelle 20: Verwendete Antikörper und Reagenzien für die Blockade der iNKT-Zell vermittelten Apoptoseinduktion

Antikörper/Reagenzien	Klon	Konzentration	Zielzelle
CMA		100 nM	iNKT-Zelle
FASL	NOK-1	5 µg/ml	iNKT-Zelle
NKG2D	149810	5 µg/ml	iNKT-Zelle
CD1d	51.1	10 µg/ml	DC
TRAIL	RIK-2	10 µg/ml	iNKT-Zelle
Transport Inhibition Cocktail eBioscience 500x		1x	iNKT-Zelle
ZVAD-FMK		100 µM	DC
Mouse IgG2b, κ LEAF			iNKT-Zelle
Mouse IgG1, κ LEAF			iNKT-Zelle

Zur Durchführung des Experiments wurden je nach Antikörper iNKT-Zellen oder Mo-DCs mit neutralisierenden Antikörpern/Reagenzien für 1 Stunde präinkubiert. Danach erfolgte eine gemeinsame Inkubation von iNKT-Zellen und 1×10^5 Mo-DCs im Verhältnis 5:1 für 4 h in einer 96-Well-Rundbodenplatte in 200 µl iNKT-Medium. Die Viabilität der Mo-DCs wurde mittels Annexin V/PI-Assay und dem in 2.4.4.1 gezeigten FACS-Panel bestimmt (siehe 2.2.6.3). Für die Berechnung der prozentualen Apoptoseinhibition wurden alle Werte innerhalb eines Experiments auf die entsprechende Kontrollgruppe, Mo-DCs ohne Inkubation mit iNKT-Zellen, normiert:

$$\left(\frac{\text{Anzahl Annexin-PI-DCs in zu analysierender Probe}}{\text{Anzahl Annexin-PI-DCs ohne iNKT-Zellen}} \right) \times 100$$

Danach wurde die Apoptoseinhibition der einzelnen Ansätze folgendermaßen berechnet:

$$100 - \left(\left(\frac{100 - \text{Anzahl normierter Annexin-PI-DCs in zu analysierender Probe}}{100 - \text{Anzahl normierter Annexin-PI-DCs in zugehöriger Kontrolle}} \right) \times 100 \right)$$

2.2.4.6 Analyse des Einflusses der HLA-Kompatibilität auf die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion

Um zu ergründen, ob iNKT-Zellen eine stärkere Apoptoseinduktion in autologen oder allogenen Mo-DCs induzieren, wurden expandierte iNKT-Zellen sowohl mit 1×10^5 autologen DCs als auch mit 1×10^5 allogenen DCs für 4 h in einem Verhältnis von 5:1 in einer 96-Well-Rundbodenplatte in 200 μ l iNKT-Medium kultiviert. Die Kultur mit oder ohne die Zugabe von 100 ng/ml α -GalCer sollte den Nutzen einer Stimulation mit α -GalCer zeigen. Die Apoptoseinduktion wurde mit dem in 2.2.4.1 gezeigten FACS-Panel mittels Annexin V/PI-Assay (siehe 2.6.6.3) bestimmt.

2.2.4.7 Bestimmung der von iNKT-Zellen freigesetzten zytotoxischen Moleküle zur Apoptoseinduktion in Mo-DC

Zur Bestimmung der von iNKT-Zellen freigesetzten Zytokine zur Apoptoseinduktion in Mo-DCs wurden expandierte iNKT-Zellen mit 1×10^5 allogenen Mo-DCs im Verhältnis 5:1 für 4 h in einer 96-Well-Rundbodenplatte in 200 μ l iNKT-Medium inkubiert. Als Kontrollen wurden 1×10^5 allogene DCs und 5×10^5 expandierte iNKT-Zellen jeweils in 200 μ l iNKT-Medium für 4 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die 96-Well-Platte für 5 min bei 400 g zentrifugiert um die darin befindlichen Zellen zu pelletieren. Im Anschluss wurde der Überstand mit den darin befindlichen Zytokinen und Proteinen abgenommen und bei -20 °C weggefroren. Die von iNKT-Zellen freigesetzten Zytokine wurden zu einem späteren Zeitpunkt mittels Multiplex-Assay bestimmt (siehe 2.2.6.6).

2.2.4.8 Analyse der Spezifität der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion

Zur Analyse der Spezifität von iNKT-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Apoptoseinduktion wurden diese mit typischerweise im Transplantat enthaltenen Zellen kultiviert. Hierfür wurden T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, DCs, CD34+ Stammzellen und CD14+ Monozyten wie in 2.2.1.6 beschrieben isoliert. Im Anschluss

wurden jeweils 1×10^5 der isolierten Zellen mit expandierten HLA-inkompatiblen iNKT-Zellen im Verhältnis 1:5 für 4 h in 200 μ l iNKT Medium in einer 96-Well-Rundbodenplatte inkubiert. Die Analyse der Apoptoseinduktion in den jeweiligen Zellpopulationen erfolgte mittels Annexin V/PI-Assay (siehe 2.2.6.3) und der in 2.2.4.1 dargestellten FACS-Färbung.

Die Berechnung des prozentualen Anteils von viablen Zellen im Transplantat nach Kultur mit iNKT-Zellen erfolgte folgendermaßen:

$$\frac{\% \text{ Anzahl lebender Zellen nach Kultur mit iNKT-Zellen}}{\% \text{ Anzahl lebender Zellen nach Kultur ohne iNKT-Zellen}} \times 100$$

2.2.4.8.1 Bestimmung der CD1d-Expression der im Transplantat enthaltenen Zellpopulationen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Vulnerabilität für eine von iNKT-Zellen vermittelte Apoptoseinduktion und der CD1d-Expression der Zielzelle zu untersuchen, wurde auf den in 2.2.4.2 beschriebenen, im Transplantat befindlichen Zellen die CD1d-Expression mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die FACS-Färbung wurde wie in 2.2.6.1 dargestellt und mit folgenden Antikörpern durchgeführt:

Tabelle 21: FACS-Panel zur Bestimmung der CD1d-Expression der im Transplantat enthaltenen Zellpopulationen

Zellpopulation	Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
T-Zellen	CD3	BV605	OKT3	1:400
B-Zellen	CD20	BV510	2H7	1:200
Monozyten	CD14	BV785	M5E2	1:100
NK-Zellen	CD56	BV510	HCD56	1:50
DCs	mDCs CD1c	APC-Cy7	L161	1:120
	pDCs CD303	PerCP Cy5.5	201a	1:20
Stammzellen	CD34	APC	4H11	1:50
CD1d-Expression	CD1d	PE	51.1	1:100

Die untersuchten Zellpopulationen wurden nach ihrer Isolation jeweils mit den oben genannten Antikörpern identifiziert und auf ihre CD1d-Expression mittels CD1d-Antikörper untersucht.

2.2.5 iNKT-Zell-vermittelte Tumorlyse

Zur Bestimmung der iNKT-Zell-vermittelten-Lyse von Tumorzellen wurden expandierte iNKT-Zellen in aufsteigender Menge mit 1×10^5 primären Tumorzellen oder Tumorzelllinien für 18 h in einer 96-Well-Rundbodenplatte in 200 μ l iNKT-Medium im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Tumorzellen durchflusszytometrisch auf ihre Viabilität überprüft. Dafür wurden die Tumorzellen mit dem Lebend/Tot-Farbstoff 7-AAD angefärbt. Um die Lyse der Tumorzellen isoliert analysieren zu können, wurden iNKT-Zellen mittels PBS57-CD1d-Tetramer spezifisch angefärbt, sodass sie bei der späteren Analyse ausgeschlossen werden konnten. Als Kontrollprobe dienten Tumorzellen ohne die Zugabe von iNKT-Zellen. Die FACS-Färbung wurde wie in 2.2.6 beschrieben durchgeführt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit folgendem Panel:

Tabelle 22: FACS-Panel zur Bestimmung der iNKT-Zell-vermittelte Tumorlyse

Antigen	Fluorochrom	Klon	Verdünnung
PBS57-CD1d-Tetramer	PE		1:1000
7-AAD	7-AAD		1:40

Die prozentuale spezifische Lyse durch iNKT-Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{7AAD - \text{Tumorzellen in der zu analysierenden Probe}}{7AAD - \text{Tumorzellen in der Kontrollprobe}} \times 100$$

2.2.6 Durchflusszytometrische Analysen

Die Analyse der durchgeführten Zellkulturexperimente fand ausschließlich mittels durchflusszytometrischer Verfahren statt. Dafür wurden die zu untersuchenden Zellen oder Zellüberstände mit spezifischen Antikörpern angefärbt, wobei hierfür direkt konjugierte sowie unkonjugierte Antikörper verwendet wurden. Die Messung und Analyse der Proben erfolgte mit unterschiedlichen Durchflusszytometern und Auswertungssoftwares. Die prinzipielle Funktionsweise eines Durchflusszytometers ist folgende: Zu Beginn werden in Flüssigkeit gelöste Zellen oder Beads durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt. Anschließend werden die Analyte durch einen gebündelten Laserstrahl geführt, wodurch es zur Anregung der an Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe kommt. Diese emittieren daraufhin Licht in einer

definierten Wellenlänge. Durch ein komplexes System aus Filtern und Siegeln wird dieses Licht gebündelt und zerlegt, wodurch jedem Fluoreszenzfarbstoff ein spezifisches Signal zugeordnet werden kann. Zusätzlich ermöglichen durchflusszytometrische Analysen eine Aussage über die Granularität und Größe der Analyte.

2.2.6.1 Extrazelluläre FACS-Färbung

Zur extrazellulären FACS-Färbung wurden die zu färbenden Zellen in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 50 µl FACS-Puffer + 1% FC-R Block für 5 min inkubiert, um die unspezifische Bindung von Antikörpern an FC-Rezeptoren der Zielzellen zu verhindern. Im nächsten Schritt wurden die zu färbenden Zellen für 20 min mit 50 µl des gewünschten Antikörper-Mastermixes inkubiert. Zum Waschen wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und in 100 µl FACS-Puffer für die Analyse an einem Durchflusszytometer gelöst. Alle extrazellulären durchflusszytometrischen Daten wurden mit Hilfe der Software „FlowJo“ analysiert.

2.2.6.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Zur Analyse der Zytokinproduktion von iNKT-Zellen wurden diese intrazellulär gefärbt. Die Färbung erfolgte mit dem Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer-Set von eBioscience. Dazu wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen in 5 ml iNKT-Medium aufgenommen und für 4 h mit 1x Cell Stimulation Cocktail inkubiert. Durch das im Cell Stimulation Cocktail enthaltene Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin werden die iNKT-Zellen zu Zytokinproduktion angeregt, während die ebenfalls enthaltenen Substanzen Monensin und Brefeldin A den Verbleib der Zytokine im Golgi-Apparat bewirken. Nach vorhergehender extrazellulärer FACS-Färbung (siehe 2.2.6.1), wurden die Zellen pro Ansatz für 5 min in 1 ml FACS-Puffer bei 450 g gewaschen und anschließend für 20 min mit Intracellular Fixation Puffer fixiert. Im Anschluss wurden die fixierten Zellen 2 mal in 1 ml Permeabilization Buffer bei 450 g für 5 min gewaschen. Die Aufnahme der Zellen in Permeabilization Buffer diente zur Bildung von Poren in der Zellmembran der anzufärbenden Zellen und macht sie dadurch durchlässig für Antikörper, mit deren Hilfe das jeweilige Zytokin von Interesse

in 100 µl Perm Puffer für weitere 20 min bei 4 C° gefärbt wurde. Nach einem letzten Waschschrift in 1 ml Perm Puffer bei 450 g für 5 min, wurden die Zellen in 100 µl Perm Puffer gelöst und an einem LSR Fortessa gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mittels „FlowJo“.

2.2.6.3 Annexin V/PI-Assay

Wenn eine Zelle in Apoptose geht, reguliert diese Phosphatidylserine von ihrer inneren Membran an ihre Zelloberfläche. Dies kann mittels der spezifischen Bindung von Annexin an Phosphatidylserine detektiert werden. Spätapoptotische Zellen haben zusätzlich Poren in ihrer Zellmembran und in ihrem Zellkern, sodass die DNA frei zugänglich ist. Diese kann durch den DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt werden. Für die Annexin V/ PI-Apoptosefärbung wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst in 100 µl 1x Annexin Puffer aufgenommen. Diesen erhält man durch die 10-fache Verdünnung von 10x Annexin Puffer mit destilliertem H₂O. Im Anschluss wurden die gelösten Zellen für 15 min bei Raumtemperatur mit 5 µl PI und 2,5 µl Annexin FITC pro Ansatz gefärbt. Nach 15 min wurde die Färbereaktion mit 400 µl 1x Annexin Puffer gestoppt und die gefärbten Zellen innerhalb einer Stunde am LSR Fortessa eingemessen und mit der Analysesoftware „FlowJo“ ausgewertet. Lebende Zellen wurden dabei zum Setzen des FSC-SSC Gates verwendet. Bei Annexin V-PI-Zellen handelt es sich um lebende Zellen; Annexin V+PI- iNKT-Zellen sind früh apoptotische Zellen und Annexin V+PI+-Zellen sind spätapoptotische Zellen. War eine zusätzliche extrazelluläre Färbung der Zellen gewünscht, wurde diese vor der Annexinfärbung wie in 2.2.6.1 beschrieben durchgeführt.

2.2.6.4 Nicoletti-Assay

Ein weiteres Zeichen der Apoptoseinduktion zeigt sich durch die Defragmentierung der DNA im Zellkern. Diese DNA-Fragmente verlassen anschließend den Zellkern, wodurch sich die DNA-Menge im Zellkern apoptotischer Zellen verringert. Diese hypodiploiden Zellkerne können mittels PI-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt werden, womit eine präzise Quantifizierung der Apoptose ermöglicht wird. Diese Methode zur Quantifizierung apoptotischer Zellen bezeichnet man als Nicoletti-Assay. Im ersten Schritt dieses Assays wurden die zu analysierenden Zellen zuerst in 1 ml PBS bei 1500 rpm in einem FACS-Röhrchen für 5 min gewaschen. Im Anschluss

wurden die Zellen für 15 min mit -20 C° kaltem 70 % EtOH fixiert und danach 2 mal mit 1 ml PBS + 0,1 % BSA gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 100 µl PI RNASE-Färbepuffer inkubiert und für 20 min bei Raumtemperatur gefärbt. Zur Selektion der Mo-DCs wurden iNKT-Zellen mittels CD3-Färbung ausgeschlossen. Diese erfolgte durch die Zugabe von 1 µl CD3 APC Antikörper zum PI RNASE-Färbepuffer. Zur Analyse der Apoptose wurden die gefärbten Zellen ohne vorherigen Waschschrift innerhalb einer Stunde an einem LSR Fortessa im linearen und logarithmischen Bereich eingemessen.

2.2.6.5 ImageStream

Der ImageStream ist eine Kombination aus Fluoreszenzmikroskop und Durchflusszytometer. Dies ermöglicht, jede im Durchflusszytometer gemessene Zelle zusätzlich mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen visuell darzustellen. Das Färbeprotokoll für die ImageStream-Analysen entspricht dem der in 2.2.6.1 beschriebenen extrazellulären FACS-Färbung mit anschließender Annexin/PI-Färbung (siehe 2.2.6.3). Die gefärbten Proben wurden an einem Amnis® ImageStream®XMk II in der FACS Core Facility Berg, Tübingen mit Simone Pöschel gemessen und mit Hilfe der Software IDEAS® ausgewertet.

2.2.6.6 Multiplex-Assay

Der Multiplex-Assay ist ein Bead-basierter Immuno-Assay. Die verwendeten Beads unterscheiden sich in ihrer Größe und Fluoreszenzintensität. Jedes Bead ist mit einem spezifischen Antikörper gekoppelt und ist somit in der Lage, an ein Analyt von Interesse spezifisch zu binden. Um zu untersuchen, welche Zytokine und Proteine iNKT-Zellen nach ihrer Interaktion mit allogenen Mo-DCs freisetzen, wurde ein LEGENDplex™ Human CD8/NK 13-plex durchgeführt. Der Multiplex-Assay wurde nach der im Kit beigelegten Anleitung in leicht modifizierter Form angewendet. Hierfür wurden 15 µl der in 2.2.4.1.5 generierten Überstände in einer V-Boden Platte 1:1 mit Assay-Puffer verdünnt und die Beads für die Analyte des humanen CD8/NK-LEGENDplex™ hinzugegeben. Zusätzlich wurden 15 µl des Assaystandards für die Bestimmung der Analytmenge ebenfalls 1:1 mit Assay-Puffer verdünnt und aufgetragen. Nach einer 2 stündigen Inkubation auf einem Plattenschüttler im Dunkeln wurden alle Proben mit 200 µl Waschpuffer für 5 min bei 300 g gewaschen.

Anschließend wurden alle Ansätze mit 15 µl Streptavidin gelabelten Detektionsantikörpern inkubiert, welche 1 Stunde später wiederum für 30 min mit 15 µl Streptavidin-PE-Antikörpern auf einem Plattenschüttler im Dunkeln markiert wurden. Anschließend wurden die Proben noch 2 mal mit 200 µl Waschpuffer bei 300 g für 5 min gewaschen, bevor sie in 150 µl Assay-Puffer in einem BD Lyric mit Autosampler gemessen wurden. Die Analyse der Daten fand mittels der dem Kit beigelegten LEGENDplex™-Software statt.

2.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten dieser Arbeit erfolgte mit der Software GraphPad Prism 7. Für die Ermittlung der Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde der ungepaarte Student's T-Test verwendet. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. Ergebnisse

3.1 Expansion von iNKT-Zellen

Da humane PBMCs nur ca. 0,1 % iNKT-Zellen enthalten, müssen diese für Zellkulturexperimente und eine mögliche klinische Anwendung zuerst expandiert werden. Hierzu wurden PBMCs aus Buffy Coats von gesunden Spendern über 21 Tage mit den Glykolipiden KRN7000, PBS44 und PBS57 expandiert (Abbildung 4 A). Bei allen drei Glykolipiden handelt es sich um künstlich synthetisierte Derivate von α -GalCer, welches bereits 1995 im marinen Schwamm *Agelas mauritianus* entdeckt wurde und bis heute das potenteste und am häufigsten verwendete Glykolipid zur Stimulation und Expansion von iNKT-Zellen ist (Morita *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2006). Die Verwendung der drei α -GalCer-Derivate sollte klären, ob eines davon zu einer signifikant stärkeren Expansion von iNKT-Zellen führt.

Wie die durchflusszytometrischen Diagramme in Abbildung 4 B zeigen, führte die Stimulation mit allen drei Glykolipiden zu einer deutlichen Expansion von iNKT-Zellen, während unstimulierte iNKT-Zellen nicht expandierten. Alle drei Glykolipide waren dabei vergleichbar effektiv (Abbildung 4 B, C). Im Durchschnitt expandierten Glykolipid-stimulierte iNKT-Zellen innerhalb von 21 Tagen um den Faktor 7130. Bei minimaler Expansion wuchsen iNKT-Zellen um das 1852-fache bei maximaler Expansion um das 16886-fache. Im Durchschnitt ließen sich pro Ansatz so aus anfänglich 800 iNKT-Zellen an Tag 0 ca. 6×10^6 iNKT-Zellen an Tag 21 expandieren. Die iNKT-Zell-Kulturen erreichten dabei eine Reinheit von durchschnittlich 30,4 %. Bei minimaler Expansion betrug die Reinheit der iNKT-Zellen in Kultur 8,4 %, bei maximaler Expansion eine Reinheit von 62,1 % (Abbildung 4 C).

Da sowohl für Zellkulturexperimente als auch für eine zukünftige klinische Anwendung eine höhere Reinheit notwendig ist, wurden expandierten iNKT-Zellen nach erfolgter Expansion mittels MACS und FACS aufgereinigt. Durch eine FACS-basierte Aufreinigung ließ sich eine durchschnittliche Reinheit an iNKT-Zellen von 95,7 % (min. 78,4 %, max. 99,9 %) erzielen. Bei einer MACS-basierten Aufreinigung lag die durchschnittliche Reinheit bei 94,2 % (min. 78,7 %, max. 100,0 %) (Abbildung 4 D).

Durch die hohe Expansionsrate und die Möglichkeit, iNKT-Zellen sehr rein zu isolieren, konnten diese in weiteren Zellkulturexperimenten auf ihr mögliches Potenzial zur GvHD-Prävention und auf ihre antitumorale Wirkung getestet werden. Ob die *ex vivo*

Expansion genügend iNKT-Zellen für eine Anwendung im Patienten liefert, müsste in weiterführenden Dosisesskalationsstudien überprüft werden. Aufgrund der vergleichbaren Expansionsraten wurden für die Experimente in dieser Arbeit, wenn nicht anders beschrieben, mittels KRN7000 expandierte iNKT-Zellen verwendet.

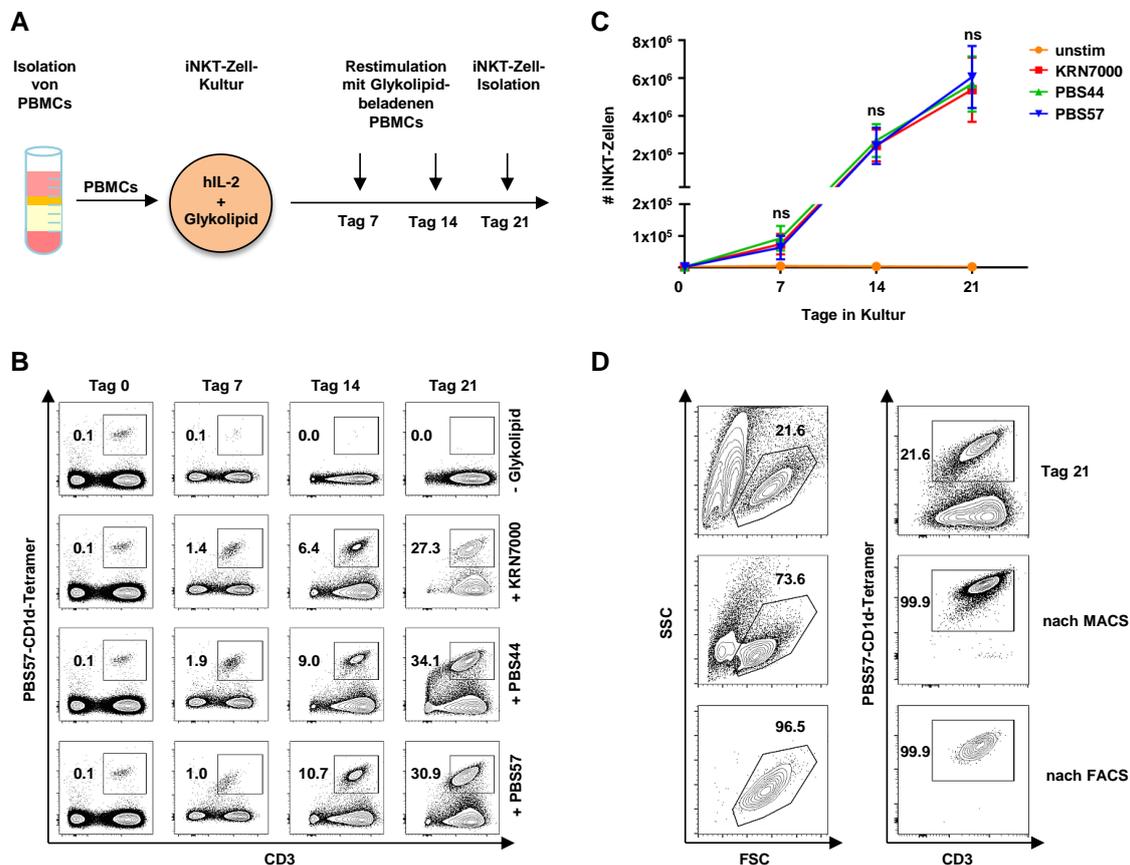


Abbildung 4: Ex vivo Expansion und Aufreinigung von iNKT-Zellen

(A) zeigt eine schematische Darstellung einer iNKT-Zell-Expansion durch Glykolipid-Stimulation. Nach der Isolation von PBMCs wurden diese zusammen mit hiL-2 und mit einem der angegebenen Glykolipide stimuliert. Im Anschluss wurden die iNKT-Zellen an Tag 7 und Tag 14 mit Glykolipid-beladenen und -bestrahlten PBMCs allogenen restimuliert. In (B) sind repräsentative *dot plots* dargestellt, welche den prozentualen Anteil an iNKT-Zellen während ihrer Expansion mit den Glykolipiden KRN7000, PBS44 und PBS57 an Tag 0, 7, 14 und 21 zeigen. Alle dargestellten Events beziehen sich dabei auf lebende Lymphozyten. iNKT-Zellen wurden durch die Expression von CD3 und einer positiven PBS57-CD1d-Tetramer-Färbung charakterisiert. (C) zeigt absolute iNKT-Zellzahlen im Verlauf einer 21-tägigen Expansion bei einem Ausgangswert von 2×10^6 PBMCs pro Ansatz. Dargestellt sind hierbei zusammengefasste Daten von jeweils 9 Kulturen je Glykolipid. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. In (D) sind exemplarische *dot plots* zu sehen, welche die Aufreinigung von iNKT-Zellen nach einer 21-tägigen Kultur zeigen. Zur Aufreinigung wurden sowohl MACS-basierte als auch FACS-basierte Methoden verwendet. Die FSC/SSC-plots beziehen sich Einzelzellen. iNKT-Zellen wurden anhand ihrer CD3-Expression und einer positiven PBS57-CD1d-Tetramer-Färbung aus lebenden Lymphozyten definiert.

modifiziert aus Schmid *et al.*, 2018 Front Immunol

3.2 Charakterisierung expandierter iNKT-Zellen

Direkt nach Aktivierung setzen iNKT-Zellen große Mengen an Zytokinen frei und regulieren damit sowohl Immunzellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems. Anhand der Produktion der Surrogat-Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-17 und der Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 werden iNKT-Zellen in Subpopulationen unterteilt (Brennan *et al.*, 2013): CD4⁺ IL-4-produzierende iNKT-Zellen werden in der Literatur als Th2-iNKT-Zellen klassifiziert, die insbesondere antiinflammatorische Aufgaben erfüllen und Toleranz vermitteln; Als Th1-iNKT-Zellen sind CD8⁺ IFN- γ -produzierende iNKT-Zellen charakterisiert, welche vor allem inflammatorische und zytotoxische Aufgaben übernehmen; Th17-iNKT-Zellen stellen nur einen sehr geringen Anteil der iNKT-Zellen dar. Sie spielen vor allem bei der Abwehr von Pathogenen eine wichtige Rolle; Gekennzeichnet sind sie durch einen CD4⁻ IL-17-produzierenden Phänotyp. Um zu überprüfen, ob die Expansion mittels α -GalCer in einer präferentiellen Expansion einer dieser iNKT-Zell-Subpopulationen resultiert, wurde die CD4- und CD8-Expression sowie die Produktion der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-17 vor und nach 21-tägiger Expansion bestimmt.

Bei der Analyse der iNKT-Zell-Subpopulationen vor Expansion an Tag 0 und nach Expansion an Tag 21 wurde deutlich, dass sich der prozentuale Anteil von CD4⁺CD8⁻ von durchschnittlich 40,0 % auf 63,0 % signifikant erhöhte (Abbildung 5 A, B). Im Gegensatz dazu nahm der relative Anteil von CD4⁻CD8⁻ iNKT-Zellen im Verlauf der Expansion von 52,5 % auf 23,3 % ab. Der relative Anteil von CD4⁻CD8⁺ iNKT-Zellen blieb mit 7,1 % vor Expansion zu 7,2 % nach Expansion hingegen fast unverändert (Abbildung 5 A, B).

Auch die Zytokinproduktion der kultivierten iNKT-Zellen änderte sich durch die Expansion. Die Anzahl IFN- γ produzierender iNKT-Zellen verdoppelte sich von 39,3 % vor Expansion auf 78,5 % nach Expansion (Abbildung 5 C, D). Eine Verdopplung war ebenfalls bei der Anzahl von IL-17 produzierenden T-Zellen zu beobachten. Vor Beginn der Expansion produzierten 0,2 % der iNKT-Zellen IL-17, während nach 21-tägiger Expansion 0,4 % der iNKT-Zellen dazu in der Lage waren (Abbildung 5 C, D). Die Anzahl IL-4-produzierender iNKT-Zellen nahm am stärksten zu. Diese mehr als versiebenfachte sich von 7,1% vor Expansion auf 52,5 % nach Expansion.

Die Analyse der Zytokinproduktion der einzelnen iNKT-Subpopulationen nach Expansion ergab, dass CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁺ iNKT-Zellen alle

vergleichbare Mengen an IFN- γ - und IL-17-produzierenden iNKT-Zellen aufwiesen. Der Anteil IL-4-produzierender iNKT-Zellen hingegen war in CD4+CD8- iNKT-Zellen signifikant erhöht (CD4-CD8- 26,3%; CD4+CD8- 57,3%; CD4-CD8+ 19,9%) (Abbildung 5 E). Die signifikante Zunahme der IL-4-produzierenden iNKT-Zellen im Verlauf der 21-tägigen Kultur stand somit im Zusammenhang mit der präferentiellen Expansion CD4+CD8- iNKT-Zellen.

Die Charakterisierung expandierter iNKT-Zellen zeigte somit, dass die Stimulation mit α -GalCer zu einer präferentiellen *in vitro* Expansion von CD4+IL-4+ Th-2-iNKT-Zellen führt. Dies galt sowohl für die Expansion mit KRN7000 als auch mit den Glykolipiden PBS44 und PB57 (Anhangsabbildung 1). Die grundsätzliche Fähigkeit zur Zytokinproduktion der expandierten iNKT-Zellen sprach außerdem für ihre intakte Funktionalität, was essentiell war für deren Verwendung in weiteren Versuchen und einer möglichen klinischen Anwendung.

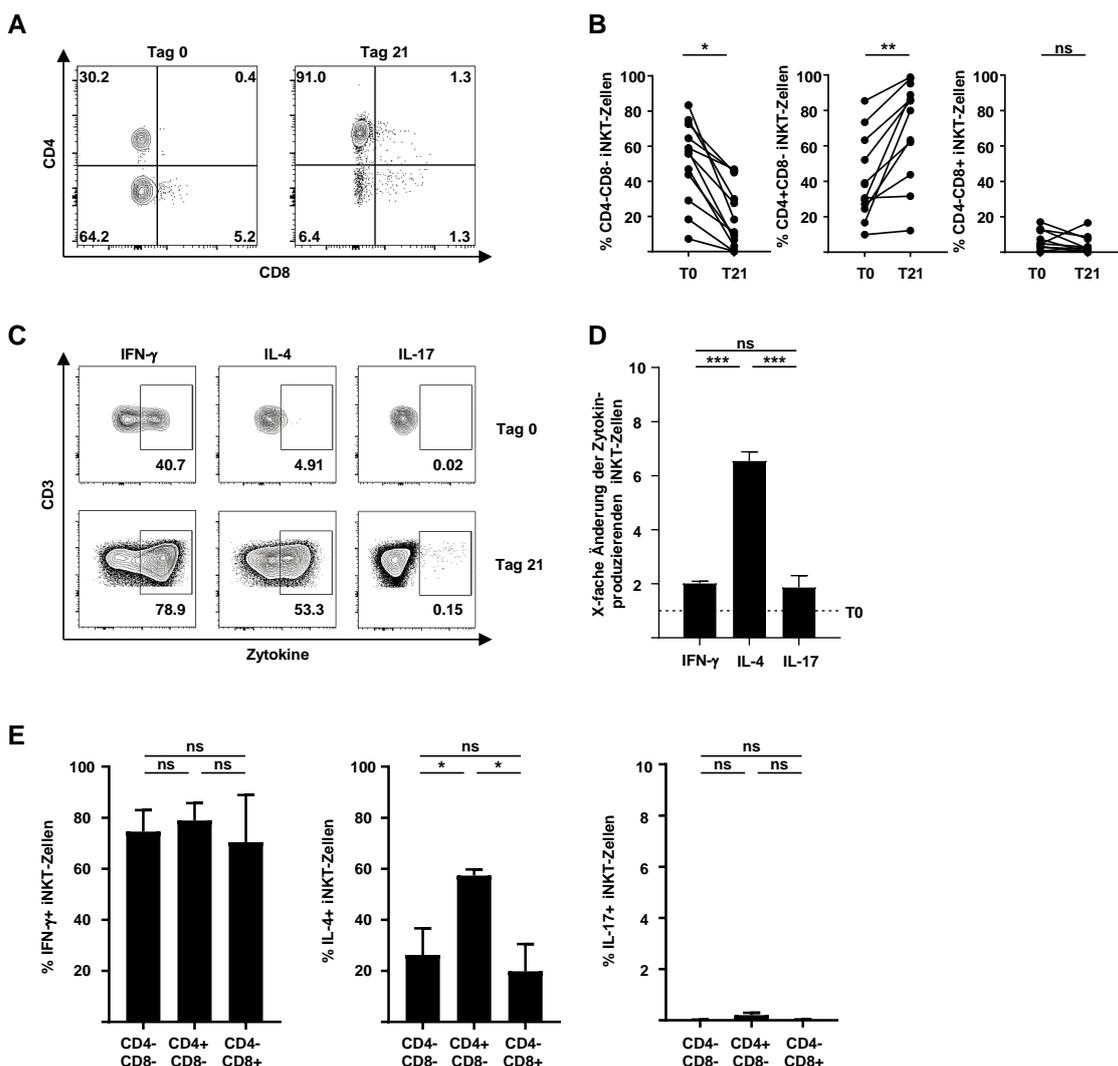


Abbildung 5: Präferentielle Expansion Th-2 polarisierter CD4+ iNKT-Zellen

(A) zeigt repräsentative *dot plots* von iNKT-Zellen hinsichtlich ihrer CD4- und CD8-Expression vor und nach 21-tägiger Expansion. Alle dargestellten Events beziehen sich auf lebende iNKT-Zellen. In (B) ist die relative Änderung der iNKT-Zell-Subpopulationen CD4-CD8- (n=12), CD4+CD8- (n=11) und CD4-CD8+ (n=11) vor und nach 21-tägiger Expansion dargestellt. (C) zeigt repräsentative *dot plots*, welche der Th-1, Th-2 und Th-17 Produktion von iNKT-Zellen vor und nach einer 21-tägigen Expansion zeigen. Alle dargestellten Events beziehen sich auf lebende iNKT-Zellen. In (D) ist die x-fache Zunahme der Zytokin-produzierenden iNKT-Zellen während der Expansion (Tag 21 vs Tag 0 (gestrichelte Linie)) für die Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-17 dargestellt (n=12). (E) zeigt die IFN- γ , IL-4- und IL-17-Produktion von iNKT-Zellen nach 21-tägiger Expansion, aufgeteilt in CD4-CD8-, CD4+CD8- und CD4-CD8+ iNKT-Zellen (n=4). Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

modifiziert aus Schmid *et al.*, 2018 Front Immunol

3.3 Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von expandierten iNKT-Zellen in einer humanen MLR

Die Entstehung einer GvHD beginnt damit, dass Spender-T-Zellen aus dem Transplantat den HLA-Komplex, oder ein darin präsentiertes Alloantigen, im Körper des Empfängers als fremd erkennen. Diese Spender-T-Zellen werden dadurch aktiviert, sie proliferieren und beginnen daraufhin im Effektorstadium mit der Zerstörung von Geweben und Organen des stammzelltransplantierten Patienten. Wenn sich diese Immunreaktion manifestiert und unkontrollierbar wird, kann diese bis zum Tod des Patienten führen. In Mausstudien konnte bereits gezeigt werden, dass der adoptive Transfer von iNKT-Zellen vor einer letalen GvHD schützen kann (Schneidawind *et al.*, 2014).

Um zu überprüfen, ob auch humane expandierte iNKT-Zellen das Potenzial haben, die T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation alloreaktiver T-Zellen in einem humanen GvHD-Modell zu unterdrücken, wurden diese in einer MLR getestet (Abbildung 6).

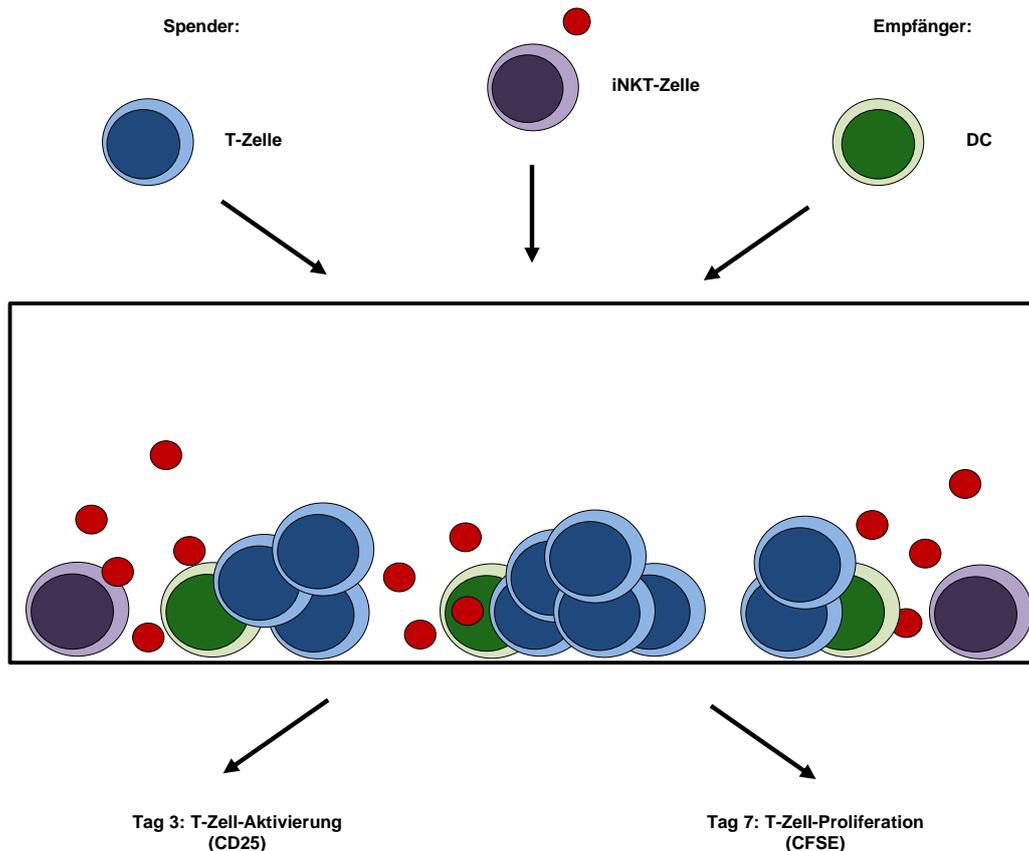


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer humanen MLR

Die immunsuppressiven Eigenschaften expandierter iNKT-Zellen wurden in einer humanen MLR getestet. Hierfür wurden Mo-DCs (Empfänger) mit HLA-inkompatiblen CFSE-markierten allogenen CD3+ T-Zellen (Spender) in einem Verhältnis von 1:1 mit und ohne die Hinzugabe von expandierten iNKT-Zellen inkubiert. Nach 3 Tagen wurde die T-Zell-Aktivierung allogener CFSE+ T-Zellen mittels CD25 bestimmt. Die T-Zell-Proliferation wurde an Tag 7 mittels CFSE ermittelt. Durch den Vergleich der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation in MLRs mit und ohne iNKT-Zellen wurde das immunsuppressive Potenzial expandierter iNKT-Zellen analysiert.

Ohne die Zugabe von expandierten iNKT-Zellen wurden durchschnittlich 27,0 % der Spender-T-Zellen durch HLA-inkompatible Mo-DCs des Empfängers aktiviert. Durch die Zugabe ansteigender Mengen an iNKT-Zellen wurde die T-Zell-Aktivierung dosisabhängig inhibiert. Bereits bei einem Verhältnis von iNKT-Zellen zu T-Zellen von 0,5:1 wurde die T-Zell-Aktivierung um fast die Hälfte auf 16,4 % inhibiert. Eine nahezu vollständige Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung wurde bei einem Verhältnis von 2,5:1 erreicht (5,1 %) (Abbildung 7 A, B). Sowohl CD4+ als auch CD8+ Spender-T-Zellen reagierten in gleichem Maße auf die iNKT-Zell-induzierte Inhibition (Abbildung 4 B).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der T-Zell-Proliferation. Nach 7-tägiger MLR proliferierten durchschnittlich 29,0 % der T-Zellen ohne die Zugabe von iNKT-Zellen. Durch die mengenmäßig ansteigende Zugabe von iNKT-Zellen wurde die T-Zell-Proliferation proportional zur T-Zell-Aktivierung inhibiert. Dies geschah ebenfalls dosisabhängig (Abbildung 7 C, D). Auch bei der T-Zell-Proliferation hatten expandierte iNKT-Zellen einen inhibitorischen Effekt sowohl auf CD4+ als auch auf CD8+ T-Zellen (Abbildung 7 D).

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass expandierte humane iNKT-Zellen in der Lage sind, sowohl die Aktivierung als auch die Proliferation von alloreaktiven T-Zellen in einer humanen MLR dosisabhängig zu inhibieren. Dabei war es unerheblich, ob die iNKT-Zellen zuvor mit Hilfe von KRN7000, PBS44 oder PBS57 expandiert wurden (Anhangsabbildung 2).

Die expandierten iNKT-Zellen stammten im durchgeführten Experiment von einer dritten Partei (iNKT-Zellen, DCs und T-Zellen HLA-unident). Allerdings waren expandierte iNKT-Zellen aus PBMCs des Spenders (iNKT-Zellen und T-Zellen HLA-ident) als auch des Empfängers (iNKT-Zellen und DCs HLA-ident) ebenfalls in der Lage, die Aktivierung allogener T-Zellen zu inhibieren (Anhangsabbildung 3).

Da expandierte iNKT-Zellen die T-Zell-Aktivierung proportional zur T-Zell-Proliferation inhibierten, wurde in den MLRs in den folgenden Versuchen ausschließlich die T-Zell-Aktivierung mittels CD25 bestimmt. Dies war zusätzlich der Tatsache geschuldet, dass für eine suffiziente T-Zell-Proliferation stark unterschiedliche MHC-Komplexe vorliegen mussten, was nicht immer gewährleistet werden konnte.

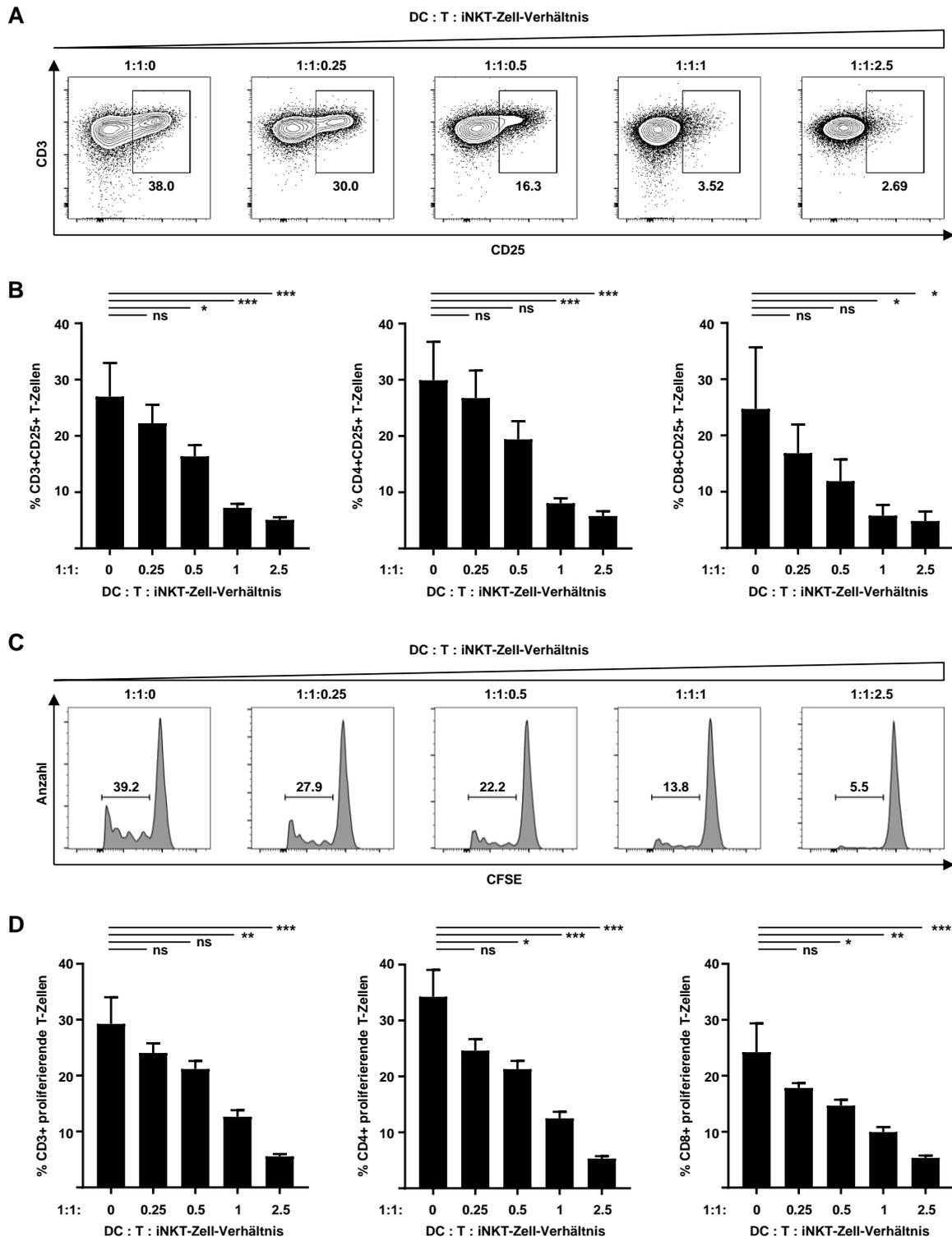


Abbildung 7: Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation durch expandierte iNKT-Zellen

(A) zeigt repräsentative *dot plots* von CD3+ Spender-T-Zellen. Dargestellt ist die T-Zell-Aktivierung von Spender-T-Zellen mittels CD25 nach 3-tägiger MLR mit steigenden Mengen an iNKT-Zellen. Die gezeigten *dot plots* beziehen sich auf CFSE-markierte CD3+ lebende T-Zellen. Ergänzend dazu sind in (B) zusammengefasste Daten von 4 dieser MLRs gezeigt. Die CD3+ Spender-T-Zellen sind dabei zusätzlich in CD4+ und CD8+ T-Zellen unterteilt. (C) zeigt die T-Zell-Proliferation CD3+ Spender-T-Zellen nach 7-tägiger MLR mit steigenden Mengen an iNKT-Zellen. Die dargestellten *dot plots* beziehen

sich auf CFSE-markierte lebende T-Zellen. **(D)** zeigt dazugehörige zusammengefasste Daten von 3 unabhängigen Experimenten. Die CD3⁺ Spender-T-Zellen wurden dafür zusätzlich in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterteilt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

modifiziert aus Schmid *et al.*, 2018 Front Immunol

3.4 Vergleichende Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von CD4-CD8-, CD4+CD8- und CD4-CD8+ iNKT-Zell-Subpopulationen

Da sich iNKT-Zellen in verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen und Aufgaben unterteilen lassen, sollte in diesem Experiment geklärt werden, ob eine distinkte iNKT-Zell-Subpopulation für die Inhibition der T-Zell-Aktivierung verantwortlich ist. Während in Mausstudien vor allem CD4⁺CD8⁻ iNKT-Zellen als toleranzinduzierend beschrieben werden (Schneidawind *et al.*, 2014), wurden in prospektiven humanen klinischen Studien vor allem CD4⁻CD8⁻ iNKT-Zellen für die Prävention einer GvHD als essenziell identifiziert (Malard *et al.*, 2016).

Um zu überprüfen, ob eine der iNKT-Zell-Subpopulationen innerhalb humaner MLRs in besonderem Maße für die Prävention der T-Zell-Aktivierung verantwortlich ist, wurden expandierte iNKT-Zellen mittels FACS in CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁺ Subpopulationen aufgereinigt und auf ihr inhibitorisches Potenzial hin überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von CD4⁻CD8⁻ iNKT-Zellen den Anteil aktivierter, alloreaktiver T-Zellen von durchschnittlich 19,9 % in der MLR ohne iNKT-Zellen, auf 5,3 % reduzierte. CD4⁺CD8⁻ iNKT-Zellen reduzierten den Anteil aktivierter, alloreaktiver T-Zellen auf 6,0 %; CD4⁻CD8⁺ iNKT-Zellen auf 7,8 % (Abbildung 8 A, B). Die Analyse der T-Zell-Aktivierung ergab somit, dass alle getesteten iNKT-Zell-Subpopulationen das Potenzial besaßen, die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen *in vitro* zu inhibieren. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede in der Qualität der vermittelten Toleranzinduktion.

Auf Basis dieser Daten lässt sich schlussfolgern, dass keine einzelne iNKT-Zellsubpopulation die alleinige Kontrolle alloreaktiver T-Zellen übernimmt, sondern alle iNKT-Zell-Subpopulationen dazu fähig sind.

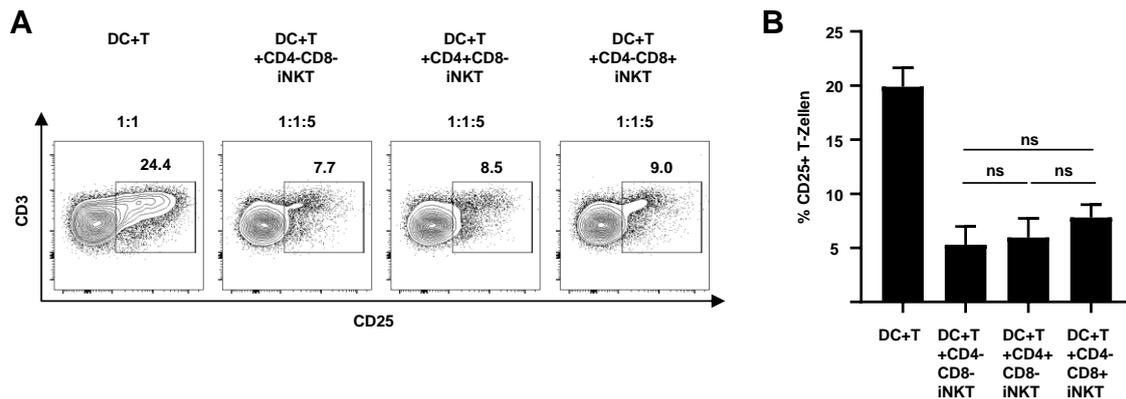


Abbildung 8: Äquipotente Inhibition der Aktivierung allogener T-Zellen durch CD4-CD8-, CD4+CD8- und CD4-CD8+ iNKT-Zell-Subpopulationen

(A) zeigt repräsentative *dot plots* CD3+ T-Zellen nach 3-tägiger Kultur mit allogenen Mo-DCs und wahlweise CD4-CD8-, CD4+CD8- oder CD4-CD8+ iNKT-Zellen im Verhältnis 1:1:5. Analysiert wurde die T-Zell-Aktivierung mittels CD25. Die dargestellten Events beziehen sich auf lebende CD3+ CFSE-markierte T-Zellen. In (B) sind 3 dieser Versuche in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.5 Transwell-Assay zur Analyse der Zellkontakt-abhängigen inhibitorischen Eigenschaften von expandierten iNKT-Zellen

Mit Hilfe einer Transwell-MLR sollte anschließend analysiert werden, ob iNKT-Zellen für die Unterdrückung der Alloreaktivität von T-Zellen innerhalb einer humanen MLR direkten Zellkontakt benötigen oder ob die Sekretion löslicher Faktoren ohne direkten Zellkontakt hierfür ausreichend ist. Hierzu wurden expandierte iNKT-Zellen sowohl direkt als auch durch ein Transwell getrennt in MLRs gegeben.

Während direkt kultivierte iNKT-Zellen die Anzahl aktivierter, alloreaktiver T-Zellen in den MLRs von durchschnittlich 20,4 % auf 5,9 % reduzieren konnten, war die Anzahl aktivierter, alloreaktiver T-Zellen im Transwell-Ansatz nicht signifikant reduziert (19,0%) (Abbildung 9 A, B).

Die Ergebnisse der Transwell-Assays machten damit deutlich, dass iNKT-Zellen nur nach direktem Zell-Zell-Kontakt dazu sind in der Lage, die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen *in vitro* zu verhindern.

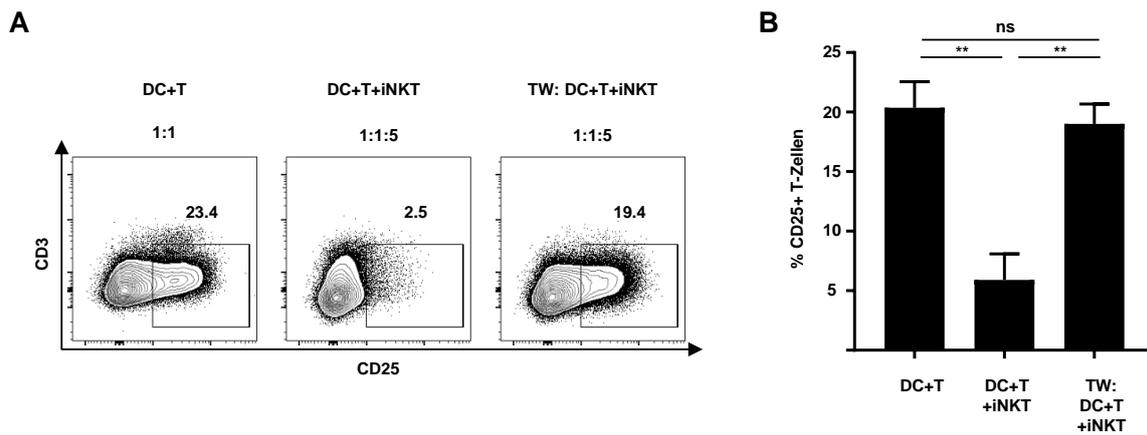


Abbildung 9: Zellkontakt-abhängige Inhibition der Aktivierung allogener T-Zellen durch expandierte iNKT-Zellen

(A) zeigt repräsentative dot plots von CD3+ T-Zellen nach 3-tägiger Kultur mit allogenen Mo-DCs ohne iNKT-Zellen, nach direkter Kultur mit iNKT-Zellen und nach Kultur mit iNKT-Zellen getrennt durch ein Transwell. Analysiert wurde die T-Zell-Aktivierung mittels CD25. Mo-DCs und allogene T-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 kultiviert, während iNKT-Zellen in 5-facher Menge hinzugegeben wurde. Die gezeigten Plots beziehen sich auf CD3+ CFSE-markierte, lebende T-Zellen. (B) zeigt ein Diagramm mit zusammengefassten Daten von 3 dieser Experimente. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.6 Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Treg-Expansion

Da Mausstudien nahelegen, dass die iNKT-Zell-vermittelte Kontrolle der Alloreaktivität von T-Zellen durch die Expansion von Tregs realisiert wird, sollte in diesem Experiment geklärt werden, ob dieser Mechanismus auch der iNKT-Zell-vermittelten Toleranzinduktion im humanen System zugrundeliegt (Pillai *et al.*, 2009; Schneidawind *et al.*, 2015).

Um dies zu überprüfen, wurde die Anzahl an CD127^{lo}CD25⁺ Tregs in den in 3.3 durchgeführten MLRs nach 3 und 7 Tagen bestimmt und mit T-Zellen desselben Spenders, welche alleine kultiviert wurden, verglichen.

An Tag 3 hatten alleine kultivierte T-Zellen einen durchschnittlichen Anteil an Tregs von 1,4 %. T-Zellen vom selben Spender hatten nach 3-tägiger MLR mit iNKT-Zellen einen Anteil an Tregs von 1,5 % (Abbildung 10 A, B). Ein ähnliches Bild zeigte sich nach 7-tägiger Kultur. Alleine kultivierte T-Zellen wiesen nach 7 Tagen einen Treg-Anteil von durchschnittlich 1,2 % auf, während der Anteil an Tregs der T-Zellen in der MLR mit expandierten iNKT-Zellen 1,8 % betrug (Abbildung 10 A, B).

Somit konnte weder nach 3 noch nach 7 Tagen eine von iNKT-Zellen induzierte Expansion von Tregs festgestellt werden, womit sich schlussfolgern lässt, dass die iNKT-Zell-vermittelte Inhibition der T-Zell-Alloreaktivität im humanen System in den in dieser Arbeit durchgeführten MLRs nicht durch die Expansion von Tregs vermittelt wurde.

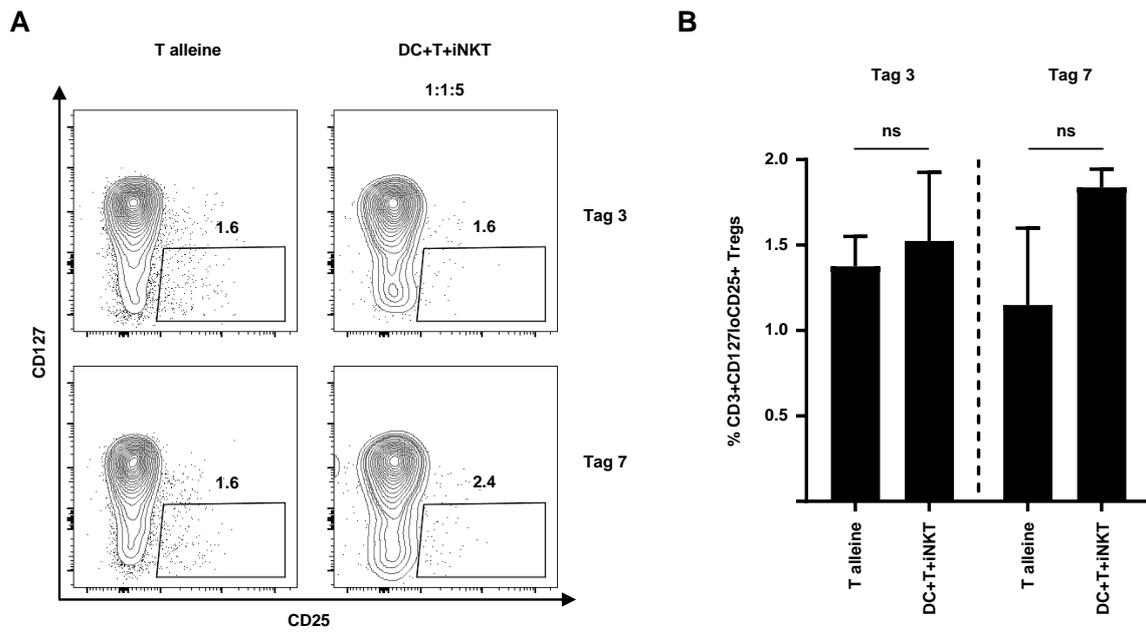


Abbildung 10: Ausbleibende Expansion von Tregs nach Kokultur mit iNKT-Zellen

(A) zeigt repräsentative *dot plots* von CFSE-markierten CD3+ T-Zellen nach 3- und 7-tägiger Kultur alleine oder in einer MLR mit expandierten iNKT-Zellen. Analysiert wurde die Anzahl an Tregs mittels CD127 und CD25 Färbung. Tregs wurden als CD3+CD127loCD25+ definiert. Mo-DCs und allogene T-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 kultiviert, während iNKT-Zellen in 5-facher Menge hinzugegeben wurden. (B) zeigt ein Diagramm mit zusammengefassten Daten 4 dieser Experimente. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.7 Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von iNKT-Zellen auf mittels CD3/CD28-Bead aktivierte T-Zellen

Da gezeigt werden konnte, dass die iNKT-Zell-vermittelte Inhibition der Alloreaktivität von T-Zellen nicht über die Expansion von Tregs erfolgte, stellte sich die Frage, was stattdessen der hierbei zugrundeliegende Mechanismus ist. Um sich dieser Fragestellung zu nähern, sollte zunächst geklärt werden, ob iNKT-Zellen die Unterdrückung der Alloreaktivität von T-Zellen über eine alleinige, direkte Interaktion mit T-Zellen vermitteln oder sie dies indirekt realisieren, indem sie die in der MLR

befindlichen DCs so modulieren, dass diese die Suppression alloreaktiver T-Zellen bewerkstelligen.

Um dies zu testen, wurden expandierte iNKT-Zellen in diesem Experiment ausschließlich mit allogenen CD3+ T-Zellen für 3 Tage kultiviert. Da die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen, anders als in MLRs, nicht über MHC-inkompatible Mo-DCs erfolgen konnte, wurden diese mittels CD3/CD28 Dynabeads aktiviert.

Die 3-tägige Stimulation mittels Dynabeads resultierte in einer Aktivierung von 86,8 % der CD3+ T-Zellen. Durch die Hinzugabe von expandierten iNKT-Zellen wurde die Anzahl aktivierter CD25+ T-Zellen nicht signifikant reduziert (78,6 %) (Abbildung 11 A, B). In der Kontrollgruppe ohne Dynabead-Stimulation fand keine T-Zell-Aktivierung statt.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass iNKT-Zellen die Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung nicht direkt vermitteln können, sondern indirekt über die in den MLRs enthaltenen Mo-DCs.

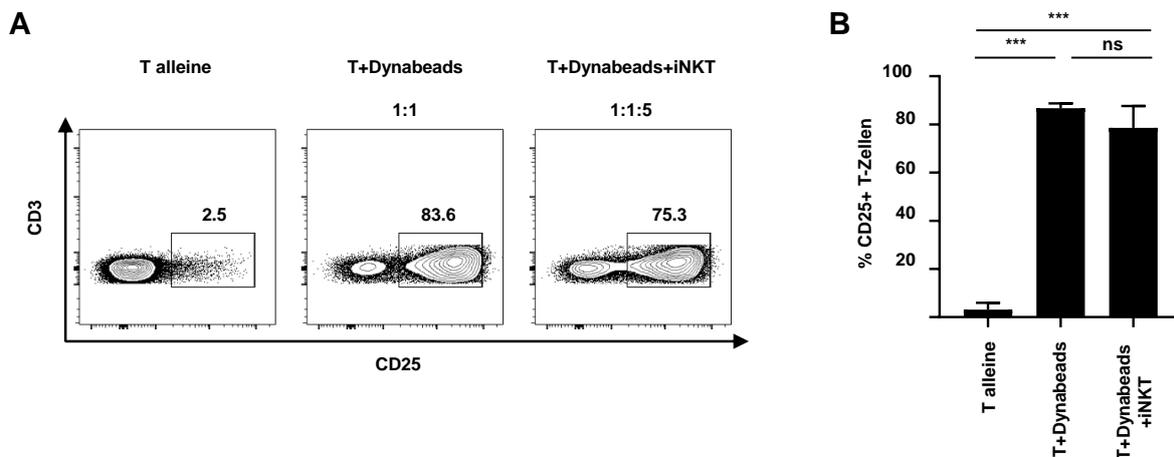


Abbildung 11: Ausbleibende Inhibition der Aktivierung mittels Dynabead stimulierter T-Zellen durch iNKT-Zellen

In **(A)** sind repräsentative *dot plots* von CD3+ T-Zellen gezeigt, die nach 3-tägiger Kultur mittels CD25 auf ihre Aktivierung hin untersucht wurden. Es handelt sich dabei um T-Zellen, die ohne Dynabeads, mit Dynabeads im Verhältnis 1:1 und mit Dynabeads und iNKT-Zellen im Verhältnis 1:1:5 inkubiert wurden. In **(B)** sind zusammengefasste Daten von 3 dieser Experimente dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

3.8 Apoptoseassays zur Analyse der iNKT-Zell-induzierten DC-Apoptose

Dass die iNKT-Zell-vermittelte Unterdrückung alloreaktiver T-Zellen indirekt über die Modulation von DCs erfolgt, ist durchaus plausibel, da bereits hinlänglich bekannt ist, dass DCs T-Zell-Antworten in großem Maße beeinflussen. Dies erfolgt häufig über die Interaktion von DCs und T-Zellen über kostimulatorische Moleküle wie beispielsweise CD40, CD80, CD86, PDL-1, PDL-2, TIM-3, OX40L, 4-1BBL oder ICOS-L (Wykes and Lewin, 2018). Daher sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob iNKT-Zellen die Expression dieser kostimulatorischen Moleküle auf DCs modulieren.

Zur Überprüfung dieser These wurden MLRs mit und ohne die Zugabe expandierter iNKT-Zellen angesetzt. Nach 3 und 7 Tagen sollten die DCs auf ihre Expression dieser kostimulatorischen Moleküle analysiert werden.

Bei der Analyse der Daten wurde anhand des FCS/SSC *dot plots* und der Lebend-Tot-Färbung allerdings deutlich, dass alle in der MLR befindlichen Mo-DCs, welche zusätzlich mit expandierten iNKT-Zellen kultiviert wurden, bereits nach 3 Tagen nicht mehr viabel waren (Anhangsabbildung 4).

Dies legte die Vermutung nahe, dass expandierte iNKT-Zellen allogene Mo-DCs in Kultur töten.

Um diese Vermutung zu verifizieren, wurden allogene Mo-DCs zusammen mit expandierten iNKT-Zellen für 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden inkubiert und anschließend auf ihre Viabilität mittels Annexin V/PI-Assay überprüft. Über die unterschiedlich langen Inkubationszeiten sollte ermittelt werden, wie lange iNKT-Zellen für eine mögliche Eliminierung allogener Mo-DCs benötigen.

Mittels Annexin V/PI-Färbung konnte gezeigt werden, dass Mo-DCs in Kultur ohne iNKT-Zellen im Verlauf einer 8-stündigen Kultur viabel bleiben.

Der Anteil viabler Annexin V-PI- Mo-DCs lag zu Beginn bei 90,3 %; nach 8 h Kultur bei 95,7 % (Abbildung 12 A). Wurden Mo-DCs allerdings mit expandierten iNKT-Zellen zusammen kultiviert, begangen diese bereits nach 4 h damit, in Apoptose zu gehen. Der Anteil viabler Annexin V-PI- Mo-DCs reduzierte sich hier von 81,4 % auf 42,2 % (Abbildung 12 A).

Nach 6 h nahm die Menge apoptotischer Mo-DCs weiter zu und nur noch 30,6 % der Mo-DCs waren viabel. Nach 8 h blieben nur noch 25% der Mo-DCs viabel. Während zu den vorherigen Zeitpunkten Mo-DCs fast ausschließlich früh-apoptotisch waren

(Annexin V+PI-) enthielten Kokulturen von expandierten iNKT-Zellen und Mo-DCs nach 8 h auch erste spätapoptotische/nekrotische DCs (Annexin V+/PI+) (Abbildung 12 A).

Als weiterer Assay zur Analyse der Apoptose wurde der Nicoletti-Assay verwendet. Hierzu wurden Mo-DCs alleine und mit expandierten iNKT-Zellen in Kombination für 4 und 18 h inkubiert und anschließend die freie Menge an DNA bestimmt, welche von apoptotischen Zellen typischerweise bei der Defragmentierung des Zellkerns freigesetzt wird. Durch die 4-stündige Inkubation von allogenen Mo-DCs iNKT-Zellen mit expandierten iNKT-Zellen stieg der Anteil freier DNA von apoptotischen Mo-DCs signifikant von 11,2 % (Mo-DCs alleine) auf 31,8 %. Bei 18-stündiger Inkubation stieg der Anteil freier DNA von apoptotischen Mo-DCs weiter auf durchschnittlich 50,5 % (Abbildung 12 B).

Zur bildlichen Veranschaulichung der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion wurden zusätzlich immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mittels ImageStream durchgeführt.

Hierfür wurden erneut Mo-DCs mit und ohne expandierte iNKT-Zellen für 4 h und 18 h kultiviert. Ohne die Kultur mit iNKT-Zellen waren über 90 % der Mo-DCs viabel. Im Durchlicht war ihre Zellmorphologie rund und gleichmäßig. Sie zeigten eine DC-typische Expression von HLA-DR, aber keine Anzeichen von Apoptose (Annexin-PI-) (Abbildung 12 C).

Nach 4-stündiger Kultur mit iNKT-Zellen waren hingegen 58,5 % der allogenen Mo-DCs apoptotisch. In den immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen waren apoptotische DCs durch ihre inhomogene und geschrumpfte Zellform zu erkennen. Zudem war ihre HLA-DR-Expression geringer und die Hochregulation von Phosphatidylserin an ihrer Zellmembran war anhand der Annexinfärbung klar zu erkennen. Nach 18-stündiger Kultur mit iNKT-Zellen waren 87,4 % der Mo-DCs spätapoptotisch. Im Durchlicht zeigten diese eine für die Apoptose typische Blasenbildung der Zellmembran. Zudem wiesen sie eine deutliche Annexin V- und PI-Färbung auf. Anhand der PI-Färbung war zudem eine für die späte Apoptose typische Defragmentierung des Zellkerns deutlich zu erkennen (Abbildung 12 D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass expandierte iNKT-Zellen *in vitro* dazu in der Lage sind, Apoptose in allogenen Mo-DCs zu induzieren. Daraus lässt sich folgender Mechanismus für die iNKT-Zell-vermittelte Inhibition der Alloreaktivität von T-Zellen *in vitro* ableiten: Durch die Apoptoseinduktion können iNKT-Zellen allogene

Mo-DCs eliminieren, welche daraufhin Spender-T-Zellen nicht mehr aktivieren können wodurch diese nicht mehr proliferieren und eine Alloreaktion somit ausbleibt.

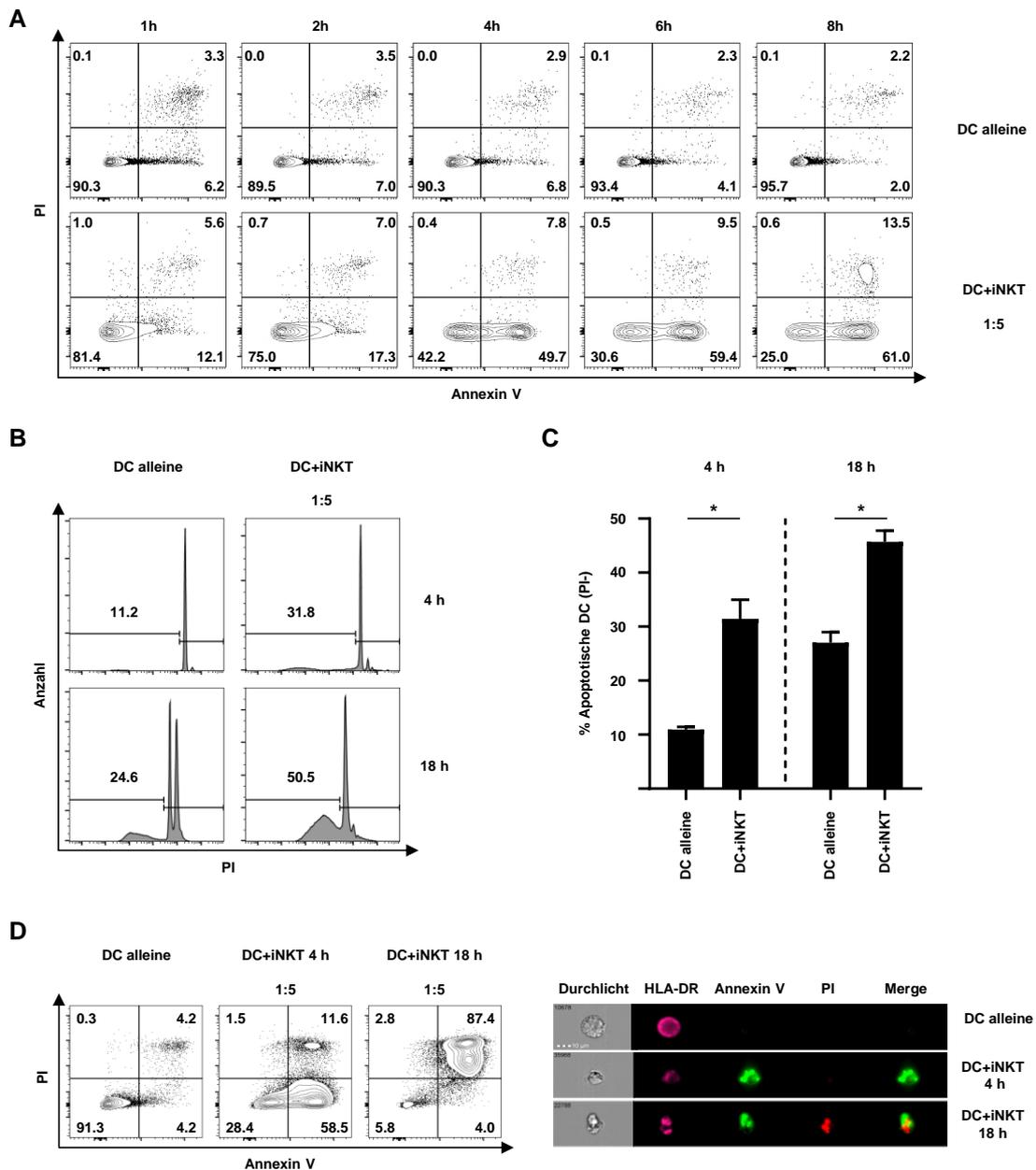


Abbildung 12: Induktion der Apoptose in allogenen Mo-DCs durch iNKT-Zellen

(A) zeigt *dot plots* von Mo-DCs nach alleiniger Kultur oder nach gemeinsamer Kultur mit expandierten iNKT-Zellen im Verhältnis 1:5. Dargestellt ist die Apoptose von Mo-DCs, welche nach 1, 2, 4, 6 und 8 h mittels Annexin V/PI-Assay bestimmt wurde. Die gezeigten *dot plots* beziehen sich auf Mo-DCs welche durch die Negativselektion von iNKT-Zellen identifiziert wurden (Kinetik n=1). In (B) ist die Bestimmung apoptotischer DCs mittels Nicoletti-Assay in repräsentativen Histogrammen dargestellt. Gemessen wurde die Anzahl apoptotischer Mo-DCs nach Kultur mit expandierten iNKT-Zellen für 4 und 18 h im Verhältnis 1:5. Als Kontrolle dienten Mo-DCs, welche alleine über dieselbe Dauer kultiviert wurden. Die gezeigten *dot plots* beziehen sich durch den Ausschluss von iNKT-Zellen erhaltene Mo-DCs (n=3). (C) zeigt zusammengefasste Daten von 3 dieser Experimente. (D) zeigt repräsentative *dot plots* von Mo-DCs nach alleiniger bzw. gemeinsamer Kultur mit expandierten iNKT-Zellen für 4 und 18 h (n=3).

Dargestellt ist die daraus resultierende Apoptose mittels Annexin V/PI-Assay. Zusätzlich dazu sind dazugehörige immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dargestellt, welche mittels ImageStream erstellt wurden. Die Aufnahmen zeigen Mo-DCs der im Annexin V/PI-Assay anteilmäßig größten Populationen. Für Mo-DCs alleine waren dies lebende Annexin V-PI- Mo-DCs. Für DC+iNKT-Zellen, die für 4 h kultiviert wurden, waren dies frühapoptotische Annexin V+PI- Mo-DCs, und für DC+iNKT-Zellen, die für 18 h kultiviert wurden, waren dies spätapoptotische Annexin V+PI+ Mo-DCs. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.9 Analyse der Aktivierung allogener T-Zellen durch apoptotische Mo-DCs

Um den zuvor vorgestellten Mechanismus auf seine Sinnhaftigkeit zu überprüfen und zu zeigen dass die Induktion der Apoptose in allogenen DCs mit einer ausbleibenden Aktivierung alloreaktiver T-Zellen verbunden ist, wurden CD3+ T-Zellen zum einen mit viablen allogenen Mo-DCs, zum anderen mit apoptotischen allogenen Mo-DCs inkubiert und anschließend auf ihre T-Zell-Aktivierung überprüft. Die Induktion der Apoptose in allogenen Mo-DCs wurde durch eine 18-stündige Inkubation mit expandierten iNKT-Zellen vermittelt sowie zur Kontrolle durch die Behandlung mit 1 μM Staurosporin (Anhangsabbildung 13).

Während viable allogene Mo-DCs eine Aktivierung in durchschnittlich 40,2 % der CD3+ T-Zellen verursachten, wurden durch allogene, apoptotische DCs signifikant weniger T-Zellen alloreaktiv. Mo-DCs, in denen die Apoptose durch die Inkubation mit iNKT-Zellen induziert wurde, aktivierten nur 4,7 % der CD3+ allogenen T-Zellen. Apoptotische Mo-DCs, die durch die Zugabe von Staurosporin generiert wurden, aktivierten ausschließlich 0,7 % der CD3+ T-Zellen.

Somit konnte gezeigt werden, dass apoptotische DCs *in vitro* allogene T-Zellen nicht mehr aktivieren können, was die zuvor aufgestellte Hypothese unterstützt, dass iNKT-Zellen die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen verhindern können, indem sie die Apoptose allogener Mo-DCs induzieren.

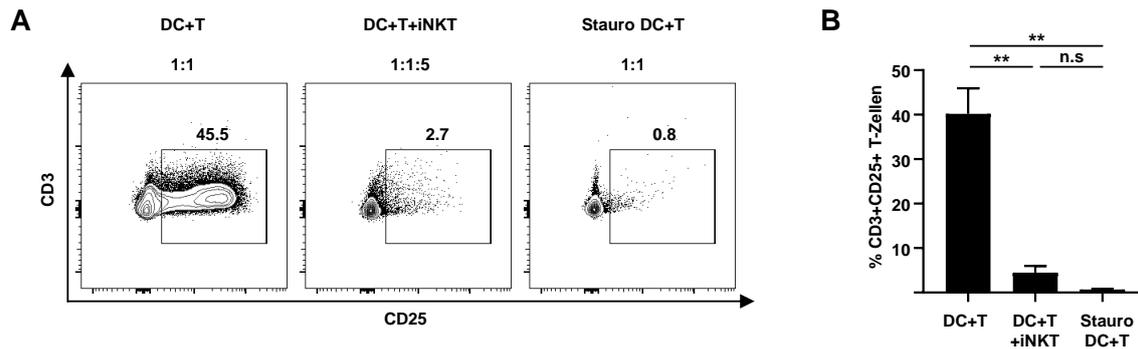


Abbildung 13: Ausbleibende Aktivierung allogener T-Zellen nach Kultur mit apoptotische Mo-DCs

(A) zeigt exemplarische *dot plots* von CD3+ T-Zellen, die nach 3-tägiger Kultur mit viablen allogenen Mo-DCs oder mit apoptotischen allogenen Mo-DCs auf ihre T-Zell-Aktivierung mittels CD25 überprüft wurden. Die Generierung apoptotischer DCs erfolgte vor der Kultur mit T-Zellen, zum einen durch eine 18-stündige Kokultur mit expandierten iNKT-Zellen, zum anderen durch eine 18-stündige Behandlung mit 1 µM Staurosporin. Die Kultur der T-Zellen und DCs erfolgte in einem Verhältnis von 1:1. Die dargestellten Events beziehen sich auf CD3+ CFSE+ T-Zellen. (B) zeigt zusammengefasste Daten von 3 dieser Experimente mit Mo-DCs von 3 unterschiedlichen Spendern. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.10 Analyse der dosisabhängigen Apoptoseinduktion von allogenen Mo-DCs durch iNKT-Zellen und T-Zellen

Nachdem bestätigt wurde, dass iNKT-Zellen die Aktivierung allogener T-Zellen verhindern, indem sie DCs über die Induktion der Apoptose eliminieren, sollte in diesem Versuch überprüft werden, wie viele iNKT-Zellen dafür nötig sind. Da es sich bei iNKT-Zellen um eine spezialisierte Untergruppe von T-Zellen handelt, sollte zusätzlich untersucht werden, ob alle T-Zellen oder nur spezifisch iNKT-Zellen die Apoptose in allogenen Mo-DCs induzieren können.

Zur Klärung dieser Fragen wurden steigende Mengen an expandierten iNKT-Zellen oder CD3+ T-Zellen mit allogenen Mo-DCs für 4 h inkubiert.

Bereits bei einem iNKT-Zell zu DC-Verhältnis von 0,5:1 konnte ein Rückgang des Anteils viabler DCs von anfangs 79,0 % auf durchschnittlich 63,1 % beobachtet werden. Bei einem iNKT-Zell zu DC-Verhältnis von 1:1 waren nur noch 47,4 % viabel; bei einem iNKT-Zell zu DC Verhältnis von 5:1 zeigten nur noch 22,3 % der DCs kein Anzeichen einer Apoptose (Abbildung 14 A, B).

Während iNKT-Zellen somit eine dosisabhängige Apoptose in allogenen Mo-DCs induzierten, führte die Kultur mit allogenen CD3+ T-Zellen nicht zur Induktion der Apoptose in allogenen Mo-DCs (Abbildung 14 A, B).

Die Fähigkeit zur Induktion der Apoptose in allogenen Mo-DCs ist auf Basis dieser Daten eine spezifische Fähigkeit von iNKT-Zellen, welche konventionelle T-Zellen nicht besitzen. Für eine geringe Induktion der DC-Apoptose ist bereits ein iNKT-Zell zu DC-Verhältnis von 0,5:1 ausreichend. Um etwa die Hälfte der DCs in Apoptose zu führen wird ein ausgeglichenes Verhältnis von iNKT-Zellen und DCs benötigt; für eine Reduktion der viablen DCs auf ca. ein Fünftel ist ein iNKT-Zell zu DC-Verhältnis von 5:1 von Nöten.

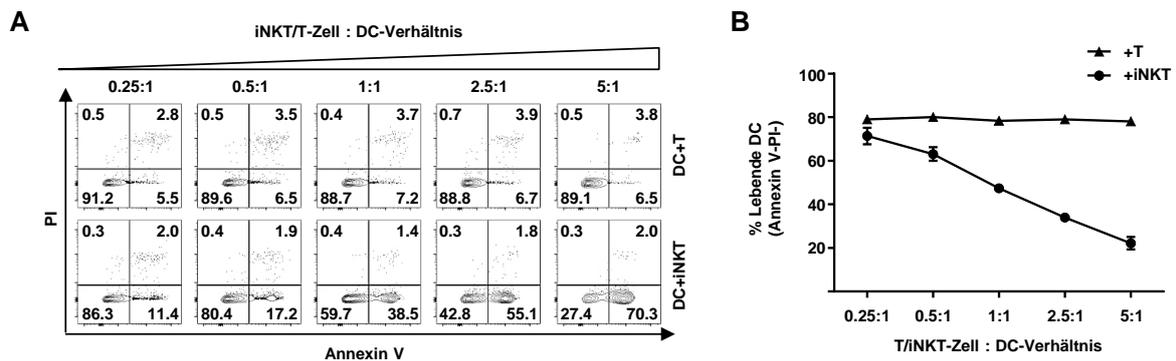


Abbildung 14: Dosisabhängige iNKT-Zell-vermittelte Induktion der Apoptose in allogenen Mo-DCs

In (A) sind exemplarische *dot plots* von allogenen Mo-DCs nach 4-stündiger Kultur mit ansteigenden Mengen an iNKT- bzw. T-Zellen gezeigt. Sie zeigen die Apoptose von Mo-DCs dargestellt mittels Annexin V/PI-Assay. Die dargestellten Events zeigen Mo-DCs, welche durch den Ausschluss von iNKT-Zellen identifiziert wurden. (B) zeigt zusammengefasste Daten von 3 dieser Assays. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

3.11 Vergleichende Analyse von iNKT-Zell-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs

Um zu testen, ob alle iNKT-Zell-Subpopulationen in gleichem Maße dazu in der Lage sind, Apoptose in allogenen Mo-DCs zu induzieren oder eine der Subpopulationen im Speziellen wurden expandierte iNKT-Zellen in CD4-CD8-, CD4+CD8- und CD4-CD8+ iNKT-Zell-Subpopulationen mittels FACS aufgereinigt und für 4 h mit allogenen Mo-DCs inkubiert.

Während nach alleiniger Kultur durchschnittlich 84,4 % der Mo-DCs viabel waren, zeigten nach der Kultur mit CD4-CD8- iNKT-Zellen nur noch 32,8 % der Mo-DCs kein

Anzeichen einer Apoptose (Annexin V-/PI-). Nach der Kultur mit CD4+CD8- iNKT-Zellen verblieben 32,6 % der Mo-DCs viabel und 33,5 % nach der Kultur mit CD4-CD8+ iNKT-Zellen (Abbildung 15 A, B).

Somit zeigte sich, dass alle getesteten iNKT-Zell-Subpopulationen äquipotent in der Induktion der Apoptose allogener Mo-DCs waren. Diese Daten sind stimmig, da bereits alle iNKT-Zellsubpopulationen gleichermaßen dazu fähig waren die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen zu inhibieren. Weil sie dies mechanistisch über die Induktion der Apoptose in allogenen Mo-DCs bewerkstelligen, war konsequenterweise davon auszugehen, dass sie auch in diesem Prozess vergleichbar sind.

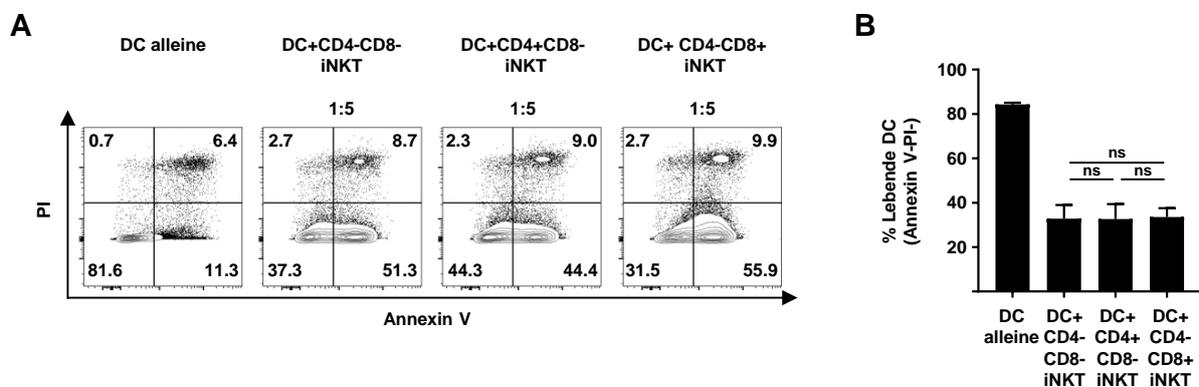


Abbildung 15: Quantitativ vergleichbare Apoptoseinduktion allogener Mo-DCs durch CD4-CD8-, CD4+CD8- und CD4-CD8+ iNKT-Zellen

(A) zeigt exemplarische *dot plots* eines Annexin V/PI-Assays von Mo-DCs nach alleiniger Kultur oder nach 4-stündiger Inkubation mit den iNKT-Zell-Subpopulationen CD4-CD8-, CD4+CD8- oder CD4-CD8+. Expandierte iNKT-Zellen und Mo-DCs wurden dabei im Verhältnis 5:1 eingesetzt. Bei den gezeigten Events handelt es sich um Mo-DCs, welche sich nach dem Ausschluss von iNKT-Zellen ergaben. (B) zeigt das zugehörige Balkendiagramm. Hierfür wurden Daten aus 3 unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.12 Analyse der kontaktabhängigen Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs durch expandierte iNKT-Zellen

Die Induktion der Apoptose kann entweder durch direkten Zellkontakt oder durch die Sekretion Apoptose-induzierender Faktoren erreicht werden (Nagata, 2018).

Um zu untersuchen, ob iNKT-Zellen die Apoptose in allogenen Mo-DCs durch direkten Zellkontakt oder durch die Sekretion Apoptose-induzierender Faktoren vermitteln, wurden Transwell-Assays durchgeführt. Hierbei wurden expandierte iNKT-Zellen mit

allogenen Mo-DCs einmal direkt und einmal durch ein Transwell getrennt für 4 h inkubiert und anschließend auf ihre Viabilität mittels Annexin V/PI- überprüft. Bei direkter Kultur reduzierten iNKT-Zellen den Anteil viabler DCs von durchschnittlich 95,7 % auf 38,6 % (Abbildung 16 A, B). Waren iNKT-Zellen durch ein Transwell getrennt, verblieben 94,7 % der DCs viabel (Abbildung 16 A, B). Dies zeigte, dass expandierte iNKT-Zellen, analog zur T-Zell-Aktivierung, für die Induktion der Apoptose in allogenen Mo-DCs direkten Zellkontakt benötigen.

Um diesen Zellkontakt zu visualisieren, wurden allogene Mo-DCs und expandierte iNKT-Zellen nach gemeinsamer Kultur mittels ImageStream analysiert. Bei der Betrachtung der immunhistochemischen Aufnahmen ließen sich bereits im Durchlicht aneinanderhaftende Zellen erkennen (Abbildung 16 C). Mit Hilfe der charakteristischen Marker HLA-DR für DCs und des PBS57-CD1d-Tetramers für iNKT-Zellen konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den interagierenden Zellen um Mo-DCs und iNKT-Zellen handelte. Zusätzlich zeigte sich durch eine Annexin V-Färbung, dass allogene Mo-DCs nach dieser in der Interaktion mit iNKT-Zellen apoptotisch werden (Abbildung 16 C).

Durch diese Analysen konnte die Interaktion von Mo-DCs mit expandierten iNKT-Zellen und die dadurch vermittelte Apoptoseinduktion direkt nachgewiesen werden. Dass die Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs kontaktabhängig stattfindet stimmt damit überein, dass auch die Inhibition der Aktivierung allogener T-Zellen kontaktabhängig stattfindet. Dies war insofern schlüssig, als dass die Apoptoseinduktion allogener Mo-DCs der zugrundeliegende Mechanismus für die iNKT-Zell-vermittelte Kontrolle alloreaktiver T-Zellen ist.

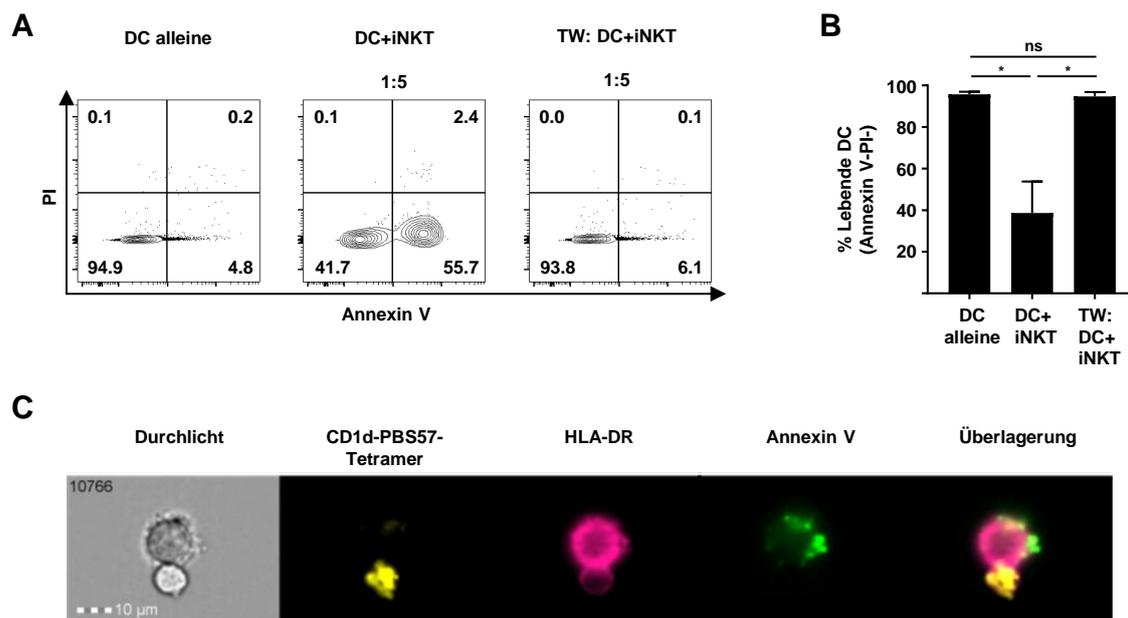


Abbildung 16: Zellkontakt-abhängige Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs durch expandierte iNKT-Zellen

(A) zeigt exemplarische *dot plots* von Annexin V/PI-Assays allogener Mo-DCs, welche direkt oder durch ein Transwell getrennt mit expandierten iNKT-Zellen für 4 h inkubiert wurden. Die dargestellten Events zeigen Mo-DCs, welche durch den Ausschluss von iNKT-Zellen identifiziert wurden. In (B) sind dazu zusammengefasste Daten von 3 dieser Assays gezeigt. (C) zeigt eine immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahme der Interaktion von expandierten iNKT-Zellen und allogenen Mo-DCs. Mo-DCs und iNKT-Zellen wurden für 4 h im Verhältnis 1:5 inkubiert und anschließend mit fluoreszenzgekoppelten-Antikörpern gefärbt und mittels ImageStream analysiert. Dabei wurden Aufnahmen von PBS57-CD1d-Tetramer+HLA-DR+ Dubletten (interagierende iNKT-Zellen und Mo-DCs) erstellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.13 Blockade von Schlüsselmolekülen der Apoptoseinduktion zur Identifizierung des Mechanismus der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion in DCs

Für die direkte iNKT-Zell-vermittelte Tumorlyse ist bereits bekannt, dass iNKT-Zellen CD1d+ Tumorzellen über FasL, TRAIL und NKG2D sowie über die Ausschüttung von Perforin und Granzym B eliminieren können (Kawano *et al.*, 1998; Smyth and Godfrey, 2000; Wingender *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2018). Daher sollte in diesem Experiment überprüft werden, ob auch die iNKT-Zell-vermittelte Apoptose von allogenen Mo-DCs über diese Schlüsselmoleküle induziert wird und ob eine CD1d-TCR-Interaktion dafür vonnöten ist.

Hierzu wurden expandierte iNKT-Zellen mit allogenen Mo-DCs für 4 h inkubiert und die zu testenden Schlüssel-moleküle mittels spezifischer Antikörper oder entsprechender Reagenzien blockiert.

Die Blockade der Interaktion von iNKT-Zellen und DCs über CD1d führte zu einer signifikanten Inhibition der Apoptose in allogenen Mo-DCs von durchschnittlich 18,6 % (Abbildung 17 A, B). Keine signifikante Reduktion der iNKT-vermittelten Apoptose zeigte hingegen die Blockade von FasL, TRAIL oder NKG2D (Abbildung 17 A, B).

Wurde der Mechanismus der Perforin/Granzym B-vermittelten Apoptose durch die Zugabe von Concanamycin (CMA) inhibiert, konnte die Apoptose in allogenen Mo-DCs um durchschnittlich 42,8 % verringert werden (Abbildung 17 A, B).

Zusätzlich zur spezifischen Blockade der Moleküle und Signalwege, welche iNKT-Zellen zur direkten Tumorlyse befähigen, sollte die Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs durch den pan-Caspase Inhibitor Z-VAD und durch die Blockade der iNKT-Zell-Degranulation mittels CMA inhibiert werden. Durch die Behandlung mit Z-VAD konnte die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion allogener Mo-DCs um durchschnittlich 22,0 % gesenkt werden (Abbildung 17 A, B). Die Blockade der iNKT-Zell-Degranulation über Monensin und Brefeldin A führte zu einer Apoptoseinduktion von durchschnittlich 84,1 % (Abbildung 17 A, B).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs entscheidend über die CD1d-TCR-Achse vermittelt wird. Da die Blockade von CD1d die Apoptose in allogenen Mo-DCs allerdings nicht komplett inhibierte, ist es wahrscheinlich, dass neben CD1d weitere Adhäsionsmoleküle oder kostimulatorische Faktoren an der für die Apoptoseinduktion notwendigen Interaktion zwischen iNKT-Zellen und DCs beteiligt sind. Zwingend notwendig für die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion ist ihre Degranulation. Faktoren, die in Folge der Degranulation von iNKT-Zellen nachweislich die Apoptose in allogenen Mo-DCs induzierten, waren Perforin und Granzym B. Dass iNKT-Zellen zusätzlich weitere apoptoseinduzierende Faktoren sezernieren, scheint wahrscheinlich, da die Blockade des Perforin/Granzym-Signalwegs die Apoptoseinduktion nicht so stark inhibierte wie die komplette Blockade der Degranulation über CMA. Dass die Apoptoseinduktion sowohl über Caspase-abhängige wie -unabhängige Prozesse verläuft, zeigte die Verwendung von ZVAD. Keine Rolle für die iNKT-vermittelte Apoptoseinduktion spielten hingegen FasL, TRAIL und NKG2D.

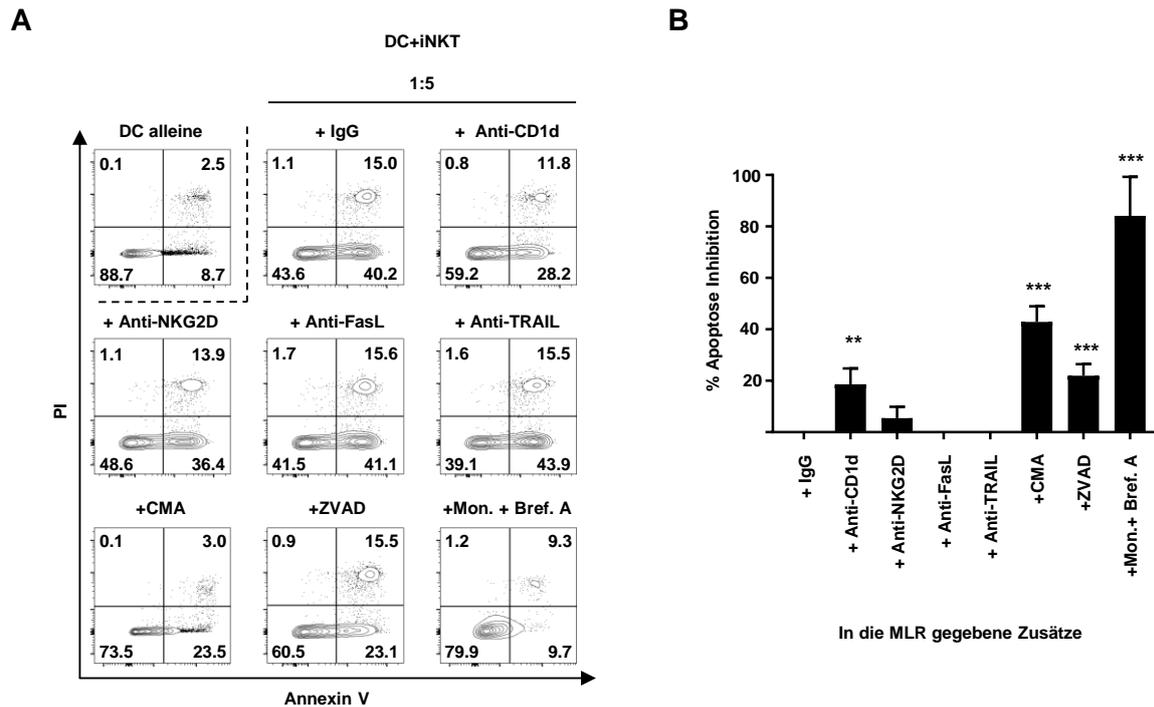


Abbildung 17: Blockade potenzieller Schlüsselmoleküle zur Inhibition der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs

(A) zeigt repräsentative *dot plots* apoptotischer DCs, analysiert mittels Annexin V/PI-Assays. Dafür wurden allogene Mo-DCs in einem Verhältnis von 1:5 mit expandierten iNKT-Zellen für 4 h inkubiert. Durch die Hinzugabe der angegebenen Antikörper oder Reagenzien wurden potenzielle Schlüsselmoleküle bzw. Schlüsselmechanismen für eine iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion blockiert. Die Kokulturen aus Mo-DCs und iNKT-Zellen und die entsprechenden IgGs dienten hierbei als Kontrolle. Innerhalb der Proben wurde auf alleine kultivierte Mo-DCs normiert. Die gezeigten Events beziehen sich auf Mo-DCs, die durch den Ausschluss von iNKT-Zellen identifiziert wurden. In (B) sind dazu zusammengefasste Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ bezogen auf die entsprechende Kontrolle.

3.14 Bestimmung der freigesetzten zytolytischen Moleküle und Zytokine von iNKT-Zellen nach der Kultur mit allogenen Mo-DCs

Um zu zeigen, dass iNKT-Zellen nach dem Kontakt mit allogenen Mo-DCs tatsächlich Perforin und Granzym B freisetzen, wurden expandierte iNKT-Zellen für 4 h mit allogenen Mo-DCs inkubiert. Als Kontrolle für eine spontane und möglicherweise unspezifische Freisetzung dienten iNKT-Zellen und Mo-DCs, welche jeweils alleine kultiviert wurden

Nach erfolgter Kultur wurde der Überstand auf die darin freigesetzten zytolytischen Faktoren und Zytokine mit Hilfe des CD8/NK LEGENDplex™ Kits analysiert. Dies ermöglichte nicht nur die Bestimmung der Perforin- und Granzym B-Freisetzung, sondern erlaubte zudem die Suche nach weiteren Faktoren, welche die iNKT-Zell-vermittelte Apoptose allogener DCs induzieren könnten.

Die Analyse der Überstände ergab, dass iNKT-Zellen in Kultur mit allogenen Mo-DCs große Mengen an Granzym B, Perforin und Granulysin freisetzen. Diese Moleküle wurden von iNKT-Zellen nach der gemeinsamen Kultur mit allogenen Mo-DCs signifikant mehr freigesetzt als von iNKT-Zellen alleine (Abbildung 18 A, B, C). Der Nachweis der Freisetzung von Perforin und Granzym B unterstützt die Hypothese, dass die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion über diese Moleküle erfolgt. Granulysin ist ebenfalls dafür bekannt, Apoptose zu vermitteln und könnte daher einer der weiteren gesuchten Faktoren sein, der relevant für die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs ist.

Neben Granzym B, Perforin und Granulysin waren ebenfalls Granzym A, TNF- α , sFasL und FasR im Überstand der Kokultur von expandierten iNKT-Zellen und allogenen Mo-DCs zu finden (Abbildung 18 D, E, F, G). Diese Moleküle sind potenziell auch in der Lage, die Induktion der Apoptose zu realisieren. Da Granzym A allerdings auch schon ohne den Kontakt mit allogenen DCs von iNKT-Zellen freigesetzt wurde und iNKT-Zellen für die Apoptoseinduktion allogener Mo-DCs direkten Zellkontakt benötigen, scheint Granzym A eher keine wichtige Rolle in diesem Prozess zuzukommen (Abbildung 18 D).

TNF- α hingegen konnte in signifikant höheren Mengen in Überständen der Kokultur von DCs und iNKT-Zellen nachgewiesen werden als in Überständen von Einzelkulturen dieser Zellen (Abbildung 18 E). Da TNF- α allerdings anders als Perforin, Granzym B, Granulysin und Granzym A potenziell sowohl von iNKT-Zellen als auch

von DCs in größeren Mengen freigesetzt werden kann, ist es zwar möglich, dass iNKT-Zellen die Apoptoseinduktion allogener Mo-DCs über die Freisetzung von TNF- α vermitteln, allerdings kann es auch sein, dass TNF- α schlichtweg von apoptotischen oder lysierten Mo-DCs sezerniert wird.

Ähnlich verhielt es sich mit sFasL. Der Überstand der Kokultur aus expandierten iNKT-Zellen und allogenen Mo-DCs enthielt signifikant mehr FasL (Abbildung 18 F). Da sowohl iNKT-Zellen als auch DCs in der Lage sind, FasL zu sezernieren, ist es schwer zu beurteilen, ob iNKT-Zellen eine Apoptoseinduktion allogener Mo-DCs darüber vermitteln. Falls dem so sein sollte, wäre der Effekt allerdings sehr gering, da die Blockade der FasR-FasL Interaktion in 3.14 die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion in DCs nicht signifikant inhibierte. Die Konzentration von sFasR wurde ebenfalls in den Kulturüberständen bestimmt, allerdings konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Abbildung 18 G).

Darüber hinaus ermöglichte die Analyse der Zellkulturüberstände durch das LEGENDplex™ Kit die Bestimmung der Konzentrationen der Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IL-17. Da diese eher für die immunologische Charakterisierung interessant sind und weniger für die direkte Apoptoseinduktion, befinden sich diese Ergebnisse im Anhang (Anhangsabbildung 6).

Die Resultate dieses Versuchs bekräftigen, dass die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion entscheidend über die Freisetzung von Perforin und Granzym B erfolgt. Als weitere Schlüsselfaktoren für die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion in allogenen DCs konnten zudem Granulysin und TNF- α ausgemacht werden.

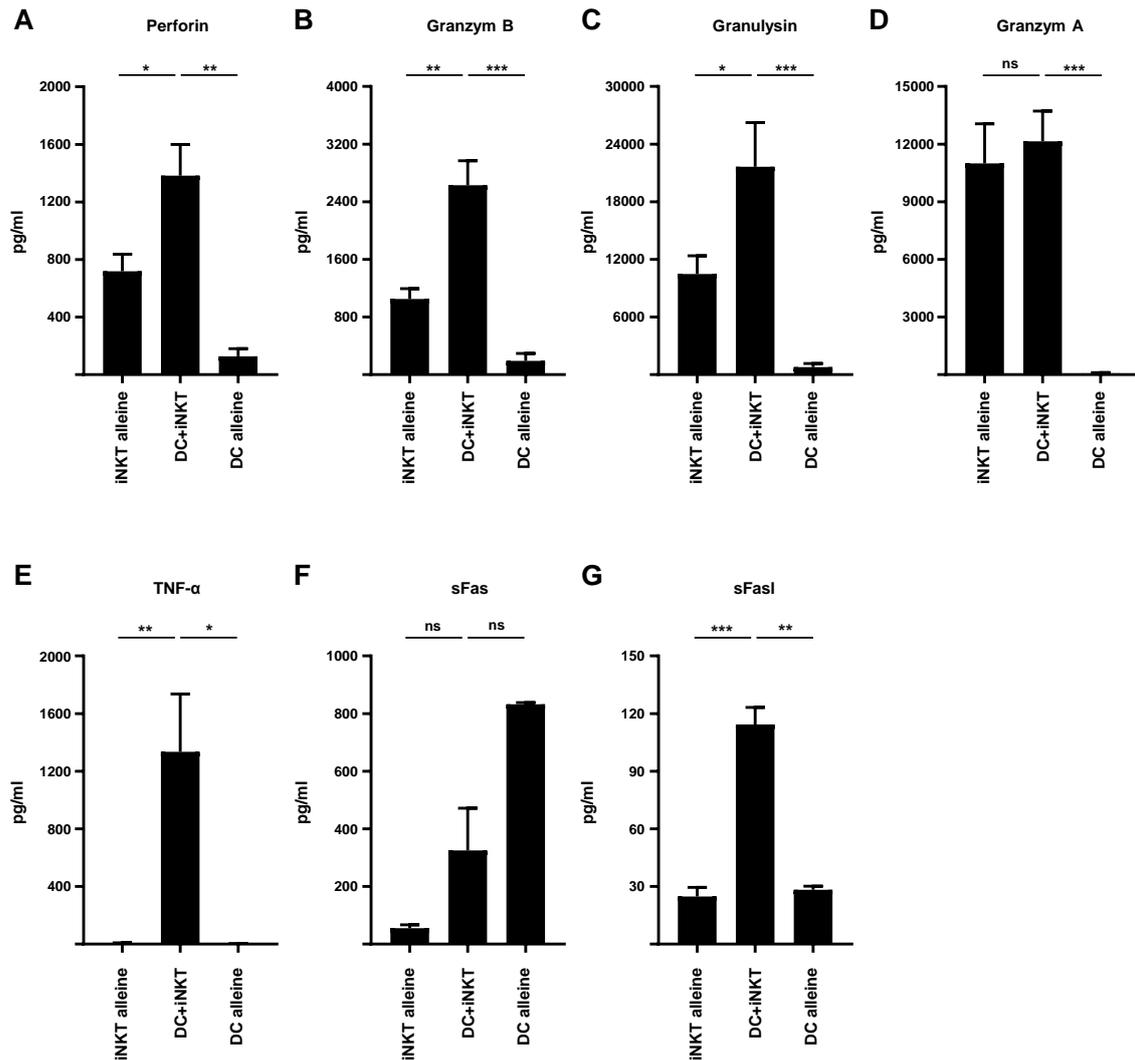


Abbildung 18: Bestimmung der freigesetzten zytolytischen Moleküle von iNKT-Zellen nach der Kultur mit allogenen Mo-DCs

Die Diagramme in Abbildung 15 zeigen die Freisetzung der zytolytischen Faktoren Perforin (A), Granzym B (B), Granulysin (C), Granzym A (D), TNF- α (E), sFas (F) und sFasI (G) durch expandierte iNKT-Zellen und Mo-DCs alleine und nach gemeinsamer Kokultur. Die freigesetzten zytolytischen Faktoren wurden aus Zellkulturüberständen mit Hilfe des CD8/NK LEGENDplex™ Kits bestimmt. Die analysierten Überstände wurden aus Kokulturen von expandierten iNKT-Zellen und allogenen Mo-DCs im Verhältnis von 5:1 oder aus den entsprechenden Einzelkulturen gewonnen (n=5). Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.15 Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion

Die bisher beschriebenen Versuche wurden alle mit allogenen Mo-DCs ohne zusätzliche Stimulation mit α -GalCer durchgeführt. Um herauszufinden, ob iNKT-Zellen die Apoptose ausschließlich in allogenen DCs induzieren können oder ob sie auch in der Lage sind, die Apoptoseinduktion in autologen DCs zu veranlassen, wurden sie mit autologen und allogenen Mo-DCs im Verhältnis 5:1 für 4 h inkubiert. Desweiteren sollte in Erfahrung gebracht werden, ob die Apoptoseinduktion in Mo-DCs durch die zusätzliche Stimulation von iNKT-Zellen mittels α -GalCer verstärkt werden kann. Hierzu wurden die zuvor beschriebenen Kokulturen mit und ohne Zugabe von α -GalCer durchgeführt.

Ohne Stimulation mit α -GalCer induzierten iNKT-Zellen in durchschnittlich 66,3 % der autologen Mo-DCs die Apoptose. Eine signifikant höhere Apoptoseinduktion war in allogenen Mo-DCs zu beobachten (86,1 %) (Abbildung 19 A, B).

Durch die zusätzliche Stimulation mit α -GalCer vermittelten iNKT-Zellen in 87,1 % der autologen Mo-DCs und in 88,2 % der allogenen Mo-DCs die Induktion der Apoptose (Abbildung 19 A, B).

Während die zusätzliche Stimulation mit α -GalCer die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion in autologen DCs signifikant steigerte, konnte diese bei allogenen DCs nicht weiter erhöht werden (Abbildung 19 A, B). Die zusätzliche Simulation mit α -GalCer hob dementsprechend den signifikanten Unterschied in der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion zwischen autologen und allogenen Mo-DCs auf (Abbildung 19 A, B).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass expandierte iNKT-Zellen grundsätzlich dazu im Stande sind, sowohl autologe als auch allogene Mo-DCs in Apoptose zu versetzen. Ohne die zusätzliche Stimulation mit α -GalCer werden allerdings signifikant mehr allogene Mo-DCs in Apoptose versetzt.

Werden iNKT-Zellen jedoch zusätzlich mit α -GalCer stimuliert, induzieren diese die Apoptose in autologen und allogenen Mo-DCs in gleichem Maße. Die signifikant erhöhte Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs ohne die zusätzliche Gabe von α -GalCer lässt darauf schließen, dass expandierte iNKT-Zellen durch allogene DCs einen zusätzlichen Stimulus erhalten, den sie durch autologe DCs nicht bekommen.

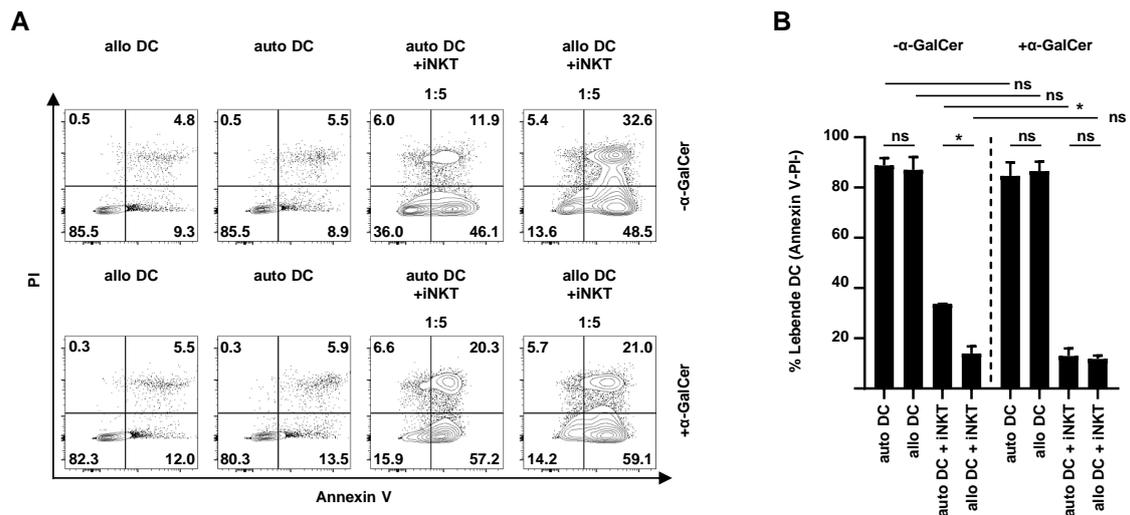


Abbildung 19: Apoptoseinduktion autologer und allogener Mo-DCs durch unstimulierte und stimulierte iNKT-Zellen

(A) zeigt repräsentative dot plots, welche die Apoptoseinduktion in autologen und allogenen Mo-DCs nach der Inkubation mit expandierten iNKT-Zellen mit und ohne Zugabe von α -GalCer darstellen. Hierzu wurden autologe und allogene Mo-DCs mit iNKT-Zellen für 4 h im Verhältnis 1:5 inkubiert. Als Kontrolle dienten alleine kultivierte iNKT-Zellen. Die dargestellten Events beziehen sich auf Mo-DCs, welche durch den Ausschluss von iNKT-Zellen identifiziert wurden. Abbildung (B) zeigt zusammengefasste Daten von 3 dieser Assays. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.16 Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion in typischerweise in Transplantaten enthaltenen Zellen

Wie in den vorherigen Versuchen bereits gezeigt wurde, stellt die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion einen wirksamen Mechanismus für die Inhibition der Aktivierung alloreaktiver T-Zellen dar. Für die klinische Verwendung von expandierten iNKT-Zellen in der GvHD-Prävention ist es allerdings essenziell, dass die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion zielgerichtet stattfindet.

Würden expandierte iNKT-Zellen die Apoptose in den in Transplantaten befindlichen Stammzellen induzieren, wäre dies äußerst kontraproduktiv, da diese für die Immunrekonstitution des betreffenden Patienten überlebensnotwendig sind.

Auch die Eliminierung von anderen Immunzellen wie NK-Zellen, B-Zellen und T-Zellen wäre nicht förderlich, da diese sowohl für die Abwehr von Krankheitserregern als auch für die Tumorkontrolle und somit für die Verhinderung eines möglichen Rezidivs von enormer Wichtigkeit sind.

Um die Spezifität der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion zu analysieren, wurden expandierte iNKT-Zellen mit typischerweise in Transplantaten vorkommenden Zellen kultiviert.

Dabei zeigte sich, dass iNKT-Zellen die Apoptose in einem signifikanten Ausmaß, sowohl in DCs als auch in Monozyten induzierten (Abbildung 20 A, B). Die Anzahl viabler Annexin V-PI- DCs wurde durch die Kultur mit iNKT-Zellen um durchschnittlich 47,9 % auf 52,1 % reduziert. Bei Monozyten sank die Anzahl viabler Monozyten sogar um durchschnittlich 71,7 % auf 28,9 % (Abbildung 20 B).

CD34+ Stammzellen, NK-Zellen, T-Zellen und B-Zellen zeigten hingegen keine Anzeichen einer durch iNKT-Zellen vermittelten Apoptose (Abbildung 20 A, B). Hier wurde die Anzahl viabler Zellen nicht signifikant reduziert.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs über eine direkte Interaktion stattfindet und CD1d hierbei eine wichtige Rolle spielt, wurde nachfolgend die CD1d-Expression der in Transplantaten enthaltenen Zellen bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die stärkste CD1d-Expression in Monozyten und DCs zu finden war (Abbildung 20 C, D). Während alle Monozyten eine deutliche CD1d-Expression aufwiesen, gab es innerhalb der DCs eine CD1d- und eine CD1d+ Population (Abbildung 20 C). Über eine CD1c-, CD303-Färbung konnte gezeigt werden, dass es sich bei der CD1d+ Population um myeloide CD1c+ DCs (mDCs) handelt, wohingegen die CD1d- als plasmazytoide CD303+ DCs (pDCs) identifiziert wurden (Anhangsabbildung 7).

CD34+ Stammzellen und B-Zellen zeigten ebenfalls eine Expression von CD1d, diese war allerdings deutlich geringer als die von Monozyten und DCs. T-Zellen und NK-Zellen zeigten hingegen keine Expression von CD1d (Abbildung 20 C, D).

Betrachtet man diese Daten zusammen mit den Daten der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion, wird deutlich, dass iNKT-Zellen vornehmlich Apoptose in stark CD1d+-Zellen induzieren, was in diesem Fall DCs und Monozyten waren. CD1d-Zellen hingegen, hier konkret T-Zellen und NK-Zellen, wurden hingegen nicht von iNKT-Zellen in Apoptose geführt. Schwach CD1d+ Zellen wie B-Zellen und CD34+ Stammzellen wurden ebenfalls nicht lysiert. Ob dies der Tatsache geschuldet war, dass die CD1d-Expression in diesen Zellpopulationen schlichtweg zu gering war oder ob andere Faktoren, wie beispielsweise die Expression kostimulatorischer Moleküle oder die Produktion bestimmter Zytokine, für eine iNKT-Zell-vermittelte Induktion der Apoptose essenziell sind, wurde nicht weiter untersucht.

Mit der Fähigkeit, die Apoptoseinduktion ausschließlich in APCs wie DCs und Monozyten zu induzieren, besitzen expandierte iNKT-Zellen das Potenzial, die Initiierung und Aufrechterhaltung einer GvHD zu verhindern, ohne andere essenzielle Immunzellpopulationen in ihrer Anzahl zu reduzieren, die wichtig für die Immunrekonstitution (CD34+ Stammzellen), die Pathogenabwehr und Tumorkontrolle (T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen) sind.

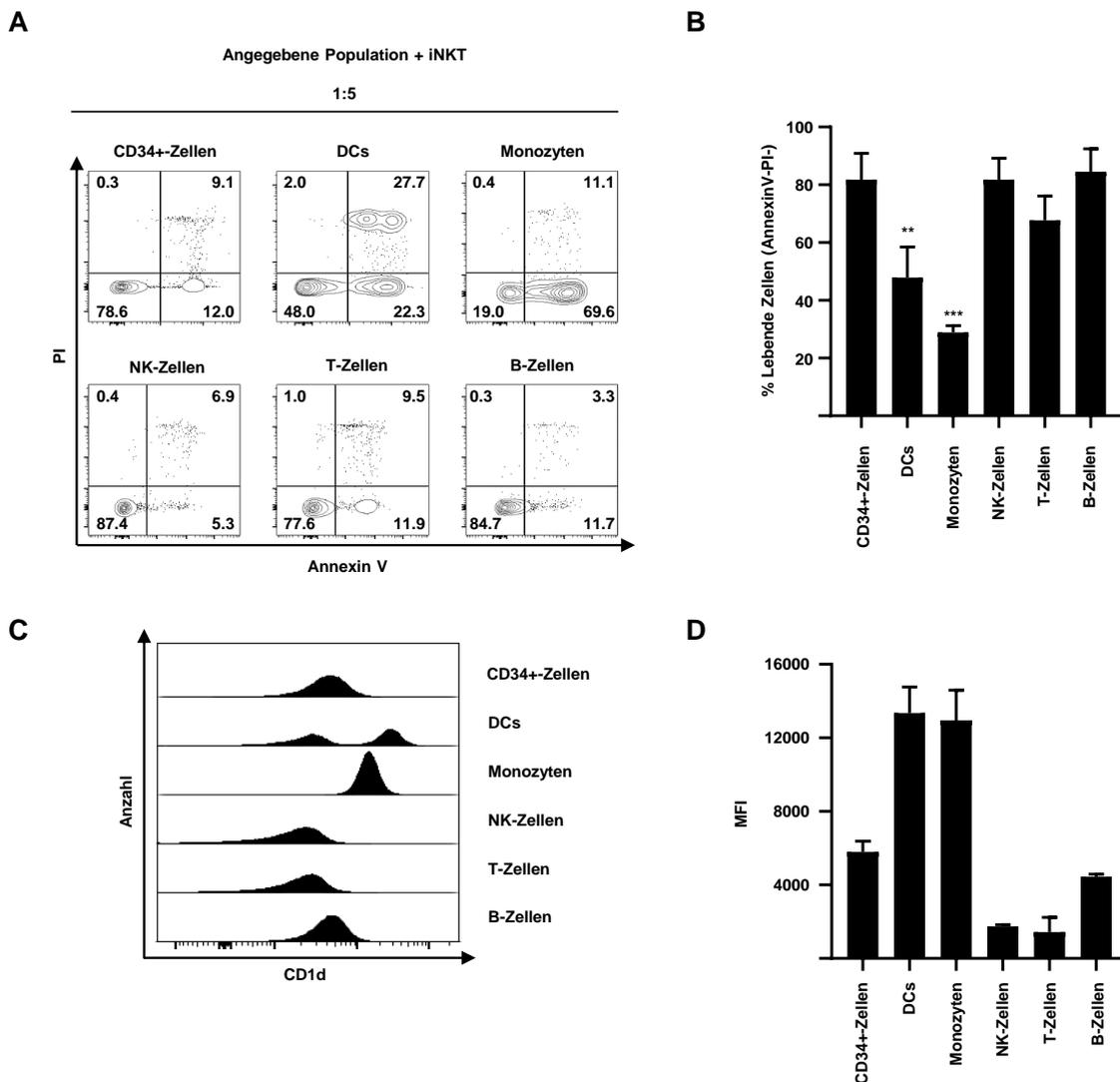


Abbildung 20: Selektive Apoptoseinduktion in typischerweise in Transplantaten enthaltenen Zellen durch expandierte iNKT-Zellen

(A) zeigt repräsentative *dot plots*, welche die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion in typischerweise in Transplantaten enthaltenen Zellen darstellen. Die Apoptoseinduktion wurde mittels Annexin V/PI-Assay analysiert. Hierzu wurden allogene iNKT-Zellen jeweils mit CD34+ Stammzellen, DCs aus peripherem Blut, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen und B-Zellen im Verhältnis 1:5 inkubiert. Die dargestellten Events beziehen sich auf die über den *dot plots* angegebenen Zellpopulationen. (B) zeigt zusammengefasste Daten der in (A) gezeigten Experimente mit iNKT-Zellen von 3 unterschiedlichen Spendern in einem Diagramm. In (C) sind Histogramme, die die CD1d-Expression der typischerweise in Transplantaten enthaltenen Zellen zeigt, dargestellt. Die zugehörige MFI ist in (D) dargestellt.

Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ bezogen auf die entsprechende Zellpopulation ohne gemeinsame Kultur mit iNKT-Zellen.

3.17 Analyse der direkten Tumorzellyse durch expandierte iNKT-Zellen

Wie bereits in dieser Arbeit gezeigt, sind expandierte humane iNKT-Zellen dazu in der Lage, die Alloreaktivität von T-Zellen zu kontrollieren. Neben der Toleranzinduktion und der Regulierung diverser Immunantworten sind iNKT-Zellen auch dafür bekannt, das Tumorstadium zu kontrollieren zu können. Dies können sie indirekt durch die Transaktivierung von NK-Zellen oder direkt durch die selbstvermittelte Lyse CD1d⁺ Tumorzellen. Diese Mechanismen sind in der Literatur bereits sehr gut beschrieben (Dao *et al.*, 1998; Wingender *et al.*, 2010; Kuylenskierna *et al.*, 2012).

Um zu sehen, ob auch expandierte iNKT-Zellen das Potenzial haben, das Tumorstadium *in vitro* zu kontrollieren, wurden sie in ansteigenden Mengen mit Tumorzelllinien und primären Leukämiezellen für 16 h inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der von iNKT-Zellen vermittelten spezifischen Lyse der Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie.

Expandierte iNKT-Zellen waren dazu in der Lage, die CD1d⁺ Tumorzelllinien MOLT-4 und Jurkat dosisabhängig zu lysieren (Abbildung 21 A, B). Sie lysierten durchschnittlich 3,1 % der MOLT-4 Tumorzellen bei der geringsten iNKT- zu Tumorzellrate von 0,25:1 und 28,7 % bei der höchsten iNKT- zu Tumorzellrate von 10:1.

Durchschnittlich 4,2 % der Jurkat-Zellen wurden von expandierten iNKT-Zellen bei der geringsten iNKT- zu Tumorzellrate von 0,25:1 lysiert und 60,7 % bei einer iNKT- zu Tumorzellrate von 10:1.

Keine Rolle spielte es dabei, ob expandierte iNKT-Zellen mit α -GalCer, PBS-44 oder PBS-57 expandiert wurden (Anhangsabbildung 8).

CD1d⁻ Tumorzelllinien konnten von iNKT-Zellen wie in der Literatur beschrieben nicht lysiert werden (Anhangsabbildung 9).

Um zu analysieren, ob expandierte iNKT-Zellen auch primäre Tumorzellen lysieren können, wurden diese in aufsteigenden Mengen mit primären Tumorzellen von Patienten ebenfalls für 16 h inkubiert.

Sowohl primäre Blasten einer M1-Leukämie als auch Blasten einer M5-Leukämie wurden dosisabhängig von iNKT-Zellen lysiert.

Durchschnittlich 7,7 % der M1-Leukämiezellen wurden bei einer iNKT- zu Tumorzellrate von 5:1 lysiert. Bei einer iNKT- zu Tumorzell-Rate von 80:1 lysierten expandierte iNKT-Zellen 58,3 % der M1-Leukämiezellen.

M5-Leukämiezellen wurden noch effektiver von expandierten iNKT-Zellen lysiert. 22,7 % starben bei einer iNKT- zu Tumorzellrate von 5:1, 65,1 % bei einer iNKT- zu Tumorzellrate von 80:1.

Somit konnte gezeigt werden, dass expandierte iNKT-Zellen dazu in der Lage sind, sowohl Tumorzelllinien als auch primäre Tumorzellen durch direkte Lyse zu eliminieren.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass expandierte iNKT-Zellen *in vitro* sowohl dazu in der Lage sind die Alloreaktivität von T-Zellen zu unterdrücken als auch das Tumorstadium über die direkte Lyse von Tumorzellen zu kontrollieren.

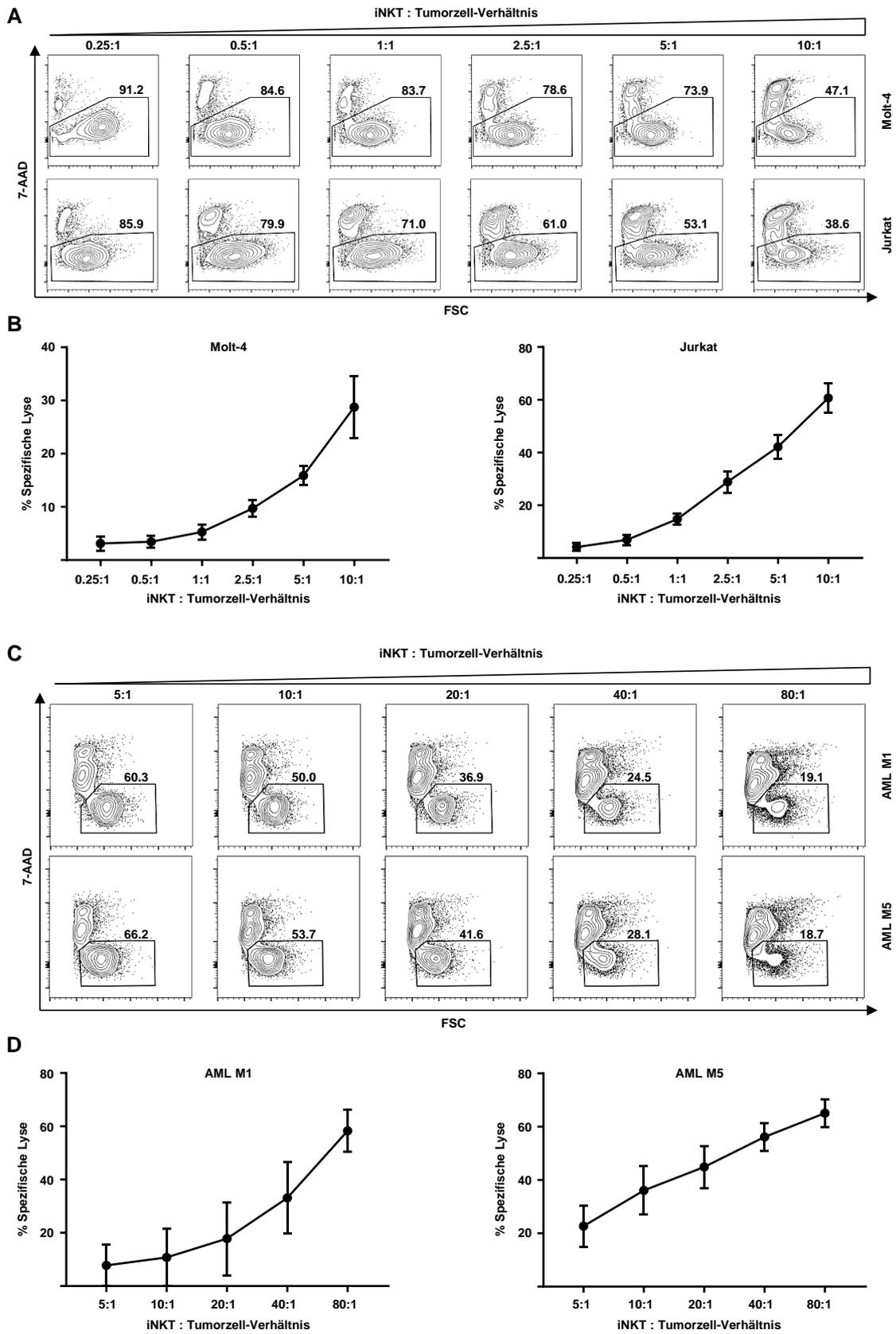


Abbildung 21: Dosisabhängige Lyse von Tumorzelllinien und primären Leukämiezellen durch expandierte iNKT-Zellen

(A) zeigt repräsentative *dot plots* der spezifischen Lyse von MOLT-4 und Jurkat-Leukämiezellen nach Kultur mit expandierten iNKT-Zellen für 18 h. Ohne die Kultur mit iNKT-Zellen hatten MOLT-4 Zellen eine Viabilität von 92 %, Jurkat-Zellen hatten eine Viabilität von 87 %. Die in **(B)** gezeigten Diagramme umfassen Daten von 4 unabhängigen Experimenten. Hierfür wurden jeweils iNKT-Zellen von unterschiedlichen Spendern expandiert. In **(C)** sind *dot plots* von der spezifischen Lyse von primären AML M1- und AML M5- Leukämiezellen, nach Inkubation mit iNKT-Zellen für 16h, gezeigt. Die gezeigten AML M1-Leukämiezellen hatten eine Viabilität von 88 %, während die gezeigten AML M5 Leukämiezellen eine Viabilität von 89 % hatten. Die in **(D)** gezeigten Diagramme bestehen aus Daten von jeweils 4 unterschiedlichen iNKT-Zellspendern sowie primären Leukämiezellen von jeweils 4 unterschiedlichen AML M1- und AML M5-Patienten. Die gezeigten Events beziehen sich immer auf Tumorzellen, welche durch die Exklusion von iNKT-Zellen identifiziert wurden. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

modifiziert aus Schmid *et al.*, 2018 Front Immunol

4. Diskussion

Eine allogene SZT ist für Patienten mit einer fortgeschrittenen oder Hochrisiko-Leukämie die Behandlung der Wahl. Eine optimierte Spenderauswahl, überarbeitete und an die Patienten angepasste Konditionierungsregime und verbesserte Möglichkeiten in der Nachbehandlung haben dazu beigetragen, die Lebensqualität und das Überleben nach einer SZT signifikant zu erhöhen. Trotz der erzielten Verbesserungen sind Morbidität und Mortalität nach einer allogenen SZT aufgrund der beiden Hauptkomplikationen, GvHD und Leukämie rezidiv, immer noch beträchtlich. Daher wird intensiv nach Möglichkeiten gesucht, die allogene SZT zu optimieren. Das Hauptproblem dabei ist, dass sowohl die Tumorkontrolle als auch die Entstehung einer GvHD von Spender-T-Zellen ausgehen. Eine Stimulation des Immunsystems, beispielsweise durch die Infusion von Donorlymphozyten oder Checkpoint-Inhibitoren, führt zwar zu einem verstärkten antitumoralen Effekt, allerdings geht sie zwangsläufig mit einem erhöhten Risiko einer GvHD-Entstehung einher (Wolschke *et al.*, 2013; Haverkos *et al.*, 2017; Ghosh *et al.*, 2017). Der umgekehrte Effekt tritt bei Immunsuppression ein. Die Unterdrückung des Immunsystems reduziert das Risiko einer GvHD-Entstehung, schwächt jedoch gleichzeitig den GvL-Effekt signifikant ab (Zhang *et al.*, 2018). Eine Therapie, die Toleranz induziert, ohne jedoch den antileukämischen Effekt zu verringern, wäre deshalb ein Meilenstein in der Optimierung der SZT.

INKT-Zellen können sowohl Toleranz als auch Anti-Tumor-Effekte vermitteln, was sie ins Zentrum neuer Ansätze zur Immuntherapie von Tumoren und zur GvHD-Prävention rückt (Nair and Dhodapkar, 2017; Van Kaer and Wu, 2018). Mausstudien konnten bereits zeigen, dass der adoptive Transfer von iNKT-Zellen ohne den Verlust des GvL-Effekts verlässlich vor einer letalen GvHD schützt (Schneidawind *et al.*, 2014; Schneidawind *et al.*, 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte einerseits in Zellkulturexperimenten überprüft werden, ob auch humane, expandierte iNKT-Zellen in der Lage sind, die Entstehung einer GvHD zuverlässig zu verhindern und andererseits der immunbiologische Mechanismus, der dieser Toleranzinduktion zugrunde liegt, aufgeklärt werden. Ein weiteres Ziel war es, zu überprüfen, ob expandierte iNKT-Zellen das Tumorwachstum durch die direkte Lyse von Tumorzellen kontrollieren können. Die gewonnenen

Ergebnisse sollen den Grundstein für eine mögliche iNKT-Zell-basierte Prävention der GvHD legen.

4.1 iNKT-Zell-vermittelte Toleranzinduktion

Dass iNKT-Zellen immunregulatorisch wirken können, ist bereits vielfach beschrieben. In vielen Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Lupus erythematosus, Colitis ulcerosa und rheumatoider Arthritis kommt ihnen daher eine protektive Rolle zu (Novak and Lehen, 2011). Auch im Rahmen der drohenden Alloreaktivität nach SZT können iNKT-Zellen eine wichtige immunregulatorische Funktion einnehmen. Mehrere klinische Studien zeigten, dass eine erhöhte Menge an iNKT-Zellen im Blut von stammzelltransplantierten Patienten, entweder durch eine hohe Ausgangszahl im Transplantat oder durch eine schnelle Rekonstitution, mit dem Ausbleiben einer GvHD positiv korreliert (Chaidos *et al.*, 2012; Malard *et al.*, 2016; Haraguchi *et al.*, 2004; de Lalla *et al.*, 2011).

4.1.1 iNKT-Zell-vermittelte Toleranzinduktion durch die Eliminierung allogener DCs

Der Ausgangspunkt einer GvHD ist die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten MLRs zeigten, dass humane, expandierte iNKT-Zellen die Aktivierung und Proliferation alloreaktiver T-Zellen verhindern, indem sie allogene Mo-DCs in Apoptose führen und damit den alloreaktivitätsauslösenden Stimulus eliminieren (siehe 3.8). Diesen Mechanismus der iNKT-Zell-vermittelten GvHD-Prävention stützen auch die Daten von Coman *et al.*: In einem Xenograft-Mausmodell konnte der adoptive Transfer von expandierten iNKT-Zellen die Entstehung einer GvHD über die Reduktion von Empfänger-DCs verhindern (Coman *et al.*, 2018).

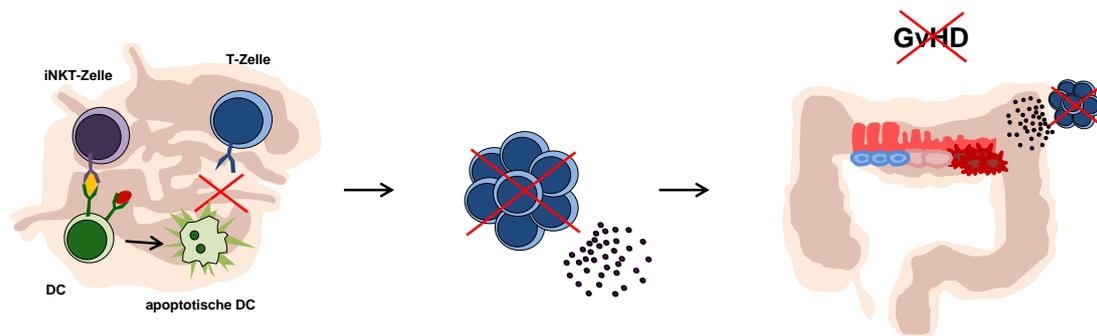


Abbildung 22: Schematische Darstellung der iNKT-Zell-vermittelten GvHD-Prävention

iNKT-Zellen wandern mit möglichen alloreaktiven Spender-T-Zellen in den Lymphknoten des Empfängers. Dort induzieren sie die Apoptose in allogenen DCs und eliminieren diese, wodurch mögliche alloreaktive Spender-T-Zellen keine Zielzellen mehr vorfinden, durch welche sie aktiviert werden können. Konsequenterweise wird dadurch auch die Proliferation alloreaktiver Spender-T-Zellen und die Entstehung einer GvHD verhindert.

Die Depletion von DCs vor einer allogenen SZT wurde schon in der Vergangenheit als möglicher Ansatz zur Prävention einer GvHD diskutiert, da DCs als professionelle APCs hauptverantwortlich für die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen sind (Duffner *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002; Koyama and Hill, 2016). Eine unspezifische Depletion aller DCs jedoch ist kritisch zu betrachten, da DCs je nach Subpopulation und Milieu den Verlauf einer GvHD unterschiedlich beeinflussen (Yu *et al.*, 2019). Während mDCs bekanntermaßen starke Induktoren einer GvHD darstellen, sind pDCs als Subpopulation mit protektiven Eigenschaften beschrieben (Hadeiba *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufgrund der besseren Verfügbarkeit weitestgehend Mo-DCs als Modell-DCs verwendet. Allerdings konnten iNKT-Zellen ebenso humane DCs aus dem peripheren Blut in Apoptose führen (siehe 3.16). Die Analyse der CD1d-Expression auf den DC-Subpopulationen ergab, dass mDCs wie in der Literatur beschrieben eine starke Expression von CD1d aufweisen, pDCs hingegen nicht (Anhangsabbildung 7) (van der Vliet *et al.*, 2008). Da die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion sich in den Experimenten dieser Arbeit CD1d-abhängig zeigte, müssten iNKT-Zellen ausschließlich mDCs, nicht aber pDCs über die Apoptoseinduktion eliminieren. Dies könnte in weiterführenden Kokulturen mit isolierten mDCs bzw. pDCs und expandierten iNKT-Zellen überprüft werden. Wenn iNKT-Zellen spezifisch GvHD-induzierende mDCs eliminieren würden, GvHD-protektive pDCs hingegen erhalten blieben, würde der adoptive Transfer von iNKT-

Zellen einen deutlichen Fortschritt gegenüber der kompletten Depletion von DCs darstellen.

In den Experimenten zum Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion wurden signifikant mehr allogene als autologe DCs in Apoptose geführt (siehe 3.15). Da der CD1d-Komplex ebenso wie der semi-invariante TCR auf iNKT-Zellen in allen Menschen identisch ist, kann die Interaktion der CD1d-TCR-Achse nicht ursächlich für die unterschiedlich starke Apoptoseinduktion sein (Brossay and Kronenberg, 1999). Eine mögliche Erklärung könnte allerdings eine voneinander abweichende Glykolipid-Präsentation von autologen und allogenen DCs darstellen. iNKT-Zellen könnten von allogenen, „fremden“ DCs aufgrund von Unterschieden im Glykolipid-Repertoire stärker stimuliert werden als von autologen „eigenen“ DCs. Die Erstellung eines Glykolipid-Profiles, wie von Patterson *et al.* für Tumorzellen beschrieben, könnte übertragen auf APCs interindividuelle Unterschiede in der Glykolipid-Präsentation aufklären (Patterson *et al.*, 2008).

Unter zusätzlicher Stimulation mit α -GalCer induzierte expandierte iNKT-Zellen in autologen DCs ebenso effektiv Apoptose wie in allogenen DCs. Eine robuste Apoptoseinduktion unabhängig von der Herkunft der APCs zu erreichen ist für die Prävention einer GvHD von hoher Relevanz. Zwar ist im Patienten primär die Eliminierung von Empfänger-DCs entscheidend, da diese die Entstehung der GvHD initiieren, doch auch die Depletion von Spender-DCs scheint bedeutend, da diese ebenso zur Pathogenese und Manifestation der GvHD beitragen (Yu *et al.*, 2019).

Zusätzlich könnte die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion in DCs einen weiteren, längerfristigen Effekt haben. Wenn T-Zellen ein Alloantigen oder ein inkompatibles MHC-Molekül ohne die zur Aktivierung notwendige simultane Kostimulation als fremd erkennen, werden sie inert (Schwartz, 2003). In Folge der iNKT-Zell-vermittelten Apoptose konnte in Mo-DCs eine Herunterregulation der erforderlichen kostimulatorischen Moleküle beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Interaktion solcher apoptotischen DCs mit alloreaktiven T-Zellen könnte somit der Mangel an Kostimulation zur langfristigen Inaktivierbarkeit der T-Zellen führen. Diesen Mechanismus machen sich auch viele Pathogene zu Nutzen (Khan *et al.*, 2012).

4.1.2 iNKT-Zell-vermittelte Expansion von Tregs

Anders als in den meisten GvHD-Mausmodellen konnte in den Experimenten dieser Arbeit die iNKT-Zell-vermittelte Toleranzinduktion nicht direkt mit der Expansion von Tregs in Verbindung gebracht werden (siehe 3.6). Allerdings könnte die Kontrolle von Alloimmunität durch iNKT-Zellen in einem zweistufigen Mechanismus erfolgen: Zuerst, wie in dieser Arbeit beschrieben, durch die direkte Eliminierung von allogenen DCs, in einem zweiten Schritt aber auch durch eine indirekte Expansion von Tregs.

Für eine indirekte iNKT-Zell-vermittelte Expansion von Tregs sind zwei Mechanismen denkbar. Wenn, wie bereits diskutiert, iNKT-Zellen CD1d-abhängig mDCs, nicht aber pDCs eliminieren, könnte sich im Körper des Empfängers das Gleichgewicht dieser Subpopulationen in Richtung der pDCs verschieben. Diese können nachweislich die Expansion von Tregs vermitteln und damit an der Prävention einer GvHD mitwirken (Banovic *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2012; Florek *et al.*, 2014). Einen weiteren Mechanismus könnte die Aufnahme apoptotischer DCs durch unreife DCs darstellen (engl.: *immature DCs*; iDCs), die daraufhin tolerogen werden und die Expansion von Tregs induzieren können (Wu *et al.*, 2013; Kushwah *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Begebenheit kommt die Injektion apoptotischer DCs zur GvHD Prävention bereits in klinischen Studien zur Anwendung (Morelli and Larregina, 2016). Über diese zwei Mechanismen könnten iNKT-Zellen die Expansion von Tregs indirekt veranlassen und somit zur langfristigen Prävention von Alloimmunität beitragen. Eine iNKT-Zell-vermittelte Vermehrung von Tregs über diese Mechanismen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht demonstriert werden, da in den MLRs ausschließlich Mo-DCs verwendet wurden und *in vitro* zudem weitere Voraussetzungen wie zusätzliche Zellpopulationen (iDCs) und andere Faktoren wie das Zytokinmilieu, die Zell-Kompartimentierung und eine längere Kulturdauer nicht gezeigt werden können.

4.1.3 Weitere iNKT-Zell-vermittelte Mechanismen zur Prävention einer GvHD

Expandierte iNKT-Zellen induzierten Apoptose nicht nur in DCs, sondern auch in allogenen Monozyten (siehe 3.16). Diese tragen zwar nicht zur Induktion einer GvHD bei, allerdings können sie über die Freisetzung von IL-6 und TNF- α sowie die Induktion von proinflammatorischen Th-17-Zellen die Manifestation einer GvHD unterstützen (Reinhardt-Heller *et al.*, 2017). Expandierte iNKT-Zellen könnten daher auch über die Apoptoseinduktion in allogenen Monozyten den Verlauf der GvHD beeinflussen.

Neben APCs sind auch andere Zellpopulationen, wie z. B. Epithelzellen, in der Lage, die Induktion alloreaktiver T-Zellen zu vermitteln (Kündig *et al.*, 1995; Hershberg *et al.*, 1998). In einem *in vitro* Modell könnte überprüft werden, ob iNKT-Zellen die Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen durch Epithelzellen ebenfalls dadurch unterdrücken, dass sie die Alloantigen-präsentierenden Epithelzellen eliminieren.

4.2 iNKT-Zell vermittelte Apoptoseinduktion

Wie in dieser Arbeit gezeigt unterdrückten expandierte iNKT-Zellen die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen durch die Induktion von Apoptose in allogenen DCs (siehe 3.8). Mittels Transwell-Assays konnte demonstriert werden, dass die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion zellkontaktabhängig verläuft (siehe 3.12). Die Interaktion von iNKT-Zellen und Mo-DCs wurde dabei entscheidend über die TCR-CD1d-Achse vermittelt (siehe 3.13). Nach erfolgter Interaktion degranulierten iNKT-Zellen und setzten große Mengen an Perforin und Granzym B frei (siehe 3.14). Diese waren nachweislich an der Apoptoseinduktion in allogenen DCs beteiligt (siehe 3.13).

Die folgende Skizze stellt den auf den Ergebnissen dieser Arbeit basierenden Mechanismus der Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs durch expandierte iNKT-Zellen dar (Abbildung 23).

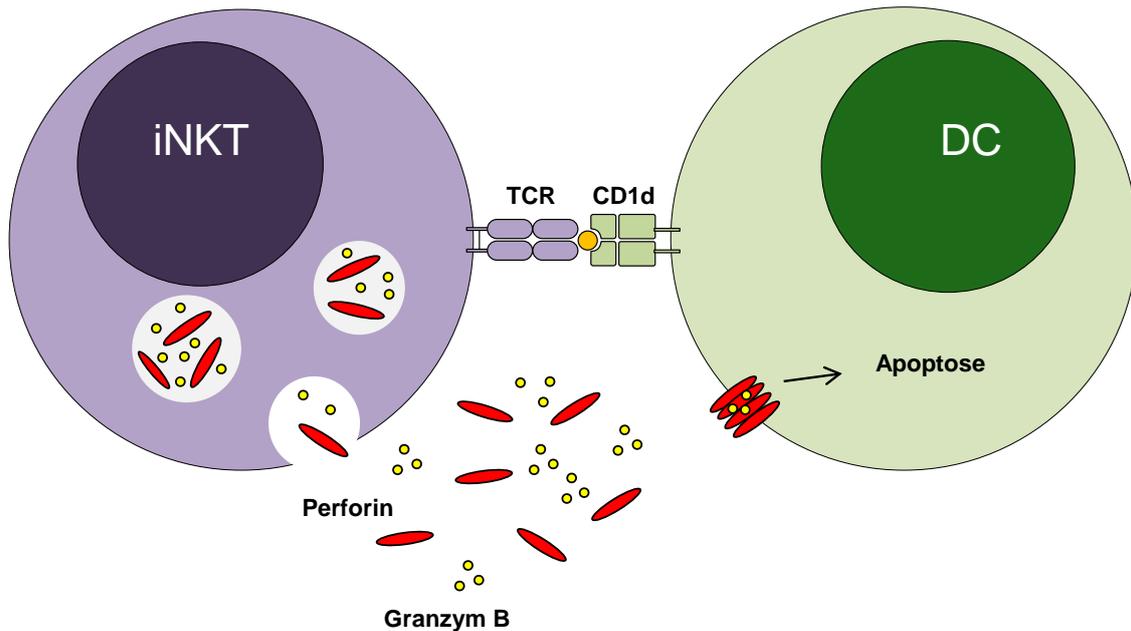


Abbildung 23: iNKT-Zellen vermitteln die Apoptoseinduktion von DCs über die CD1d-abhängige Freisetzung von Perforin und Granzym B

iNKT-Zellen binden an DCs über eine TCR-CD1d-Interaktion. iNKT-Zellen degranulieren daraufhin und sezernieren Perforin und Granzym B, welche im Folgenden die Apoptose in allogenen Mo-DCs verursachen.

4.2.1 Direkte Interaktion von expandierten iNKT-Zellen und Mo-DCs

Die Interaktion von DCs und iNKT-Zellen findet maßgeblich über CD1d und den semi-invarianten TCR statt (Keller *et al.*, 2017). Die durchgeführten Versuche mit blockierendem CD1d-Antikörper zeigten die entscheidende Bedeutung dieser Achse für die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion (siehe 3.13). Allerdings konnte der CD1d-Antikörper keine vollständige Blockade der Apoptoseinduktion vermitteln. Da diese aber, wie in den durchgeführten Transwell-Assays gezeigt, komplett zellkontaktabhängig verläuft, muss die Interaktion von Mo-DCs und iNKT-Zellen zusätzlich über weitere Moleküle stattfinden. Auch in Experimenten mit anderen typischerweise im Transplantat enthaltenen Zellen (3.16) war die Expression von CD1d zwar essentiell für das Ausmaß der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion, nicht aber der alleinige prädiktive Faktor.

In der Literatur sind neben der CD1d-TCR-Achse vor allem kostimulatorische Moleküle aus der CD28/B7- und der TNF-Rezeptor-Familie, wie z.B. MHC-II, B7-H4, PDL-1/L2, CD80/CD86, CD40, ICOSL, 4-1BBL, OX40L, GITRL und LLT-1 für die

zellkontaktabhängige Interaktion von DCs und iNKT-Zellen beschrieben (Shissler *et al.*, 2017). Bisher wird allerdings davon ausgegangen, dass eine Interaktion dieser Moleküle immer in Kombination mit einer TCR-CD1d-Interaktion erfolgt (Brennan *et al.*, 2013).

Da an Mo-DCs gebundene iNKT-Zellen nicht nur mittels Immunfluoreszenz visualisiert, sondern auch mittels FACS sortiert werden können ohne dabei den Zell-Zell-Kontakt zu lösen, könnten die interagierenden Moleküle durch massenspektrometrische Analysen identifiziert werden.

Zwei verschiedene Ansätze zur Analyse der molekularen Interaktion sollen im Folgenden diskutiert werden. Einerseits können in der Interaktion befindliche Zellen und Moleküle durch „*crosslinking*“ miteinander verbunden werden, um anschließend die aneinander gebundenen Oberflächenproteine mittels Massenspektrometrie zu analysieren (Dybkov *et al.*, 2018).

Der zweite Ansatz basiert auf der quantitativen massenspektrometrischen Bestimmung der Oberflächenmoleküle von iNKT-Zellen und DCs. Freiliegende Oberflächenproteine werden dazu mit Biotin markiert, zuerst separat auf beiden Zelltypen alleine, danach während iNKT-Zellen und DCs zur Interaktion aneinandergelassen sind (Hörmann *et al.*, 2016). Oberflächenmoleküle, die auf Mo-DCs bzw. iNKT-Zellen einzeln stärker detektierbar waren als auf miteinander interagierenden Zellen, stellen potentiell Rezeptor-Liganden-Kombinationen für die Interaktion dar, weil sie aufgrund ihrer spezifischen Bindung aneinander nicht markiert werden konnten.

4.2.2 Von iNKT-Zellen freigesetzte Faktoren zur Apoptoseinduktion

In Versuchen mit blockierenden Antikörpern konnte gezeigt werden, dass iNKT-Zellen die Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs nicht über die Todesliganden FASL und TRAIL oder NKG2D-abhängig vermitteln. Stattdessen war die Degranulation von iNKT-Zellen zur Freisetzung zytolytischer Faktoren essentiell für eine effektive Apoptoseinduktion (siehe 3.13).

In der Analyse von Überständen aus Kokulturen von iNKT-Zellen und allogenen Mo-DCs konnten große Mengen an Perforin, Granzym B, Granulysin und TNF- α detektiert werden (siehe 3.14). Eine essentielle Rolle des Perforin/Granzym B-Signalwegs für die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs konnte in Versuchen

mit CMA gezeigt werden (siehe 3.13). Durch die Hemmung der vakuolären H⁺-ATPase bewirkt CMA einen Anstieg des pH-Werts in lytischen Granula und damit die Degradation des darin enthaltenen Perforins (Kataoka *et al.*, 1996). Ohne das porenformende Perforin kann Granzym B nicht in die Zielzelle eindringen, um dort Apoptose zu induzieren (Pipkin and Lieberman, 2007). Im Umkehrschluss sollte auch die direkte Inhibition von Granzym B mit dem *small molecule* Z-AAD-CMK die Induktion von Apoptose in den Mo-DCs effektiv verhindern können (Shi, 1992). Die Bestätigung dieser Hypothese könnte die Bedeutung des Perforin/Granzym B-Signalwegs für die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion weiter untermauern. Da die iNKT-Zell-vermittelte Apoptoseinduktion, wie mit Z-VAD gezeigt, sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängig verläuft, unterstützt die Bedeutung des Granzym B/Granulysin-Signalwegs weiter, da dieser die Induktion der Apoptose sowohl über die Aktivierung von Caspasen als auch über andere Wege bewerkstelligt, wie z. B. die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien oder die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Choy, 2010; Afonina *et al.*, 2010).

Zusätzlich zu Perforin und Granzym B scheinen aber auch andere Moleküle an der Apoptoseinduktion in allogenen DCs beteiligt zu sein. Mit Granulysin und TNF- α wurden zwei weitere Faktoren im Kulturüberstand detektiert, die hier potenziell eine Rolle spielen könnten (siehe 3.13) (Rath and Aggarwal, 1999; Kaspar *et al.*, 2001). Ihr Beitrag zur Apoptoseinduktion könnte in Versuchen mit blockierenden Antikörpern vertiefend untersucht werden (Tewary *et al.*, 2010; Hanauer *et al.*, 2002). Zusätzlich könnte die Suche nach weiteren von iNKT-Zellen freigesetzten Schlüsselmolekülen zur Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs die nicht im CD8/NK LEGENDplex™ Assay enthalten waren, durch eine massenspektrometrische Analyse erfolgen.

Zur Verifizierung der Bedeutung der in dieser Arbeit identifizierten und diskutierten Faktoren könnten diese mittels CRISPR/Cas9 ausgeschaltet werden. Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten allerdings, dass so editierte iNKT-Zellen nur kurz in Kultur überleben und deshalb nicht in funktionellen Experimenten verwendet werden können.

Um die Kurzlebigkeit von iNKT-Zellen nach einem Knockout der gewünschten Schlüsselmoleküle mittels CRISPR/ CAS9 zu umgehen, könnten anstelle von primären humanen iNKT-Zellen induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) genetisch editiert werden. Zur Generierung humaner iPS-iNKT-Zellen werden zunächst primäre iNKT-Zellen mit Hilfe der Yamanaka Faktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc zu iPS-Zellen

redifferenziert (Yamada *et al.*, 2016). Da iPS-Zellen fast unbegrenzt kultiviert werden können, bleibt in diesem Stadium genug Zeit, um die gewünschten Gene mittels CRISPR/CAS9 „auszuknocken“. Nach erfolgter genetischer Editierung findet die Induktion der iPS-Zellen zu iPS-iNKT-Zellen auf CD1d-exprimierenden OP-9 Feederzellen in mit IL-7, SCF und FLT-3L supplementiertem OP-9 Medium statt (Vizcardo *et al.*, 2013).

Alternativ könnten die in dieser Arbeit beschriebenen Schlüsselfaktoren mit *small interfering* RNA (siRNA) „stillgelegt“ werden. Zwar kann mit diesem Verfahren kein kompletter Knockout wie mit dem CRISPR/CAS9-System, sondern nur eine Reduktion der gewünschten Moleküle erreicht werden. Dafür können aufgrund der schnellen Durchführbarkeit dieser Methode primäre iNKT-Zellen verwendet werden.

Kojo *et al.* zeigten, dass eine Anwendung von siRNA in iNKT-Zellen grundsätzlich möglich ist (Kojo *et al.*, 2009). Der „Knockdown“ von Perforin, Granzym B und Granulysin mittels siRNA wurde bereits bereits erfolgreich in anderen Arbeiten durchgeführt (Ma *et al.*, 2004; Ashley and Baecher-Allan, 2009).

Um die hier diskutierten Mechanismen zur iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion (siehe 4.2) und der darüber erzielten Toleranzinduktion (siehe 4.1) umfassend im Mausmodell zu überprüfen, könnten „*major mismatch*“ Transplantationsversuche wie von Schneidawind *et al.*, 2014 beschrieben durchgeführt werden. Dabei könnten iNKT-Zellen von gesunden Mäusen im Vergleich zu iNKT-Zellen von Perforin/Granzym B Knockout-Mäusen adoptiv transferiert werden. Zur Bestätigung, dass iNKT-Zellen ohne Perforin/Granzym B die Apoptoseinduktion in allogenen DCs signifikant schlechter vermitteln, könnte die Anzahl viabler DCs in den Lymphknoten und in weiteren GvHD-Zielorganen mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die Spezifizierung der DCs in mDCs und pDCs könnte zudem die Theorie bestätigen, dass primäre mDCs und nicht pDCs durch iNKT-Zellen eliminiert werden. Die Verwendung von FoxP3DTR/GFP/luc-Mäusen, bei denen das Luciferase-Gen unter der Kontrolle des FoxP3-Promotors steht, würde zusätzlich die Bestimmung einer durch iNKT-Zellen-vermittelten Expansion an Tregs ermöglichen. Die Ermittlung des GvHD-Scores und das Gesamtüberleben der Mäuse könnten als Kriterien zur Beurteilung der GvHD-Entstehung dienen.

4.3 iNKT-Zell-vermittelte Tumorkontrolle

iNKT-Zellen sind von besonderem Interesse in der GvHD-Prävention, da sie neben ihren toleranzinduzierenden Eigenschaften auch antitumorales Potenzial besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass iNKT-Zellen sowohl CD1d+ Tumorzelllinien als auch primäre Blasten dosisabhängig lysieren können (siehe 3.17). Bekanntermaßen können iNKT-Zellen das Tumorstadium auch indirekt über die Transaktivierung von NK-Zellen kontrollieren (Carnaud *et al.*, 1999). Zwar setzen expandierte iNKT-Zellen das zur Transaktivierung von NK-Zellen notwendige IFN- γ in großen Mengen frei (siehe 3.2), weitergehend wurde die indirekte Wirkweise von iNKT-Zellen zur Tumorkontrolle jedoch nicht untersucht und könnte daher Gegenstand nachfolgender Experimente sein.

Der Hauptanteil der Tumorkontrolle nach allogener SZT geht aber von T-Zellen aus. Da aktuell die GvHD-Prävention über die vollständige Depletion oder die allgemeine Unterdrückung der T-Zellaktivität erzielt wird, kommt es dabei zwangsläufig zur Reduktion des eigentlich erwünschten GvL-Effekts. iNKT-Zellen inhibieren hingegen ausschließlich die Aktivierung möglicher alloreaktiver T-Zellen ohne dabei das anti-leukämische Potenzial der übrigen T-Zellen zu verringern (siehe 3.7).

4.4 iNKT-Zellen in der klinischen Anwendung

4.4.1 Mögliche Ansätze zur Verwendung von iNKT-Zellen in der klinischen Anwendung

Da diese Arbeit im Einklang mit bereits durchgeführten Mausversuchen eine klinische Anwendung von iNKT-Zellen zur GvHD-Prävention erfolgsversprechend erscheinen lässt, soll im Folgenden diskutiert werden, wie diese praktisch umgesetzt werden kann (Pillai *et al.*, 2009; Schneidawind *et al.*, 2014; Schneidawind *et al.*, 2015).

Eine Möglichkeit, die Anzahl an iNKT-Zellen in Patienten nach SZT zu erhöhen, stellt die Injektion von iNKT-Zell-spezifischen Stimulanzen wie z. B. α -GalCer dar. In bisherigen klinischen Studien zeigte dieser Ansatz allerdings keinen durchschlagenden Erfolg (Chen *et al.*, 2017). Zum einen kann ein Therapieerfolg grundsätzlich nur bei einer ausreichenden Anzahl an iNKT-Zellen im Stammzelltransplantat erzielt werden. Zum anderen ist in klinischen Studien zur

Tumorkontrolle beschrieben, dass iNKT-Zellen durch eine Injektion von α -GalCer zwar aktiviert werden, aufgrund der fehlenden Kostimulation *in vivo* jedoch schnell inert werden und somit nicht weiter expandieren (Giaccone *et al.*, 2002).

Derartige Limitationen können durch eine *ex vivo* Expansion von iNKT-Zellen mit anschließendem adoptiven Transfer überwunden werden. Dieser Ansatz, *in vitro* expandierte iNKT-Zellen zeitgleich mit dem Stammzelltransplantat in den Patienten zu übertragen, um die Entstehung einer GvHD zu verhindern, kam bisher noch nicht zur klinischen Anwendung. Dass die *ex vivo* Expansion und Isolation von humanen iNKT-Zellen prinzipiell möglich ist, konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden (siehe 3.1). Bei diesem Vorgehen sind iNKT-Zellen zudem direkt nach der SZT in großen Mengen im Körper des Empfängers verfügbar, was entscheidend dafür ist, die zu diesem frühen Zeitpunkt stattfindende Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen zu verhindern.

Für den adoptiven Transfer kommen sowohl iNKT-Zellen des Stammzellempfängers, des Stammzellspenders als auch iNKT-Zellen einer dritten Partei in Frage. Für eine erfolgreiche Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung scheint die Herkunft der iNKT-Zellen nicht von Relevanz zu sein (siehe 3.3, Anhangsabbildung 3). Auch die HLA-Kompatibilität muss nicht berücksichtigt werden, da iNKT-Zellen aufgrund ihres semi-invarianten T-Zell-Rezeptors selbst keine GvHD induzieren können.

In der klinischen Umsetzung sind neben der Effektivität aber auch Sicherheit und Umsetzbarkeit einer Therapie von entscheidender Bedeutung.

Beim Transfer von Empfänger-iNKT-Zellen besteht zwar aufgrund der autologen Herkunft der Zellen nicht das Risiko einer GvHD-Entstehung durch eine allogene T-Zell-Kontamination, allerdings können eine mögliche Kontamination mit Tumorzellen, wenn die Expansions-PBMCs vor der Konditionierung entnommen wurden, oder eine für eine suffiziente Expansion von iNKT-Zellen nicht ausreichende Gesamtzellzahl der peripheren Immunzellen in der Praxis zu Problemen führen.

Spender-PBMCs zur Expansion von iNKT-Zellen sind dagegen in größerer Menge verfügbar und bergen nicht das Risiko einer Tumorzell-Kontamination. Jedoch sind auch Spender-iNKT-Zellen nicht immer in ausreichenden Mengen für eine suffiziente Expansion vorhanden. Die garantierte Verfügbarkeit von iNKT-Zellen ist der große Vorteil von Drittspender-iNKT-Zellen. Allerdings muss hierbei sichergestellt werden, dass diese sehr rein isoliert und keine sonstigen T-Zellen mehr enthalten sind, die

aufgrund ihrer HLA-Inkompatibilität hoch potente Induktoren einer GvHD darstellen würden.

Obwohl Drittpartei-iNKT-Zellen vom neuen Immunsystem des Empfängers aufgrund ihrer HLA-Inkompatibilität abgestoßen wurden, konnten sie in den von uns durchgeführten Mausstudien trotzdem eine tödliche GvHD verhindern (Schneidawind *et al.*, 2015). Da iNKT-Zellen die zur Toleranzvermittlung notwendige Induktion von Apoptose in allogenen DCs bereits in den ersten 4 Stunden veranlassen (siehe 3.8), ist ein begrenztes Überleben der iNKT-Zellen im Körper des Patienten dennoch zur Prävention der GvHD-Induktion ausreichend.

4.4.2 GMP-konforme Expansion von iNKT-Zellen

Um *ex vivo* expandierte iNKT-Zellen zur zellulären Therapie einzusetzen, müssen diese unter „*good manufacturing practice*“ (GMP)-Bedingungen vermehrt und isoliert werden. Für die Herstellung von Zelltherapeutika unter GMP-Bedingungen müssen von der „European Medicines Agency“ zertifizierte Materialien und Medien verwendet werden. Als Vorbild für die GMP-konforme Expansion von iNKT-Zellen könnte das in 2017 beantragte Patent von Pillai dienen (U.S. Pub. No. 20170029777A1, 2017).

Über eine Leukapherese könnte aus den Spendern das benötigte Zellmaterial gewonnen werden. Die in den PBMCs enthaltenen iNKT-Zellen könnten in Folge wie in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt, über eine Stimulation mit α -GalCer und hIL-2 *in vitro* expandiert werden. Als Glykolipide für eine klinische Studie würden sich sowohl KRN7000 als auch PBS44 und PBS-57 anbieten. Diese Glykolipide bewirken eine vergleichbar starke iNKT-Zell-Expansion. Zudem zeigen hierüber expandierte iNKT-Zellen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Funktionalität (siehe Abbildung 1 B, C, Anhangsabbildung 1, Anhangsabbildung 2, Anhangsabbildung 8). Sowohl die Glykolipide als auch das für die Expansion ebenfalls benötigte hIL-2 können bereits unter GMP-Bedingungen hergestellt werden (Nieda *et al.*, 2004).

Für eine suffiziente Expansion von iNKT-Zellen wird eine Stimulation mit glykolipid-beladenen APCs benötigt. Dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit zuvor eingefrorene autologe PBMCs alle sieben Tage zur Restimulation zur Kultur hinzugegeben. Diese Vorgehensweise könnte zwar GMP-konform umgesetzt werden, ist allerdings mit hohem Aufwand verbunden. Einfacher könnte die Restimulation mit GMP-geeigneten artifiziellen Antigen-präsentierenden Zellen (engl.: *artificial antigen presenting cell*;

aAPC). East *et al.* konnten bereits 2012 mit Hilfe von CD1d- α -GalCer/CD28-präsentierenden aAPCs unter Zugabe von hIL-2 erfolgreich iNKT-Zellen expandieren (East *et al.*, 2012).

Die Zugabe von hIL-12, dem eine Rolle bei der iNKT-Zell-Aktivierung zugeschrieben wird, könnte die Expansion weiter verbessern (Rossjohn *et al.*, 2012).

Eine GMP-konforme Aufreinigung von expandierten iNKT-Zellen könnte über das CliniMACS Selection System erfolgen. Wie bei Exley *et al.* bereits klinisch angewendet, könnten MACS-Beads, an die der iNKT-TCR-Antikörper 6B11 mittels Biotin gebunden wird, zum Einsatz kommen (Exley *et al.*, 2017). Alternativ könnten iNKT-Zellen nach ihrer Expansion mittels GMP-konformer Einzelzellsortierung aufgereinigt werden.

Die expandierten und isolierten iNKT-Zellen könnten anschließend zum Transplantat hinzugefügt werden- oder direkt nach der Transplantation transfundiert werden.

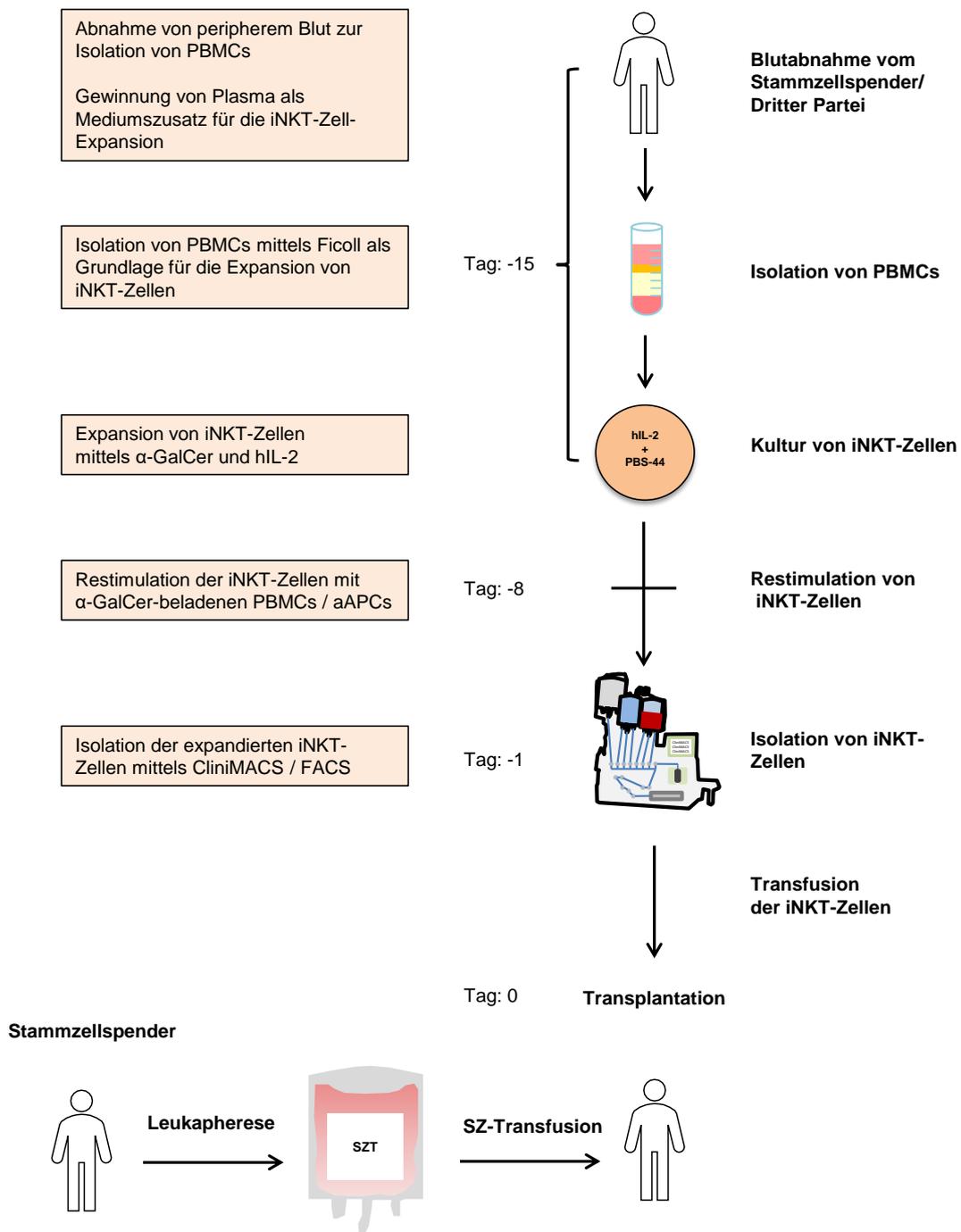


Abbildung 24: Schematische Skizze zum Ablauf einer möglichen Zytotherapie auf Basis von iNKT-Zellen

Für einen adoptiven Transfer von expandierten iNKT-Zellen zur GvHD-Prävention wird peripheres Blut des Stammzellspenders oder eines Drittparteispenders 15 Tage vor SZT über eine Leukapherese gewonnen. Im Anschluss werden die mittels Ficoll-isolierten PBMCs für 14 Tage mit hIL-2 und α -GalCer zur Expansion der iNKT-Zellen kultiviert. Die erforderliche Restimulation der iNKT-Zellen könnte mit α -GalCer-beladenen autologen PBMCs oder aAPCs erfolgen. Mittels CliniMACS oder FACS könnte die Isolation der expandierten iNKT-Zellen erfolgen, sodass diese am Tag der SZT adoptiv mit dem Transplantat in den Empfänger infundiert werden können.

5. Zusammenfassung

Nach aktuellen Hochrechnungen erkranken weltweit pro Jahr ca. 350 000 Menschen an einer Leukämie (Miranda-Filho *et al.*, 2018). Oftmals stellt für diese Patienten eine allogene SZT die letzte und einzige kurative Therapieoption dar.

Durch die allogene SZT konnten seit ihrer ersten Anwendung im Jahr 1968 tausende Leben gerettet werden, aber trotz zahlreicher Optimierungen bleibt die Entstehung einer GvHD noch immer eine der Hauptkomplikationen die zu einer beträchtlichen Morbidität und Mortalität führt.

Aktuelle angewandte immunsuppressive Therapien zur Behandlung einer GvHD sind zwar wirkungsvoll, gehen aber mit einer Reduktion des GvL-Effekts einher, was in erhöhten Rezidivraten resultiert, weshalb noch immer mit Nachdruck nach neuen Strategien zur GvHD-Prävention gesucht wird.

Ein hoffnungsvoller neuer Ansatz zur Prävention einer GvHD ist die Entwicklung einer Zytotherapie auf Basis von iNKT-Zellen. Neueste Studien zeigen, dass Patienten, die eine hohe Anzahl an iNKT-Zellen mit dem Transplantat gespendet bekommen, signifikant seltener eine GvHD entwickeln (Rubio *et al.*, 2012; Malard *et al.*, 2016). Zudem konnte in präklinischen Mausmodellen demonstriert werden, dass der adoptive Transfer von iNKT-Zellen verlässlich vor einer letalen GvHD schützt, ohne dass dabei der zur Tumorkontrolle nötige GvL-Effekt dabei verloren geht (Schneidawind *et al.*, 2014; Schneidawind *et al.*, 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch humane expandierte iNKT-Zellen sowohl die Aktivierung als auch die Proliferation alloreaktiver T-Zellen *in vitro*, durch die Eliminierung von allogenen Mo-DCs, unterdrücken können. Die Eliminierung allogener Mo-DCs vermitteln iNKT-Zellen über die Freisetzung der Apoptose-induzierenden Moleküle Perforin und Granzym, infolge einer direkten CD1d-TCR-abhängigen Interaktion. Neben der Unterdrückung alloreaktiver T-Zellen waren expandierte iNKT-Zellen außerdem in der Lage, Tumorzellen *in vitro* direkt zu lysieren. Aufgrund der Tatsache, dass expandierte iNKT-Zellen durch die Unterdrückung alloreaktiver T-Zellen und über die direkte Lyse von Tumorzellen sowohl das Potenzial zur GvHD-Prävention als auch zu Tumorkontrolle besitzen, scheint der adoptive Transfer von iNKT-Zellen eine sinnvolle Optimierung der allogenen SZT zu sein.

Summary

Based on recent projections, 350 000 people develop leukemia per year worldwide (Miranda-Filho *et al.* 2018). Often-times, allogeneic SCT is the last and only curative therapeutic option for those patients. Since 1968, thousands of patients could be saved via allogeneic SCT. However, albeit many improvements GvHD remains as one of the major side-effects which leads to substantial morbidity and mortality.

Present applied immunosuppressive therapies are succesful in treating GvHD, but they go along with a diminished GvL-effect which results in higher relapse rates. For this reason, the search for new strategies on how to prevent GvHD goes on.

A promising approach for GvHD prevention lies in the development of an iNKT-cell-based cytotherapy. Latest studies revealed that patients which receive high numbers of iNKT cells with the graft display significantly reduced GvHD rates (Rubio *et al.*, 2012; Malard *et al.*, 2016). Moreover preclinical mouse models demonstrated that the adoptive transfer of iNKT cells could prevent the development of a lethal GvHD while preserving GvL effects. (Schneidawind *et al.*, 2014; Schneidawind *et al.*, 2015).

In this study it has been shown that also human expanded iNKT cells are capable of preventing the activation and proliferation of alloreactive T-cells *in vitro* by the elimination of allogeneic Mo-DCs. iNKT cells eliminate allogeneic Mo-DCs after a direct CD1d-TCR interaction and the subsequent release of the apoptosis-inducing factors perforine and granzyme B. Beside the supression of alloreactive T cells, expanded iNKT cells were also able to induce direct lysis of tumor cells.

Given the fact that culture-expanded iNKT cells are able to supress alloreactive T cells and directly lyse tumor cells and that they not only posses the potential to succesfully prevent the development of a GvHD but also have the ability to control tumor growth. Therefore, adoptive transfer strategies could be a useful optimization of allogeneic SCT.

6. Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- Afonina, I.S., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2010. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B: Granzyme B in apoptosis and inflammation. *Immunol. Rev.* 235, 105–116.
- Allegra, C.J., Drake, J.C., Jolivet, J., Chabner, B.A., 1985. Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4881–4885.
- Allison, A.C., Eugui, E.M., 2005. Mechanisms of Action of Mycophenolate Mofetil in Preventing Acute and Chronic Allograft Rejection: *Transplantation* 80, 181–190.
- Anasetti, C., Logan, B.R., Lee, S.J., Waller, E.K., Weisdorf, D.J., Wingard, J.R., Cutler, C.S., Westervelt, P., Woolfrey, A., Couban, S., Ehninger, G., Johnston, L., Maziarz, R.T., Pulsipher, M.A., Porter, D.L., Mineishi, S., McCarty, J.M., Khan, S.P., Anderlini, P., Bensinger, W.I., Leitman, S.F., Rowley, S.D., Bredeson, C., Carter, S.L., Horowitz, M.M., Confer, D.L., 2012. Peripheral-Blood Stem Cells versus Bone Marrow from Unrelated Donors. *N. Engl. J. Med.* 367, 1487–1496.
- Arora, M., Weisdorf, D.J., Spellman, S.R., Haagenson, M.D., Klein, J.P., Hurley, C.K., Selby, G.B., Antin, J.H., Kernan, N.A., Kollman, C., Nademanee, A., McGlave, P., Horowitz, M.M., Petersdorf, E.W., 2009. HLA-Identical Sibling Compared With 8/8 Matched and Mismatched Unrelated Donor Bone Marrow Transplant for Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 27, 1644–1652.
- Ashley, C.W., Baecher-Allan, C., 2009. Cutting Edge: Responder T Cells Regulate Human DR + Effector Regulatory T Cell Activity via Granzyme B. *J. Immunol.* 183, 4843–4847.
- Banovic, T., Markey, K.A., Kuns, R.D., Olver, S.D., Don, A.L., Degli-Esposti, M.A., Engwerda, C.R., MacDonald, P.A., Hill, G.R., 2009. Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 182 912-920.
- Bassiri, H., Das, R., Guan, P., Barrett, D.M., Brennan, P.J., Banerjee, P.P., Wiener, S.J., Orange, J.S., Brenner, M.B., Grupp, S.A., Nichols, K.E., 2014. iNKT Cell Cytotoxic Responses Control T-Lymphoma Growth In Vitro and In Vivo. *Cancer Immunol. Res.* 2, 59–69.
- Bendelac, A., 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* 182, 2091–2096.
- Benlagha, K., Wei, D.G., Veiga, J., Teyton, L., Bendelac, A., 2005. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J. Exp. Med.* 202, 485–492.
- Berzins, S.P., Smyth, M.J., Baxter, A.G., 2011. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 131–142.
- Blazar, B.R., Murphy, W.J., Abedi, M., 2012. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 443–458.
- Bleakley, M., Heimfeld, S., Loeb, K.R., Jones, L.A., Chaney, C., Seropian, S., Gooley, T.A., Sommermeyer, F., Riddell, S.R., Shlomchik, W.D., 2015. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell–depleted stem cell grafts. *J. Clin. Invest.* 125, 2677–2689.
- Brennan, P.J., Brigl, M., Brenner, M.B., 2013. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 101–117.
- Brigl, M., Brenner, M.B., 2004. CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 817–890.
- Brossay, L., Kronenberg, M., 1999. Highly conserved antigen-presenting function of CD1d molecules. *Immunogenetics* 50, 146–151.
- Chaidos, A., Patterson, S., Szydlo, R., Chaudhry, M.S., Dazzi, F., Kanfer, E., McDonald, D., Marin, D., Milojkovic, D., Pavlu, J., Davis, J., Rahemtulla, A., Rezvani, K., Goldman, J., Roberts, I., Apperley, J., Karadimitris, A., 2012. Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 119, 5030–5036.
- Chakraverty, R., Sykes, M., 2007. The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood* 110, 9–17.
- Chen, Y.-B., Efebera, Y.A., Johnston, L., Ball, E.D., Avigan, D., Lekakis, L.J., Bachier, C.R., Martin, P., Duramad, O., Ishii, Y., Han, S., Jung, Y.-J., Lee, D., Kunkel, L., Negrin, R.S., Bui, J.D., 2017. Increased Foxp3 + Helios + Regulatory T Cells and Decreased Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Patients Receiving Sirolimus and RGI-2001, an Activator of Invariant Natural Killer T Cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 23, 625–634.

- Choy, J.C., 2010. Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection. *Cell Death Differ.* 17, 567–576.
- Christiansen, D., Milland, J., Mouhtouris, E., Vaughan, H., Pellicci, D.G., McConville, M.J., Godfrey, D.I., Sandrin, M.S., 2008. Humans Lack iGb3 Due to the Absence of Functional iGb3-Synthase: Implications for NKT Cell Development and Transplantation. *PLoS Biol.* 6, e172.
- Colf, L.A., Bankovich, A.J., Hanick, N.A., Bowerman, N.A., Jones, L.L., Kranz, D.M., Garcia, K.C., 2007. How a Single T Cell Receptor Recognizes Both Self and Foreign MHC. *Cell* 129, 135–146.
- Coman, T., Rossignol, J., D'Aveni, M., Fabiani, B., Dussiot, M., Rignault, R., Babdor, J., Bouillé, M., Herbelin, A., Coté, F., Moura, I.C., Hermine, O., Rubio, M.-T., 2018. Human CD4- invariant NKT lymphocytes regulate graft versus host disease. *Oncol Immunology* 7, e1470735.
- Copelan, E.A., 2006. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354:1813-1826.
- Coquet, J.M., Chakravarti, S., Kyparissoudis, K., McNab, F.W., Pitt, L.A., McKenzie, B.S., Berzins, S.P., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2008. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 11287-11292.
- Crowe, N.Y., Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2002. A Critical Role for Natural Killer T Cells in Immunosurveillance of Methylcholanthrene-induced Sarcomas. *J. Exp. Med.* 196, 119–127.
- Dao, T., Mehal, W.Z., Crispe, I.N., 1998. IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J. Immunol.* 161, 2217-2222.
- De Lalla, C., Rinaldi, A., Montagna, D., Azzimonti, L., Bernardo, M.E., Sangalli, L.M., Paganoni, A.M., Maccario, R., Di Cesare-Merlone, A., Zecca, M., Locatelli, F., Dellabona, P., Casorati, G., 2011. Invariant NKT Cell Reconstitution in Pediatric Leukemia Patients Given HLA-Haploidentical Stem Cell Transplantation Defines Distinct CD4⁺ and CD4⁻ Subset Dynamics and Correlates with Remission State. *J. Immunol.* 186, 4490–4499.
- De Santo, C., Arcsott, R., Booth, S., Karydis, I., Jones, M., Asher, R., Salio, M., Middleton, M., Cerundolo, V., 2010. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat. Immunol.* 11, 1039-1046.
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., Levine, R.L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M.S., Tien, H.-F., Wei, A.H., Löwenberg, B., Bloomfield, C.D., 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129, 424-447.
- D'Souza, A., Lee, S., Zhu, X., Pasquini, M., 2017. Current Use and Trends in Hematopoietic Cell Transplantation in the United States. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 23, 1417–1421.
- Duffner, U.A., Maeda, Y., Cooke, K.R., Reddy, P., Ordemann, R., Liu, C., Ferrara, J.L.M., Teshima, T., 2004. Host Dendritic Cells Alone Are Sufficient to Initiate Acute Graft-versus-Host Disease. *J. Immunol.* 172, 7393–7398.
- Duramad, O., Laysang, A., Li, J., Ishii, Y., Namikawa, R., 2011. Pharmacologic Expansion of Donor-Derived, Naturally Occurring CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells Reduces Acute Graft-versus-Host Disease Lethality Without Abrogating the Graft-versus-Leukemia Effect in Murine Models. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17, 1154–1168.
- Dybkov, O., Stützer, A., Bertram, K., Kastner, B., Stark, H., Lührmann, R., Urlaub, H., 2018. Protein-Cross-Linking zur Aufklärung von komplexen Strukturen. *BIOspektrum* 24, 278–282.
- Dzierzak-Mietla, M., Markiewicz, M., Siekiera, U., Mizia, S., Koclega, A., Zielinska, P., Sobczyk-Kruszelnicka, M., Kyrz-Krzemien, S., 2012. Occurrence and Impact of Minor Histocompatibility Antigens' Disparities on Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation from HLA-Matched Sibling Donors. *Bone Marrow Res.* 2012, 1–12.
- East, J.E., Sun, W., Webb, T.J., 2012. Artificial Antigen Presenting Cell (aAPC) Mediated Activation and Expansion of Natural Killer T Cells. *J. Vis. Exp.* e433.
- Exley, M.A., Friedlander, P., Alatrakchi, N., Vriend, L., Yue, S., Sasada, T., Zeng, W., Mizukami, Y., Clark, J., Nemer, D., LeClair, K., Canning, C., Daley, H., Dranoff, G., Giobbie-Hurder, A., Hodi, F.S., Ritz, J., Balk, S.P., 2017. Adoptive Transfer of Invariant NKT Cells as Immunotherapy for Advanced Melanoma: A Phase I Clinical Trial. *Clin. Cancer Res.* 23, 3510–3519.
- Facciotti, F., Ramanjaneyulu, G.S., Lepore, M., Sansano, S., Cavallari, M., Kistowska, M., Forss-Petter, S., Ni, G., Colone, A., Singhal, A., Berger, J., Xia, C., Mori, L., De Libero, G., 2012. Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus. *Nat. Immunol.* 13, 474–480.
- Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P., Holler, E., 2009. Graft-versus-host disease *Lancet.* 373, 1550-1561.
- Filipovich, A.H., Weisdorf, D., Pavletic, S., Socie, G., Wingard, J.R., Lee, S.J., Martin, P., Chien, J., Przepiorka, D., Couriel, D., Cowen, E.W., Dinndorf, P., Farrell, A., Hartzman, R., Hensley-Downey, J., Jacobsohn, D., McDonald, G., Mittleman, B., Rizzo, J.D., Robinson, M., Schubert,

- M., Schultz, K., Shulman, H., Turner, M., Vogelsang, G., Flowers, M.E.D., 2005. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11, 945–956.
- Finke, J., Bethge, W.A., Schmoor, C., Ottinger, H.D., Stelljes, M., Zander, A.R., Volin, L., Ruutu, T., Heim, D.A., Schwerdtfeger, R., Kolbe, K., Mayer, J., Maertens, J.A., Linkesch, W., Holler, E., Koza, V., Bornhäuser, M., Einsele, H., Kolb, H.-J., Bertz, H., Egger, M., Grishina, O., Socié, G., 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. *Lancet Oncol.* 10, 855–864.
- Florek, M., Segal, E.I., Leveson-Gower, D.B., Baker, J., Müller, A.M.S., Schneidawind, D., Meyer, E., Negrin, R.S., 2014. Autologous apoptotic cells preceding transplantation enhance survival in lethal murine graft-versus-host models. *Blood* 124, 1832–1842.
- Freigang, S., Landais, E., Zadorozhny, V., Kain, L., Yoshida, K., Liu, Y., Deng, S., Palinski, W., Savage, P.B., Bendelac, A., Teyton, L., 2012. Scavenger receptors target glycolipids for natural killer T cell activation. *J. Clin. Invest.* 122, 3943–3954.
- Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A.J., Steinman, R.M., 2004. The Linkage of Innate to Adaptive Immunity via Maturing Dendritic Cells In Vivo Requires CD40 Ligation in Addition to Antigen Presentation and CD80/86 Costimulation. *J. Exp. Med.* 199, 1607–1618.
- Galli, G., Nuti, S., Tavarini, S., Galli-Stampino, L., De Lalla, C., Casorati, G., Dellabona, P., Abrignani, S., 2003. CD1d-restricted Help To B Cells By Human Invariant Natural Killer T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 197, 1051–1057.
- Ghosh, A., Smith, M., James, S.E., Davila, M.L., Velardi, E., Argyropoulos, K.V., Gunset, G., Perna, F., Kreines, F.M., Levy, E.R., Lieberman, S., Jay, H.V., Tuckett, A.Z., Zakrzewski, J.L., Tan, L., Young, L.F., Takvorian, K., Dudakov, J.A., Jenq, R.R., Hanash, A.M., Motta, A.C.F., Murphy, G.F., Liu, C., Schietinger, A., Sadelain, M., van den Brink, M.R.M., 2017. Donor CD19 CAR T cells exert potent graft-versus-lymphoma activity with diminished graft-versus-host activity. *Nat. Med.* 23, 242–249.
- Giaccone, G., Punt, C.J.A., Ando, Y., Ruijter, R., Nishi, N., Peters, M., Scheper, R.J., 2002. A Phase I Study of the Natural Killer T-Cell Ligand α -Galactosylceramide (KRN7000) in Patients with Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 8, 3702–3709.
- Godfrey, D.I., Kronenberg, M., 2004. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* 114, 1379–88.
- Gumperz, J.E., Miyake, S., Yamamura, T., Brenner, M.B., 2002. Functionally Distinct Subsets of CD1d-restricted Natural Killer T Cells Revealed by CD1d Tetramer Staining. *J. Exp. Med.* 195, 625–636.
- Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., Butcher, E.C., 2008. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 9, 1253–1260.
- Hanauer, S.B., Feagan, B.G., Lichtenstein, G.R., Mayer, L.F., Schreiber, S., Colombel, J.F., Rachmilewitz, D., Wolf, D.C., Olson, A., Bao, W., Rutgeerts, P., 2002. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *The Lancet* 359, 1541–1549.
- Haraguchi, K., Takahashi, T., Hiruma, K., Kanda, Y., Tanaka, Y., Ogawa, S., Chiba, S., Miura, O., Sakamaki, H., Hirai, H., 2004. Recovery of α 24⁺ NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 34, 595–602.
- Haraguchi, K., Takahashi, T., Matsumoto, A., Asai, T., Kanda, Y., Kurokawa, M., Ogawa, S., Oda, H., Taniguchi, M., Hirai, H., Chiba, S., 2005. Host-Residual Invariant NK T Cells Attenuate Graft-versus-Host Immunity. *J. Immunol.* 175, 1320–1328.
- Hashimoto, D., Asakura, S., Miyake, S., Yamamura, T., Van Kaer, L., Liu, C., Tanimoto, M., Teshima, T., 2005. Stimulation of Host NKT Cells by Synthetic Glycolipid Regulates Acute Graft-versus-Host Disease by Inducing Th2 Polarization of Donor T Cells. *J. Immunol.* 174, 551–556.
- Haverkos, B.M., Abbott, D., Hamadani, M., Armand, P., Flowers, M.E., Merryman, R., Kamdar, M., Kanate, A.S., Saad, A., Mehta, A., Ganguly, S., Fenske, T.S., Hari, P., Lowsky, R., Andritsos, L., Jagasia, M., Bashey, A., Brown, S., Bachanova, V., Stephens, D., Mineishi, S., Nakamura, R., Chen, Y.-B., Blazar, B.R., Gutman, J., Devine, S.M., 2017. PD-1 blockade for relapsed lymphoma post-allogeneic hematopoietic cell transplant: high response rate but frequent GVHD. *Blood* 130, 221–228.
- Hayakawa, Y., Rovero, S., Forni, G., Smyth, M.J., 2003. α -Galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9464–9469.
- Herrera, C., Torres, A., García-Castellano, J.M., Roman, J., Martin, C., Serrano, J., Falcon, M., Alvarez, M.A., Gomez, P., Martinez, F., 1999. Prevention of graft-versus-host disease in high risk

- patients by depletion of CD4+ and reduction of CD8+ lymphocytes in the marrow graft. *Bone Marrow Transplant.* 23, 443–450.
- Hershberg, R.M., Cho, D.H., Youakim, A., Bradley, M.B., Lee, J.S., Framson, P.E., Nepom, G.T., 1998. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 102, 792–803.
- Hörmann, K., Stukalov, A., Müller, A.C., Heinz, L.X., Superti-Furga, G., Colinge, J., Bennett, K.L., 2016. A Surface Biotinylation Strategy for Reproducible Plasma Membrane Protein Purification and Tracking of Genetic and Drug-Induced Alterations. *J. Proteome Res.* 15, 647–658.
- Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Kolb, H.-J., Rimm, A.A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., 1990. Graft-Versus-Leukemia Reactions After Bone Marrow Transplantation. *Blood* 75, 555–562.
- Huai, Q., Kim, H.-Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J.O., Ke, H., 2002. Crystal structure of calcineurin–cyclophilin– cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin–drug complexes *Proc Natl Acad Sci* 99, 12037–12042.
- Jenq, R.R., van den Brink, M.R.M., 2010. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 213–221.
- Ji, Y., Sun, S., Xu, A., Bhargava, P., Yang, L., Lam, K.S.L., Gao, B., Lee, C.-H., Kersten, S., Qi, L., 2012. Activation of Natural Killer T Cells Promotes M2 Macrophage Polarization in Adipose Tissue and Improves Systemic Glucose Tolerance via Interleukin-4 (IL-4)/STAT6 Protein Signaling Axis in Obesity. *J. Biol. Chem.* 287, 13561–13571.
- Kaspar, A.A., Okada, S., Kumar, J., Poulain, F.R., Drouvalakis, K.A., Kelekar, A., Hanson, D.A., Kluck, R.M., Hitoshi, Y., Johnson, D.E., Froelich, C.J., Thompson, C.B., Newmeyer, D.D., Anel, A., Clayberger, C., Krensky, A.M., 2001. A Distinct Pathway of Cell-Mediated Apoptosis Initiated by Granulysin. *J. Immunol.* 167, 350–356.
- Kataoka, T., N. Shinohara, H. Takayama, K. Takaku, S. Kondo, S. Yonehara, K. Nagai., 1996. Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 156, 3678–3686.
- Kawakami, K., Yamamoto, N., Kinjo, Y., Miyagi, K., Uezu, K., Kinjo, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., Saito, A., 2003. Critical role of V α 14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Microbiol Immunol* 46, 207–210.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., Taniguchi, M., 1997. CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of V α 14 NKT Cells by Glycosylceramides. *Science* 278, 1626–1629.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., Tanaka, Y., Taniguchi, M., 1998. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V 14 NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 5690–5693.
- Keller, C.W., Freigang, S., Lünemann, J.D., 2017. Reciprocal Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer T Cells: Mechanisms and Therapeutic Potenzial. *Front. Immunol.* 8, 570.
- Khan, N., Gowthaman, U., Pahari, S., Agrewala, J.N., 2012. Manipulation of Costimulatory Molecules by Intracellular Pathogens: Veni, Vidi, Vici!! *PLoS Pathog.* 8, 7 e1002676.
- Kinjo, Y., Illarionov, P., Vela, J.L., Pei, B., Girardi, E., Li, X., Li, Y., Imamura, M., Kaneko, Y., Okawara, A., Miyazaki, Y., Gómez-Velasco, A., Rogers, P., Dahesh, S., Uchiyama, S., Khurana, A., Kawahara, K., Yesilkaya, H., Andrew, P.W., Wong, C.-H., Kawakami, K., Nizet, V., Besra, G.S., Tsuji, M., Zajonc, D.M., Kronenberg, M., 2011. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat. Immunol.* 12, 966–974.
- Kinjo, Y., Tupin, E., Wu, D., Fujio, M., Garcia-Navarro, R., Benhnia, M.R.-E.-I., Zajonc, D.M., Ben-Menachem, G., Ainge, G.D., Painter, G.F., Khurana, A., Hoebe, K., Behar, S.M., Beutler, B., Wilson, I.A., Tsuji, M., Sellati, T.J., Wong, C.-H., Kronenberg, M., 2006. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat. Immunol.* 7, 978–86
- Kohrt, H.E., Turnbull, B.B., Heydari, K., Shizuru, J.A., Laport, G.G., Miklos, D.B., Johnston, L.J., Arai, S., Weng, W.-K., Hoppe, R.T., Lavori, P.W., Blume, K.G., Negrin, R.S., Strober, S., Lowsky, R., 2009. TLI and ATG conditioning with low risk of graft-versus-host disease retains antitumor reactions after allogeneic hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *Blood.* 114, 1099–1109
- Kojo, S., Elly, C., Harada, Y., Langdon, W.Y., Kronenberg, M., Liu, Y.-C., 2009. Mechanisms of NKT cell anergy induction involve Cbl-b-promoted monoubiquitination of CARMA1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 17847–17851.
- Kündig, T.M., Simard, J.J.L., Battegay, M., Lothar, H., Gessner, A., Kuhicke, K., Ohashi, P.S., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1995. Fibroblasts as Efficient Antigen-Presenting Cells in Lymphoid Organs. *Science.* 268, 1343–1347.

- Koseki, H., Imai, K., Nakayama, F., Sadot, T., Taniguchi, M., 1990. Homogenous junctional sequence of the V14' T-cell antigen receptor α chain expanded in unprimed mice. *Proc Natl Acad Sci* 87, 5248-5252
- Kovalovsky, D., Uche, O.U., Eladad, S., Hobbs, R.M., Yi, W., Alonzo, E., Chua, K., Eidson, M., Kim, H.-J., Im, J.S., Pandolfi, P.P., Sant'Angelo, D.B., 2008. The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat. Immunol.* 9, 1055-1064.
- Koyama, M., Hashimoto, D., Aoyama, K., Matsuoka, K., Karube, K., Niino, H., Harada, M., Tanimoto, M., Akashi, K., Teshima, T., 2009. Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood* 113, 2088-2095.
- Koyama, M., Hill, G.R., 2016. Alloantigen presentation and graft-versus-host disease: fuel for the fire. *Blood.* 127, 2963-70.
- Koyama, M., Kuns, R.D., Olver, S.D., Raffelt, N.C., Wilson, Y.A., Don, A.L.J., Lineburg, K.E., Cheong, M., Robb, R.J., Markey, K.A., Varelias, A., Malissen, B., Hämmerling, G.J., Clouston, A.D., Engwerda, C.R., Bhat, P., MacDonald, K.P.A., Hill, G.R., 2012. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 18,135-142
- Krensky, A. M., Weiss, A., Crabtree, G., Davis, M. M. & Parham, P., 1990. T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *The New England journal of medicine* 322, 510-517
- Kushwah, R., Wu, J., Oliver, J.R., Jiang, G., Zhang, J., Siminovitch, K.A., Hu, J., 2010. Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3⁺ Treg: Cellular immune response. *Eur. J. Immunol.* 40, 1022-1035.
- Kuylenskierna, C., Snyder-Cappione, J.E., Loo, C.P., Gonzalez, V.D., Michaëlsson, J., Moll, M., Spotts, G., Hecht, F.M., Nixon, D.F., Sandberg, J.K., 2012. NK cells and CD1d-restricted NKT cells respond in different ways with divergent kinetics to IL-2 treatment in primary HIV-1 infection. *Scand J Immunol.* 73, 141-146.
- Kuylenskierna, C., Snyder-Cappione, J.E., Loo, C.P., Long, B.R., Gonzalez, V.D., Michaëlsson, J., Moll, M., Spotts, G., Hecht, F.M., Nixon, D.F., Sandberg, J.K., 2011. NK Cells and CD1d-restricted NKT Cells Respond in Different Ways with Divergent Kinetics to IL-2 Treatment in Primary HIV-1 Infection: Innate Cellular Immunity in Primary HIV-1 Infection. *Scand. J. Immunol.* 73, 141-146.
- Lan, F., Zeng, D., Higuchi, M., Higgins, J.P., Strober, S., 2003. Host conditioning with total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin prevents graft-versus-host disease: the role of CD1-reactive natural killer T cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 9, 355-363.
- Lantz, O., 1994. An invariant T cell receptor α chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4⁺ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* 180, 1097-1106.
- Leadbetter, E.A., Brigl, M., Illarionov, P., Cohen, N., Luteran, M.C., Pillai, S., Besra, G.S., Brenner, M.B., 2008. NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 8339-8344.
- Lee, P.T., Benlagha, K., Teyton, L., Bendelac, A., 2002. Distinct Functional Lineages of Human V α 24 Natural Killer T Cells. *J. Exp. Med.* 195, 637-641.
- Lee, S.J., Klein, J., Haagenson, M., Baxter-Lowe, L.A., Confer, D.L., Eapen, M., Fernandez-Vina, M., Flomenberg, N., Horowitz, M., Hurley, C.K., Noreen, H., Oudshoorn, M., Petersdorf, E., Setterholm, M., Spellman, S., Weisdorf, D., Williams, T.M., Anasetti, C., 2007. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 110, 4576-4583.
- Lee, S.J., Vogelsang, G., Flowers, M.E.D., 2004. Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 9, 215-233
- Li, H., Matte-Martone, C., Tan, H.S., Venkatesan, S., McNiff, J., Demetris, A.J., Jain, D., Lakkis, F., Rothstein, D., Shlomchik, W.D., 2011. Graft-versus-Host Disease Is Independent of Innate Signaling Pathways Triggered by Pathogens in Host Hematopoietic Cells. *J. Immunol.* 186, 230-241.
- Liu, Y., Goff, R.D., Zhou, D., Mattner, J., Sullivan, B.A., Khurana, A., Cantu, C., Ravkov, E.V., Ibegbu, C.C., Altman, J.D., Teyton, L., Bendelac, A., Savage, P.B., 2006. A modified α -galactosyl ceramide for staining and stimulating natural killer T cells. *J. Immunol. Methods* 312, 34-39.
- Liu, Y., Goff, R.D., Zhou, D., Mattner, J., Sullivan, B.A., Khurana, A., Cantu, C., Ravkov, E.V., Ibegbu, C.C., Altman, J.D., Teyton, L., Bendelac, A., Savage, P.B., 2006. A modified α -galactosyl ceramide for staining and stimulating natural killer T cells. *J. Immunol. Methods* 312, 34-39.
- Loiseau, P., Busson, M., Balere, M.-L., Dormoy, A., Bignon, J.-D., Gagne, K., Gebuhrer, L., Dubois, V., Jollet, I., Bois, M., Perrier, P., Masson, D., Moine, A., Absi, L., Reviron, D., Lepage, V., Tamouza, R., Toubert, A., Marry, E., Chir, Z., Jouet, J.-P., Blaise, D., Charron, D., Raffoux, C.,

2007. HLA Association with Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome: The Number of Mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 Is Strongly Associated with Overall Survival. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 965–974.
- Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, et al., 2005. Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med.* 353, 1321-1331.
- Lu, Y., Giver, C.R., Sharma, A., Li, J.M., Darlak, K.A., Owens, L.M., Roback, J.D., Galipeau, J., Waller, E.K., 2012. IFN- γ and indoleamine 2,3-dioxygenase signaling between donor dendritic cells and T cells regulates graft versus host and graft versus leukemia activity. *Blood* 119, 1075-85
- Ma, L.L., Wang, C.L.C., Neely, G.G., Epelman, S., Krensky, A.M., Mody, C.H., 2004. NK Cells Use Perforin Rather than Granulysin for Anticryptococcal Activity. *J. Immunol.* 173, 3357–3365.
- Macdonald, W.A., Chen, Z., Gras, S., Archbold, J.K., Tynan, F.E., Clements, C.S., Bharadwaj, M., Kjer-Nielsen, L., Saunders, P.M., Wilce, M.C.J., Crawford, F., Stadinsky, B., Jackson, D., Brooks, A.G., Purcell, A.W., Kappler, J.W., Burrows, S.R., Rossjohn, J., McCluskey, J., 2009. T Cell Allorecognition via Molecular Mimicry. *Immunity* 31, 897–908.
- Mackay, L.K., Minnich, M., Kragten, N.A.M., Liao, Y., Nota, B., Seillet, C., Zaid, A., Man, K., Preston, S., Freestone, D., Braun, A., Wynne-Jones, E., Behr, F.M., Stark, R., Pellicci, D.G., Godfrey, D.I., Belz, G.T., Pellegrini, M., Gebhardt, T., Busslinger, M., Shi, W., Carbone, F.R., van Lier, R.A.W., Kallies, A., van Gisbergen, K.P.J.M., 2016. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science* 352, 459–463.
- Makino, Y., Kanno, R., Ito, T., Higashino, K., Taniguchi, M., 1995. Predominant expression of invariant Va14+ TCR α chain in NK1.1+ T cell populations. *International Immunology* 7, 1157-1161
- Malard, F., Labopin, M., Chevallier, P., Guillaume, T., Duquesne, A., Rialland, F., Derenne, S., Peterlin, P., Leauté, A.-G., Brissot, E., Gregoire, M., Moreau, P., Saas, P., Gaugler, B., Mohty, M., 2016. Larger number of invariant natural killer T cells in PBSC allografts correlates with improved GVHD-free and progression-free survival. *Blood* 127, 1828–1835.
- Marmont, A.M., Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sobocinski, K., Ash, R.C., van Bekkum, D.W., Champlin, R.E., Dicke, K.A., Goldman, J.M., Good, R.A., Herzig, R.H., Hong, R., Masaoka, T., Rimm, A.A., Ringdahl, O., Speck, B., Bortin, M.M., 1991. T-cell Depletion of HLA-Identical Transplants in Leukemia. *Blood* 78, 2120-2130.
- Martinez, C., Urbano-Ispizua, A., 2011. Graft-versus-host disease therapy: something else beyond glucocorticoids? *Haematologica* 96, 1249–1251.
- Matte, C.C., Liu, J., Cormier, J., Anderson, B.E., Athanasiadis, I., Jain, D., McNiff, J., Shlomchik, W.D., 2004. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat. Med.* 10, 987–992.
- Miranda-Filho, A., Pineros, M., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Monnereau, A., Bray, F., 2018. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: A population-based study. *Lancet Haematol.* 5, 14–24.
- Mohty, M., 2007. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* 21, 1387–1394.
- Morecki, S., Panigrahi, S., Pizov, G., Yacovlev, E., Gelfand, Y., Eizik, O., Slavin, S., 2004. Effect of KRN7000 on induced graft-vs-host disease. *Exp. Hematol.* 32, 630–637.
- Morita, M., Motoki, K., Akimoto, K., Natori, T., Sakai, T., Sawa, E., Yamaji, K., Koezuka, Y., Kobayashi, E., Fukushima, H., 1995. Structure-Activity Relationship of α -Galactosylceramides against B16-Bearing Mice. *J. Med. Chem.* 38, 2176–2187.
- Nagata, S., 2018. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 489–517.
- Nair, S., Dhodapkar, M.V., 2017. Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 8, 1178.
- Nieda, M., Okai, M., Tazbirkova, A., Lin, H., Yamaura, A., Ide, K., Abraham, R., Juji, T., Macfarlane, D.J., Nicol, A.J., 2004. Therapeutic activation of Va24+V β 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 103, 383–389.
- Niemeyer, M., Darmoise, A., Mollenkopf, H.-J., Hahnke, K., Hurwitz, R., Besra, G.S., Schaible, U.E., Kaufmann, S.H.E., 2008. Natural killer T-cell characterization through gene expression profiling: an account of versatility bridging T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses. *Immunology* 123, 45–56.
- Nimer, S.D., Ireland, P., Meshkinpour, A., Frane, M., 1994. An increased HLA-DR2 frequency is seen in aplastic anemia patients. *Blood* 84, 923-927.
- Novak, J., Lehuen, A., 2011. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine* 53, 263–270.
- O'Reilly, V., Zeng, S.G., Bricard, G., Atzberger, A., Hogan, A.E., Jackson, J., Feighery, C., Porcelli, S.A., Doherty, D.G., 2011. Distinct and Overlapping Effector Functions of Expanded Human CD4+, CD8 α + and CD4-CD8 α - Invariant Natural Killer T Cells. *PLoS ONE* 6, e28648.

- Passweg, J.R., Baldomero, H., Bader, P., Bonini, C., Cesaro, S., Dreger, P., Duarte, R.F., Dufour, C., Falkenburg, J.H., Farge-Bancel, D., Gennery, A., Kröger, N., Lanza, F., Nagler, A., Sureda, A., Mohty, M., 2015., Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant.* 50, 476–482.
- Patterson, S., Chaidos, A., Neville, D.C.A., Poggi, A., Butters, T.D., Roberts, I.A.G., Karadimitris, A., 2008. Human Invariant NKT Cells Display Alloreactivity Instructed by Invariant TCR-CD1d Interaction and Killer Ig Receptors. *J. Immunol.* 181, 3268–3276.
- Petersdorf, E., Longton, G., Anasetti, C., Martin, P., Mickelson, E., Smith, A., Hansen, J., 1995. The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 86, 1606–1613.
- Pillai, A.B., 2017, Methods of expanding exvivo natural killer t (nkt) cells and therapeutic uses thereof. Patent Application Publication US 2017/0029777 A1.
- Pillai, A.B., George, T.I., Dutt, S., Strober, S., 2009. Host natural killer T cells induce an interleukin-4–dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood* 113, 4458–4467.
- Pillai, A.B., George, T.I., Dutt, S., Teo, P., Strober, S., 2007. Host NKT Cells Can Prevent Graft-versus-Host Disease and Permit Graft Antitumor Activity after Bone Marrow Transplantation. *J. Immunol.* 178, 6242–6251.
- Pipkin, M., Lieberman, J., 2007. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 301–308.
- Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., et al., 1995. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 15, 825–828.
- Rath, P.C., Aggarwal, B.B., 1999. TNF-Induced Signaling in Apoptosis. *J. Clin. Immunol.* 19, 350–364.
- Reinhardt-Heller, K., Hirschberg, I., Lang, P., Vogl, T., Handgretinger, R., Bethge, W.A., Holzer, U., 2017. Increase of Intermediate Monocytes in Graft-versus-Host Disease: Correlation with MDR1+Th17.1 Levels and the Effect of Prednisolone and 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 23, 2057–2064.
- Reiser, J.-B., Darnault, C., Guimezanes, A., Grégoire, C., Mosser, T., Schmitt-Verhulst, A.-M., Fontecilla-Camps, J.C., Malissen, B., Housset, D., Mazza, G., 2000. Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule. *Nat. Immunol.* 1, 291–297.
- Richter, J., Neparidze, N., Zhang, L., Nair, S., Monesmith, T., Sundaram, R., Miesowicz, F., Dhodapkar, K.M., Dhodapkar, M.V., 2013. Clinical regressions and broad immune activation following combination therapy targeting human NKT cells in myeloma. *Blood* 121, 423–430.
- Rossjohn, J., Pellicci, D.G., Patel, O., Gapin, L., Godfrey, D.I., 2012. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 845–857.
- Rubio, M.-T., Bouillié, M., Bouazza, N., Coman, T., Trebeden-Nègre, H., Gomez, A., Suarez, F., Sibon, D., Brignier, A., Paubelle, E., Nguyen-Khoc, S., Cavazzana, M., Lantz, O., Mohty, M., Urien, S., Hermine, O., 2017. Pre-transplant donor CD4– invariant NKT cell expansion capacity predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 31, 903–912.
- Rubio, M.-T., Moreira-Teixeira, L., Bachy, E., Bouillié, M., Milpied, P., Coman, T., Suarez, F., Marcais, A., Sibon, D., Buzyn, A., Caillat-Zucman, S., Cavazzana-Calvo, M., Varet, B., Dy, M., Hermine, O., Leite-de-Moraes, M., 2012. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. *Blood* 120, 2144–2154.
- Schmieg, J., Yang, G., Franck, R.W., Tsuji, M., 2003. Superior Protection against Malaria and Melanoma Metastases by a C-glycoside Analogue of the Natural Killer T Cell Ligand α -Galactosylceramide. *J. Exp. Med.* 198, 1631–1641.
- Schneidawind, D., Baker, J., Pierini, A., Buechele, C., Luong, R.H., Meyer, E.H., Negrin, R.S., 2015. Third-party CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality. *Blood* 125, 3491–3500.
- Schneidawind, D., Pierini, A., Alvarez, M., Pan, Y., Baker, J., Buechele, C., Luong, R.H., Meyer, E.H., Negrin, R.S., 2014. CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 124, 3320–3328.
- Schwartz, R.H., 2003. T Cell Anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 305–334.
- Shi, L., 1992. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J. Exp. Med.* 176, 1521–1529.
- Shin, T., Nakayama, T., Akutsu, Y., Motohashi, S., Shibata, Y., Harada, M., Kamada, N., Shimizu, C., Shimizu, E., Saito, T., Ochiai, T., Taniguchi, M., 2001. Inhibition of tumor metastasis by adoptive transfer of IL-12-activated V α 14 NKT cells. *Int J Cancer.* 91, 523–528.

- Shissler, S.C., Lee, M.S., Webb, T.J., 2017. Mixed Signals: Co-Stimulation in Invariant Natural Killer T Cell-Mediated Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 8, 1447.
- Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., et al., 1999. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285, 412–415.
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I., 2000. NKT cells and tumor immunity—a double-edged sword. *Nat. Immunol.* 1, 459–460.
- Spierings, E., 2014. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens* 84, 374–360.
- Storb, R., Deeg, H.J., Whitehead, J., et al., 1986. Methotrexate and Cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med.* 314, 729–735.
- Takahashi, T., Chiba, S., Nieda, M., Azuma, T., Ishihara, S., Shibata, Y., Juji, T., Hirai, H., 2002. Cutting Edge: Analysis of Human V α 24⁺ CD8⁺ NK T Cells Activated by α -Galactosylceramide-Pulsed Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* 168, 3140–3144.
- Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., Gagin, S., Liu, C., Cooke, K.R., Ferrara, J.L.M., 2002. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat. Med.* 8, 575–581.
- Tewary, P., Yang, D., de la Rosa, G., Li, Y., Finn, M.W., Krensky, A.M., Clayberger, C., Oppenheim, J.J., 2010. Granulysin activates antigen-presenting cells through TLR4 and acts as an immune alarmin. *Blood* 116, 3465–3474.
- Toubai, T., Tawara, I., Sun, Y., Liu, C., Nieves, E., Evers, R., Friedman, T., Korngold, R., Reddy, P., 2012. Induction of acute GVHD by sex-mismatched H-Y antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic-derived antigen-presenting cells. *Blood* 119, 3844–3853.
- Toura, I., Kawano, T., Akutsu, Y., Nakayama, T., Ochiai, T., Taniguchi, M., 1999. Cutting Edge: Inhibition of Experimental Tumor Metastasis by Dendritic Cells Pulsed with α -Galactosylceramide. *J. Immunol.* 163, 2387–2391.
- Uchida, T., Horiguchi, S., Tanaka, Y., Yamamoto, H., Kunii, N., Motohashi, S., Taniguchi, M., Nakayama, T., Okamoto, Y., 2008. Phase I study of α -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 337–345.
- van der Vliet, H.J.J., Wang, R., Yue, S.C., Koon, H.B., Balk, S.P., Exley, M.A., 2008. Circulating Myeloid Dendritic Cells of Advanced Cancer Patients Result in Reduced Activation and a Biased Cytokine Profile in Invariant NKT Cells. *J. Immunol.* 180, 7287–7293.
- Van Kaer, L., Wu, L., 2018. Therapeutic Potenzial of Invariant Natural Killer T Cells in Autoimmunity. *Front. Immunol.* 9, 519.
- Vizcardo, R., Masuda, K., Yamada, D., Ikawa, T., Shimizu, K., Fujii, S., Koseki, H., Kawamoto, H., 2013. Regeneration of Human Tumor Antigen-Specific T Cells from iPSCs Derived from Mature CD8⁺ T Cells. *Cell Stem Cell* 12, 31–36.
- Wingender, G., Krebs, P., Beutler, B., Kronenberg, M., 2010. Antigen-Specific Cytotoxicity by Invariant NKT Cells In Vivo Is CD95/CD178-Dependent and Is Correlated with Antigenic Potency. *J. Immunol.* 185, 2721–2729.
- Wolf, B.J., Choi, J.E., Exley, M.A., 2018. Novel Approaches to Exploiting Invariant NKT Cells in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 9, 384.
- Wolschke, C., Stübig, T., Hegenbart, U., Schönland, S., Heinzelmann, M., Hildebrandt, Y., Ayuk, F., Atanackovic, D., Dreger, P., Zander, A., Kröger, N., 2013. Postallograft lenalidomide induces strong NK cell-mediated antimyeloma activity and risk for T cell-mediated GvHD: Results from a phase I/II dose-finding study. *Exp. Hematol.* 41, 134–142.
- Wu, C., Zhang, Y., Jiang, Y., Wang, Q., Long, Y., Wang, C., Cao, X., Chen, G., 2013. Apoptotic cell administration enhances pancreatic islet engraftment by induction of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 393–402.
- Wykes, M.N., Lewin, S.R., 2018. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 91–104.
- Yamada, D., Iyoda, T., Vizcardo, R., Shimizu, K., Sato, Y., Endo, T.A., Kitahara, G., Okoshi, M., Kobayashi, M., Sakurai, M., Ohara, O., Taniguchi, M., Koseki, H., Fujii, S., 2016. Efficient Regeneration of Human V α 24⁺ Invariant Natural Killer T Cells and Their Anti-Tumor Activity In Vivo: In Vivo Anti-Tumor Activity of Human iPSC-NKT Cells. *Stem Cells* 34, 2852–2860.
- Yu, H., Tian, Y., Wang, Y., Mineishi, S., Zhang, Y., 2019. Dendritic Cell Regulation of Graft-Vs.-Host Disease: Immunostimulation and Tolerance. *Front. Immunol.* 10, 93.
- Zhang, L., Yu, J., Wei, W., 2018. Advance in Targeted Immunotherapy for Graft-Versus-Host Disease. *Front. Immunol.* 9, 1087.

- Zhang, Y., Louboutin, J.-P., Zhu, J., Rivera, A.J., Emerson, S.G., 2002. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* 109, 1335-1344.
- Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y.-P., Yamashita, T., Teneberg, S., Wang, D., Proia, R.L., Lavery, S.B., Savage, P.B., Teyton, L., Bendelac, A., 2004. Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells. *Science* 306, 1786-1789.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
µM	Mikrometer
2-ME	2-Mercaptoethanol
7AAD	7-Actinomycin D
aAPC	Artifizielle APC (engl.: artificial APC)
AF	Alexa Fluor
aGvHD	Akute GvHD
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl.: antigen presenting cell)
ATG	Antithymozytenglobulin
BD	Becton Dickinson
BSA	Kälberserum Albumin (engl.: bovine serum albumin)
BV	Brilliant Violett
BYU	Birmingham Young University
CD	Cluster of Differentiation
cDCs	Klassische DC (engl.: classical DC)
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
cGvHD	Chronische GvHD
CMA	Concanamycin A
CML	Chronische myeloische Leukämie
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cy	Cyanin
DC	Dendritische Zelle (engl.: dendritic cell)
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab	French–American–British classification
FACS	Fluorescence activated cell sorting
°C	Grad Celcius
engl	Englisch
FBS	Fetal bovine serum
FCR	Fragment Crystallisable Rezeptor
FITC	Fluorescein
flt3-l	Fms like tyrosine kinase 3
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl.: Forward scatter)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Cell Stimulation Factor
GMP	Good Manufacturing Practice
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl.: graft-versus-host disease)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie (engl.: graft-versus-leukemia)
h	Stunde (engl.: hour)
hIL	Humanes Interleukin
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IE	Internationale Einheiten
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin

Verzeichnisse

iNKT-Zelle	Invariante natürliche Killer T-Zelle
iPS-Zelle	Induziert pluripotente Stammzelle
Klf4	Krüppel-like factor 4
KLRB1	Killer cell lectin-like receptor
LD	Lebend/Tot (engl.: live dead)
LEAF	Low endotoxin free
LLT-1	Induction of lectin-like transcript 1
Luc	Luciferase
MACS	Magnetic activated cell sorting
mDCs	Myeloide DC
MEM	Minimum Essential Medium
MFI	Mean fluorescence intensity
mHA	Minor Histocompatibility Antigen
MHC	Minor Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
MLR	Gemischte Lymphozyten Reaktion (engl.: mixed lymphocyte reaction)
MMUD	Mismatched unrelated donor
Mo-DC	Monocyte derived DC
MRD	Matched related donor
MUD	Matched unrelated donor
NIH	National Institutes of Health
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBMCs	Peripheral Blood Mononucleated Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS44	α -GalCer (C24:1)
PBS57	6'-deoxy-6'-NHAc- α -GalCer (C24:1)
PD-L	Programmed death ligand
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidium Iodide
PLZF	Promyelocytic leukaemia zinc finger protein
RIC	Intensitätsreduzierte Konditionierung (engl. reduced intensityconditioning)
rpm	Rounds per minute
RPMI	Royal Park Memorial Institute
scf	Stemcell factor
Si-RNA	Small-interfering RNA
SSC	Seitwärtstreulicht (engl.: sidewardscatter)
SZT	Stammzelltransplantation
t-ALL	Akute T-Zell lymphatische Leukämie
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl.: T-cell receptor)
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLI	Totale Lymphozythenbestrahlung (engl.: total lymphoid irradiation)
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg	Regulatorische T-Zelle (engl.: Regulatory T-cell)
ZVAD	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone
α -GalCer	α -Galactosylceramide

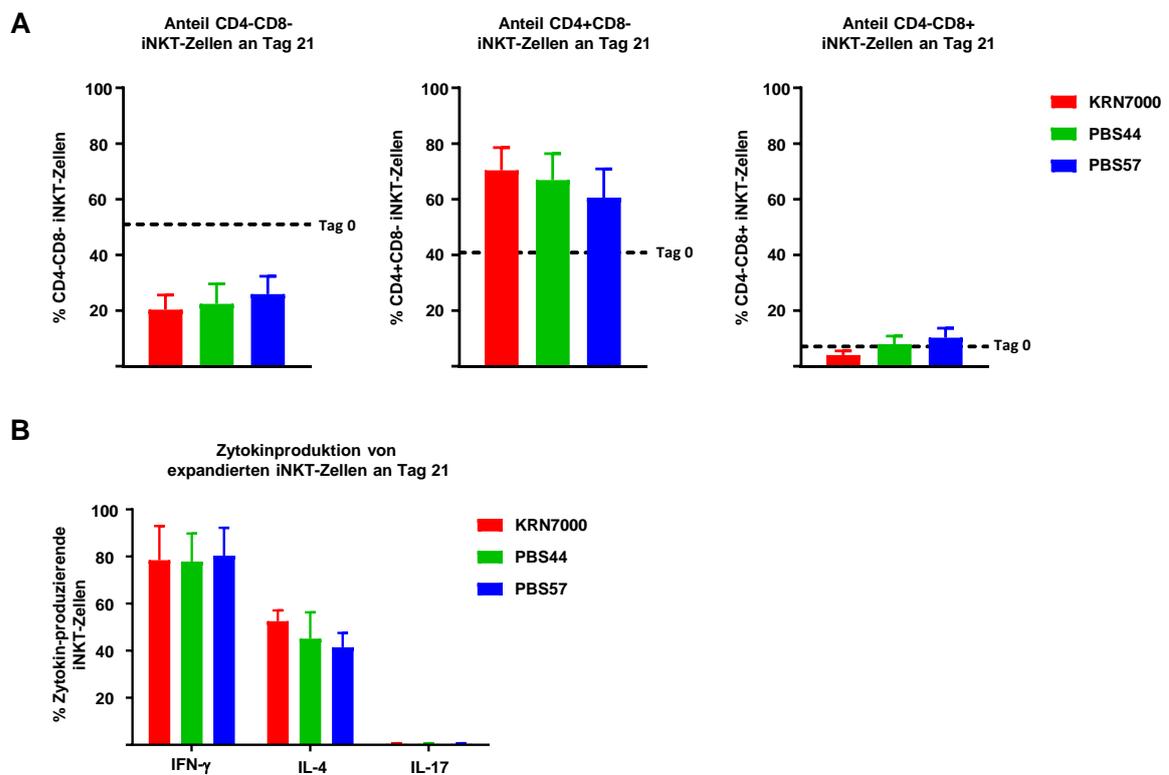
6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung einer GvHD.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung alloreaktiver T-Zellen bei der Pathogenese einer GvHD.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Rolle von iNKT-Zellen bei der Regulation von Immunantworten im Zusammenspiel mit anderen Immunzellen.....	11
Abbildung 4: <i>Ex vivo</i> Expansion und Aufreinigung von iNKT-Zellen.....	45
Abbildung 5: Präferentielle Expansion Th-2 polarisierter CD4+ iNKT-Zellen.....	48
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer humanen MLR.....	49
Abbildung 7: Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation durch expandierte iNKT-Zellen.....	51
Abbildung 8: Äquipotente Inhibition der Aktivierung allogener T-Zellen durch CD4-CD8-, CD4+CD8- und CD4-CD8+ iNKT-Zell-Subpopulationen.....	53
Abbildung 9: Zellkontakt-abhängige Inhibition der Aktivierung allogener T-Zellen durch expandierte iNKT-Zellen.....	54
Abbildung 10: Ausbleibende Expansion von Tregs nach Kokultur mit iNKT-Zellen.....	55
Abbildung 11: Ausbleibende Inhibition der Aktivierung mittels Dynabead stimulierter T-Zellen durch iNKT-Zellen.....	56
Abbildung 12: Induktion der Apoptose in allogenen Mo-DCs durch iNKT-Zellen.....	59
Abbildung 13: Ausbleibende Aktivierung allogener T-Zellen nach Kultur mit apoptotische Mo-DCs... ..	61
Abbildung 14: Dosisabhängige iNKT-Zell-vermittelte Induktion der Apoptose in allogenen Mo-DCs..	62
Abbildung 15: Quantitativ vergleichbare Apoptoseinduktion allogener Mo-DCs durch CD4-CD8-, CD4+CD8- und CD4-CD8+ iNKT-Zellen.....	63
Abbildung 16: Zellkontakt-abhängige Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs durch expandierte iNKT-Zellen.....	65
Abbildung 17: Blockade potenzieller Schlüsselmoleküle zur Inhibition der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion in allogenen Mo-DCs.....	67
Abbildung 18: Bestimmung der freigesetzten zytolytischen Moleküle von iNKT-Zellen nach der Kultur mit allogenen Mo-DCs.....	70
Abbildung 19: Apoptoseinduktion autologer und allogener Mo-DCs durch unstimulierte und stimulierte iNKT-Zellen.....	72
Abbildung 20: Selektive Apoptoseinduktion in typischerweise in Transplantaten enthaltenen Zellen durch expandierte iNKT-Zellen.....	74
Abbildung 21: Dosisabhängige Lyse von Tumorzelllinien und primären Leukämiezellen durch expandierte iNKT-Zellen.....	77
Abbildung 22: Schematische Darstellung der iNKT-Zell-vermittelten GvHD-Prävention.....	81
Abbildung 23: iNKT-Zellen vermitteln die Apoptoseinduktion von DCs über die CD1d-abhängige Freisetzung von Perforin und Granzym B.....	85
Abbildung 24: Schematische Skizze zum Ablauf einer möglichen Zytotherapie auf Basis von iNKT-Zellen.....	93

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Laborgeräte	16
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Glas- und Plastikwaren	17
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper, Lebend/Tot-Farbstoffe und Tetramere für durchflusszytometrische Färbungen	18
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten blockierenden Antikörper/Reagenzien	20
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Zytokine und Stimulanzen	20
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten gebrauchsfertigen Kits	21
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Zelllinien und primären Zellen	21
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Medien und Puffer	22
Tabelle 10: FACS-Panel zur Überprüfung der Reinheit von Mo-DCs	25
Tabelle 11: FACS-Panel zur Bestimmung des prozentualen Anteils an iNKT-Zellen	25
Tabelle 12: FACS-Panel zur Isolation von expandierten iNKT-Zellen	27
Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Microbeads für die Isolation von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, DCs und Stammzellen	27
Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Antikörper für die Überprüfung der Reinheit von T-Zellen, B- Zellen, Monozyten, NK-Zellen, DCs und Stammzellen	28
Tabelle 15: FACS-Panel für die Bestimmung der Zytokinproduktion von iNKT-Zellen	30
Tabelle 16: FACS-Panel zur Analyse der T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation alloreaktiver T- Zellen innerhalb einer MLR	31
Tabelle 17: FACS-Panel zur Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion mittels Annexin V/PI-Assay	34
Tabelle 18: FACS-Panel zur Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptose mittels Nicoletti-Assay	34
Tabelle 19: FACS-Panel zur Analyse der iNKT-Zell-vermittelten Apoptoseinduktion in allogenen Mo- DCs mittels Annexin V/PI-Assay und anschließenden ImageStream-Analysen	34
Tabelle 20: Verwendete Antikörper und Reagenzien für die Blockade der iNKT-Zell vermittelten Apoptoseinduktion	36
Tabelle 21: FACS-Panel zur Bestimmung der CD1d-Expression der im Transplantat enthaltenen Zellpopulationen	38
Tabelle 22: FACS-Panel zur Bestimmung der iNKT-Zell-vermittelte Tumorlyse	39

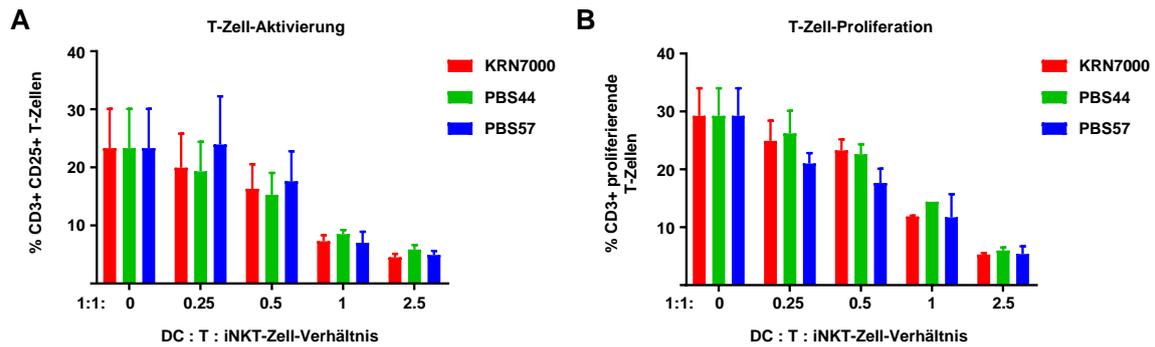
7. Anhang



Anhangsabbildung 1: Vergleichbare Subpopulationen und Zytokinproduktion von mittels KRN7000, PBS44 und PBS57 expandierten iNKT-Zellen

(A) zeigt Diagramme, die den Anteil an CD4-CD8-, CD4+CD8- und CD4-CD8+ iNKT-Zellen nach 21-tägiger Expansion mit den Glykolipiden KRN7000, PBS44 und PBS57 darstellen. Hierfür wurden iNKT-Zellen von 12 verschiedenen Spendern expandiert und auf ihre Subpopulationen hin untersucht. Die horizontal gestrichelte Linie zeigt den Anteil der jeweiligen Subpopulationen an Tag 0. Die in (B) dargestellten Diagramme zeigen die Zytokinproduktion expandierter iNKT-Zellen nach 21-tägiger Expansion. Auch hier fand die Expansion der iNKT-Zellen über die Stimulation mit den Glykolipiden KRN7000, PBS44 und PBS57 statt. Die Zytokinexpression expandierter iNKT-Zellen wurde von 4 unabhängig voneinander expandierten Buffy Coats mittels intrazellulärer Zytokinfärbung bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

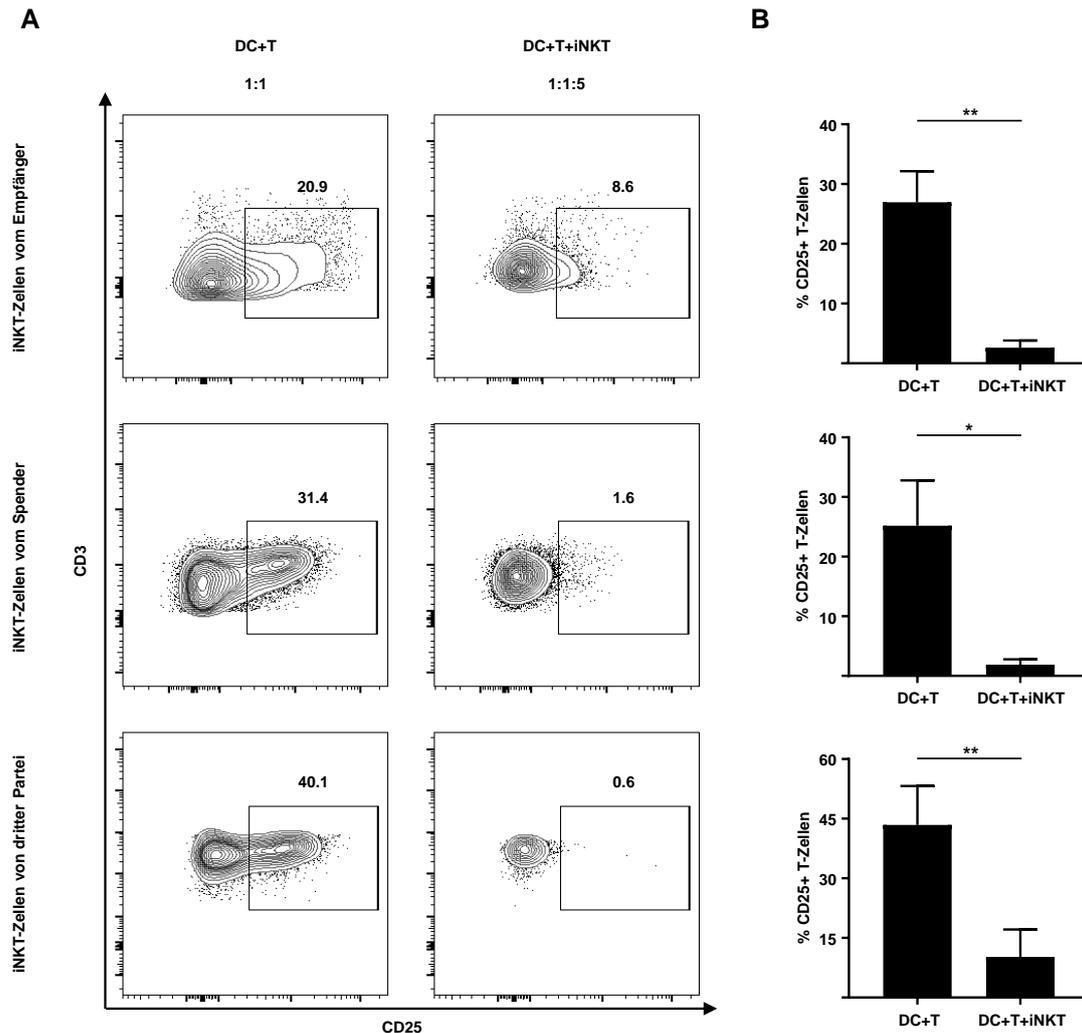
modifiziert aus Schmid *et al.*, 2018 Front Immunol



Anhangsabbildung 2: Äquipotente Inhibition der Aktivierung und Proliferation alloreaktiver T-Zellen durch mittels KRN7000, PBS44 und PBS57 expandierte iNKT-Zellen

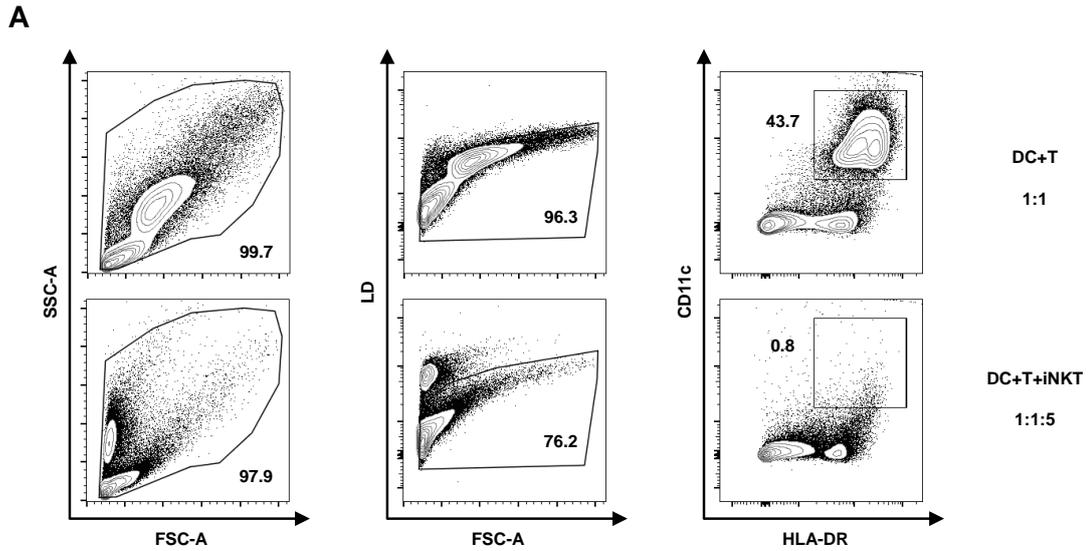
Die dargestellten Diagramme zeigen die Aktivierung (A) und Proliferation (B) allogener T-Zellen innerhalb von MLRs unter der Zugabe von iNKT-Zellen, welche mittels KRN7000 bzw. PBS44 oder PBS57 expandiert wurden. Dazu wurden DCs und T-Zellen von unterschiedlichen Spendern im Verhältnis 1:1 mit steigenden Mengen an iNKT-Zellen für 3 bzw. 7 Tage kultiviert. Die Aktivierung allogener T-Zellen wurde an Tag 3 mittels CD25 bestimmt, die T-Zell-Proliferation mittels CFSE an Tag 7. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

modifiziert aus Schmid *et al.*, 2018 Front Immunol



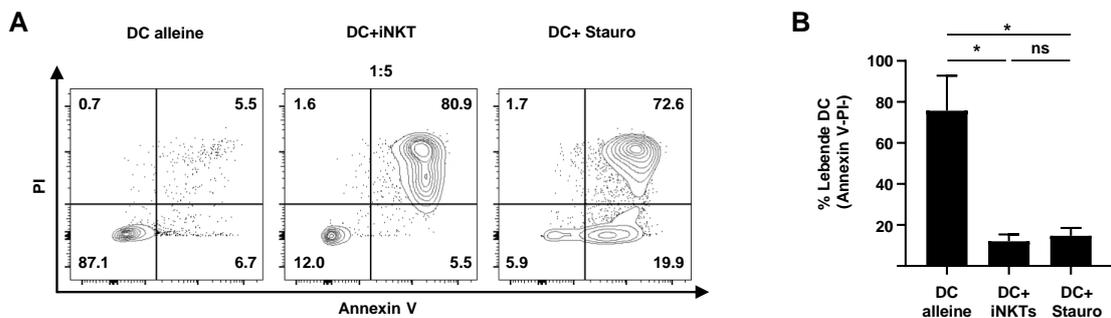
Anhangsabbildung 3: Inhibition der Aktivierung alloreaktiver T-Zellen durch expandierte Spender-, Empfänger- und Drittpartei-iNKT-Zellen

(A) zeigt repräsentative *dot plots* von CD3+ T-Zellen nach 3-tägiger Kultur mit allogenen Mo-DCs mit und ohne Zugabe von expandierten Spender-, Empfänger- oder Drittpartei-iNKT-Zellen im Verhältnis 1:1 bzw. 1:1:5. Analysiert wurde die T-Zell-Aktivierung mittels CD25. Die dargestellten Events beziehen sich auf lebende CFSE+ T-Zellen. In (B) sind 3 dieser Versuche in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



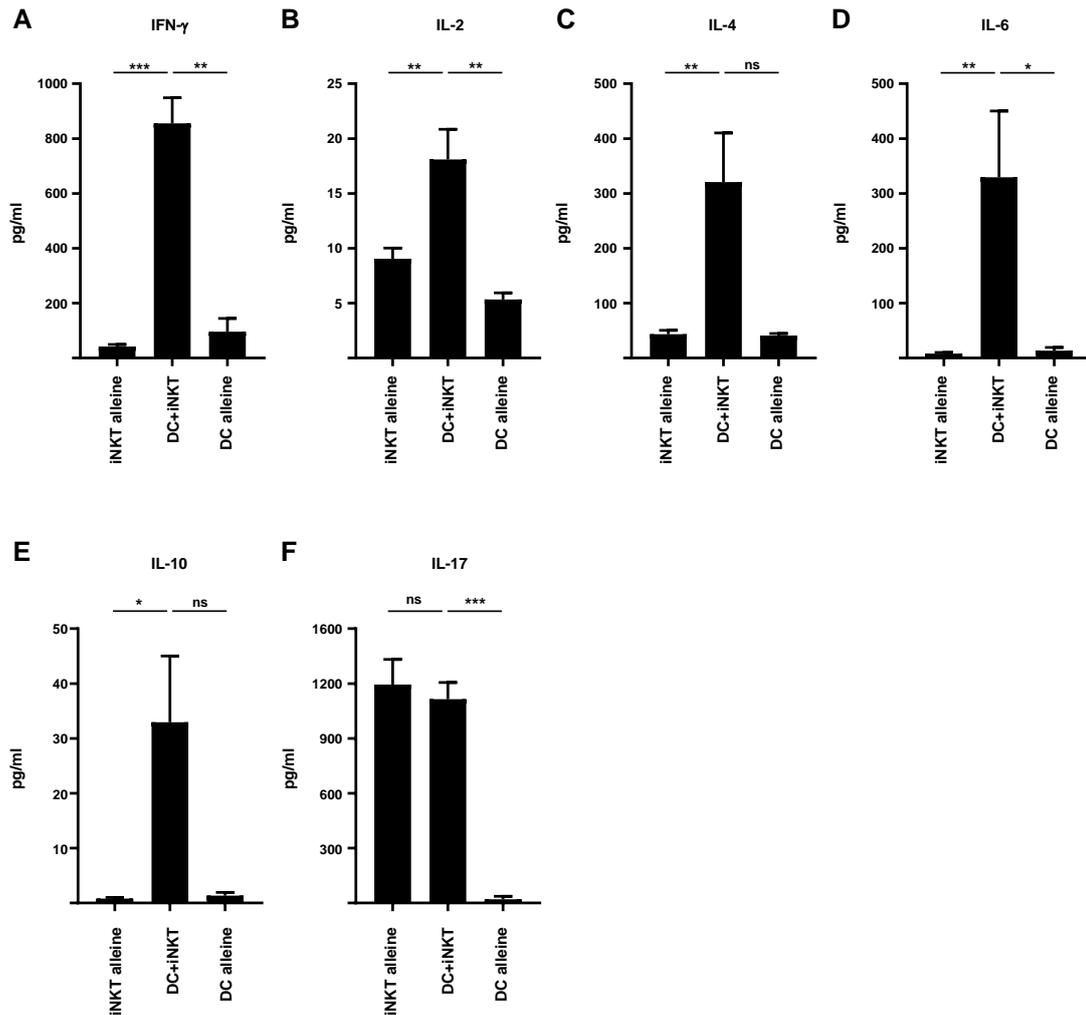
Anhangsabbildung 4: Verlust von Mo-DCs nach 3-tägiger MLR mit expandierten iNKT-Zellen

(A) zeigt exemplarische dot plots, welche die Detektion von Mo-DCs nach einer 3-tägigen MLR mit und ohne iNKT-Zellen darstellen. Hierzu wurden Mo-DCs und T-Zellen von unterschiedlichen Spendern im Verhältnis 1:1 für 3 Tage inkubiert. In der MLR mit iNKT-Zellen wurden diese zuvor expandiert und in 5-fachem Überschuss in die MLR gegeben. FSC-A/SSC-A plots ermöglichten die Analyse der in den MLRs enthaltenen Zellen anhand ihrer Größe und Granularität. Mittels LD-Farbstoff wurde die Viabilität dieser Zellen ermittelt. Anhand der Marker HLA-DR und CD11c wurde im Anschluss der Anteil lebender Mo-DCs in den durchgeführten MLRs bestimmt.



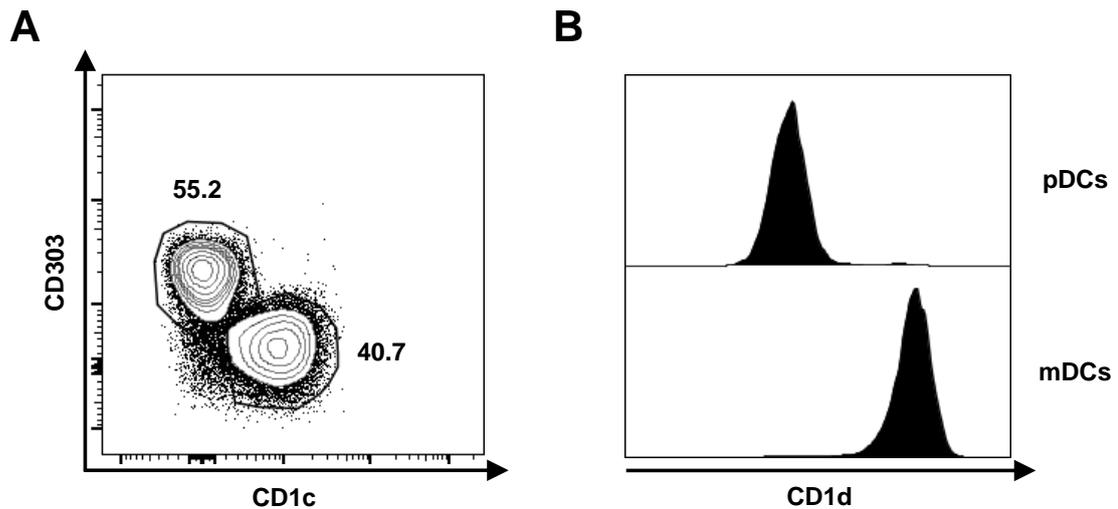
Anhangsabbildung 5: Vergleichbare Apoptoseinduktion in Mo-DCs durch expandierte iNKT-Zellen und Staurosporin

(A) zeigt repräsentative dot plots von Mo-DCs, die mittels Annexin V/PI-Färbung auf ihre Viabilität überprüft wurden. Dazu wurden Mo-DCs alleine, mit 1 µM Staurosporin oder mit iNKT-Zellen im Verhältnis 1:5 für 18 h kultiviert. Die gezeigten Events stellen Mo-DCs dar. Diese wurden durch den Ausschluss von CD3+ iNKT-Zellen selektiert. (B) zeigt ein Diagramm mit zusammengefassten Daten dieser Experimente mit Mo-DCs von 3 unterschiedlichen Spendern. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.



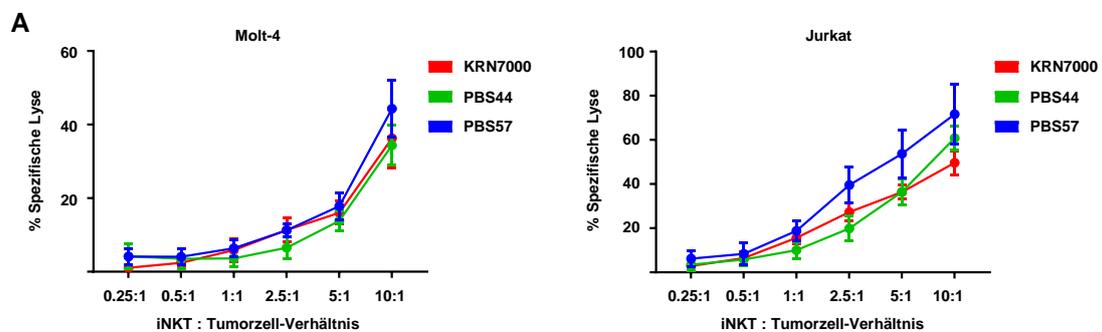
Anhangsabbildung 6: Bestimmung der freigesetzten Zytokine von iNKT-Zellen nach der Kultur mit allogeenen Mo-DCs

Anhangsabbildung 6 zeigt Diagramme, welche die Freisetzung der Zytokine IFN- γ (**A**), IL-2 (**B**), IL-4 (**C**), IL-6 (**D**), IL-10 (**E**), IL-17 (**F**) durch iNKT-Zellen alleine, DCs alleine und iNKT-Zellen und Mo-DCs nach gemeinsamer Kokultur. Die freigesetzten Zytokine wurden aus Zellkulturüberständen mittels CD8/NK LEGENDplex™ bestimmt. Die Überstände wurden aus 4-stündigen Kulturen von expandierten iNKT-Zellen und allogeenen Mo-DCs im Verhältnis von 5:1 oder iNKT-Zellen und DCs nach alleiniger Kultur gewonnen (n=5). Die Fehlerbalken zeigen den SEM, ungepaarter T-Test *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.



Anhangsabbildung 7: Analyse der CD1d-Expression von CD303+ pDCs und CD1c+ mDCs

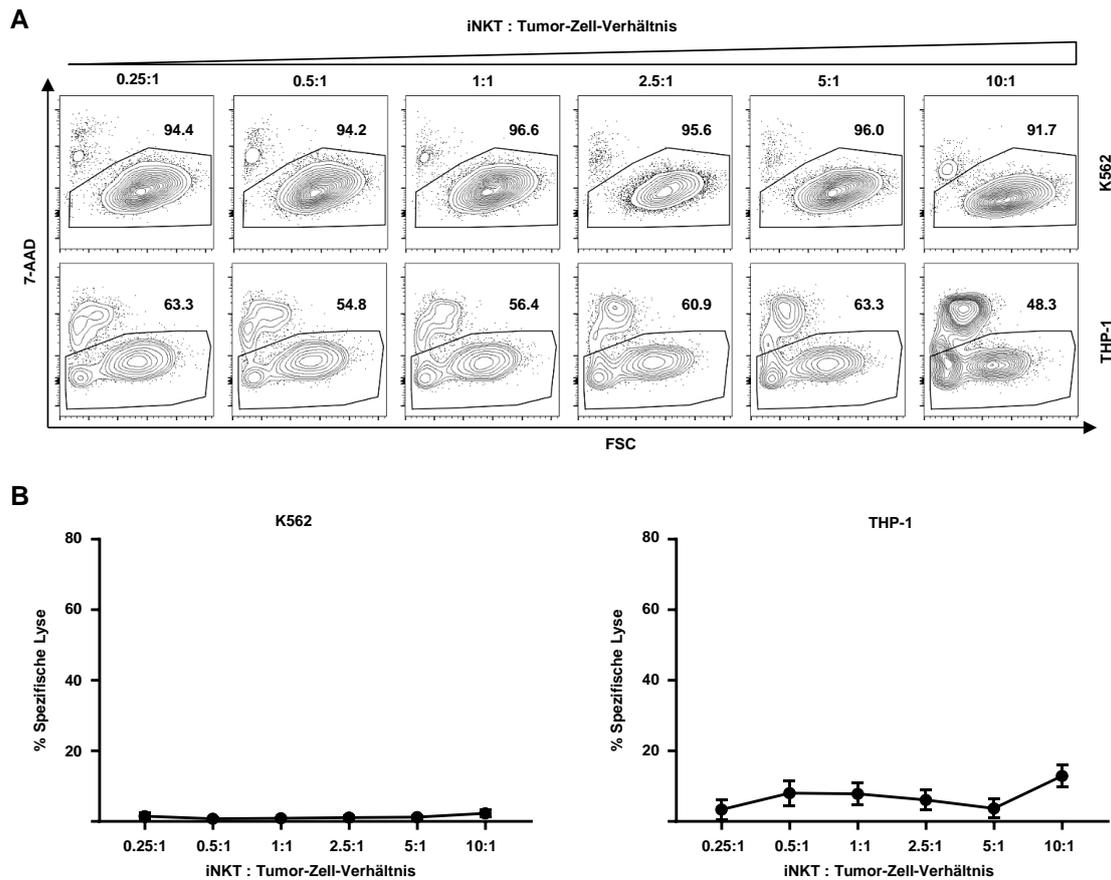
(A) zeigt einen repräsentativen *dot plot*, welcher die Unterteilung von DCs aus humanem peripherem Blut in CD303+ pDCs und CD1c+ mDCs darstellt. Die gezeigten Events beziehen sich auf lebende DCs. Diese wurden zuvor aus dem peripheren Blut gesunder Spender mittels Blood DCs Isolation Kit II aufgereinigt. (B) zeigt ein exemplarisches Histogramm der CD1d-Expression der in (A) selektierten CD303+ pDCs und CD1c+ mDCs.



Anhangsabbildung 8: Vergleichbare dosisabhängige Lyse von Tumorzelllinien durch mittels KRN7000, PBS44 und PBS57 expandierte iNKT-Zellen

Die dargestellten Diagramme zeigen die spezifische Lyse von Molt 4- (A) und Jurkat (B) Tumorzellen durch steigende Mengen an iNKT-Zellen, die entweder mittels KRN7000, PBS44 oder PBS57 für 21 Tage expandiert wurden. Jedes Diagramm zeigt zusammengefasste Daten von 4 Experimenten mit expandierten iNKT-Zellen von jeweils unterschiedlichen Spendern. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

modifiziert aus Schmid *et al.*, 2018 Front Immunol



Anhangsabbildung 9: Ausbleibende dosisabhängige Lyse von CD1d- Tumorzelllinien durch expandierte iNKT-Zellen

(A) zeigt repräsentative *dot plots* der spezifischen Lyse von K562 und THP-1 Leukämiezellen nach Kultur mit expandierten iNKT-Zellen für 18 h. Die dargestellten Events zeigen die genannten Tumorzellen. Diese wurden durch den Ausschluss von CD3+ iNKT-Zellen selektiert. Ohne die Kultur mit iNKT-Zellen hatten K562-Zellen eine durchschnittliche Viabilität von 96,1 %. Die basale Viabilität von THP-1-Zellen lag bei 71,0 %. Die dazugehörigen Diagramme in (B) umfassen zusammengefasste Daten von 2 dieser Experimente. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

modifiziert aus Schmid *et al.*, 2018 Front Immunol

8. Danksagung

Für das Ermöglichen dieser Arbeit möchte ich insbesondere PD Dr. Dominik Schneidawind danken. Danke für die hilfreichen Diskussionen, die nicht nur dieses Projekt, sondern auch mich in meiner Persönlichkeit gefördert haben. Danke für deinen immerwährenden Optimismus.

Ein großes Dankeschön gilt Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Betreuung meiner Dissertation und die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

PD Dr. Stella Autenrieth möchte ich für die enge Zusammenarbeit und die vielen wertvollen Ratschläge danken. Ein großes Dankeschön auch an die Arbeitsgruppenmitglieder Manina, Kristin, Nicole und Jenny – danke für eure Hilfe bei Fragen und für die vielen anregenden Unterhaltungen und gemeinsame Mittagspausen.

Großer Dank gilt auch Dr. Corina Schneidawind für hilfreiche Tipps und die bereitwillige Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch allen aktuellen und ehemaligen Laborkolleginnen und -kollegen aussprechen, die mich während meiner Doktorarbeitszeit begleitet und unterstützt haben: Silke, Hilde, Kathy, Felix, Timo, Marcus, Simona, Elisa, Lukas, Jakob, Bianca, Ruoyun und Emma. Vielen Dank für die schöne und unvergessliche Zeit im Labor, unterhaltsame Kongressteilnahmen und die lustigen Unternehmungen auch außerhalb des Labors. Ihr wart immer meine kleine Laborfamilie für mich.

Bedanken möchte ich mich zudem bei allen Mitarbeitern der AG Salih und der AG Skokowa für die vielen lustigen Momente auf der Ebene II.

Bei meinen Freunden und meiner gesamten Familie möchte ich mich für die immerwährende Unterstützung und euren Rückhalt bedanken. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Frau Daniela bedanken. Danke für deine Liebe und dein Verständnis.